

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİSFENOL A'NIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) PRİMORDİYAL
GERM HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
HİSTOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cansu AKBULUT

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Nazan Deniz KOÇ

Haziran 2012

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİSFENOL A'NIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) PRIMORDİYAL
GERM HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
HİSTOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**


YÜKSEK LİSANS TEZİ


Cansu AKBULUT

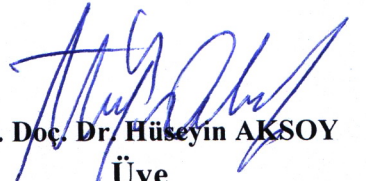
Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Enstitü Bilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 04/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Nazan Deniz KOÇ
Üye


Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY
Üye

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmam sırasında bana büyük emek ve katkıları bulunan saygıdeğer Hocam Yrd. Doç. Dr. Nazan Deniz KOÇ baőta olmak üzere, tezimin moleküler kısmını Dresden Teknik Üniversitesi'nde yapmama olanak tanıyan ve moleküler çalıőmalarıma yön veren, bilgi ve tavsiyelerinden yararlandığım sayın Dr. ağhan KIZIL'a, fikirleriyle ve tez sonuçlarının istatistiksel değerlendirme sürecinde yardımlarını esirgemeyen Hocam Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a, lisansüstü öğrenimim süresince bana sürekli destek olan Ankara Üniversitesi'ndeki Hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisansımı 2210 – Yurtiçi Yüksek Lisans Burs Programı ile destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım Arő. Gör. Tarık DİN ve Arő. Gör. Ahmet Ali BERBER baőta olmak üzere tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma, tüm yaşamım boyunca en büyük destek kaynağım olan annem Fazilet TÜFEKçİOğLU ve kardeőim Can AKBULUT baőta olmak üzere tüm aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvi
SUMMARY.....	xvii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri.....	2
2.1.1. Zebra balığının sistematığı.....	2
2.1.2. Zebra balığının biyolojisi ve morfolojisi.....	2
2.3. Zebra Balığı Gelişim Aşamaları.....	3
2.3.1. Zigot evresi.....	3
2.3.2. Segmentasyon (yarıklanma) evresi.....	4
2.3.3. Morula ve blastula evresi.....	5
2.3.4. Gastrula evresi.....	6
2.3.5. Faringula evresi.....	9
2.3.6. Kuluçka evresi.....	9
2.3.7. Larval evre.....	9
2.3.8. Genç (juvenil) evre.....	9
2.3.9. Ergin evre.....	9

2.4. Kök Hücre.....	10
2.4.1. Primordiyal germ hücreleri.....	11
2.5. Endokrin Bozucular.....	18
2.5.1. Bisfenol A.....	20
2.5.1.1. BPA'nın yıkımı.....	26
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOD.....	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>).....	28
3.1.2. Ortam koşulları.....	28
3.2. Metod.....	29
3.2.1. Primordiyal germ hücrelerinin histolojisi.....	29
3.2.1.1. Fiksasyon.....	29
3.2.1.2. Dehidratasyon.....	30
3.2.1.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme.....	30
3.2.1.4. Kesit alınması.....	30
3.2.1.5. Boyama ve inceleme.....	30
3.2.2. Whole mount in situ hibridizasyon yöntemi.....	33
3.2.2.1. Solüsyonların hazırlanması.....	33
3.2.2.2. Ön işlem.....	35
3.2.2.3. Dehidrasyon.....	35
3.2.2.4. Proben hazırlanışı.....	35
3.2.2.5. ISH 1. gün.....	37
3.2.2.6. ISH 2. gün.....	38
3.2.2.7. ISH 3. gün.....	39
3.2.3. Akridin turuncusu boyaması.....	40
BÖLÜM 4.	
BULGULAR.....	41
4.1. Zebra Balığında Gelişim Evreleri ve Stereo Mikroskop Bulguları... 41	41
4.1.1. Kontrol grubu.....	41
4.1.2. Çözücü kontrol grubu.....	46

4.1.3. 4mg/L BPA uygulaması yapılmış grup.....	48
4.1.4. 8mg/L BPA uygulaması yapılmış grup.....	49
4.2. Akridin Turuncusu Boyama Bulguları.....	51
4.3. Whole Mount In Situ Hibridizasyon Bulguları.....	52
4.4. Histolojik Bulgular (Işık Mikroskobu Bulguları).....	57
4.4.1. Kontrol grubu histolojik bulguları.....	57
4.4.2. Çözücü kontrol grubunun histolojik bulguları.....	67
4.4.3. 4 mg/L BPA grubunun histolojik bulguları.....	77
4.4.4. 8 mg/L BPA grubunun histolojik bulguları.....	89
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA.....	97
KAYNAKLAR.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	113

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BPA	: Bisfenol A
PGH	: Primordiyal germ hücresi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
VST	: Vitellus sinsitiyal tabakası
PL	: Primordiyal germ benzeri
<i>ody</i>	: <i>Odysseus</i>
SDF-1a	: Stromal cell derived factor 1-a
EDCs	: Endokrin bozucu kimyasallar
DES	: Dietilstilbestrol
ER	: Östrojen reseptörü
EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
LOAEL	: Gözlemlenebilir en düşük etki değeri
ADI	: Günlük alınabilecek doz
PET	: Polietilen tereftalat
HDPE	: Yüksek dansiteli polietilen
PVC	: Polivinil klorür
LDPE	: Düşük dansiteli polietilen
MCF-7	: İnsan göğüs kanseri hücre hattı
NIH3T3	: Androjenik aktiviteye fare fibroblast hücre hattı
GH3	: Hipfiz hücre hattı
BPAS	: Bisfenol A sülfat
BPAGA	: BPA glukronik asit
UDP	: Üridin difosfat
Hyb	: Hibridizasyon tampon
$T_{1/2}$: Yarı ömür
EtOH	: Etil alkol

MeOH	: Metil alkol
PFA	: Paraformaldehit
dk	: Dakika
mg	: Milligram
g	: Gram
μ g	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
L	: Litre
cm	: Santimetre
sn	: Saniye
hpf	: Döllenenmeden sonra saat
dpf	: Döllenenmeden sonra gün
vk	: Vitellus kesesi
k	: Kas tabakası
s	: Somit
sh	: Somatik hücre
b	: Baş
k	: Kuyruk
ko	: Koryon

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Dişi ve erkek zebra balığı.....	3
Şekil 2.2.	Zebra balığında döllenmiş yumurta.....	3
Şekil 2.3.	Zebra balığının döllenmiş yumurtası.....	4
Şekil 2.4.	Zebra balığı embriyosunda segmentasyon ve morula evreleri.....	5
Şekil 2.5.	Zebra balığında morula blastula evreleri.....	6
Şekil 2.6.	Zebra balığı embriyosunda gastrulasyon	7
Şekil 2.7.	Zebra balığında somitlerin oluşumu	8
Şekil 2.8.	Zebra balığı larvası.....	9
Şekil 2.9.	Ergin zebra balığı.....	10
Şekil 2.10.	Hematoksilen-Eosin boyaması yapılmış primordiyal germ hücreleri.....	13
Şekil 2.11.	Zebra balığı gelişiminde primordiyal germ hücrelerinin ilk 24 saatteki göçü.....	14
Şekil 2.12.	Primordiyal germ hücrelerinin göç mekanizması.....	16
Şekil 2.13.	Bisfenol A'nın yapısı.....	21
Şekil 2.14.	Bisfenol A'nın fenol ve asetondan kondensasyonu.....	22
Şekil 2.15.	Polikarbonat yapıdan ester bağlarının hidrolizi sonucu BPA oluşması.....	23
Şekil 4.1.	Döllenmiş ve döllenmemiş zebra balığı yumurtası.....	41
Şekil 4.2.	Zebra balığı embriyosunda 0 ve 2 blastomerli evre.....	42
Şekil 4.3.	Zebra balığı embriyosunda 4 ve 8 blastomerli evre.....	42
Şekil 4.4.	Zebra balığı embriyosunda 32 ve 64 blastomerli evre.....	43
Şekil 4.5.	Zebra balığı embriyosunda gastrulasyon.....	44
Şekil 4.7.	18 saatlik zebra balığı embriyosu	45
Şekil 4.8.	24 saatlik zebra balığı embriyosu.....	45
Şekil 4.9.	2 günlük zebra balığı embriyosu.....	46

Şekil 4.10.	3 günlük zebra balığı embriyosunun koryondan çıkışı.....	46
Şekil 4.11.	6 günlük prelarva ve 8 günlük larva.....	47
Şekil 4.12.	Çözücü kontrol grubundaki embriyo ve larvaların gelişimi.....	47
Şekil 4.13.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyo ve larvaları	48
Şekil 4.14.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyo ve larvaları.....	50
Şekil 4.15.	Akridin turuncusu boyaması yapılmış 24 saatlik zebra balığı embriyoları	52
Şekil 4.16.	vasa genine ait RNA'nın elektroforetik görüntüsü.....	53
Şekil 4.17.	24 saatlik zebra balığı embriyosunda vasa-pozitif (primordiyal germ hücre) hücre sayım grafiği	53
Şekil 4.18.	Whole mount in situ hibridizasyon ile belirlenmiş primordiyal germ hücreleri.....	54
Şekil 4.19.	1 günlük zebra balığı embriyosunun 5µm lik kesiti.....	58
Şekil 4.20.	2 günlük zebra balığı embriyosu.....	59
Şekil 4.21.	3 günlük zebra balığı prelarvasında vitellus kesesinin üst bölgesinde gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	59
Şekil 4.22.	4 günlük zebra balığı prelarvası.....	60
Şekil 4.23.	5 günlük zebra balığı prelarvasında göç yolu üzerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	61
Şekil 4.24.	5 günlük zebra balığı prelarvasında kas tabakasının altında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	61
Şekil 4.25.	5 günlük zebra balığı prelarvasında kas tabakasının altında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	62
Şekil 4.26.	7 günlük zebra balığı prelarvasında kas tabakasının altında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	62
Şekil 4.27.	7 günlük zebra balığı prelarvasında vücut boşluğunun dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücresi.....	63
Şekil 4.28.	9 günlük zebra balığı larvasında kas tabakasının alt bölgesinde gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	63
Şekil 4.29.	9 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu yakınında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	64

Şekil 4.30.	10 günlük zebra balığı larvasında somitler ile vücut boşluğu arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	65
Şekil 4.31.	10 günlük zebra balığı larvasında somitler ile vücut boşluğu arasında gözlenen primordiyal germ hücresi.....	65
Şekil 4.32.	13 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu yakınlarında göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri.....	66
Şekil 4.33.	15 günlük zebra balığı larvasında gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri.....	66
Şekil 4.34.	15 günlük zebra balığı larvasında gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri.....	67
Şekil 4.35.	%1 oranında DMSO uygulaması yapılmış 2 günlük zebra balığı embriyosu.....	68
Şekil 4.36.	%1 oranında DMSO uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvası.....	68
Şekil 4.37.	%1 oranında DMSO uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvası.....	69
Şekil 4.38.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvasında göç yolu üzerindeki primordiyal germ hücreleri....	70
Şekil 4.39.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında solungaç taslakların bulunduğu bölgede tespit edilen primordiyal germ hücreleri	70
Şekil 4.40.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında göz çevresinde görülen primordiyal germ hücreleri.....	71
Şekil 4.41.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 9 günlük zebra balığı larvasında somitler ile vücut boşluğu arasında gözlenen primordiyal germ hücresi	71
Şekil 4.42.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 9 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu kenarında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	72

Şekil 4.43.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 9 günlük zebra balığı larvasında barsak taslaklarında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	72
Şekil 4.44.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 10 günlük zebra balığı larvasında primordiyal germ hücreleri.....	73
Şekil 4.45.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 10 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu çevresinde bulunan primordiyal germ hücreleri.....	74
Şekil 4.45.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 10 günlük zebra balığı larvasında solungaç taslaklarının bulunduğu bölgede görülen primordiyal germ hücreleri.....	74
Şekil 4.47.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 10 günlük zebra balığı larvasında göz çevresindeki primordiyal germ hücreleri.....	75
Şekil 4.48.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 11 günlük larvada gonad taslaklarına göç eden primordiyal germ hücreleri.....	75
Şekil 4.49.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 11 günlük zebra balığı larvalarında solungaç taslaklarındaki primordiyal germ hücreleri.	76
Şekil 4.50.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 11 günlük zebra balığı larvalarında göz çevresinde bulunan primordiyal germ hücresi....	76
Şekil 4.51.	%1 DMSO uygulaması yapılmış 14 günlük zebra balığı larvalarında göz çevresinde bulunan primordiyal germ hücresi....	77
Şekil 4.52.	4 mg/L BPA uygulanmış 2 günlük zebra balığı embriyosunun 5µm'lik kesiti.....	78
Şekil 4.53.	4 mg/L BPA uygulanmış 2 günlük zebra balığı embriyosunun 5µm'lik kesiti.....	78
Şekil 4.54.	4 mg/L BPA uygulanmış 2 günlük zebra balığı embriyosunun 5µm'lik kesiti.....	79
Şekil 4.55.	4 mg/L BPA uygulanmış 3 günlük zebra balığı embriyosunun 5µm'lik kesiti.....	80
Şekil 4.56.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı embriyolarında vitellüs kesesi sınırında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	80

Şekil 4.57.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı embriyolarında vitellüs kesesi sınırında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	81
Şekil 4.58.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı embriyolarında vitellüs kesesi ve somitler arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	81
Şekil 4.59.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı embriyolarında somitlerin yakınında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	82
Şekil 4.60.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı embriyolarında ektopik bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	83
Şekil 4.61.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı embriyolarında solungaç taslaklarında gözlenen primordiyal germ hücresi.....	83
Şekil 4.62.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı larvasında göç yolu üzerinde görülen primordiyal germ hücreleri.....	84
Şekil 4.63.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı larvasında görülen primordiyal germ hücreleri.....	84
Şekil 4.64.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı larvasında ektopik bölgelerde görülen primordiyal germ hücreleri.....	85
Şekil 4.65.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı larvasında ektopik bölgelerde görülen primordiyal germ hücreleri.....	85
Şekil 4.66.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 11 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu yakınlarında görülen primordiyal germ hücreleri.....	86
Şekil 4.67.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 12 günlük zebra balığı larvasında somitlere sınır olan bölgede bulunan yalancı ayaklara sahip olan primordiyal germ hücreleri.....	87

Şekil 4.68.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 12 günlük zebra balığı larvasında ektopik bölgedeki primordiyal germ hücresi.....	87
Şekil 4.69.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 13 günlük zebra balığı larvasında somitler ile vücut boşluğu arasında bulunan bölgedeki primordiyal germ hücreleri	88
Şekil 4.70.	4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 13 günlük zebra balığı larvasında somitlere sınır olan bölgede bulunan primordiyal germ hücreleri.....	88
Şekil 4.71.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 3 günlük zebra balığı embriyolarında vitellus kesesinin dorsal sınırında gözlenen primordiyal germ hücreleri	90
Şekil 4.72.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 4 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesi sınırında gözlenen primordiyal germ hücreleri.....	90
Şekil 4.73.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 4 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesinin dorsal sınırında görülen primordiyal germ hücreleri,.....	91
Şekil 4.74.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesi sınırında görülen primordiyal germ hücreleri.....	91
Şekil 4.75.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesinin dorsal sınırında izlenen primordiyal germ hücreleri.....	92
Şekil 4.76.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesinin dorsal sınırında görülen primordiyal germ hücreleri.....	93
Şekil 4.77.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesinin ventral sınırında tespit edilen primordiyal germ hücreleri	94
Şekil 4.78.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında somitlerin ventralinde izlenen primordiyal germ hücreleri.....	94

Şekil 4.79.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında vücut boşluğu kenarında izlenen primordiyal germ hücreleri.....	95
Şekil 4.80.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında ektopik bölgedeki primordiyal germ hücresi.....	95
Şekil 4.81.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı prelarvalarında kas tabakasının altında gözlenen primordiyal germ hücresi.....	96
Şekil 4.82.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı prelarvalarında ektopik bölgede gözlenen primordiyal germ hücresi.....	96
Şekil 4.83.	8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı prelarvalarında solungaç taslaklarında gözlenen primordiyal germ hücresi.....	97

TABLULAR LİSTESİ

Şekil 3.1.	Işık mikroskobu için fiksasyon (tespit) uygulaması.....	29
Şekil 3.2.	Işık mikroskobu için dehidratasyon uygulaması.....	30
Şekil 3.3.	Işık mikroskobu için Harris Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi.....	31
Şekil 3.4.	Işık mikroskobu için Eosin stoğu hazırlanması.....	31
Şekil 3.5.	Işık mikroskobu için Best Carmin boyasının hazırlanması.....	32
Şekil 3.6.	Işık mikroskobu için Best Carmin boyama yöntemi.....	32
Şekil 4.1.	BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarındaki toplam PGH frekansı.....	55
Şekil 4.2.	BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarında doğru bölgeye göç eden PGH frekansı.....	56
Şekil 4.3.	BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarında ektopik bölgelerdeki PGH frekansı.....	56
Şekil 4.4.	BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarında ektopik ve toplam PGH frekansı.....	57

ÖZET

Anahtar kelimeler: Bisfenol A, Zebra Balığı (*Danio rerio*), Primordiyal Germ Hücreleri

Bisfenol A (BPA)'nın zebra balığı primordiyal germ hücreleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada whole mount in situ hibridizasyon, akridin turuncusu boyaması ve histolojik analizler yapılmıştır. Bunun yanı sıra BPA'nın gelişim üzerinde etkisinin olup olmadığı stereo mikroskop bulguları ile incelenmiştir.

4mg/L ve 8 mg/L dozlarla yapılan bu çalışmada zebra balığı embriyo ve larvalarında morfolojik bozukluklar gözlenmiştir. Akridin turuncusu boyaması sonucunda düşük dozlarda BPA uygulamasının apoptoza sebep olmadığı tespit edilmiştir. Whole mount in situ hibridizasyon tekniği ile primordiyal germ hücre sayısının arttığı ve bazı primordiyal germ hücrelerinin ektopik bölgelerde bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca, histolojik teknikler ile primordiyal germ hücre göçü 15 gün boyunca izlenmiştir. Bu çalışma sonucunda BPA uygulamasının primordiyal germ hücre sayısında artışa sebep olduğu, primordiyal germ hücrelerinin ektopik bölgelere yönelmesini sağladığı, primordiyal germ hücrelerinde nuage materyalinde ve glikojen tanelerinde azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BISPHENOL A ON ZEBRAFISH (*Danio rerio*) PRIMORDIAL GERM CELLS BY HISTOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

SUMMARY

Key Words: Bisphenol A, Zebrafish (*Danio rerio*), Primordial Germ Cells

In this study, whole mount in situ hybridization, acridine orange staining and histological analysis were used to investigate the effects of bisphenol A (BPA) on zebrafish primordial germ cells. In addition, effects of BPA on development was investigated with stereo microscopy.

In the results of research explored with 4mg/L and 8 mg/L BPA, morphological anomalies was observed. As a result of acridine orange staining, apoptosis wasn't detected with low doses of BPA application. With whole mount in situ hybridization technique, increase in primordial germ cell number was seen and some of primordial germ cells was detected at ectopic locations. Primordial germ cell migration was followed with histological analysis. After BPA exposure, increase in primordial germ cell number, migration to ectopic locations, decrease in nuage material and glycogen granules in primordial germ cells were detected.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Zebra balığı (*Danio rerio*), kolay üreme kapasitesine ve şeffaf embriyolara sahip olan ve bu yüzden bilimsel çalışmalarda sıkça tercih edilen bir omurgalı modelidir. Bisfenol A (BPA) günümüzde oldukça fazla üretilen ve plastik yapısında bulunan bir madde olduğu için insanlar da dahil olmak üzere pek çok canlı grubu bu maddeye maruz kalmaktadır. BPA ksenoöstrojen olduğundan, üremeyi de yakından etkilemektedir. Dolayısıyla çalışma boyunca zebra balığı embriyo ve larvalarına düşük dozlarda önemli bir endokrin bozucu olan BPA uygulanarak, bu maddenin üremede kilit rol oynayan primordiyal germ hücreleri üzerine olan etkileri histolojik ve moleküler yöntemlerle incelenmiştir.

Primordiyal germ hücreleri, türün devamını sağlayan sperm ve yumurtanın öncüsü olan embriyonik kök hücrelerdir. Çeşitli canlı türlerinde primordiyal germ hücreleri ile ilgili oldukça çok çalışma olmasına karşılık bu hücrelerin histolojik ve moleküler açıdan inceleyen çalışmalar yetersizdir. Embriyonun ilk döneminde, ameboid hareketle, düzenli bir göç yolu izleyen, bu süreçte önemli yapısal ve işlevsel değişiklikler gösteren primordiyal germ hücreleri göç yolları boyunca uğrayacağı engellere karşı davranışının ne olacağı merak konusu olmuştur.

Yapılan bu araştırma ile zebra balığı embriyo ve larvalarında (ilk 15 günlük süreç) primordiyal germ hücrelerinin histolojisi ve göç yollarında meydana gelen değişiklikler ilk olarak ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Primordiyal germ hücrelerinin göç yolundaki konumlarını belirlemek için whole mount in situ hibridizasyon yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca BPA'nın düşük dozlarının 24 saatlik zebra balığı embriyolarında apoptoza olan etkileri acridine turuncusu boyaması yapılarak tespit edilmiştir.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri

2.1.1. Zebra balığının sistematığı

Filum: Chordata

Subfilum: Vertebrata

Clasis: Osteichthyes

Subclasis: Actiopterygii

Superordo: Teleostei

Ordo: Cypriniformes

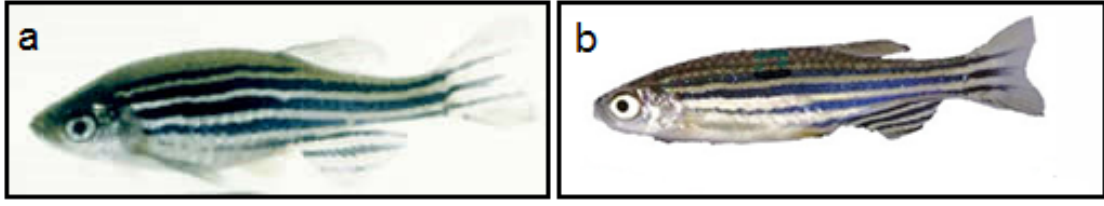
Familya: Cyprinidae

Genus: Danio

Spesies: *Danio rerio*

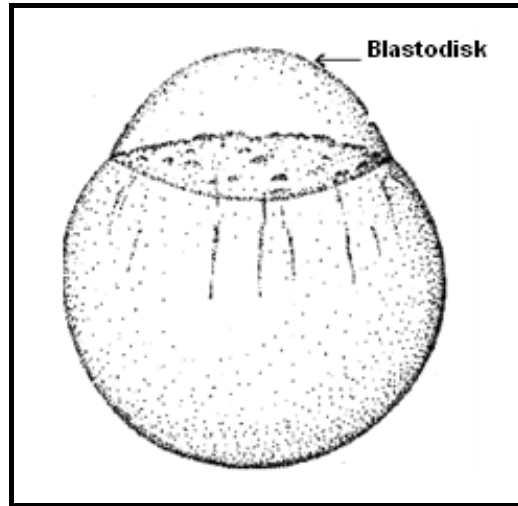
2.2. Zebra Balığının Biyolojisi ve Morfolojisi

Cyprinidae familyasına ait olan zebra balığı, doğal yaşama ortamı Hindistan, Pakistan, Bangladeş ve Güneydoğu Himalayalar olan tropikal bir balıktır (Koç, 2008). Genellikle durgun, temiz ve bol oksijenli sularda yaşarlar. Gövdelerinde 7-9 adet gümüş rengi ve mavi çizgiler vardır. Ergin bireyler 5-6 cm boyundadır. Dişilerin karınları şişkin ve erkeklerden daha iridir. Erkekler ise ince düz bir yapıya sahiptir (Şekil 2.1). Zebra balıkları oldukça hareketli balıklardır ve sürü halinde yaşarlar.



Şekil 2.1. Dişi ve erkek zebra balığı, a) Dişi zebra balığı b) Erkek zebra balığı

Zebra balıkları su sıcaklığı bakımından geniş bir yelpazede yaşayabilir. 18 - 30 °C aralığında bir sorun olmadan hayatını sürdürebilmektedir. Zebra balıklarının üremeleri oldukça kolaydır. Üremeleri için ideal sıcaklık 26-28 °C dir. Zebra balıklarını yumurtlatmak için akvaryuma dişi başına 2-3 ergin erkek birey konulur. 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ışık periyodu sonucunda her ergin dişi 50-80 civarında yumurta bırakır ve bu yumurtalar erkekler tarafından döllenir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Zebra balığında döllenmiş yumurta (Kimmel ve ark, 1995).

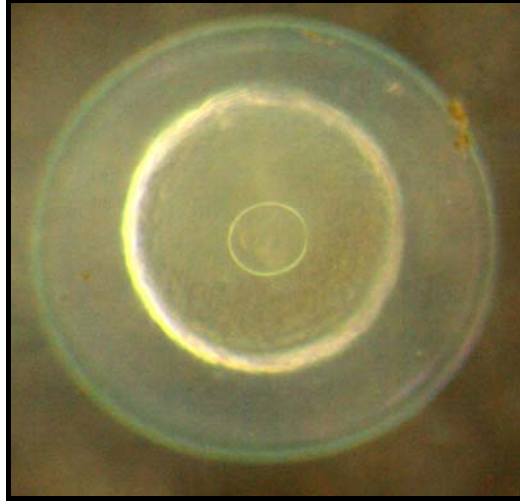
2.3. Zebra Balığı Gelişim Aşamaları

Zebra balığında embriyo gelişimi; zigot, segmentasyon (yarıklanma), blastula, gastrula, faringula (geçiş evresi) ile kuluçka ve larval evreler olmak üzere 7 evredir.

2.3.1. Zigot evresi

Polilesital tipteki zebra balığı yumurtası döllenildikten sonra 45. dakikaya kadar olan evre zigot evresidir. Döllenmeden sonra plazma zarını zona radiata adı verilen koryon

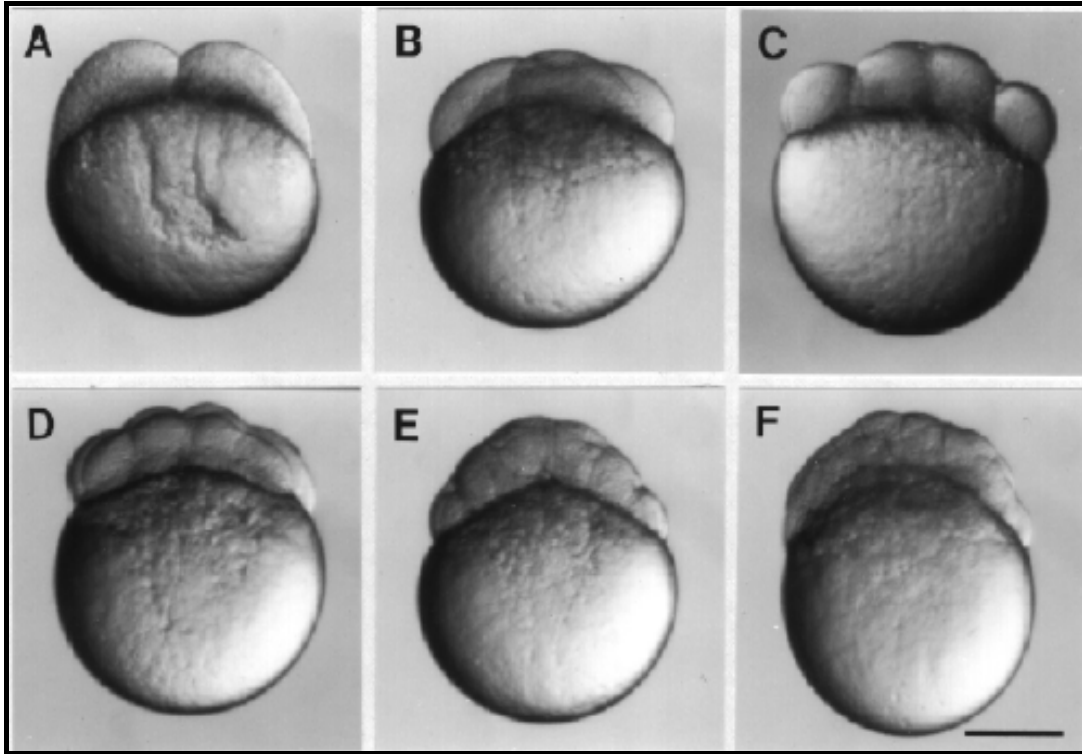
tabakası çevreler. Plazma zarı ile koryon arasında kalan bölgeye ise perivitellin alan adı verilir. Yeni döllenmiş zigotun ilk bölünmeyi geçirene kadar bulunduğu evre zigot evresidir. Zigot evresinde koryon şişer ve yumurtadan ayrılır. Fertilizasyonla birlikte sitoplazmik hareketler başlar (Şekil 2.3). Vitellussuz sitoplazma animal kutba doğru akmaya başlar ve blastodiski vitellusca zengin olan vejetal kutuptan ayırır (Kimmel ve ark., 1995).



Şekil 2.3. Zebra balığının döllenmiş yumurtası

2.3.2. Segmentasyon (yarıklanma) evresi

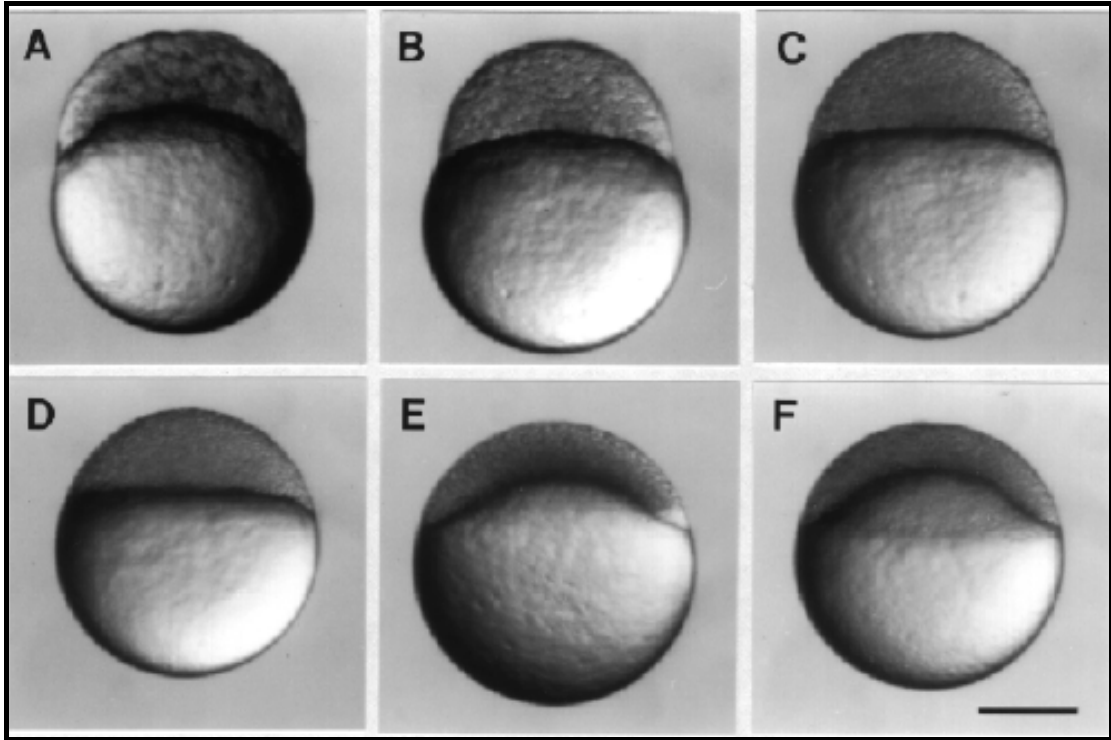
İlk bölünme fertilizasyondan yaklaşık 40 – 45 dk sonra gerçekleşir. İlk bölünme dikey düzlemedir. Bölünen blastodiske “blastoderm” denir. Blastodermiler bölünerek morula safhasına ulaşır (Şekil 2.4) (Kimmel ve ark., 1995).



Şekil 2.4. Zebra balığı embriyosunda segmentasyon ve morula evreleri a) 2 blastomerli safha (0,75 saat) b) 4 blastomerli safha (1 saat) c) 8 blastomerli safha (1,25 saat) d) 16 blastomerli safha (1,5 saat) e) 32 blastomerli safha (1,75 saat) f) 64 blastomerli safha (morula) (2 saat) (Kimmel ve ark, 1995)

2.3.3. Morula ve blastula evresi

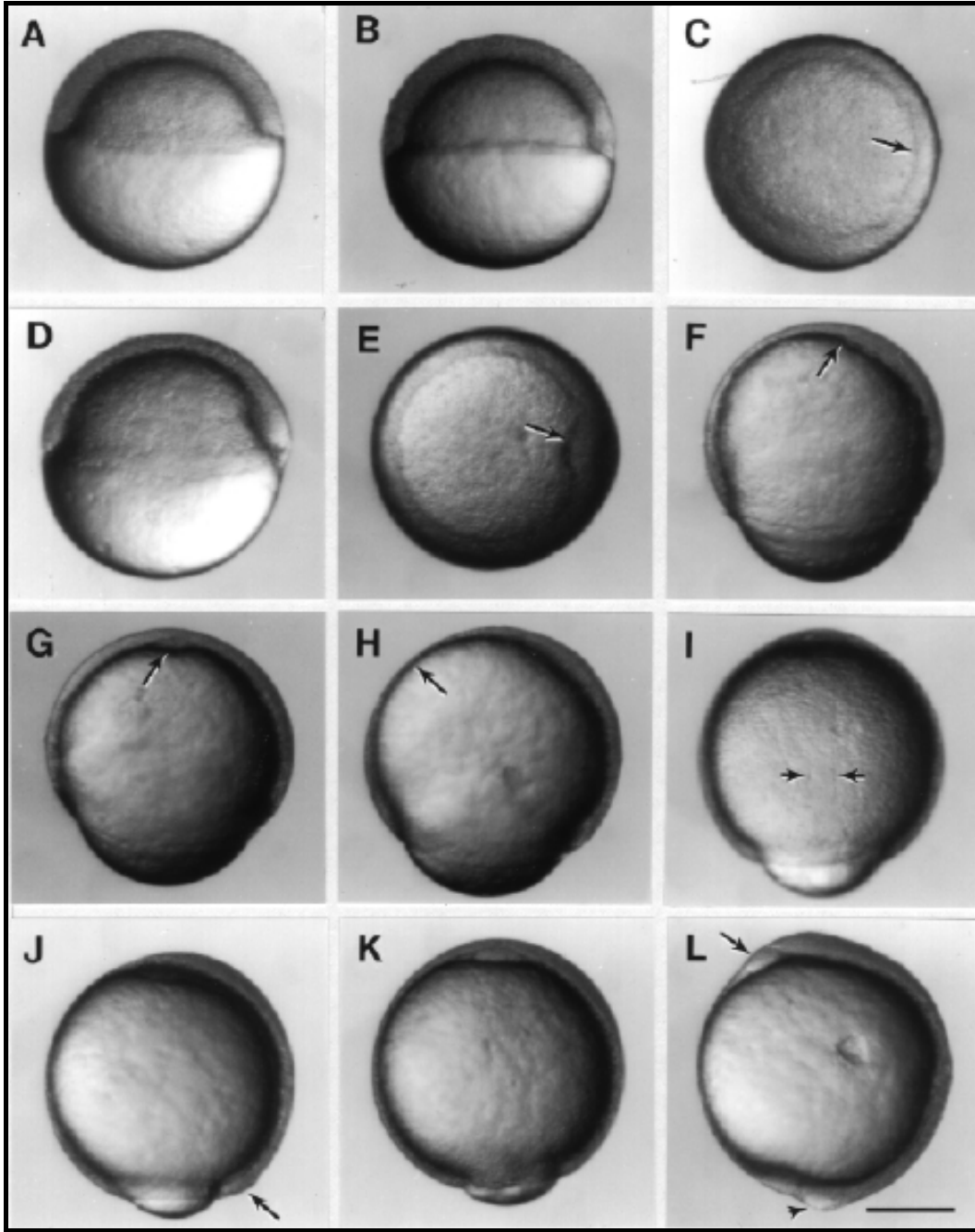
Blastula, blastodiskın top gibi küre halinde gözüküdüğü aşamada embriyoya verilen isimdir. Bu aşama, embriyonun 128 blastomerli aşaması ya da diğer bir değişle 8. zigotik hücre döngüsünün gerçekleştiği aşamadır. Blastula aşaması gastrula başlangıcına kadar devam eder. Bu aşamada 3 önemli olay gerçekleşir. Bunlar: embriyonun midblastula safhasına girmesi, vitellus sinsitiyal tabakası (VST)'nın oluşması ve epibolinin başlamasıdır (Şekil 2.5) (Kimmel ve ark., 1995).



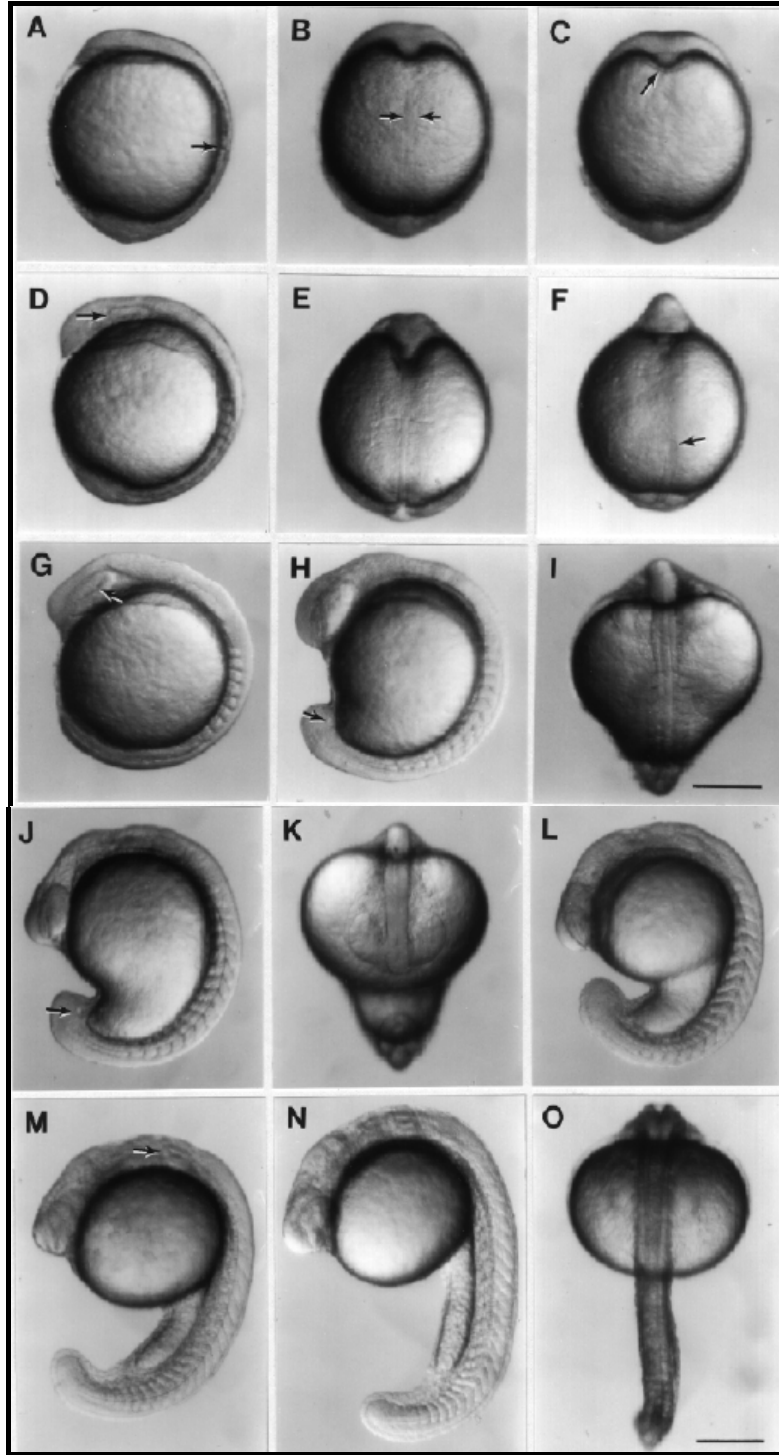
Şekil 2.5. Zebra balığında morula blastula evreleri a) 256 blastomerli evre (2,5 saat) b) tümsek evresi (3,3 saat) c) tümsek ve çevreleme evreleri arasında geçiş (3,5 saat) d) çevreleme ve küresel evreler arasında geçiş (3,8 saat) e) kubbe evresi (4,3 saat) f) %30 epiboli (4,7 saat) (Kimmel ve ark., 1995).

2.3.4. Gastrula evresi

Döllenmeden sonra 5. ve 24. saatler arasında gerçekleşen gastrula evresinde epiboli devam eder. İnvölüsyon, gastrulasyonun başlangıcı olarak kabul edilir. Gastrulasyonda gerçekleşen en önemli olaylar kuyruk tomurcuğu ve germ halkasının oluşmasıdır (Şekil 2.6). Gastrulasyonda baş bölgesi belirginleşir ve vitellus küçülmeye başlar. Bu evre sonunda somitlerin oluşumu tamamlanır (Şekil 2.7) (Kimmel ve ark., 1995).



