



**ERKEK YENİ ZELANDA TAVŞANLARINDA BİSFENOL
AF'NİN OLASI SUBAKUT ETKİLERİ ÜZERİNE
SAFRANAL'IN KORUYUCU ROLÜ**

Muhammed ETYEMEZ
Doktora Tezi
Danışman: Prof. Dr. Mehmet Şükrü GÜLAY
Tez No: 2022-014
Aralık, 2022
Afyonkarahisar

T.C
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

ERKEK YENİ ZELANDA TAVŞANLARINDA BİSFENOL
AF'NİN OLASI SUBAKUT ETKİLERİ ÜZERİNE SAFRANAL'IN
KORUYUCU ROLÜ

Hazırlayan
Muhammed ETYEMEZ

Danışman
Prof. Dr. Mehmet Şükrü GÜLAY

2. Danışman
Prof. Dr. Recep ASLAN

Tez No: 2022-014

AFYONKARAHİSAR

2022

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ortak Doktora programı çerçevesinde yürütülen **Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı'nda** Muhammed ETYEMEZ tarafından hazırlanan “Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında bisfenol AF'nin olası subakut etkileri üzerine safranal'ın koruyucu rolü” adlı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca 21/12/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

.

Başkan

Prof. Dr. Mehmet Şükrü GÜLAY

İmza

Üye

Doç. Dr. Ahu DEMİRTAŞ

İmza

Üye

Doç. Dr. Ahmet UYAR

İmza

Üye

Doç. Dr. Mehmet GÜVENÇ

İmza

Üye

Doç. Dr. Özlem YILDIZ GÜLAY

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

27/12/2022

İmza

Muhammed Etyemez

ÖZET

ERKEK YENİ ZELANDA TAVŞANLARINDA BİSFENOL AF'NİN OLASI SUBAKUT ETKİLERİ ÜZERİNE SAFRANAL'IN KORUYUCU ROLÜ

Bisfenol A (BPA), 1960'lardan beri bazı plastiklerin ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanılan endüstriyel bir kimyasaldır. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar, BPA'ya maruz kalmanın, endokrin bozukluklar ve nöro-davranışsal problemler de dahil olmak üzere canlıların sağlığı üzerine olumsuz etkilere neden olabileceğini göstermiştir. Buna karşın, üreticiler BPA'nın yerine alternatif olarak birden fazla bisfenol analogu üretmeye ve kullanmaya başlamıştır. Bu analogların ise sağlık üzerindeki etkileri kesin olarak bilinmemektedir. Bu analoglardan biri olan Bisfenol AF (BPAF)'nin ise BPA'ya göre daha yüksek endokrin bozucu bir kimyasal ve toksikolojik etki potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir.

Safran bitkisi, Türkiye'de ve birçok ülkede yetiştirilmektedir. Kimyasal analize göre, safran stigmalarında 150'den fazla kimyasal bulunmaktadır ve bunların arasında tüm bu farmakolojik etkiler; safrana özel renk, tat ve kokudan sorumlu olan krosin, krosetin, pikrokrosin ve safranal gibi safran ana kimyasal bileşikler ile ilişkilidir. Safranal, *Crocus sativus* (Çiğdem, Safran) bitkisinin ikincil metabolit izolasyonu ile oluşan güçlü bir antioksidan maddedir. Son yıllarda bu maddenin antiinflamatuvar, antikanser, antimikrobiyel, antihiperglisemik ve nöroprotektif etkilerinin olabildiği belirtilmektedir.

Bu tez çalışmamızın amacı erkek Yeni Zelanda Tavşanlarında bisfenol türevlerinden BPAF'nin oksidatif, histopatolojik ve bazı erkek üreme parametreleri üzerindeki olası negatif etkilerine karşı safranal'in sağaltıcı potansiyelini incelemektir. Bu anlamda yapılan çalışmamızda 24 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı (*Oryctolagus cuniculus*) kullanıldı. Tavşanlar; Kontrol, BPAF, Safranal, BPAF+Safranal grupları olarak her grupta 6 adet olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (K) 1 kg canlı ağırlık için 1 ml mısır yağı, BPAF grubuna (BF) 20 mg/kg dozunda Bisfenol AF 1 ml mısır yağı içerisinde, Safranal grubuna (SF) 100 mg/kg dozunda safranal 1 ml mısır yağı içerisinde, BPAF+Safranal grubu (B+S) 20 mg/kg dozunda Bisfenol

AF + 100 mg/kg dozunda safranal 1 ml mısır yağı içerisinde oral olarak verildi. Deneysel uygulama toplam 9 hafta sürdü. Haftalık olarak yem tüketimi ve vücut ağırlıkları ölçüldü. Çalışmanın başında ve sonunda alınan kanlardan kan parametreleri ve elde edilen serumlardan üreme hormonlarındaki değişiklikler incelendi. Çalışma başında ve sonunda elde edilen ejakülatlardan bazı spermatolojik parametrelere bakıldı. Deneysel aşamanın sonunda tüm gruplardaki tavşanlar isoflurane ile genel anesteziyi takiben ötenazi yapıldı. Testis ve epididimis dokuları histopatolojik açıdan değerlendirildi. Testislerde bazı oksidan-antioksidan parametreler incelendi. Ayrıca testis dokusu ve ejakülatlardan elde edilen seminal plazmadaki üreme hormonları tayin edildi.

Yapılan uygulamalar sonucunda, canlı ağırlık ve yem tüketiminde gruplar arasında bir fark görülmedi. BPAF, kan değerlerinde granülosit (%) ve toplam lökosit sayısını (WBC) önemli düzeyde artırdı. Buna karşın lenfosit (%) değerini düşürdü. Safranal ise sadece WBC değerinde kısmi bir azalmaya sebep oldu. Östrojen hormonu en yüksek BF grubunda olmasına rağmen kontrol grubu ile arasında anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Fakat safranal serum ve testiste östrojen hormon düzeylerini azaltmış ve bu etkisini B+S grubunda da göstermiştir. Sperm konsantrasyonu ve motilite değerlerinde BPAF önemli bir düşüşe sebep oldu ve safranal bu değerleri B+S grubunda kontrol seviyelerine yükseltti. Testis dokusunda malondialdehit (MDA) değerleri BF grubunda anlamlı olarak yükseldi. Safranal tedavisi ise BPAF'nin MDA üzerindeki bu olumsuz etkisini S+F grubunda pozitif yönde değiştirdi. Histopatolojik olarak BPAF testis ve epididimis dokularına hasara yol açarken, safranal'ın BPAF uygulamasının oluşturduğu histopatolojik hasar üzerine düzeltici bir etkisinin olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak BPAF uygulamasının testis ve epididimis üzerinde oksidatif hasara yol açtığı belirlendi. Bu hasara paralel olarak MDA seviyelerinde bir artış görülürken, semen kalitesinde bir düşüş meydana geldi. Safranal'ın ise BPAF'nin oluşturduğu bu olumsuz etkiler üzerine koruyucu bir rol oynayabileceği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol AF, Safranal, Tavşan, Erkek, Üreme, Fizyoloji

SUMMARY

PROTECTIVE ROLE OF SAFRANAL ON POSSIBLE SUBACUTE EFFECTS OF BISPHENOL AF IN MALE NEW ZEALAND RABBITS

Bisphenol A (BPA) is an industrial chemical used in some plastics and epoxy paints since the 1960s. The scientific operation in recent years is that exposure to BPA can cause adverse effects on the health of living things, including endocrine and neurobehavioral problems. Despite this, manufacturers have begun to produce and use multiple bisphenol analogs as alternatives to BPA. The effects of these analogs on health are not known for certain. One of these analogs, Bisphenol AF (BPAF), may have a higher endocrine-disrupting chemical and toxicological impact than BPA.

The Saffron plant is grown in Turkey and many countries. According to chemical analysis, there are more than 150 chemicals in saffron stigmas, and among them, all these pharmacological effects; It carries the main chemical components of saffron, such as crocin, crocetin, picrocrocin, and safranal, which are responsible for the specific color, taste, and odor of saffron. Safranal is a strong preservative formed by the isolation of metabolites on the *Crocus sativus* (Crocus, Saffron) plant. In recent years, it has been reported that this substance may have anti-inflammatory, anticancer, antimicrobial, antihyperglycemic, and neuroprotective effects.

The aim of this thesis was to investigate the therapeutic potential of safranal against the possible negative effects of BPAF, a bisphenol derivative, on oxidative, histopathologic, and some male reproductive parameters in male New Zealand rabbits. In the current study, 24 male New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were used. The rabbits were divided into 4 groups Control, BPAF, Safranal, BPAF+Safranal groups with 6 rabbits in each group. Control group (C) received 1 ml corn oil per 1 kg body weight, BPAF group (BF) received 20 mg/kg dose of Bisphenol AF in 1 ml corn oil, Safranal group (SF) received 100 mg/kg dose of safranal in 1 ml corn oil, BPAF+Safranal group (B+S) received 20 mg/kg dose of Bisphenol AF + 100 mg/kg dose of safranal in 1 ml corn oil orally. The experiment

lasted for a total of 9 weeks. Feed intake and body weight were measured weekly. Blood parameters were analyzed from the blood samples taken at the beginning and end of the study and changes in reproductive hormones were analyzed from the serum samples taken. Some spermatologic parameters were examined from the ejaculates obtained at the beginning and end of the study. At the end of the experimental phase, rabbits in all groups were euthanized following general anesthesia with isoflurane. Testes and epididymis tissues were evaluated histopathologically. Some oxidant-antioxidant parameters were also examined in the testes. In addition, reproductive hormones were determined from testicular tissue and seminal plasma obtained from ejaculate.

As a result of the treatments, there was no difference between the groups in live weight and feed intake. BPAF significantly increased granulocyte (%) and total leukocyte count (WBC) in the blood. On the other hand, the lymphocyte (%) was decreased. Safranal caused only a partial decrease in the WBC. Although estrogen hormone was highest in the BF group, it was not significant in comparison with the control group. However, safranal decreased the estrogen hormone levels in serum and testis and showed this effect in the B+S group as well. BPAF caused a significant decrease in sperm concentration and motility values and safranal increased these values to control levels in B+S group. Malondialdehyde (MDA) levels in testicular tissue were significantly increased in the BF group. Safranal treatment positively changed this negative effect of BPAF on MDA in the S+F group. Histopathologically, BPAF caused damage to testicular and epididymis tissues, whereas safranal treatment had a corrective effect on the histopathologic damage caused by BPAF administration.

In conclusion, it was determined that BPAF administration caused oxidative damage in the testis and epididymis. In parallel with this damage, there was an increase in MDA levels and a decrease in semen quality. It was observed that saffron may play a protective role against these negative effects of BPAF.

Keywords: Bisphenol AF, Safranal, Rabbit, Male, Reproduction, Physiology

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim ve tez çalışmamda en başından itibaren tüm bilgi ve tecrübelerini aktaran, desteklerini esirgemeyen ve tüm çalışmalarımda bana yol gösteren kıymetli sayın danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Şükrü GÜLAY'a muhabbet ve hürmetlerimle teşekkür ediyorum. Tez sürecinin başından sonuna kadar yardım ve destekte bulunan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalındaki değerli hocalarım Doç. Dr. Mehmet GÜVENÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa CELLAT'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin histopatolojik bulgular kısmındaki doku analizlerinde destek olan Doç. Dr. Ahmet UYAR'a, tavşanların bakım ve beslenmesinde yardımcı olan HMKÜ Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi personeline, tezin uygulamaları ve laboratuvar analizlerinde yardımcı olan kıymetli dostlarım Öğr. Gör. Dr. Halil ALAKUŞ, Dr. Öğr. Üyesi İbrahim ALAKUŞ, Dr. Öğr. Üyesi Ömer KIRGIZ, Arş. Gör. Oğuz Kaan YALÇIN'a teşekkür ediyorum. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında bulunan Prof. Dr. Şule DEMİRCİ (emekli), Doç. Dr. Özlem YILDIZ GÜLAY, Doç. Dr. Ahu DEMİRTAŞ, Doç. Dr. Özkan ELMAS ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında bulunan Prof. Dr. Recep ASLAN ve Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ'a doktora öğrenimimdeki kazançlarıma yaptıkları önemli katkılardan dolayı saygı ve sevgi ile müteşekkirdiğimi beyan ederim. Son olarak en kıymetli değerlerim olan, her zaman yanımda maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen, bu başarımın mimarları olan annem Ayşe ETYEMEZ, babam Seyfettin ETYEMEZ ve eşim Ayşegül ETYEMEZ başta olmak üzere bütün aileme canıgönülden teşekkürlerimi sunarım.

Muhammed ETYEMEZ

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	
ÖZET	i
SUMMARY	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
RESİMLER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tavşan	2
1.1.1. Erkek Tavşanların Üreme Sistemi Anatomisi	3
1.1.2. Cinsel gelişim, Puberta ve Cinsel Olgunluk	9
1.1.3. Spermatogenezis	11
1.1.4. Spermatogenezisin Hormonal Kontrolü	14
1.1.5. Sperm Üretimi	16
1.1.6. Semen Özellikleri	16
1.1.6.1. Jel Kitlesi	17
1.1.6.2. Seminal Plazma	17
1.1.6.3. Sperm Motilitesi	19
1.1.6.4. Spermatozoon Morfolojisi	19
1.1.6.5. Semen Hacmi ve Sperm Konsantrasyonu	21
1.1.6.6. Semen Rengi ve Görünümü	23
1.2. Safranal	23
1.2.1. Safranal'ın Fiziksel ve Biyokimyasal Özellikleri	25
1.2.2. Safranal'ın Antioksidan Etkileri	26

1.2.3. Safranal'ın Diğer Farmakolojik Etkileri	28
1.3. Bisfenol AF (BPAF)	30
1.3.1. BPAF'nin Kullanım Alanları	30
1.3.2. BPAF'nin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	31
1.3.3. Metabolizması ve Toksikolojik Etkileri	31
2. MATERYAL VE METOT	37
2.1. Analizlerde Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	37
2.1.1. Kimyasal Maddeler	37
2.1.2. Cihazlar	38
2.1.3. Laboratuvar Malzemeleri	39
2.2. Deney Hayvanı Materyali ve Deneysel Protokol	40
2.3. Kan Örneği Alımı	41
2.4. Hormon Tahlilleri	42
2.5. Sperm Örneklerinin Toplanması	43
2.6. Sperm Analizi	44
2.7. Ötenazi ve Testis-Epididimis Ağırlıklarının Tayini	45
2.8. Oksidan ve Antioksidan Tayini	45
2.8.1. Homojenatların Hazırlanması	45
2.8.2. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Ölçümü	46
2.8.3. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Ölçümü	46
2.8.4. Doku Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü	46
2.8.5. Doku Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Ölçümü	47
2.8.6. Doku Protein Tayini	47
2.9. Histopatolojik Muayene	47
2.10. İstatistiksel Analiz	48
3. BULGULAR	48
3.1. Genel Sağlık Durumu	49
3.2. Canlı Ağırlık ve Yem Tüketimi	49
3.3. Kan Parametrelerindeki Değişiklikler	51
3.4. Hormonal Değişiklikler	53
3.5. Spermatolojik Değişiklikler	55
3.6. Oksidan-Antioksidan Parametrelerdeki Değişiklikler	56
3.7. Histopatolojik Bulgular	57
3.7.1. Testis Dokusuna Ait Histopatolojik Bulgular	57
3.7.2. Epididimis Dokusuna Ait Histopatolojik Bulgular	65
3.7.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru	72

4. TARTIŞMA 73

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 88

6. KAYNAKLAR 90

7. EKLER HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

Ek 7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

ÖZGEÇMİŞ HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

17β-HSD: 17 β-Hidroksi Steroid Dehidrojenaz

2n: Diploid kromozom

3β-HSD: 3-Beta Hidroksisteroid Dehidrogenaz

Å°: Ångström

Akt: protein kinaz B

ANOVA: Analysis of Variance

ATP: Adenozin trifosfat

β-NGF: Beta-Sinir büyüme faktörü

BPA: Bisfenol A

BPAF: Bisfenol AF

BPB: Bisfenol B

BPBP: Bisfenol BP

BPC: Bisfenol C

BPF: Bisfenol F

BPG: Bisfenol G

BPS: Bisfenol S

Ca: Kalsiyum

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

CatSper: Sperm-spesifik kalsiyum (Ca^{+2}) iyon kanalı

CCl4: Karbon Tetraklorür

Cd: Kadmiyum

Cu: Bakır

CV: Tahlil hassasiyeti

CYP11A1: Kolesterol yan zincir bölünme enzimi

CYP17: Sitokrom P450 17 α -hidroksilaz

CYP17A1: Sitokrom P450 17-alfa-hidroksilaz

CYP19A1: Aromataz

A4: Steroid hormon sentezi yolağı

dl: Desilitre

DNA: Deoksiribo nükleik asit

EDC: Endokrin bozucu kimyasallar

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EPA: Çevre Koruma Ajansı

ER: Endoplazmik Retikulum

ER α : Östrojen reseptörü alfa

ER β : Östrojen reseptörü beta

F: Varyans analizine (ANOVA) ilişkin parametre

Fe: Demir

fL: Femtolitre

FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon

g: Gram

GnRH: Gonadotropik Salgılatıcı Hormon

H.E.: Hematoksilen-Eozin boyama

HbA1c: Hemoglobin A1c

HPG: Hipotalamus-hipofiz eksen

HSD3 β 2: Hidroksisteroid dehidrojenaz/delta-deltaizomeraz tip II

ICSH: Interstisyel Hücre Stimüle Edici Hormon

IU: International Unit

K: Potasyum

Keap1: Kelch Like ECH Associated Protein 1

Kg: Kilogram

L: Litre

LH: Lüteinleştirici Hormon

MAPK: Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz

MDA: Malondialdehit

Mg: Magnezyum

µg: Mikrogram

µm: Mikrometre

µM: Mikromolar

mg: Miligram

mIU: Mili International Unit

ml: Mililitre

mm: Milimetre

mm³: Milimetre küp

mmol: Milimol

Mn: Manganez

mRNA: Messenger Ribo Nükleik Asit

mTOR: Mammalian target of rapamycin

n: Haploid Kromozom

Na: Sodyum

NADP: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

NADPH: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

ng: Nanogram

Ni: Nikel

nm: Nanometre

nmol: Nanomol

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

Nrf2: Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2

p: Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri

p75NTR: Düşük affiniteli nörotropin reseptörü

Pb: Gümüş

PC12: Adrenal feokromositoma

pg: Pikogram

pH: Hidrojen Potansiyeli

PI3: Fosfor triiyodür

PI3K: Fosfoinositid-3 Kinaz

ROS: Reaktif oksijen türleri

rpm: Dakikadaki devir sayısı

SD: Standart sapma

Se: Selenyum

SEM: Elektron mikroskop görüntüleme

SOD: Süperoksit Dismutaz

sptz: Spermatozoon

StAR: Steroidojenik akut düzenleyici protein

Th1: Tip 1 Timus yardımcı hücreleri

Th2: Tip 2 Timus yardımcı hücreleri

TrkA: Tropomiyozin reseptörü kinaz A

USA: Amerika Birleşik Devletleri

vb: Ve benzeri

vd: Ve diğlerleri

x10⁶: Milyon

Zn: Çinko



ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 1.1. Tavşan testisinin anatomik yapısı	6
Şekil 1.2. Tavşanlarda erkek eklenti bezleri	7
Şekil 1.3. Spermatogenezisde mitoz ve mayoz bölünme	12
Şekil 1.4. Hormonal kontrol	15
Grafik 3.1. Haftalara göre grupların canlı ağırlıkları	49
Grafik 3.2. Haftalara göre grupların yem tüketimi	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SAYFA
Çizelge 1.1. Tavşanlarda seminal plazmada bulunan karbonhidratlar, protein ve minerallerin kompozisyonu	18
Çizelge 1.2. Bazı tavşan ırklarına göre ejakülat hacmi ve sperm konsantrasyonu	21
Çizelge 1.3. Tavşan spermine ait bazı parametreler	22
Çizelge 1.4. Safranal çıkarılan bitkiler	27
Çizelge 2.1. Johnsen testiküler biyopsi skoru kriterleri	48
Çizelge 3.1. BPAF ve safranal'in 9 hafta uygulama sonrası Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarında canlı ağırlığı ve yem tüketimi üzerindeki etkileri	51
Çizelge 3.2. Deneysel çalışmadan önce Yeni Zelanda Beyaz tavşanlarının bazı kan parametreleri	51
Çizelge 3.3. BPAF ve safranal uygulamasının Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının bazı kan parametreleri üzerindeki etkileri	52
Çizelge 3.4. Deneysel çalışmadan önce Yeni Zelanda Beyaz tavşanlarının başlangıç serum östrojen ve testosteron konsantrasyonları	53
Çizelge 3.5. BPAF ve safranal'in Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının serum, seminal plazma ve testiste bulunan testosteron ve östrojen seviyeleri üzerindeki etkileri	54
Çizelge 3.6. BPAF ve safranal'in Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının serum, seminal plazma ve testiste bulunan GnRH, FSH ve LH seviyeleri üzerindeki etkileri	54
Çizelge 3.7. Deneysel çalışma öncesi Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının deney başlangıcındaki spermatolojik parametreler	55

Çizelge 3.8. BPAF ve safranal'ın Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının bazı üreme parametreleri üzerindeki etkileri	56
Çizelge 3.9. BPAF ve safranal'ın Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının testis dokularında bazı oksidan-antioksidan parametreler üzerine etkileri.	57
Çizelge 3.10. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru	72



RESİMLER DİZİNİ

	SAYFA
Resim 1.1. Tavşan penisinin ve testisinin yerleşimi	4
Resim 1.2. Tavşan testisleri karın boşluğunda, skrotal kesenin boşken görünümü	5
Resim 1.3. Erkek tavşanda aksesuar bezlerin anatomik görünümü	8
Resim 1.4. Tavşan sperminin başının SEM görünümü	20
Resim 1.5. Tavşan sperminin 2.600'lük bir SEM görüntüsü	20
Resim 1.6. <i>Crocus sativus</i>	25
Resim 1.7. Safranal maddesinin fiziksel görüntüsü ve biyokimyasal yapısı	26
Resim 1.8. BPAF'nin moleküler yapısı ve fiziksel görünümü	31
Resim 2.1. Tavşan sentral kulak arterlerinden intraket yardımı ile kan alınması	42
Resim 2.2. Hormon tayinlerinde ELİSA test prosedürlerinin uygulanması	43
Resim 2.3. Sperm alımı için kullanılan suni vajen ve sperm toplama işlemleri	44
Resim 3.1. Kontrol grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X40	58
Resim 3.2. Kontrol grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X100	58
Resim 3.3. Kontrol grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının daha yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	59
Resim 3.4. BPAF grubuna ait testis dokusunun mikroskopik görünümü. H.E. X40	60

Resim 3.5. BPAF grubuna ait testis dokusunda yapıları tamamen bozulmuş seminifer tubulların yakın mikroskopik görünümü. H.E. X100	60
Resim 3.6. BPAF grubuna ait testis dokusunda yapısı tamamen bozulmuş seminifer tubulusta dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin daha yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	61
Resim 3.7. BPAF+Safranal grubuna ait testis dokusunun normale yakın histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X40	62
Resim 3.8. BPAF+Safranal grubuna ait testis dokusunun normale yakın histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X100	62
Resim 3.9. BPAF+Safranal grubuna ait testis dokusunda germinatif epitel hücre serileri ve interstisyumda yer alan Leydig hücreleri ile vasküler yapıların normale yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	63
Resim 3.10. Safranal grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X40	64
Resim 3.11. Safranal grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X100	64
Resim 3.12. Safranal grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının daha yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	65
Resim 3.13. Kontrol grubuna ait epididimis dokusunun normal histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X100	66
Resim 3.14. Kontrol grubuna ait epididimis dokusunun normal histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	66
Resim 3.15. BPAF grubuna ait epididimis dokusunda dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin mikroskopik görünümü. H.E. X100	67
Resim 3.16. BPAF grubuna ait epididimis dokusunda epitel hücrelerde vakuoler dejenerasyon ve piknotik çekirdekli koagulasyon nekrozlarının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	68

Resim 3.17. BPAF grubuna ait epididimis dokusunda dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	68
Resim 3.18. BPAF grubuna ait duktus epididimis dokusunda şeffaf hücrelerinde hiperplazi ve koagülasyon nekrozların yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	69
Resim 3.19. BPAF+Safranal grubuna ait epididimis dokusunun normale yakın histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X100	70
Resim 3.20. BPAF+Safranal grubuna ait epididimis dokusunun normale yakın histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	70
Resim 3.21. BPAF+Safranal grubuna ait duktus epididimis dokusunun şeffaf hücrelerinde hiperplazi haricinde normale yakın histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400.	71
Resim 3.22. Safranal grubuna ait epididimis dokusunun normal histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X100	71
Resim 3.23. Safranal grubuna ait epididimis dokusunun normal histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400	72

1. GİRİŞ

Bisfenol AF (2,2-bis(4-hidroksifenil)-heksafloropropan; BPAF), iki metil grubunun triflorometil gruplarıyla değiştirildiği BPA'nın florlanmış bir türevidir. Floropolimerler ve floroelastomerler, polyesterler, poliamidler ve poliimidler gibi özel polimerlerin üretimi için bir monomer olarak kullanılır. BPA ve türevleri, konserve yiyecek ve içeceklerin, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin sıvı ve katı kısımlarında, elektronik malzemelerde bulunmaktadır (Jagne vd., 2016, Song vd., 2014). Günümüzde BPA maruziyet oranlarındaki artış ve olumsuz sağlık etkileri sebebiyle artan toplumsal endişe, BPA üretiminde kısıtlamalara gidilmesine yol açmıştır (Ma vd., 2019) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından Toksikolojik Öncelik Endeksi'nde 5. sıraya yerleştirilmiştir (İnt. Kyn. 1). Son yıllarda BPA ile ilgili sıkı düzenlemeler ve kısıtlamalar, BPA'nın yerine alternatif maddelerin geliştirilmesi ve üretilmesini teşvik etmektedir. Sonuç olarak, kimyasal yapısı BPA'ya benzeyen ve "BPA analogları" olarak adlandırılan bir dizi kimyasal, polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerinin imalatında, BPA'ya alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır (Riaz vd., 2021). Bisfenol AF (BPAF)'nin kullanımı Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından tanınmıştır (İnt. Kyn. 2).