Şekil 2.6. Zebra balığı embriyosunda gastrulasyon a) %50 epiboli (5,25. saat) b) Germ halka evresi (5,7. saat) c) Germ halka evresinin animal kutuptan görünümü d) Kalkan evresi (6. saat) e) Kalkan evresinin animal kutuptan görünümü f) %70 epiboli (ventral görünüm) (7,7. saat) h) %75 epiboli (8. saat) i) %80 epiboli (8,4. saat) j) %90 epiboli (9. saat) Bu evrede kuyruk tomurcuğu gözlemlenmeye başlar. l) Tomurcuk evresi (10. saat) (Kimmel ve ark., 1995)



Şekil 2.7. Zebra balığında somitlerin oluşumu a) 2 somitli safha (10,7. saat) b) 2 somitli safha dorsal görünüm c) 2 somitli safha ventral görünüm d) 4 somitli safha (11,3. saat) e) 4 somitli safha, dorsal görünüm f) 5 somitli safha (11,7. saat) ventral görünüm g) 8 somitli safha (13. saat) h) 13 somitli safha (15,5. saat) i) 14 somitli safha (16. saat) dorsal görünüm j) 15 somitli safha (16,5. saat) k) 15 somitli safha, dorsal görünüm l) 17 somitli safha (17,5. saat) m) 20 somitli safha (19. saat) n) 25 somitli safha (21,5. saat) o) 25 somitli safha, dorsal görünüm. (Kimmel ve ark., 1995)

2.3.5. Faringula evresi

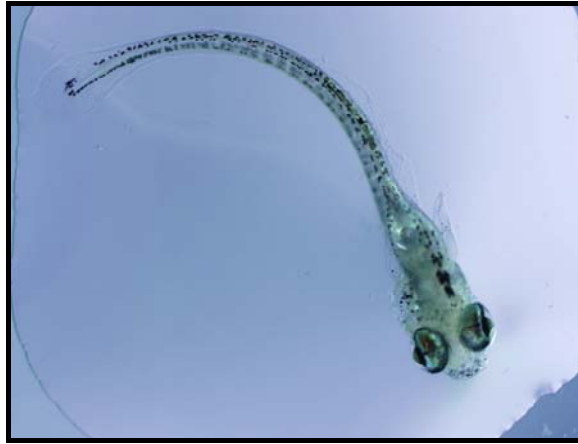
Döllenmenin gerçekleşmesinden sonraki 24. ve 48. saatler arasındaki evredir. Bu evrede yüzgeçler şekillenmeye başlar, pigment hücreleri farklılaşır, beyin taslağı oluşur. Dolaşım sistemi oluşur ve kalp atmaya başlar (Kimmel ve ark., 1995).

2.3.6. Kuluçka evresi

Zebra balığında kuluçka evresi 48. saatten itibaren başlar. Gittikçe gelişimini tamamlayan embriyoda vitellus kesesi küçülür.

2.3.7. Larval evre

Zebra balığı embriyoları 3. günden itibaren koryondan çıkar ve bu evre larval evre olarak adlandırılır (Şekil 2.8).



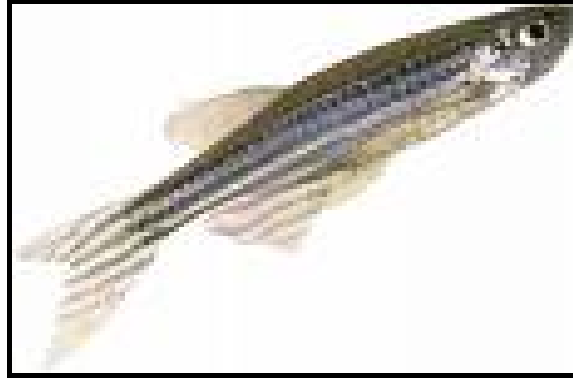
Şekil 2.8. Zebra balığı larvası

2.3.8. Genç (juvenil) evre

Larva ile ergin balık arasındaki geçiş dönemidir.

2.3.9. Ergin evre

Zebra balığı gelişiminin 3. ayında ergin döneme ulaşır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Ergin zebra balığı

2.4. Kök Hücre

Kök hücre, uzun bir süre bölünme kapasitesine sahip olan, kendini yenileyebilen ve farklılaşabilen hücrelere verilen addır. Kök hücreler genler ve dış uyaranlardan aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeli gösteren özelleşmemiş hücrelerdir. Vücudumuzda herhangi bir hücre grubunda ölüm ya da hasar meydana geldiğinde vücudumuzda hangi hücreye gereksinim varsa kök hücreler o hücre tipine dönüşürler (Şahin ve ark., 2005).

Embriyonun en önemli özelliği değişebilme ve pek çok farklı dokuya farklılaşabilme özelliğidir. Embriyoya bu özelliği kazandıran kök hücrelerdir. Memelilerde embriyonik kök hücreler, erişkin kök hücreleri ve embriyonik germ hücreleri olmak üzere 3 tip kök hücre bulunur. Embriyonik kök hücreler, erken embriyonik dönemdeki blastosiste ait iç hücre kitlesinden oluşur. Sınırsız bölünebilme ve erişkin organlardaki tüm hücrelere farklılaşabilme, diğer bir deyişle pluripotensi yetenekleri vardır (Öktem ve Altay, 2009).

Embriyonik kök hücreleri primordiyal germ hücrelerinden köken alan pluripotent kök hücrelerdir (Kerr ve ark., 2006). Embriyonik germ hücreleri ise karakteristik olarak embriyonik kök hücrelere benzerler. Embriyonik germ hücreleri, 5-9 haftalık fetal dokunun gonad kabartısı ve mezenşiminden alınan primordiyal germ hücrelerinin kültürüyle elde edilen hücrelerdir. İç hücre kitlesinden kaynaklanmalarına karşın embriyon kök hücrelerine benzer özellikler taşırlar. Bu hücreler de üç germ

tabakasına da farklılaşabilirler ve pluripotent kök hücrelere özgü belirteçleri taşırlar (Pera ve Reubinoff, 2000; Can, 2006).

Embriyonun iç hücre kitlesi dışındaki kaynaklardan elde edilen kök hücreleri, embriyonik olmayan kök hücreleri adını alır. Embriyonik olmayan kök hücreleri genel olarak erişkin kök hücreleri ve fetüs kök hücreleri olmak üzere iki grupta irdelenir. Erişkin kök hücrelerinden en yaygın çalışılanları farklılaşma yetenekleri sınırlı olan multipotent özellikteki hematopoetik ve nonhematopoetik mezanşimal kök hücreleridir (Can, 2006; Öktem ve Altay 2009). Hematopoetik kökenli erişkin kök hücreleri, kordon kanı, kemik iliği veya periferik kandan elde edilmiştir. Non-hematopoetik mezanşimal kök hücreleri ise kemik iliğinin stroması içinde yer alan uzantılı fibroblast-benzeri hücreler olup üzerinde en çok çalışılan kök hücre türlerinden birisini oluşturur ve bu hücreler karaciğer, pankreas, çizgili iskelet kası, kalp kası, böbrek, akciğer ve merkez sinir sistemi hücrelerine farklılaşırlar (Can, 2006). Kısaca, kök hücrelere embriyodan yetişkinliğe kadar gelişmenin her evresinde rastlanır ama çok yönlülükleri ve sayıları yaşla birlikte azalır. Embriyonik kök hücrelerinden insan vücudunu oluşturan 200 farklı tipteki farklılaşmış hücreden herhangi biri gelişebilirken, yetişkin kök hücrelerinden sadece bir ya da sınırlı sayıda tipteki hücrelerin gelişmesi mümkündür (Beksaç ve ark., 2004).

Embriyonik kök hücreleri, yüksek bir çekirdek / sitoplazma hacim oranı ve belirgin pronükleus yapısına sahiptir ve destek hücreleri üzerindeki kültürleri sırasında üç boyutlu koloniler oluştururlar (Kansu, 2008).

2.4.1. Primordiyal germ hücreleri

Primordiyal germ hücreleri (PGH), embriyoda gonad taslaklarına göç ederek türün devamını sağlayan sperm ve yumurtanın öncüsü olan embriyonik kök hücrelerdir. Primordiyal germ hücreleri, embriyoda bulunan, gamet öncü hücrelerine farklılaşarak dişilerde yumurta, erkeklerde ise sperm hücrelerini oluşturacak olan, dolayısıyla genetik bilginin kuşaklar arası transferinden sorumlu olan hücrelerdir. Germ hücreleri genetik bilginin devamını sağlar ve yeni nesile geçirirler. İlk olarak vitellüs kesesinde gözlemlenen primordiyal germ hücreleri, embriyonik kök hücrelerdir ve kan hücreleri

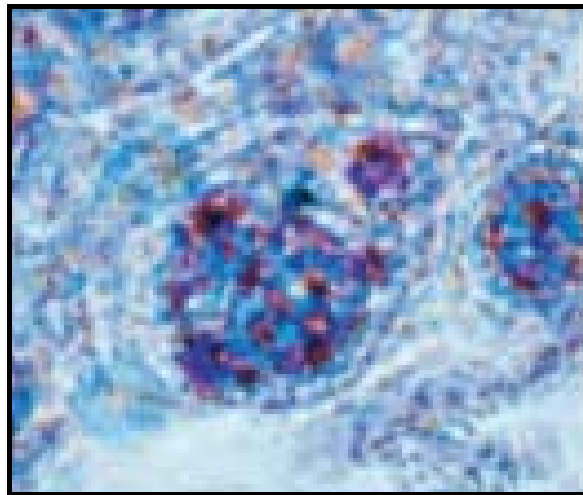
ile aynı yerden köken alırlar. Primordiyal germ hücreleri, gastrulasyon sırasında salınan mezodermal sinyallerle pluripotent özellikteki epiblast hücrelerinden farklılaşarak oluşurlar. Yüksek düzeyden alkalın fosfataz içerdikleri için histolojik olarak belirlenebilirler. Sperm ya da oosite farklılaşacak primordiyal germ hücreleri, in vitro koşullarda tekrar pluripotent kök hücre olan embriyonik kök hücrelere farklılaşabilirler (Merchant-Larios,1985; Montiel ve ark., 2001; Kimura ve Nakano, 2011).

PGH, 10-20 µm çapında, yuvarlak, oval ya da armutumsu şekilde, etrafındaki hücrelere kıyasla büyük boyutta, belirgin hücre sınırlarına sahip olan hücrelerdir. Yuvarlak ve büyük çekirdek, bir veya birkaç çekirdekçik içerir (Buehr, 1997; Bendel-Stenzel ve ark., 1998). Çevresel sitoplazmaları yüksek alkalın fosfataz aktivitesi gösterir (Braat ve ark., 2000; Castrillon ve ark., 2000; Dumstrei ve ark., 2004). Yüksek düzeyde alkalın fosfataz içermelerine bağlı olarak histokimyasal yöntemlerle belirlenebilmektedirler (Merchant-Larios,1985; Montiel ve ark., 2001). Primordiyal germ hücreleri, embriyolojik gelişimin ilk evrelerinde vitellüs kesesinin allontoise yakın bölümünde, endoderm hücreleri arasında ortaya çıkar. Ameboid hareket ile barsak taslağını saran dorsal mezenteri boyunca ilerleyerek gonad taslaklarına ulaşır ve burada yer alan kıvrımlara yerleşerek mezenşim içine girerler. Primordiyal germ hücrelerinin izledikleri yola “gonad yolu” denir (Coucouvanis,1993; Carlson, 1996; Felici, 2001; Baser, 2005 ve ark.; Koç, 2008).

Primordiyal germ hücrelerinin sitoplazmasına “germinal sitoplazma” veya “germ plazması” denir. Bu sitoplazma mitokondrilerle ilişkili elektronca yoğun bir madde içermektedir. Bu granüller sitoplazmada bulutsu bir görünüm yarattığından bu granüller “bulutsu yapı – nuage materyali” olarak adlandırılmıştır (Andre ve Rouiller, 1956; Koç, 2008).

Gelişimin aşamasına bağlı olarak sitoplazmalarında granüller ve yağ damlacıkları bulundurulur. Ameboid hareketle göç eden bu hücrelerin sitoplazmaları elektronca yoğundur ve çok sayıda mitokondri barındırır. Buna ek olarak sitoplazmada pigment granülleri, glikojen ve lipid damlacıkları da bulunur (Nieuwkoop ve Sutasurya, 1979).

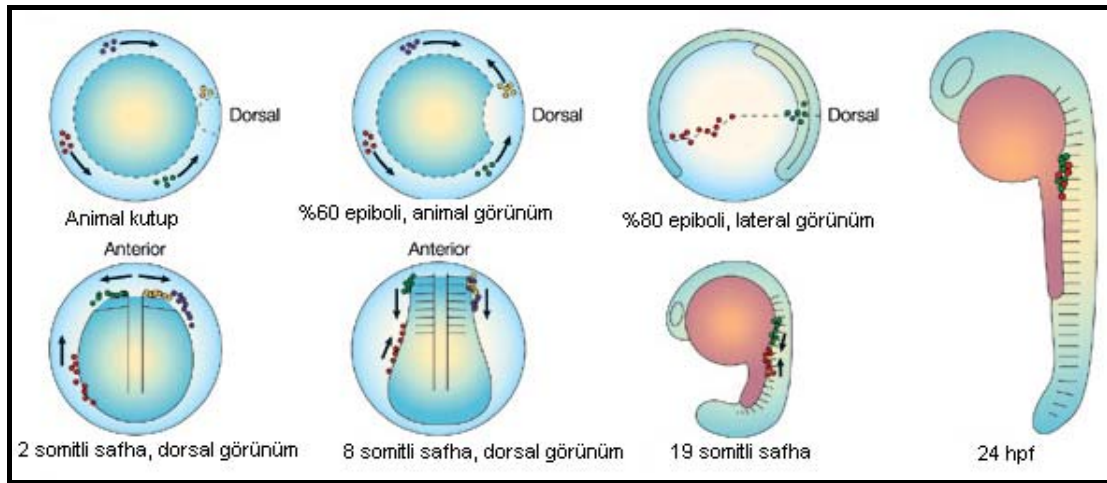
Diğer teleost türlerinde olduğu gibi zebra balığı primordiyal germ hücreleri de ışık mikroskobunda gastrula safhasından önce diğer somatik hücrelerden ayırt edilemezler (Braat ve ark., 1999a). Primordiyal germ hücreleri, erken evrede eosinofilik granüller içermelerine rağmen, diğer PGH karakteristiklerini sergilemezler. Dolayısıyla fertilizasyondan 4 saat sonra, küresel safhada histolojik olarak ışık mikroskobunda ayırt edilemezler. Dolayısıyla bu hücelere primordiyal germ benzeri (Primordiyal like cells, PL) hücreler denir. Primordiyal germ benzeri hücreler de PGH gibi eosin ile boyanabilme özelliklerine göre vitellustan ayrılırlar. Küresel safhadan gastrulanın başlangıcındaki safhaya kadar olan süreçte primordiyal germ benzeri hücrelerdeki eosinofilik granüller, çekirdek membranının etrafında değil, sitoplazmada dağınık halde bulunurlar. Gastrulasyondan erken segmentasyona kadar olan süreçte sitoplazmada dağınık halde bulunan granüller, çekirdek membranının etrafında halka gibi toplanır. Primordiyal germ benzeri hücreler, çekirdeklerinin hematoksilen ile diğer somatik hücre çekirdeklerinden daha kuvvetli boyanması ile ayrılırlar. Segmentasyonun son safhasından fertilizasyondan 6 gün sonraki (6dpf) lik safhaya kadar olan süreçte primordiyal germ hücrelerinin çekirdek membranının etrafındaki eosinofilik granüller küçük parçalara dağılmaya başlar. Bu aşamada primordiyal germ hücreleri, önceki safhaya göre eosin ile daha homojen bir şekilde boyanır (Şekil 2.10) (Nagai ve ark., 2001).



Şekil 2.10. H&E boyaması yapılmış primordiyal germ hücresi (Nagai, 2001)

Embriyonun ilk döneminde, ameboid hareketle, düzenli bir göç yolu izleyen, bu süreçte önemli yapısal ve işlevsel değişiklikler gösteren primordiyal germ hücreleri

göç yolları boyunca uğrayacağı engellere karşı davranışının ne olacağı merak konusu olmuştur. PGH migrasyonu, teleostlarda en çok zebra balıklarında çalışılmıştır (Saito ve ark., 2011). Zebra balıklarında PGH migrasyonu, embriyonik gelişimin ilk 24 saatinde meydana gelir (Weidinger ve ark., 1999; Weidinger ve ark., 2002; Saito ve ark., 2011). Primordiyal germ hücreleri, gastrulasyon sırasında dorsal olarak migrasyona başlarlar. Primordiyal germ hücreleri, fertilizasyondan 10.5 saat sonra (10.5 hpf) 1. ve 3. somitler arasında bulunurken, 13hpf aşamasında 8. ve 10. somitlere göç etmiş durumdadır. 24 hpf aşamasında ise primordiyal germ hücreleri, vitellus kesesinin sınırında, gonadal bölgede lokalize olurlar (Şekil 2.11) (Saito ve ark., 2011).



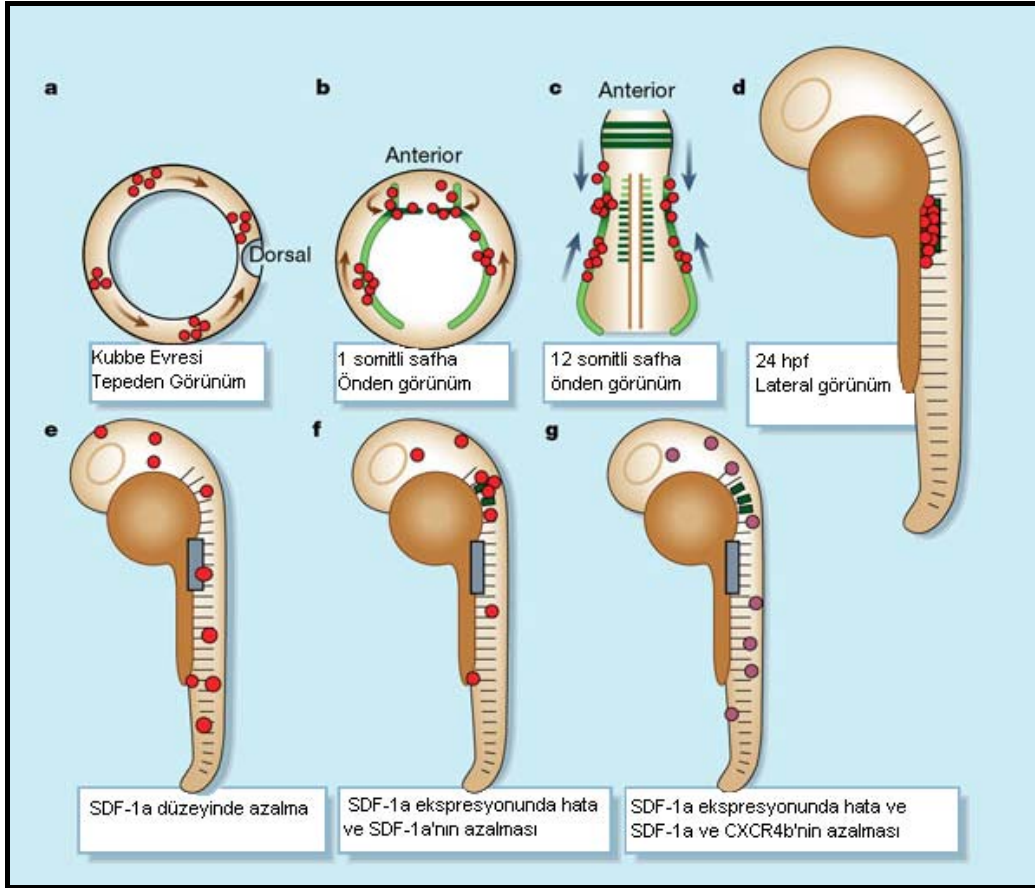
Şekil 2.11. Zebra balığı gelişiminde primordiyal germ hücrelerinin ilk 24 saatteki göçü (Raz, 2003)

Primordiyal germ hücreleri, zebra balığı embriyosunda rastgele 4 farklı yerde konumlanmış olsa da gelişimin ilk 24 saatinde gonadların oluşacağı bölgeye doğru, ileride gametleri oluşturmak üzere göç ederler (Raz ve Freid, 2006).

Pek çok organizmada primordiyal germ hücre göçü çalışılmıştır (Buehr, 1997; Bendel-Stenzel ve ark., 1998; Braat ve ark., 1999b; Castrillon ve ark., 2000; Felici, 2001). Primordiyal germ hücrelerinin nasıl göç ettikleri, göç işleminde hangi faktörlerin yer aldığı, dolayısıyla primordiyal germ hücrelerinin gidecekleri hedefleri nasıl buldukları bilim insanları tarafından merak konusu olmuştur ve bu konuda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, primordiyal germ hücrelerinin göç sırasında bazı somatik yapılarla etkileşim içinde olduğunu göstermiştir. Bu yapıların,

primordiyal germ hücrelerini göç sırasında taşıdığını ve onları gitmeleri gereken hedeflere ulaşmalarında yardımcı oldukları düşünülmüştür (Godin ve ark., 1990; Jaglarz ve Howard, 1995; Zhang ve ark., 1997; Van Doren ve ark., 1998; Kuwana ve Rogulska, 1999; Weidinger ve ark., 1999; Starz-Gaiano ve ark., 2001; Deshpande ve ark., 2001; Weidinger ve ark., 2002; Doitsidou ve ark., 2002). Bu yüzden göç (migrasyon) işlemi, yıllarca farklı model organizmalarda (örneğin fare, insan, zebra balığı, *Xenopus*, *Drosophila* gibi) çalışılmıştır fakat buna rağmen primordiyal germ hücrelerinin gerekli hedeflere göçünü sağlayan sinyaller ve moleküler mekanizmalar hala daha tamamen açıklığa kavuşturulamamıştır. Zebra balıklarında primordiyal germ hücrelerinin göç sırasında yollarını nasıl buldukları ve gonad taslaklarına nasıl doğru bir şekilde gittiğini anlamak için çalışmalarda 2 farklı teknik kullanılmıştır (Kunwar ve Lehmann, 2003). Doitsidou ve arkadaşları (2002), PGH göçünde önemli olduğu düşünülen genlerin hepsini susturmuşlardır. Bunu yapabilmek için “*morpholino antisense knockdown*” adlı tekniği kullanmışlardır. Bu işlem sonucunda zebra balıklarında CXCR4 proteinini kodlayan *cxcr4b* adlı geni susturmuşlar ve bunun sonucunda primordiyal germ hücrelerinin gonad taslaklarına göç edemediğini saptamışlardır. Yine Knaut ve arkadaşları (2003), *odysseus (ody)* diye tanımlanan mutasyona uğramış (mutant) zebra balıkları ile çalışma yaparken primordiyal germ hücrelerinin gonadal bölgeye ulaşamadıklarını ve göç yolunda problemler olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmayı yapan bilim adamları *ody* zebra balıklarındaki mutasyonun *cxcr4b* geninde olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla bu iki çalışma da primordiyal germ hücrelerinde *cxcr4b* geninin ifade edildiğini kanıtlamıştır. Bunun dışında bu çalışmalar *cxcr4b* geni susturulduğunda ya da mutasyona uğradığında PGH göçünde aksaklıklara neden olduğunu kanıtlamıştır (Doitsidou ve ark., 2002; Knaut ve ark., 2003; Kunwar ve Lehmann, 2003). SDF-1a (stromal cell derived factor 1-a), CXCR4b reseptörüne bağlanan başlıca kemokindir. Dolayısıyla *crcx4b* geni ile yapılan araştırmalar, SDF-1a kemokininin de PGH göçü üzerine etkisi olabileceği fikrini uyandırmış ve bu konuda çalışmalar yapılmıştır. Araştırmalar sonucunda zebra balıklarında primordiyal germ hücre göçünde SDF-1a adlı kemokinin etkili olduğu bulunmuştur. SDF-1a, primordiyal germ hücrelerinin göç edeceği bölgelerden salınırken, SDF-1a'nın reseptörü olan CXCR4b, göç eden primordiyal germ hücrelerinin üzerinde bulunmaktadır. CXCR4b ve bunun ligandı olan SDF-1a'nın aktivitesinin azalması sonucu zebra balıklarında PGH migrasyonunda kusurların

oluştugu bulunmuştur (Doitsidou ve ark., 2002). Dolayısıyla SDF-1a ekspresyonunun azalması PGH göçünde *cxcr4b* mutasyonu ile aynı etkiyi yaratmaktadır (Şekil 2.12) (Kunwar ve Lehmann, 2003).



Şekil 2.12. Primordiyal germ hücrelerinin göç mekanizması. a: 4 primordiyal germ hücre grubu, embriyonun rastgele 4 bölgesinden dorsal orta çizgiye doğru göç eder. b) Somitogenezin (segment oluşumu) başlangıcında *sdf-1* RNA (yeşil renk ile gösterilmiştir) ilk segmentin yakınında oldukça fazla salgılanır ve primordiyal germ hücreleri bu bölgeye doğru göç ederler. c) Somitogenez boyunca 4 primordiyal germ hücre kümesi yüksek miktarda salınan *sdf-1* a 'ya doğru göç eder (not: arka beyinde (geniş yatay çizgilerle gösterilmiştir) yüksek miktarda *sdf-1a* salgılanmasına rağmen primordiyal germ hücreleri bu bölgeye gitmezler) d) Embriyo gelişiminin son aşamasında primordiyal germ hücreleri gonad taslaklarına ulaşmış olur. e) *SDF-1a* düzeyinde azalma olduğunda veya *ody* mutantlarında (resimde gösterilmemiştir) primordiyal germ hücreleri embriyonun her tarafına dağılmış durumdadır. f) *SDF-1a* ekspresyonundaki hata sonucunda primordiyal germ hücreleri farklı bölgeye göç ederler. g) *ody* mutant primordiyal germ hücreleri ve *CXCR4b*'siz primordiyal germ hücreleri (hücreler mor ile gösterilmiştir) *SDF-1a*'ya doğru göç etmezler (Kunwar ve Lehmann, 2003).

Sadece *SDF-1a* kemokini ve *CXCR4b* reseptör birlikteliği zebra balıklarında PGH göçü için yeterli değildir. PGH, *SDF-1a*'nın fazlaca salındığı bölgelere doğru

giderken, diğer hücreleri de SDF-1a salgılamak üzere uyarır. Dolayısıyla çeşitli sinyaller, SDF-1a modifikasyonları, SDF-1a'nın ekstraselüler matris proteinleri ile etkileşimi gibi faktörler bu olayı etkileyebilir (Kunwar ve Lehmann, 2003).

CXCR4 ve SDF-1a çiftinin diğer organizmalarda da PGH göçü üzerine etkisinin olup olmadığını anlamak için farelerde deneyler yapılmış fakat farelerde pek çok dokuda hasar olduğu için fare embriyoları ölmüş ve dolayısıyla PGH göçünün detayları açıklanamamıştır (Tachibana ve ark., 1998; Ma ve ark., 1998; Zou ve ark., 1998; Hargreaves ve ark., 2001; Bagri ve ark., 2002; Zhu ve ark., 2002; Kunwar ve Lehmann, 2003). Fakat zebra balığı *ody* mutantlarında bu tip ölüme rastlanmamıştır. Bunun, G proteinine bağlı bir kemokin reseptörü olan CXCR4a gibi farklı bir yapının zebra balıklarında CXCR4'ün fonksiyonunu üstlenmiş olabileceği düşünülmüştür (Knaut ve ark., 2003).

Zebra balıklarında *nanos-1* ve *vasa* genleri, primordiyal germ hücre belirleyicileridir. (Olsen ve ark., 1997; Yoon ve ark., 1997; Kopranner ve ark., 2001). *vasa* geninin yapısı ilk olarak *Drosophila*'da aydınlatılmış ve germ hücre oluşumunda bu genin maternal bir etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Schüpbach ve Wieschaus, 1986). ATP bağımlı RNA helikaz tarafından kodlanan *vasa* geni, DEAD box (Asp-Glu-Ala-Asp) ailesine ait bir gen olup, *Drosophila*'da oositlerin posterior kısmında ve primordiyal germ hücrelerinin bulutsu yapısındaki polar granüllerde bulunur (Mahowald, 1992; Strome, 1992). *vasa* geninin *Drosophila*'da izole edilmesiyle *vasa* benzeri DEAD-box RNA helikaz genleri, fare, rat, kurbağa, zebra balığı, planaria, tavuk, ipek böceği ve insan gibi canlılarda germ hücrelerinden izole edilebilmiştir (Raz, 2000). Yapılan araştırmalar sonucunda *Drosophila* ve *Caenorhabditis*'un germ plazmasında *vasa* proteini bulunurken, bu durumun aksine, *Xenopus* ve zebra balıklarında aslında *vasa* proteininin değil, *vasa* RNA'sının germ plazmasının bir bileşeni olduğunu kanıtlamıştır (Yoon ve ark., 1997; Olsen ve ark., 1997; Knaut ve ark., 2000; MacArthur ve ark., 2000).

Zebra balığında *vasa* proteininin gelişim sürecinde ovaryum ve testiste bulunduğu western blot analizleriyle ortaya konulmuştur (Braat ve ark., 1999b). *vasa* proteininin miktarı, anasal *vasa* proteini parçalandığı için fertilizasyondan sonra 14 somitli

safhaya kadar hızla azalmaktadır (Braat ve ark., 2000). *vasa* geni, germ hücre gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Pek çok organizmanın germ hücresinde *vasa* RNA eksprese edilmektedir fakat *vasa* fonksiyonunda translasyonel kontroller, post-translasyonel kontroller, *vasa* proteininin subselüler lokalizasyonu, ve diğer proteinlerle interaksiyonu büyük bir rol oynamaktadır (Raz, 2000). Zebra balıklarında *vasa* RNA, 2-4 hücreli aşamada, hücrelerin distal kısımlarındaki yarıklarda gruplar halinde bulunmaktadır (Olsen ve ark., 1997; Yoon ve ark., 2000; Knaut ve ark., 2000). Bu gruplar, her hücre bölünmesi sırasında, asimetric olarak ayrılırlar ve blastulanın son safhalarında sadece 4 adet primordiyal germ hücresi kalır. Kısaca gastrulasyondan önce bu 4 hücre, simetric olarak bölünür ve gonadları oluşturacak olan bölgelere göç ederler (Yoon ve ark., 1997; Weidinger ve ark., 1999; Braat, 1999a; Knaut ve ark., 2000; Shinomiya ve ark., 2000). Dişilerde *vasa* geninde oluşan homozigot mutasyonlar sonucunda kutup hücreleri ve germ hücreleri oluşamayacağı için gelecek nesillerin kısır olmasına sebep olurlar (Yoon ve ark., 1997). Dolayısıyla *vasa* geni ile yapılan çalışmalar gelecek kuşaklarda infertilitenin önlenmesi açısından oldukça önem taşımaktadır.

Omurgalılarda *vasa* homologları bulunmaktadır ve kurbağaların (Komiya ve ark., 1994), farelerin (Fujiwara ve ark., 1994), ratların (Komiya ve Tanigawa, 1995), tavukların (Tsunekawa ve ark., 2000) ve teleost balıkların (zebrafish, Yoon ve ark., 1997; Olsen ve ark., 1997; tilapia, Kobayashi ve ark., 2000) germ hücrelerinde *vasa* geni ekspresyonu tespit edilmiştir. *vasa* geni spesifik olarak germ hücrelerinde sentezlenir (Lasko ve Ashburner, 1990) ve zebra balıklarında *vasa* RNA, oogenez ve embriyogenez boyunca bulunmaktadır (Olsen ve ark., 1997; Yoon ve ark., 1997; Braat ve ark., 1999b). 4 hücreli aşamada, *vasa* RNA içeren germ hücre plazması bu 4 hücreye asimetric olarak dağılmıştır.

vasa mRNA, ileride germ hücrelerine farklılaşacak olan germ hücre öncülerini, diğer somatik hücrelerden ayırır (Yoon ve ark., 1997; Braat ve ark., 1999a). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar da germ plasm benzeri hücrelerin de *vasa* mRNA içerdiğini göstermiştir (Knaut ve ark., 2000).

2.5. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucu kimyasallar (EDCs); sağlıklı bir organizmada veya onun gelecekteki neslinde endokrin sistemine dahil olarak ve onun çalışmasını değiştirerek endokrin sistemin fonksiyonunu bozan, gelişim, üreme, sinir ve immün sistem üzerine olumsuz etkilere sebep olup sağlık sorunlarına neden olan dışarıdan alınan madde veya madde karışımlarıdır. Endokrin bozucu bileşikler, doğal ve yapay endokrin bozucular olmak üzere 2 başlık altında incelenebilir. Doğal endokrin bozucular, yarı ömürleri kısa olduğundan organizmadan kolayca atılabilen ve genellikle önemli yan etkilere sahip olmayan bileşiklerdir. Doğal endokrin bozuculara fitoöstrojenler örnek verilebilir. Fitoöstrojenler, doğal hormon yapısında olduklarından; kolayca yıkılır, depolanmazlar. Yapay endokrin bozucular ise tarım ve endüstride oldukça fazla kullanılan bileşiklerdir. Bunlara örnek olarak dietilstilbesterol (DES), bisfenol A (2,2-bis(4-hidroksifenil) propan), oktilfenol, fitalatlar, dioksin ve dioksin benzeri bileşikler, poliklorine bifeniller, DDT ve bazı pestisitler örnek verilebilir. Bu kimyasallar evsel ve endüstriyel atıklarla sucul ortama katılmaktadır. (Goldman ve ark., 2000; Stoker ve ark., 2000).

Çevresel östrojenler, organizma bünyesine katılıp östrojen gibi işlev gören yapay maddelerdir. Ksenoöstrojenler olarak adlandırılan kimyasalların çoğu veya bunların metabolitleri, östrojenik, mutajenik, karsinojenik veya toksik özelliğe sahiptir (Steinmetz ve ark., 1998). Ksenoöstrojenler, doğada oldukça çok bulunan yani doğaya salınan, estradiolle çok az ya da hiç homoloji göstermeyen fakat östrojenin agonisti (aynı yönde etki yapan) ya da antagonisti gibi davranan pestisitler ya da endüstriyel ürünlerdir. Pek çok çalışma ksenoöstrojenlerin doğal yaşama ciddi zararları olduğunu göstermiştir (Colborn, 1995). Her şeye rağmen ksenoöstrojenlerin üreme sisteminde anormalliklere sebep olup olmadığı kesin belli değildir. Çünkü doğal yaşamda aynı anda pek çok kirletici ekosisteme karıştığı için canlılar pek çok kimyasalın karışımına maruz kalmaktadır. Dolayısıyla bunların her birinin yaptığı etkiyi saptamak zordur. Ksenoöstrojenler, canlılarda östrojen reseptörüne zayıf bağlanma affinitesi (eğilimi) gösterdiğinden ksenoöstrojenlerin zararlı olduğu düşünülmektedir (Ben-Johnathan ve Steinmetz, 1998).

Endokrin bozucular; hormonun yapımı, taşınması, yıkımı ve atılımını değiştirebildikleri gibi, hedef hücredeki etkilerini de değiştirebilmektedirler. Bu etkilerin bir veya birkaçı da bir arada olabilmektedir. Endokrin bozucular, hormonların yapımı, taşınması, metabolizması ve hormonların atılımı üzerine arttırıcı veya azaltıcı etkisi ile hormonların hedef hücredeki etkisine benzer veya ters etkiye sahiptirler.

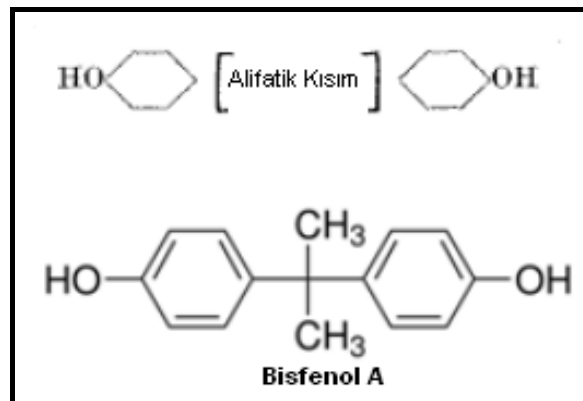
Endokrin bozuculardan en çok bilineni dietilstilbesterol (DES)'dür. DES, ilk defa 1938 yılında üretilmiş, Amerika ve Avrupa'da uzun yıllar boyunca toksemilerde, erken doğum tehdidinde ve fetal ölümlerin önlenmesinde kullanılmıştır. 1970'lerin başında erişkin kadınlarda DES uygulamasına bağlı olarak vajinal kanserlerde artış gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışmalarda, DES'e maruz kalan bayanlarda meme kanseri gelişme riskinin yaklaşık 2 kat arttığı ve DES'e intrauterin maruz kalan genç bayanlarda serviks kanseri, overyan germ hücre kanseri, serviko-vajinal displazi ve vajinal clear-cell adenokarsinoması ile intrauterin maruz kalan erkeklerde minör ürogenital anomali ve testis kanseri riskinin arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle DES piyasadan kaldırılmıştır (Marselos ve Tomatis, 1992; Giusti ve ark., 1995; Lee, 2007; Solomon ve Schettler, 2000; Yeşilkaya, 2008). DES'e prenatal dönemde maruz kalmak erkek ve dişilerde pek çok yapısal ve fonksiyonel anormalliklere sebep olmaktadır. DES kullanan pek çok anne ve kızında üreme sisteminde benign anormallikler, kısırlık ve dış gebelik oranlarında artış görülmüştür. Oğullarında ise testislerin skrotuma inmemesi, uretrada problemler, epididimal kistler, sperm sayısında azalma, sperm deformitelerinde artış ve prostatik inflamasyonlar gözlemlenmiştir (Marselos ve Tomatis, 1992). Endokrin bozucular, her zaman aynı etkiye neden olmamaktadır. Örneğin düşük dozda östrojen reseptörlerine bağlanarak etki gösteren bir bozucu, yüksek dozda ise androjen reseptörlerine bağlanarak antiandrojenik etki gösterebilir (Lee, 2007).

Endokrin bozucu ile karşılaşma süresine, miktarına, tek veya karışım maddeler ile karşılaşma durumuna göre endokrin bozucuların etkileri değişebilmektedir. Bu açıdan en hassas dönemler gebelik, çocukluk ve ergenliktir. Gebelikte endokrin sistemin işlevini bozan çeşitli kimyasal maddelerle karşılaşma; fetusun endokrin sistemini

etkileyerek, çok sayıda gelişme bozukluğuna sebep olmaktadır. Bu kimyasal maddelerin çoğu plasentada etkisiz hale getirilemezler. Kimyasal maddelerin miktarı ne kadar fazla olursa, ortaya çıkan gelişim bozukluğunun derecesi de o kadar ağır olmaktadır (Durmaz ve Özmert, 2010).

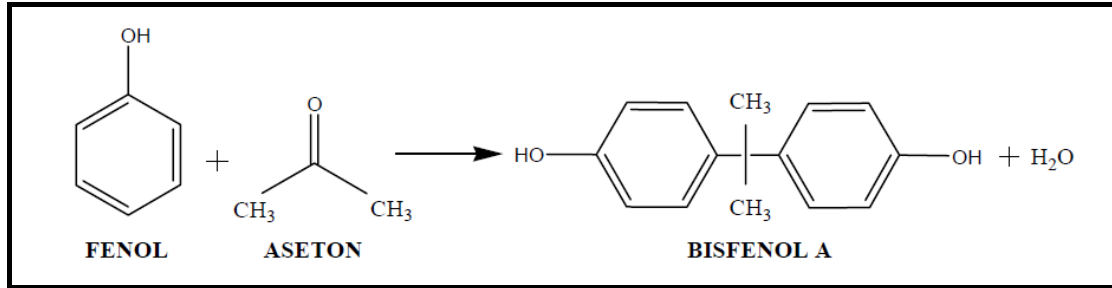
2.5.1. Bisfenol A

Bisfenol A, 1891 yılında Rus Kimyacı A.P. Dianin tarafından asit kataliz reaksiyonu sonucu doymamış 2 fenol halkasının aseton ile birleşmesiyle oluşturulmuş bir bileşiktir ve Bisfenol A'daki "A" harfi asetondan gelir (Dianin, 1891). İlk olarak Dodds ve Lawson tarafından 1930'lu yıllarda pek çok organik bileşik ratlara subkutanöz (cilt altı) enjeksiyon uygulamasıyla verilmiş ve böylece BPA'nın sentetik östrojen olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar alifatik bir grupta bağlı 2 fenolik halka içeren kimyasalların östrojenik aktiviteye sahip olduğunu (Şekil 2.13) tespit etmişlerdir (Dodds ve Lawson, 1936). Alifatik bileşikler, molekül yapılarında, çeşitli atomların birbirine kovalent bağlanarak oluşmuş düz veya dallanmış zincir şeklinde iskelet içeren organik bileşikler ve bunların türevleridir. Dodds ve Lawson BPA'nın östrojenik aktivitesini 1930 sonu, 1940 başlarında çalışmaya kadar geçen zaman sürecinde BPA ile ilgili hiçbir çalışma yapılmamıştır. 1930'lu yıllara kadar BPA'nın östrojenik etkileri üzerine bir çalışma yapılmadığı ve BPA'nın in vivo etkileri üzerine bir çalışma yapılmadığı için BPA, 1915 yılında endüstriyel olarak oldukça fazla miktarda üretilmeye başlanıp insan hayatına girmiştir (Ortiz, 2009).



Şekil 2.13. Bisfenol A'nın yapısı

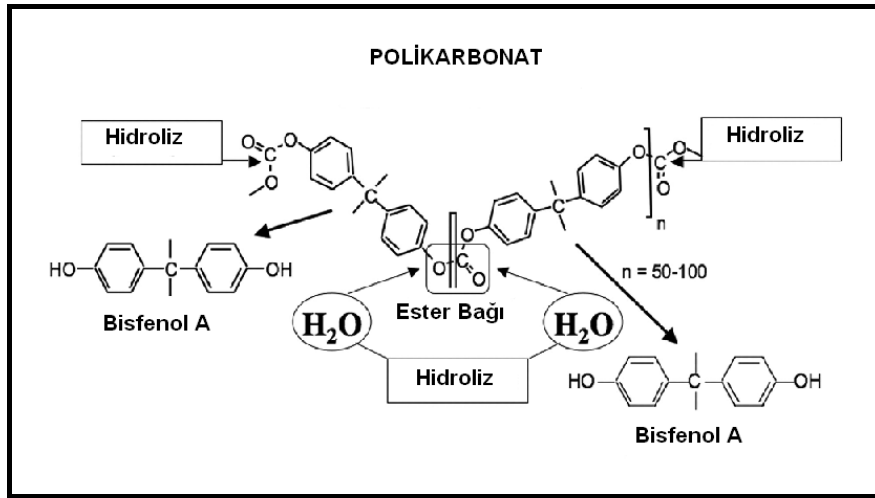
En önemli endokrin bozuculardan biri olan 2,2 bis (4-hidroksifenil) propan yani Bisfenol A (BPA), 2 mol fenol ve 1 mol asetonun asit kataliz reaksiyonu sonucu oluşun ve 2 tane doymamış fenol halkasına sahip olan bir bileşiktir (Staples ve ark., 1998) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Bisfenol A'nın fenol ve asetonun kondensasyonu

Bisfenol A, katı, beyaz renkte kristal yapıda fenolik bir maddedir. Molekül formülü C₁₅H₁₆O₂'dir. Dimetilsülfoksit (DMSO), etanol ve aseton gibi çözücülerde iyi çözünür. 25°C'deki suda 120 mg/L oranında çözünür (Kosky ve Guggenheim, 1991; Johnson ve Harvey, 2002).