Giderek kullanımı artmasına rağmen, BPAF üzerine yapılan çalışma sayısı hala sınırlı sayıdadır. Çalışmalar BPAF maruziyetinin steroidogenez üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini göstermiştir (Siracusa vd., 2018). Erkek zebra balığı üzerinde yapılan incelemelerde, 1 mg/L dozunda BPAF balıklarda testosteron seviyelerini düşürmüştü ve testis morfolojisini değiştirmiştir (Yang vd., 2016; Shi vd., 2015). Farelerde yapılan bir çalışmada BPAF'nin kan testis bariyerine zarar verdiği ve sperm kalitesini olumsuz etkilediği görülmüştür (Wu vd., 2019). Elde edilen veriler, BPAF'nin BPA'dan daha güçlü bir endokrin bozucu olabileceğini düşündürmektedir (Siracusa vd., 2018).

Safranal, safran (*Crocus sativus*) bitkisinin ikincil metabolit izolasyonu ile oluşan güçlü bir antioksidan maddedir (Hosseinzadeh ve Sadeghnia, 2005). Ayrıca safranal'in antiinflamatuvar (Alayunt vd., 2019), antikanser (Zhang vd., 2018),

antimikrobiyel (Khayyat ve Elgendy, 2018), antihiperglisemik (Kianbakht ve Hajiaghachee, 2011) ve nöroprotektif (Sadeghnia vd., 2017) etkileri de bulunmaktadır. Safran, antioksidan olarak, infertil erkeklerde sperm morfolojisi ve hareketlilik üzerinde olumlu etkilidir (Heidary vd., 2008). Safran takviyesi egzersiz stresi ile meydana gelen sperm DNA hasarını iyileştirmiştir (Maleki vd., 2016). Ayrıca spermdeki kromatin anomaliliklerini ortadan kaldırabilmektedir (Mardani vd., 2014). Sperm zarının bütünlüğünü koruyan (Vaez vd., 2014) safran, kadmiyuma maruz kalan sıçanlarda epididim sperm parametrelerini pozitif yönde etkilemiştir (Asadi vd., 2014). Safranal'ın diyabetli sıçanların testis dokusunda antioksidatif etki gösterdiği ve oksidatif strese karşı koruyucu bir rolü olabileceği bildirilmiştir (Ataei ve Rahbarian, 2020).

Bu tez çalışmamızın amacı bisfenol türevlerinden BPAP'nin oksidatif, histopatolojik ve bazı erkek üreme parametreleri üzerindeki olası negatif etkilerine karşı safranal'in sağaltıcı potansiyelini incelemektir.

1.1. Tavşan

Tavşan (*Oryctolagus cuniculus*), Lagomorpha takımında sınıflandırılmış Leporidae (Tavşangiller) familyası içinde bulunan bir kemirgendir. Nokturnal olan bu hayvanlar üstte ve altta olmak üzere kesici dişlere sahiptir. Tavşanlar genelde vahşi doğada toprak altına yuva kazarlar ve bu yuvalar birleşerek 2 dönümlük araziyi kaplayacak kadar büyüklükte bir yaşam alanı oluşturur. Amerikan Tavşan Yetiştiricileri Birliği, 100'den fazla tavşan türünü tanımaktadır. Laboratuvarında yaygın olarak üç cins kullanılmaktadır: Dutch Belted, Yeni Zelanda Beyazı ve Flaman Devi (Brewer, 2006).

İlk kontrollü beslenme yapılan tavşanlar Fransa'da manastır duvarları içinde yetiştirilmiştir (Lebas vd., 1997; Lowe, 2010). Bu hayvanlar çeşitliliği, boyutu ve uysallığı sebebiyle meşhur olup insanlar tarafından büyük ilgi görmüştür (Lowe, 2010). Tavşanlar, otlaklarda beslenen herbivorlardan olması ve yemini verimli hale dönüştürmesi bakımından önemli bir performansa sahiptir. Et üretiminde önemli bir özelliği; düşük besin değerine sahip bitki proteinlerini, insanlar için yüksek besin değerine sahip hayvansal proteine çevirebilmeleridir (Lebas vd., 1997). Amerika gibi bazı ülkelerde tavşanlar öncelikli olarak toksikolojik çalışmalar gibi gıda haricindeki

alışmalar için de yetiştirilir (Santos-Filho vd., 2007). Bu türün derisi yüksek kalitededir. El sanatlarında, bisiklet koltuk örtüleri, şapkalar ve giysiler yapmak için bazı ürünlerde kullanılır. Bunun yanında tavşanlar kozmetik endüstrisinde, medikal ve farmakolojik araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır (Dontas vd., 2011). Bu hayvanlar aynı zamanda evcil hayvan olarak ve sergilerde gösteri için de yetiştirilir. Köpekler ve kedilerden sonra dünyanın en popüler üçüncü evcil hayvanı olarak kabul edilir (Brown, 2001; Huerkamp, 2003). Bu hayvanların yetiştirilmesi; çok geniş alan gerektirmemesi, lifli gıdaları tüketmesi ve düşük düzeyde yatırım gerektirmesi bakımından çok avantajlıdır (Carabao ve Piquer, 2003).

1.1.1. Erkek Tavşanların reme Sistemi Anatomisi

Erkek tavşanların üreme sistemi anatomisi; testis (2 adet), epididimis (2 adet), ampulla (2 adet), vas deferens (2 adet), üretra, penis, preputial bezler, vezikül bez, bulboretral ve prostat kompleks bezinden oluşmaktadır. Tavşanlarda, penisin kranio-lateralinde gelişmiş bir skrotum dış cinsel organlarda yaygın olarak görülen bir özelliktir (Campos vd., 2014).

Skrotumu diğerk bölgelere göre daha az tüylüdür ve tunica vaginalis, tunica dartos ve cremaster kasından oluşmuştur. Bu yapının esas fonksiyonu testislerin karın boşluğundan uzak tutulmasını sağlamaktır. Böylece normal spermatogenez için gerekli olan testis sıcaklığı vücut sıcaklığının 0,5-4°C altında tutulur. Skrotum epididimisten gelen boşaltım kanalı (vas deferens) ile inguinal halkadan geçerek karın boşluğu ile bağlantı kurar. Cinsel aktivitenin olmadığı veya stres dönemlerinde testisler inguinal halkadan karın boşluğuna girer ve cremaster kasının hareketiyle tekrar skrotal keseye iner (Campos vd., 2014). Penise kraniyel olarak (Brewer, 2006; Campos vd., 2014), testislerden her biri inguinal çizginin bir tarafına (Resim 1.1), yatay pozisyona daha yakın bir şekilde yerleşmişlerdir (Holtz ve Foote, 1978a).



Resim1.1: Tavşan penisinin ve testisinin yerleşimi (İnt. Kyn. 3).

Testislerin pozisyonu; vücut pozisyonu, vücut ısı, üreme aktivitesi, gastrointestinal sistemdeki organların doluluğu, abdominal yağ miktarı ve stres gibi birçok faktöre bağlıdır (Campos vd., 2014). Doğduklarında testisler karın boşluğundayken pubertase erince skrotuma iner. Vahşi tavşanların testisleri cinsel aktivitenin olmadığı zamanlarda karın boşluğuna döner (Alvariño vd., 2000). Fraser'e (1998) göre, testisin ağırlığı ve görünümü bulunduğu bölgeye bağlıdır. Örneğin, skrotumda tutulan testisler daha ağır, doku bakımından sağlam ve kırmızı renklidir. Karın boşluğunda tutulan testisler hafif, kırmızımsı-kahverengi ve yumuşaktır (Resim 1.2).

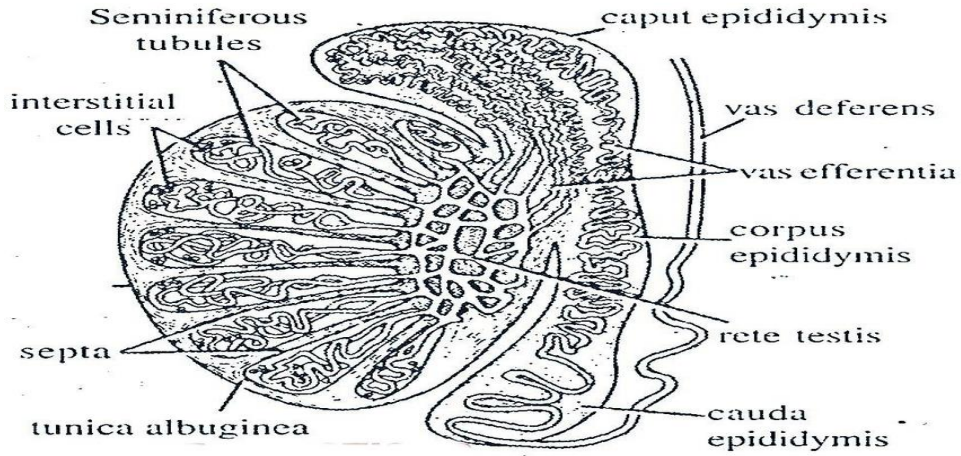
Kriptorşidizm oluşan tavşanlar cinsel dürtülerini koruduğu halde fertilite azalmıştır. Skrotum tam olarak gelişemez. Fakat skrotum gelişmiş ve testisler palpe edilemiyorsa, abdominal boşluk veya inguinal kanala geri çekilmeleri muhtemeldir. Araştırmacılar, diğer türler gibi bazı tavşanlar için de kriptorşidizmin kalıtsal olduğunu düşünmenin mantıklı olduğunu belirtmişlerdir (Campos vd., 2014).



Resim 1.2: Tavşan testisleri karın boşluğunda, skrotal kesenin boşken görünümü. Oklar skrotal bölgeyi göstermektedir (Van Praag, 2015).

Testisin son kısmı olan dorsomedial bölümünde ise, bir dizi efferent tubuller tunica albuginea'ya girer ve kaput epididimisin başlangıç kısmına girer. Epididimisin fonksiyonel kısmı tek bir kanaldan oluşur (Şekil 1.1). Bu da efferent kanallardır. Bunlar; epididimisin başı, gövdesi ve kuyruk kısmı olmak üzere birçok kıvrım yaparak doğrudan vas deferense bağlanır (Holtz ve Foote, 1978a). Bilim insanları, epididimisin kaudal kısmının 'U' şeklinde olduğunu ifade ederler. Epididimis, tavşanlarda spermin akrozom kısmının son şeklini aldığı yerdir (Pérez-Sánchez vd., 1997). Tavşan, yüksek motiliteye sahip olan spermi kauda epididimiste depolayan türlerden biridir (Turner ve Reich, 1985).

Vas deferens, inguinal kanal aracılığıyla epididimisin gövdesine dorsokraniyal uzanır ve karın boşluğuna girer (Holtz ve Foote, 1978a). Vas deferens'in son kısmı üreter etrafında bir halka oluşturur ve bu noktada iğsi hale gelir. Çapın kalınlığı vas deferens'in geri kalanından farklı olmasa da, bu segmente genellikle ampulla (ampulla vas deferens) denir (Campos vd., 2014).

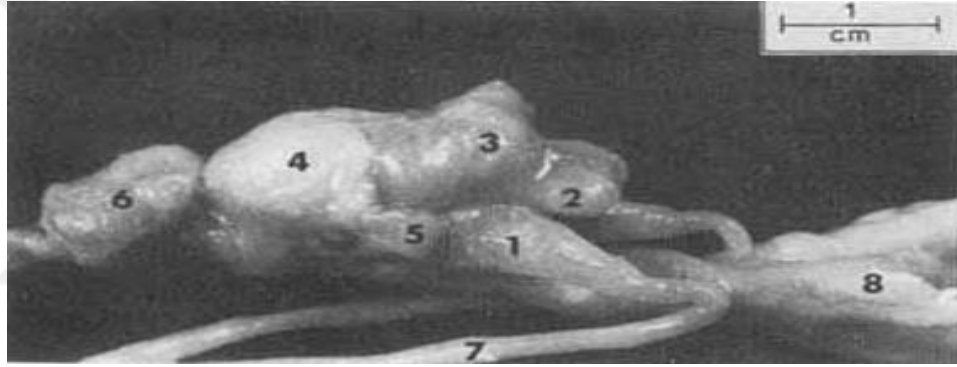


Şekil 1.1: Tavşan testisinin anatomik yapısı (Van Praag, 2015)

Tavşan üreme bezleri, diğer türlerde de olduğu gibi sayı, yer, boyut ve orantı bakımından da farklılık gösterir (Campos vd., 2014). Bu bezler; veziküler bez, bulboüretal bez ve ön prostat, prostat, paraprostat (Şekil 1.2) oluşan kompleks bir bezden oluşmuştur (Holtz ve Foote, 1978a; Campos vd., 2014). Hafez'e (1995) göre, bu bezler salgılarıyla ejakülat hacminin büyük bir kısmına katkıda bulunur. Veziküler bez, prostat kompleks bezi (bir glandular zar ile büyük bir kas kitlesi) ile yan yana duran iki ampulla arasında bulunur. Bu yüzden, vezikül bezi uzunluğu değişkendir ve içindeki sıvı miktarına bağlı olarak bazen geçici olarak genişler. İçindeki sıvı hafif viskozdan jel kıvamına kadar değişkenlik gösterir (Holtz ve Foote, 1978a). Bu bez, tavşanların ejakülat hacminin %45,6'sına katkıda bulunur (Del Niño Jesus vd., 1997). Vezikül bezin kranial duvarı düz kas lifleri içeren tunika muskularis'den oluşmaktadır. Bu musküler yapının lümene bakan yüzeyinde parmak benzeri çıkıntılar mevcuttur. Kaudal kısmının ventral ve dorsal duvarı düzensiz düz kas lifleri bulundurulur. Veziküler bezin kaudal ucuna yakın olan duktus deferens kanalları, ventral duvarın içinden bu bezin lümenine girerek iki küçük papilla oluşturur (Holtz ve Foote, 1978a).

Bazı araştırmacılar tavşan prostat kompleksinin seminal bez, veziküler bez ve prostat bezinden oluşarak üretra ve idrar kesesinin dorsal yan kenarında olduğunu bildirmişlerdir (Seki ve Suzuki, 1989). Diğer araştırmacılar, prostat kompleksin;

vezikül bez, koagülasyon bezi, prostatın dorsal ventral lobu ve bulboüretal bezlerinden oluştuğunu söylemektedir (Cockle vd., 1989). Bununla birlikte, terimleri standartlaştırmak ve anlayışı kolaylaştırmak için bu çalışma; Holtz ve Foote (1978a) tarafından önerilen, Dimitrov ve Stamatova (2011) tarafından da kabul edilen terminolojiyi benimsemiştir. Kullanılan isimler embriyolojik kökene ve bezlerin morfolojisine göre kabul edilmiştir. Bu araştırmacılar, prostat kompleksinin üç lobdan oluştuğunu kabul eder: ön prostat, prostat ve paraprostat (iki adet). Tavşan prostat bezinin farklı elementlerinin anatomik, histolojik ve immünohistokimyasal çeşitlilik göstermesi önemlidir ve bezin her bölümünün üremede özel bir rol oynadığını düşündürür (Dimitrov, 2010).



Şekil 1.2: Tavşanlarda erkek eklenti bezleri (Holtz ve Foote, 1978a). 1. Ampulla, 2. Veziküler bez, 3. Proprostat, 4. Prostat, 5. Paraprostat, 6. Bulboüretal bez, 7. Duktus deferens, 8. Vesica urinaria.

Proprostat, dağınık düz kas liflerine sahip bir bağ dokusu kapsülü ile çevrilmiş bileşik asiner bezdir. Ön prostat bezinde biriken beyaz granüler sekresyonun birikimi beyazımsı bir görünüm verir ve bölümlerini makroskopik olarak görünür hale getirir (Holtz ve Foote, 1978a).

Prostat, veziküler bezin kaudalinde (Resim 1.3) ve son kısmı bulboüretal bezlere kranial olarak yerleşmiştir (Campos vd., 2014). Ayrı bir kanal sistemine sahip bir salgı bezidir (Holtz ve Foote, 1978a). Prostat bezi, sarımsı beyaz renklidir. Ön prostat ve bulboüretal bezleri arasında bulunur (Campos vd., 2014). Ön prostatla

aynı bağ dokusu kapsülünü paylaşır ve sadece bir küçük doku tabakası bu iki bezi ayırır. Proprstatın kapsülü ve trabekülü düz kas yapısındayken, prostatta bu yapılar elastik bağ dokudan oluşmuştur. Epitel hücreleri uzun ve çekirdekleri yuvarlak ya da basık bir biçimde bulunur. Sitoplazma, mukoproteinler ve lipomusinlerden oluşan çok fazla sayıda eozinofilik granüller ile doludur. Bu granüller glandüler lümene salınmaktadır. Prostatın karakteristik bir özelliği, farklı boyutlarda asidofilik hücrelere sahiptir ve bu hücrelerin sayısı tavşan yaşlandıkça artar (Holtz ve Foote, 1978a).



Resim 1.3: Erkek tavşanda aksesuar bezlerin anatomik görünümü. p: prostat, gv: glandular vezikül, vu: vesica urinaria (Dimitrov vd., 2013).

Paraprostat bezleri küçüktür ve prostatın her iki yanında yer aldıkları için bu şekilde adlandırılmıştır. Başka bir deyişle, ön prostatın sağ ve sol kenarlarına ve ventraline yerleşmişlerdir (Dimitrov ve Stamatova, 2011). Düzensiz, kabarık bir yüzeye sahiptirler ve çekiç şeklindedirler (Campos vd., 2014).

Tavşanın bulboüretal bezi kapsülle çevrili küçük bir salgı bezidir. Büyük bir kısmı lobülleri ayıran bulboglandular iskelet kasıyla kaplanmıştır. Bu bez, diğer türlerden farklı olarak üretra duvarından köken alır. Tavşanda oldukça küçüktür, ancak insana göre daha büyüktür (Campos vd., 2014).

Tavşan penisinde glans penis bulunmaz (Brewer, 2006) ancak penisin gövdesi silindirik, 40-50 mm uzunluğundadır ve çapı son kısmına doğru daralır.

Çiftleştikten sonra dinlenirken anüsün ventralinde (Brewer, 2006) ve testislerin kaudalinde bulunan preputiuma çekilir (Campos vd., 2014). Tavşan preputial bezleri hissedilemez ve preputial orifis etrafındaki dermise gömülüdür. Bu bezlerin fazla sayıdaki yağ bezlerinin olduğuna inanılmaktadır (Holtz ve Foote, 1978a).

1.1.2. Cinsel Gelişim, Puberta ve Cinsel Olgunluk

Tavşanlar hızlı üreme yetenekleriyle bilinir. Pubertaya 4-6 ay arasında erişirler. Küçük ırklar büyük ırklara göre daha erken cinsel olgunluğa ulaşırlar. Tavşanlarda cinsel olgunluk yaşı; ırk, cins, beslenme ve çevresel faktörlere (fotoperyot, sıcaklık ve mevsim vb.) göre değişir (Campos vd., 2014).

Tavşanlarda epididimisin sterosiliyasında ve bulboüretal bezlerinde özel olarak yerleşmiş bir protein üretildiği düşünülmektedir. Düşük affiniteli nörotropin reseptörü (p75NTR) olan bu protein erkek tavşanlarda cinsel gelişim sırasında fizyolojik olaylara katkısı olduğu tahmin edilmektedir (Sanchez-Rodriguez vd., 2018). β -NGF ve yüksek affiniteli reseptörü TrkA, cinsel olgunlaşma sırasında erkek tavşan kanalında; prostat, bulboüretal bezler ve epididimisinde bulunur. β -NGF, endokrin yoluyla TrkA reseptörleri ile etkileşime girerek erkek tavşan üreme sisteminin gelişmesinde rol oynayabilir (Sanchez-Rodriguez vd., 2019).

Erkek üreme organlarının farklılaşması fetal yaşamda gerçekleşir. Albuginea oluşumu gebeliğin 14-15. günleri arasında gerçekleşir. Birkaç gün sonra, seminifer tübüllerin germinal hücrelerle çevrili olduğu görülmektedir. Androjen üretimi gebeliğin 19. gününde başlar. Plazma testosteron/dihidrotestosteron oranı doğumda $1,7 \pm 0,4$ ng/ml, yaşı ilerlemesi ile birlikte erişkin erkeklerde $2,6 \pm 0,7$ ng/ml civarına kadar artar (Alvariño vd., 2000). Testosteron, Müllerian kanallarının gerilemesine neden olur. Müllerian kanalları 20. günde geriler ve 21. günde prostat oluşumu başlar. Wolf kanallarının gelişimi 24. günde tamamlanır. (Alvariño vd., 2000).