Bisfenol A, kaseve ve plastik ürünlerde bulunan, epoksi ve polistiren reçine üretiminde ve kimyasal endüstride oldukça fazla kullanılan endokrin bozucu bir maddedir. BPA, endüstriyel olarak, polimer, epoksi rezin, polisülfon, kauçuk, fungusit, antioksidan ve boya imalatında ara bileşik olarak kullanılmaktadır ve bu amaçla üretilen BPA'nın %95'i polikarbonat plastiklerin imalatında kullanılmaktadır (Mihaich ve ark., 2009). Artan polikarbonat üretimine paralel olarak BPA üretimi de günümüzde hızla artmaktadır. BPA, polikarbonatın hidrolizi sonucu ortama salınmaktadır (Şekil 2.15). Diğer bir deyişle BPA, bir polikarbonat monomeridir. polikarbonat ve rezinlerde BPA monomerleri birbirine ester bağı ile bağlıdır. Epoksi rezinler, metal maddeleri kaplamada, kasevelerde ve dış dolgularında bulunmaktadır. Bunun yanı sıra BPA, kasevelerin iç yüzeylerinde, bebek biberonlarında, plastik su şişelerinde ve damacanalarda, bebek şampuan ve kremlerinde, çoğu oyuncakların yapısında, parfümeri ve kozmetik ürünlerde, optik lenslerde, CD'lerin dış film kaplamasında, baskılı kıyafetlerde ve oda parfümlerinde bulunmaktadır. (Staples ve ark., 1998; Welshons ve ark., 2006; Hengstler ve ark., 2011).



Şekil 2.15. Polikarbonat yapıdan ester bağlarının hidrolizi sonucu BPA oluşması (Welsons ve ark., 2006)

Bisfenol A günümüzde oldukça fazla üretilen ve plastik yapısında bulunan bir madde olduğu için insanlar da dahil olmak üzere pek çok canlı grubu bu maddeye maruz kalmaktadır. Hayvanlarla yapılan deneylerde, Bisfenol A'nın, dişi cinsiyet hormonu östrojen gibi hareket ettiği ortaya konmuştur. BPA'nın endokrin sistemini bozucu özelliği, çok sayıda bilimsel tartışmalara sebep olmaktadır. Plastik üretiminde kullanılan bisfenol A'nın *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda ksenoöstrojen olarak davrandığı saptanmıştır (Richter ve ark., 2007). BPA, günümüzde en fazla üretilen kimyasallardan biridir ve ekosisteme büyük bir oranda BPA girdisi vardır (Rodriguez ve ark., 2010). Bu sebeplerden dolayı BPA, 21. yüzyılda medya ve basın organlarında sıkça yer almaktadır.

BPA, yıllık >3,7 milyon ton üretim kapasitesi ile dünyada en çok üretilen kimyasallar arasındadır (Chemical Week, 2005; Yıldız, 2009). Daha önce yapılmış olan çalışmalar, BPA'nın embriyolar üzerinde genetik kusurlara ve toksik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Bindhumol ve ark., 2003). Yüksek dozlardaki BPA'nın ise hamile CD ırkı ratlar için oldukça toksik olduğu ve bu uygulamanın anne ve fetüsün kilosunda bir düşüşe sebep olarak ölüm riskini arttırdığı bulunmuştur (Morrissey ve ark., 1987). İnsanda BPA maruziyeti östrojene duyarlı MCF-7 göğüs kanser hücrelerinin üremesini sağladığını, hücre çoğalmasında bir artışa sebep olduğu ve progesteron reseptör seviyesini değiştirdiği saptanmıştır (Zhu ve ark., 2003). Yapılan

bir diğerk çalışmada ise yüksek dozda BPA'nın cilt ile absorpsiyonu sonucu, böbrek, karaciğerk, dalak, pankreas ve akciğerkde hasar olduğu saptanmıştır (Sax, 1975). Ayrıca BPA'nın *in vitro* ortamda DNA'ya bağlanan metabolitlere dönüştüğu bulunmuştur (Atkinson ve Roy, 1995).

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Bisfenol A'nın ksenoöstrojen olduğu için Avrupa Birliği ile paralel olarak Türk Gıda Kodeksi Gıda maddeleri ile temasta bulunan plastik madde ve malzemeler tebliğinde bir değişiklik yaparak 10 Haziran 2011 tarihindeki Resmi Gazete'de yayımlamış ve bebek olarak tanımlanan tüketici grubu için kullanılan, polikarbonat madde ve malzemelerin üretiminde kullanılmasını yasaklamıştır (Resmi Gazete, 2011). Bisfenol A'nın biberonlarda kullanımı yasaklanmasına rağmen yeterli bilimsel çalışma olmadığı için damacanalarda hala daha kullanılmaya devam etmektedir. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 15 Eylül 2011 tarihinde yaptığı basın açıklamasında damacanalarda BPA göçünü önlemek için, damacanaların uzun süre güneş işığında bırakılmaması, deforme olmuş ya da yıpranmış damacanalarda kullanılmaması, damacana temizliğinde çamaşır suyu ya da fırça gibi maddeler kullanılmaması, damacana temizliğinin su üreticisine bırakılması gerektiğini vurgulamıştır.

Karbonat halkalarının nötral-alkali pH aralığında yüksek sıcaklıkta hidrolizi BPA salınımına neden olmaktadır. Dolayısıyla konservelerin, bebek biberonlarının, içecek şişelerinin, vb. ürünlerin pişirme, ısıtma veya sterilizasyon amacıyla sıcaklıkla maruziyeti BPA salınımına neden olmaktadır (Staples ve ark., 1998). Yani, konserveler sterilizasyon amacıyla ısıtıldığında veya ambalajlı gıdalar mikrodalgada ısıtıldığında yiyeceklere BPA salınımı olmaktadır. Aynı zamanda sıcaklığa ek olarak asidik ve bazik koşullar da BPA salınımını artırmaktadır. Stanford Üniversitesi'ndeki araştırıcılar mayalarda bir protein ile çalışma yaparken mayanın estradiol ürettiğini saptamışlardır (Feldman ve ark., 1984). Daha sonra östrojenik aktivitenin mayadan değil, polikarbonat hücre kültürü kaplarının otoklavlanması sonucu kültür ortamından geldiğini bulmuşlardır. Östrojen reseptörü (ER) ne bağlanan bu madde saflaştırılarak BPA olduğu tanımlanmıştır. Otoklavlanmış suda 2-3 µg/L oranında BPA tespit etmişlerdir. Yine aynı grup BPA'nın östrojenik olduğu sonucuna 4 kritere bakarak

varmıştır. 1) Östrojen reseptörüne bağlanması 2) MCF-7 göğüs kanser hücrelerinin proliferasyonunu sağlaması 3) progesteron reseptörlerinin indüksiyonu 4) tomoxifene (göğüs kanseri tedavilerinde kullanılan östrojen antagonisti) ters etkiler göstermesi (Krishnan ve ark., 1993).

Kubwabo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, polikarbonat içeren plastik ya da epoksi rezinlerle kaplı içki ve yiyeceklerde Bisfenol A'nın içecek ve yiyeceklere geçiş miktarını GC-El/MS/MS analizleriyle ölçmüşlerdir. Plastik şişelerdeki suların 8 saat boyunca 40 °C'de maruziyetinde suya 0,11 µg/L oranında geçtiğini saptamışlardır. %50 oranında etanol içeren şişelerde yine 40 °C'de 240 saat bekletildiğinde sıvıya 2,39 µg/L oranında BPA göçünün olduğunu kaydetmişlerdir (Kubwabo ve ark., 2009). Kısacası plastikle kaplı maddelerde BPA göçü zaman ve çözücüye bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA)'na göre memeliler için günlük 50 µg/L lik doz, güvenilir doz olarak kabul edilmiştir (EPA, 1982). Bu değer gözlemlenebilir en düşük etki değeri (LOAEL=LOEL) nin 100'e bölünmesi ile bulunmuş ADI (günlük alınabilecek doz) değeridir. Kanada'da damacana ve pet şişe sularındaki BPA oranını tespit etmek amacıyla bir çalışma yapılmış ve bu çalışmada kullanılan polikarbonat kaplı olmayan 56 pet şişeden 51 tanesindeki BPA oranı güvenilir sınırlarda (< 50 µg/L) çıkmıştır. Damacanalarda ise bu oran 0.50 – 1.4 mg/L arasında (ortalama 0.75 mg/L) çıkmıştır. Fakat 5 hafta sonunda depolama ve taşıma sırasında yanlışlıkla güneşe maruz kalan damacanalarda yapılan ölçümlerde bu oran 6.5 mg/L ve 8.8 mg/L olarak tespit edilmiştir (Cao ve Corriveau, 2008a).

Bir başka grup araştırmacı 20 farklı marka konservede sebzelere BPA göçünü araştırmış ve polimer tipi, sterilizasyon prosedürü ve yiyecek çeşitliliğine bağlı olarak sebzeler 0-33 µg/konserve oranında BPA göçü tespit etmişlerdir. Alkali ya da yağlı yiyeceklerde ısı ile birlikte BPA geçişi artmaktadır (Brotons ve ark., 1995).

Plastik paketleme uygulamalarında 7 sınıf bulunmaktadır. Tip 1 (PET = Polietilen tereftalat), Tip 2 (HDPE = yüksek dansiteli polietilen), Tip 4 (LDPE = düşük dansiteli polietilen), Tip 5 (polipropilen) ve 6 (polisitren) polimerizasyon ya da paketleme formunda BPA içermezler, dolayısıyla gıda ve içeceklere BPA salınmaz. Tip 3 (PVC

= polivinil klorür) plastikler Bisfenol A içerebilmektedir. 7. tip "diğer" sınıfı olarak adlandırılmakta ve polikarbonat ve epoksi gibi malzemeleri içermektedir ki bunlar Bisfenol A momonerinden yapılmıştır. Bisfenol A normal koşullarda (oda sıcaklığında) 32 ng/saat hızı ile salınırken, 100°C'deki BPA göçü, oda sıcaklığındaki migrasyondan 55 kat daha fazladır (Lea ve ark., 2008). Diğer bir çalışmada da BPA içeren bir şişedeki suyu 70°C'de 6 gün boyunca ısıtılırsa ortama 521 µg/L BPA geçtiği belirtilmiştir (Cao ve Corriveau, 2008b). Dolayısıyla BPA migrasyonu sıcaklıkla ilişkilidir.

2.5.1.1. BPA'nın yıkımı

Ksenoöstrojenlerin metabolizması 17β- estradiole benzerlik göstermektedir (Yager ve Liehr, 1996.) Yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda BPA'nın 17β- estradiol gibi ERα tamamen ERβ'nın ise kısmen agonisti olduğu saptanmıştır (Gould ve ark., 1998; Kim ve ark., 2001; Matthews ve ark., 2001; Gray ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalarda bisfenol A ve benzer yapıdaki maddelerin östrojenik, anti-östrojenik, androjenik, anti-androjenik, tiroid hormonal veya anti-tiroid hormonal özellikleri incelenmiştir. Östrojenik aktiviteye insan göğüs kanseri hücre hatlarında (MCF-7), androjenik aktiviteye fare fibroblast hücre hatlarında (NIH3T3), tiroid hormonal aktiviteye ise hipofiz hücre hatlarında (GH3) bakılmıştır (Kitamura ve ark., 2005). Tetrabromobisfenol A, tetraklorobisfenol A, tetrametilbisfenol A ve 3,3'-dimetilbisfenol A'nın tiroid hormonal aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Kitamura ve ark., 2005).

Memelilerde BPA metabolizması 2 yolaklıdır. Bunlar, BPA'nın glukuronidasyonu ve sülfasyonudur. BPA, karaciğer mikrozomlarında glukuronide edilir. Memelilerde glukuronidasyonu UDP-glukuronoziltransferaz enzimi yapar. Sülfasyon ise sülfotransferazlar tarafından yapılır. Ratlarda, glukuronidasyon ve sülfasyondan sonra BPA metabolitleri vücuttan idrar ile atılır (Inoue ve ark., 2001). Memelilerde serbest BPA'nın %56-82'si dışkı yoluyla atılır. İdrar ile atılan metabolitlerinin oranı ise %13-28'dir (Knaak ve Sullivan, 1966; Yokota ve ark., 1999; Pottenger ve ark., 2000; Snyder ve ark., 2000). Fakat sıçanlarda karaciğerden atılan ve major metabolit olan

bisfenol A glukuronit safra yoluyla ulaşığı sindirim kanalında tekrar bisfenol A'ya dönüşmekte ve burada kana geçmektedir. Bisfenol A'nın enterohepatik dolaşıma girmesi, bisfenol A'nın sıçanlarda daha yavaş elimine olmasına yol açmaktadır (EFSA, 2008; Yıldız, 2009). BPA metabolizması dişi ratlarda erkek ratlara göre daha hızlıdır. Bunun sebebi, UDP-glukuronoziltransferaz mRNA'sının dişilerde daha fazla ekspresse edilmesidir (Takeuchi ve ark., 2004; Hun-Kang ve ark., 2006).

Balıklarda BPA metabolizması türlere göre değişiklik gösterir. Örneğin BPA metabolizması zebra balığı karaciğerinde, gökkuşağı alabalığına göre daha hızlıdır. Dolayısıyla hızlı BPA metabolizması daha düşük östrojenik duyarlılık sağlamaktadır. BPA'ya maruz bırakılan zebra balıklarında BPA sülfat (BPAS) ve BPA glukronik asit (BPAGA) olmak üzere 2 metabolit tespit edilmiştir. 100 µg/L BPA'ya maruz bırakılan zebra balıkları 7 gün boyunca incelenmiş ve uygulamadan sonra 2, 6, 12, 24, 48, 72, 120 ve 168. Saatlerde balıklarda BPA, BPGA ve BPAS oranları analiz edilmiştir. 24 saat sonunda BPA, BPAGA ve BPAS oranları sırasıyla 569, 12600 ve 39,9 ng/g balık olarak tespit edilmiştir. Başlangıç eliminasyon fazında BPA ve BPAS'ın total yarı ömrü ($T_{1/2}$) < 1,1 saat ve 30 dakika olarak bulunmuştur. Sekonder eliminasyon fazında ise $T_{1/2}$ değerleri 139 ve 71 saat olarak tespit edilmiştir. BPAGA'nın $T_{1/2}$ değeri ise 35 saattir (Lindholst ve ark., 2003).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Zebra balığı (*Danio rerio*)

Zebra balığı, gelişim biyolojisi çalışmalarında kullanılan önemli bir omurgalı modelidir ve zebra balığı ile çalışmanın pek çok avantajı vardır. Bu organizmaları laboratuvar ortamında üretmek ve üretimlerini devam ettirmek kolaydır ve dikkate değer deneysel avantajlar sunar. Ayrıca bu organizmaların üretimi de ucuzdur. Bir zebra balığı 50 ila 200 arasında yumurta bırakır. Döllendikten sonra hızlı bir şekilde gelişen embriyo şeffaf olduğundan gelişimin her aşamasını mikroskop altında görmek mümkündür. Ayrıca insanla pek çok ortak gene sahip olan zebra balıklarının erginleşme süreleri de diğer omurgalılara göre oldukça kısadır. Yumurtalar elverişli ortam şartlarında 3 ayda cinsel olgunluğa erişirler (Mills, 1994). Model organizmalar, üzerinde çalışılması zor olan diğer türler hakkında (insan da dahil) biyolojik olayların araştırılması ve bilgi edinmek için kullanılır. Bu yüzden çalışmada model organizma olarak zebra balığı seçilmiştir. Omurgalılarının gelişimi için iyi bir organizmadır çünkü diğer tüm modellerin en iyi özelliklerini bulundurulur. Genetik analizler için uygundur. Birçok insan hastalık ve gelişim genlerinin benzeri zebra balığının genomunda vardır. Üretilen mutant zebra balıkları insan hastalıkları için uygun bir modeldir. İlaçların denenmesi içinde kullanılır. Alzheimer hastalığı, konjenital kalp hastalığı, polisistik böbrek hastalığı ve kanser gibi modelleri de içerir.

3.1.2. Ortam koşulları

Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarı içerisine zebra balığı ile yapılacak deneyler için 10x20x35 cm boyutlarında akvaryumlar kuruldu. Akvaryumların içerisine içme suyu konulup

sıcaklık, termostatlar ile 26 - 28 °C 'ye sabitlendi. Akvaryum içerisindeki sular, hava motorları ile oksijenlendirildi. Ayrıca oda içerisine 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak balıkların üremesi için gereken sirkadien ritim oluşturuldu. Elde edilen embriyolar toplanarak stereo mikroskop altında incelendi. Döllenen zebra balığı yumurtaları, yumurtlama kaplarından alınarak kontrol, çözücü kontrol ve deney grupları oluşturuldu. Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmazken, çözücü kontrol grubuna BPA'nın çözücüsü olan dimetilsülfoksit (DMSO) %1 oranında embriyoların bulunduğu 25x45x15 cm boyutlarındaki yavrular için kullanılan akvaryum ortamına eklendi. 4 mg/L ve 8 mg/L BPA olmak üzere 2 deney grubu oluşturuldu. 4 mg/L ve 8 mg/L oranındaki BPA'lar %1 DMSO içerisinde çözülerek akvaryum ortamına verildi. Tüm bu DMSO ve BPA uygulamaları embriyolara gelişimin ilk 1 saatlik periyodu içerisinde uygulandı. Çalışmada kullanılacak olan embriyolara histolojik boyamalar, whole mount in situ hibridizasyon, akridin turuncusu boyaması yapılmış ve primordiyal germ hücreleri tespit edilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Primordiyal germ hücrelerinin histolojisi

3.2.1.1. Fiksasyon

Embriyonun genel fiksasyonu için Bouin çözeltisi kullanıldı (Karataş, 2005).

Tablo 3.1. Işık mikroskobu için fiksasyon (tespit) uygulaması

SOLÜSYON ADI	SOLÜSYONUN İÇERDİĞİ MADDELER	MADDE MİKTARI	UYGULAMA SÜRESİ
BOUİN	Suda doymuş pikrik asit % 40 Formaldehit Glisyal asetik asit	75 mL 25 mL 5 mL	2 saat – 24 saat

3.2.1.2. Dehidratasyon

Tablo 3.2. Işık mikroskobu için dehidratasyon uygulaması

SOLÜSYON ADI	SOLÜSYONUN İÇERDİĞİ MADDELER	MADDE MİKTARI	UYGULAMA SÜRESİ
% 70 ALKOL	Etanol Distile su	70 mL 30 mL	5 dk
% 80 ALKOL	Etanol Distile su	80 mL 20 mL	5 dk
%95 ALKOL	Etanol Distile su	95 mL 5 mL	5 dk
%100 ALKOL	Etanol	100 mL	5 dk

3.2.1.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme

Embriyodaki su yükselen alkol seviyeleriyle uzaklaştırıldıktan sonra, embriyolar parafin çözücü bir sıvı olan ksilol ile 2 kere 5 dk muamele edilerek şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Böylece embriyodaki alkol ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Hemen ardından embriyolar sıvı parafin içerisine kesit alma düzlemine göre gömüldü.

3.2.1.4. Kesit alınması

Parafin blok içerisine gömülmüş olan embriyo ve larvalardan Leica marka döner mikrotom ile 4-5 μ m kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler su banyosuna atılarak üzerine albumin mayer sürülmüş lamlara alındı ve 1 gece kuruyup lam üzerine yapışması beklendi.

3.2.1.5. Boyama ve inceleme

a) Hematoksilen & Eosin boyama yöntemi

Tablo 3.3. Işık mikroskobu için Harris Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi

1.Parafinden kurtarma Ksilen	3 x 3 dk.
2. Hidratasyon % 100 Etanol % 80 Etanol %50 Etanol % 30 Etanol	3 x 1 dk 30 sn. 30 sn 30 sn.
3. Akarsu altında	30 sn
4.Harris Hematoksilen	4,5 dk
5.Distile su	4 dk
6.%95 Etanol	30 sn
7.%95 Etanol	30 sn
8. Eozin	30 sn.
9. % 100 Etanol	6 x 15 sn
10. Ksilol	3 x 15 sn
11. Entellan ile kapama	

Tablo 3.4. Işık mikroskobu için Eozin stoğu hazırlanması

EOZİN STOĞU	MİKTARI
Eozin Y	10 g
Potasyum Dikromat	5 g
Suda Doymuş Pikrik Asit	100 mL
%100 Etanol	100 mL
Distile Su	800 mL
Glasiyal Asetik Asit	10 damla

b) Best Carmin boyama yöntemi

Tablo 3.5. Işık mikroskobu için Best Carmin boyasının hazırlanması

BESTCARMİN STOK SOLÜSYONU	MADDE ADI	MİKTARI
	Carmine	2 g
	K ₂ CO ₃	1 g
	Potasyum clorür	5 g
	Saf su	60 mL
BESTCARMİN BOYAMA SOLÜSYONU	MADDE ADI	MİKTARI
	Stok solüsyon	10 mL
	%95 Alkol	15 mL
	Amonyak	15 mL

Tablo 3.6. Işık mikroskobu için Best Carmin boyama yöntemi

1.Ksilol	10 dk.
2.Ksilol	10 dk.
3.%100 alkol	10 dk.
4.50:50 Alkol:Eter (1:1)	15 dk.
5.Lamları dik süz	
6.Musluk suyunda akıt	1-2 dk.
7.Hematoksilen boyama	5 dk.
8.Musluk suyunda yıka	
9.Seyreltilmiş boyama çözeltisinde boya	20 dk.
10.Metanol	3 x 10 dk.
11.Aseton	3 x 10 dk.
12.50:50 Aseton:Ksilol (1:1)	10 dk.
13.Ksilol	10 dk.
14.Ksilol	10 dk.
15.Entallan ile kapama	

c) Toluidine Blue boyama yöntemi

Toluidine Blue Boyama Solüsyonu

Toluidine Blue 1g

Distile su..... 200 cc

Toluidine Blue Boyama Protokolü

Ksilen 5dk
 %100 EtOH..... 2dk
 %95 EtOH..... 2dk
 Distile su..... 20 sn
 Toluidine Blue 2 sn
 Distile su..... 4dk
 %95 EtOH..... 2dk
 %100 EtOH..... 2dk
 Ksilen..... 2dk
 Entellen ile kapama

3.2.2. Whole mount in situ hibridizasyon yöntemi

Bu yöntem ile zebra balıklarında vasa pozitif hücreler tespit edilmiş ve sonuçlar stereo mikroskop ile fotoğraflanmıştır.

3.2.2.1. Solüsyonların hazırlanması

a) %4 Paraformaldehit/1XPBS

300 mL için:

250 mL su mikrodalgada 60°C ye kadar ısıtılır.

12 g PFA, steril kabinde karıştırılarak eklenir.

Birkaç damla NaOH eklenir ve çözülene kadar karıştırılıp ısıtılır.

30 mL 10XPBS eklenir.

20 mL H₂O eklenir ve -20°C'de muhafaza edilir.

b) PBT

1000 mL PBS + 1 mL Tween 20,

c) Hibridizasyon tamponu (Hyb)

1 Litre için:

250 mL SSC, 20X

500 mg tip VI Torula maya RNAsı veya buğday tohumundan tip V tRNA

50 mg heparin

1 mL Tween 20

1,89 g sitrik asit (monohidrat)

500 mL H₂O

500 mL formamid (deiyonize)

Son pH 6,0-6,5 arası olmalıdır. -20°C de saklanır.

d) 20X SSC

175.3 gr NaCl (3M) + 88.2 gr sodyum sitrat (0.3 M), 800 mL distile suda çözülür.

1M HCl kullanılarak pH 7.0 a ayarlanır. Son hacim distile su eklenerek 1 L'ye tamamlanır. Otoklavlanarak sterilize edilir.

e) NTMT

100 mM Tris HCl pH 9.5

50 mM MgCl₂

100 mM NaCl

%0,1 Tween 20

f) Bloke solüsyonu

%5 normal keçi serumu + 10 mg/mL BSA/PBT -20°C de uzun dönem ya da +4°C de kısa dönem saklanır.

3.2.2.2. Ön İşlem

24 saatlikden küçük embriyolar: +4°C'de gece boyunca ya da 3 güne kadar %4'lük PFA içeren PBS de fiske edilir. Dekoryonize etmek için 2 ya da 3 defa PBT de çalkalanır.

24 saatlikden büyük embriyolar /larvalar için: Fiksasyondan önce koryon uzaklaştırılır. 4°C'de gece boyunca ya da 3 güne kadar %4'lük PFA içeren PBS de fiske edilir. 2 kere PBT de çalkalanır.

3.2.2.3. Dehidrasyon

Embriyo ya da larvalar MeOH'a transfer edilir

1. 5' oda sıcaklığında %25 MeOH-PBT
2. 5' oda sıcaklığında %50 MeOH-PBT
3. 5' oda sıcaklığında %75 MeOH-PBT
4. 5' oda sıcaklığında %100 MeOH-PBT
5. %100 lük MeOH da -20°C de in situ hibridizasyon protokolünden (ISH) önce en az 2 saat bekletilir.

3.2.2.4. Proben hazırlanışı

a) PCR ürünleri

05 µl cDNA ya da 1 µL BAC DNA

2,5 µL 10X PCR buffer (MgCl₂ li)

0,5 µL 50 mM forward primer

0,5 µL 50 mM reverse primer

0,5 µL 10mM dNTP mix

0,5 µL Taq DNA Polimeraz

X µL dH₂O

(Toplam hacim: 25 µL)

b) Transformasyon

2-4 μ L jelde yürütülüp pürifiye edilmiş PCR ürünü

1 μ L tuz solüsyonu (kit ürünü)

1 μ L TOPO-TA vektör

(Toplam hacim: 6 μ L)

Karışım 25-30 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.

Karışıma bakteri ekilip 20 dk buzda bekletilir.

40 μ L X-gal içeren LB-Amp veya LB-Kan platelerine ekim yapılır.

Beyaz kolonilerden alınıp 2,5 mL LB-Amp veya LB-Kan sıvı ortamlarında çoğaltılır.

6000 rpm'de 3 dk 4°C de santrifüj edilir.

Sırasıyla Buffer P1 ve Buffer P2 (Qiagen kit içeriği) eklenir.

13000 rpm'de 15 dk 4°C'de santrifüj edilir.

450 μ L isopropanol eklenir.

Yeniden 13000 rpm'de 20 dk 4°C'de santrifüj edilir.

DNA pelleti %70 EtOH ile yıkanır.

Pellet kurutulup uygun miktarda dH₂O içerisinde çözülür.

c) DNA'nın kesimi

2,5 μ L 10X restriksiyon tamponu (Fermentas)

1 μ L restriksiyon endonükleaz (Fermentas)

Uygun miktarda DNA

X μ L dH₂O

(Toplam hacim: 25 μ L)

d) Linerize DNA'nın in vitro transkripsiyonu

1 μ g linerize kalıp DNA

2 μ L 10 X transkripsiyon tamponu (Roche)

2 μ L 0,1 M DTT

1 μ L RNase inhibitörü

1 μ L RNA Polimeraz
 X μ L DEPC-H₂O
 (Toplam hacim: 20 μ L)
 37°C de 2 saat bekletilir.
 1 μ L DNaz I transkripsiyon karışımına eklenir.

e) RNA'nın presipitasyonu

Hacim DEPC-H₂O ile 100 μ L yapılır.
 10 μ L NaOAc-DEPC eklenir.
 200 μ L %100 EtOH eklenir.
 -20°C de bir gece bekletilir.
 13000 rpm'de 15 dk 4°C'de santrifüj edilir.
 Pellet %70 EtOH ile yıkanır.
 Pellet kurutulup uygun miktarda DEPC-H₂O içerisinde çözülür.
 RNA %1 TAE agaroz jelde yürütülür.

3.2.2.5. ISH 1. Gün

a) Rehidrasyon

5' oda sıcaklığında %50 MeOH-PBT
 5' oda sıcaklığında %25 MeOH-PBT
 2 kere 5' oda sıcaklığında PBT de bekletilir.

b) Proteinaz K

Gerektiğinde Preproteinaz K ile muamele edilir. (stok genelde 20 mg/mL)

1. Erken evreler için Proteinaz K uygulaması gerekli değil.
2. Geç gastrula safhaları için: 0-3 dk 5 μ g / mL
3. Erken somitogenesis safhaları: 5-10 dk 5 μ g / mL
4. Erken somitogenesis safhaları: 5 dk 10 μ g / mL
5. 24- 36 hpf embriyolar: 15 dk 10 μ g / mL

6. 36 hpf embriyolar -72 hpf larvalar: 30 dk. 40µg / mL
7. 2 kere PBT de muameleyi durdurmak için çalkalanır.

c) Refiksasyon

%4 lük PFA içeren PBS de oda sıcaklığında 20 dk refikse edilir.
4 kere 5 dk oda sıcaklığında PBT ile yıkanır.

d) Prerehidizasyon ve hibridizasyon

65°C de en az 2 saat Hyb tamponunda inkübe edilir. Daha sonra önceden ısıtılmış proba (70°C de en az 10 dk) 65°C de su banyosunda bekletilir. (DIG problemleri genelde 1:50 – 1:200 oranında kullanılır.)

3.2.2.6. ISH 2. Gün

a) Yıkamalar

Yıkama solüsyonlarının mutlaka uygulamadan önce hibridizasyon sıcaklığına (65°C) kadar ısıtılması gerekmektedir. Ardından aşağıdaki yıkamalar yapılır.

1. 65°C de 20 dk Hyb tamponu
2. 65 °C de 3 kere 20 dk 2X SSCT/%50 Formamid
3. 65 °C de 2 kere 20 dk 2X SSCT
4. 65 °C de 4 kere 30 dk 0,2X SSCT
5. Oda sıcaklığında 2 kere 5 dk PBT ile yıkama yapılır.

b) Bloke etme

%5 normal keçi serumu + 10 mg/mL BSA/PBT'de bloke edilir.
Çalkalayıcıda hafifçe çalkalanarak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilir.

c) Antikor

Bloke solüsyonunda 1:4000 oranında seyreltilmiş Anti-DIG AP Fab fragments (Roche) da +4°C de gece boyunca inkübe edilir.

3.2.2.7. ISH 3. Gün

a) Antikor uygulamasından sonra yıkama

Çalkalayıcıda 2 kez 5 dk boyunca PBT de yıkama yapılır.

Oda sıcaklığında 3 saat boyunca 8-10 defa PBT yıkamalarına devam edilir.

b) NTMT boyama tamponu

NTMT tamponu taze hazırlanmalıdır. 3 kere 5 dk NTMT yıkaması yapılır. Son yıkama esnasında embriyolar 24 kuyucuklu plakalara aktarılır.

c) Boyama reaksiyonları

Embriyolar 1 gece boyunca oda sıcaklığında karanlıkta boyama solüsyonunda bekletilir. Zaman zaman boyamanın gerçekleşip gerçekleşmediği mikroskopla gözlenir. 24 kuyucuklu plaka için kuyu başına 0,75 mL boyama solüsyonu olacak şekilde hesaplama yapılır.

d) Reaksiyonu durdurma

2 kere PBT solüsyonunda dokular çalkalanır. %90'lık EtOH ile yıkama yapılarak arka plan temizlenir. Bu yıkama NBT/BCIP presipitasyonlarını yok eder. Bu aşamada dikkatli olunmalı ve yeniden boyanma zaman zaman gözlenmelidir. Mor rengin maviye dönüştüğü görülür. Yeniden boyamadan sonra birkaç kez PBT yıkaması yapılır. 10 dk oda sıcaklığında %4'lük PFA/PBS ile fiske edilir. Örnekler PBT'de saklanabilir. Görüntülemek için agaroz, metil selüloz ya da gliserole gömülebilir.

3.2.3. Akridin turuncusu boyaması

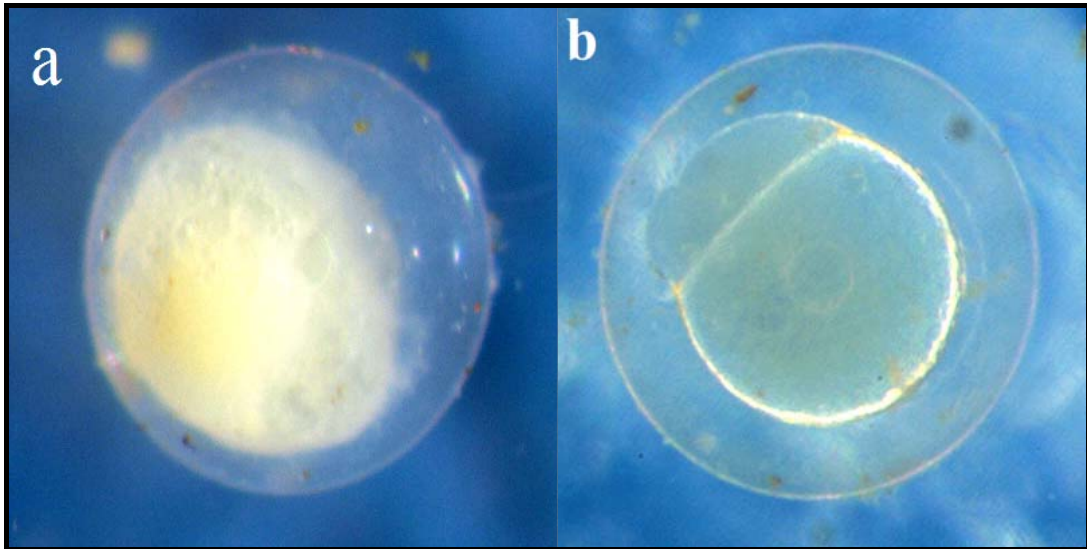
Zebra balığı embriyoları dekoryonize edilir ve akvaryum suyunun içine alınır. Daha sonra akridin turuncusu boyası (Sigma) 5 µg akridin turuncusu/mL akvaryum suyu olacak şekilde embriyo ortamına koyulup homojen bir şekilde karışması sağlanır. Embriyolar boya içerisinde 30 dk boyunca bekletilir. Boyamadan sonra embriyolar %4'lük 3-amino benzoik asit metilester içerisinde anestezi edilir ve apoptotik hücreler florasan mikroskop ile fotoğraflanır.

BÖLÜM 4. BULGULAR

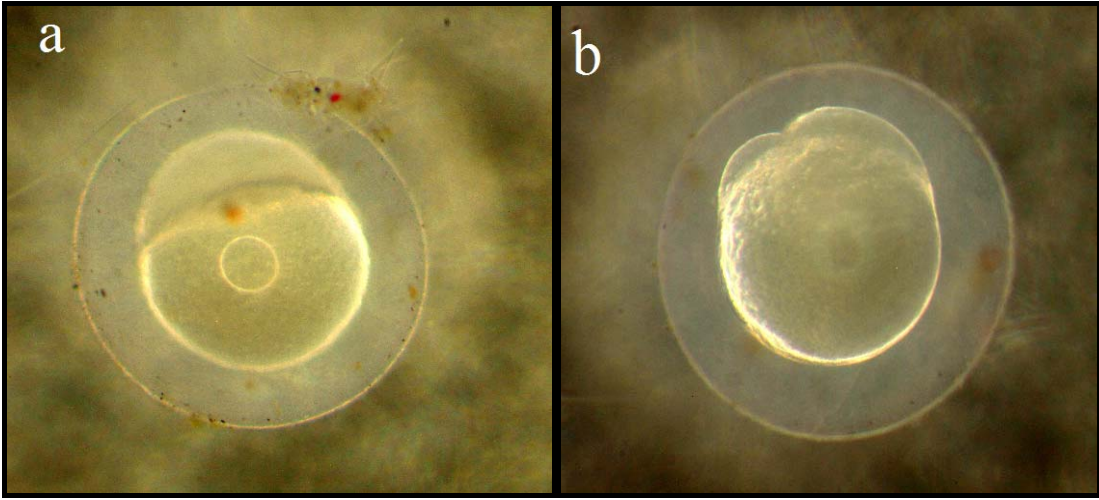
4.1. Zebra Balığında Gelişim Evreleri ve Stereo Mikroskop Bulguları

4.1.1. Kontrol grubu

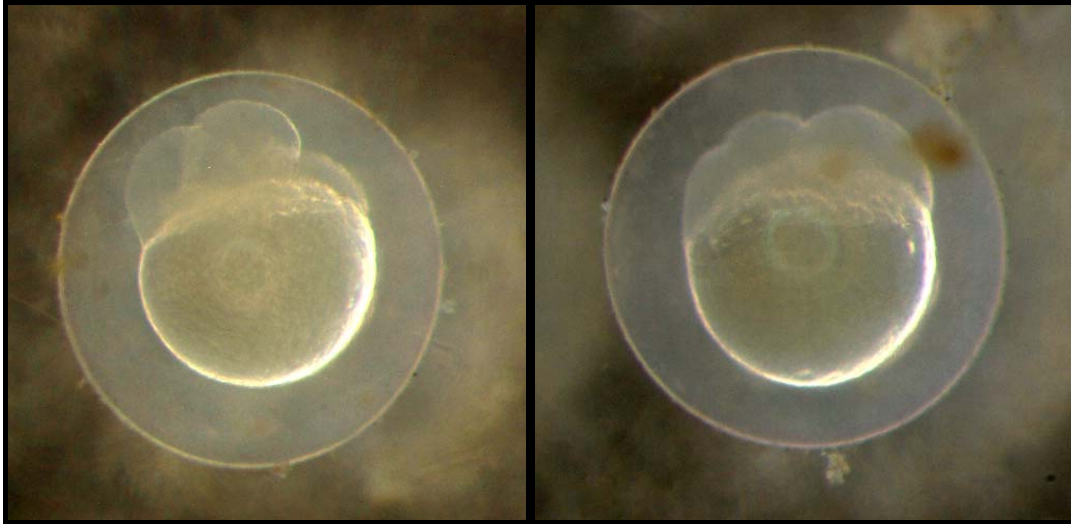
Döllenmiş yumurtalar stereo mikroskop altında şeffaf görünürken, döllenmemiş yumurtalar opak bir görünüme sahipti (Şekil 4.1a). Döllenmiş zebra balığı embriyolarında koryon kolaylıkla seçilebiliyordu. Zebra balığı embriyolarında döllenmeden sonra ilk yarım saat içerisinde blastodisk oluşum gözlemlendi. (Şekil 4.1b) İlk bölünme döllenmeden sonra 45. dakikada izlendi. İlk bölünmeden sonra blastomerlerin 15 dakikada bir bölündüğü gözlemlendi. (Şekil 4.2a, b). İlk bölünme animal kutuptan vejetal kutup düzleminde gerçekleşti. Döllenmeden 1 saat sonra gerçekleşen 2. bölünme bu bölünme düzlemine dik olarak izlendi. Döllenmeden 1 saat sonra 4 blastomer oluştu (Şekil 4.3)



Şekil 4.1. Döllenmiş ve döllenmemiş zebra balığı yumurtası a) Döllenmemiş zebra balığı yumurtası b) Döllenmiş zebra balığı yumurtası

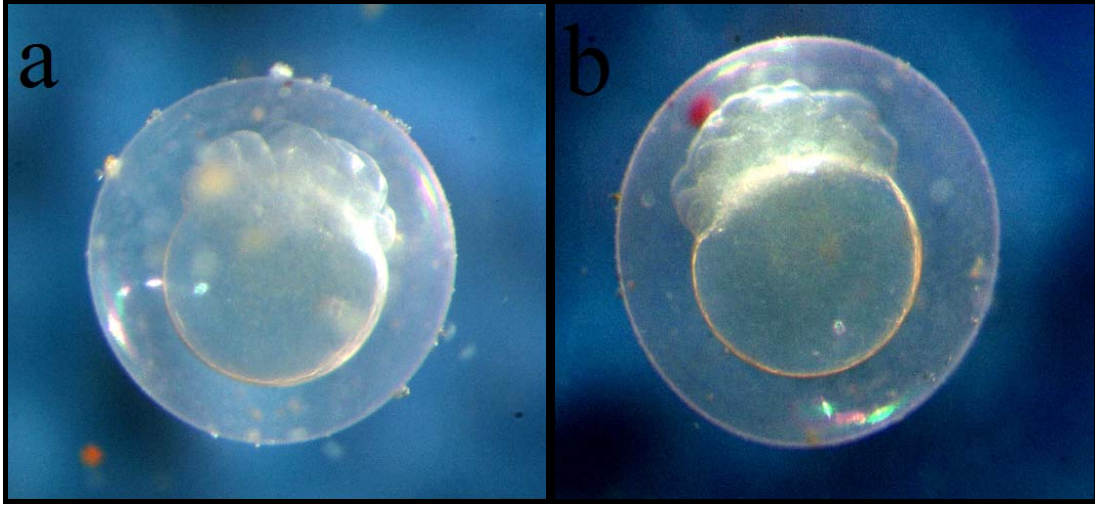


Şekil 4.2. Zebra balığı embriyosunda a) (0. saat) b) 2 blastomerli evre

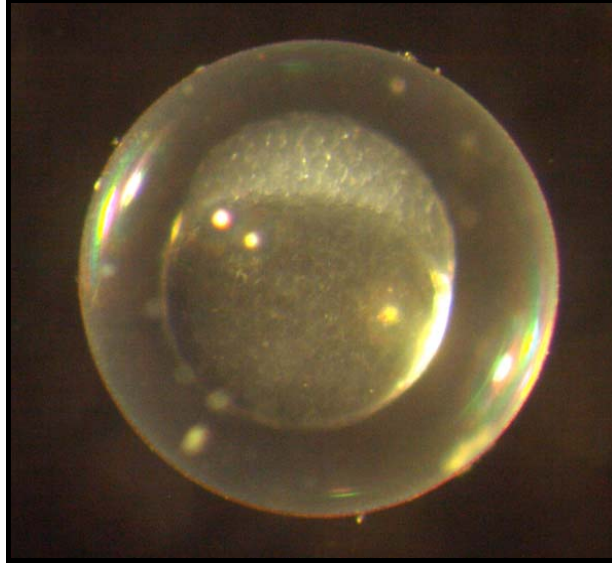


Şekil 4.3. Zebra balığı embriyosunda 4 blastomerli evre ve 8 blastomerli evre

Döllenmeden 1 saat 15 dakika sonra zebra balığı embriyosu tekrar animal vejetal kutup düzleminde bölündüğü ve 8 blastomer oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.3). Embriyolar bu şekilde segmentasyon aşaması boyunca bölünmelerine devam ederek 32 ve 64 blastomerli evreye ulaştılar. Blastomerler bu şekilde bölünmelerine devam ettiler (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5)

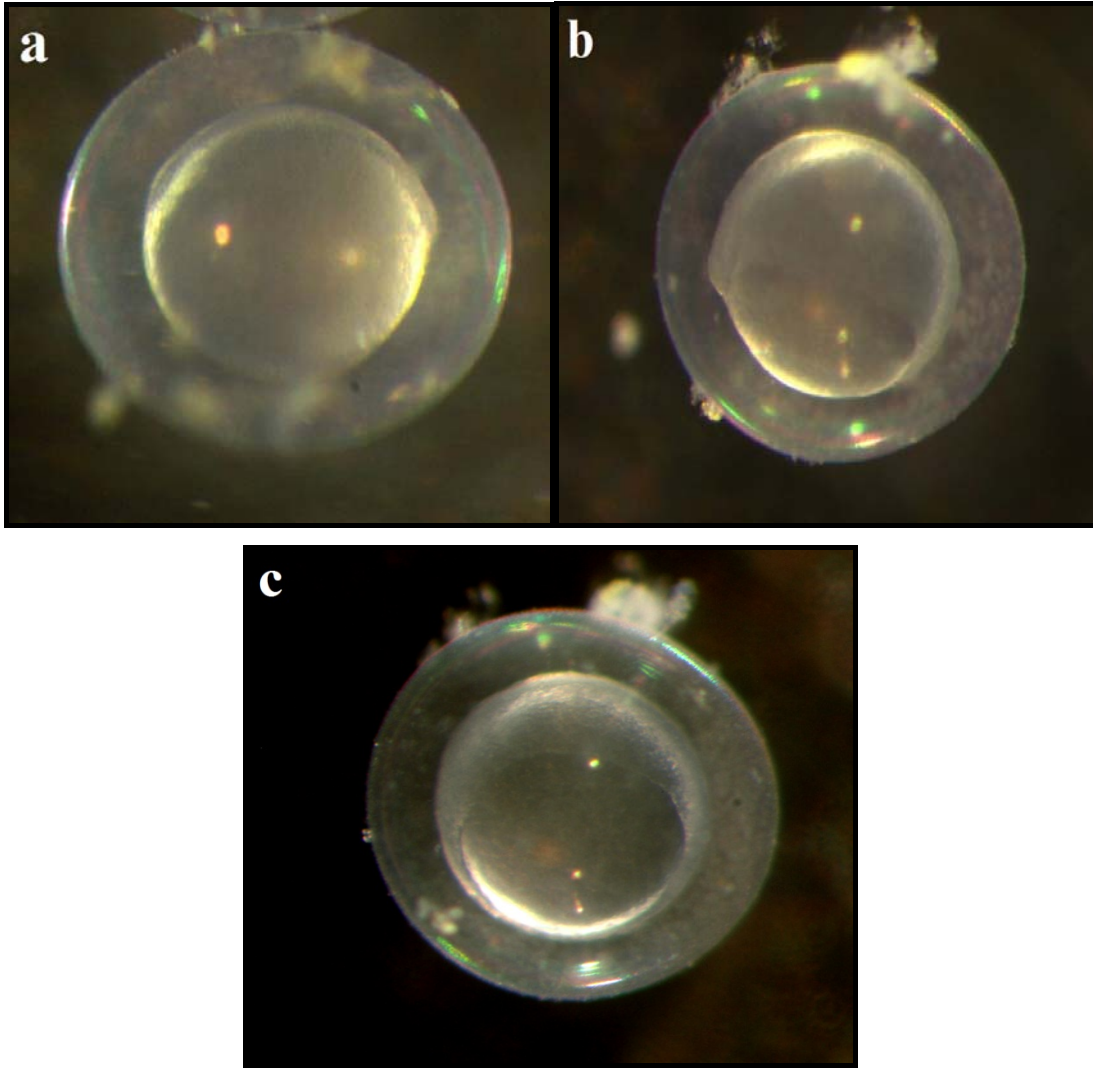


Şekil 4.4. Zebra balığı embriyosu a) 32 blastomerli evre b) 64 blastomerli evre



Şekil 4.5. Zebra balığı blastulası

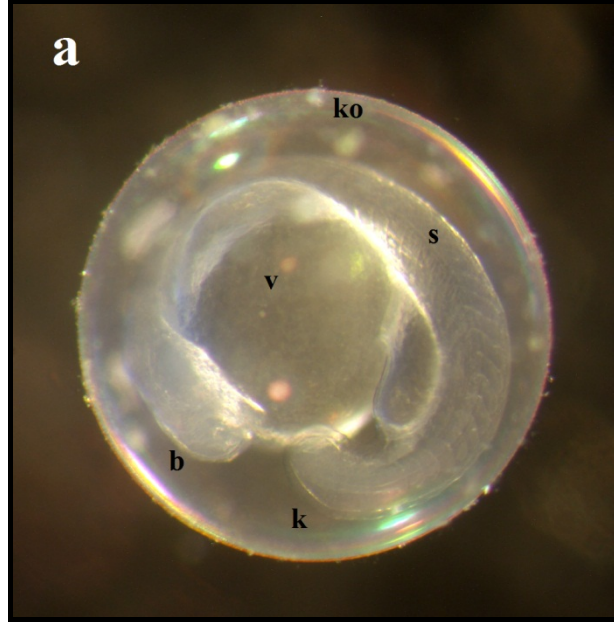
Segmentasyon aşamalarından sonra gastrulasyonun epiboli şeklinde gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 4.6).



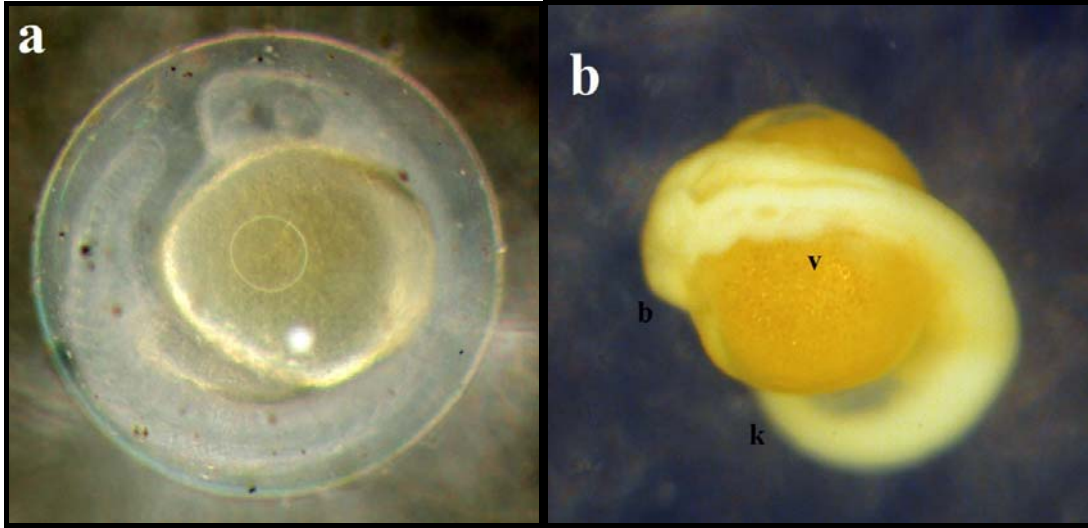
Şekil 4.6. Zebra balığı embriyosunda gastrulasyon; a) %30 epiboli, b) %70 epiboli c) %80 epiboli

Gelişimin 1. gününde somit oluşumunun tamamlandığı, baş ve kuyruk bölgelerinin oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8)

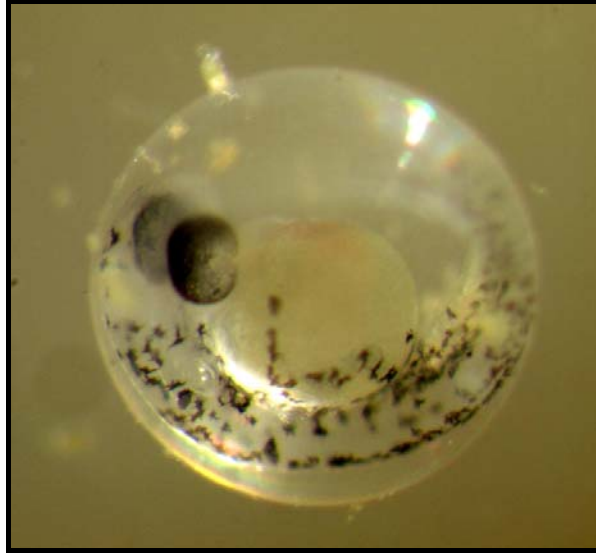
Döllenmeden sonra 2. günde pigmentasyon oluşumu gözlemlendi. Embriyonun kalp atışları stereo mikroskop altında izlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.7. 18 saatlik zebra balığı embriyosu a) Dekoryonize edilmemiş embriyo; b: baş bölgesi s: somitler, k: kuyruk, ko: koryon v: vitellüs

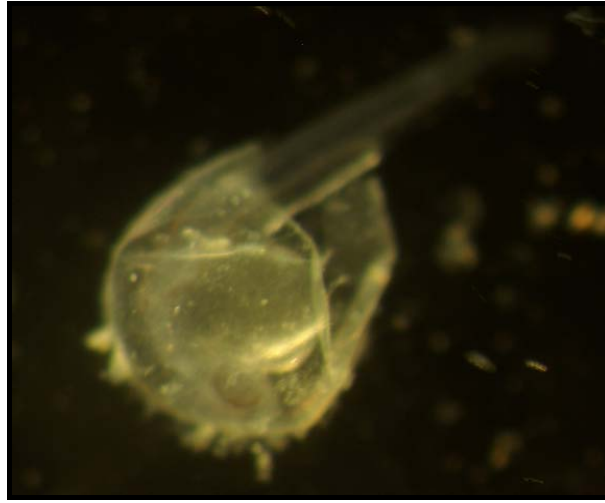


Şekil 4.8. Zebra balığı embriyosu. a) 24 saatlik b) Bouin ile fikse edilip dekoryonize edilmiş 24 saatlik embriyo; b: baş bölgesi, k: kuyruk, v: vitellüs



Şekil 4.9. 2 günlük zebra balığı embriyosu

Gelişimin 3. gününde zebra balığı embriyolarının koryondan çıktığı gözlemlendi (Şekil 4.10)

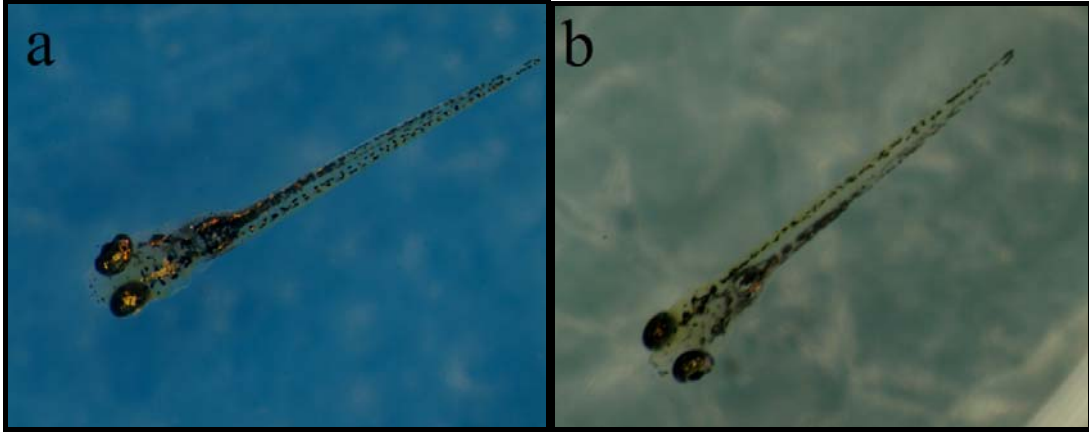


Şekil 4.10. 3 günlük zebra balığı embriyosunun koryondan çıkışı

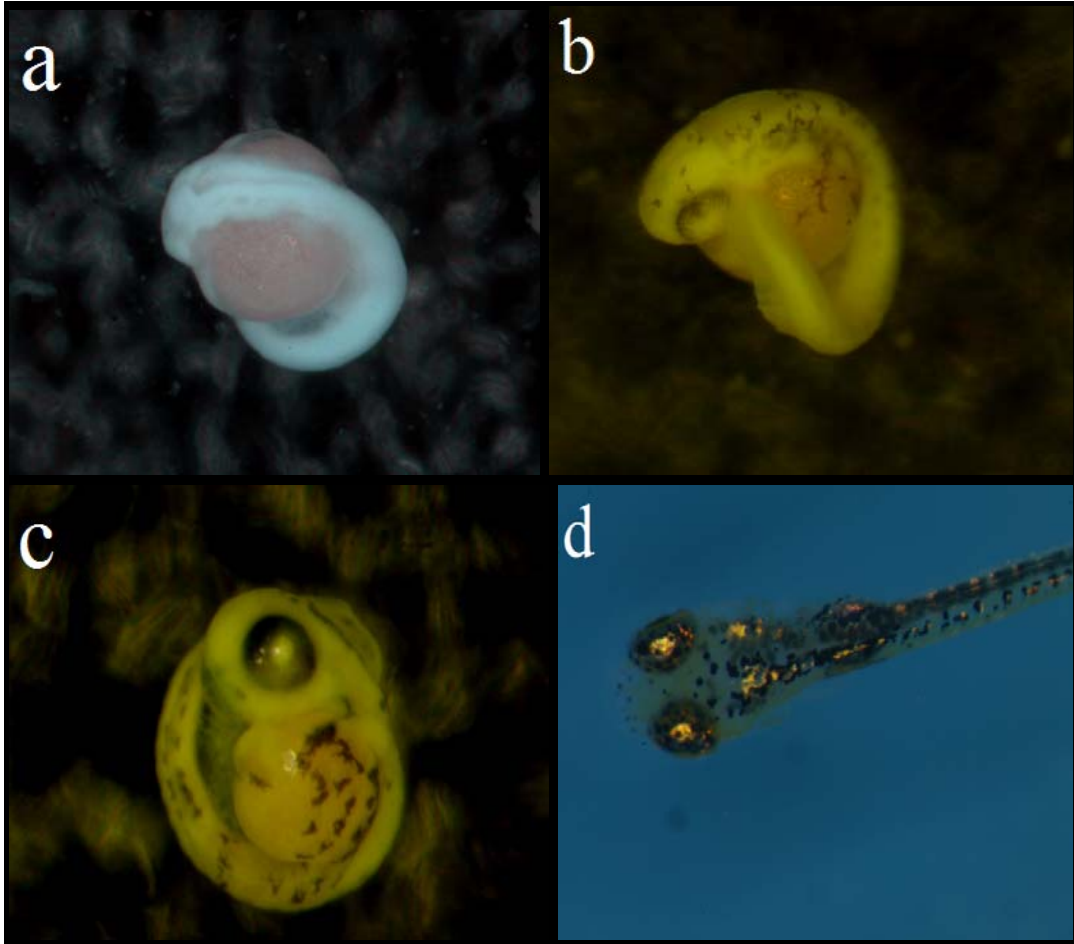
Zebra balığı larvaları 7. güne kadar vitellus kesesinden beslenirken, 7. gün itibari ile larvalarda ağız oluşumu gözlemlendi ve larvalar ağız yolu ile beslenmeye başladılar (Şekil 4.11).

4.1.2. Çözücü kontrol grubu

Morfolojik açıdan incelendiğinde gelişim sürecinde kontrol ve çözücü kontrol grupları arasında fark gözlemlenmedi (Şekil 4.12).



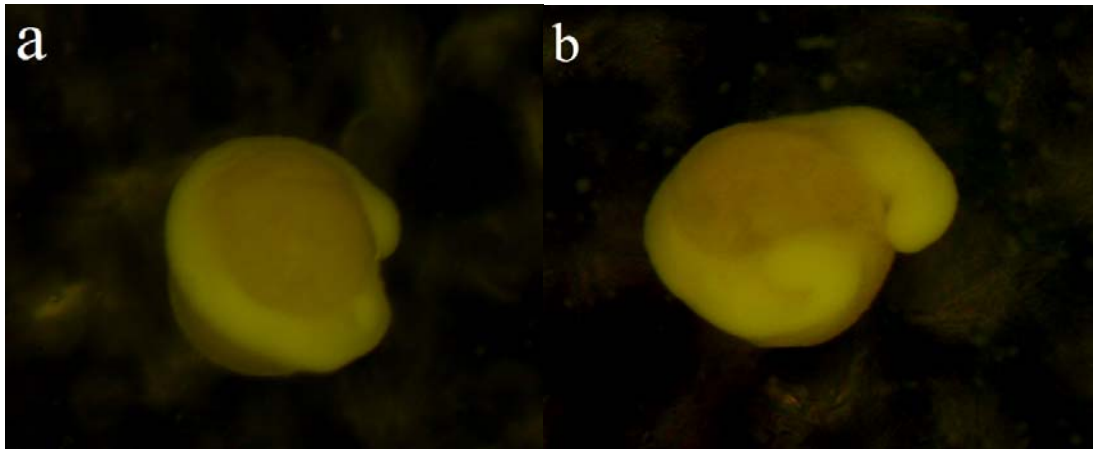
Şekil 4.11. a) 6 günlük zebra balığı prelarvası b) 8 günlük zebra balığı post larvası



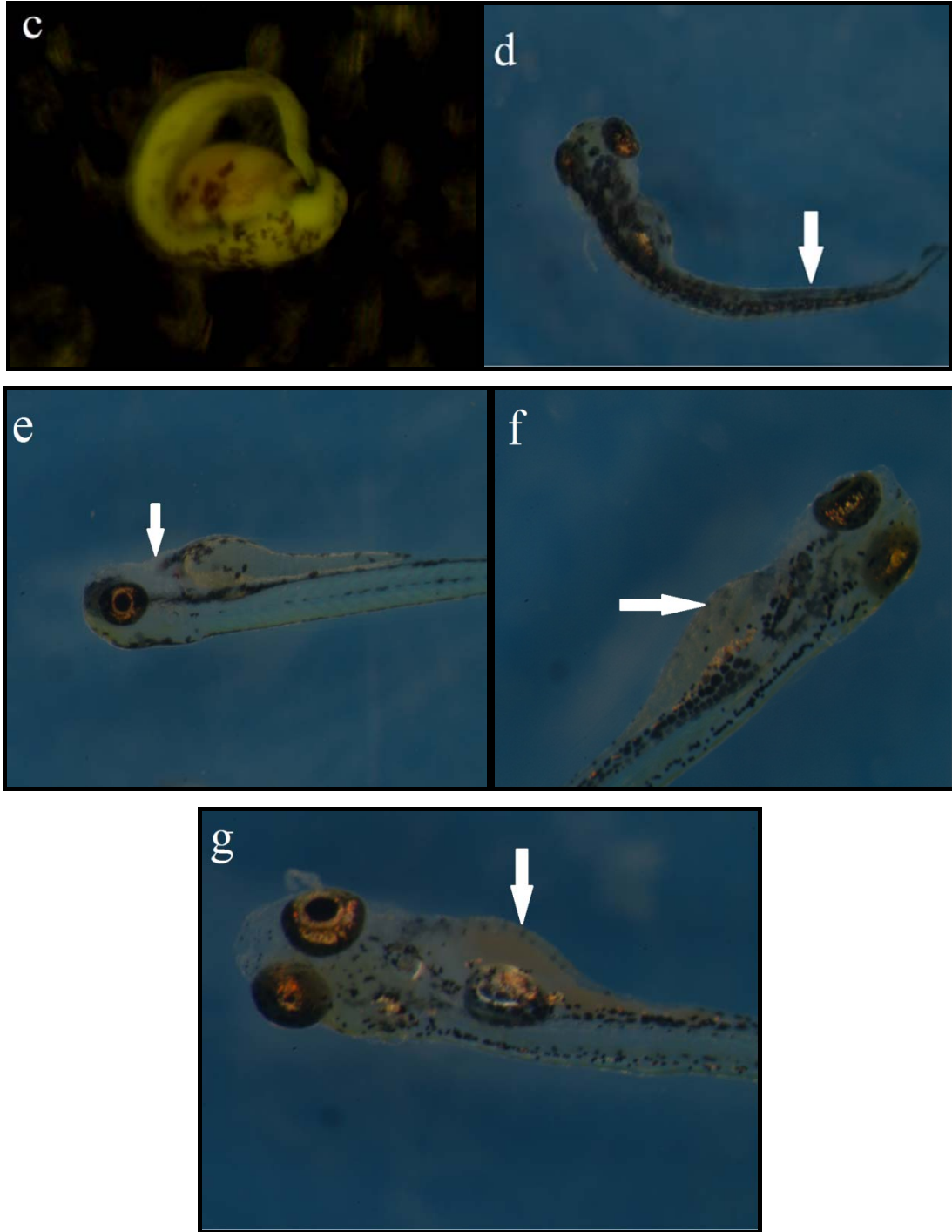
Şekil 4.12. Çözücü kontrol grubu, a) 1 günlük embriyo (Bouin ile fiske edilip fotoğraflanmıştır) b) 2 günlük embriyo (Bouin ile fiske edilip fotoğraflanmıştır) c) 3 günlük embriyo (Bouin ile fiske edilip fotoğraflanmıştır) d) 6 günlük prelarva

4.1.3. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış grup

Kontrol grupları gelişimlerini normal bir şekilde sürdürürken 4 mg/L BPA uygulaması yapılan gruptaki embriyo ve larvalar ancak 13 gün boyunca yaşadı. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyoları kontrol ve çözücü kontrol grupları ile karşılaştırıldığında gelişimin 1. gününde baş ve kuyruk oluşumunda gecikmeler (Şekil 4.13 a), 2. gününde pigmentasyon oluşumunda gecikmeler görüldü (Şekil 4.13 b). Aynı zamanda bu embriyoların koryondan çıkış zamanlarında da gecikmeler görüldü (Şekil 4.13 c). Bazı embriyoların gelişimin 5.ve 6. günlerinde koryondan çıkabildikleri tespit edildi. Bunun yanında birçok larvada anormal kuyruk oluşumları gözlemlendi (Şekil 4.13 d). Buna paralel olarak kuyruk şeklinde kıvrılmalar olduğu için larvaların sirküler şekilde yüzdükleri tespit edildi. Pek çok larvada kalp çevresinde ödem oluşumları ve kan birikimi görüldü (Şekil 4.13 g). Bu ödem oluşumu sonucunda larvaların yüzerken dengelerini sağlayamadıkları ve bir yana yatık şekilde yüzebildikleri tespit edildi (Şekil 4.13 e, f, g).



Şekil 4.13. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyo ve larvaları a) Bouin ile fikse edilip fotoğraflanmış 24 saatlik zebra balığı embriyosu, baş ve kuyruk oluşumunda gecikme. b) Bouin ile fikse edilip fotoğraflanmış 2 günlük zebra balığı embriyosu, baş ve kuyruk oluşumunda gecikme. c) Bouin ile fikse edilip fotoğraflanmış 3 günlük zebra balığı embriyosu, koryondan çıkmada gecikme d) 5 günlük zebra balığı prelarvası, kuyrukta oluşan deformasyonlardan (ok ile gösterilmiştir) dolayı sirküler hareketle yüzüş e) 5 günlük zebra balığı prelarvası, kalp çevresinde oluşan ödemden (ok ile gösterilmiştir) dolayı denge kaybının oluşumu ve yan yüzüş f) 6 günlük zebra balığı prelarvası, yüzme kesesi çevresinde yoğun ödem oluşumu (ok ile gösterilmiştir) g) 8 günlük zebra balığı larvası yüzme kesesi çevresinde ağır ödem oluşumu ve kan birikimi (ok ile gösterilmiştir)

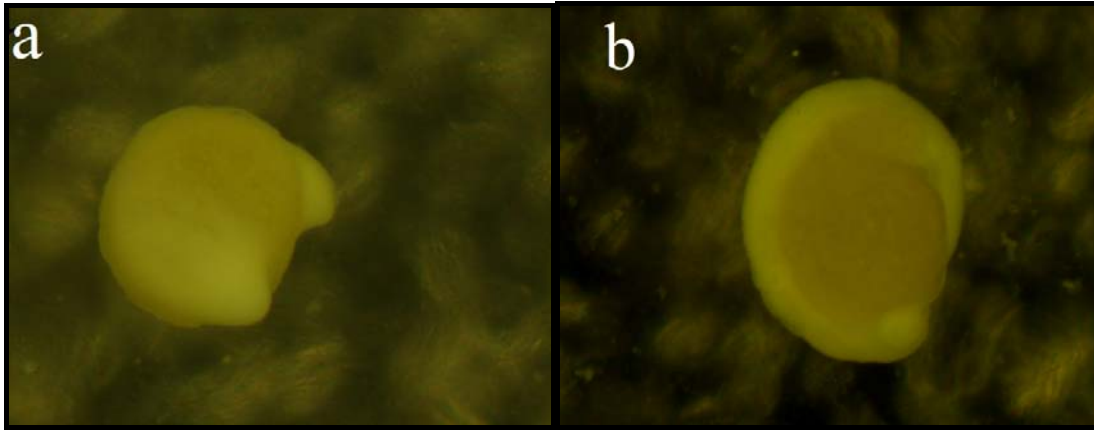


Şekil 4.13. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyo ve larvaları (Şeklin devamı)

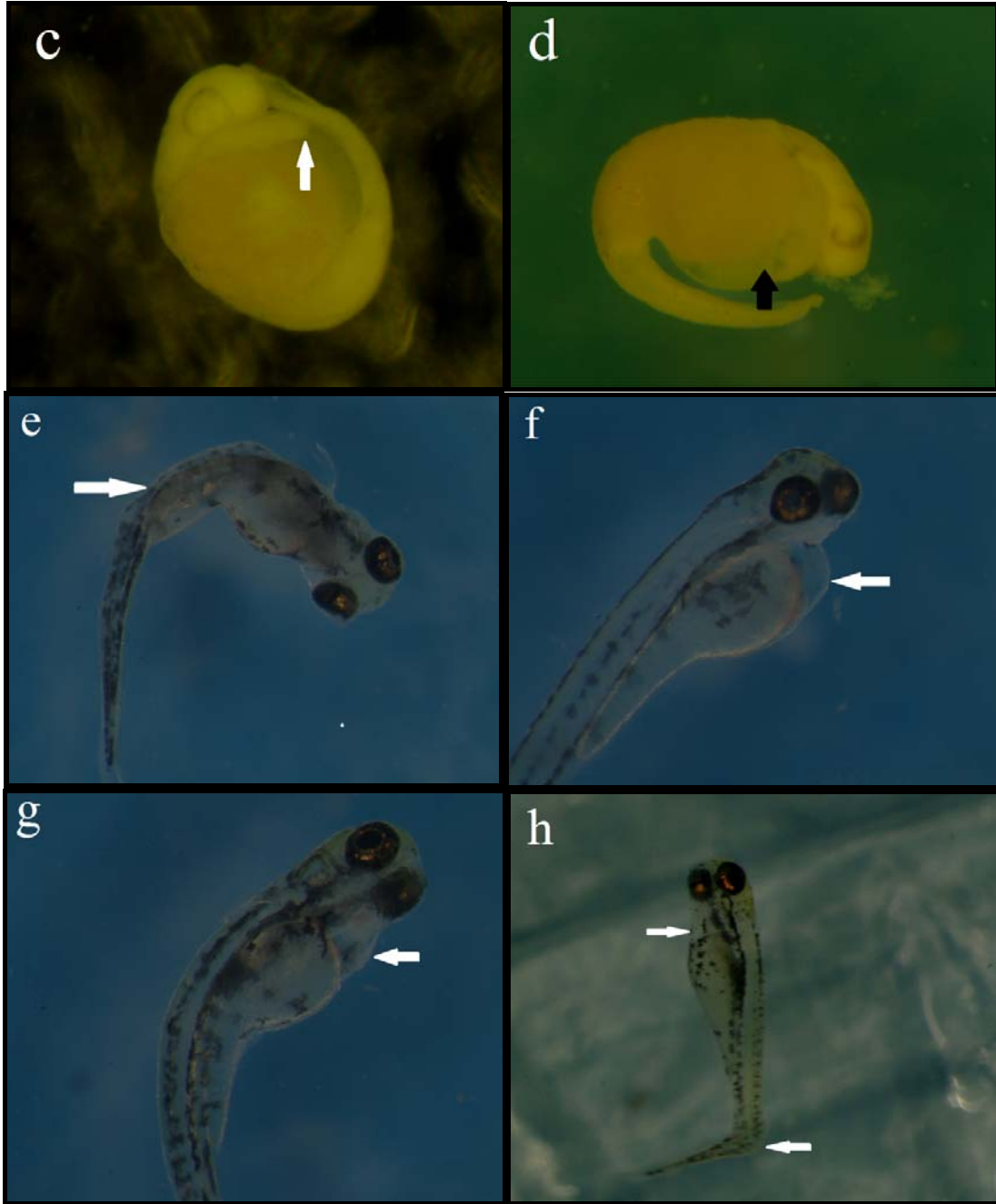
4.1.4. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış grup

Kontrol grupları gelişimlerini normal bir şekilde sürdürürken 8 mg/L BPA uygulaması yapılan gruptaki embriyo ve larvalar ancak 8 gün boyunca yaşadı. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış grupta da 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış

embriyolardaki etkiler biraz daha belirgin şekilde gözlemlendi. Bu gruptaki embriyolar, 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış gruptaki embriyolara göre daha az yaşayabildi ve oluşan morfolojik anormallikler 4 mg/L BPA grubundaki embriyolara göre daha fazla gözlemlendi. Gelişimin ilk iki gününde gelişim gerilikleri görüldü. Özellikle gelişimin ilk gününde baş ve kuyruk bölgeleri gelişmemiş embriyolara rastlandı (Şekil 4.14 a, b) Bu grupta da 4 mg/L BPA grubunda olduğu gibi pigmentasyon oluşumunda (Şekil 4.14 c) ve koryondan çıkış zamanında gecikmeler izlendi. 3-4 günlük prelarvalarda pigment oluşmadığı ve bu süreç içerisinde koryondan çıkamadıkları gözlemlendi (Şekil 4.14 c, d). Buna ek olarak bu gruptaki larvalarda kuyrukta anormal gelişimler (Şekil 4.14 e, g, h) ve kalp çevresinde 4 mg/L BPA grubuna göre daha büyük oranda ödem oluşumları (Şekil 4.14 f,g,h) izlendi. Buna ek olarak, kuyrukta oluşan şekil bozukluklarından dolayı sirküler yüzme şekilleri, yine oluşan büyük ödemden dolayı denge bozuklukları ve bir yana yatarak yüzme şekilleri görüldü (Şekil 4.14 e, f, g, h).



Şekil 4.14. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyo ve larvaları a) Bouin ile fikse edilip fotoğraflanmış 24 saatlik zebra balığı embriyosu, baş ve kuyruk oluşumunda gecikme. b) Bouin ile fikse edilip fotoğraflanmış 2 günlük zebra balığı embriyosu, gelişim geriliği ve pigmentasyon oluşumunda gecikme. c) Bouin ile fikse edilip fotoğraflanmış 3 günlük zebra balığı embriyosu, pigmentasyon oluşumunda ve koryondan çıkmada gecikme, kalp çevresinde ödem oluşumu (ok ile gösterilmiştir) d) Bouin ile fikse edilip fotoğraflanmış 4 günlük zebra balığı prelarvası, kalp çevresinde ödem oluşumu (ok ile gösterilmiştir) e) 5 günlük zebra balığı prelarvası, kuyrukta bükülmeler (ok ile gösterilmiştir) f) 5 günlük zebra balığı prelarvası, kalp çevresinde oluşan ödem (ok ile gösterilmiştir) g) 6 günlük zebra balığı prelarvası, kalp çevresinde oluşan ödem (ok ile gösterilmiştir) h) 7 günlük zebra balığı prelarvası, kalp çevresinde oluşan ödem (ok ile gösterilmiştir)ve kuyrukta bükülme (ok ile gösterilmiştir)

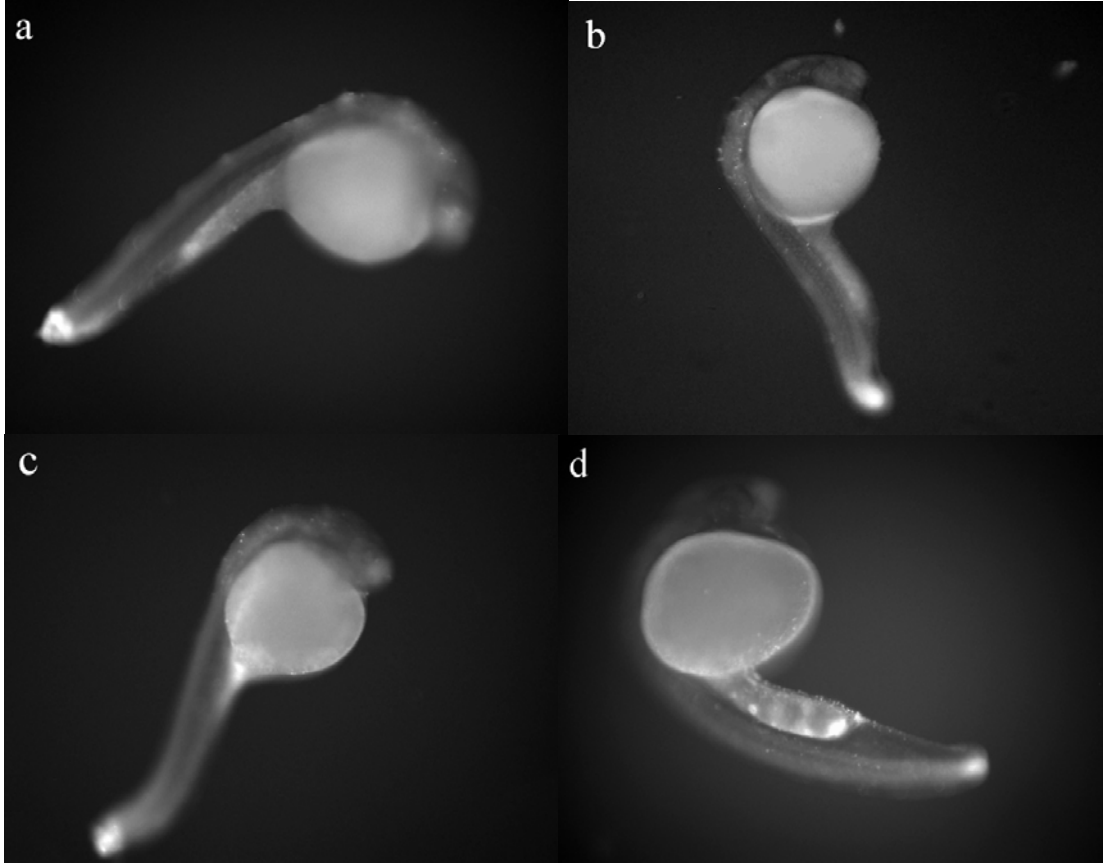


Şekil 4.14. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyo ve larvaları (Şeklin devamı)

4.2. Akridin Turuncusu Boyama Bulguları

24 saatlik zebra balığı embriyoları dekoryonize edildikten sonra vital boya olan akridin turuncusu ile boyandıktan sonra embriyolar anestezi edilerek apoptotik hücreler floresan mikroskop ile tespit edilerek fotoğraflandı. Akridin turuncusu boyaması sonucunda PGH göç yolu göz önüne alınarak sonuçlar değerlendirildiğinde

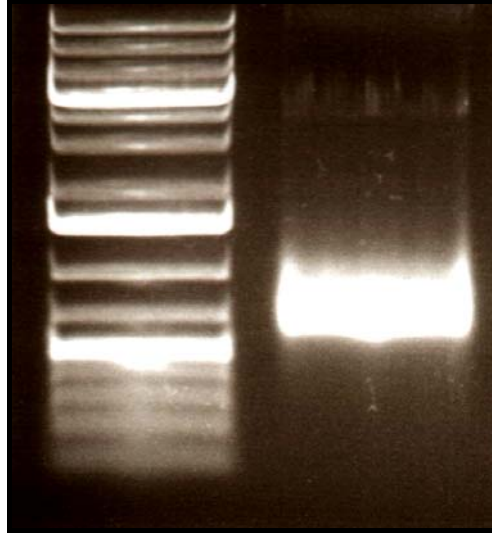
kontrol grupları ile BPA uygulaması yapılmış embriyoların arasında apoptotik hücre artışı bakımından bir fark görülmedi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Akridin turuncusu boyaması yapılmış 24 saatlik zebra balığı embriyoları a) Kontrol grubu, b) Çözücü kontrol grubu, c) 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış grup d) 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış grup

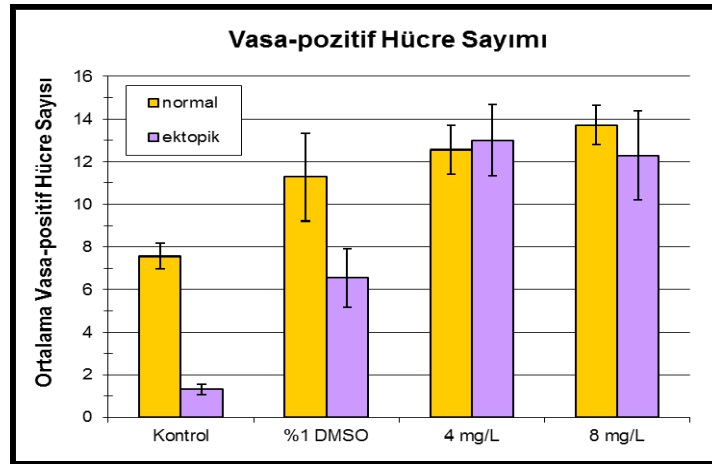
4.3. Whole Mount In Situ Hibridizasyon Bulguları

Kontrol ve BPA uygulaması yapılmış deney gruplarında primordiyal germ hücrelerinin konumlarını belirlemek için vasa genine ait digoksinin ile işaretlenmiş antisense RNA probu (Şekil 4.16) kullanılarak whole mount in situ hibridizasyon uygulaması yapıldı. Primordiyal germ hücre göçünde ilk 24 saat büyük bir önem taşıdığından bu yöntem 24 saatlik zebra balığı embriyolarında uygulandı.

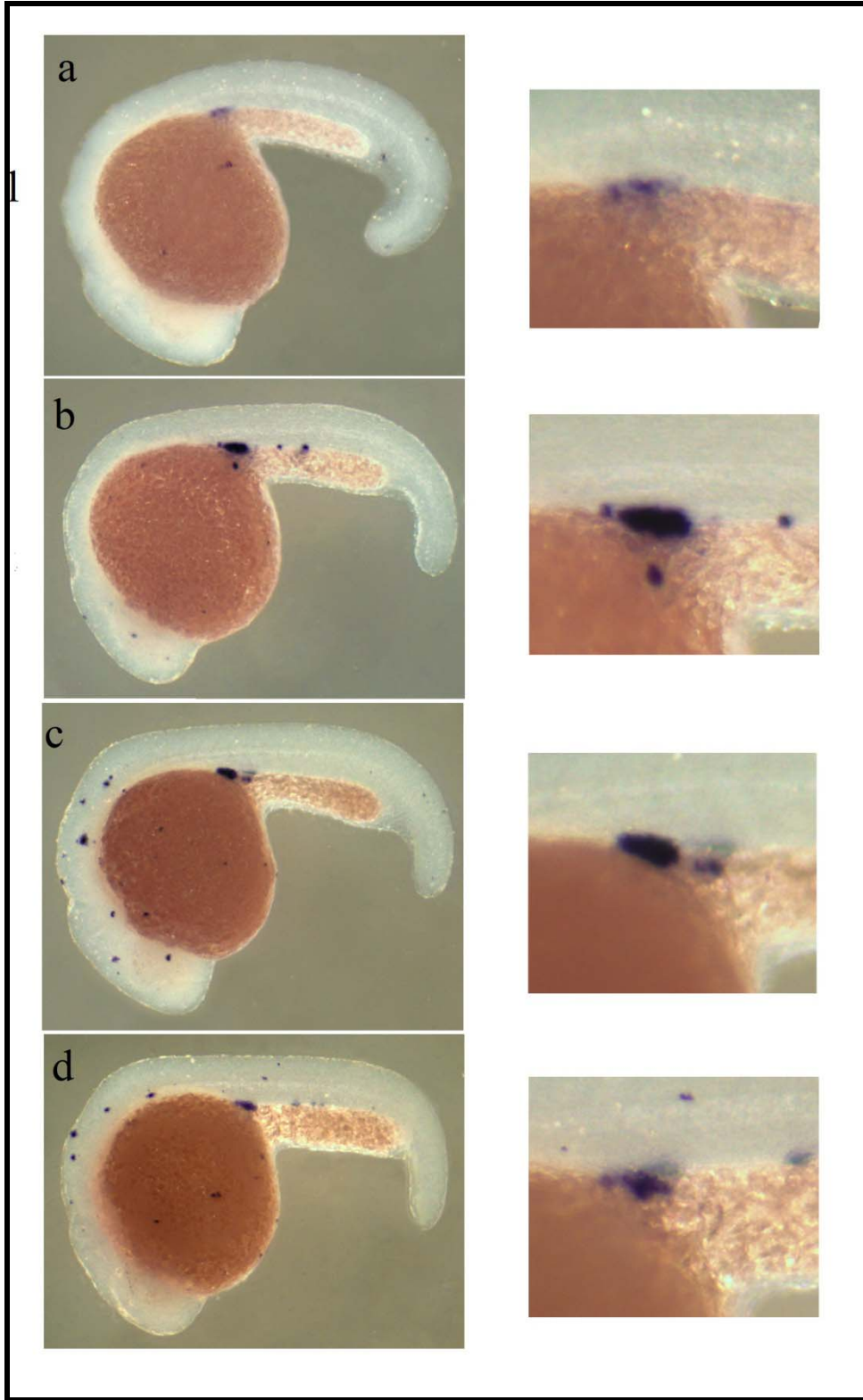


Şekil 4.16. vasa genine ait RNA'nın elektroforetik görüntüsü

Whole mount in situ hibridizasyon sonucunda spesifik olarak işaretlenmiş olan primordiyal germ hücrelerinin konumları stereo mikroskop ile gözlemlendi, sayıldı ve fotoğraflandı. Kontrol grubu ile deney grupları karşılaştırıldığında primordiyal germ hücre sayısında bir artış olduğu görüldü (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). Buna ek olarak embriyolarda primordiyal germ hücrelerinin normalde bulunması gereken bölgenin dışında da PGH varlığına rastlandı ve bunlar “ektopik hücre” ler olarak değerlendirildi. Çözücü kontrol grubunda kontrol grubuna göre ektopik hücrelerin arttığı tespit edildi. Deney gruplarında yine kontrol ve çözücü kontrol gruplarına nazaran ektopik hücre artışında bir artış görüldü. (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18)



Şekil 4.17. 24 saatlik zebra balığı embriyosunda vasa-pozitif (primordiyal germ hücre) hücre sayım grafiği. Sarı sütunlar normal bir şekilde doğru bölgeye göç edebilmiş primordiyal germ hücre sayısını, mor sütunlar ise ektopik bölgelerdeki primordiyal germ hücre sayısını temsil etmektedir.