Testosteron her zaman baskın hormon olarak bilinir. Bununla birlikte, erişkinlerin dolaşımındaki rete testis sıvısında baskın hormonlar testosteron, dehidroepiandrosteron ve dihidrotestosterondur. Bu hormonlar erkek tavşan üreme sisteminin farklılaşmasında tamamlayıcı bir rol oynar (Lau ve Saksena, 1979). Diğer memeli türlerinde ise Sertoli hücreleri tarafından salgılanan bir glukoprotein

tanımlanmıştır. Bu madde, fetal ovidukt, uterus ve vajinanın regresyonuna neden olan bir Müllerian inhibitör faktörüdür (Alvariño vd., 2000).

Testisin gelişimi hipofiz bezinin kontrolündedir. Sertoli hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması gonadotropinlere bağımlıdır. Hipofizektomi sonrasında testisin ağırlığı ve sertoli hücrelerinin sayısı azalmıştır. LH enjeksiyonu ile bu durum normale getirilebilir (Alvariño vd., 2000). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada, kan-testis bariyerinin doğumdan sonra 9-10. haftalar arasında tamamen olgunlaştığı ve 10. haftada fonksiyonel etkisini gösterdiği bildirilmiştir (Sun ve Gondos, 1986). FSH, LH ile sinerjistik bir etkiye sahiptir. Gonositlerin mitotik aktivitesi, hipofizden bağımsızdır ancak spermatogonyumda farklılaşma, spermatogenetik aktiviteye yol açan primer spermilerin oluşması gonadotropinler tarafından kontrol edilmektedir (Byskov, 1986).

Doğum ile 40. gün arasında plazma testosteron ve FSH düzeyleri bazal konsantrasyonlara ulaşır. LH, 20.günden itibaren azalmaya başlar (Berger vd., 1982). Prepubertal evre, 40. gün civarında Leydig hücrelerinin görünmesiyle birlikte FSH ve testosteron konsantrasyonlarının belirgin artışıyla başlar. Bu evrede LH seviyesinde az miktarda artış gözlemlenir. Spermatogenez, Sertoli hücreleri tarafından spesifik bir androjen bağlayıcı proteinin (ABP) salgılanmasına neden olan FSH tarafından uyarılır (Setchell, 1991).

Macari ve Machado'ya (1978) göre, tavşanlarda ergenlik, ejakülat içinde sperm bulunmasından daha önce gerçekleşir. Çünkü ergenlik ve cinsel olgunluk farklı evrelerdir. Testisin büyümesi 8. aya kadar devam eder. Bu periyotta vezikül bezi ve aksesuar bezlerinde hızlı bir şekilde geliştiği gözlemlenmiştir (Alvariño vd., 2000). Skinner (1967), tavşan doğduktan 63 gün sonra testislerinin skrotuma indiğini söylemiştir. Diğer çalışmalar, tavşanın 4 ayda pubertaya ulaşmasına rağmen, testislerin henüz skrotumda olmadığını, sadece 6 aylıkken skrotuma indiğini göstermiştir (Fraser, 1988). Yapılan çalışmalar, bu türün 18 haftalıkken cinsel olgunluğa ulaştığını ortaya koymuştur (Chubb vd., 1978; Frame vd., 1994).

Yeni Zelanda tavşanlarının 129. günde pubertaya eriştiği bilinmektedir (Macedo ve Miguel, 1986). Bununla birlikte, cinsel olgunluk; 32 haftalık Yeni Zelanda Beyaz

tavşanlarında günlük spermatozoon üretiminin bazal seviyeye geldiği zaman olarak tanımlanmaktadır (Amann ve Lambiase, 1967; Lebas vd., 1997).

Prostat ve seminal bezden 6. haftada fruktoz salgısı artar. Aksesuar bezlerinin salgılayıcı aktivitesi, sperm konsantrasyonunun azaldığı 1 yaşına kadar devam eder (Alvariño vd., 2000). Skinner (1967) için, testisler androjenik olarak aktif hale geldiğinde ve aksesuar bezleri fruktoz ve sitrik asit üretmeye başladığında tavşanlar ergendir ve hayvan karakteristik olarak erkek davranışını üstlenir. İlk çiftleşme davranışları 60-70.günlerde başlar. İlk çiftleşmeyi ise 100. gün civarında yapar (Macedo ve Miguel, 1986). Bu bağlamda, tavşanlarda, sperm ergenliğin sonuna doğru bulunmaya başlar (Campos vd., 2014).

1.1.3. Spermatogenezis

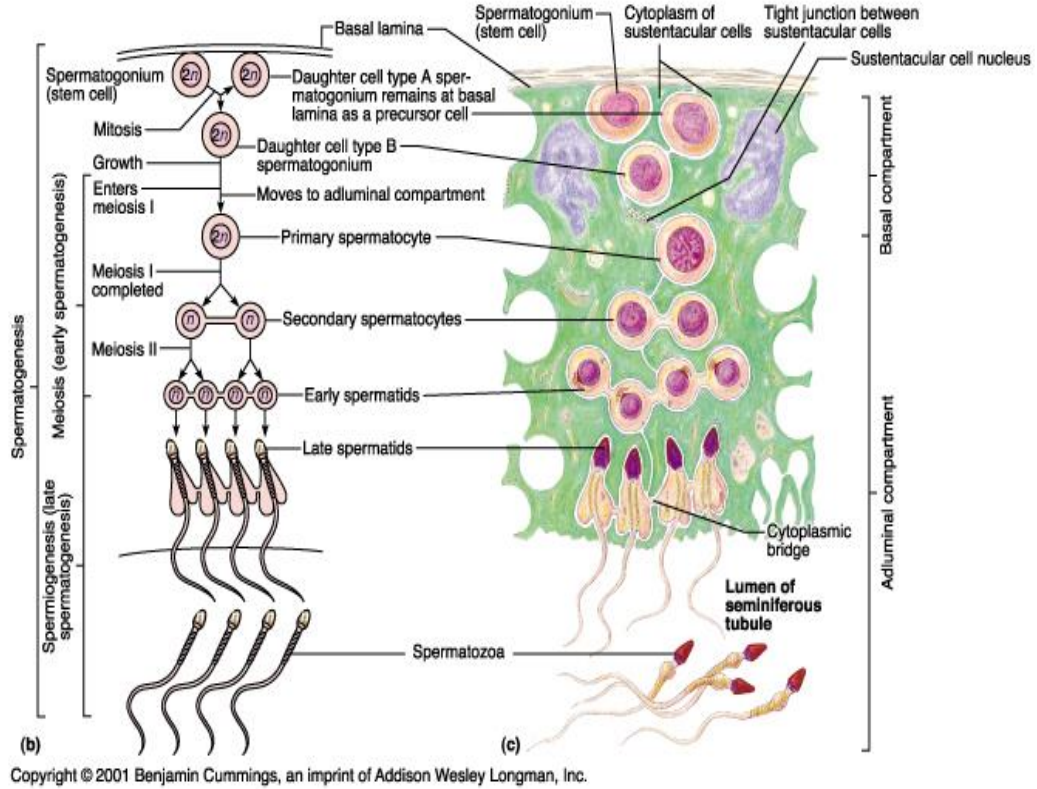
Spermatogenezis 42 ila 63 gün arasında başlar, ilk sperm 60. gün civarında üretilir (Alvariño vd., 2000). Ancak sperm ejakülat içerisinde 119. günden önce ortaya çıkmaz (Skinner, 1967). Lakabi ve diğerleri (2016) ise ilk spermlerin 20. haftada görüldüğünü belirtmiştir. Seminifer tübüllerin hepsi ortalama 84. günde aktiftir (Alvariño vd., 2000). Spermatogenezin, skrotumun düşük sıcaklığına bağlı bir süreç olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, skrotuminkinden daha yüksek sıcaklıklar (örneğin karın sıcaklığı) spermatogenezi engelleyebilir (Kong vd., 2000).

Spermatogenezis, germinal epitel hücresinin (kök hücre) farklılaşarak spermatozoona dönüşmesine kadar geçen tüm aşamaları kapsar ve iki farklı bölüme ayrılır: 1) spermatositogenezis ve 2) spermiyogenezis. Spermatositogenezis bir bölünme fazı olup spermatogonyal hücreler bir seri mitoz bölünme geçirerek çoğalırlar ve bu fazın sonunda mayoz bölünme geçirerek haploid (n) sayıda kromozom içerirler (Reece, 2009).

Kök hücreler (spermatogonyum) seminifer tübüllerin bazal bölümünde yer alırlar. İlk mitoz bölünmesiyle oluşan iki hücreden biri spermatogonyum olarak kalır ve spermatogonyumların sürekliliğini sağlar. Diğeri ise tip A spermatogonyum halini alarak sertoli hücre bariyerinden adluminal bölgeye ilerler. Tip A spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirerek (bazen birkaç jenerasyon) çok sayıda tip B spermatogonyumları oluşturur. Tip B spermatogonyumlar da son mitoz

bölünmeleri geçirerek $2n$ kromozomlu primer spermatositleri oluşturur (Şekil 1.3). Primer spermatositler ise mayoz bölünme geçirerek sekonder spermatositlere, sekonder spermatositler de ikinci mayoz bölünme sonunda n kromozom sayısında spermatidlere dönüşürler (Reece, 2009).

Spermatogenezisin ikinci aşaması olan spermiyogenezis adluminal bölmede bulunan spermatidlerin olgunlaşma aşamasını içerir. Spermiyogenezis sırasında çekirdekte ve sitoplazmada meydana gelen değişiklikler neticesinde hareket kabiliyetini sağlayan flagellum (kuyruk) oluşur. Spermiyogenezisin son aşamasında üretilen olgun spermatidler seminifer tübülün lümenine spermatozoon olarak bırakılır. Bu olaya spermiyasyon denir (Reece, 2009).



Şekil 1.3: Spermatogenezisde mitoz ve mayoz bölünme (Cummings, 2001).

Swierstra ve Foote (1963), spermatid çekirdeğinin şeklini, spermatidlerin ve spermatozoonun bazal membran ile ilişkili yeri, mayotik şekillerin mevcudiyeti ve

lümende salgılanan spermatozoon ölçütlerini kullanarak tavşanların seminifer epitel siklusunun sekiz evreye bölündüğünü söylemiştir. Araştırmacılar ayrıca, tavşanlarda spermatogenez sırasında spermatojenik hücrelerde önemli bir kayıp olduğunu bildirmişlerdir. Teorilere göre beklenenden %20 daha az spermatid vardır. Morton (1988), Zhang ve diğerleri (2002)'de daha az sayıda spermatid gözlemlemiştir. Swierstra ve Foote (1963) bu kaybın çoğunun iki olgunlaşma evresinde ve hemen sonrasında meydana geldiğini bildirmiştir. Bununla birlikte, son çalışmalar epididimide yuvarlak spermatidlerin (farklılaşmış spermatidler) varlığını göstermiştir. Başka bir deyişle spermatidler olgunlaşmadan önce testisleri terk etmişlerdir (Zhang vd., 2002). Araştırmacılar ayrıca hayvanın yaşı ve mevsimin değişikliğiyle, ergenlikten sonra veya spermatogenezin aktif bir şekilde başladığında spermatidlerin sayısının azaldığını öne sürmektedir (Zhang vd., 2002).

Tavşanlarda, çok çekirdekli spermatidler sıklıkla bulunur. Fokal tübüler hipospermatogenez, spermatositlerin şişmesi ve sertoli hücrelerinde sitoplazmik vakuoller yaygın olarak tavşan testislerinde görülür. Bu değişiklikler toksik lezyonlarla karıştırılabilir. Bu oran stres veya çevresel değişiklikler ile artabilir (Barakat, 2007). Çok çekirdekli spermatidler, küre şeklinde ve 2-4 adet küçük, yuvarlak, yoğun kromatinli piknotik çekirdeğe sahip olduklarından kolayca tanınırlar (Tsunenari ve Kast, 1992).

Tavşanlarda tahmin edilen toplam spermatogenez süresi, spermatogenezin başlangıcı olarak seçilen güne bağlıdır. Spermatogenezin, primer spermlerin üretiminin başlangıcı olan spermatogonyum ile başladığına karar verilirse, yaklaşık olarak 4 seminifer epitel siklusu ($4 \times 10,9 = 43,6$ gün) geçirmesi gereklidir. Bununla birlikte, spermatogenezin, spermatogonyum kök hücrelerinin oluşması ile başladığı ve bu kök hücrelerin ömrünün bir seminifer epitel siklusu olduğu, ardından spermatogenezin yaklaşık 4,75 siklus ve 51,8 güne uzadığı varsayılmaktadır (Swierstra ve Foote, 1965). Morton (1988), bir siklusun 10,8 gün sürdüğünü, Swierstra ve Foote (1963) tarafından önerildiği gibi 10,9 gün olmadığını ve bu türdeki spermatogenezin yaklaşık 48 gün sürdüğünü belirtmiştir.

Yeni oluşan spermatozoon hareketsizdir. Seminifer tübüllerden ve rete testisten salgılanan sıvılar ve testisin kasılabilir yapıları sayesinde kaput epididimise

aktarırlar (Reece, 2009). Testislerden kaput epididimisin proksimal kısmına spermatozoon geçerken anormal boyun kısımlarının ve çoklu defektlerin azaldığı görülmüştür (Pérez-Sánchez vd., 1997). Spermatozoon asıl fertilizasyon yeteneğini epididimis içerisinde ilerlerken kazanır. Yine burada motilitede, çekirdek kromatininde değişim ve plazma membran yüzeyinde değişiklikler meydana gelir (Reece, 2009). Spermatozoon, kaput epididimisin proksimalinden distal bölgesine geçerken sitoplazmik damlacıkla karakterize edilir (Pérez-Sánchez vd., 1997). Son olarak oluşan spermatozoonlar kauda epididimide depo edilir (Reece, 2009).

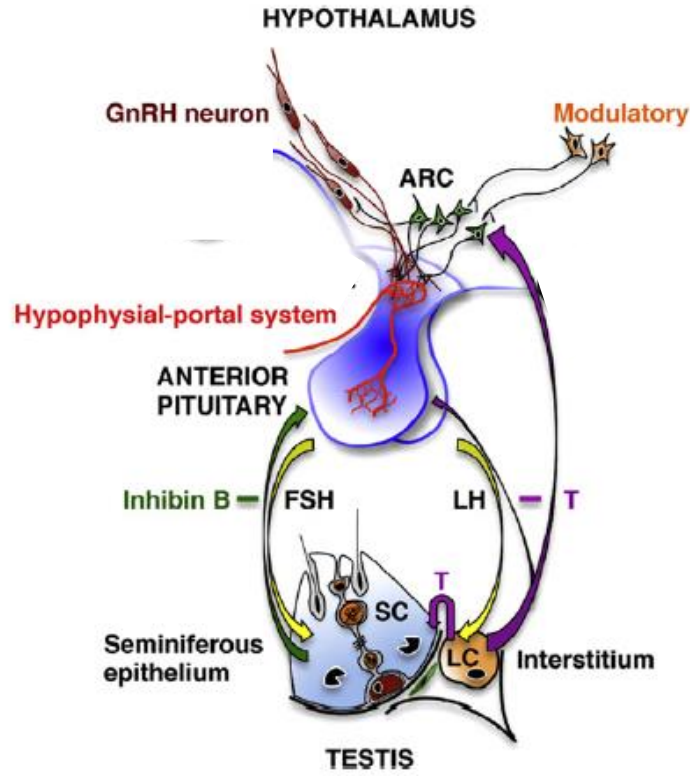
1.1.4. Spermatogenezisin Hormonal Kontrolü

Testis, tavşanlarda ana testosteron kaynağıdır (Castro vd., 2002). Aynı zamanda cinsel olgunlaşma sırasında androjen üretim kaynağıdır (Chubb vd., 1978). Temel işlevleri normal spermatogenezin sürdürülmesi olsa da, başlangıç seviyesinden daha yüksek serum testosteron düzeyleri spermatogenezin etkinliğini etkilemiyor gibi görünmektedir (Castro vd., 2002).

Testislerde hormon üretiminden Leydig ve Sertoli hücreleri sorumludur. Leydig hücrelerinden testosteron üretimi gonadotropik bir hormon olan lüteinleştirici hormon (LH- bazen interstisyel hücre uyarıcı hormon veya ICSH olarak da adlandırılır) tarafından kontrol edilir. Testosteron plazma konsantrasyonlarındaki düşüş, ön hipofizden LH salınmasına neden olur. LH kan seviyelerinde artar ve Leydig hücrelerinden testosteron salınımını uyarır. Testosteron seviyesinin artması ön hipofizden LH salınımını baskılar. Böylece testosteronun belirli bir düzeyde kalması sağlanır. Testosteron seviyelerinin tekrar düşmesi LH sekresyonunun artışına sebep olur (Şekil 1.4). Bu döngüye negatif geri bildirim mekanizması denir (Reece, 2009). Testosteronun spermatogenezisi uyarabilmesi için interstisyel hücrelerden geçerek seminifer tübüllere ulaşması gerekir. Testosteronun burada mayoz bölünmeleri desteklediği düşünülmektedir (Reece, 2009).

Ön hipofizden salgılanan başka bir gonadatropik hormon olan folikül uyarıcı hormon (FSH), sertoli hücrelerinde androjen bağlayıcı protein (ABP) yapımını uyarır. Bu protein seminifer tübüllerin lümenine salgılanır ve testosteron ile birlikte diğer androjenlere bağlanarak spermatogenez için bu hormonların konsantrasyonlarını sabitler. FSH'nin ayrıca sertoli hücrelerinden östrojen salınımını artırdığı

düşünülmektedir. Testosteron sertoli hücreleri içerisinde östrojene dönüşerek östrojen seviyesini artırabilir. Sertoli hücreleri ayrıca ön hipofizden FSH salınımını durduran inhibin hormonunun da kaynağıdır (Reece, 2009).



Şekil 1.4: Hormonal kontrol. ARC: arcuate nucleus, SC: sertoli hücresi, LC: leydig hücresi, T: testosteron, FSH: Folikül stimüle edici hormon, LH: Lüteinleştirici hormon (Plant, 2016).

LH spermatogenezisin devamı için sürekli olarak gerekli iken, FSH spermatogenezisi bir kez başlattıktan sonra gerekli değildir (Reece, 2009). Doğumdan sonra 6. hafta civarında kandaki FSH ve LH konsantrasyonlarında, testosteron salgısının başlangıcından ve ergenliğin görülmesinden önce hızlı bir artışı vardır (Chubb vd., 1978). Tavşanların ergenliği sırasında, FSH ve androjen arasındaki bu ilişkinin FSH'nın steroidogenezis üstünde düzenleyici bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Campos vd., 2014).

1.1.5. Sperm Üretimi

Testisler, 6 aylık olana kadar büyümeye devam eder ve sperm üretimini artırır (Morton, 1988). Spermatozoon, yaklaşık 15 haftalıkken kauda epididimisinde bulunabilir (Chubb vd., 1978). Araştırmacılar ayrıca günlük spermatozoon üretiminin 15 haftalıktan 52 haftalığa kadar giderek arttığını belirtmişlerdir. Diğer çalışmalar gonadal rezervin, testis ağırlığı (Orgebin-Crist, 1968) ve tavşanın vücudu ile pozitif ilişkili olduğunu bildirmiştir (Ewuola ve Egbunike, 2010). Fakat sürekli olarak 14 saatlik bir ışık periyoduna maruz kalmaları gonadal rezervleri olumsuz yönde etkilemektedir (Orgebin-Crist, 1968). Araştırmacıya göre, normal şartlarda ortalama verim $147,4 \times 10^6$ spermatozoon/gün ve 1 g testis $26,5 \times 10^6$ spermatozoon/gün üretmektedir. Günlük testiste üretilen spermatozoon sayısı ejakülat içerisindeki spermatozoon sayısından daha yüksektir. Bu da üretilen spermatozoonların yaklaşık % 50'sinin tekrar emildiğini gösterir (Holtz ve Foote, 1972).

Semen kalitesi genellikle tavşanlarda 2 yaşından sonra azalmaya başlar (Boiti vd., 2005). Sıcaklık stresinin artmasıyla testosteron konsantrasyonu, spermatogenez, cinsel istek, ejakülat hacmi, motilite, sperm konsantrasyonu ve ejakülatındaki toplam spermatozoon sayısı düşerken, sperm anormallikleri ve ölü sperm oranı aynı faktöre maruz kalma ile artar (Marai vd., 2002). Tavşan spermi, kışın yaza göre daha yüksek metabolik aktivite göstermektedir (Sabés-Alsina vd., 2016).

Farklı çalışmalarda Günlük spermatozoon üretimi farklı olarak gözlemlenmiştir: $148 \pm 11 \times 10^6$ spermatozoon/gün (Amann ve Lambiase, 1967), 187×10^6 spermatozoon/gün (Holtz ve Foote, 1972) ve 210×10^6 spermatozoon/gün (Amann ve Lambiase, 1969). Sperm toplama ritminin günlük spermatozoon üretimini etkilememesi dikkat çekicidir (Amann, 1966). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, bu türlerde, spermatozoon rezervinin sol testiste ve sol epididimisinde sağdakinden daha az olduğunu göstermiştir (Ewuola ve Egbunike, 2010).

1.1.6. Semen Özellikleri

Semen; farklı aksesuar bezlerin, epididimisten salgılanan seminal plazmanın ve testislerde üretilen spermatozoonların ejakülasyon sırasındaki karışımıdır (El-Azim ve El-kamash, 2011). Ejakülasyonla semen toplanırken suni vajen içerisine katılan sıvının sıcaklığı 45°C civarında olmalıdır (Boiti vd., 2005). Ayrıca semen

toplanmasından hemen sonra ölçülen pH 6,8-8,4 arasındadır (Alvariño vd., 2000). Bununla birlikte, tavşan semeni iki ana parçadan; sıvı ve jelatinli kısımdan oluşur (Mukherjee vd., 1951).

1.1.6.1. Jel Kitlesi

Tavşan semenindeki jelatinimsi kısım vezikül bezinden kaynaklanır (Holtz ve Foote, 1978a; Del Niño Jesus vd., 1997) ve androjene bağımlıdır (Parsons, 1950; Bell ve Mitchell, 1984). Önemli miktarda östrojenik maddeler ve sitrik asit ve az miktarda fruktozdan oluşur (Parsons, 1950; Mukherjee vd., 1951; Holtz ve Foote, 1978b). İki günlük semen depolayan hayvanlarda jelatinimsi kütle ilk ejakülatların % 75,4'ünde, ikinci ejakülatın ise sadece % 4,8'inde bulunur (Amann, 1966; Amann ve Lambiase, 1967; Holtz ve Foote, 1978b). Çok sayıda spermatozoon tutulur ve jelatinimsi kütle seminal inaktiftir. Ancak tuzlu su çözeltisinde seyreltikten ve 37 °C'de inkübe edildikten sonra jelatinimsi kütle, sırayla çok aktif hale gelen spermatozoonu serbest bırakır (Mukherjee vd., 1951). Bunun, boşalma sırasında iki semen bileşeninin sıvı halde olmasından dolayı olduğuna inanılmaktadır (Mukherjee vd., 1951). Daha sonra yapılan çalışmalar, vezikül bezinde bulunan sıvının kıvamının hafif viskoziteden jelleşmeye kadar değiştiğini göstermiştir (Holtz ve Foote, 1978a). Tavşan semeninde jel miktarı fazla olsa da, kemirgenlerde jel kitlesinin retrograd spermatozoon kaybını önlemekten başka hiçbir işlevi bulunmamıştır (Campos vd., 2014). Mukherjee ve diğerleri (1951), ejakülasyondan sonra jelin pıhtılaşarak vajinal lümeni bir tampon olarak doldurduğunu belirtmiştir. Boiti ve diğerleri (2005) tavşan semenini topladıktan hemen sonra ve değerlendirmeden önce jelin çıkartılmasını önermektedir.