Şekil 4.18. Whole mount in situ hibridizasyon ile belirlenmiş primordiyal germ hücreleri; a) kontrol grubu, b) çözücü kontrol grubu (%1 DMSO), c) 4mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyosu, d) 8mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyosu

Kontrol grubu ve BPA uygulaması yapılmış olan gruplardaki primordiyal germ hücreleri T testi yapılarak istatistiki açıdan değerlendirildi. Toplam PGH (doğru bölgeye göç eden PGH + ektopik PGH) frekansına bakıldığında %1'lik DMSO uygulamasının kontrol grubuna göre PGH sayısını arttırdığı gözlemlendi. BPA uygulaması yapılmış deney gruplarında ise kontrol gruplarına göre PGH sayısı bakımından anlamlı bir şekilde artış olduğu görüldü (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarındaki toplam PGH frekansı

	Ortalama ± Standart Hata
Kontrol	4,43 ± 0,94 *a
DMSO	9,00 ± 1,45 *b
4 mg/L BPA	13,50 ± 0,81 *c
8 mg/L BPA	13,71 ± 0,98 *c

* Farklı harfle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark vardır. ($p < 0,05$)

Doğru bölgeye göç eden primordiyal germ hücre frekansı incelendiğinde kontrol grubu ile çözücü kontrol grubu arasında PGH sayısı bakımından anlamlı bir fark görülmezken, kontrol grubu ile BPA uygulaması yapılmış gruplar arasında PGH sayısı bakımından anlamlı bir fark vardı. 4 mg/L BPA ve 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarında doğru bölgeye göç etmiş olan PGH sayısında anlamlı bir artış bulundu. PGH sayısı artışı çözücü kontrol ile doz grupları karşılaştırıldığında anlamlı değildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarında doğru bölgeye göç eden PGH frekansı

	Ortalama ± Standart Hata
Kontrol	7,57 ± 0,65 *a
DMSO	11,29 ± 2,22 *a,b
4 mg/L BPA	12,57 ± 1,25 *b
8 mg/L BPA	13,71 ± 0,99 *b

* Farklı harfle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark vardır. ($p < 0,05$)

Ektopik bölgelerdeki primordiyal germ hücre frekansı incelendiğinde, kontrol grubu ile çözücü kontrol ve BPA uygulaması yapılmış gruplar arasında PGH sayısı bakımından anlamlı bir artış bulundu. BPA uygulaması sonucunda zebra balığı

embriyolarında primordiyal germ hücrelerinin bir kısmı gonadal bölgeye göç edememiş şekilde ektopik bölgelerde gözlemlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarında ektopik bölgelerdeki PGH frekansı

	Ortalama ± Standart Hata
Kontrol	1,29 ± 0,29 *a
DMSO	6,71 ± 1,57 *b
4 mg/L BPA	14,43 ± 1,00 *c
8 mg/L BPA	13,71 ± 1,77 *c

* Farklı harfle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark vardır. (p<0,05)

Özetle BPA uygulaması yapılmış olan zebra balığı embriyolarındaki ektopik ve toplam PGH frekansı karşılaştırıldığında kontrol grubu ile çözücü kontrol ve BPA uygulaması yapılmış gruplar arasında anlamlı bir fark vardı. Çözücü kontrolde kontrol grubuna göre bir artış gözlemlendi. Yine çözücü kontrol ile BPA uygulaması yapılmış gruplar arasında anlamlı bir fark vardı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarında ektopik ve toplam PGH frekansı

BPA UYGULAMALARINDA EKTOPIK VE TOPLAM PGH FREKANSI

	Toplam PGH sayısı	Ektopik PGH Sayısı	Ektopik PGH *100/Toplam PGH	+
Kontrol	62	9	14,52	a
DMSO	126	47	37,30	b
4 mg/L BPA	189	101	53,44	c
8 mg/L BPA	192	96	50,00	c

+ Farklı harfle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark vardır.

Kontrol- DMSO	p<0,01
Kontrol- 4mg/L BPA ve 8 mg/L BPA	p<0,001
DMSO- 4 mg/L BPA	p<0,01
DMSO- 8mg/L BPA	p<0,05

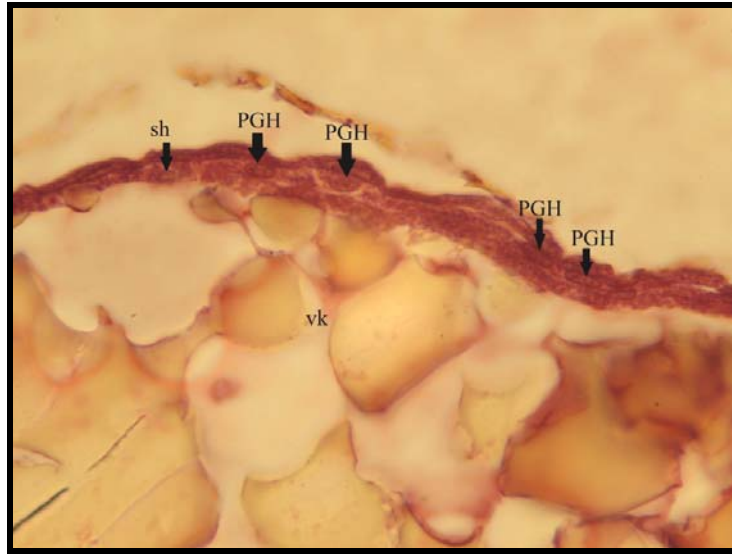
4.4. Histolojik Bulgular (Işık Mikroskobu Bulguları)

Çalışmamızda zebra balığındaki primordiyal germ hücreleri 15 gün boyunca morfolojik ve histolojik yöntemlerle incelendi. Bu hücreler, ilk olarak segmentasyon aşamasında tanımlandı. Primordiyal germ hücrelerinin somatik hücrelere göre daha büyük oluşu, iri çekirdek yapısına sahip olmaları ve glikojen granülleri içerdiği için

H&E, Toluidine Blue ve Best Carmin gibi boyalarla spesifik olarak boyanışı primordiyal germ hücrelerinin tanınmasını kolaylaştırdı.

4.4.1. Kontrol grubu histolojik bulgular

Gelişimin 1. gününde primordiyal germ hücreleri vitellüs sınırının anterior kısmında bilateral sıralar halinde Best Carmin boyaması yapılarak gözlemlendi (Şekil 4.19). Primordiyal germ hücrelerinin somatik hücrelere göre büyük oldukları tespit edildi.

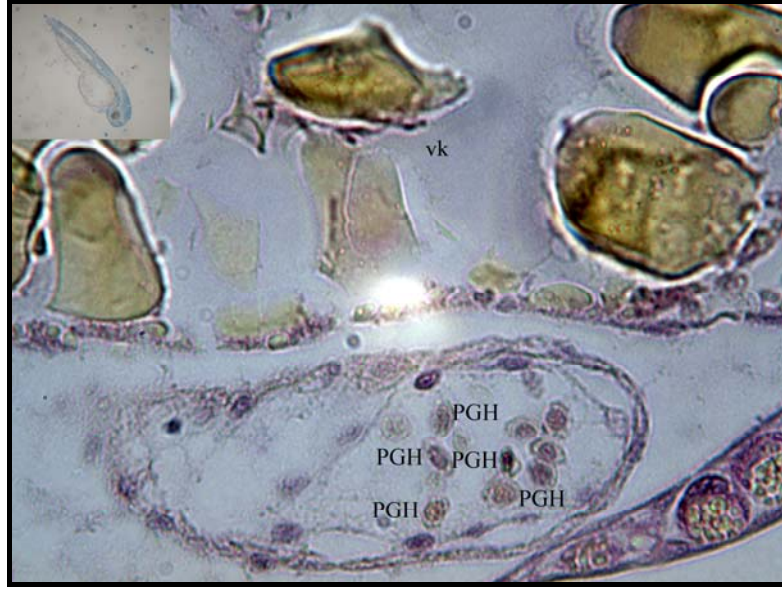


Şekil 4.19. 1 günlük zebra balığı embriyosunun 5µm lik kesiti, sh: somatik hücre, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellüs kesesi. Best Carmin boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).

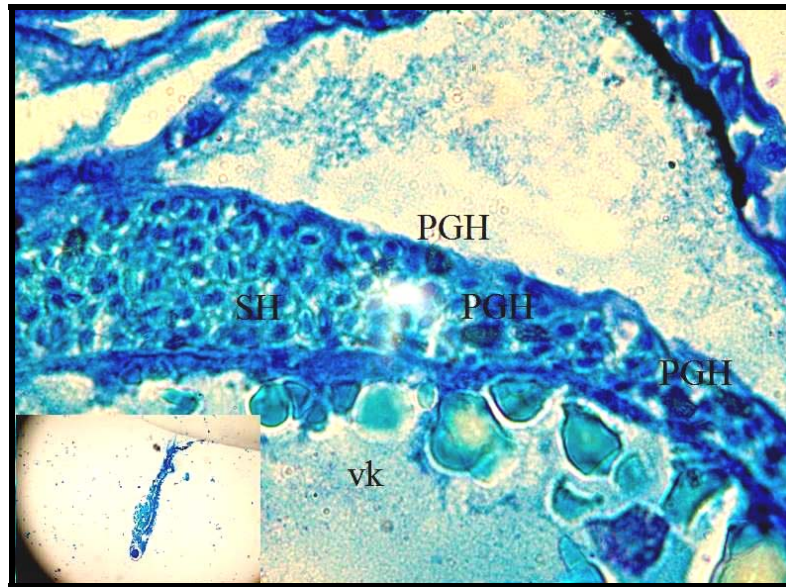
Gelişimin 2. gününde primordiyal germ hücreleri vitellüs kesesi sınırında gözlemlendi. Yapılan Toluidine Blue ve Best Carmin boyamaları sonucunda primordiyal germ hücreleri ışık mikroskobu altında, iri nükleusları ve granüllü yapıları sayesinde diğer hücrelerden ayırt edildi (Şekil 4.20). Hücreler oval bir şekle sahipti.

Döllenmeden sonra 3. günde koryondan çıkmış olan zebra balığı prelarvalarında Toluidine Blue boyaması yapıldı. Toluidine Blue yöntemine olumlu (pozitif) yanıt veren primordiyal germ hücreleri büyük nükleusları ve granüllü sitoplazmaları ile somatik hücrelerden rahat bir şekilde ayrılabilirdi. Primordiyal germ hücreleri vitellüs kesesinin dorsalinde gözlemlendi (Şekil 4.21).

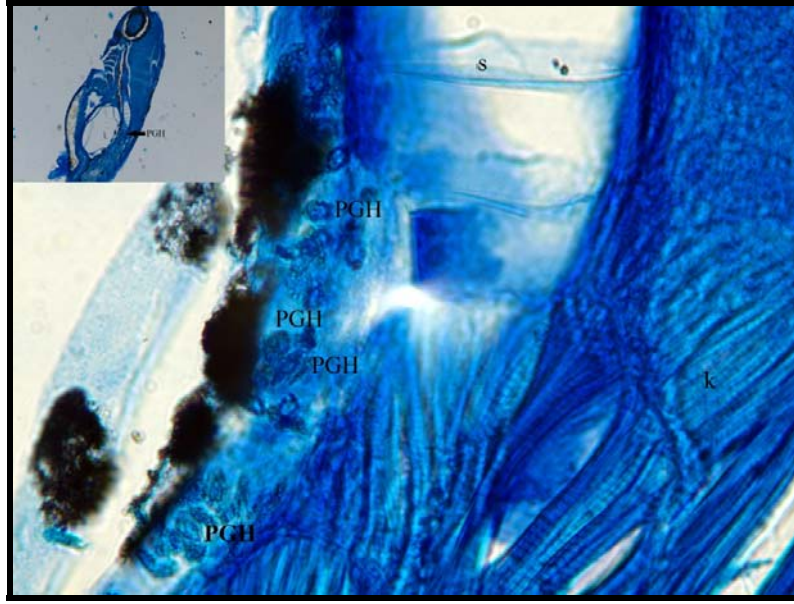
Gelişimin 4. gününde primordiyal germ hücreleri somitler ile vücut boşluğu arasında kalan bölgede gözlemlendi. Primordiyal germ hücreleri, yapılan Toluidine Blue boyaması sonucunda granüllü yapıları sayesinde belirgin olarak seçildi. 4. gün itibariyle primordiyal germ hücrelerinin şekillerinin ovalden iğ şekline dönüştüğü gözlemlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.20. 2 günlük zebra balığı embriyosu, PGH: primordiyal germ hücreleri, vk: vitellus kesesi. Best Carmin boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).



Şekil 4.21. 3 günlük zebra balığı prelarvasında vitellus kesesinin üst bölgesinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, sh: somatik hücre, vk: vitellus kesesi. Toluidine Blue boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100)

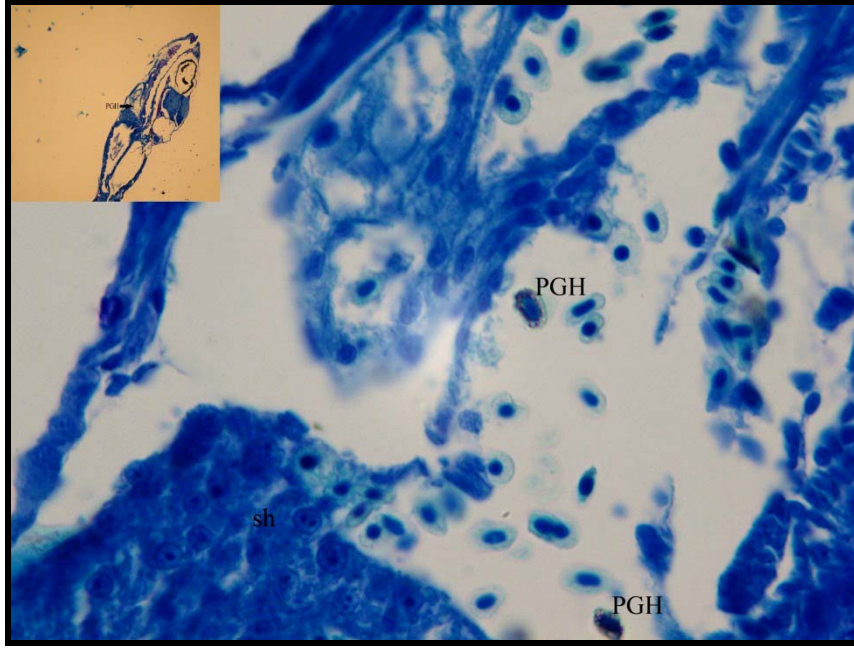


Şekil 4.22. 4 günlük zebra balığı prelarvası, PGH: primordiyal germ hücreleri, s: somitler, k: kas tabakası. Toluidine Blue boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).

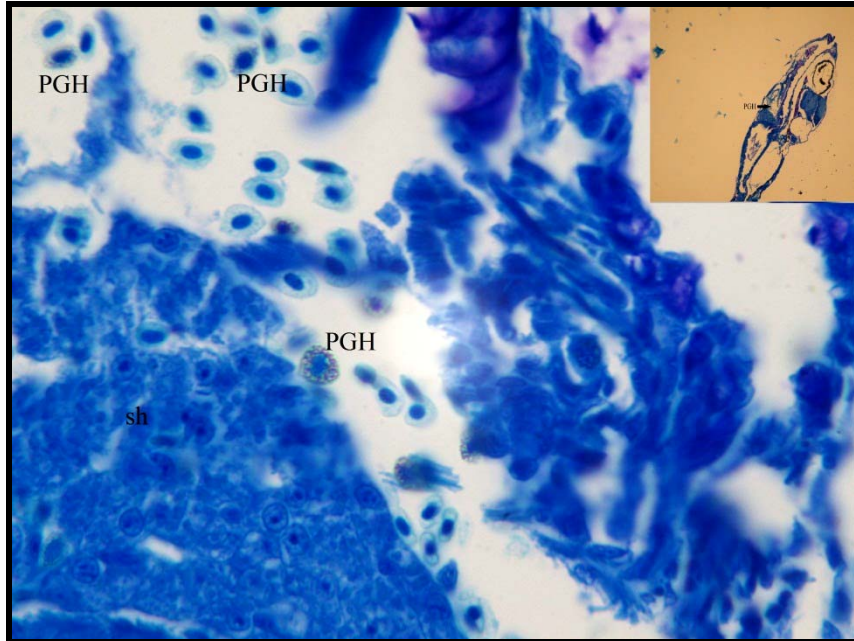
Gelişimin 5. gününde, primordiyal germ hücreleri kas tabakasının alt tarafında gözlemlendi. Yapılan Toluidine Blue boyaması sonucunda primordiyal germ hücrelerinin diğer hücrelerden daha farklı bir şekilde boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.23). Primordiyal germ hücrelerindeki nuage materyalleri ışık mikroskobu altında izlendi. Primordiyal germ hücreleri göç yolu üzerinde ameboid hareketlerle tek tek göç ettiği tespit edildi (Şekil 4.24). Katyonik yapıdaki Toluidine Blue boyasının primordiyal germ hücrelerindeki elektronca yoğun nuage materyallerini spesifik olarak boyadığı görüldü (Şekil 4.25).

Gelişimin 7. gününde yapılan Toluidine Blue boyaması sonucunda primordiyal germ hücreleri büyük nükleusları ve nuage materyalleri sayesinde somatik hücrelerden kolayca ayırt edildi (Şekil 4.26). Zebra balığı prelarvalarından alınan kesitlerde primordiyal germ hücreleri vücut boşluğu ile kas tabakası arasındaki bölgede gözlemlendi (Şekil 4.27).

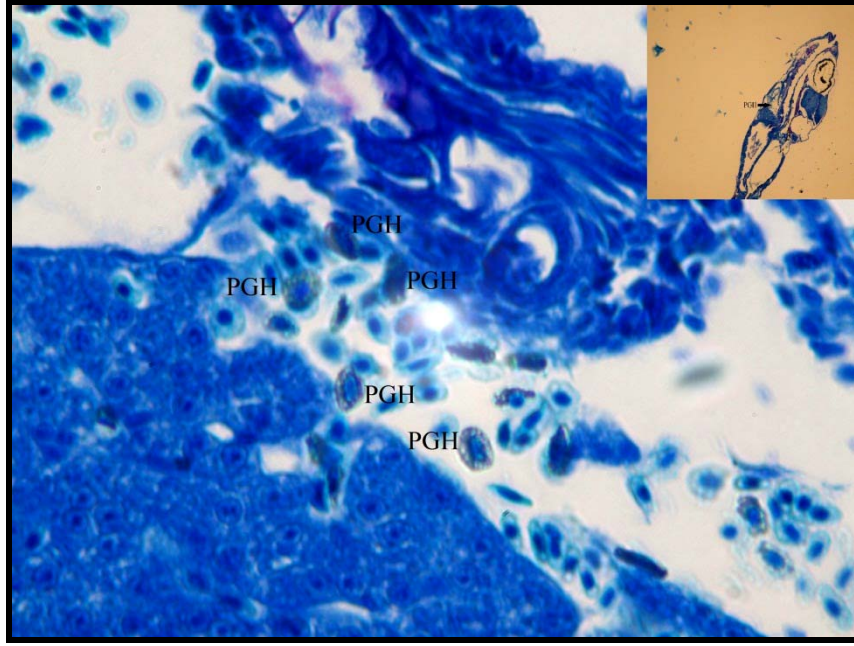
Gelişimin 9. gününde primordiyal germ hücreleri, kas tabakasının alt bölgelerinde (Şekil 4.28) ve vücut boşluğu yakınlarında (Şekil 4.29) tespit edildi. Göç etmekte olan primordiyal germ hücrelerinin iğ şeklini aldığı ve ameboid hareketlerle göç ettiği gözlemlendi.



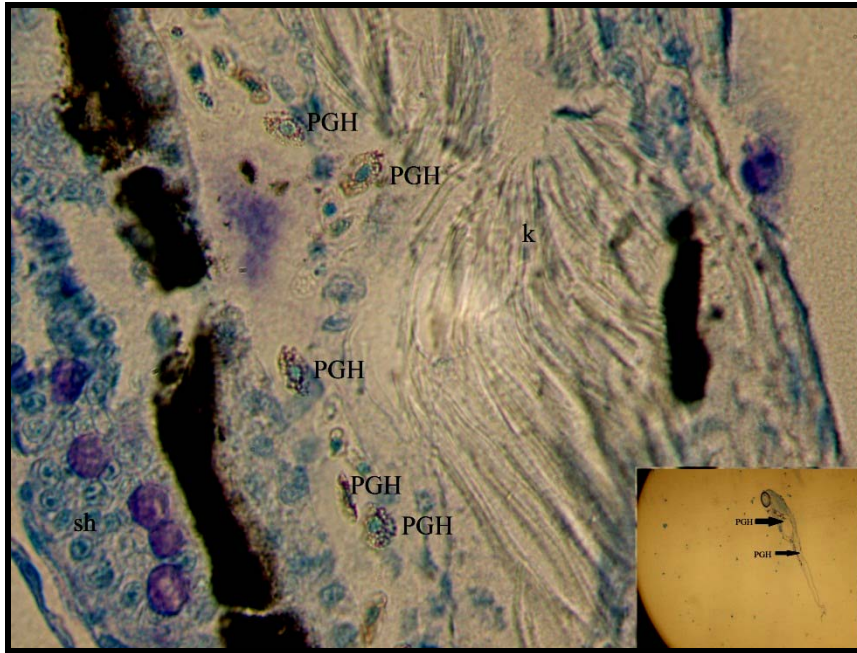
Şekil 4.23. 5 günlük zebra balığı prelarvasında göç yolu üzerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücreleri. Toluidine Blue boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).



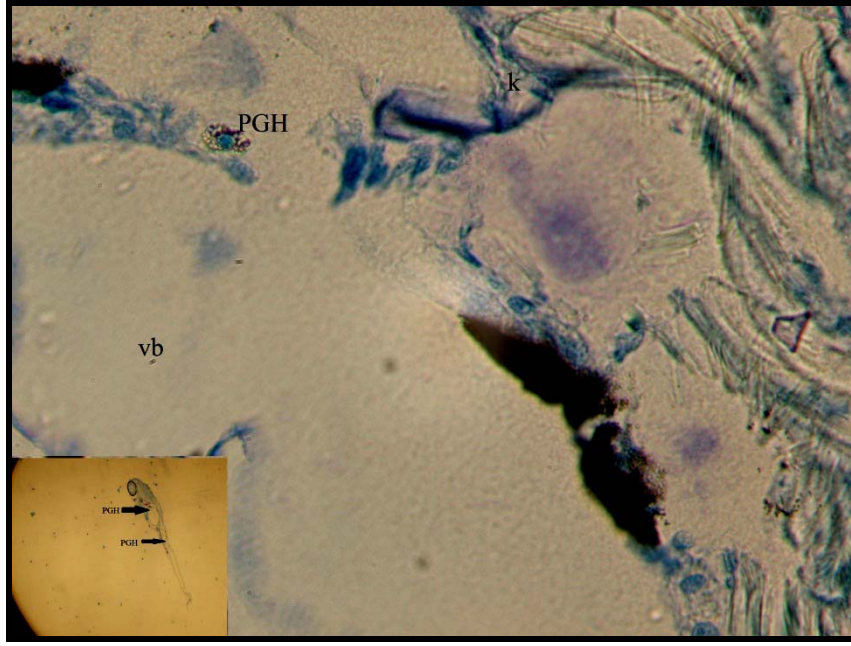
Şekil 4.24. 5 günlük zebra balığı prelarvasında kas tabakasının altında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücreleri, sh: somatik hücre. Toluidine Blue boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).



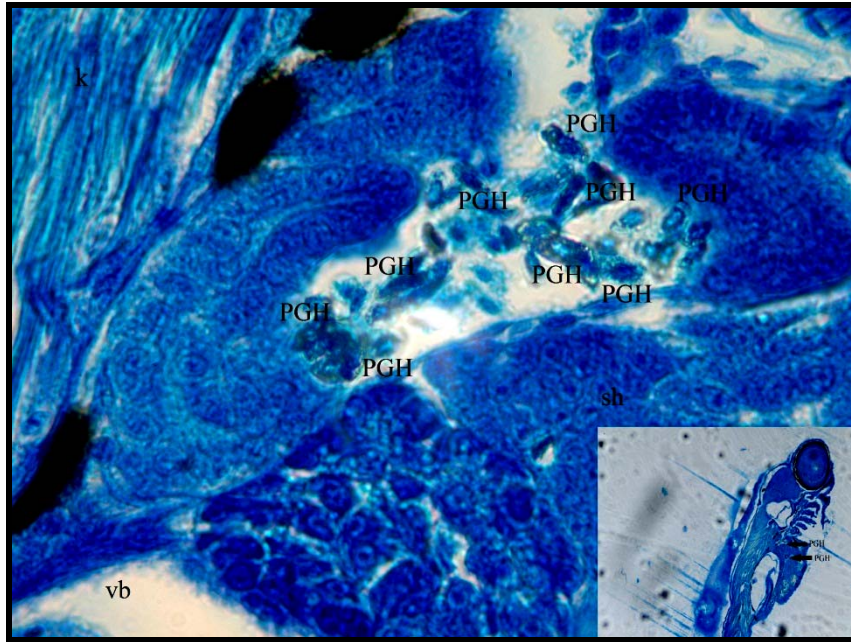
Şekil 4.25. 5 günlük zebra balığı prelarvasında kas tabakasının altında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücreleri. Toluidine Blue boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).



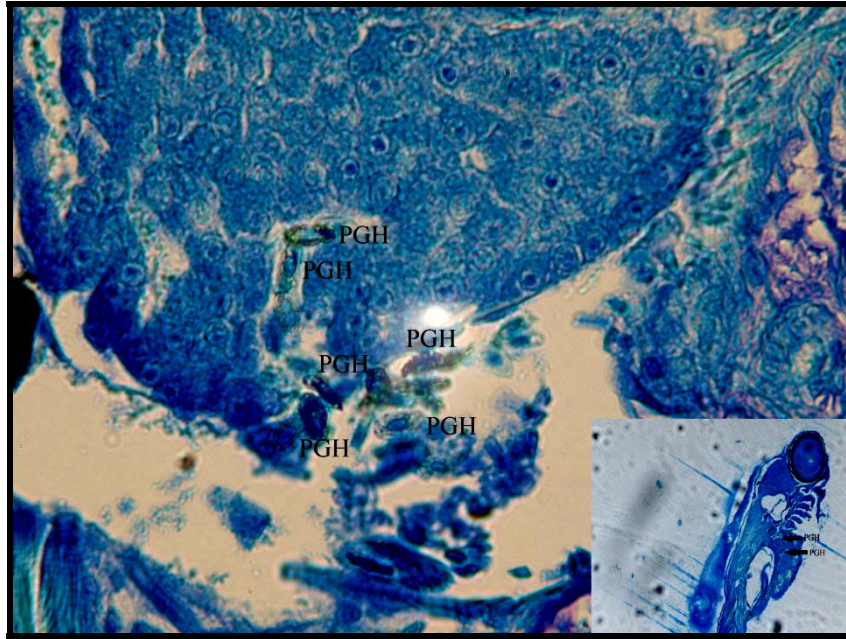
Şekil 4.26. 7 günlük zebra balığı prelarvasında kas tabakasının altında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücreleri, k: kas tabakası. Toluidine Blue boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).



Şekil 4.27. 7 günlük zebra balığı prelarvasında vücut boşluğunun dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu, k: kas tabakası. Toluidine Blue boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).



Şekil 4.28. 9 günlük zebra balığı larvasında kas tabakasının alt bölgesinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu, k: kas tabakası. Toluidine Blue boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).

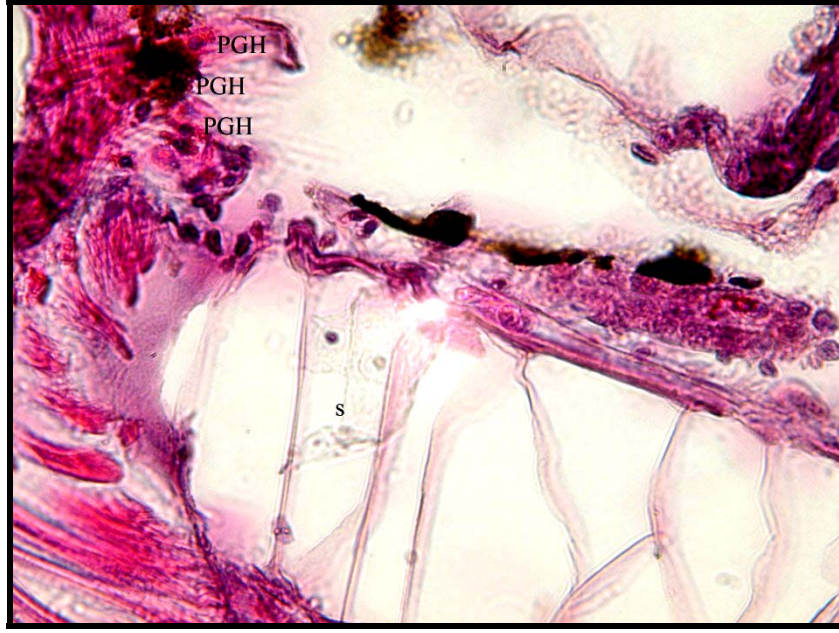


Şekil 4.29. 9 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu yakınında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, sh: somatik hücre. Toluidine Blue boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).

Gelişimin 10. gününde primordiyal germ hücreleri, somitler ile vücut boşluğu arasında kalan bölgede gözlemlendi (Şekil 4.30). Yapılan H&E boyaması sonucunda içerdikleri glikojen taneleri sayesinde hücrelerin pozitif bir reaksiyon verdiği görüldü (Şekil 4.31). İri nükleusları ve büyük hücre boyutları sayesinde primordiyal germ hücreleri somatik hücrelerden belirgin bir şekilde ayrıt edildi.

Gelişimin 13. gününde primordiyal germ hücrelerinin vücut boşluğu yakınlarında ameboid hareketlerle göç ettiği görüldü. Primordiyal germ hücrelerinin iğ şeklinde olduğu tespit edildi (Şekil 4.32).

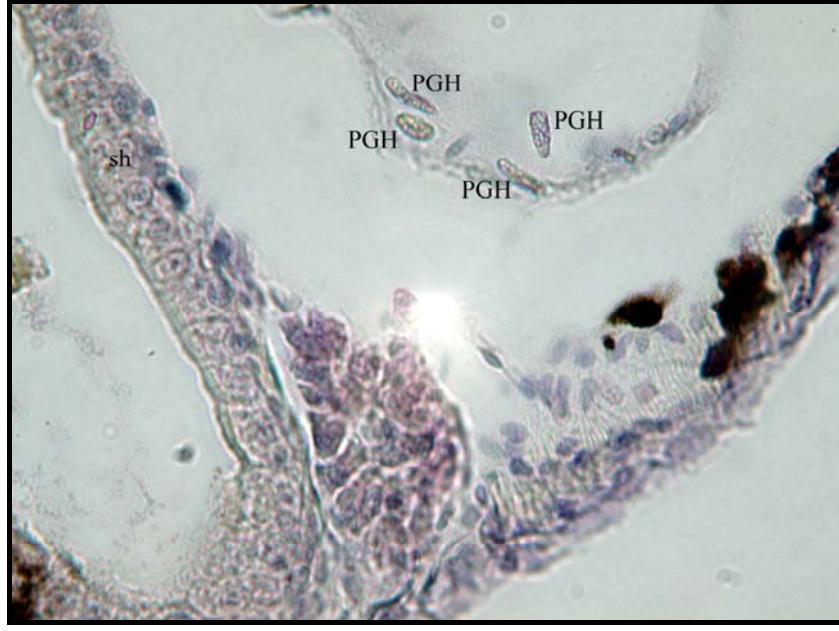
Gelişimin 15. gününde primordiyal germ hücreleri, gonad taslaklarının yakınlarında gözlemlendiler (Şekil 4.33). H&E boyamasının yapılması sonucunda primordiyal germ hücrelerinin içerdikleri eozinofilik granüller sayesinde diğer hücrelerden farklı bir şekilde boyandıkları görüldü (Şekil 4.34).



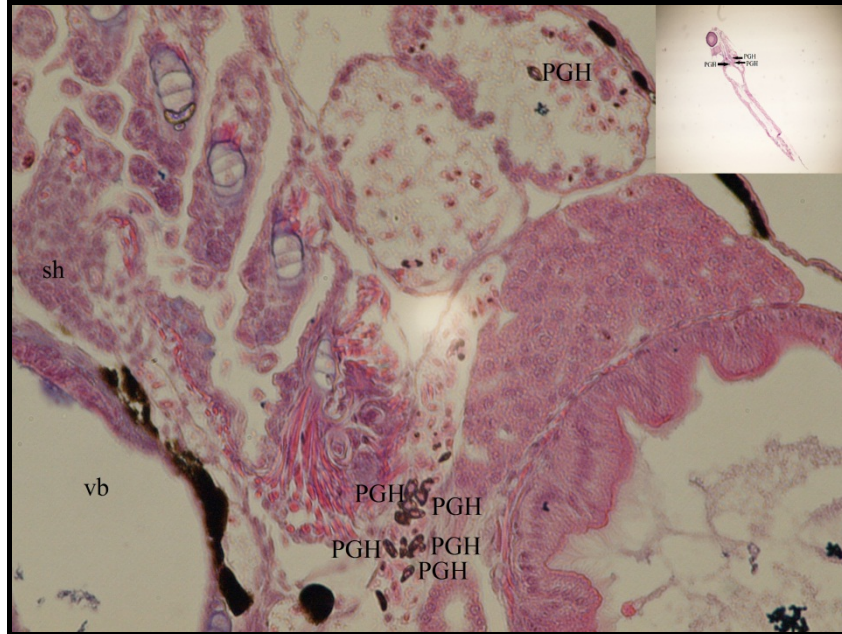
Şekil 4.30. 10 günlük zebra balığı larvasında somitler ile vücut boşluğu arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, s: somitler. H&E boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).



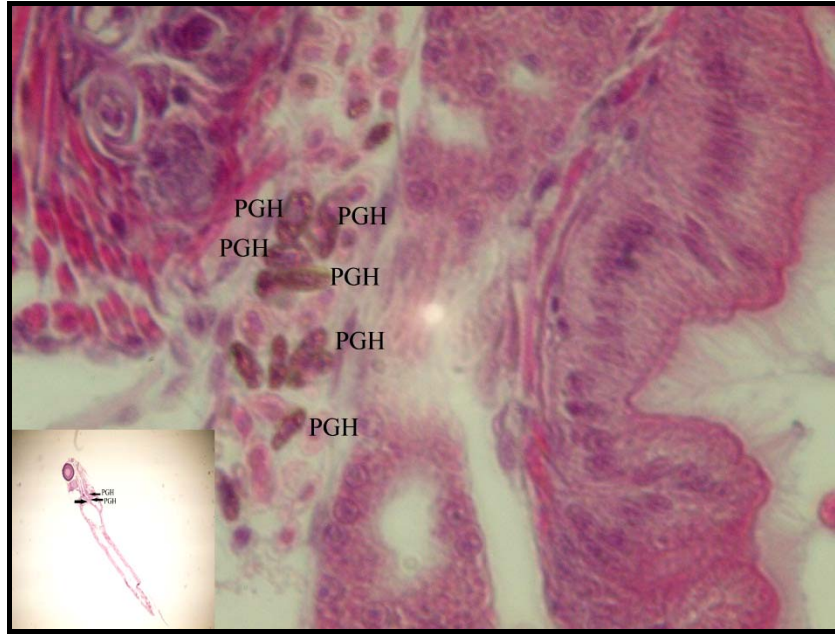
Şekil 4.31. 10 günlük zebra balığı larvasında somitler ile vücut boşluğu arasında gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, s: somitler. H&E boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).



Şekil 4.32. 13 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu yakınlarında göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, sh: somatik hücre, Best Carmin boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).



Şekil 4.33. 15 günlük zebra balığı larvasında gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu, H&E boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x40).

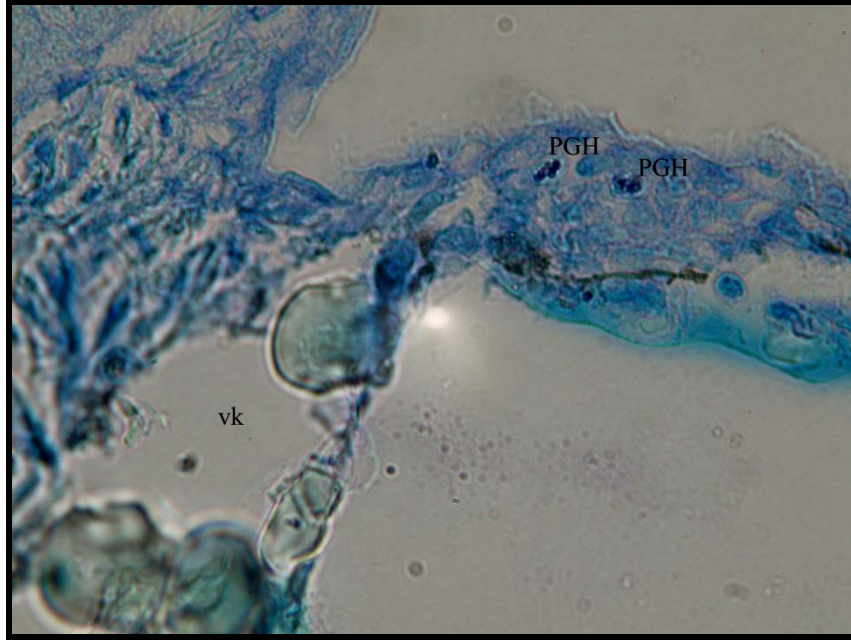


Şekil 4.34. 15 günlük zebra balığı larvasında gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, H&E boyama yöntemi. Işık mikroskobu (x100).

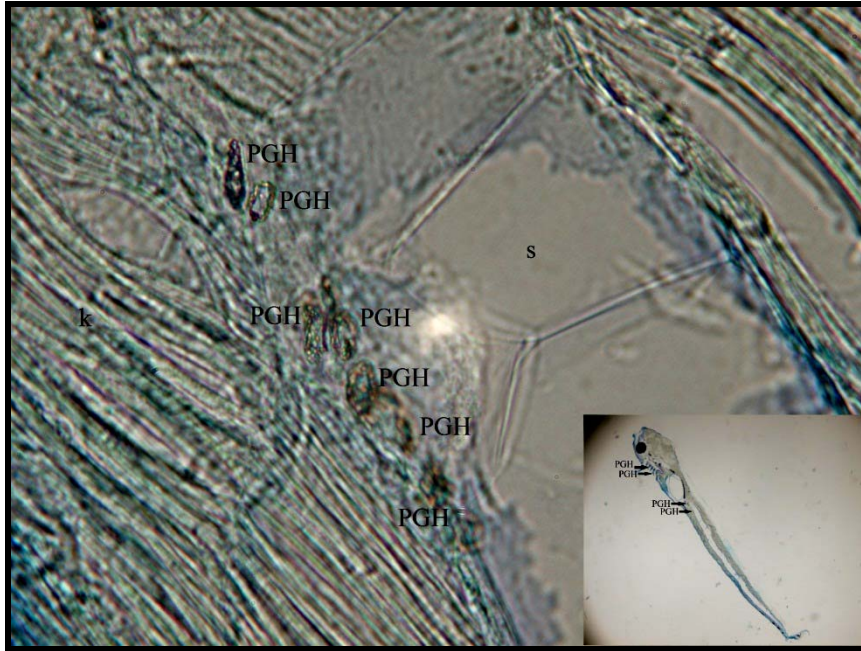
4.4.2. Çözücü kontrol grubunun histolojik bulguları

%1 oranında DMSO uygulanan zebra balığı embriyolarından gelişimin 2. gününde alınan kesitlerde Toluidine Blue boyaması yapıldı. Yapılan Toluidine Blue boyamasında primordiyal germ hücreleri vitellus kesesinin dorsal sınırında tespit edildi. Primordiyal germ hücrelerinin Toluidine Blue boyasına olumlu tepki verdikleri görüldü. Katyonik bir boya olan Toluidine Blue boyasının primordiyal germ hücrelerindeki elektronca yoğun materyalleri spesifik olarak boyadığı tespit edildi (Şekil 4.35).

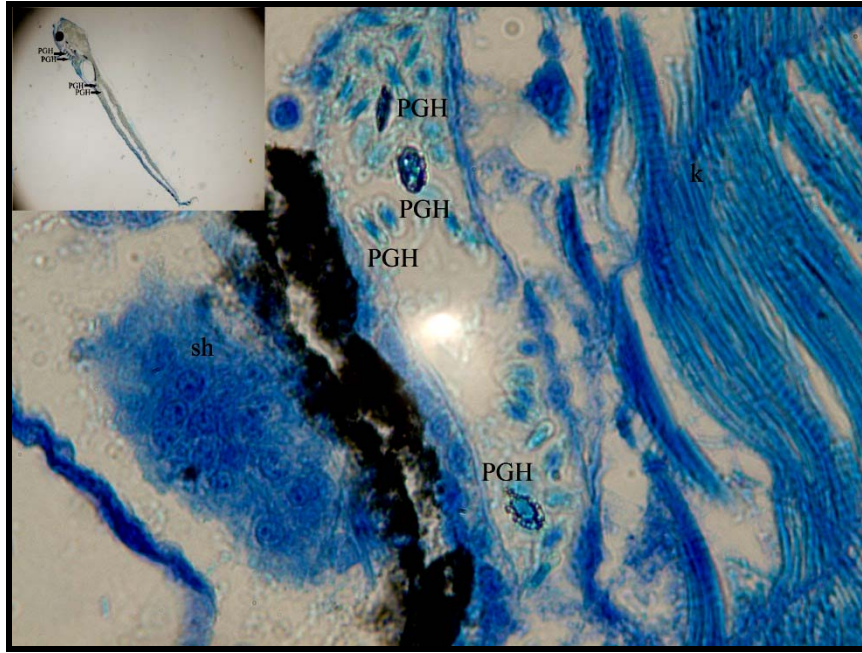
%1 oranında DMSO uygulanan zebra balığı prelarvalarından gelişimin 6. gününde alınan kesitlerde primordiyal germ hücreleri somitler ile kas tabakası arasında kalan bölgede tespit edildi. Bu bölgede primordiyal germ hücreleri grup halinde izlendi (Şekil 4.36.). Yapılan Toluidine Blue boyaması sonucunda nuage materyali içeren iğ şeklindeki primordiyal germ hücreleri ışık mikroskobu ile rahat bir şekilde gözlemlendi (Şekil 4.37).



Şekil 4.35. %1 oranında DMSO uygulaması yapılmış 2 günlük zebra balığı embriyosu, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellüs kesesi. Toluidine Blue boyaması, (x100).



Şekil 4.36. %1 oranında DMSO uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvası, PGH: primordiyal germ hücresi, s: somitler, k: kas tabakası. Toluidine Blue boyaması, (x100).

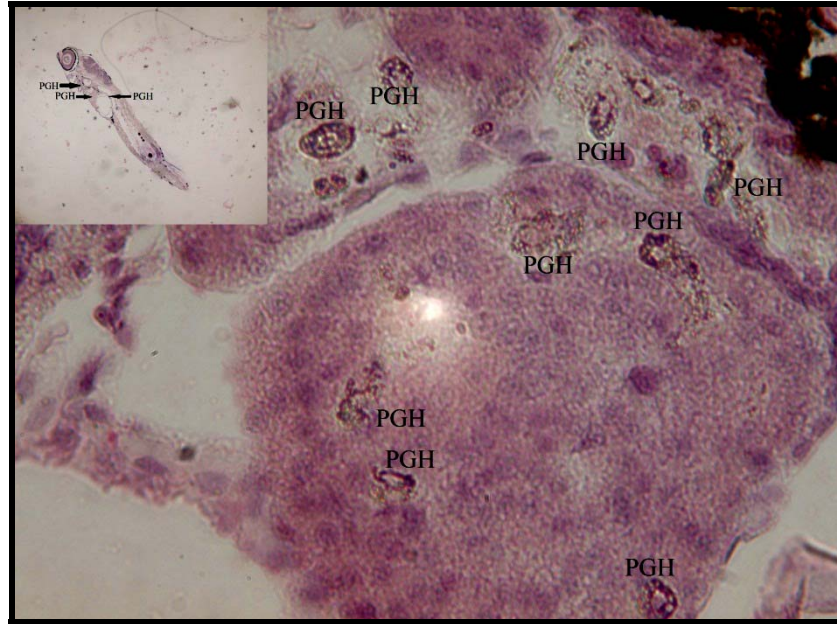


Şekil 4.37. %1 oranında DMSO uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvası, PGH: primordiyal germ hücresi, sh: somatik hücre. Toluidine Blue boyaması, (x100).

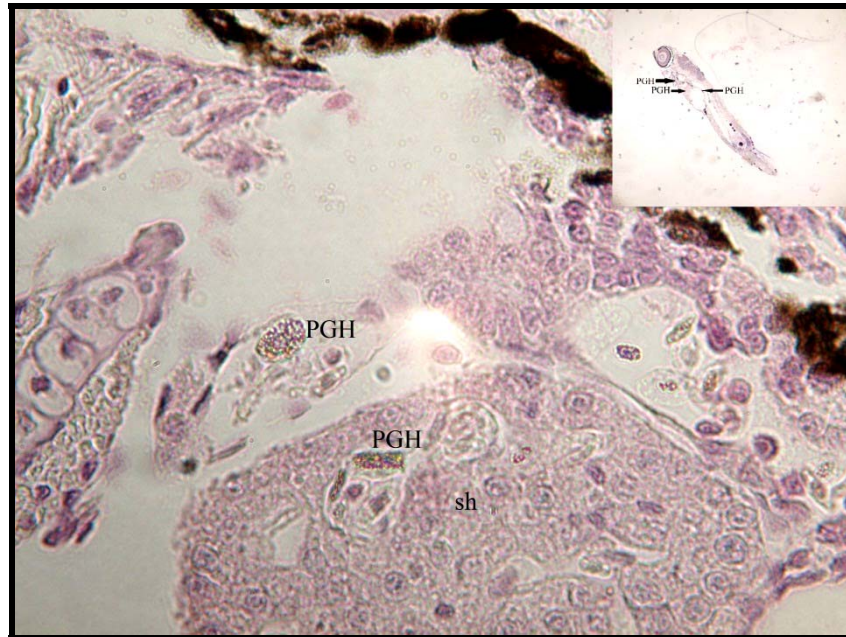
%1 oranında DMSO uygulaması yapılan 7 günlük zebra balığı prelarvalarından alınan kesitlerde vücut boşluğunun anterior kısmı ile vücut boşluğunun dorsal kısmında somitlere sınır olan bölgede gözlemlendi. Yapılan Best Carmin boyaması sonucunda primordiyal germ hücrelerinin içerdikleri glikojen taneleri sayesinde diğer hücrelerden farklı boyandıkları gözlemlendi. Primordiyal germ hücreleri hem büyük hücre hacimleriyle hem de Best Carmin boyasıyla olumlu bir şekilde boyanmalarıyla somatik hücrelerden belirgin bir şekilde ayırt edildi (Şekil 4.38). Bunun haricinde 7 günlük zebra balığı prelarvalarında ektopik bölgelerde de primordiyal germ hücreleri gözlemlendi. Göç yolu dışındaki primordiyal germ hücrelerinden bazıları solungaç taslaklarının bulunduğu bölgede tespit edilirken (Şekil 4.39), diğerleri ise göz çevresinde izlenmiştir (Şekil 4.40) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çözücü kontrol grubunda gelişimin 7. gününde primordiyal germ hücre sayısında artış olduğu görüldü.

%1 DMSO uygulaması yapılmış 9 günlük zebra balığı larvalarında primordiyal germ hücreleri somitler ile vücut boşluğunun sınır oluşturduğu bölgede (Şekil 4.41 ve Şekil 4.42) ve barsak taslaklarının bulunduğu bölgede tespit edildi (Şekil 4.43). Primordiyal germ hücrelerinin Best Carmin boyamasına olumlu bir tepki vererek somatik

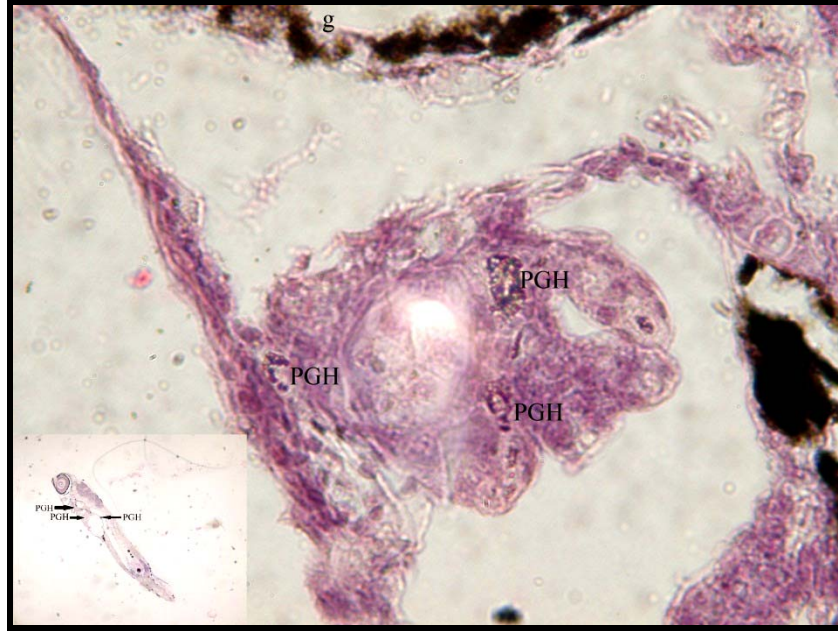
hücrelerden farklı olarak boyandıkları gözlemlendi. Yapılan Best Carmin boyaması sonucunda primordiyal germ hücreleri iri hücre boyutları ve içerdikleri glikojen taneleri sayesinde kolaylıkla ışık mikroskobu ile gözlenebiliyordu (Şekil 4.43).



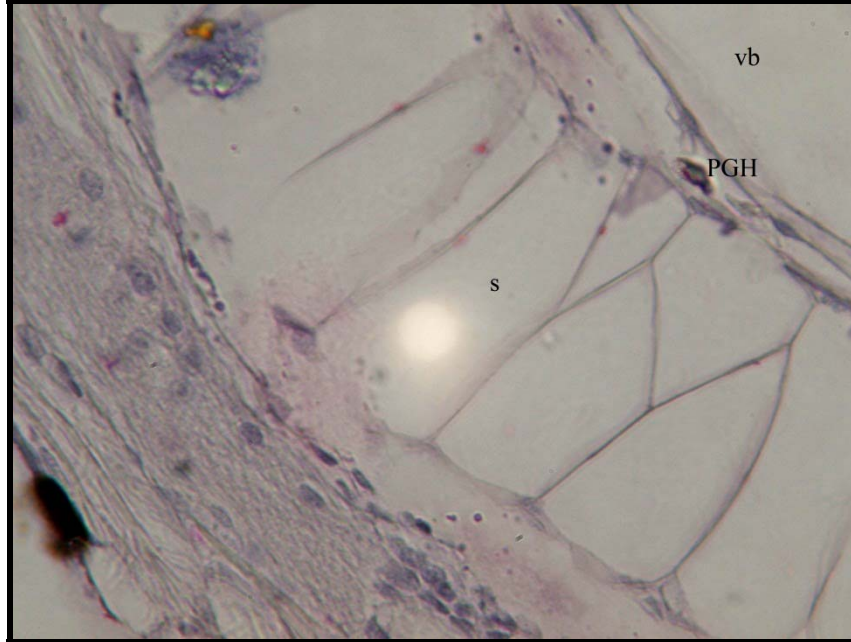
Şekil 4.38. %1 DMSO uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvasında göç yolu üzerindeki primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi. Best Carmin boyama yöntemi, (x100).



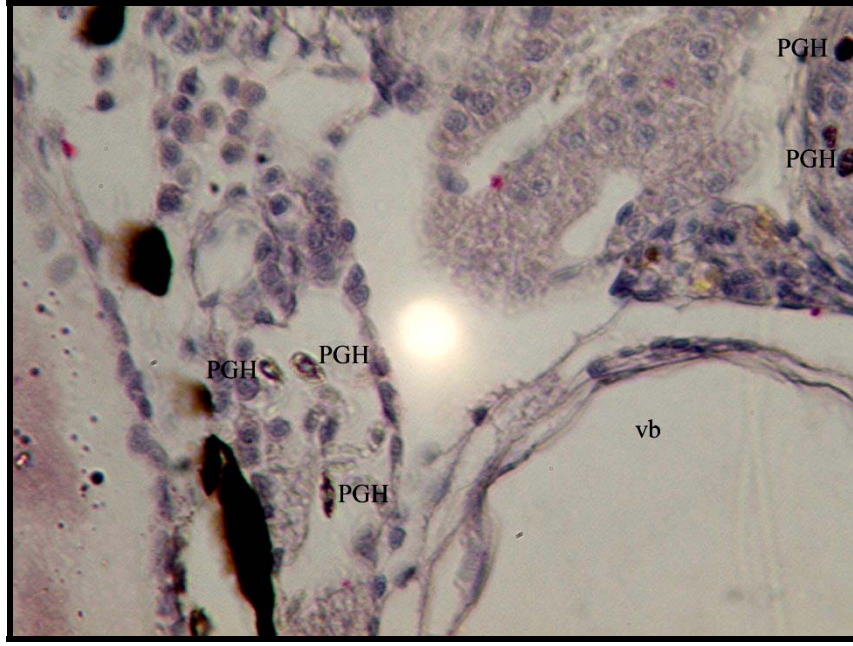
Şekil 4.39. %1 DMSO uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında solungaç taslaklarının bulunduğu bölgede tespit edilen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, sh: somatik hücre. Best Carmin boyama yöntemi, (x100).



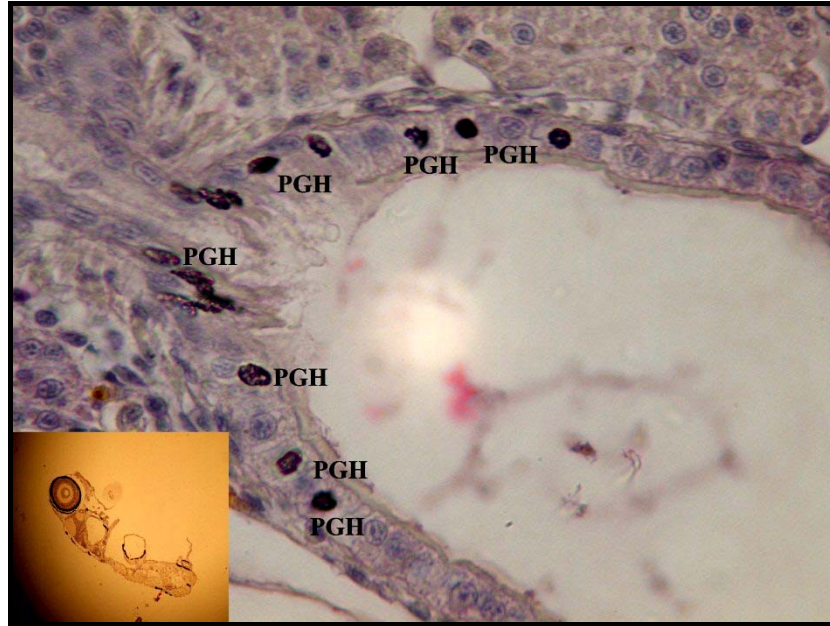
Şekil 4.40. %1 DMSO uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında göz çevresinde görülen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz. Best Carmin boyama yöntemi, (x100)



Şekil 4.41. %1 DMSO uygulaması yapılmış 9 günlük zebra balığı larvasında somitler ile vücut boşluğu arasında gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, s: somitler, vb: vücut boşluğu. Best Carmin boyaması, (x100)



Şekil 4.42. %1 DMSO uygulaması yapılmış 9 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu kenarında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu. Best Carmin boyama yöntemi, (x100).

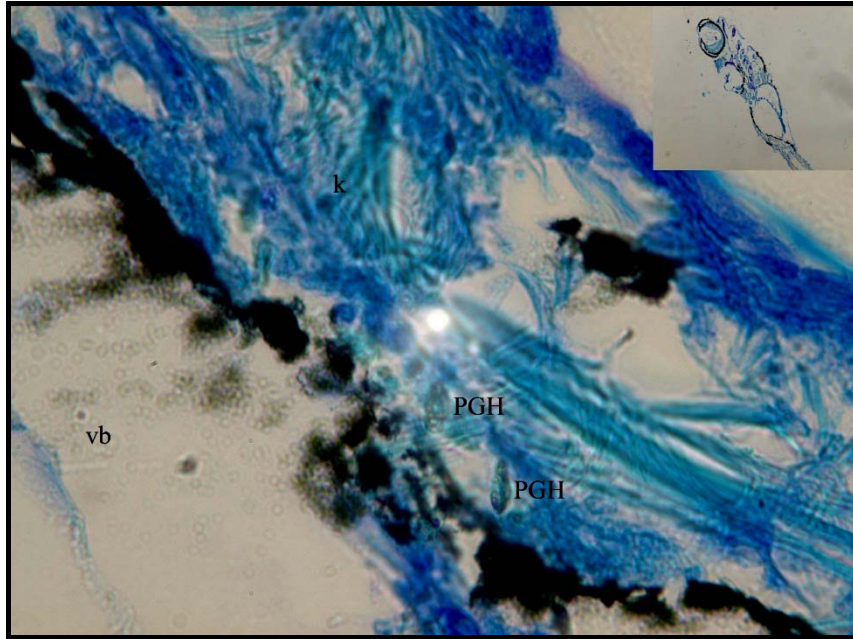


Şekil 4.43. %1 DMSO uygulaması yapılmış 9 günlük zebra balığı larvasında barsak taslaklarında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi. Best Carmin boyama yöntemi, (x100)

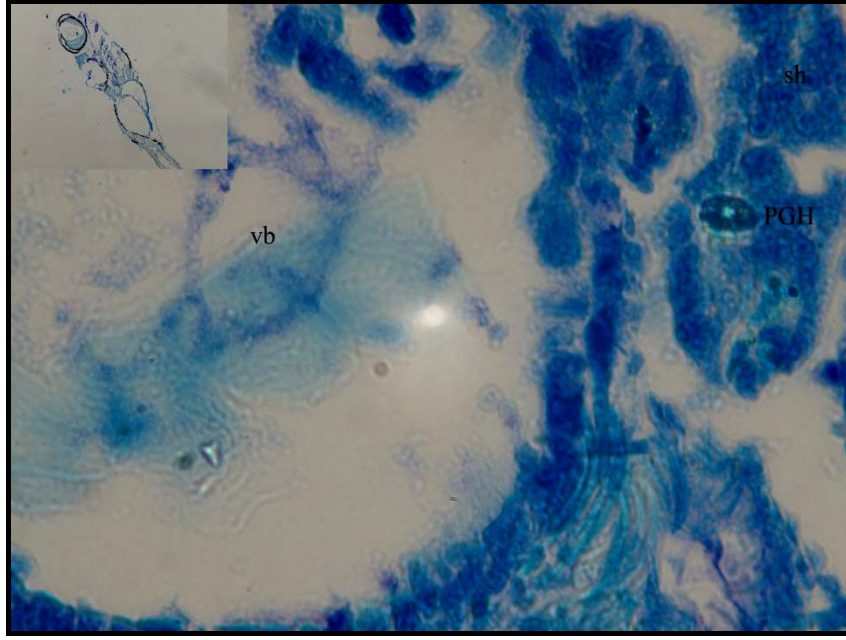
%1 oranında DMSO uygulaması yapılmış 10 günlük zebra balığı larvalarında primordiyal germ hücreleri vücut boşluğunun sınırında gözlemlendi (Şekil 4.44 ve Şekil

4.45). Primordiyal germ hücrelerinin Toluidine Blue boyasına olumlu bir cevap verip diğer hücrelerden farklı bir şekilde boyandığı tespit edildi (Şekil 4.45). Gelişimin 10. gününde kontrol grubundan farklı olarak ektopik bölgelerde de primordiyal germ hücreleri izlendi. Solungaç taslaklarının bulunduğu bölgede (Şekil 4.46) ve göz çevresinde (Şekil 4.47) primordiyal germ hücrelerinin varlığı tespit edildi.

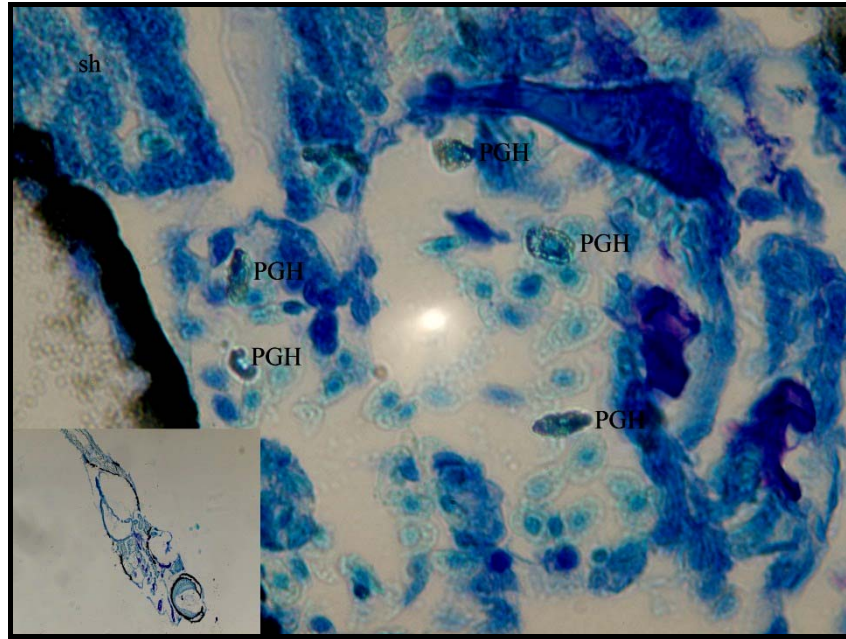
%1 DMSO uygulaması yapılmış 11 günlük zebra balığı larvalarında gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri yapılan Best Carmin boyaması sonucunda ışık mikroskobu ile tespit edildi (Şekil 4.48). Bunun haricinde ektopik bölgelerde de primordiyal germ hücre varlığına rastlandı. 7. ve 10. güne benzer şekilde solungaç taslaklarında (Şekil 4.49) ve göz çevresinde (Şekil 4.50) göç yolundan sapmış olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. %1 oranında DMSO uygulamasının göç yolunda değişikliklere sebep olduğu görülmüştür.



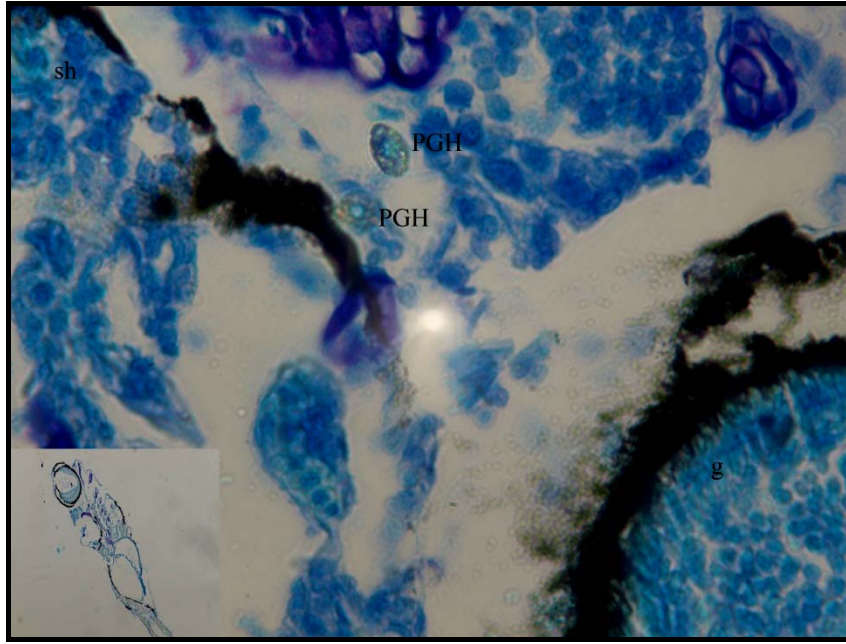
Şekil 4.44. %1 DMSO uygulaması yapılmış 10 günlük zebra balığı larvasında primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu, k: kas tabakası. Toluidine Blue boyama yöntemi, (x100).



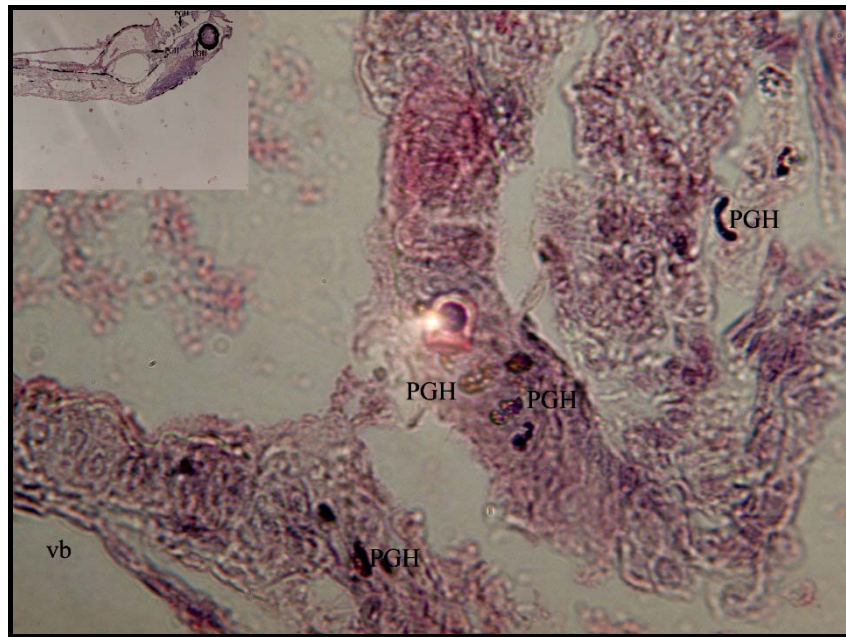
Şekil 4.45. %1 DMSO uygulaması yapılmış 10 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu çevresinde bulunan primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu, sh: somatik hücre. Toluidine Blue boyama yöntemi, (x100).



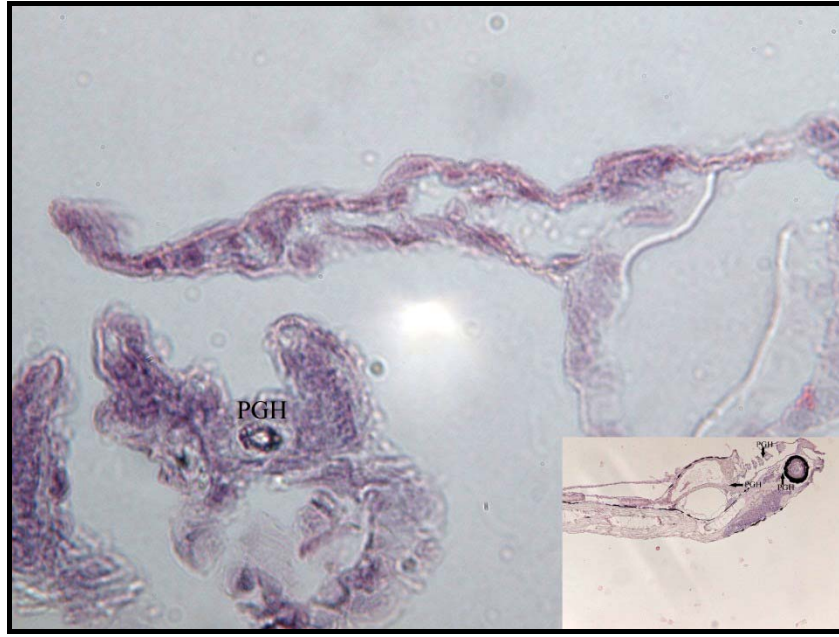
Şekil 4.46. %1 DMSO uygulaması yapılmış 10 günlük zebra balığı larvasında solungaç taslaklarının bulunduğu bölgede görülen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, sh: somatik hücre. Toluidine Blue boyama yöntemi, (x100).



Şekil 4.47. %1 DMSO uygulaması yapılmış 10 günlük zebra balığı larvasında göz çevresindeki primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, sh: somatik hücre, g: göz. Toluidine Blue boyama yöntemi, (x100).



Şekil 4.48. %1 DMSO uygulaması yapılmış 11 günlük zebra balığı larvada gonad taslaklarına göç eden primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu. Best Carmin boyama yöntemi, (x100)



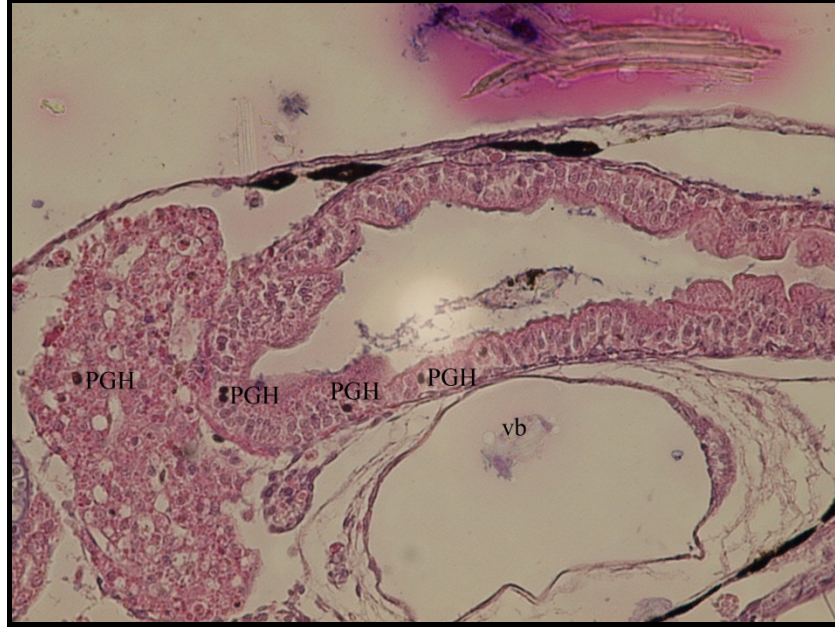
Şekil 4.49. %1 DMSO uygulaması yapılmış 11 günlük zebra balığı larvalarında solungaç taslaklarındaki primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi. Best Carmin boyama yöntemi, (x100)



Şekil 4.50. %1 DMSO uygulaması yapılmış 11 günlük zebra balığı larvalarında göz çevresinde bulunan primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz. Best Carmin boyama yöntemi, (x100).

%1 DMSO uygulaması yapılmış 14 günlük zebra balığı larvalarında primordiyal germ hücreleri gonad taslaklarının yakınlarında gözlemlendi. Primordiyal germ

hücrelerinin yapılan H&E boyası ile olumlu bir tepki vererek boyandığı görüldü. Primordiyal germ hücreleri, granüllü yapıları sayesinde somatik hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebiliyordu (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. %1 DMSO uygulaması yapılmış 14 günlük zebra balığı larvalarında bulunan primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu. H&E boyama yöntemi, (x40).

4.4.3. 4 mg/L BPA grubunun histolojik bulguları

Embriyonik ve larval dönemde BPA uygulamasına maruz kalan zebra balığı embriyolarının bir kısmının gelişimlerini tamamlayamadıkları görüldü. 4 mg/L BPA uygulanan gruptaki embriyo ve larvaların en çok 13. güne kadar yaşamını sürdürdükleri dolayısıyla BPA uygulamasının larva gelişimini etkilediği izlendi. Bu gruptaki embriyo ve larvalarda ağır kalp çevresinde ve vitellus kesesinde ödem oluşumları, pigmentasyon oluşumunda ve koryondan çıkma süresinde gecikmeler ve kuyruk yapısında bozukluklar tanımlandı. Gelişimin 2. gününden itibaren yüksek oranda ölüm görüldü. Embriyolardan yaklaşık %25'i yaşamaya devam etti.

Gelişimin 2. gününde, somatik hücrelerden belirgin özellikleri ile ayırt edilebilen primordiyal germ hücreleri göç yolu üzerinde, vitellüs kesesinin dorsalinde Best Carmin ve H&E boyamaları sonucunda gözlemlendi (Şekil 4.52 - Şekil 4.53 ve Şekil 4.54). PGH morfolojisinde bir anomali gözlenmedi. Primordiyal germ hücre sayısında herhangi bir azalma gözlenmedi. Primordiyal germ hücreleri somatik

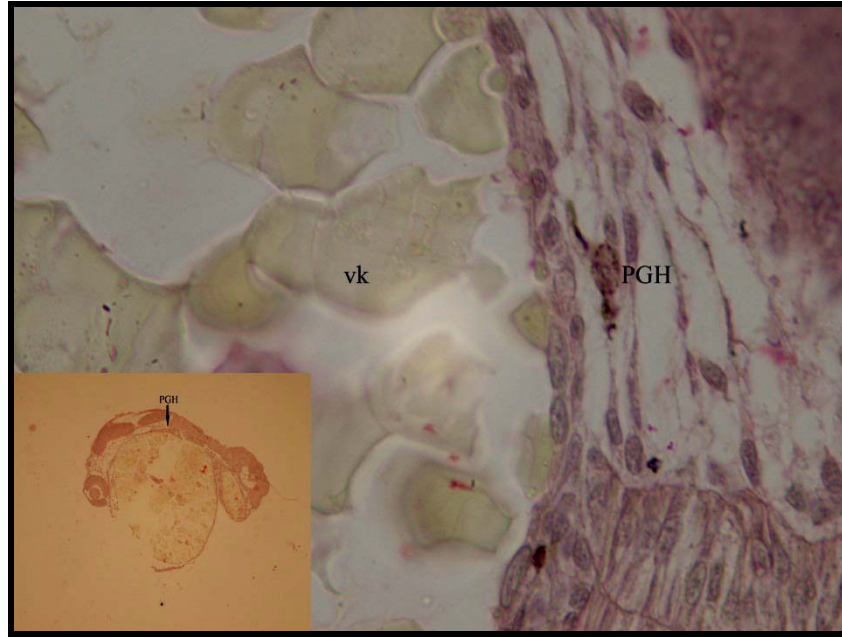
hücrelerden yapısal özellikleri nedeniyle ayırt edilebiliyordu (Şekil 4.53). Primordiyal germ hücrelerinde nuage materyalleri belirgin bir şekilde gözlenebiliyordu (Şekil 4.54).



Şekil 4.52. 4 mg/L BPA uygulanmış 2 günlük zebra balığı embriyosunun 5 μm 'lik kesiti, vitellüs keseinin dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücreleri, vk: vitellüs kesesi. H&E boyama. Işık mikroskobu (x100)



Şekil 4.53. 4 mg/L BPA uygulanmış 2 günlük zebra balığı embriyosunun 5 µm'lik kesiti, vitellüs keseinin dorsalinde gözlenen ve belirgin nuage materyaline sahip olan primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellüs kesesi. H&E boyama. Işık mikroskobu (x100)

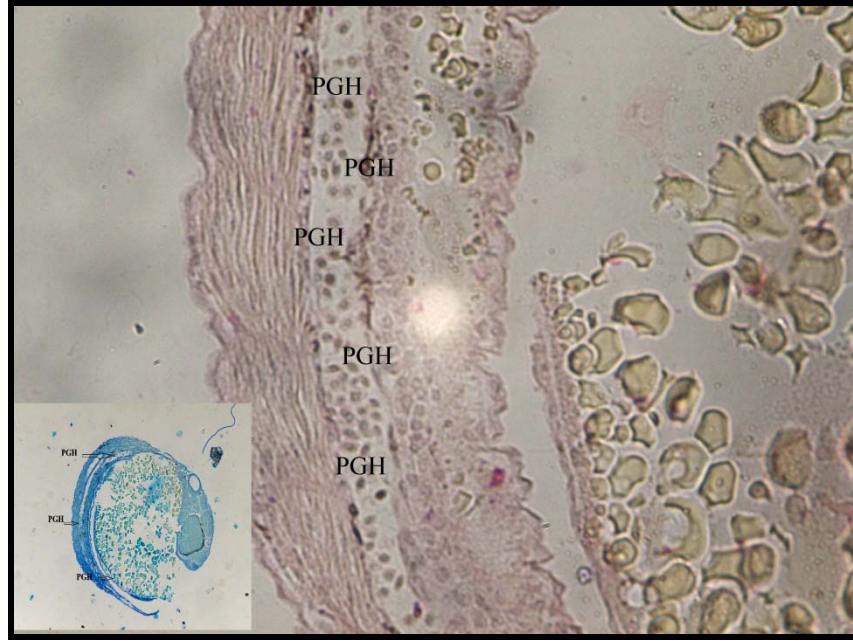


Şekil 4.54. 4 mg/L BPA uygulanmış 2 günlük zebra balığı embriyosunun 5 µm'lik kesiti, vitellüs keseinin dorsalinde gözlenen ve belirgin nuage materyaline sahip olan primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellüs kesesi. Best Carmin boyama. Işık mikroskobu (x100)

Gelişimin 3. gününde, primordiyal germ hücreleri, vitellüs kesesi ile somitler arasında gözlemlendi. Primordiyal germ hücre histolojisinde bir değişim görülmedi, herhangi bir dejenerasyon yoktu. Primordiyal germ hücrelerindeki bulutsu yapı belirgindi (Şekil 4.55). Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 3 günlük zebra balığı embriyolarında, whole mount in situ hibridizasyon deneyleri ile uyumlu olarak primordiyal germ hücre sayısında bir artış ve göç eden hücrelerde kümeleşmeler tespit edildi.

4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı prelarvalarında primordiyal germ hücrelerinin vitellüs kesesi sınırında gözlemlendi (Şekil 4.56) ve vitellüs kesesine paralel olarak göç ettikleri tespit edildi (Şekil 4.57). Primordiyal germ hücrelerinde nuage materyali daha net bir şekilde gözlemlendi. Göç yolu üzerinde gelişimin 4. gününde kümeleşmiş bir şekilde gözlenen hücrelerde 5. gün itibariyle bu hücrelerin farklı bölgelere göç ettikleri görüldü. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 4 mg/L

BPA uygulaması yapılmış zebra balığı prelarvalarında primordiyal germ hücrelerinde whole mount in situ hibridizasyon deneyleriyle uyumlu olarak artış tespit edildi. Somitler ile vitellüs kesesi arasında bulunan ve gonad taslaklarına doğru göç eden primordiyal germ hücreleri nuage materyali, çekirdek büyüklüğü ve hücre büyüklüğü ile somatik hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebiliyorlardı (Şekil 4.58).



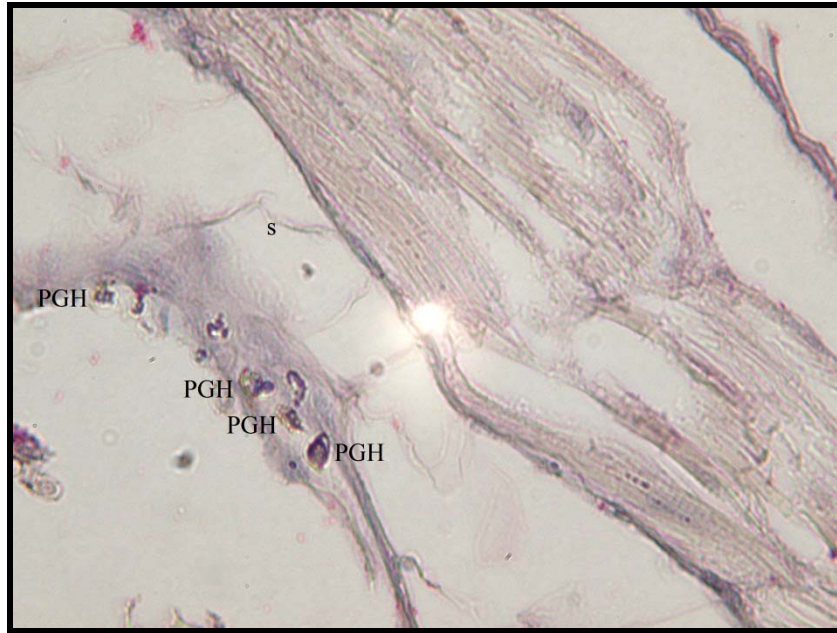
Şekil 4.55. 4 mg/L BPA uygulanmış 3 günlük zebra balığı embriyosunun 5 µm'lik kesiti. PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellüs kesesi. Best Carmin boyama. Işık mikroskobu (x40).



Şekil 4.56. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellüs kesesi sınırında gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücreleri, vk: vitellüs kesesi. Best Carmin boyama. Işık mikroskobu (x100)



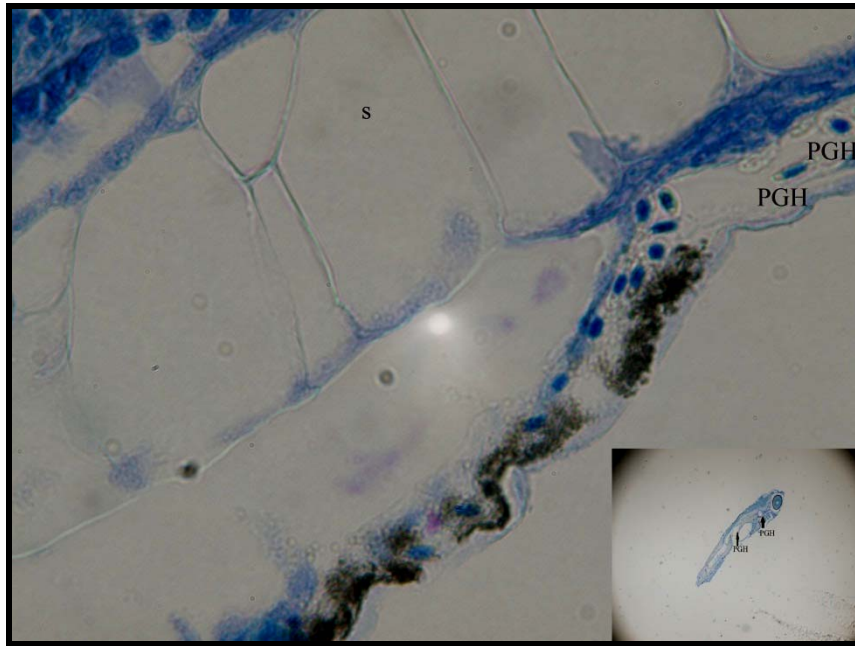
Şekil 4.57. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellüs kesesi sınırında gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücreleri, vk: vitellüs kesesi. Best Carmin boyama. Işık mikroskobu (x100)



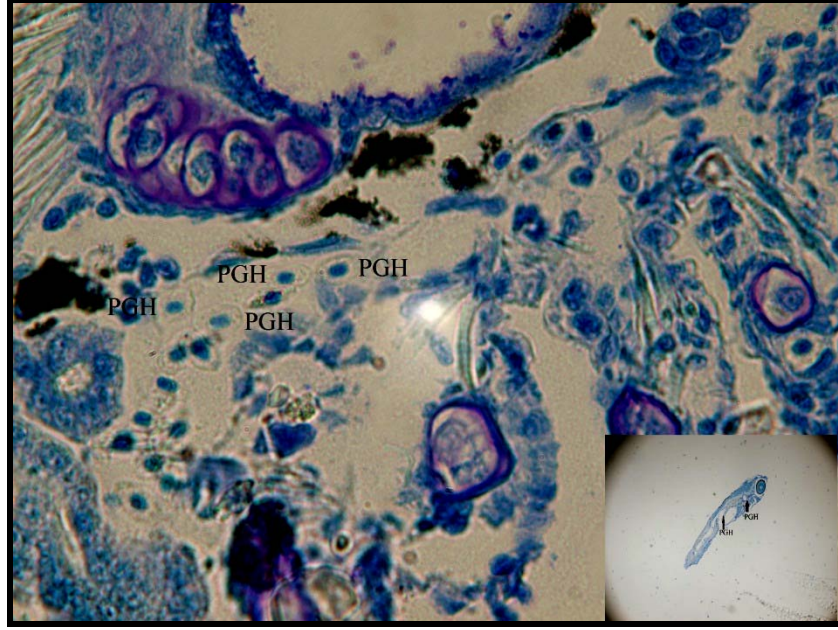
Şekil 4.58. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellüs kesesi ve somitler arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücreleri, s: somitler. Best Carmin boyama. Işık mikroskobu (x100)

4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı larvalarında yapılmış olan histoloji çalışmalarının bulgularının whole mount in situ hibridizasyon bulguları ile uyumlu olduğu bulundu. Primordiyal germ hücreleri yapılan Toluidine Blue boyası ile somitlerin sınırında izlendi (Şekil 4.59). Ektopik bölgelerde primordiyal germ hücre sayısında artış tespit edildi (Şekil 4.60). Primordiyal germ hücreleri, somatik hücrelerden belirgin nuage materyali sayesinde ayırt edildi (Şekil 4.61). Primordiyal germ hücre morfolojisinde herhangi bir anormallik gözlenmedi.