1.1.6.2. Seminal Plazma

Spermin sıvı kısmıdır. Tavşanlarda sperm canlılığını ve motilitesini olumlu yönde etkiler (Castellini vd., 2000, Hagen vd., 2010). Seminal plazma, çizelge 1.1'de gösterildiği gibi sperm metabolizması için önemli olan karbonhidratlar, lipidler, proteinler ve mineraller gibi bileşenleri içerir (Holtz ve Foote, 1978b; Müller ve Kirchner, 1978, Castellini vd., 2006b; Zaniboni vd., 2004). Fruktoz ve glikoz, sperm hücresi metabolizması için substratların yanı sıra semende ana enerji kaynaklarıdır (Mann ve Parsons, 1947). Fruktoz ve testosteron konsantrasyonu ilkbahara göre yazın daha yüksek çıkmıştır (Okab, 2007). Böylece, seminal plazmada fruktoz

konsantrasyonu testosteron aktivitesini ve semen kalitesini yansıtır (Mann ve Parsons, 1947; Okab, 2007). Bununla birlikte, tavşan semenindeki karbonhidrat konsantrasyonu ruminantlarda bulunan miktarın çok altındadır (Anand, 1973; Mendoza vd., 1989; Roca vd., 1993).

Çizelge 1.1: Tavşanlarda seminal plazmada bulunan karbonhidratlar, protein ve minerallerin kompozisyonu (Alvariño vd., 2000).

Parametre	Konsantrasyon
Fruktoz (mg/ 100 ml)	40 – 150
Sorbitol (mg/100ml)	80
Sitrik asit (mg/ 100 ml)	70 – 200
Protein (mg/ 100 ml)	4 – 15
Gliserilfosforilkolin (mg)	215 – 370*
Sodyum (mmol/l)	80 – 140
Potasyum (mmol/l)	23 – 120
Fosfor (mmol/l)	1 – 3
Magnezyum (mmol/l)	2 – 4
Kalsiyum (mmol/l)	2 – 8

*Semendeki toplam miktarı

Tavşan seminal plazması, Na, K, Ca, Mg, Se ve Zn (Holtz ve Foote, 1978b; Castellini vd., 2007) ve Cu, Fe, Mn, Cd, Pb ve Ni (Lukáč vd., 2009) gibi bazı eser elementleri içerir. Na ve K birbirine yakın konsantrasyonlarda bulunmuştur ancak belirtilen mineral konsantrasyonları diğer türlerde bulunanlardan çok daha azdır (Blackshaw ve Salisbury, 1957; Holtz ve Foote, 1978b). Bu nedenle semen ozmotik basıncının korunmasında çok etkileri yoktur. Organik bileşenlerin ozmotik basıncın korunmasında esas etkiyi yaptığı kabul edilmektedir (Holtz ve Foote, 1978b). Seminal Na, seminal vezikül bezinin çıkarılması durumunda önemli ölçüde azalır

(Del Niño Jesus vd., 1997). Oliveira ve diğerleri (2004), çinkonun üreme diyetine dahil edilmesinin spermatozoon miktarını etkileyebileceğini bildirmiştir.

Tavşan seminal plazması tam olarak bilinmeyen, farklı roller oynayan, farklı miktarlarda üretilen birkaç damla vezikül (prostat salgı granüllerinden) salgısı içerir (Castellini vd., 2006a). Mourvaki ve diğerleri (2010), prostat salgılayıcı granüllerin, spermlerin endojen alfa-tokoferol ile beslenmesi yoluyla, spermlerin spermatozoon için *in-vitro* oksidatif strese karşı korunma kaynağı olabileceğini öne sürmüşlerdir.

1.1.6.3. Sperm Motilitesi

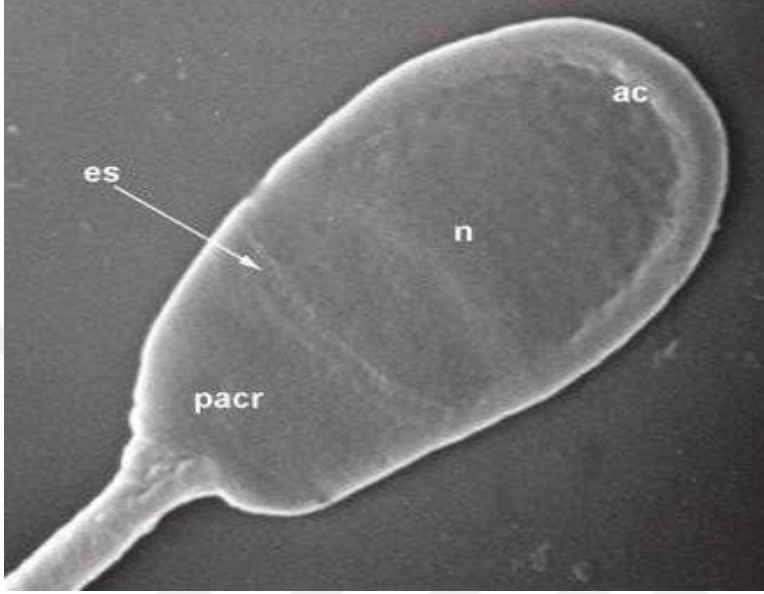
Motilite, tüm hayvanlar aleminde spermlerin ortak bir özelliğidir ve düz bir çizgide sabit hareket eden spermlerin yüzdesini belirtir (Chrenek vd., 2007). Ayrıca, vücut içinde fertilizasyon olan türler için, spermlerin üreme yollarına ve oosit penetrasyonunda taşınması için hareketlilik önemlidir (Holt ve Van Look, 2004). Hareketliliğin tespiti için, semen süspansiyonu lam üzerine damlatılmalı ve lamel ile kapatıldıktan sonra mikroskop altında incelenmelidir (Emmens, 1947; Boiti vd., 2005). Motilite ve sperm morfolojisinin değerlendirilmesi en yaygın kullanılan laboratuvar testleridir (Lavara vd., 2008a). Bu özellikler potansiyel spermatozoon fertilitesi hakkında bilgi verir. Çünkü motilite ile seminal parametreler arasında bazı ilişkiler vardır. Bu durum tavşanların sperm kalitesi ile morfometrik parametreler arasındaki ilişkiyi gösterir (Hagen vd., 2010; Lavara vd., 2008b). Roca ve diğerleri (2000), 0-5 rastgele bir ölçek kullanarak (0, 1, 2, 3, 4 veya 5, D 0-10, 10-25, 25-50, 50-70, 70-90 90-100 %) spermatozoonların motilitesini değerlendirmiştir. Ejakülattaki sperm hücrelerinin % 50'sinin motiliteye sahip olduğu yaş 117. gündür (Bell ve Mitchell, 1984).

1.1.6.4. Spermatozoon Morfolojisi

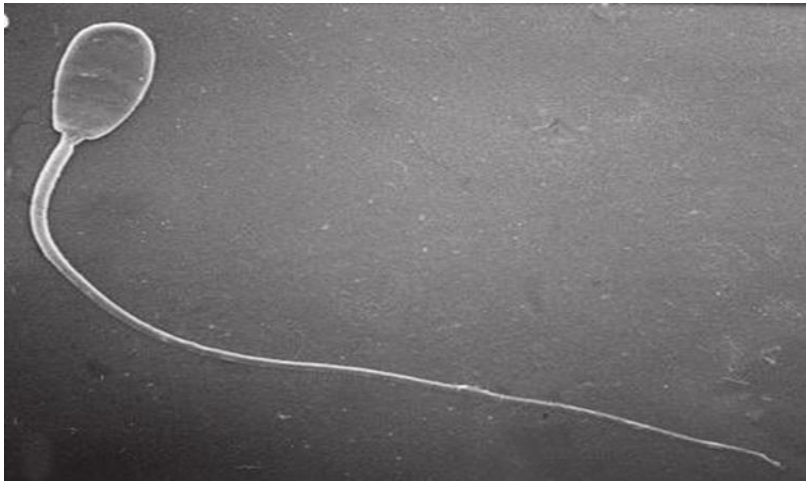
Tavşanlarda semenin özellikleri, özellikle morfolojik olarak orta ila yüksek kalıtım dereceleri gösterir (Lavara vd., 2008c). Farklı boyama teknikleri kullanılarak optik mikroskopi prosedürleri değerlendirilebilir (Boiti vd., 2005).

Tavşan sperminin morfometrik ölçümleri: Toplam uzunluğu 46-55 µm arasındadır (Cummins ve Woodall, 1985; Eddy, 2006). Baş uzunluğu 7,8-8,6 µm arasındadır (Campos vd., 2014). Orta parça yaklaşık 41 sıra ile düzenlenmiş mitokondriyle

uzunluğu 8,5 μm 'dir (Eddy, 2006). Gövde kısmı yaklaşık 38 μm uzunluğundadır (Cummins ve Woodall, 1985). Kafa bir spatula şeklindedir ve akrozom çekirdeğin dışına taşmaz. Aynı zamanda küçük bir ekvatorial segmente sahiptir (Phillips, 1977; Eddy, 2006), (Resim 1.4).



Resim 1.4: Tavşan sperminin başının SEM görünümü: ac-akrozom, n-çekirdek, es-ekvatorial segment, pacr- post akrozomal bölge. 10,000 x (Boiti, 2005).



Resim1.5: Tavşan sperminin 2.600'lk bir SEM görüntüsü(Boiti, 2005).

Kuzminsky ve diğeri(1996), tavşan semeninin çeşitli anormallikleri için resimli bir model geliştirmiştir. Kantitatif optik mikroskopi (x400) ile gözlemlenen ortalama değerler; toplam anormallik %18,2, baş anomalileri %2,9, kuyruk anormallikleri %13,6 ve %1,7 kırık spermiler olarak belirtilmiştir. Araştırmacılar, semen analizi sürecini hızlandırmak için sadece kıvrımlı kuyrukları saymayı önermişlerdir. Çünkü bunlar kuyruktaki anormallikleri en fazla temsil edenlerdir. Düşük büyütme altında bile olsa, optik bir mikroskop altında kolayca gözlenirler. Ayrıca kabul edilebilir bir ejakülat için kıvrımlı kuyruklu spermilerin konsantrasyonunun gözlenen 200 hücrenin %17-18'ini geçmemesi gerektiğini bildirmişlerdir. Tavşan spermatozoonlarının yüksek ortam sıcaklıklarına karşı çok hassas olduklarını ve anormal spermatozoonun hayvanın uğradığı bir ısı stresi durumunu gösterebileceğini belirtmek önemlidir (Finzi vd., 1994). Araştırmacılar ayrıca bu durumun, kıvrımlı kuyruklu spermilerin sayısındaki artışla kolayca gözlenebileceğini iddia etmişlerdir, çünkü bu anormallik, toplam morfolojik anormalliklerin %80'i ile ilişkilidir (Campos vd., 2014).

Diğer anormallikler arasında Branham (1969), protoplazmik damlanın ara parçasının varlığının, tavşan spermatozoonların yavaş yer değiştirme hızı ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Tavşan spermatozoon akrozomu, başın ön kenarında bir şişlik olarak belirgindir (Gould vd., 1971), (Resim 1.5). Ekvator segmentini ayıran çizgiler, hamsterdekinden daha yakındır (Campos vd., 2014).

1.1.6.5. Semen Hacmi ve Sperm Konsantrasyonu

Tavşanlarda ejakülat hacmi ve sperm konsantrasyonu sırasıyla; 0.3-0.6 ml ve $150-500 \times 10^6$ sperm / ml arasında değişebilir (Adams ve Singh, 1981; Lebas vd., 1997). Bununla birlikte, seminal özellikler farklı ırklara göre değişebilir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2: Bazı tavşan ırklarına göre ejakülat hacmi ve sperm konsantrasyonu (Amann, 1966; Hassanien ve Baiomy, 2011; Alvarino vd., 2000)

Tavşan Irkları	Ejakülat Hacmi	Sperm Konsantrasyonu
Rex	$0,54 \pm 0,03$ ml	$415,10 \pm 10,11 \times 10^6$ sptz / ml
Yeni Zelanda Beyazı	$0,54 \pm 0,04$ ml	$416,72 \pm 9,16 \times 10^6$ sptz / ml

Çizelge 1.2. Devam.

Kaliforniya	0,62 ± 0,03 ml	454,11 ± 11,40x10 ⁶ sptz / ml
Baladi Kırmızısı	0,56 ± 0,04 ml	423,23 ± 12,11x10 ⁶ sptz / ml
Dev Alman Alacası*	1,51 ml	502,5x10 ⁶ sptz / ml
Yeni Zelanda Kırmızısı*	0,83 ml	221,7x10 ⁶ sptz / ml

* ± değerler orijinal makalede (Alvarino vd., 2000) verilmemiştir. sptz: spermatozoon

Bu parametreleri değiştirebilecek diğer faktörler; beslenme (Kamel ve Attia, 2011), toplama sıklığı (Amann, 1966), yaş (Boiti vd., 2005), ejakulat sırası ve ortam sıcaklığıdır (Finzi vd., 2010). Sperm hacminin, sperm konsantrasyonuna göre sıcaklıktan daha fazla etkilendiği bildirilmiştir (Roca vd., 2005). Ejakülasyon sıklığı da sperm özelliklerini değiştirebilmektedir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3: Tavşan spermine ait bazı parametreler (Holtz ve Foote, 1978b; Setchell, 1991; Battaglini vd.,1993)

Parametre	Birinci ejakülasyon	İkinci ejakülasyon
Hacim (jel kitlesi hariç) (ml)	0,1 – 1,1	0,2 – 0,4
Jel kitlesinin hacmi (ml)	0,32 – 0,50	0,1 – 0,18
Ejakülattaki jel kitlesi (%)	54	15
Spermatozoon/ml semen (x 10 ⁶)	280 - 1,050	420 – 800
Sperm motilite (%)	58 – 90	57 – 87
Motilite oranı (0 - 5)	2,3 – 3,3	2,0 – 4,8
Distal sitoplazmik damlacık (0 - 5)	0,6 – 1,0	0,4 – 0,8
Sperm aglütinasyonu (0 - 5)	1,2 – 2,0	0,8 – 1,6
PH	7,7 – 8,4	-

Lebas ve diğlerleri (1997), çiftleşmeden 1-2 dakika önce cinsel uyarımın sperm konstrasyonunu artırdığını ileri sürmüştür. Önceki çalışmalar, bu tip bir dürtünün vas deferens ve sonuç olarak ejakülattaki spermelerin sayısını arttırdığını göstermiştir. Araştırmacılara göre, bunun nedeni, tavşanlarda cinsel uyarılma sırasında spermin epididimiden vas deferense taşınmasıdır ve burada boşalma sırasında çabucak çıkarılırlar. Vas deferens, cinsel istirahat sırasında korunmuş, hareketli kalabilen spermelerin onarımını yapar. Bu nedenle, vas deferens cinsel hareketsizlik sırasında aktif bir organdır (Prins ve Zaneveld, 1979).

1.1.6.6. Semen Rengi ve Görünümü

Bazı çalışmalar tavşan semeninin beyaz olduğunu ve yoğunluğunun sperm konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmiştir (Alvarez vd., 2006; Bilbao, 1996). Tavşan semeninin rengine ilişkin bazı derecelendirmeler vardır. Bilbao (1996) için, semen sıklıkla beyaz ve fildişi rengindedir, ancak gri semen kalitesiz olarak kabul edilir. Alvarez ve diğlerleri (2006), süt beyazı semeninin tavşanda en iyisi ve daha üstün olduğunu, iyi kalitede normal semeni temsil ettiğini bildirmiştir. Sarımsı sperm genellikle yapay vajinadaki sıcaklık çok yüksek olduğunda normal olarak elde edilen idrarla kontamine olmuştur (Chang, 1959).

Çeşitli çalışmalar renk ve görünümü tek bir parametre olarak ilişkilendirmiştir (El-Azim ve El-kamash, 2011). Normal semen beyaz, opalesant ve homojendir (Boiti vd., 2005). Arrebola ve Fernandez (2011) inci beyazı semenin kaliteli olduğunu ve diğler renklerin zayıf olarak sınıflandırıldığını bildirmiştir. Aynı şekilde, homojen görünüm en çok istenen durumdur (Campos vd., 2014).

1.2. Safran

Crocus (Çiğdem) *sativus*, çok yıllık bir bitkidir ve Liliaceae familyasına ait olan *Crocus* cinsinin Iridaceae ailesinin bir üyesidir (Resim 1.6). Bu bitki Azerbaycan, Çin, Fransa, Yunanistan, Mısır, Hindistan, İran, İsrail, İtalya, Meksika, Fas, İspanya ve Türkiye gibi birçok ülkede yetiştirilmektedir. Bu bitkinin son ürünü olarak safran baharatı bazı yiyeceklerin içerisinde bulunmaktadır. Safran, çiğdem çiçeğinin kurutulmuş filamentlerinde (stigma) bulunan koyu-kırmızı bölgesidir. Tek bir

stigmanın ağırlığı yaklaşık 2 mg'dır ve her çiçeğin üç stigmatı vardır. 1 kg safran baharatı elde etmek için 230.000 çiçekten stigmaları tek tek seçerek toplanmalıdır. Safran karakteristik bir renge, tada ve kokuya sahiptir. Antik çağlardan modern zamanlara kadar safran birçok uygulamalarla tarihte yerini almıştır. Yiyecek ve içecek preparatlarını bir baharat olarak tatlandırmak ve lezzetlendirmek için, bunun yanında parfüm olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Safran tüketmenin en yaygın yolu hala yiyeceklerle karıştırmak veya sıcak ve ılık herhangi bir içeceğe eklemektir (Liakopoulou-Kyriakides ve Kyriakidis, 2002; Tarantilis vd., 1995).

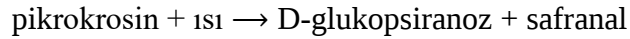
Yaygın olarak bilinen safran, yaygın bir afrodizyak, antispazmodik ve halk hekimliğinde balgam söktürücü olarak kullanılmıştır (Zargari A., 1990). *Crocus sativus* stigmalarının sulu veya alkolik özlerinin farmakolojik etkileri literatürde tanımlanmış ve geniş bir faaliyet yelpazesini oluşturmuş, antikonvülzan (Hosseinzadeh and Khosravan 2002), antidepresan (Hosseinzadeh vd., 2003), antinosiseptif ve anti-inflamatuvar (Hosseinzadeh ve Younesi, 2002), antioksidan (Farahmand vd., 2013), asetilkolinesterazı inhibe edici (Geromichalos vd., 2012), antitussif (Hosseinzadeh ve Ghenaati, 2006), yoksunluk sendromunu azaltıcı (Hosseinzadeh ve Jahanian, 2010), erkek erektil disfonksiyonu iyileştirici (Hosseinzadeh vd., 2008), kronik serebral hipoperfüzyon sonrası uzamsal bilişsel yetenekleri geliştirici (Hosseinzadeh vd., 2012), hipotansif (Imenshahidi vd., 2010) ve antisolar (Golmohammadzadeh vd., 2010) özellikler barındırmaktadır. Safran kokusunun kadınlarda menstrual siklus bozukluklarının tedavisinde etkili olabileceği de öne sürülmüştür (Fukui vd., 2011). Kimyasal analize göre, safran stigmalarında 150'den fazla kimyasal bulunmaktadır (Bathaie ve Mousavi, 2010) ve bunların arasında tüm bu farmakolojik etkiler, safrana özel renk, tat ve kokudan sorumlu olan krosin, krosetin, pikrokrosin ve safranal gibi safran ana kimyasal bileşikleriyle ilişkilidir (Melnyk vd., 2010).

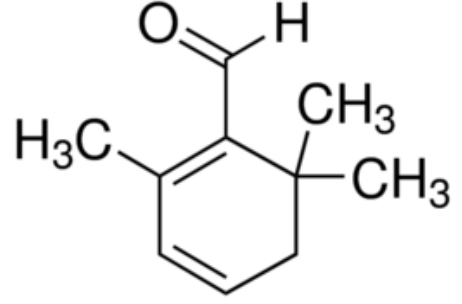
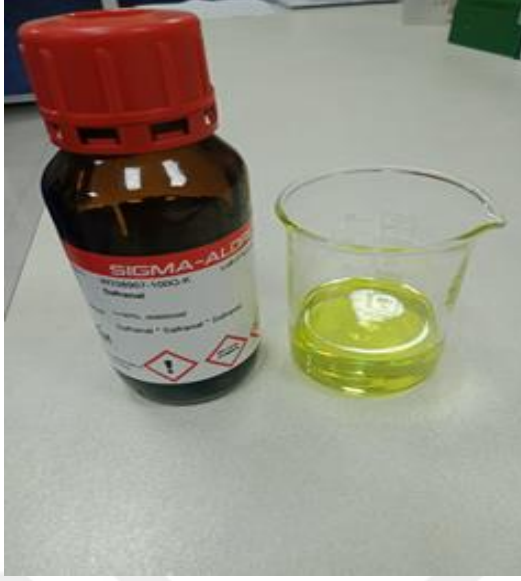


Resim 1.6: *Crocus sativus* (İnt. Kyn. 4)

1.2.1. Safran'al'in Fiziksel ve Biyokimyasal Özellikleri

Safran'al suda çözünmeyen, yağda eriyen, sistematik adı; 2,6,6-trimetilsikloheksa-3,1-din-1-karboksidehit olan, uçucu bir karboksidehit bileşiktir. Moleküler ağırlığı 150,21 g/mol olarak belirlenmiştir (Carmona vd., 2007). Moleküler formülü; “C₁₀H₁₄O” olarak belirlenmiştir. Erime noktası 25 °C'nin altındadır. Soluk sarımsı renkte, odunumsu keskin bir kokuya sahip yağlı bir sıvıdır (Resim 1.7). Oda sıcaklığında etanol içinde çözünabilmektedir. Yoğunluğu 0,968-0,980 (20Â°) dansitedir. Kırılma indeksi 1,525-1,533 arasındadır. Safran bitkisinin aromasını veren ana bileşenlerden biri safran'aldir. Bazı gıda firmalarında tatlandırıcı olarak da kullanılabilmektedir. Safran'al, krosetin biyosentezi yoluyla elde edilmektedir (İnt. Kyn. 5).





Resim 1.7:Safranal maddesinin fiziksel görüntüsü ve biyokimyasal yapısı

İlk kez pikrosin hidrolizasyonu ile elde eden Kuhn ve Winterstein 1933 yılında, bu kimyasalı "safranal" olarak adlandırdı (Nelson, 1953). Bu madde yüksek sıcaklıklarda (80°C) ve daha az işlem süresinde (30 dk civarında), daha fazla miktarda elde edilmiştir (Himeno ve Sano, 1987). Safranal'ın elde edildiği doğal bitkiler aşağıdaki çizelgede (Çizelge 1.4) verilmiştir.

1.2.2. Safranal'ın Antioksidan Etkileri

Safranal'ın güçlü bir antioksidan olduğunu gösteren birtakım çalışmalar yapılmıştır. Ratlarda yapılan bir çalışmada yaştan ilerlemesi ile karaciğerde artan lipid peroksidasyonu ve azalan antioksidan enzim aktivitelerine karşı safranal'ın hasarı koruduğu görülmüştür (Farahmand vd., 2013). Ayrıca yaşlı sıçanların beyinde oluşan oksidatif hasara karşı da etkili olmuştur (Samarghandian vd., 2015). Serebral iskemide nedeniyle rat hipokampusunda meydana gelen MDA (Malondialdehit) artışını safranal azaltmıştır (Hosseinzadeh ve Sadeghnia, 2005). CCl₄ tarafından indüklenen karaciğer hasarında safranal antioksidan sistemini teşvik etmiştir (Alayunt, 2019). *In vitro* yapılan bir çalışmada safranal'ın, deride oluşan serbest radikalleri engellediği ve dermal enzimlerin inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir (Madan ve Nanda, 2018). Diyabetik sıçanlarda bronkoalveoler lavaj sıvısı (BALF) ve akciğer dokusunda MDA ve nitrik oksit (NO) düzeylerindeki artışı inhibe etmiştir (Samarghandian vd., 2014a).

Astımlı farelerde yapılan bir çalışmada da yine antioksidatif özelliği gözlemlenmiştir (Bukhari vd., 2015). Safranal ratlarda mide ülserine karşı koruyucu etki göstermiştir (Tamaddonfard vd., 2019). Ayrıca safranal'ın diyabetli sıçanların testis dokusunda antioksidatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Ataei ve Rahbarian, 2020).

Çizelge 1.4: Safranal çıkarılan bitkiler (Rezaee ve Hosseinzadeh, 2013)

Bitki	Safranal Çıkartılan Bölümü
<i>Crocus sativus</i> (Çiğdem)	Tüm bitki
<i>Centaurea sibthorpii</i> (Peygamber çiçeği)	Anten parçaları
<i>Centaurea amanicola</i> (Som kavgalaz)	Anten parçaları
<i>Centaurea consanguinea</i> (Tez düğme)	Anten parçaları
<i>Erodium cicutarium</i> (Leylek gagası)	Tüm bitki
Çin yeşil çayı	Yaprak
<i>Calycopteris floribunda</i>	Yaprak
<i>Crocus heuffelianus</i>	Filizlenmiş primordia kısmı
<i>Sambucus nigra</i> (Kara mürver)	Çiçek
Limon (Narenciye limon)	Meyve
<i>Achillea distans</i> (Civan perçemi)	Kök

Streptozotosin kaynaklı diyabetik ratlar safranal ile tedavi edildiğinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Samarghandian vd., 2013). Miyokard iskemi-reperfüzyon üzerinde de antioksidan olarak safranal önemli bir rol oynamıştır (Bharti vd., 2012). Safranal sıgır aort endotel hücrelerinde mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) yolağını etkileyerek antioksidan ve anti-apoptotik bir ajan olabilmektedir (Rahiman vd., 2018). Ayrıca cisplatin ile oluşturulan nefroktoksisite karşısında koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (Karafakıoğlu vd., 2017). Ovalbumin duyarlı kobaylarda

toplam nitrik oksit ve nitrit serum düzeylerinin azalmasını sağlamıştır (Boskabady vd., 2014). Siyatik sinirleri zedelenmiş sıçanların kandaki MDA seviyelerini safranal azaltmıştır (Tamaddonfard vd., 2014).

1.2.3.Safranal'ın Diğer Farmakolojik Etkileri

Safranal farklı dozlarda ve uygulama yollarıyla kullanılarak canlıdaki birçok sistem üzerine hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda bazı etkileri incelenmiştir. Özellikle merkezi sinir sistemi üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Bu anlamda safranal'ın, farelerde yapılan bir çalışmada antidepresif özelliği keşfedilmiştir (Hosseinzadeh vd., 2003). Pentilenetetrazol tarafından indüklenen nöbetler üzerinde safranal antikonvülsan aktivite uygulayabildiği gözlemlenmiştir (Hosseinzadeh ve Sadeghnia, 2007). Ayrıca Tip-1 diyabetik sıçanlarda öğrenme ve hafıza bozukluklarına karşı iyileştirici etki sergilemiştir (Delkhosh-Kasmaie vd., 2018). Bu bilgiler ışığında safranal'ın şizofreni hastalığı üzerinde tedavi etme ihtimali umut edilmektedir (Pitsikas, 2021). Parkinson hastalığı üzerinde Keap1/Nrf2 sinyal yolunu düzenleyerek serbest radikallerin artışını ve hücre apoptozisini önlerken (Pan vd., 2016), Multipl skleroz hastalığı üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada ise safranal oligodentrosit (OLN-93) hücre yaralanmasını önlemiştir (Alavi vd., 2019). Ayrıca Alzheimer hastalığı üzerinde de olumlu etkisinin olduğu bilinmektedir (Huang vd., 2019). Bu etkinin nasıl olduğu konusunda yapılan bir çalışmada ise *in vitro* PC12 hücrelerinde beta-amiloid peptid ile Alzheimer modeli oluşturulmuş ve sonuç olarak MAPK ve PI3 Kinaz yolaklarını etkileyerek apoptozisi engellediği sonucuna varılmıştır (Rafieipour vd., 2019). Forouzanfar ve diğerlerinin (2020) yaptıkları çalışma da bu sonucu desteklemiştir. Diğer bir çalışma safranal'ın farelerde akut ve kronik epilepsi modellerinde genel olarak nöbeti inhibe ettiğini ve nanopartikül lipit aracılığıyla taşınarak bu etkiyi artırabileceğini göstermektedir (Bo-Qiang vd., 2018). Bu bilgilerin yanında hipertirodizmin neden olduğu beyin hasarını korumuştur (Shahat vd., 2020). Ayrıca safranal'ın geçici reseptör potansiyel ankyrin 1 (TRPA1) kanalını aktive ederek antinoseptif özellik gösterdiği tanımlanmıştır (Li Puma vd., 2019). Sıçanlarda Huntington hastalığı üzerinde yapılan bir çalışmada ise safranal motor disfonksiyonunu engelleyerek koruyucu etki göstermiştir (Fotoohi vd., 2021).

Başka sistemler, doku ve organlar üzerinde de yapılan çalışmalar safranal'ın birçok etkisini göstermektedir. Bunlardan bazıları; kardiyovasküler sistem, metabolik

faaliyetler, göz fonksiyonları, kanser, dermatoloji, cinsel davranışlar ve solunum yolları üzerindeki etkileri sayılabilir. Bu bileşik kalp hızını azaltarak ve vasküler gevşemeyi sağlayarak kan basıncını düşürebilir (Imenshahidi vd., 2015). Ayrıca Ca^{+2} regülasyonu ile miyokardiyal iskemiye iyileştirmiştir (Xue vd., 2020). İzoproterenol kaynaklı miyokard enfarktüsünde lipid peroksidasyonunu azaltarak kardiyoprotektif özellik göstermiştir (Mehdizadeh vd., 2013). Safranal'ın sadece miyokard enfarktüs derecesini önemli ölçüde azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda sol ventrikül fonksiyonlarını ve miyokardın genel hemodinamik durumunu da iyileştirdiği bildirilmiştir (Bharti vd., 2012). Pıhtılaşma mekanizmasını etkileyerek antikoagülan olarak da rol oynamaktadır (Ditsa vd., 2012). Safranal, Th1/Th2 dengesizliği ile ilişkili inflamatuvar hastalıklarda terapötik etkilere sahip olabilir (Feyzi vd., 2016). Safranal, anti-inflamatuvar etkisiyle dekstran sülfat sodyum kaynaklı koliti hafifletir ve makrofaj aracılı iltihabı bastırır (Lertnimitphun vd., 2019). Bunun yanında *Escherichia coli* hücrelerinin büyümesini tamamen yok ederek antimikrobiyel aktivite sergilemiştir (Liu vd., 2017). Safran ekstratının *Salmonella enterica* üzerindeki bakterisidal etkisi içerisinde bulunan safranal'dan kaynaklı olabileceği de düşünülebilir (Pintado vd., 2011). Ayrıca safranal ve epoksidasyon türevleri, Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı önemli bir aktivite göstermiştir (Khayyat ve Elgendy, 2018).

Safranal açlık kan glikoz, HbA1c seviyelerini önemli ölçüde azaltarak ve kan insülin seviyelerini önemli ölçüde artırarak antihiperglisemik aktivite göstermektedir (Kianbakht ve Hajiaghaee, 2011). Bununla beraber protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B) enzimini inhibe ederek tip 2 diyabetik olan farelerde antidiyabetik bir tedavi olarak yararlı olmuştur (Maeda vd., 2014). Tip 2 diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, safranal hem antienflamatuvar hem de antioksidatif etkisiyle böbrek doku hasarını azaltmıştır (Hazman ve Bozkurt, 2015). Obezite, hiperglisemi, hipertrigliseridemia ve hipertansiyon gibi olanzapinin neden olduğu farklı metabolik bozuklukları hafifletmiştir (Malekzadeh vd., 2019).

Bazı çalışmalar safranal'ın antikanser olarak da kullanılabileceğini bildirmiştir. Kolon kanseri hücrelerine karşı potansiyel antikanser etkisini; mTOR/PI3K/Akt yolunun baskılanmasıyla apoptozisi başlatarak ve mitokondriyal membran potansiyel (MMP) düzeyini azaltarak göstermiştir (Zhang vd., 2018). Safranal, hepatosellüler

karsinom hücrelerinde DNA çift iplikçik kırılmasına ve ER-stres aracılı hücre ölümüne neden olmaktadır (Al-Hroust vd., 2018). Ayrıca *in vitro* bir çalışmada anti-tübülin bağlayıcı ajan olarak rol almıştır (Naghshineh vd., 2015). Oral skuamöz hücreli karsinomda sitotoksik etki göstererek apoptotik davranış sergilemiştir (Jabini vd., 2017). Yine anti-tümör aktivitesini nöroblastom hücreleri üzerinde de göstermiştir (Samarghandian vd., 2014b). Prostat kanser hücre hattında hücrelerin büyümesini inhibe etmiştir (Samarghandian ve Shabestari, 2013). Bu bulguları destekleyici olarak bir başka prostat kanseri çalışmasında S fazlı kinaz ilişkili protein 2 (Skp2) regülasyonu ile prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamıştır (Jiang vd., 2020). Son olarak safranal, K-562 insan kronik miyelojen lösemi hücrelerinin büyümesini engellediği bulunmuştur (Geromichalos vd., 2014).

Safranal, hızlı olmayan göz hareketi (NREM) uyku süresini artırmış, NREM uyku gecikmesini kısaltmış ve NREM uykusunun delta güç aktivitesini artırmıştır (Liu vd., 2012). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise retinitis pigmentosa hastalığında fotoreseptör hücre dejenerasyonunu yavaşlattığı ve retina damar ağı bozulmasını iyileştirdiği görülmüştür (Fernández-Sánchez vd., 2012).

Bu etkilerine ek olarak, safranal'ın immun sistem için de güvenilir bir bileşik olduğu düşünülmektedir (Riahi-Zanjani vd., 2015). Erkek Wistar sıçanlarında hem metabolik hem de davranışsal stres belirtilerinin azaltılmasında safranal'ın önemli bir etkisi olduğu ortaya koyulmuştur (Hooshmandi vd., 2011).

1.3. Bisfenol AF (BPAF)

Bisfenol AF (BPAF, Hekzafloroaseton bisfenol), östrojenik etkileri taklit eden ve erkeklerde androjenlerin sentezini bozan, bir endokrin bozucu olan bisfenol A (BPA)'nın özellikle plastik endüstrisinde hammadde olarak kullanılan analoglarından birisidir (Yu vd., 2022). Endokrin bozucu kimyasallar (EDC'ler) çevrede yaygın olarak bulunur. Östrojen benzeri aktivite, bisfenol A (BPA), bisfenol AF (BPAF) ve zearalenon (Zea) gibi EDC'lere atfedilir, ancak etki mekanizmaları ve etki çeşitliliği tam olarak anlaşılamamıştır (İnt. Kyn. 2).

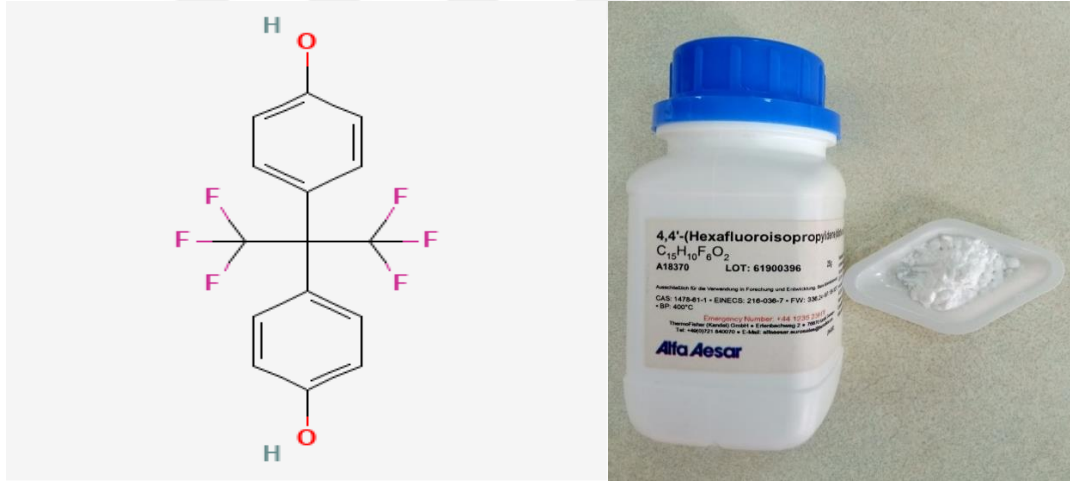
1.3.1. BPAF'nin Kullanım Alanları

BPAF, günümüzdeki endüstriyel işletme sektörlerinde; kauçuk ürün imalatı, sentetik kauçuk imalatı, plastik malzeme ve reçine imalatı gibi alanlarda aktif olarak

kullanılmaktadır (İnt. Kyn. 2). BPAF, elektronik cihazlar ve optik fiberler (çok sayıda polimerde bir monomer olarak), gıda işleme ekipmanları ve özellikle mükemmel stabilitesi ve sıcak yırtılma mukavemeti nedeniyle özel elastomerlerin sentezinde kimyasal ve termal özelliklerini geliştirmek için çapraz bağlama ve kütleme maddesi olarak kullanılmasıyla geniş uygulamalara sahiptir. Yıllık üretim hacmi yüksek olan bu madde; kimyasal fabrika ve üretim tesislerinin atık sularında meydana gelen kirlenmenin ana kaynaklarından biri olarak gösterilmektedir (Zhang vd., 2013).

1.3.2. BPAF'nin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Moleküler ağırlığı 336,23 ve moleküler formülü “C₁₅H₁₀F₆O₂” olan kimyasal bir maddedir. Beyazdan açık griye değişen bir renge sahiptir (Resim 1.8). Kuru toz halinde olan BPAF'nin kaynama noktası 400 °C ve erime noktası 162,0 °C'dir. Isıtıldığında toksik flor buharları yaymaktadır. Cilt tahrişine ve göz hasarına neden olan bu maddenin solunulması da ciddi sıkıntıları meydana getirebilir (İnt. Kyn. 2).



Resim 1.8: BPAF'nin moleküler yapısı (İnt. Kyn. 2) ve fiziksel görünümü.

1.3.3. Metabolizması ve Toksikolojik Etkileri

ABD’de BPAF çeşitli gıda maddelerinde kullanılmaya başlanmış ve günlük tüketilen ürünlerde, insan idrarı veya kan örneklerinde BPAF varlığına rastlanmıştır (Liao ve Kannan, 2013). Çin ve Suudi Arabistan'da insanlar üzerinde yapılan farklı çalışmalarda, BPAF'nin idrar örneklerindeki varlığı tespit edilmiştir (Asimakopoulos

vd., 2016; Yang vd., 2014). Çin’de yapılan bir araştırmada, bir üretim tesisinin çevresindeki bazı çevresel materyallerin içeriğinde BPAF tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bilgilere göre üretim tesisinin etrafında bulunan, özellikle toprak ve kuyu suyundan, insanlara BPAF maruziyetinin olabileceğini belirtmişlerdir (Song vd., 2012). BPAF ayrıca kanalizasyon çamurunda (72,2 ng/g kuru ağırlığa kadar) (Yu vd., 2015), iç mekan tozunda (Liao vd., 2012) ve bal örneklerinde (53,5 ng / mL’ye kadar) (Çesenvd., 2016) tespit edilmiştir. Öte yandan, BPAF konserve içeceklerde (Regueiro ve Wenzl, 2015a) ve hazır yemeklerde (Regueiro ve Wenzl, 2015b) tespit edilmemiştir. Şu anda, BPAF'nin tahmini diyet alımı erkekler için 0,49 ng/kg vücut ağırlığı/gün ve kadınlar için 0,50 ng/kg vücut ağırlığı/gündür (Liao ve Kannan, 2013). Gıda ve ilaç endüstrisindeki boru ve contalar BPAF polimerlerinden yapıldığı için gıda ve kozmetik yoluyla temas mümkün olabilir. Elde edilen veriler, genel popülasyonun iç mekan tozunun solunması yoluyla bisfenol AF'ye maruz kalabileceğini göstermektedir (İnt. Kyn. 2). Ayrıca, BPAF'nin temel olarak glukuronidasyon yoluyla metabolize olduğu, Sprague Dawley (SD) sıçanlarında dışkı ve idrar yoluyla atıldığı bulunmuştur (Li vd., 2013; Yang vd., 2012).

BPAF'nin BPA'ya kıyasla daha yüksek östrojenik bağlanma potansiyeli sergilemesi dikkat çekicidir (Kitamura vd., 2005; Stossi vd., 2014). Ek olarak BPAF, östrojenik reseptör olan ER α 'ya kıyasla ER β için üç kat daha güçlü bir afinite sergilemiştir (Matsushima vd., 2010). Günümüzde en yoğun kullanılan BPA analoglarından biri olan BPAF üzerine *in vivo* çalışma sayısı hala sınırlı sayıdadır. 2017 yılında yapılan *in vitro* bir çalışmada BPAF’nin reaktif oksijen seviyelerini (ROS) yükselttiği, lipid peroksidasyonunu artırdığı, katalaz ve süperoksit dismutaz seviyelerini olumsuz etkilediği gözlenmiştir (Maćczak vd., 2017). Zebra balıklarında, akvaryum suyuna ilave edilen 1 mg/L dozundaki BPAF’nin testis dejenerasyonunu artırdığı gözlenmiştir (Yang vd., 2016). Ayrıca, BPAF maruziyeti erkek balıklarda testosteron seviyelerini düşürmüştür ve testis morfolojisini değiştirmiştir (Yang vd., 2016; Shi vd., 2015). Farelerde yapılan bir çalışmada BPAF’nin kan testis bariyerine zarar verdiği ve sperm kalitesini olumsuz etkilediği görülmüştür (Wu vd., 2019). BPAF'nin kordon kanı ve emzirme yoluyla aktarılabilmesini ve sonunda yavruların testislerinde biriktiği bildirilmiştir (Meeker vd., 2010). Yetişkin erkek sıçanlarda BPAF maruziyetinin serum testosteron seviyesini ve biyosentezini düşürdüğü

bildirilmiştir (Feng vd., 2012). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, sıçanlarda 80 ve 280 mg/kg dozlarında BPAF'nin gebelik oranlarını düşürdüğü ve fetal cinsel gelişimi bozduğu görülmüştür (Sutherland vd., 2017).

Yeni Zelanda tavşanlarında BPAF benzeri bisfenol A'nın penis ereksiyonunu engellediği bilinmektedir (Moon vd., 2001). BPAF ise ratlarda leydig hücre sayısını ve serum testosteron seviyesini azaltmıştır (Yu vd., 2022). Fare spermatogonyum hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalarda, BPA ve farklı BPA analogları (tetrabromobisfenol A ve bisfenol B) ile yapılan karşılaştırmada en yüksek spermatogonial toksisite BPAF'de gözlenmiştir (Salleh vd., 2015). 1 µM BPAF'ye maruz kalma, nükleer morfolojiyi değiştirmiş ve hücre döngüsünün durmasını indüklerken, 10 µM'lik bir konsantrasyon, hücre iskeletinin bozulmasına ve hücrelerin multinükleasyonuna neden olmuştur (Liang vd., 2017). BPAF maruziyetinin spermatogonyum hücrelerini hedefleyebileceği gösterilmiştir (Sutherland vd., 2017). BPAF'nin steroidogenez üzerindeki etkileri hala belirsizdir ve muhtemelen farklı maruziyet yollarına bağlı olarak farklılık gösterebilir. Ek olarak, BPAF maruziyetinin çeşitli deneysel suşlar, türler ve maruziyet yollarında hormon seviyeleri ve birçok üreme noktaları üzerindeki etkilerini incelemek için daha fazla bilimsel çalışmaya ihtiyaç vardır (Siracusa vd., 2018).

1.3.4. Bisfenollerin Steroidogenez ve Spermatogenez Üstündeki Etkileri

Günümüzde, artan kanıtlar bisfenollerin steroidogenez yolunu bozma yeteneğini göstermiştir. Kolesterolün mitokondriye taşınmasından sorumlu bir protein olan steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR), BPA ve analoglarına maruz kalmaktan etkilenen proteinler arasındadır. Bisfenol F, Bisfenol AF ve Bisfenol S gibi BPA analogları da StAR mRNA'nın ekspresyonunda bir azalmaya neden olmuştur. StAR mRNA ekspresyonunun bozulması, kolesterol taşınmasındaki bozulma ve leydig hücresindeki mitokondriye hareket nedeniyle testis steroidogenezinin bozulmasına neden olabilir (Shamhari vd., 2021).

CYP11A1 ekspresyonunun, BPAF'ye maruz kalan erkek zebra balıklarının yetişkinlerinde ve embriyolarında arttığı bulunmuştur. CYP11A1'in gen veya protein ekspresyonunun bozulması, leydig hücresinin mitokondrisinde kolesterolün

pregnenolona dönüşümünü azaltır. BPF ve BPAF maruziyeti, zebra balığı testislerinde CYP17 ekspresyonunu, insan adrenokortikal karsinom hücre hattında HSD3 β 2 ve CYP17A1'in gen ekspresyonunu da azaltmıştır. Bu nedenle, 17 β -HSD, 3 β -HSD ve CYP17A1'in gen ve protein ekspresyonundaki değişikliklerle gösterilen steroidojenik enzimlerin değişimi, BPA, BPF, BPS ve BPAF maruziyetindeki anormal testosteron seviyesinin nedeni olabilir (Shamhari vd., 2021).

BPA ve analoglarına maruz kalma, düşük LH seviyesi ve leydig hücrelerindeki steroidojenik enzim kaskadının bozulması nedeniyle testosteron seviyelerinin düşmesine neden olur. Bu steroidogenez yolundaki bozulma, spermatogenez olarak bilinen sperm sentezinde bir bozulmaya yol açar. BPA ve analoglarının kan testis bariyeri bütünlüğünü azaltarak, testis histopatolojisini değiştirerek ve sperm defektlerine neden olarak spermatogenez bozduğu bildirilmiştir. Erkek Wistar sıçanlarının kan testis bariyerinde, BPA'ya doza bağımlı bir şekilde maruz kaldığında oklüdin ve nektin-3'ün azaltılmasıyla kanıtlanan bir rahatsızlık bulunmuştur. Kan testis bariyeri bütünlüğünün bozulması, adluminal bölmedeki germ hücrelerinin toksik maddelere maruz kalmasına izin verebilir ve bu da seminifer tübüllerde spermatogenezin bozulmasına neden olabilir (Shamhari vd., 2021).