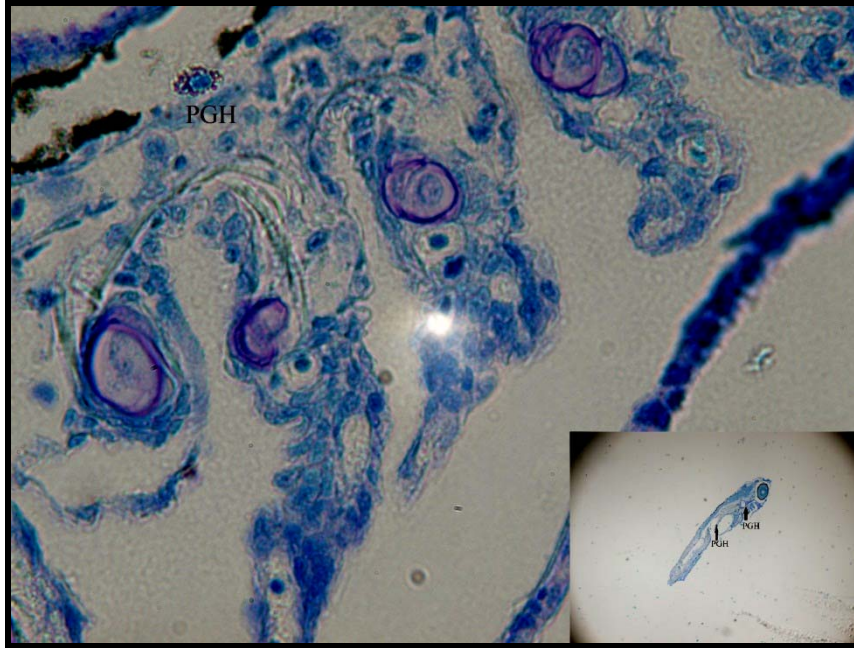
4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı larvalarında primordiyal germ hücreleri vücut boşluğu (Şekil 4.62) ve somitlere yakın olan bölgelerde gözlemlendi (Şekil 4.63). Whole mount in situ hibridizasyon sonuçlarıyla uyumlu olarak ektopik bölgelerde de primordiyal germ hücrelerine rastlandı (Şekil 4.64 ve Şekil 4.65). Best Carmin ve Toluidine Blue boyamaları sonucunda primordiyal germ hücreleri, glikojen taneleri ve nuage materyali sayesinde somatik hücrelerden ayırt edildi (Şekil 4.63 ve Şekil 4.65). 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyolarında 8. günde primordiyal germ hücreleri küme halinde değil, tek tek gözlemlendi. Ayrıca primordiyal germ hücrelerinin 4 mg/L BPA uygulaması sonucunda girintili çıkıntılı bir şekil aldıkları gözlemlendi (Şekil 4.65).



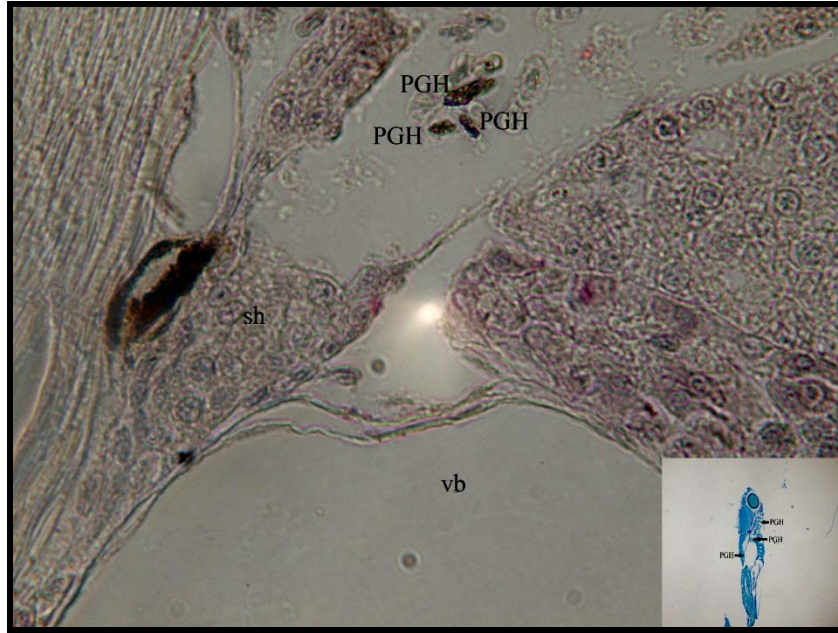
Şekil 4.59. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında somitlerin yakınında gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücreleri, s: somitler. Toluidine Blue boyaması. Işık mikroskobu (x100)



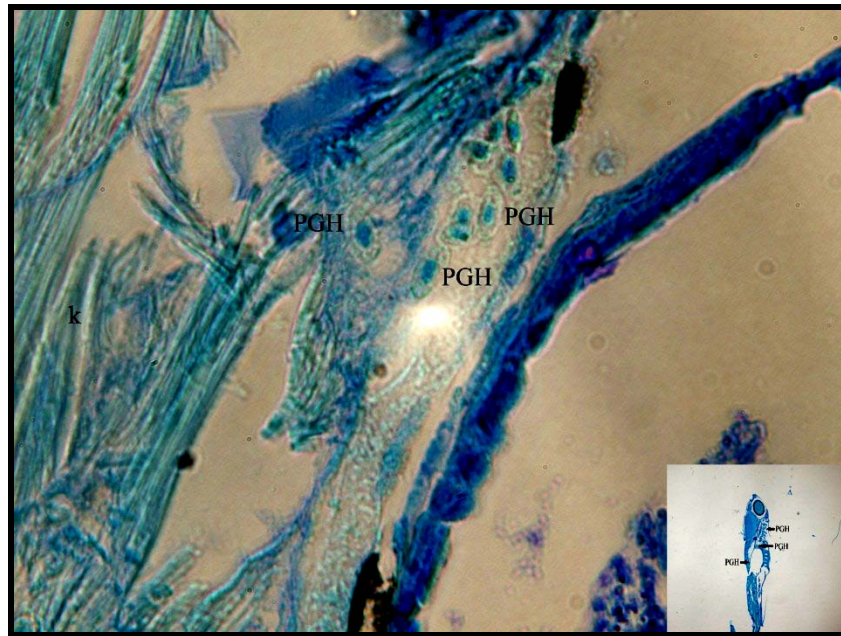
Şekil 4.60. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında ektopik bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücreleri. Toluidine Blue boyaması. Işık mikroskobu (x100)



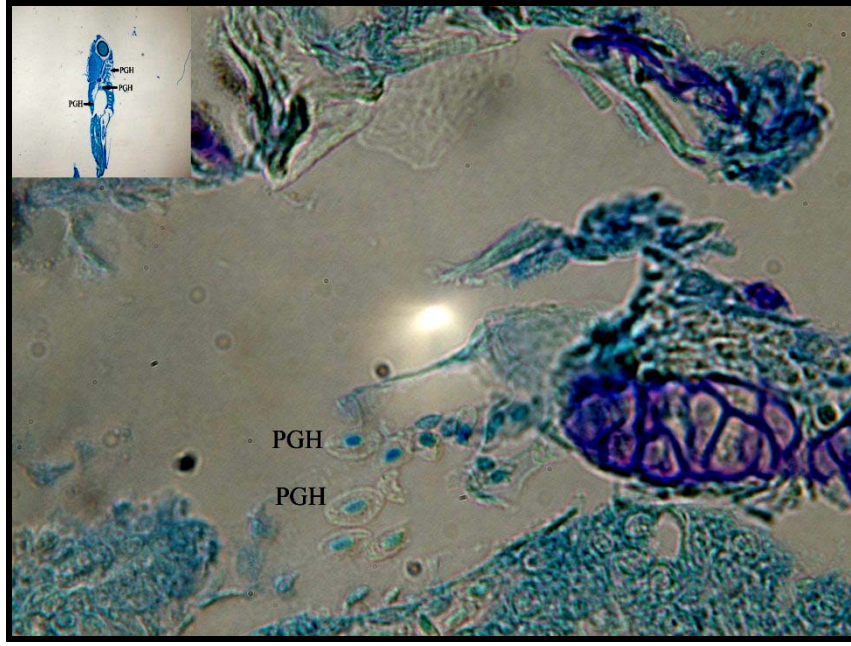
Şekil 4.61. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvaarında solungaç taslaklarında gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücreleri. Toluidine Blue boyaması. Işık mikroskobu (x100)



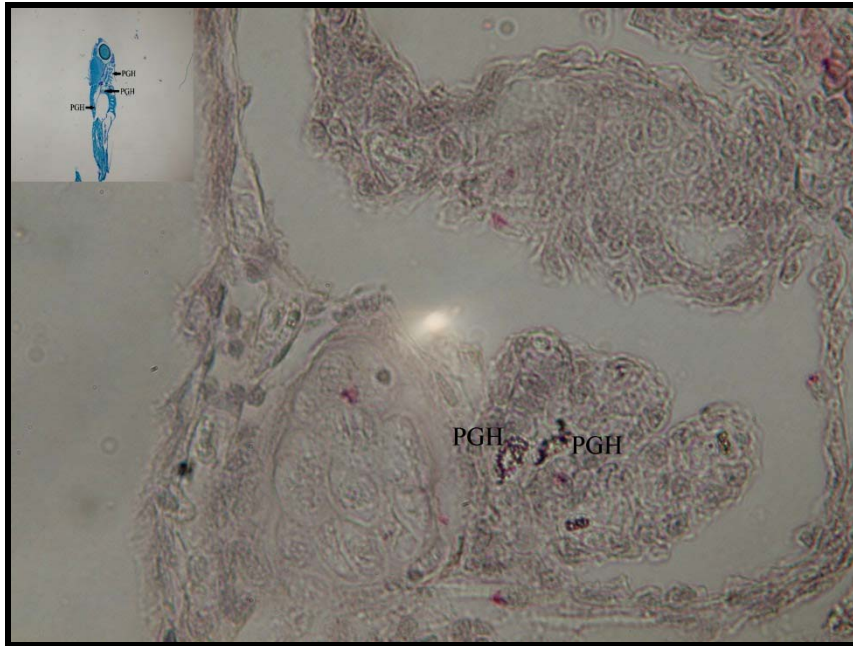
Şekil 4.62. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı larvasında göç yolu üzerinde görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu, sh: somatik hücre Best Carmin boyama yöntemi. (x100)



Şekil 4.63. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı larvasında görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kas tabakası. Toluidine Blue boyama yöntemi. (x100)

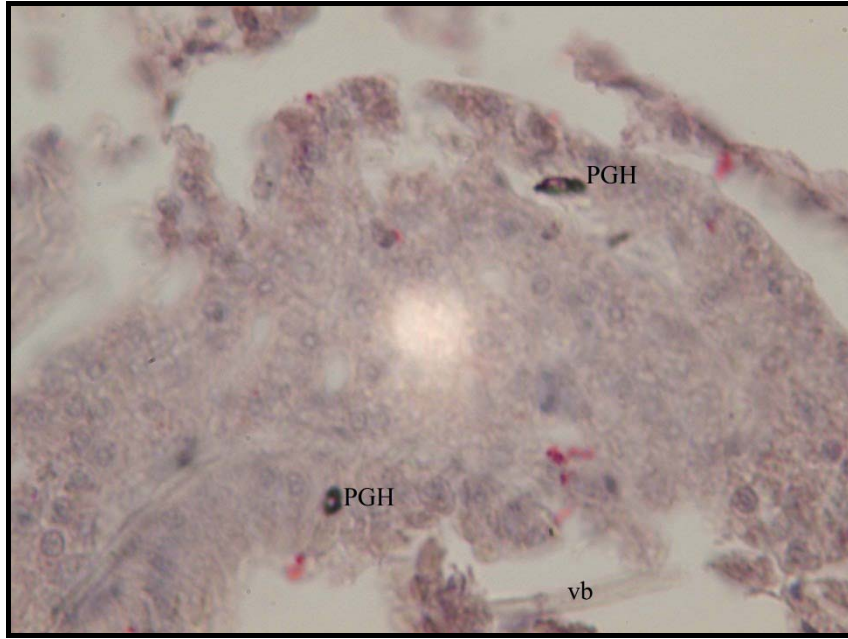


Şekil 4.64. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı larvasında ektopik bölgelerde görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi. Toluidine Blue boyama yöntemi. (x100)



Şekil 4.65. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı larvasında ektopik bölgelerde görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi. Best Carmin boyama yöntemi. (x100)

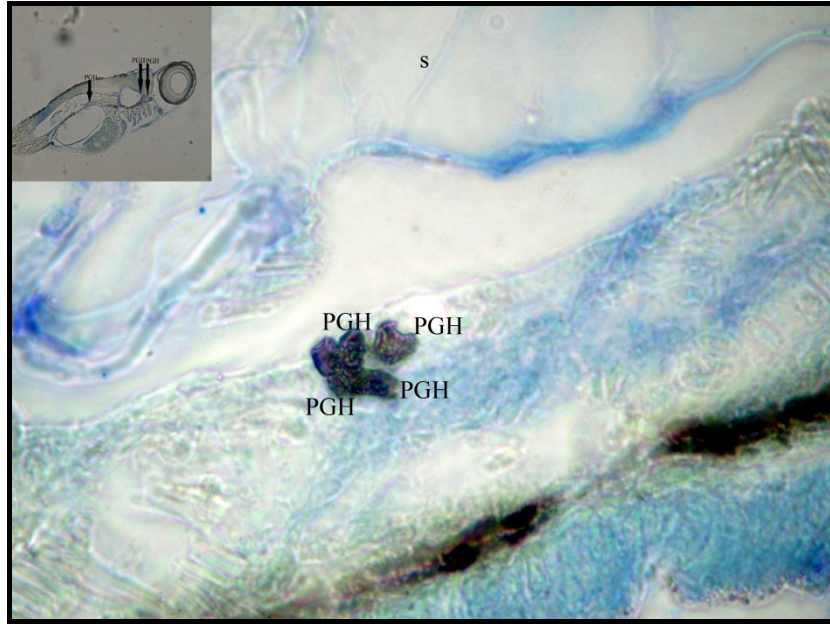
4 mg/L BPA uygulanan 11 günlük zebra balığı larvalarında primordiyal germ hücreleri vücut boşluğu yakınlarında izlendi (Şekil 4.66).



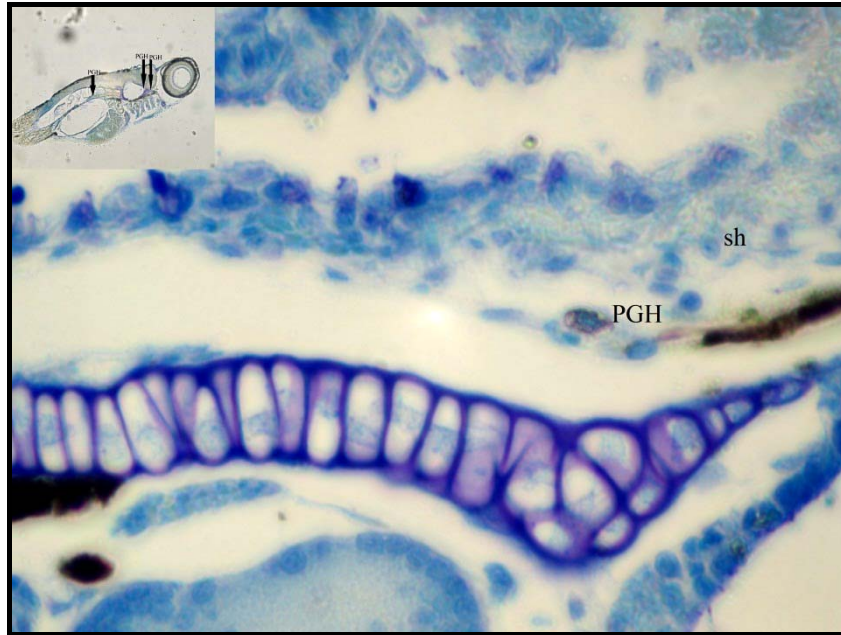
Şekil 4.66. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 11 günlük zebra balığı larvasında vücut boşluğu yakınlarında görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, vb: vücut boşluğu. Best Carmin boyama yöntemi. (x100)

4 mg/L BPA uygulanan 12 günlük zebra balığı larvalarında primordiyal germ hücreleri somitlere sınır olan bölgede gözlemlendi. Göç eden primordiyal germ hücrelerinin yalancı ayakları bu kesitlerde tanımlandı (Şekil 4.67). Buna ek olarak solungaç taslaklarının bulunduğu bölgede de primordiyal germ hücrelerinin varlığı saptandı (Şekil 4.68). Somitlere sınır olan primordiyal germ hücrelerinde kümeleşme görülürken ektopik bölgelerde tespit edilen primordiyal germ hücreleri tek tek bulunuyordu.

4mg/L BPA uygulanan 13 günlük zebra balığı larvalarında primordiyal germ hücreleri somitler ile vücut boşluğu arasında kalan bölgede gözlemlendi (Şekil 4.69). Primordiyal germ hücrelerindeki nuage materyalleri yapılan Toluidine Blue boyaması sonucunda kolaylıkla tespit edildi. Göç yolu üzerindeki bazı primordiyal germ hücre boyutlarında küçülmeler olduğu gözlemlendi (Şekil 4.70)



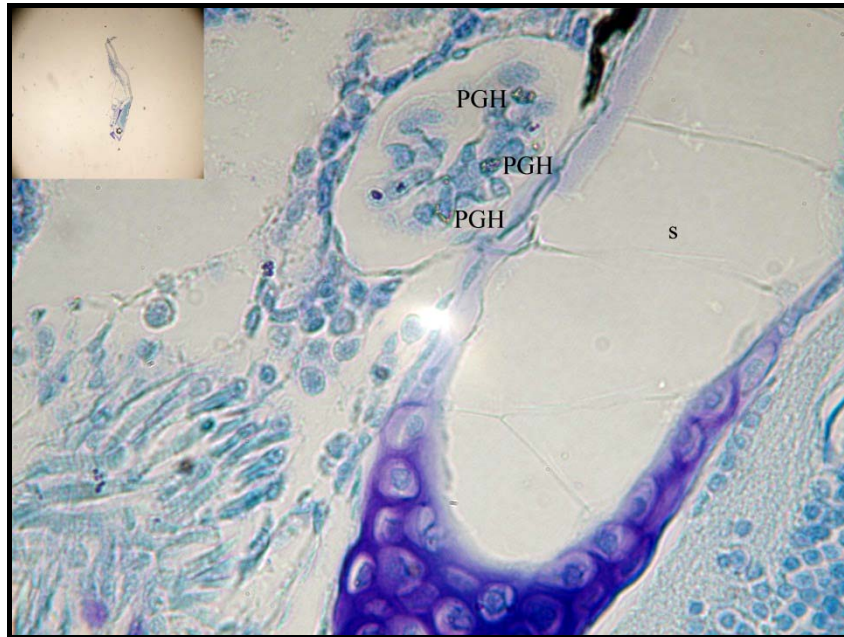
Şekil 4.67. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 12 günlük zebra balığı larvasında somitlere sınır olan bölgede bulunan yalancı ayaklara sahip olan primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: somitler. Toluidine Blue boyama yöntemi. (x100)



Şekil 4.68. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 12 günlük zebra balığı larvasında ektopik bölgedeki primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, sh: somatik hücre Toluidine Blue boyama yöntemi. (x100)



Şekil 4.69. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 13 günlük zebra balığı larvasında somitler ile vücut boşluğu arasında bulunan bölgedeki primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: somitler. Toluidine Blue boyama yöntemi. (x100)



Şekil 4.70. 4 mg/L BPA uygulaması yapılmış 13 günlük zebra balığı larvasında somitlere sınır olan bölgede bulunan primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: somitler. Toluidine Blue boyama yöntemi. (x100)

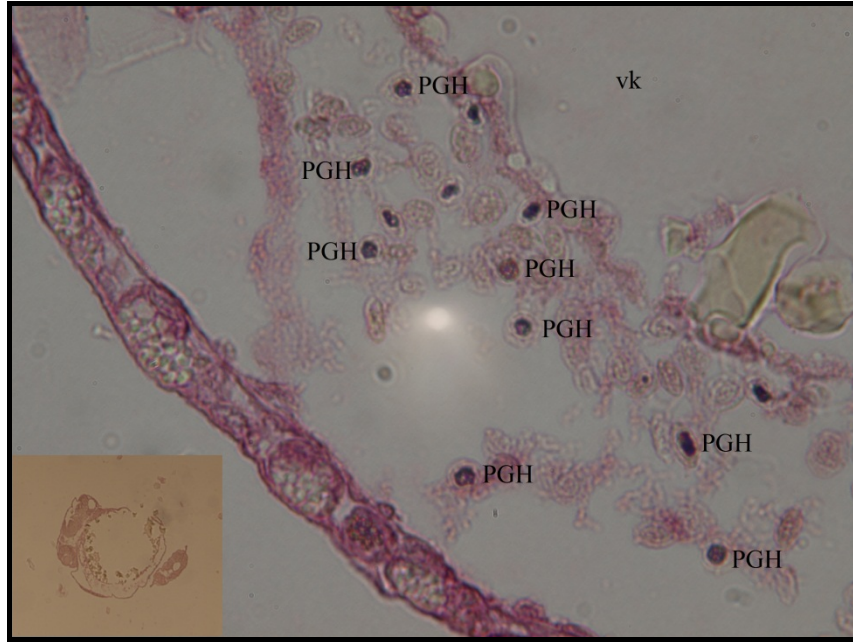
4.4.4. 8 mg/L BPA Grubunun Histolojik Bulguları

Embriyonik ve larval dönemde 8 mg/L BPA uygulamasına maruz kalan zebra balığı embriyolarının büyük bir çoğunluğunun gelişimlerini tamamlayamadıkları ve yaklaşık %85'inin larval dönemde öldüğü görüldü. 8 mg/L BPA uygulanan gruptaki embriyo ve larvaların en çok 8. güne kadar yaşamını sürdürdükleri gözlemlendi. Bu grupta gelişim sürecinde görülen bozukluklar 4 mg/L BPA grubundan daha fazlaydı. Baş ve kuyruktaki yapısal bozukluklar ve kalp çevresindeki ödem oluşumları 4 mg/L'lik gruptan daha fazla görüldü.

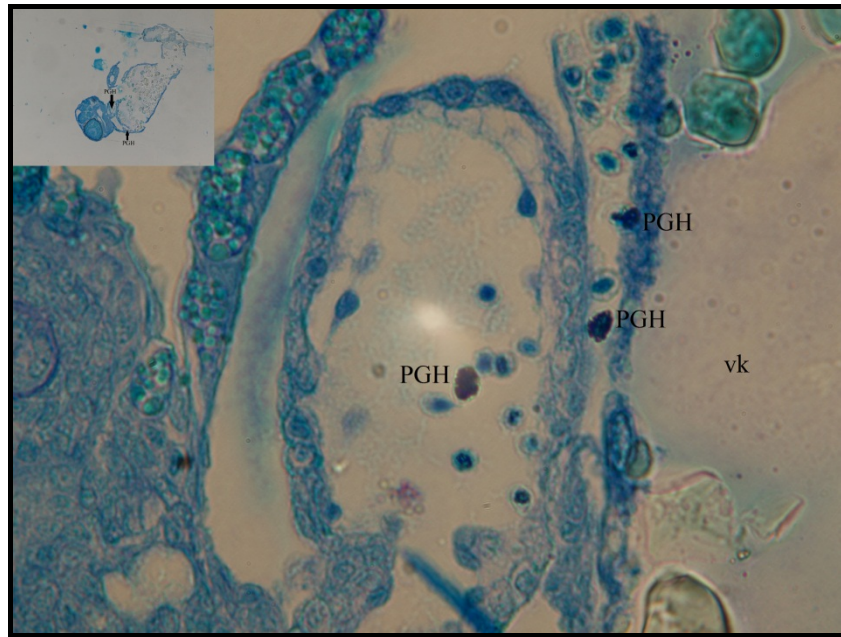
8 mg/L BPA uygulaması yapılmış olan zebra balığı embriyolarında gelişimin 3. gününde primordiyal germ hücreleri vitellus kesesinin dorsalinde tespit edildi. Yapılan Best Carmin boyaması sonucunda hücrelerin içerdiği glikojen taneleri sayesinde diğer hücrelerden farklı bir şekilde boyandıkları gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında primordiyal germ hücrelerinde glikojen tanelerinin azaldığı görüldü (Şekil 4.71).

8 mg/L BPA uygulaması yapılmış olan 4 günlük zebra balığı prelarvalarında primordiyal germ hücrelerinin vitellus kesesi boyunca göç ettikleri görüldü (Şekil 4.72 ve Şekil 4.73). Kontrol grupları ve 4 mg/L BPA grubu ile karşılaştırıldığında 8 mg/L BPA uygulamasına maruz kalmış 4 günlük prelarvalarda primordiyal germ hücre sayısının çok daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu bağlamda histolojik sonuçlar, whole mount in situ hibridizasyon sonuçlarını destekleyici nitelikteydi. Primordiyal germ hücreleri nuage materyalleri sayesinde diğer hücrelerden kolaylıkla ayırt edildi.

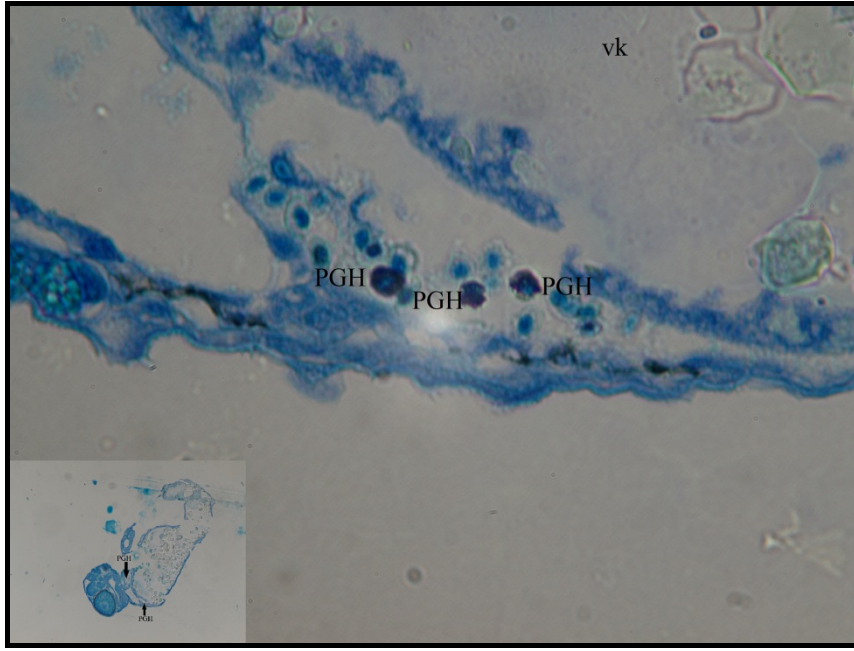
8 mg/L BPA uygulaması yapılmış olan 5 günlük zebra balığı prelarvalarında primordiyal germ hücrelerinin vitellus kesesi sınırında izlendi (Şekil 4.74 ve Şekil 4.75). 8 mg/L BPA uygulaması sonucunda primordiyal germ hücrelerdeki granüllü yapıda belirgin bir azalma olduğu tespit edildi. BPA uygulamasının primordiyal germ hücrelerinde glikojen tanelerinde azalmaya sebep olduğu gözlemlendi (Şekil 4.74 ve Şekil 4.75).



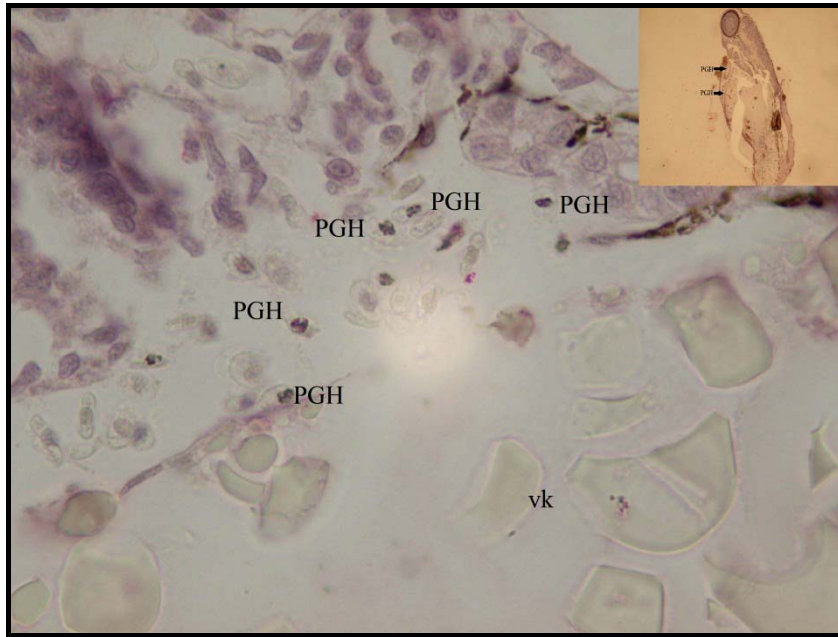
Şekil 4.71. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 3 günlük zebra balığı embriolarında vitellus kesesinin dorsal sınırında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi. Best Carmin boyama yöntemi, x100.



Şekil 4.72. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 4 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesi sınırında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi. Toluidine Blue boyama yöntemi, x100.



Şekil 4.73. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 4 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesinin dorsal sınırında görülen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi. Toluidine Blue boyama yöntemi, x100.



Şekil 4.74. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesi sınırında görülen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi. Best Carmin boyama yöntemi, (x100).



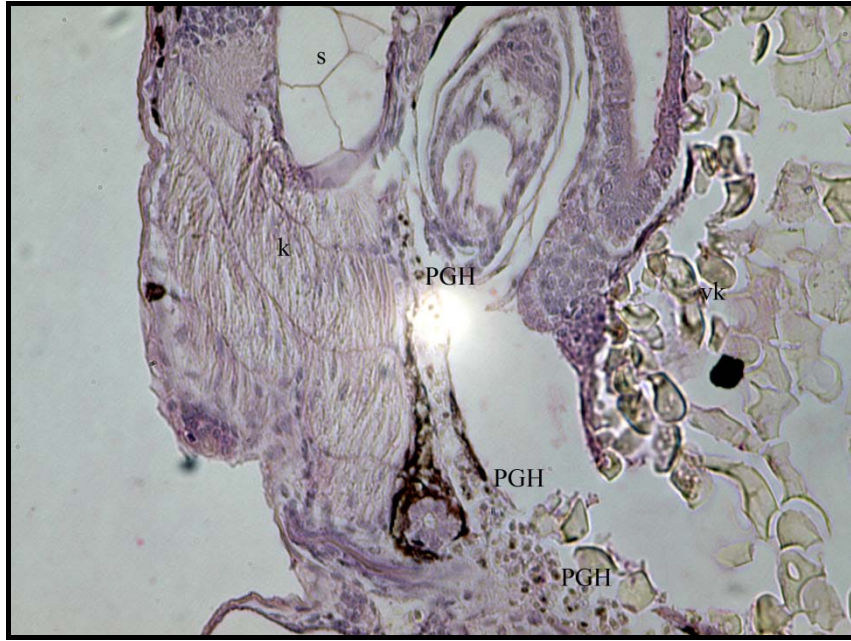
Şekil 4.75. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 5 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesinin dorsal sınırında izlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi. Best Carmin boyama yöntemi, (x100).

8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvalarında primordiyal germ hücreleri vitellus kesesinin dorsal (Şekil 4.76) ve ventral bölgelerinde (Şekil 4.77) tespit edildi. Kontrol grubu ve 4mg/L BPA uygulaması yapılmış olan grup ile karşılaştırıldığında 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvalarındaki primordiyal germ hücrelerinin boyutlarının daha küçük olduğu görüldü. Primordiyal germ hücrelerinin Best Carmin boyası ile diğer hücrelerden farklı olarak boyandıkları görüldü. Hücreler, göç etmekte olan diğer hücreler gibi iğ şeklinde değil, yuvarlak şekildedeydi. Hücreler iğ şeklinde olmadıkları için göç etmedikleri dolayısıyla BPA uygulamasının göç yoluna ket vurduğu gözlemlendi (Şekil 4.77).

8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında primordiyal germ hücreleri somitlerin ventralinde (Şekil 4.78) ve vücut boşluğu yakınlarında gözlemlendi (Şekil 4.79). Ayrıca solungaç taslaklarının bulunduğu bölgede de primordiyal germ hücrelerine rastlandı (Şekil 4.80). Dolayısıyla bu grupta da 4 mg/L BPA grubunda olduğu gibi ektopik bölgelere yönelim olduğu tespit edildi. Primordiyal germ hücrelerinin içerdikleri elektronca yoğun nuage materyalleri

sayesinde, katyonik bir boya olan Toluidine Blue boyası ile pozitif bir şekilde boyandıkları görüldü (Şekil 4.79).

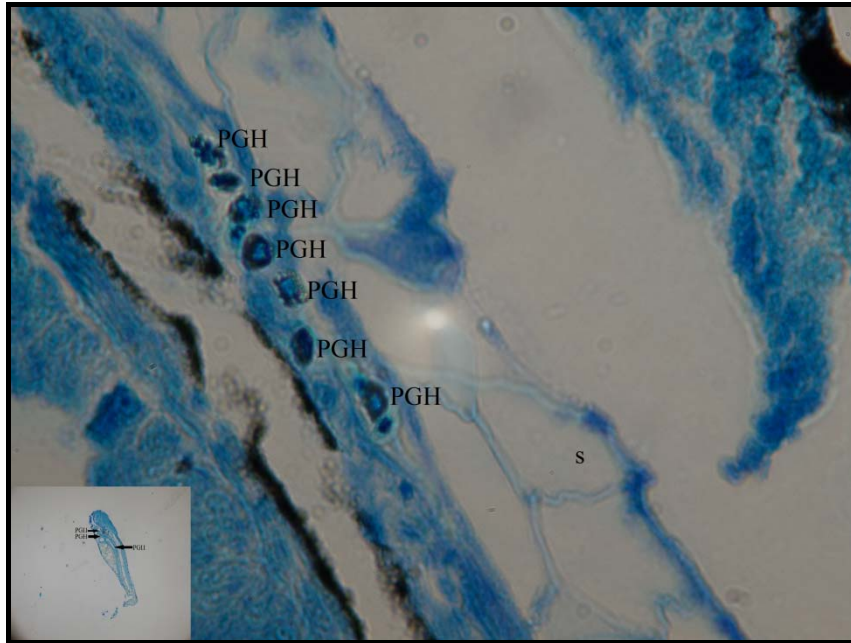
8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı prelarvalarında primordiyal germ hücreleri göç yolu üzerinde, kas tabakasının alt kısmında izlendi (Şekil 4.81). Ayrıca ektopik bölgelere de yönelim gözlemlendi (Şekil 4.82). Solungaç taslaklarının bulunduğu bölgede primordiyal germ hücre varlığına rastlandı (Şekil 4.83). Kontrol grupları ile kıyaslandığında primordiyal germ hücre boyutunda belirgin bir küçülme gözlemlendi. Ayrıca hücrelerin içerdikleri nuage materyallerinde de azalma söz konusuydu. BPA uygulamasının nuage materyalinde azalmaya sebep olabileceği düşünüldü.



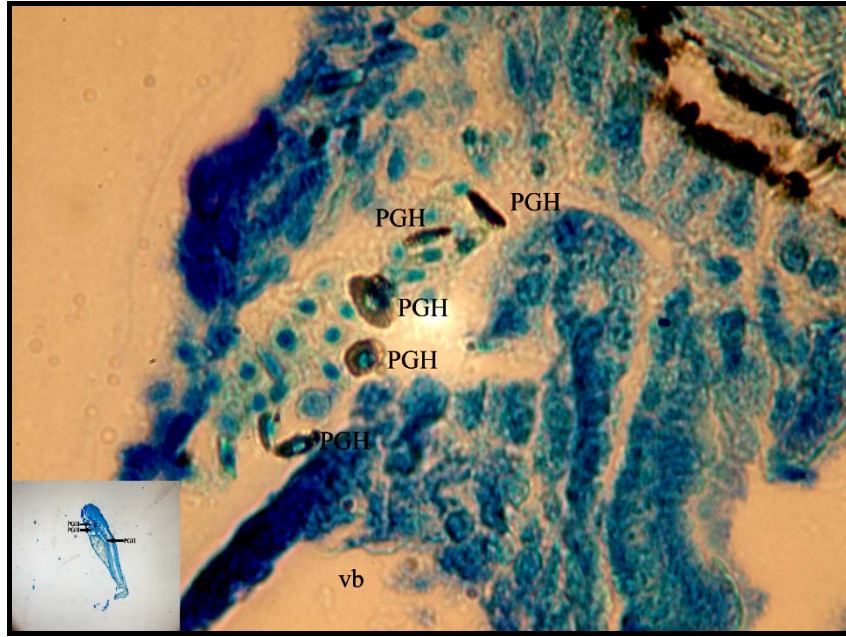
Şekil 4.76. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesinin dorsal sınırında görülen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi, k: kas tabakası, s: somitler. Best Carmin boyama yöntemi, (x100).