BPA ve analoglarına maruz kaldıktan sonra spermatogenez bozulması, germ hücrelerinin çapının ve epitel yüksekliğinin azalması, germinal epitelin atrofisi ve ayrılması ve düzensiz seminifer tübül yapısı gibi histolojik gözlemlerle gösterilebilir. Önceki çalışmalar, BPA maruziyetinin, germ hücrelerinin vakumlanması, dejenerasyonu ve düzensizliği ile kanıtlanmış histopatolojik değişikliklere neden olduğunu bildirmiştir. BPA'ya maruz kalan yetişkin erkek SD sıçanlarında germ hücrelerinin vakuolasyonu ve dejenerasyonu bildirilmiştir. BPA'ya maruz kalan yetişkin erkek Wistar sıçanlarının seminifer tübülünde 14 gün boyunca oral gavaj yoluyla 50 mg/kg'lık bir dozda spermatogenez sürecinin zayıf olduğu bulunmuştur. Ayrıca, aynı çalışma, spermatositlerin BPA toksikasyonu olan sıçanlarda en çok etkilenen germ hücreleri arasında olduğunu da bulmuştur. Buna ek olarak, oral gavaj yoluyla 200 mg/kg'lık bir dozda BPA'nın germ hücrelerinin dağınlığına neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, BPF ve BPS gibi BPA analogları spermatidlerin uzamasına neden olur ve yetişkin erkek SD sıçanlarında spermatogenez bozar, bu da

seminifer tübüllerin lümeninde olgun spermatozoonun bulunmamasına neden olur. BPA ve analogları (BPS ve BPAF) hücre canlılığını azaltır ve spermatogonyum hücre hattının DNA hasarını arttırır. Bu bisfenoller arasında BPAF, maruziyetten sonraki 24 saat içinde en düşük konsantrasyonlarda önemli sonuçlara neden olabilmektedir (Shamhari vd., 2021).

BPA ve analogları spermatogenezi bozar ve sperm kalitesinde bir azalmaya neden olur. Toksik maddeler tarafından indüklenen düşük sperm üretimi genellikle oksidatif stres ve kan dolaşımındaki testosteronun azalması ile ilişkilidir. Ayrıca, spermatogenez için gerekli olan sertoli hücrelerinin yetersiz beslenme sonucu anormalleşmesi sperm gelişimindeki azalmaya sebep olabilir.  nceki çalışmalara göre, yetişkin erkek sıçanların BPA'ya maruz kalması, sperm üretimi, sayısı, hareketliliği, canlılığı ve sperm akrozomu ve plazma zarı mitokondriyal aktivitesinin bütünlüğünde bir azalma ile kanıtlanmış sperm kalitesinde bir azalmaya neden olur. 14 gün boyunca 50 mg/kg'lık bir dozda BPA, leydig hücresinde hafif  dem oluşmasına neden olmuş, testosteronda bir azalmaya yol açmış, böylece yetişkin erkek Wistar sıçanlarının sperm kalitesini düşürmüştür. Mitokondriyal aktivite ile spermdeki hareketlilik arasında da bir ilişki olduğu bildirilmiştir, çünkü mitokondri, sperm hareketi için gerekli enerji üretimini sağlayan tek ATP kaynağıdır. Ayrıca, Sperm-spesifik kalsiyum iyon kanalı (CatSper) sperm motilitesi, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu için de çok önemlidir. Bu pH'ya duyarlı kanal, sperm fonksiyonu için yeterli miktarda Ca^{+2} sağlamaktan sorumludur. Progesteron, sperm hiperaktivasyonu ve akrozomal reaksiyon için CatSper kanalının aktivasyonunu etkileyen bir faktördür. Daha  nceki bulgular, CatSper kanalının ve iyonlarının ekspresyonunun, farelere oral olarak 10, 50 ve 250 μ g/kg BPA dozlarına maruz kaldıktan sonra sperm miktarının önemli ölçüde aşağı regüle edildiğini ve azaldığını bildirmiştir. Bu azalmalar, progesteron varlığında motilitenin ve akrozom reaksiyonunun da anlamlı olarak azaldığı bulguya paraleldir. Sağlıklı insan sperminin 10 μ M BPA analoglarına maruz kalması, CatSper kanalının yeteneği üzerinde benzer bir etki göstermiştir. Bir çalışmada, bilim insanları BPG, BPAF, BPBP, BPC ve BPB'nin progesteron kaynaklı kalsiyumu inhibe eden g   l  kimyasallar olduğunu bulmuşlardır. Bu BPA analoglarının, normal CatSper

sinyallerini engelleyerek infertiliteye sebep olacak şekilde Ca^{+2} sinyalizasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Shamhari vd., 2021).



2. MATERİYAL VE METOT

Bu bölümde deney hayvanı materyali ve deneysel protokol, spermatolojik analizler, hormon tahlilleri, oksidan/antioksidan tayini, histopatolojik muayene ve istatistiksel analizde kullanılan materyal ve metotdan bahsedilecektir.

2.1. Analizlerde Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Çalışmada Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Fizyolojisi Anabilim Dalı, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Laboratuvarı ve Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve kimyasal maddeler kullanılmıştır. Kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar ve laboratuvar malzemeleri alt bölümlerde belirtilmiştir.

2.1.1. Kimyasal Maddeler

- Bisfenol AF (%98 saflık, A18370, CAS No: 1478-61-1, Alfa-Aesar, Haverhill, Massachusetts, USA)
- Safranin (%90 saflık, Sigma-Aldrich W338907, St. Louis, Missouri, USA)
- Östradiol (BT-LAB E0274Rb Rabbit Estrogen ELISA kit, Bioassay Technology Laboratory, China)
- Testosteron (BT-LAB E0039Rb Rabbit Testosterone ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, China)
- Gonadotropin Salgılatıcı Hormon - GnRH (BT-LAB E0372Rb Rabbit Gonadotropin-releasing Hormone ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, China)
- Folikül Uyarıcı Hormon - FSH (BT-LAB E0252Rb Rabbit Follicle-Stimulating Hormone ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, China)

- Lüteinleştirici Hormon - LH (BT-LAB E0251Rb Rabbit Luteinizing Hormone ELISA Kit, Intra-Assay: CV<8%, Inter-Assay: CV<10%, Bioassay Technology Laboratory, China)
- Tris aminometan (Sigma-Aldrich)
- Amonyum Molibdat (Merck)
- Tiyoarbiturik Asit (ISO-LAB Chemicals)
- Trikloroasetik Asit (Merck)
- Metanol (Honeywell)
- L-Glutatyon İndirgeyici (Sigma-Aldrich)
- Kümen Hidroperoksit (Sigma-Aldrich)
- 5,5'- Ditiyobi (2-nitrobenzoic asit)- (Sigma-Aldrich)
- Hidrojen Peroksit (Merck)
- Mısır yağı

2.1.2. Cihazlar

- ELİSA Reader (Erba Mannheim Lisa Scan 1001)
- Refraktometre (Atago, SPR-N, Japan)
- Dijital pH metre (Orion Ross Ultra pH/ATC Triode)
- Spektrofotometre (Biochrom Libra S22)
- Santrifüj (Nüve NF 800R)
- Mikroskop (Olympus CX21)

- Hematoloji analizör (Mindray 2800 BC)
- Vorteks (DAIHAN Scientific, VM-10)
- Hassas terazi (DAIHAN Biomedical, SC210)
- Buzdolabı (+4) (Profilo, KIKDN 45V, No frost)
- Derin dondurucu (-45) (Uğur Derin Dondurucu, EUPlus 961)
- Dondurucu (-80) (DAIHAN Scientific, UniFreeze U500)
- Isıticılı manyetik karıştırıcı (IKA®, Yellow line MSH basic)
- Saf su (Distile su) cihazı (Nüve, ND12)
- Homojenizatör (IKA®, T18 digital ULTRA TURRAX)
- Otomatik doku takip cihazı (Leica)
- Mikrotom (Leica, RM 2135)
- Etüv (Nüve, FN 500)

2.1.3. Laboratuvar Malzemeleri

- Antikoagülanlı tüp (BD Vacutainer hemogard tüp)
- Antikoagülansız (jelli) tüp (BD Vacutainer Serum Separatör tüp)
- Suni vajen
- Pipet
- Polipropilen deney tüp (10 ml)
- Ependorf tüp

- İntravenöz kanül (26 G)
- Penröz dren 5/8
- Termometre (Iso-Lab)
- Otomatik pipet (Brand)
- Farklı boyutlarda balan joje, beher ve mezür (Iso-Lab)

2.2. Deney Hayvanı Materyali ve Deneysel Protokol

Çalışma 2020/07-1(15/12/2020) numarası ile Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından etik olarak onaylanmıştır. Ortalama ağırlıkları yaklaşık 2400–2800 gram olan 8-10 aylık 24 adet yetişkin erkek Yeni Zelanda tavşanı (*Oryctolagus cuniculus*) kullanılmıştır. İçeriği; %9 ham kül, %20 ham protein, %14 ham selüloz, %0,5 kalsiyum, %0,5 fosfor, %0,2 sodyum içeren standart pelet yem ile beslemeleri *ad libitum* yapılmıştır (Mirisan Yem ve Yağ Sanayi, Hatay, TURKEY). Deney başlangıcında tavşanlar çalışma boyunca tutulacakları %50-55 nem, 22 ± 2 °C sıcaklık ve 14:10 saatlik aydınlık: karanlık döngüsünde 14 gün boyunca alıştırmışlardır. Deneysel uygulama toplam 9 hafta [49 gün (bir spermatogenezis süresi) +14 gün (spermanın epididimiste depo ve transfer süresi)] sürmüştür. Çalışma süresi boyunca canlı ağırlık ve yem tüketimleri haftalık olarak takip edilmiştir. Oral gavaj uygulamaları her gün saat 17:00-18:00 arasında yapılmıştır.

Toplam 2 haftalık adaptasyon periodunu takiben tavşanlar her grupta 6 tavşan olacak şekilde rastgele biçimde toplam 4 çalışma grubuna ayrılmıştır: Kontrol grubu (K; 1 kg canlı ağırlık için oral 1 ml mısır yağı/gün), BPAF grubu [BF; 20 mg/kg/gün Bisfenol AF (Alfa-Aesar A18370.14, Haverhill, Massachusetts, USA), 1 ml mısır yağı içerisinde oral], Safranal grubu [SF; 100 mg/kg/gün safranal (Sigma-Aldrich W338907, St. Louis, Missouri, USA), 1 ml mısır yağı içerisinde oral] ve BPAF+Safranal (tedavi) grubu (B+S; 20 mg/kg/gün Bisfenol AF + 100 mg/kg/gün safranal, 1 ml mısır yağı içerisinde oral). Dokuzuncu haftanın sonunda ve oral gavaj

uygulamaları bittikten 24 saat sonra tüm gruptaki tavşanlar isoflurane ile genel anesteziyi takiben ötenazi yapılmıştır.

2.3. Kan Örneği Alımı

Çalışmanın başlangıcında, oral gavaj uygulamalarından 1 gün önce ve en son oral gavaj uygulamasından 1 saat sonra, tavşanlardan kulak arteri yoluyla antikoagulanlı tüpler kullanılarak tam kan ve plazma için, antikoagulansız tüpler kullanılarak da serum için kan örnekleri toplanmıştır. Kan alımından önce tavşanlar 12 saat aç bırakılmıştır. Kulak bölgesindeki kıllar traş edildikten sonra %95'lik etil alkol ile temizlenen deri üzerinden kulak arteri yoluyla toplam 20 ml civarında kan alınmıştır. Kan örneklerinin toplanmasında 26 G intravenöz kanül (İntraket–Nextech Branül) kullanılmıştır. Kan örneklerinin toplanmasından sonra kanamayı durdurmak için steril pamuk ile kan alma bölgesine basınç uygulandı (Resim 2.1).

Tam kan analizleri ve plazma elde etmek için EDTA'lı tüpler kullanılmıştır. Antikoagülansız (jelli) tüpler ise serum elde etmek için kullanılmıştır. Kan örnekleri alındıktan sonra soğuk zincir içerisinde muhafaza edildi. Daha sonra 30 dakika içerisinde 2000 devirde 20 dakika santrifüj edildikten sonra serum ve plazma kısımları alındı. Serum örnekleri Testosteron, Östrojen, GnRH, FSH ve LH analizleri için -20 °C'de saklandı. Hematoloji analizörü (Mindray 2800 BC) kullanılarak taze kan ve serumdan aynı gün içerisinde tam kan değerleri (hematokrit, hemoglobin, toplam eritrosit, platelet, lökosit ve % lökosit) analiz edilmiştir.

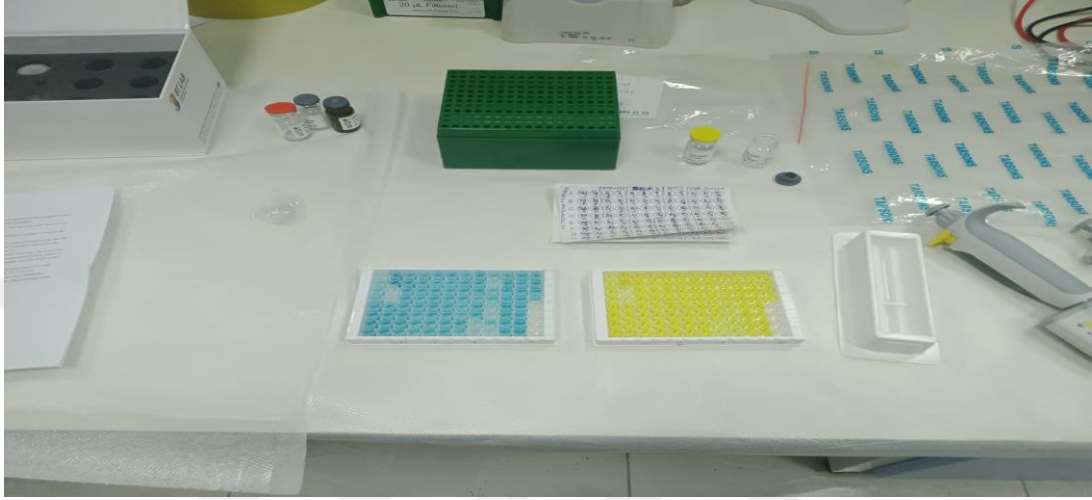


Resim 2.1: Tavşan sentral kulak arterlerinden intraket yardımı ile kan alınması.

2.4. Hormon Tahlilleri

Hormon analizleri, üretici firmanın (Bioassay Technology Laboratory, China) talimatlarına göre yapılmıştır. Serum, testis ve seminal plazma testosteron (BT-LAB E0039Rb Rabbit Testosterone ELISA Kit, Intra-Assay: CV<8%, Inter-Assay: CV<10%, Bioassay Technology Laboratory, China), östradiol (BT-LAB E0274Rb Rabbit Estrogen ELISA kit, Intra-Assay: CV<8%, Inter-Assay: CV<10%, Bioassay Technology Laboratory, China), gonadatropin salgılatıcı hormon (GnRH; BT-LAB E0372Rb Rabbit Gonadotropin-releasing Hormone ELISA Kit, Intra-Assay: CV<8%, Inter-Assay: CV<10%, Bioassay Technology Laboratory, China), folikül uyarıcı hormon (FSH; BT-LAB E0252Rb Rabbit Follicle-Stimulating Hormone ELISA Kit, Intra-Assay: CV<8%, Inter-Assay: CV<10%, Bioassay Technology Laboratory, China) ve lüteinleştirici hormon (LH; BT-LAB E0251Rb Rabbit

Luteinizing Hormone ELISA Kit, Intra-Assay: CV<8%, Inter-Assay: CV<10%, Bioassay Technology Laboratory, China) seviyelerinin tayini için tavşanlara özel ELİSA kitleri kullanıldı (Resim 2.2).



Resim 2.2: Hormon tayinlerinde ELİSA test prosedürlerinin uygulanması.

2.5. Sperm Örneklerinin Toplanması

Çalışma başlangıcında, tavşanlar 14 gün boyunca suni vajene alıştırıldı. Çalışma süresince haftada 1 kez alınan ejakülatlar, suni vajen yoluyla doğrudan dereceli ve ıslatılmış cam tüplerin içerisine toplandı. Hacim ve ağırlık, ejakülatta bulunan jel kısmı uzaklaştırıldıktan sonra ölçüldü. Ejakülat örnekleri spermatolojik muayeneler yapılana kadar +32°C'lik su banyosunda tutuldu (Ata vd., 2018).

Tavşanlardan sperm alımında gereken uygun sıcaklığı sağlamak için suni vajenin içerisine ılık su (yaklaşık 45 °C) ve hava dolduruldu (Boiti vd., 2005). Böylece suni vajenin ejakülasyon anında normal bir dişi tavşanın vajina sıcaklığına (39 °C) ulaşması sağlandı (Lebas vd., 1997). Sperm alımına hazır olan suni vajenin penröz dren bölümüne kayganlık sağlanması amacıyla vazelin sürüldü. Dişi tavşan ve erkek tavşan aynı kutunun içine konularak erkeğin libido seviyesi artırıldı. Erkek tavşan

çiftleşme için dişiye yaklaşıncı ejakülasyon suni vajen içerisine gerçekleştirildi. Ejakülatlar ılık sperm toplama kadehi (dereceli) ile toplandı (Resim 2.3).



Resim 2.3: Sperm alımı için kullanılan suni vajen ve sperm toplama işlemleri.

2.6. Sperm Analizi

Adaptasyon periodu sırasında suni vajen kullanmaya alıştıran tavşanlardan, çalışma başlangıcı ve sonunda toplanan ejakülatlardan ejakülat hacmi, ejakülat ağırlığı, sperm pH, konsantrasyon ve motilitesi ölçülmüştür (Ata vd., 2018). Ejakülat örnekleri alındıktan hemen sonra pH metre (Orion Ross Ultra pH/ATC Triode, Orion 3 Star pH benchtop, Thermo Scientific, USA) kullanılarak, hidrojen iyon konsantrasyonları ölçüldü. Alınan sperm örnekleri fosfatlı salin tamponu (PBS) ile 10 kat sulandırıldı. Yüzde sperm motilitesini belirlemek için bir ısıtma plakasına (37,8 °C) sahip bir faz-kontrast mikroskobu kullanıldı (400X büyütme, Nikon E

200). Mikroskopta 3 farklı alan taranarak ortalamaları alınmış ve yüzde (%) olarak değerlendirilmiştir.

Ejakülat hacmi, jel uzaklaştırıldıktan sonra, dereceli tüp ile tayin edildi. Ejakülat ağırlığı hassas terazide ölçüldü. Aynı mikroskopta sperm sayımı 0,1 ml formalin salin solüsyonunda (% 0,9'luk salin içerisinde % 4'lük formol) Thoma lamında 400 kat büyütme ile yapıldı. Toplam ejakülatındaki sperm sayısı ise sperm konsantrasyonu ile ejakülat hacmi değerlerinden hesaplandı.

Ölçümler sonunda kalan ejakülatlar 2000 devirde 20 dakika santirfüj edilerek seminal plazma ayrılarak, elde edilen seminal plazmadan 10µL refraktometreye (Atago, SPR-N, Japan) damlatılarak toplam seminal plazma protein seviyeleri (SPTP) kaydedildi.

2.7. Ötenazi ve Testis-Epididimis Ağırlıklarının Tayini

Erkek Yeni Zelanda tavşanlarından ikinci aşamanın bitimiyle kan alındıktan sonra, isoflurane ile genel anestezisi altında ötenazisi yapıldı. Tavşanlara uygulanan ötenazi işleminden sonra eksenterasyon yöntemi ile laparotomi yapıldı. Önce kavum abdominis açılarak karın organlarının dış görünüşleri kontrol edildi. Daha sonra costatom yardımıyla costa'lar caput'larına yakın yerlerden kesildi ve diyafram uzaklaştırılarak göğüs organları incelendi. Skrotum kesesine yapılan ensizyon hattı yardımıyla testis ve epididimis çıkartıldı. Daha sonra bütün tavşanlarda kullanılan etken maddelerin etkilerinin incelenmesi için testis ve epididimis 5°C'lik serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra tartıldı ve dış görünüşleri kontrol edildi. Alınan sağ testis ve sağ epididimis histopatolojik muayene için ayrıldı. Alınan sol testis iki eşit parçaya ayrılarak oksidan-antioksidan ve hormon parametrelerinin tespiti için -80 °C'de saklandı.

2.8. Oksidan ve Antioksidan Tayini

2.8.1. Homojenatların Hazırlanması

Derin dondurucudan çıkarılan testis dokularının tartımı yapıldı ve soğuklukları muhafaza edilerek cam tüplere aktarıldı. Dokuların üzerine 1/10 oranında dilüsyon

olacak şekilde %1,15'lik potasyum klorür içeren bir tampon ilave edildi. Daha sonra dokular yine soğuklukları muhafaza edilerek homojenizatörde 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika homojenize edildi. Hazırlanan bu homojenatlarda MDA ve protein tayini yapıldı.

Homojenat +4°C soğutmalı santrifüjde 1 saat süreyle 5000 g'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlarda GSH-Px, CAT ve GSH enzim aktiviteleri ile protein ölçümü yapıldı. Elde edilen süpernatantlar 1/1 oranında kloroform/etanol (3/5) ile karıştırılıp tekrar soğutmalı santrifüjde 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edildi.

2.8.2. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Ölçümü

Dokularda MDA düzeyleri, lipid peroksidasyonunun aldehid ürünlerinden biri olan MDA ile tiyobarbiturik asitin (TBA) reaksiyonu temeline dayanmaktadır (Placer, 1966). MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbandsı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyonun derecesi saptanmaktadır.

2.8.3. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Ölçümü

Doku GSH-Px aktiviteleri Lawrence ve Burk'un (1976) tarif ettiği metoda göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Metodun esasında, GSH-Px hidrojen peroksit vasıtasıyla indirgenmiş glutasyon (GSH)'un okside glutasyon (GSSG)'a oksidasyonunu katalize eder. Hidrojen peroksit t-bütilhidroperoksitin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorband farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasıyla belirlendi (Lawrence ve Burk, 1976).

2.8.4. Doku Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü

Doku katalaz (CAT) aktiviteleri Aebi (1983)'nin belirttiği metoda göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Enzim aktivite tayininde ya azalan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı ölçülerek enzimin aktivitesi saptandı.

Katalaz, hidrojen peroksit (H_2O_2)'in yıkımını katalize eder. H_2O_2 'in katalaz tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'nin 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. 240 nm'de kör sifra ayarlandıktan sonra 30 saniye içindeki absorbans farkı ölçülmek suretiyle katalaz aktivitesi hesaplandı (Aebi, 1983).

2.8.5. Doku Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Ölçümü

GSH düzeyi Sedlak ve Linsay'ın (1968) metodu ile tayin edildi. Bu tayinde kullanılan; 5, 5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), sülfidril bileşikler tarafından redükte edilmiş bir disülfid bileşiğidir. Oldukça sarı renkli bir anyon oluşturur. Örnek ile DTNB'nin oluşturduğu sarı renkli kompleksin renk şiddeti ortamdaki GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır, 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Sedlak ve Linsay, 1968).

2.8.6. Doku Protein Tayini

Doku protein miktarı Lowry ve diğerlerinin (1951) belirttiği yöntemle göre yapıldı. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile peptid yapar. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayırıcı bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk 650 nm'de okunur. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapıldı (Lowry vd., 1951).

2.9. Histopatolojik Muayene

Deneme süresi sonunda anestezi altında tüm tavşanların nekropsileri yapılarak sağ testis ve epididimis dokuları alınarak % 10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 48 saat süreyle tespit edildi. Doku örnekleri otomatik doku takip cihazına (Leica TP 1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Almanya) konularak rutin takip işlemi kapsamında; doku örnekleri alkol serilerinden (% 70, 80, 96, 100) geçirilerek dehidrasyonları; ksilol serilerinden geçirilerek şeffaflandırılmalarının ardından sonra parafinde bloklandı. Bu bloklardan mikrotomla (Leica RM 2135, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Almanya) 5 mikron kalınlığında alınan seri kesitler

alındı. Her bir tavşandan alınan doku örneği Hematoksilen-Eosin ile boyanarak (Luna, 1968) araştırma ışık mikroskopunda (Olympus BX50-F4, Tokyo, Japan) incelendi, elde edilen sonuçların mikro fotoğrafları (Olympus DP12-BSW, Tokyo, Japan) alındı ve aşağıda yer alan Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru yöntemine uygun olarak skorlandı (Çizelge 2.1; Johnsen, 1970). Bu yöntemde normal testisin ortalama skoru ile 8-10 arasında değişmektedir. Daha düşük değerler ise azalmış germ hücre maturasyonu, spermatogenez ve germinal epitel hasarını göstermektedir.

Çizelge 2.1: Johnsen testiküler biyopsi skoru kriterleri

10	Germinal epitelin santral lümen çevresinde çok katlı yapıda olması, lümenin açık ve çok sayıda spermatozoon içeriyor olması
9	Germinal epitel görülmekle birlikte lümeni tıkayabilecek önemsiz miktarda döküntü, tıkalı lümende spermatozoon ve döküntü epitel görülmesi
8	Germinal epitelin çok tabakalı olması ancak lümende 10'dan az sayıda spermatozoon bulunması
7	Çok sayıda spermatid olması ve hiç spermatozoon olmaması
6	Spermatozoon olmaması ve 10'dan az sayıda spermatid olması
5	Sadece spermatositlerin olması, spermatozoon ya da spermatidlerin hiç olmaması
4	Hiç spermatozoon ve spermatid olmaması ve 5'den az sayıda spermatosit varlığı
3	Germ hücresi olarak sadece spermatogonyum varlığı
2	Sadece Sertoli hücreleri olması ve hiç germ hücresi olmaması
1	Seminifer tubul lümeninde hiç hücre olmaması

2.10. İstatiksel Analiz

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD (Standart Sapma) olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme için SAS istatistik programının PROC ANOVA prosedürü kullanıldı. İstatistiki fark bulunan sonuçlar Tukey testi ile karşılaştırıldı. Tüm istatistiksel uygulamalarda, gruplar arasındaki fark $P < 0,05$ olduğunda fark anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

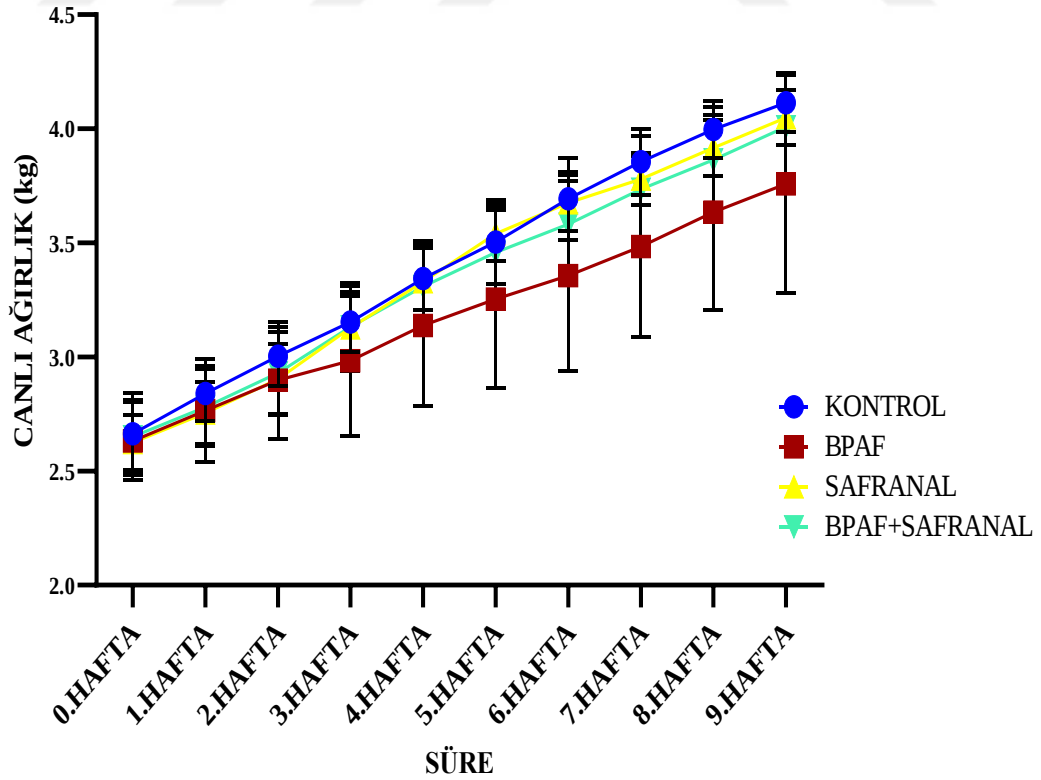
3.1. Genel Sağlık Durumu

Çalışma sırasında tavşanlarda herhangi bir klinik problem ortaya çıkmamıştır. Genel sağlık durumunun kontrolleri çalışma boyunca yapılmıştır. Postür değişimi, denge kaybı, iştahsızlık, halsizlik, çevreye karşı dikkat ve dehidratasyon belirteçleri gibi bulgulara herhangi bir problemle karşılaşılmamış ve ayrıca herhangi bir enfeksiyöz durum gözlenmemiştir.

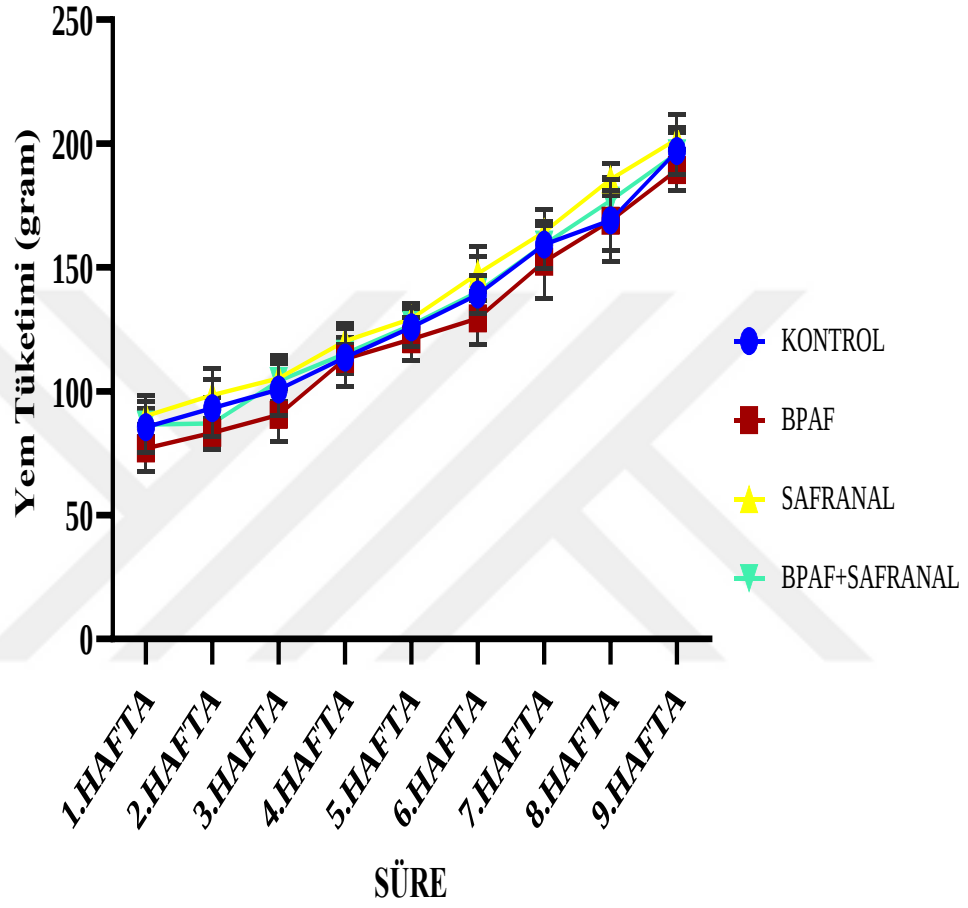
3.2. Canlı Ağırlık ve Yem Tüketimi

Çalışma süresince haftalık olarak canlı ağırlık ve yem tüketimi değerleri ölçülmüştür. Çalışma sonrasında ölçülen canlı ağırlık ve yem tüketimi verilerinde gruplar arasında herhangi bir fark görülmemiştir (Çizelge 3.1). Bu veriler sonucunda, hem çalışma başlangıcında hem de çalışma boyunca canlı ağırlık ve yem tüketiminde gruplar arasında farklılık bulunmamıştır (Grafik 3.1, Grafik 3.2).

Grafik 3.1: Haftalara Göre Grupların Canlı Ağırlıkları (Ortalama $\pm$ SD)



Grafik 3.2: Haftalara Göre Grupların Yem Tüketimi (Ortalama $\pm$ SD)



Çizelge 3.1: BPAF ve safranal'ın 9 hafta uygulama sonrası Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarında canlı ağırlık ve yem tüketimi (ortalama±SD) üzerindeki etkileri.

	K	BF	SF	B+S	P=
Canlı Ağırlık (kg)	4,13 ± 0,11	3,7 ± 0,47	4,04 ± 0,12	4,00 ± 0,23	0,145
Yem Tüketimi (g)	197,0 ± 9,65	189,3 ± 8,47	201,8 ± 9,9	196 ± 8,36	0,161

K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranal grubu. Aynı satırdaki farklı üst simge harfleri (a, b, c) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir.

3.3. Kan Parametrelerindeki Değişiklikler

Çalışma öncesinde tavşanlardan elde edilen tam kan örneklerinde alyuvar, hemoglobin, hematokrit, ortalama alyuvar hacmi (MCV), ortalama alyuvar hemoglobini (MCH), ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) ile beyaz kan hücreleri ve platelet değerlerinde gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2: Deneysel çalışmadan önce Yeni Zelanda Beyaz tavşanlarının bazı kan parametreleri (ortalama±SD).

	K	BF	SF	B+S	P=
RBC (x10⁶/mm³)	6,52±0,39	6,62±0,25	6,44±0,52	6,37±0,41	0,729
Hg (g/dl)	12,21±1,36	12,91±1,43	11,31±1,52	11,43±1,25	0,196
Hmt (%)	41,75±3,14	44,51±4,03	40,88±3,78	40,01±3,39	0,188
MCV (fl)	64,50±1,91	61,48±5,17	63,55±2,28	65,25±2,92	0,260
MCH (pg)	21,95±1,05	21,66±1,10	21,46±1,31	22,01±1,59	0,869
MCHC (g/dl)	33,61±0,72	33,56±0,75	33,16±0,88	33,66±0,64	0,656
MPV (fL)	6,80±0,06	6,86±0,17	6,93±0,25	6,65±0,19	0,088
PDW (fL)	6,51±0,16	6,31±0,29	6,45±0,36	6,76±0,37	0,114
WBC(x10³/mm³)	7,92±0,97	8,15±1,0	8,26±0,66	8,08±1,09	0,936
Lenfosit (%)	53,55±3,96	55,03±8,61	55,30±6,47	55,25±5,77	0,959
Monosit (%)	3,35±0,68	2,71±0,62	2,53±0,55	2,58±0,76	0,155
Granülosit (%)	43,10±3,88	45,58±6,33	43,83±3,72	42,16±5,66	0,689

K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranal grubu. RBC=Toplam Alyuvar Sayısı; Hg=Hemoglobin; Hmt=Hematokrit; MCV= Ortalama alyuvar hacmi; MCH=Ortalama alyuvar hemoglobini; MCHC=Ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu; MPV=Ortalama trombosit hacmi; WBC=Toplam alyuvar sayısı; PDW= Trombosit dağılım genişliği.

Deneysel çalışma sonrası elde edilen örneklerden analizi yapılan kan parametreleri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. BPAF ve safranal'ın bazı kan parametrelerinde önemli farklılıklara neden olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 3.3). Elde edilen sonuçlar BPAF ve safranal uygulamalarının kırmızı kan hücre sayısı, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, MCHC ve platelet değerleri üzerine olumlu ya da olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Buna rağmen, BFAF uygulamalarının toplam beyaz kan hücre sayısında (WBC) bir artışa sebep olduğu gözlenmiş ve WBC değerleri en yüksek BPAF grubunda bulunmuştur. BPAF grubundaki bu artışın, K ve SF gruplarına göre önemli olduğu gözlenmiştir. Lenfosit (%) değerlerinde gruplar arasında önemli bir fark olduğu görülmüştür. BF ve B+S gruplarında K grubuna göre lenfosit yüzdeleri azalırken, K grubu ile SF grubu arasında herhangi bir fark bulunmamıştır. Bununla beraber BF ve B+S gruplarında toplam granülosit (%) değerleri diğer gruplara göre daha yüksektir.

Çizelge 3.3: BPAF ve safranal uygulamasının Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının bazı kan parametreleri (ortalama±SD) üzerindeki etkileri.

	K	BF	SF	B+S	P=
RBC (x10⁶/mm³)	6,23±0,93	6,39±0,67	6,78±0,63	6,74±0,46	0,473
Hg (g/dl)	12,75±0,70	11,23±1,83	12,53±1,09	12,80±0,38	0,088
Hmt (%)	46,93±3,75	41,78±6,37	41,83±3,49	44,98±2,28	0,129
MCV (fl)	61,81±4,44	56,20±5,29	61,03±7,11	60,73±7,98	0,434
MCH (pg)	17,26±1,51	16,70±1,84	17,78±1,57	17,53±1,89	0,726
MCHC (g/dl)	26,93±1,61	27,26±1,66	27,53±0,55	27,83±1,11	0,681
MPV (fl)	6,55±0,23	7,10±0,38	6,45±0,78	6,95±0,37	0,094
PDW (fl)	7,05±0,23	7,11±0,38	7,03±0,45	6,88±0,09	0,652
WBC(x10³/mm³)	7,19 ^c ±0,62	10,75 ^a ±1,27	8,35 ^{bc} ±1,7	9,77 ^{ab} ±1,7	0,001
Lenfosit (%)	42,16 ^a ±9,77	20,96 ^b ±4,15	43,53 ^a ±4,76	21,81 ^b ±10,39	0,001
Monosit (%)	3,68±1,57	2,33±1,14	2,68±0,83	2,50±0,88	0,207
Granülosit (%)	54,18 ^b ±10,1	76,70 ^a ±5,0	53,81 ^b ±4,59	75,66 ^a ±11,2	0,001

K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranal grubu. Aynı satırdaki farklı üst simge harfleri (a, b, c) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. RBC=Toplam Alyuvar Sayısı; Hg=Hemoglobin; Hmt=Hematokrit; MCV= Ortalama alyuvar hacmi; MCH= Ortalama alyuvar hemoglobini; MCHC= Ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu; WBC=Toplam alyuvar sayısı; MPV= Ortalama trombosit hacmi; PDW= Trombosit dağılım genişliği.

3.4. Hormonal Değişiklikler

Çalışma öncesi alınan serum örneklerinde gruplar arası östrojen ve testosteron seviyelerinde herhangi bir farka rastlanmamıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4: Deneysel çalışmadan önce Yeni Zelanda Beyaz tavşanlarının başlangıç serum östrojen ve testosteron konsantrasyonları (ortalama±SD).

	K	BF	SF	B+S	P=
Östrojen (ng/L)	21,52±2,56	19,05±2,14	19,38±2,21	21,51±3,98	0,293
Testosteron (ng/ml)	12,13±0,90	11,57±0,87	11,79±0,84	11,29±1,31	0,540

K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranlal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranlal grubu.

Çalışma sonrası alınan serum, seminal plazma ve testis dokusu örneklerindeki östrojen ve testosteron hormon seviyeleri Çizelge 3.5’de, GnRH, LH ve FSH seviyeleri ise Çizelge 3.6’de verilmiştir. Genel olarak östrojen seviyeleri dışında üreme ile ilgili bakılan diğer hiçbir hormon seviyesinde gruplar arası bir farklılık bulunmamıştır. Çalışma sonrasında elde edilen serum, seminal plazma ve testis dokusundaki testosteron, GnRH, FSH ve LH hormonları düzeylerine bakıldığında gruplar arasında istatistiki bir fark görülmemiş, BPAF ve safranlal uygulamalarının bu hormonlar üzerinde pozitif veya negatif bir etkisine rastlanmamıştır (Çizelge 3.5 ve 3.6). Bununla birlikte serum östrojen seviyeleri BF grubunda, SF ve B+S grubuna göre istatistiki olarak yüksek bulunmuştur. Benzer bir şekilde testis dokusundaki toplam östrojen seviyeleri BF grubu tavşanlarda, SF ve B+S grubuna göre daha yüksek olarak elde edilmiştir. Bu hormonun, serumda ve testis dokusunda SF ve B+S grubunda en düşük değerlere sahip olduğu görülmektedir. BF grubunda serum ve testis dokusunda östrojen miktarı en yüksek değerlerde olmasına rağmen K grubuna göre önemli bir istatistiki farklılık bulunmamıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5: BPAF ve safranal'ın Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının serum, seminal plazma ve testiste bulunan testosteron ve östrojen seviyeleri (ortalama±SD) üzerindeki etkileri.

	K	BF	SF	B+S	P=
Serum Östrojen (ng/L)	20,36 ^{ab} ± 5,02	21,80 ^a ± 4,82	15,31 ^{bc} ± 4,25	14,88 ^c ± 2,87	0,023
Seminal Plazma Östrojen (ng/L)	29,19 ± 8,94	33,7 ± 5,68	36,8 ± 7,51	33,51 ± 12,35	0,546
Testis Östrojen (ng/L)	20,92 ^{ab} ± 3,96	29,84 ^a ± 7,49	8,07 ^c ± 9,15	11,28 ^{bc} ± 12,18	0,001
Serum Testosteron (ng/ml)	12,01 ± 1,99	11,61 ± 1,57	12,17 ± 0,84	11,17 ± 2,05	0,741
Seminal Plazma Testosteron (ng/ml)	42,69 ± 4,63	37,65 ± 4,09	44,70 ± 5,67	44,92 ± 12,73	0,343
Testis Testosteron (ng/ml)	75,5 ± 14,7	66,5 ± 16,5	75,9 ± 22,5	68,7 ± 16,3	0,731

K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranal grubu. Aynı satırdaki farklı üst simge harfleri (a, b, c) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir.

Çizelge 3.6: BPAF ve safranal'ın Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının serum, seminal plazma ve testiste bulunan GnRH, FSH ve LH seviyeleri (ortalama±SD) üzerindeki etkileri.

	K	BF	SF	B+S	P=
Serum GnRH (ng/L)	237,0 ± 31,6	223,3 ± 22,6	225,0 ± 30,7	200,8 ± 18,0	0,150
Seminal Plazma GnRH (ng/L)	153,8 ± 13,3	151,7 ± 22,4	149,6 ± 26,6	160,5 ± 24,6	0,849
Testis GnRH (ng/L)	162,7 ± 17,6	147,9 ± 17,0	161,1 ± 25,5	149,9 ± 27,6	0,575
Serum FSH (mIU/ml)	24,9 ± 3,3	24,3 ± 3,5	23,3 ± 1,5	23,7 ± 3,8	0,842
Seminal Plazma FSH (mIU/ml)	12,6 ± 2,4	12,4 ± 7,5	9,3 ± 4,0	9,4 ± 5,9	0,574
Testis FSH (mIU/ml)	20,5 ± 5,5	13,5 ± 4,5	17,2 ± 7,1	16,0 ± 6,3	0,261
Serum LH (mIU/ml)	9,1 ± 0,6	8,8 ± 1,7	8,7 ± 1,4	10,8 ± 2,3	0,137
Seminal Plazma LH (mIU/ml)	14,3 ± 1,7	13,9 ± 1,9	13,2 ± 0,9	13,8 ± 3,3	0,862
Testis LH (mIU/ml)	13,6 ± 2,6	12,7 ± 2,5	14,5 ± 2,4	13,3 ± 2,7	0,676

K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranal grubu.

3.5. Spermatolojik Değişiklikler

Çalışma başlangıcında alınan ejakülat örneklerine dair spermatolojik veriler Çizelge 3.7’de verilmiştir. Çalışma başlangıcında toplanan ejakülat örnekleri incelendiğinde sperm konsantrasyonu, progresif motilitesinde ejakülat hacmi, ejakülat ağırlığı, seminal plazma toplam proteini ve semen pH’sı gibi bakılan hiçbir değerde gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7: Deneysel çalışma öncesi Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının deney başlangıcındaki spermatolojik parametreler (ortalama±SD).

	K	BF	SF	B+S	P=
Sperm Konsantrasyon ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	272,83±81,3	227,66±77,1	257,83±52,8	244,66±55,2	0,698
Sperm Motilite (%)	62,50±5,24	54,16±12,81	60,83±9,7	61,66±6,83	0,393
Ejakülat Hacmi (ml)	0,63±0,26	0,76±0,24	0,73±0,28	0,85±0,18	0,519
Ejakülat Ağırlığı (mg)	0,828±0,30	0,755±0,21	0,841±0,25	0,848±0,21	0,905
Sperm pH	6,80±0,04	6,80±0,13	6,82±0,10	6,80±0,06	0,987
SPTP (mg/dl)	2,35±0,32	2,41±0,51	2,43±0,46	2,38±0,49	0,989

K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranal grubu. SPTP = Seminal Plazma Toplam Protein. Aynı satırdaki farklı üst simge harfleri (a, b, c) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir.

Dokuz haftalık çalışma süresinin sonunda gruplardan elde edilen spermatolojik değerler Çizelge 3.8’te sunulmuştur. BPAF’nin ejakülat hacmi ve ağırlığı, sperm PH’sı ve seminal plazma toplam protein değerleri üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Testis ve epididimis yaş ağırlıkları da benzer bir şekilde gruplar arasında farklılık göstermedi. Bununla birlikte BPAF uygulamasının sperm konsantrasyonu ve progresif motilite üzerine olumsuz etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. BF grubunda bu değerler hem K hem de SF grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, BPAF’ye ek olarak verilen safranal’in (B+S grubu), BPAF’nin bu iki parametre üzerine olumsuz etkisini azaltmada başarılı olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8: BPAF ve safranal'in Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının bazı üreme parametreleri (ortalama±SD) üzerindeki etkileri.

	K	BF	SF	B+S	P=
Sperm Konsantrasyon (x10⁶/mm³)	284,2 ^a ±67,4	194,0 ^b ±65,7	305,8 ^a ±35,2	246,7 ^{ab} ±43,5	0,012
Sperm Motilite (%)	64,16 ^a ±5,8	45,0 ^b ±8,94	67,5 ^a ± 8,21	63,33 ^a ± 6,05	0,001
Ejakülat Hacmi (ml)	1,01± 0,27	0,85±0,1	1,0 ± 0,23	0,91±0,24	0,557
Ejakülat Ağırlığı (mg)	0,96 ± 0,37	0,77 ± 0,19	0,98 ± 0,33	0,88 ± 0,33	0,654
Sperm pH	6,83 ± 0,05	6,75 ± 0,11	6,86 ± 0,1	6,8 ± 0,04	0,183
SPTP (mg/dl)	2,43 ± 0,46	2,43 ± 0,5	2,28 ± 0,41	2,48 ± 0,48	0,892
Testis Ağırlığı (g)	3,33 ± 0,20	3,14 ± 0,19	3,15± 0,19	3,16± 0,23	0,368
Epididimis Ağırlığı (g)	0,77 ± 0,09	0,78 ± 0,07	0,80 ± 0,08	0,79 ± 0,08	0,888

K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranal grubu, SPTP = Seminal Plazma Toplam Protein. Aynı satırdaki farklı üst simge harfleri (a, b, c) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir.