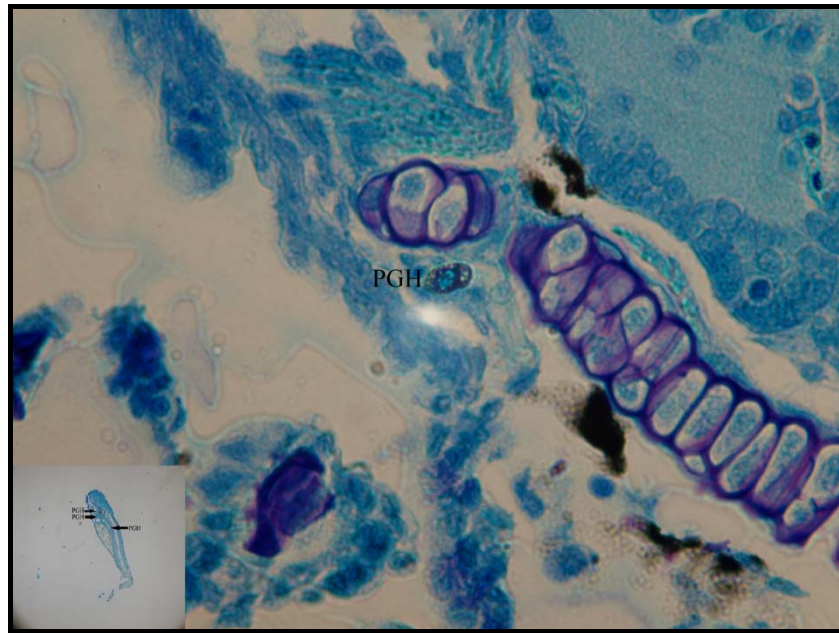
Şekil 4.77. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 6 günlük zebra balığı prelarvalarında vitellus kesesinin ventral sınırında tespit edilen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi. Best Carmin boyama yöntemi, (x100)



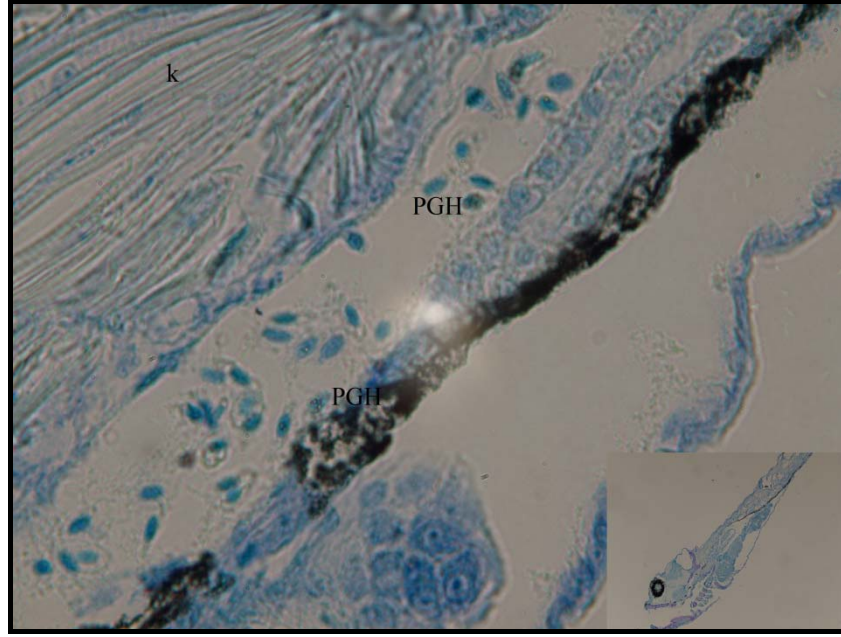
Şekil 4.78. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında somitlerin ventralinde izlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, s: somitler. Toluidine Blue boyama yöntemi, x100



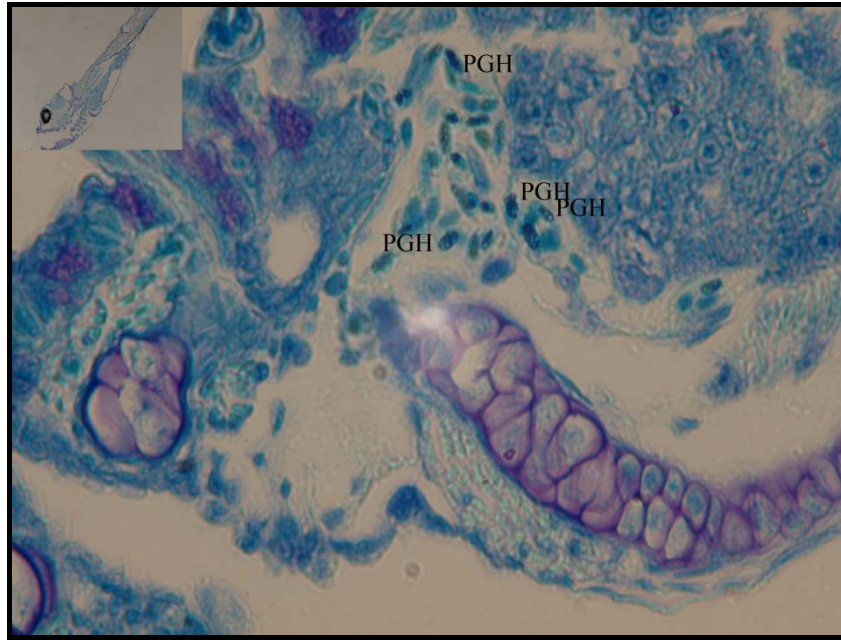
Şekil 4.79. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında vücut boşluğu kenarında izlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi. Toluidine Blue boyama yöntemi, x100



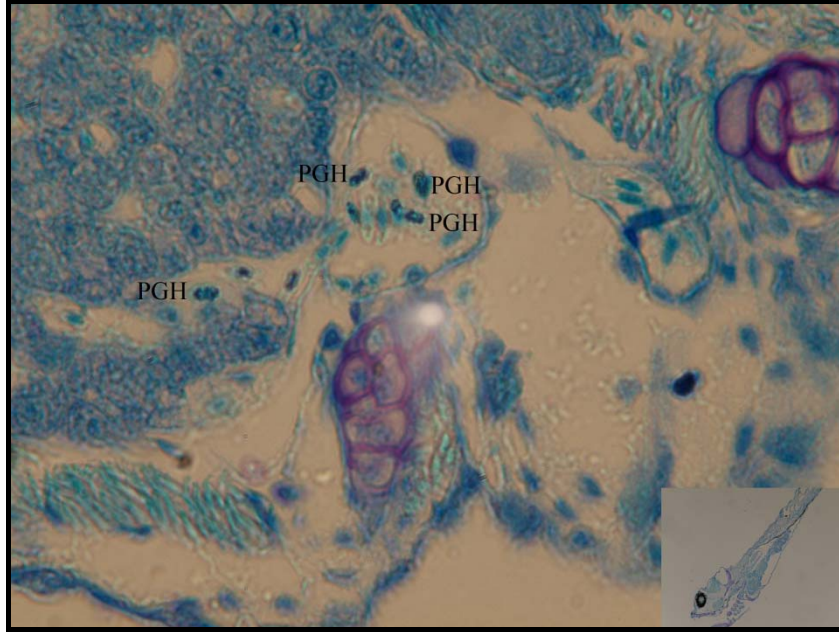
Şekil 4.80. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 7 günlük zebra balığı prelarvalarında ektopik bölgedeki primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi. Toluidine Blue boyama yöntemi, x100



Şekil 4.81. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı prelarvalarında kas tabakasının altında gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, k: kas tabakası. Toluidine Blue boyama yöntemi, x100



Şekil 4.82. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı prelarvalarında ektopik bölgede gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi. Toluidine Blue boyama yöntemi, x100



Şekil 4.83. 8 mg/L BPA uygulaması yapılmış 8 günlük zebra balığı prelarvalarında solungaç taslaklarında gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi. Toluidine Blue boyama yöntemi, x100

BÖLÜM 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada çevresel östrojenlerden Bisfenol A'nın zebra balığı embriyo ve larvalarındaki primordiyal germ hücreleri üzerine etkileri histolojik ve moleküler yöntemlerle incelenmiştir. Laboratuvar koşullarında anaç dişi balıklardan elde edilen embriyolara düşük dozlarda (4 mg/L ve 8 mg/L) BPA uygulanmıştır. BPA uygulaması zigotlara ilk 0-2 saatlik zaman diliminde uygulanmıştır. Araştırmanın ilk aşamasında moleküler çalışmalar yapılmıştır. Zebra balığı embriyolarında akrinin turuncusu boyaması yapılarak BPA'nın hücre ölümüne neden olup olmadığı incelenmiştir. Yine BPA uygulaması sonucunda 24 saatlik embriyolarda primordiyal germ hücrelerine özgü prob (*vasa*) kullanılarak whole mount in situ hibridizasyon tekniği ile primordiyal germ hücrelerinin konumları belirlenmiş ve BPA'nın primordiyal germ hücrelerinin göç yoluna verdiği hasar 24 saatlik embriyolarda ortaya konmuştur. Bu embriyolarda primordiyal germ hücrelerinin sayıları tespit edilmiş ve bu sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında ise BPA uygulaması yapılmış zebra balığı embriyo ve larvalarındaki primordiyal germ hücrelerinin yapısı ve göç yolu histolojik yöntemlerle tespit edilmiştir. Histolojik incelemelerde 1-15 günlük zebra balığı embriyo ve larvaları seçilmiştir. Histolojik çalışmalarda primordiyal germ hücrelerini spesifik olarak boyayarak ışık mikroskobu altında gözlenmesini sağlayan Best Carmin, Hematoksilen-Eosin ve Toluidine Blue boyaları seçilmiştir. Histolojik ve moleküler çalışmalara ek olarak BPA'nın zebra balığı embriyoları üzerinde oluşturduğu hasarlar morfolojik olarak da incelenmiştir.

Duan ve Zhu (2006) tarafından yapılan çalışmada 2, 4, 6, 8, 10, 15, 18, 22 ve 25 mg/L lik dozlarda BPA zebra balığı embriyolarına uygulanmış ve embriyolar 72 saat boyunca gözlemlenerek toksik etkileri saptanmıştır. Çalışma 3 kısma bölünmüş ve BPA uygulaması 0. saat, 8. saat ve 24. saatte yapılmıştır. 0. ve 8. saat itibari ile BPA uygulaması yapılan gruplar arasında toksik etki olarak bir fark bulunmazken 24. saat itibariyle BPA uygulaması yapılan gruplarda 0. ve 8. saatte uygulama yapılan

gruplara göre toksik etkinin daha az olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada BPA, etanol içerisinde çözülerek embriyo ortamına uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda 24 saatlik zebra balığı embriyoları için öldürücü konsantrasyon (LC50) değeri $16,36 \pm 0,60$ mg/L olarak tespit edilmiştir. Düşük dozlarda koryondan çıkmada gecikmeler ve kan birikimleri gözlemlenirken, yüksek dozlarda kist oluşumları, eksen eğrilikleri, kuyruk malformasyonları ve ölümler gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda düşük doz olan 4 ve 8 mg/L lik dozlar seçilmiş ve bu çalışmadan farklı olarak BPA etanol içerisinde değil kontrol grubu ile karşılaştırıldığında minimal düzeyde hasara sebep olan DMSO (%1 oranında) içerisinde çözülerek embriyo ortamına verilmiştir. Ayrıca primordiyal germ hücrelerinin gonad taslaklarına ulaşabilmesi için gereken 15 günlük süreç boyunca her gün embriyo ve larvalardaki değişimler incelenmiştir. Lam ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada ise BPA uygulaması yapılan zebra balığı larvalarında kalp çevresinde ve yüzme kesesinde ödem, duyularda zayıflık ve yüzde gelişim anomalileri gözlenmiştir. Araştırmamızda bu iki çalışmadan farklı olarak 4 mg/L ve 8 mg/L BPA uygulanmış dozlarda kuyrukta deformasyonlar, ölümler, koryondan çıkma sürelerinde gecikmeler ve pigmentasyon oluşumlarında gecikmeler tespit edilmiştir. Lam ve arkadaşlarının verilerine paralel olarak bizim çalışmamızda da BPA uygulaması sonucunda zebra balığı larvalarında kalp çevresinde ve yüzme kesesinde ödem oluşumları gözlenmiştir.

BPA'nın gelişim ve üreme üzerine olan toksik etkileri uzun yıllar boyunca bilim insanlarının en çok merak ettiği araştırma konuları arasında yerini almıştır. BPA'nın östrojen reseptörüne bağlanma afinitesi estradiole göre 1000-5000 kez daha düşüktür (Dodge ve ark., 1936). Bu nedenle BPA, in vitro koşullarda zayıf bir östrojen olarak davranır. BPA'nın in vivo etkileri üzerine de araştırmalar yapılmıştır. F344 ratlara 3 gün boyunca 0,3 mg/kg BPA içeren tabletler verilmiş ve 3 gün sonunda bu ratlarda aşırı büyüme, uterusta hiperplazi ve mukus salgısında artış ve vajina epitelinde keratinleşme tespit etmişlerdir (Colerangle ve Roy, 1997). Lawson ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada C57BL/6J ırkı hamile farelere, hamileliğin 11. gününden itibaren her gün 20 µg BPA/kg ağız yoluyla verilmiştir. BPA'nın 12., 12,5., 13,5., ve 14,5. günlerdeki fetal ovaryuma olan etkilerini gözlemek için hamile fareler BPA uygulamasının 1., 1,5., 2,5., ve 3,5. günlerinde öldürülmüş, fetüsler uterustan alınmış ve fetal ovaryumlar izole edilmiştir. Bu çalışma sonucunda hamile bireylere BPA

uygulamasının gelişmekte olan fetal ovaryumunda oogenezi etkilediği, mayotik hasarlara ve kromozom anomalilerine sebep olduğu bulunmuştur.

Bisfenol A, canlıların oldukça sıkça maruz kaldığı çevresel östrojenler arasındadır. Dolayısıyla bu maddenin hücre ölümüne olan etkisi de merak edilen konular arasındadır. Literatürde BPA'nın apoptotik etkileri memelilerde sıkça çalışılmıştır. Yuan ve arkadaşları (2009), yüksek dozlardaki BPA'nın fare testislerindeki Leydig ve germ hücrelerini apoptoza götürdüğünü tespit etmişlerdir. Benachour ve arkadaşları (2009) ise çok düşük dozdaki BPA'nın insan plasental hücrelerinde apoptoza sebep olduğunu tespit etmişlerdir. 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksinin (TCDD) zebra balığı embriyoları üzerine oluşturduğu etkiyi araştıran bir araştırmada 24 saatlik zebra balığı embriyolarına 0.1, 0.3, 0.5 ve 1.0 ppb oranında TCDD uygulaması yapılmış ve TCDD uygulamasının beyin damarlarında kan akışını ciddi ölçüde yavaşlattığı tespit edilmiştir. Yapılan TUNEL deneyleriyle TCDD'nin 24 saatlik zebra balığı embriyolarının orta beyin kısmında apoptoza sebep olduğu gösterilmiştir (Dong ve ark., 2002). Bizim çalışmamızda yapılan akrinin turuncusu boyaması sonucunda düşük dozlarda BPA'nın 24 saatlik zebra balığı embriyoları üzerinde apoptotik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.

Zebra balıklarında primordiyal germ hücre göçünde SDF-1a adlı kemokinin çok önemli bir rolü vardır. Primordiyal germ hücreleri gonad taslaklarından salınan bu kemokine doğru hareket etmektedir. Bu kemokini üreten genin ekspresyonunda herhangi bir değişiklik olduğunda ve SDF-1a aktivitesi azaldığında primordiyal germ hücrelerinin göç yolundan ayrıldıkları, tüm primordiyal germ hücrelerinin gonad taslaklarına göç edemedikleri bazı primordiyal germ hücrelerinin baş ve kuyruk bölgeleri gibi ektopik bölgelerde buldukları tespit edilmiştir (Doitsidou ve ark., 2002). Bizim sonuçlarımız da bu çalışmanın sonuçları ile oldukça benzerlik göstermektedir. Çalışmamız sonucunda düşük dozlardaki BPA'nın primordiyal germ hücrelerinin ektopik bölgelere yönelmesini sağladığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla BPA'nın SDF-1a aktivitesinin azalmasına sebep olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan literatür taraması sonucunda herhangi bir model organizmada BPA'nın primordiyal germ hücreleri üzerine etkilerini gösteren herhangi bir çalışmaya

rastlanmamıştır. Bu bağlamda çalışmamız öncü bir çalışmadır. Willey ve Krone (2000) tarafından yapılan çalışmada zebra balığı embriyolarına yüksek dozda (10^{-7} M) endosülfan ve nonilfenol uygulaması yapılarak zebra balığı embriyo ve prelarvalarındaki değişimler ile primordiyal germ hücrelerinin göçü ve dağılımları gözlenmiştir. Endosülfan ve nonilfenol uygulamaları döllenmeden sonraki 2. saatte yapılmıştır. Endosülfan uygulaması sonucunda 3-4 günlük zebra balığı prelarvalarında anormal dairesel yüzüş, omurgada anormallikler ve gövde ekseninde eğrilmeler tespit edilmiştir. Hem endosülfan hem nonilfenol uygulaması sonucunda prelarvalarda ödem oluşumları, mikrosephali (baş oluşumunun normalden küçük olması) ve harekette yavaşlama tespit edilmiştir. Bu çalışmada görülen ödem oluşumları, dairesel yüzüş şekilleri, omurgada anormallikler ve gövde ekseninde eğrilmeler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla benzerlik göstermektedir. Yine Willey ve Krone (2000)'un yaptığı bu çalışmada primordiyal germ hücrelerinin dağılımı ve göç yolu 24 saatlik zebra balığı embriyolarında whole mount in situ hibridizasyon tekniği ile gözlenmiştir. Endosülfan uygulaması 5. ve 6. somitlerde azalmaya sebep olurken 7. ve 8. somitlerde artışa sebep olmuştur. 9-13. somitlerde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında primordiyal germ hücre sayısında herhangi bir değişim görülmemiştir. Nonilfenol uygulamasında ise 6-7. somitlerde primordiyal germ hücrelerinde azalma görülmüştür. Endosülfan ve nonilfenol uygulaması primordiyal germ hücrelerinin anterior-posterior eksenini boyunca dağılımında çeşitli değişimler ve primordiyal germ hücrelerinde kümeleşmeler tespit edilmiştir.

Zebra balıklarında primordiyal germ hücre göç sürecinde sıkça kullanılan bir pestisit olan deltamethrinin etkilerini inceleyen diğer bir çalışmada zebra balığı embriyolarının bir kısmının gelişimini tamamlayamadığı, koryondan çıkış sürelerinin uzadığı ve bu etkinin pestisit dozuna bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Yüksek dozda deltamethrin uygulaması sonucunda primordiyal germ hücre sayısında azalma ve morfolojilerinde bozulma görülmüştür. Primordiyal germ hücre nükleusunun düzensiz sınırlara sahip olduğu ve mitokondri yapısında bozulmalar olduğu izlenmiştir (Koç, 2008). Bu çalışmada ise BPA uygulaması sonucunda zebra balığı embriyolarında primordiyal germ hücrelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Deltamethrine benzer şekilde BPA uygulamasının zebra balığı gelişimini yavaşlattığı ve primordiyal germ hücre morfolojisinde değişimlere sebep olduğu görülmüştür.

Ramakrishnan ve Wayne (2001)'in yaptığı çalışmada medaka (*Oryzias latipes*) balığı embriyolarına 200 µg/L oranında BPA uygulamışlardır. Bu çalışma sonucunda BPA uygulamasının medaka balığı embriyolarında gelişimini ve üreme olgunluğuna erişimini yavaşlattığını tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, endokrin bozucuların düşük dozlarının bile canlılarda üreme üzerine olan olumsuz etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Düşük dozlarda olsa bile BPA'nın ekosisteme girmesi pek çok canlıya zarar vermektedir. Bu bağlamda BPA maruziyetinden mümkün olduğunca kaçınılmalıdır. BPA uygulamasının primordiyal germ hücre sayısını artırdığı ve bu hücrelerin ektopik bölgelere yönelimini sağladığı çalışmamızda tespit edilmiştir. Buna ek olarak BPA uygulamasının primordiyal germ hücre morfolojisinde değişimlere sebep olduğu histolojik çalışmalar ile gösterilmiştir. Primordiyal germ hücre göçünde ve morfolojisinde meydana gelen değişimler gonad farklılaşmasını ve üremeyi de yakından etkilemektedir. Bu çalışmanın bu konuda yapılacak diğer çalışmalara temel olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

ANDRE, J., ROUILLER, C., L'ultrastructure de la membrane nucléaire des ovocytes del l'araignée, Proceedings of the European Conference on Electron Microscopy, Stockholm, Academic Press, New York, 162-164, 1956.

ATKINSON, A., ROY, D., In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite, Biochemical and Biophysical Research Communications, 16(210): 424 -433, 1995.

BAGRI, A., GURNEY, T., H.E., X., ZOU, Y.R., LITTMAN, D.R., TESSIER-LAVIGNE, M., PLEASURE, S.J., The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells, Development, 129(18): 4249-4260, 2002.

BASER, H., EISENBEISS, S., NEUMANN, M., REICHMANN, F.M., THISSE, B., Thisse, C., Raz, E., Transition From Non-motile Behaviour to Directed Migration During Early PGC Development in Zebrafish, Journal of Cell Science, 118: 4027-4038, 2005.

BEKSAÇ, M., ÇÖRTOĞLU, S., KANSU, E., ÖZTÜRK, M., Kök Hücre Araştırmalarında Güncel Kavramlar, Türkiye Bilimler Akademisi Raporları, 7(26): 2004.

BEN-JOHNATHAN, N., STEINMETZ, R., Xenoestrogens: The Emerging Story of Bisphenol A, 9(3): 124-128, 1998.

BENDEL-STENZEL, M., ANDERSON, R., HEASMAN, J., WYLIE, C., The Origin and Migration of Primordial Germ Cells in The Mouse, Cell and Development Biology, 9: 393-400, 1998.

BINDHUMOL, V., CHITRA, K.C., MATHUR, P.P., Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats, Toxicology, 188: 117-124, 2003.

BRAAT, A.K., ZANDBERGEN, T., VAN DE WATER, S., GOOS, H.J., ZIVKOVIC, D., Charactrization of Zebrafish Primordial Germ Cells: Morphology and Early Distribution of vasa RNA. Developmental Dynamics, 216: 153-167, 1999a.

BRAAT, A.K., SPEKSNIJDER, J.E., ZIVKOVIC, D., Germ line development in fishes, The International Journal of Developmental Biology, 43: 745-760, 1999b.

- BRAAT A.K., VAN DE WATER, S., GOOS, H., BOGERD, J., ZIVKOVIC, D., *vasa* Protein Expression and Localization in the Zebrafish, *Mechanisms of Development*, 95: 271-274, 2000.
- BROTONS, J.A., OLEA-SERRANO, M.F., VILLALOBOS, M., PEDRAZA, V., OLEA, N., Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans, *Environmental Health Perspectives*, 103:608-612, 1995.
- BUEHR, M., The Primordial Germ Cells of Mammals: Some Current Perspectives, *Experimental Cell Research*, 232 ,194-207, 1997.
- CAN, A., Kök Hücrelerin Farklanmasında Rol Alan Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar, Türk Hematoloji Derneği Bilimsel Alt Komite Kursu, 2006.
- CAO, X., CORRIVEAU, J., Survey of Bisphenol A in bottled water products in Canada, *Food Additives and Contaminants, Part B*, 1(2): 161-164, 2008a.
- CAO, X., CORRIVEAU, J., Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15): 6378-6381, 2008b.
- CARLSON, B.M., Patten's Foundations of Embryology, Department of Anatomy and Cell Biology, University of Michigan, USA, 75-81, 1996.
- CASTRILLON, D.H., QUADE, B.J., WANG, T.Y., QUIGLEY, C., CRUM, C.P., The Human *Vasa* Gene is Specifically Expressed in the Germ Cell Lineage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97(17): 9585-9590, 2000.
- CHEMICAL WEEK, Product focus, Bisphenol A, Northbrook, IL, USA, 42, (2005).
- COLBORN, T., Environmental estrogens; health implications for humans and wildlife, *Environ Health Perspect* 103: 135-136, 1995.
- COLERANGLE, J.B., ROY, D., Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol a on the growth of the mammary gland of Noble rats, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 60: 153-160, 1997.
- COUCOUVANIS, E.C., Molecular and Cellular Aspects of Prenatal Gametogenesis in the Mouse, MSc Thesis, Stanford University, 1993.
- DESHPANDE, G., SWANHART, L., CHIANG, P., SCHEDL, P., Hedgehog signaling in germ cell migration, *Cell*, 106: 759-769, 2001.
- DIANIN, A.P., Zhurnal russkogo fiziko-khimicheskogo obshchestva. 23: 492, (1891).
- DODDS, E., LAWSON, W., Synthetic, oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus, *Nature*, 137: 996, 1936.

- DODGE, J.A., GLASEBROOK, A.L., MAGEE, D.E., ve ark., Environmental estrogens: effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 59: 155-161, 1996.
- DOITSIDOU M., REICHMAN-FREID, M., STEBLER, J., KÖPRUNNER M., DÖRRIES, J., MEYER, D., ESGUERRA, C.V., LEUNG, T., RAZ, E., Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1, *Cell*, 111: 647-659, 2002.
- DONG, W., TERAOKA, H., YAMAZAKI, K., TSUKIYAMA, S., IMANİ, S., IMAGAWA, T., STEGEMAN, J.J., PETERSON, R.E., HIRAGA, T., 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Toxicity in the Zebrafish Embryo: Local Circulation Failure in the Dorsal Midbrain Is Associated with Increased Apoptosis, *Toxicological Sciences*, 69(1): 191-201, 2002.
- DUAN, Z.H., ZHU, L., Toxicity of Bisphenol A on the Growth of zebrafish Embryos, *Acta Hydrobiologica Sinica*, 30(6): 638-642, 2006.
- DUMSTREI, K., MENNECKE, R., RAZ, E., Signaling Pathways Controlling Primordial Germ Cell Migration in Zebrafish, *Journal of Cell Science*, 117: 4787-4795, 2004.
- DURMAZ, E., ÖZMERT, E.N., Fitalatlar ve Çocuk Sağlığı, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53: 305-317, 2010.
- EFSA, Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission on the toxicokinetics of Bisphenol A, *The EFSA Journal*. 759: 1-10, 2008.
- EPA, CASRN 80-05-7, <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>, 04.04.2012, 1982.
- FELDMAN, D., TOKES, L., STATHIS, P.A., ve ark., Identification of 17- β -estradiol as the estrogenic substance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 81: 4722-4726, 1984.
- FELICI, DM., Twenty Years of Research on Primordial Germ Cells, *The International Journal of Developmental Biology*, 45: 519-522, 2001.
- FUJIWARA, Y., KOMIYA, T., KAWABATA, H., SATO, M., FUJIMOTO, H., FURUSAWA, M., NOCE, T., Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ lineage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 91: 12258-12262, 1994.
- GIUSTI, R.M., IWAMOTO, K., HATCH, E.E., Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects, *Annals of Internal Medicine*, 122: 778-8, 1995.
- GODIN, I., WYLIE, C., HEASMAN, J., Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture, *Development*, 108: 357-363, 1990.

GOLDMAN, J.M., LAWS, S.C., BALCHAK, S.K., COOPER, R.L., KAVLOCK, R.J., Endocrine-disrupting Chemicals: Pre-pubertal Exposures and Effects on Sexual Maturation and Thyroid Activity in the Female Rat. A Focus on the Endocrine Disruptor Recommendations, *Critical Reviews in Toxicology*, 30: 135-196, 2000.

GOULD, J.C., LEONARD, L.S., MANESS, S.C., ve ark, Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 142(1-2): 203-14, 1998.

GRAY, G.M., COHEN, J.T., CUNHA, G., HUGHES, C., MCCONELL, E.E., RHOMBERG, L., SIPES, I.G., MATTISON, D., Weight of the evidence evaluation of low-dose reproductive and developmental effects of bisphenol a, *Human and Ecological Risk Assessment*, 10: 875-921, 2004.

HARGREAVES, DC., HYMAN, PL., LU, TT., NGO, VN., BIDGOL, A., SUZUKI, G., RUI ZOU, Y., LITTMAN, DR., CYSTER, JG., A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements, *The Journal of Experimental Medicine*, 194(1): 45-46, 2001.

HENGSTLER, J.G., FOTH, H., GEBEL, T., KRAMER, P.J., LILIENBLUM, W., SCHWEINFURTH, H., VÖLKE, W., WOLLIN, K.M., GUNDERT-REMY, U., Critical Evaluation of Key evidence on The Human Health Hazards of Exposure to Bisphenol A, *Critical Reviews in Toxicology*, 41(4): 263-291, 2011.

HUN-KANG, J., KATAYAMA, Y., KONDO, F., Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals, *Toxicology*, 217, 81-90, 2006.

INOUE, H., YOKOTA, H., MAKINO, T., YUASA, A., SATO, S., Bisphenol A glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion, *Drug Metabolism and Disposition*, 29: 1084-1087, 2001.

JAGLARZ, K.M., HOWARD K.R., The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development*, 121: 3495-3503, 1995.

JOHNSON, I., HARVEY, P., Study on The Scientific Evaluation of 12 Substances In The Context of Endocrine Disrupter Priority List of Actions European Commission, Wrc-Nsf Ref: Uc 6052, 2002.

KANSU, E., 5. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Embriyonik Kök Hücreler, Antalya, 72, 2008.

KARATAŞ, M., Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri, Ankara, Türkiye, 2005.

KERR, C.L., GEARHART, J.D., ELLIOTT, A.M., DONOVAN, P.J., Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells, *Seminars in Reproductive Medicine*, 24(5): 304-313, 2006.

- KIM, H., HAN, S., YOO, S., ve ark., Potential estrogenic effects of bisphenol A estimated by in vitro and in vivo combination assays, *The Journal of Toxicological Sciences*, 26(3): 111-118, 2001.
- KIMMEL, C.B., BALLARD W.W., KIMMEL S.R., ULLMANN B., SCHILLING T.F., Stages of Embryonic Development of Zebrafish, *Developmental Dynamics*, 203: 253-310, 1995.
- KIMURA, T., NAKANO, T., Induction of pluripotency in primordial germ cells, *Histology and Histopathology*, 26: 643-650, 2011.
- KITAMURA, S., SUZUKI, T., SANOH, S., KOHTA, R., JINNO, N., SUGIHARA, K., YOSHIHARA, S., FUJIMOTO, N., WATANABE, H., OHTA, S., Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol a and 19 related compounds, *Toxicological Sciences*, 84: 249-259, 2005.
- KNAAK, J.B., SULLIVAN, L.J., Metabolism of bisphenol A in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 8: 175-184, 1966.
- KNAUT, H., PELEGRI, F., BOHMANN, K., SCHWARZ, H., NÜSSLEIN-VOLHARD, C., Zebrafish *vasa* RNA but Not Its Protein is a Component of the germ Plasm and Segregates Asymmetrically before Germline Specification, *the Journal of Cell Biology*, 149: 875-888, 2000.
- KNAUT, H., WERZ, C., GEISLER, R., A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor, *Nature*, 421: 279-282, 2003.
- KOBAYASHI, T., KAJIURA-KOBAYASHI, H., NAGAHAMA, Y., Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Mechanisms of Development*, 99: 139-142, 2000.
- KOÇ, N.D., Zebra balığının (*Branchydanio rerio*) primordiyal germ hücrelerinin göç sürecinde deltamethrin uygulamasının etkileri, Marmara Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 2008.
- KOMIYA, T., ITOH, K., IKENISHI, K., FURUSAWA, M., Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*, *Developmental Biology*, 162, 354-363, 1994.
- KOMIYA T., TANIGAWA, Y., Cloning of a gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells in rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207: 405-410, 1995.
- KOSKY, P.E., GUGGENHEIM, E.K., The Aqueous Phase in the Interfacial Synthesis of Polycarbonates. 1. Ionic Equilibria and Experimental Solubilities in the BPA-NaOH-H₂O System, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 30(3): 462-467, 1991.

KOPRUNNER, M., THISSE, C., THISSE, B., RAZ E., A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells, *Genes and Development*, 15: 2877-2885, 2001.

KRISHNAN, A.V., STATHIS, P., PERMUTH, S., TOKES, L., FELDMAN, D., Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrinology*, 132: 2279-2286, 1993.

KUBWABO, C., KOSARAC, I., STEWART, B., GAUTHIER, B.R., LALONDE, K., LALONDE, P.J., Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Additives and Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment*, 26(6): 928- 37, 2009.

KUNWAR, P.S., LEHMANN, R., Germ Cell attraction, *Nature*, 421: 226-227, 2003.

KUWANA, T., ROGULSKA, T., Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage, *Cellular and Molecular Biology*, 45(5): 725-736, 1999.

LAM, S.H., HLAING, M.Y., ZHANG, X., YAN, C., DUAN, Z., ZHU, L., UNG, C.Y., MATHAVAN, S., ONG, C.N., GONG, Z., Toxicogenomic and phenotypic analyses of bisphenol A early life exposure toxicity in zebrafish, *Plos One*, 6(12): 1-16, 2011.

LASKO, P.F., ASHBURNER, M., Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes and Development*, 4: 905-921, 1990.

LAWSON, C., GIESKE, M., MURDOCH, B., YE, P., LI, Y., HASSOLD, T., HUNT, P., Gene expression in the fetal Mouse ovary is altered by exposure to low doses of bisphenol A, *Biology of Reproduction*, 84(1): 79-86, 2010.

LEE, MM., *Endocrine Disrupters, A Current Review of Pediatric Endocrinology*, 109-118, 2007.

LEA, H.H., CARLSONA, E.M., CHUAA, J.P., BELCHER S.M., Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters*, 176(2): 149-156, (2008).

LINDHOLST, C., WYNNE, P.M., MARRIOTT, P., PEDERSEN, S.N., BJERREGAARD,P., *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology*, 135(2): 169-177, 2003.

MA, Q., JONES, D., BORGHESANI, P.R., SEGAL R.A., HAGASAWA T., KISHIMOTO T., BRONSON, R.T., SPRINGER, T.A., Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4 and SDF-1 deficient mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95: 9448-9453, 1998.

MACARTHUR, H., HOUSTON, D.W., BUBUNENKO, M., MOSQUERA, L., KING, M.L., DEAD South is A Germ Plasm Specific DEAD-Box RNA Helicase in Xenopus related to eIF4A, *Mechanisms of Development*, 95: 291-295, 2000.

MAHOWALD, A.P., Germ plasm revisited and illuminated, *Science*, 255: 1216-1217, 1992.

MARSELOS, M., TOMATIS, L., Diethylstilbestrol: II, pharmacology, toxicology and carcinogenicity in humans, *European Journal of Cancer*, 28A: 1182-1189, 1992.

MATTHEWS, J.B., TWOMEY, K., ZACHAREWSKI, T.R., In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta, *Chemical Research in Toxicology*, 14: 149-157, 2001.

MERCHANT-LARIOS H., Mendlovic F., Alvarez-Buylla, A., Characterization of Alkaline Phosphatase from Primordial Germ Cells and Ontogenesis of This Enzyme in The Mouse, *Differentiation*, 29(2): 145-151, 1985.

MIHAICH, E.M., FRIDERICH, U., CASPERS, N., HALL, A.T., KLECKA, G.M., DIMOND, S.S, STAPLES, C.A., ORTEGO, L.S., HENTGES, S.G., Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1392-1399, 2009.

MILLS, D., *Akvaryum Bakımı, İnkılap Kitabevi, İstanbul, Türkiye*, 1994.

MONTIEL E., Guillomot, M., Rojas, M., Bustos-Obregon, E.; Flechon, J., Primordial Germ Cell Characterization by Immunohistochemistry of Vasa-Homologue Protein in Preimplantational Rabbit Embryos, *International Journal of Developmental Biology*, 45(1): 141-142, 2001.

MORRISSEY, R.E., GEORGE, J.D., PRICE, C.J., TYL, R.W., MARR, M.C., KIMMEL C.A., The Developmental Toxicity of Bisphenol A in Rats and Mice, *Fundamental and Applied Toxicology*, 8(4): 571-582, 1987.

NAGAI, T., YAMAHA, E., ARAI, K., Histological Differentiation of Primordial Germ Cells in Zebrafish, *Zoological Science*, 18: 215-223, 2001.

NIEUWKOOP, P.D., SUTASURYA, L.A., Primordial germ cells in the chordates: embryogenesis and phylogenesis, Cambridge University Press, 54-56, 1979.

OLSEN, L.C., AUSLAND, R., FOJOSE, A., A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells, *Mechanism of Development*, 66, 95-105, 1997.

ÖKTEM, G., ALTAY, A.B., Erkek genital sisteminde kök hücre ve kök hücrenin kaynakları, *Türk Üroloji Dergisi*, 35(3): 219-233, 2009.

ORTIZ, D., Developmental Changes in Zebrafish Embryos Exposed to BPA Leached From Commonly Used Plastics, Senior Thesis Submitted in Partial Fullfillment of The Requirements for Graduation in the Honors Program, Liberty University, 2009.

PERA, M.F., REUBINOFF, B., Human Embryonic Stem Cells, *Journal of Cell Science*, 113: 5-10, 2000.

POTTENGER, L.H., DOMORADZKI, J.Y., MARKHAM, D.A., HANSEN, S.C., CAGEN, S.Z., WAECHTER JR., J.M., The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological Sciences*, 54: 3–18, 2000.

RAMAKRISHNAN, S., WAYNE, N.L., Impact of bisphenol A on early embryonic development and reproductive maturation, *Reproductive Toxicology*, 25(2): 177-183, 2008.

RAZ, E., The function and regulation of vasa-like genes in germ cell development, *Genome Biology*, 1(3): 1071.1-1071.6, 2000.

RAZ, E., Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective, *Nature Review Genetics*, 4: 690-700, 2003.

RAZ, E., FRIED M.R., Attraction rules: germ cell migration in zebrafish, *Current Opinion in Genetics and Development*, 16: 355–359, 2006.

RESMİ GAZETE, Tarım ve Köyişleri Bakanlığında: Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, 27960, 29, 2011.

RICHTER, C.A., BIRNBAUM, L.S., FARABOLLINI, F., NEWBOLD, R.R., RUBIN, B.S., TALSNESS, C.E., ve ark. , In vivo effects of Bisphenol A in laboratory rodent studies, *Reproductive Toxicology*, 24: 199-224, 2007.

RODRIGUEZ H.A., SANTAMBROSIO, N., SANTAMARIA, C.G., MUNOZ-DE-TORO, M., LUQUE, E.H., Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary, *Reproductive Toxicology*, 30: 550-557, 2010.

SAITO, T., KAZETO, R.G., KAWAKAMI, Y., NOMURA, K., TANAKA, H., ADACHI, S., ARAI, K., YAMAHA, E., The Mechanism for Primordial Germ-Cell Migration Is Conserved between Japanese Eel and Zebrafish, *PLoS One*, 6(9): 1-8, 2011.

SAX, N.I., Dangerous properties of industrial chemicals, Bitton educational publishing, Bitton Educational Publishing, Von Nostrand, New York, 458 - 1008, 1975.

SCHÜPBACH T., WIESCHAUS, E., Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo, *Roux's Archives of Developmental Biology*, 195: 302-317, 1986.

SHINOMIYA, A., TANAKA, M., KOBAYASHI T., NAGAHAMA, Y., HAMAGUCHI, S., The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*, *Development Growth and Differentiation*, 42: 317-326, 2000.

SOLOMON, G.M., SCHESSLER, T., *Environment and Health*, 6. endocrine disruption and potential human health implications, *Canadian Medical Association Journal*, 1116: 1467-1474, 2000.

STARZ-GAIANO, M., CHO N.K., FORBES, A., LEHMANN, R., Spatially restricted activity of a *Drosophila* lipid phosphatase guides migrating germ cells, *Development*, 128: 983-991, 2001.

STAPLES, C.A., DORN, P.B., KLECKA, G.M., O'BLOCK, S.T., A Review of The Environmental Fate, Effects and Exposures of Bisphenol A, *Chemosphere*, 36(10): 2149- 2173, 1998.

STEINMETZ, R., MITCHNER, N.A., GRANT, A., ALLEN, D.L., BIGSBY, R.M., BEN-JONATHAN, N., The Xenoestrogen Bisphenol A Induces Growth Differentiation and c-fos Gene Expression in the Female Reproductive Tract, *Endocrinology*, 139(6): 2741-2747, 1998.

STOKER, T.E., PARKS, L.G., GRAY, L.E., COOPER, R.L., Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat, A focus on the EDSTAC recommendations, *Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee, Critical Reviews in Toxicology*, 30: 197–252, 2000.

STROME S., The Germ of the Issue, *Nature*, 358, 368-369, 1992.

SNYDER, R.W., MANESS, S.C., GAIDO, K.W., WELSCH, F., SUMNER, S.C.J., FENNELL, T.R., Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168: 225–234. 2000.

ŞAHİN, F., SAYDAM, G., OMA Y S.B., Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 1(15): 48-56, 2005.

TACHIBANA, K., HIROTA, S., IIZASA, H., YOSHIDA, H., KAWABATA, K., KATAOKA, Y., KİTAMURA, Y., MATSUSHIMA, K., YOSHIDA, N., NISHIKAWA, S., KISHIMOTO, T., NAGASAWA, T., The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract *Nature*, 393: 591-594, 1998.

- TAKEUCHI, T., TSUTSUMI, O., NAKAMURA, N., IKEZUKI, Y., TAKAI, Y., YANO, T., TAKETANI, Y., Gender difference in serum bisphenol A levels may be caused by liver UDP-glucuronosyltransferase activity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325: 549–554, 2004.
- TSUNEKAWA, N., NATIO, M., SAKAI, Y., NISHIDA, T., NOCE, T., Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells, *Development*, 127: 2741-2750, 2000.
- VAN DOREN, M., BROHIER, H.T., MOORE L.A., LEHMANN, R., HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells, *Nature*, 396: 466-469, 1998.
- WEIDINGER, G., WOLKE, U., KÖPRUNNER, M., KLINGER, M., Raz, E., Identification of Tissues and Patterning Events Required for Distinct Steps in Early Migration of Zebrafish Primordial Germ Cells, *Development*, 126: 5295–5307, 1999.
- WEIDINGER, G., WOLKE, U., KÖPRUNNER, M., THISSE, C., THISSE, B., Raz, E., Regulation of Zebrafish Primordial Germ Cell Migration by Attraction Towards An Intermediate Target, *Development*, 129: 25–36, 2002.
- WELSHONS, W.V., NAGEL, S.C., VOM SAAL, F.S., Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure, *Endocrinology* 147(6): 56-69, 2006.
- WILLEY, J.B., KRONE P.H., Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos, *Aquatic Toxicology*, 54(1-2): 113-123, 2001.
- YAGER, J.D., LIEHR, J.G., Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36: 203-232, 1996.
- YILDIZ, N., Çevresel Östrojenlerden Bisfenol A ve Oktilfenolün Erkek Sıçanlarda Subkronik Etkilerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2009
- YEŞİLKAYA, E., Endokrin Bozucular, *Güncel Pediatri*, 6, 76-82, 2008.
- YOKOTA, H., IWANO, H., ENDO, M., KOBAYASHI, T., INOUE, H., IKUSHIRO, S., YUASA, A., Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver, *Biochemical Journal*, 340: 405–409, 1999.
- YOON, C., KAWAKAMI, K., HOPKINS, N., Zebrafish vasa Homolog RNA is Localized to the Cleavage Planes of 2- and 4-Cell-Stage Embryos and Its Expressed in the Primordial Germ Cells, *Development*, 124: 3157-3166, 1997.

YUAN, J.L., TIAN, B.S., YAN, Y.C., JIN, S.Z., XIN, S., XUAN, Z., XIAO, L.W., Bisphenol A Exposure Induces Apoptosis and Upregulation of Fas/Fas Ligand Caspase-3 Expression in the Testes of Mice, *Toxicological Sciences*, 108(2): 427-436.

ZHANG, N., ZHANG, J., PURCELL, KJ., CHENG, Y., HOWARD K., The *Drosophila* protein Wunen repels migrating germ cells. *Nature*, 385: 64-67, 1997.

ZHU, Y., SHU, W.Q., ZHUO, J.B., YU, N., LIU, B., Evaluation of the Estrogenic Active of Bisphenol A to DNA binding metabolite(s), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 210: 424-433, 1995.

ZHU, Y., YU, T., ZHANG, X.C., NAGASAWA, T., WU, J.Y., RAO, Y., Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons, *Nature Neuroscience*, 5(8): 719-720, 2002.

ZOU, Y.R., KOTTMANN, A.H., KURODA, M., TANIUCHI, I., LITTMAN, D.R., Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development, *Nature*, 393: 595-599, 1998.

ÖZGEÇMİŞ

Cansu AKBULUT, 06.02.1987 de Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. 2004 yılında Özel Yüce Lisesi'nden mezun oldu. 2005 yılında başladığı Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü 2009 yılında 3.lük derecesi ile bitirdi. 2010 yılında Sakarya Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne araştırma görevlisi oldu. Lisans ve lisansüstü çalışmaları boyunca İtalya, İsviçre ve Almanya'daki çeşitli enstitülerde misafir araştırmacı olarak bulundu.