3.6. Oksidan-Antioksidan Parametrelerdeki Değişiklikler

Çalışma sonunda elde edilen testis dokularından analizleri yapılan MDA, GSH, GPx, CAT değerleri Çizelge 3.9'da gösterilmiştir. BF grubunda MDA değerleri diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur. SF ve K grupları arasında testis MDA değerlerinde herhangi bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca bu gruplarda MDA seviyesi diğer iki grupta bulunan tavşanlara göre daha düşüktür. B+S grubundaki MDA seviyeleri K ve SF gruplarına göre daha yüksek olmasına rağmen, BF grubu ile kıyaslandığında testis MDA seviyelerini pozitif yönde etkilediği görülmektedir. Ayrıca BFAF uygulamalarının testis GSH seviyesi üzerine olumsuz etkileri olduğu görülmüştür. BF grubundan elde edilen GSH seviyelerinin SF ve B+S gruplarına göre önemli olarak düşük bulunmuştur. Bununla birlikte testis GPx ve CAT değerleri arasında gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir.

Çizelge 3.9: BPAF ve safranal'ın Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarının testis dokularında bazı oksidan-antioksidan parametreler (ortalama±SD) üzerine etkileri.

	K	BF	SF	B+S	P=
MDA (nmol/g protein)	3,67 ^c ±0,47	16,30 ^a ±6,16	4,64 ^c ±1,00	8,77 ^b ±0,55	0,0001
GSH (nmol/g protein)	1,74 ^{ab} ±0,20	1,43 ^b ±0,17	1,84 ^a ±0,21	1,97 ^a ±0,36	0,009
GPx (IU/g protein)	26,95±3,52	25,93±2,49	26,69±2,67	25,95±2,11	0,884
CAT (IU/g protein)	91,35±5,88	90,13±4,84	90,99±6,02	88,93±5,37	0,877

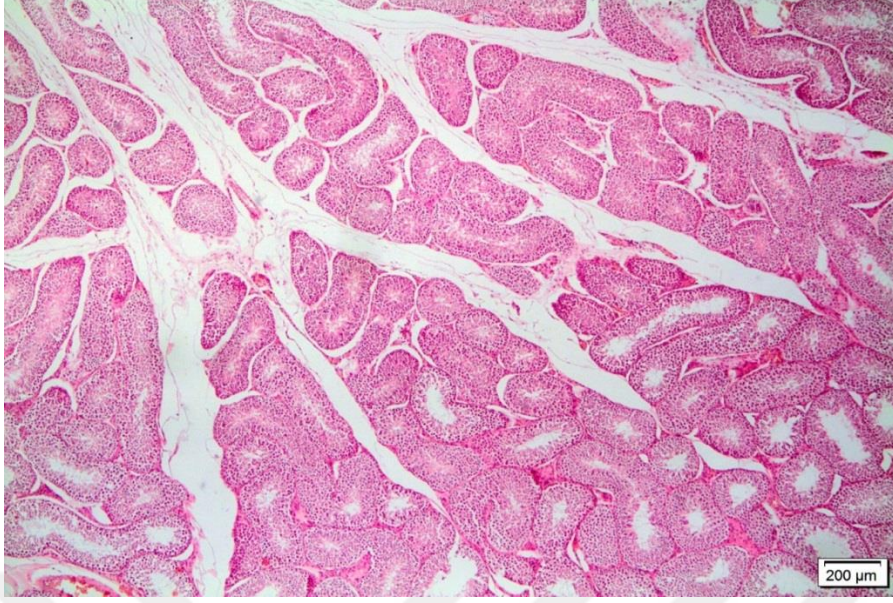
K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranal grubu. Aynı satırdaki farklı üst simge harfleri (a, b, c) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir.

3.7. Histopatolojik Bulgular

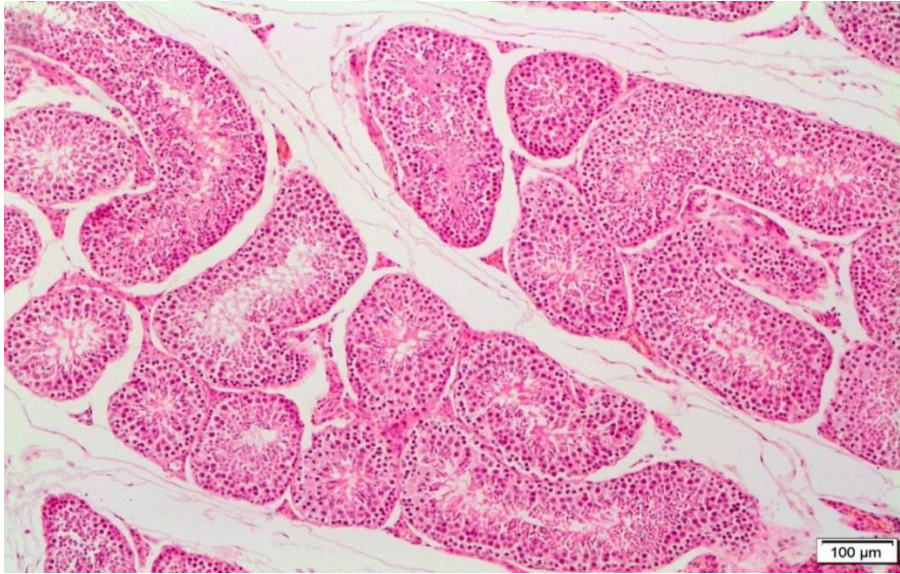
Tüm deneme grubu tavşanların testis ve epididimislerinin makroskobik incelenmesinde herhangi bir lezyona rastlanılmadı.

3.7.1. Testis Dokusuna Ait Histopatolojik Bulgular

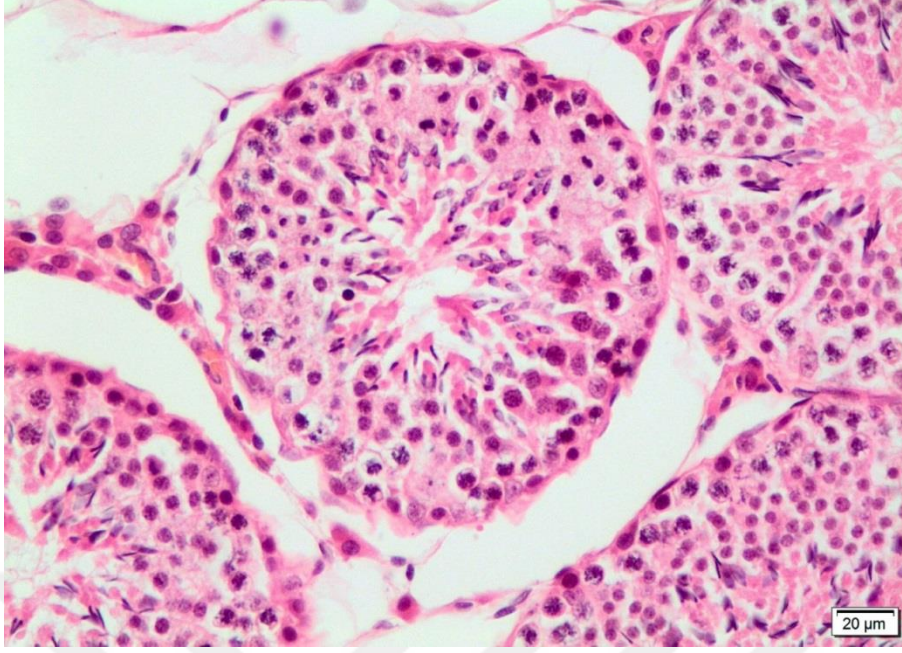
Kontrol grubunda yer alan tavşanların testis dokuları incelendiğinde; bazal membran, seminifer tubullerin germinatif epitel ve Sertoli hücreleri ile interstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri normal histolojik yapıda gözlemlendi. Tubulus seminiferus kontortus yapılarının düzgün ve lümenlerinin belirgin yapıda olduğu, tubulus duvarının 4-6 sıralı spermatogenik germinatif epitel seri hücreleri ve Sertoli hücreleri de içine alan kalın bir katman halinde olduğu görüldü. Spermatogenik hücreler bazal membrandan itibaren sırasıyla kök hücre özelliğinde olan spermatogonyumlar ile primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoa aşamalarında gözlemlendi. Spermatogenik aşamalardan geçen spermatidler, kuyrukları lümende, başları tubulusun duvarına yönelik normal şekilde gözlemlendi. İnterstisyel alanda yer alan yuvarlak görünümlü, eozinofilik sitoplazma ve eksantrik yerleşimli çekirdeğe sahip olan Leydig hücreleri tek tek ya da gruplar halinde normal görünümde izlendi. İnterstisyel alanda yer alan vasküler yapılar normal görünümlü idi. Tubulus seminiferus kontortus yapılarının etrafında yassılaştırmış ve uzun çekirdekleri ile yer alan tek sıralı normal histolojik yapıdaki myofibroblast hücreleri görüldü (Resim 3.1, 3.2, 3.3).



Resim 3.1: Kontrol grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X40



Resim 3.2: Kontrol grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X100

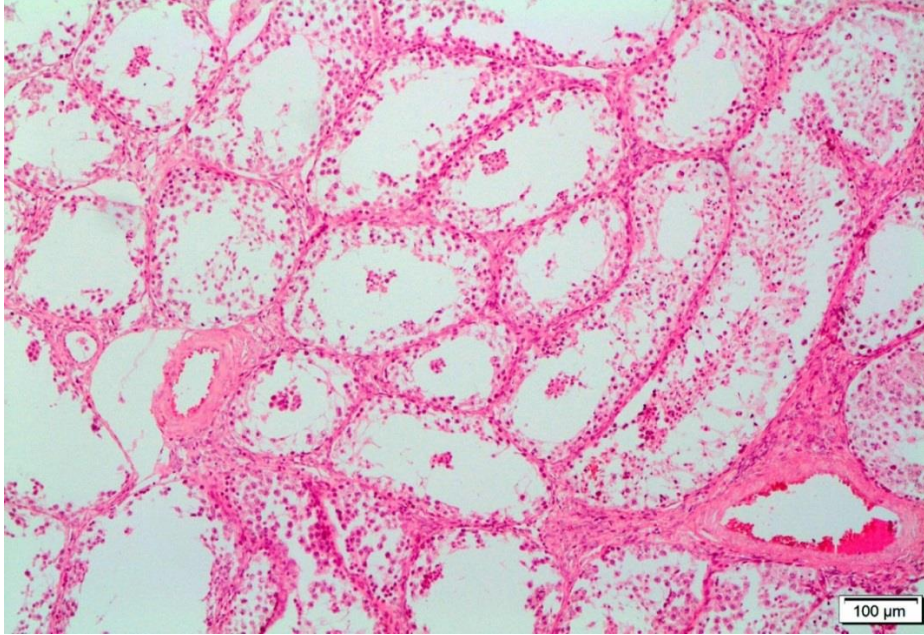


Resim 3.3: Kontrol grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının daha yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

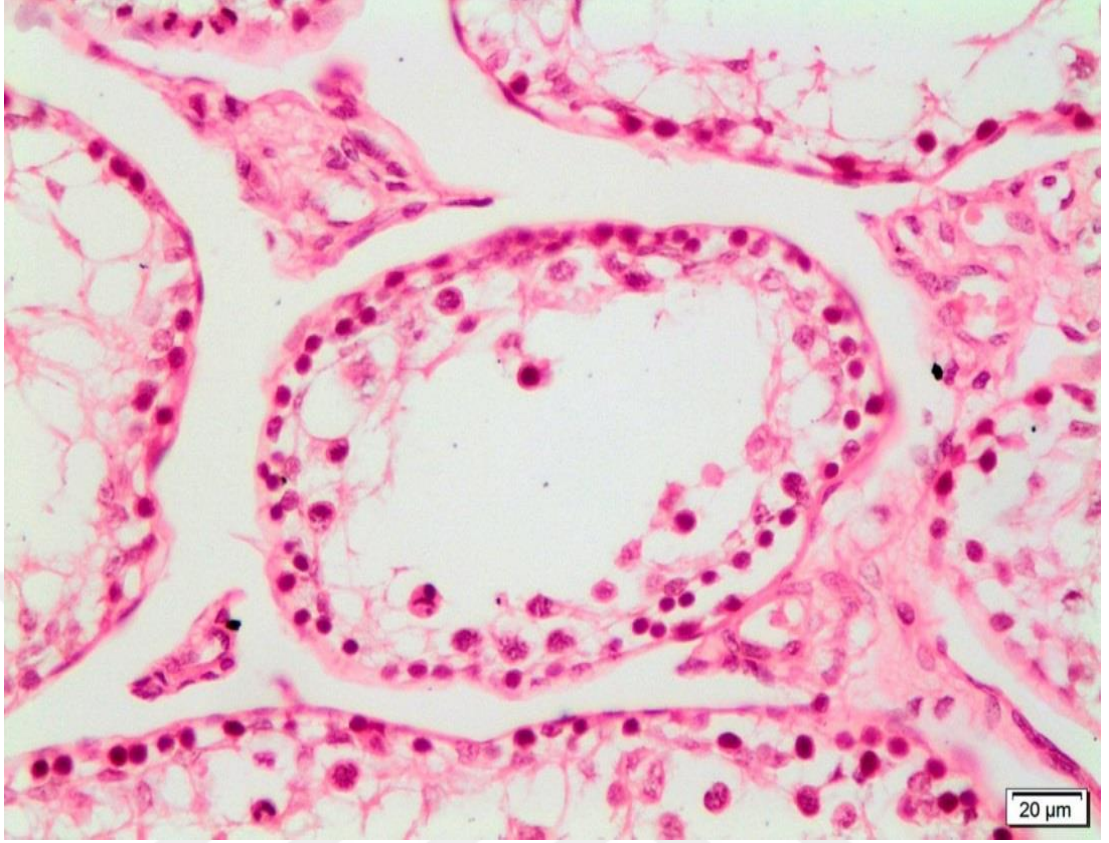
Oral yolla BPAF verilen gruptaki tavşanların testislerinin mikroskopik olarak incelenmesinde tubulusların çoğunluğunun morfolojilerinin bozulduğu ve bazılarının atrofiye olduğu görüldü. Dejenere tubulusların çoğunluğunda germinatif epitel hücrelerin bazal membrandan ayrılarak spermatogenik hücre serilerini oluşturan farklı gelişim aşamalarındaki hücrelerde belirgin bir kayba ve disorganizasyona yol açtığı, dolayısıyla germinatif epitel kalınlığında azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Germinatif epitel kalınlığındaki bu azalmanın spermatogenik hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açtığı ve yer yer sadece bazal membran ile kök hücre özelliğinde olan spermatogonyumlar ve Sertoli hücrelerinin bulunduğu izlendi. Dejenere tubuluslarda germinal hücrelerde dejenerasyon ile bazı spermatogonyumların çekirdeklerinin küçülüp büzülerek piknotik çekirdekli bir hal aldığı ve spermatogenezisin durduğu veya büyük oranda azaldığı, dejenere tubulus germinatif epitel hücreleri ve yer yer interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde vakuoller ile interstisyel alanlarda yer yer ödem gözlemlendi. Bazı tubuluslarda germinatif epitelden dökülen hücrelerin lümende biriktiği tespit edildi. Bazı alanlarda tubulusların bittiği bölgelerin birbirlerinden ayrıldığı belirlendi (Resim 3.4, 3.5 ve 3.6).



Resim 3.4: BPAF grubuna ait testis dokusunun mikroskopik görünümü. H.E. X40

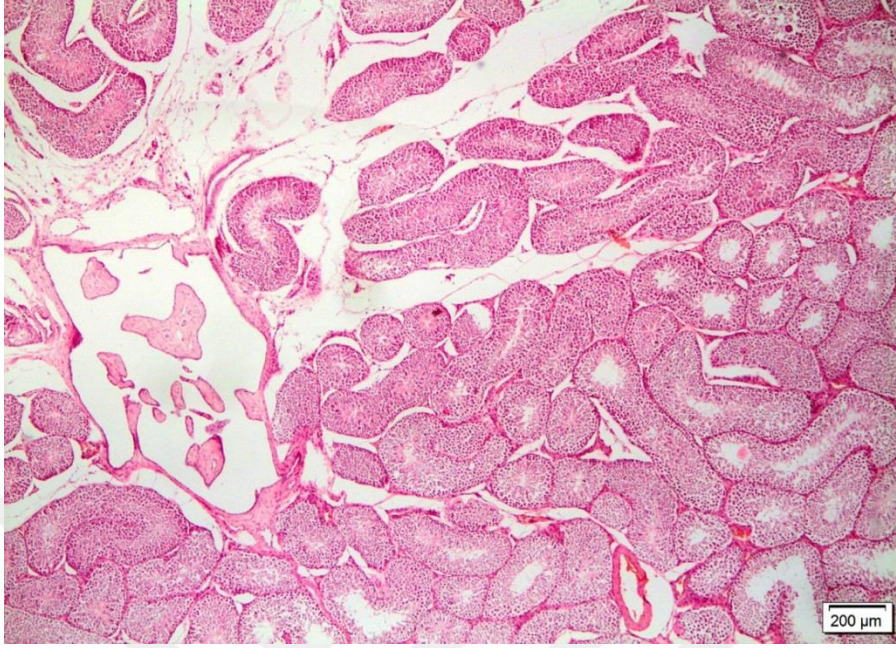


Resim 3.5: BPAF grubuna ait testis dokusunda yapıları tamamen bozulmuş seminifer tubulların yakın mikroskopik görünümü. H.E. X100

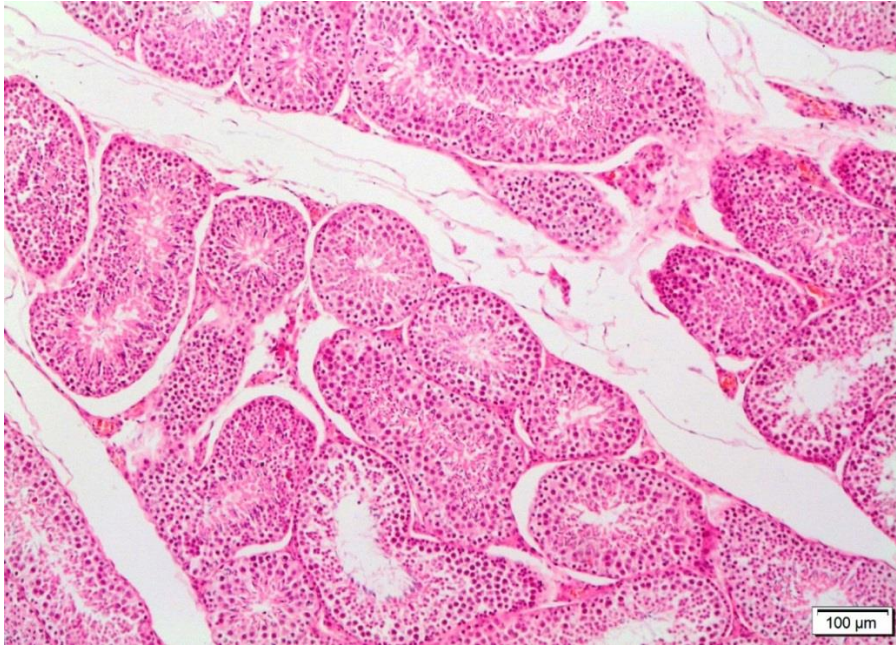


Resim 3.6: BPAF grubuna ait testis dokusunda yapısı tamamen bozulmuş seminifer tubulusta dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin daha yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

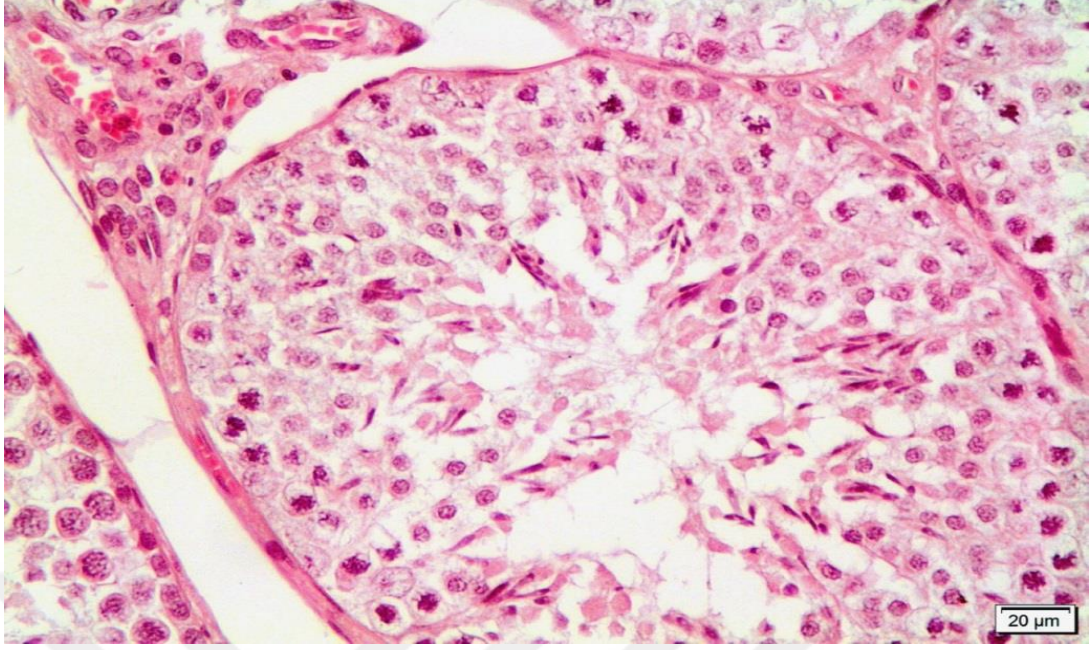
B+S grubunda bulunan tavşanların tubuluslarında büyük oranda morfolojik olarak normale yakın görünümde olmakla birlikte bazı tubuluslarda ve Leydig hücrelerini de içeren interstisyel alandaki morfolojik değişikliklerin sadece BPAF uygulanan gruba göre daha hafif derecede olduğu, dejenere tubuluslarda spermatogenik hücre serisinde kısmen hafif derecede bozulma ile birlikte bazı germinatif hücrelerde tek tük vakuoller dikkat çekti. Bu grupta çoğunlukla tubulus bazal membranı üzerinde düzenli dizilim gösteren spermatogonyumlar, spermatogenezise ait farklı gelişim aşamalarındaki germinatif epitel hücreleri, Sertoli hücreleri ve bu hücreler arasındaki bağlantılar spermatozoaları da içerecek şekilde spermatogenezise devam ettiği görüldü. Leydig hücrelerini de içeren interstisyel alan, normal görünümde olup bu alanlarda herhangi bir ödem veya damarlarda konjesyona rastlanılmadı (Resim 3.7, 3.8 ve 3.9).



Resim 3.7: BPAF+Safranal grubuna ait testis dokusunun normale yakın histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X40

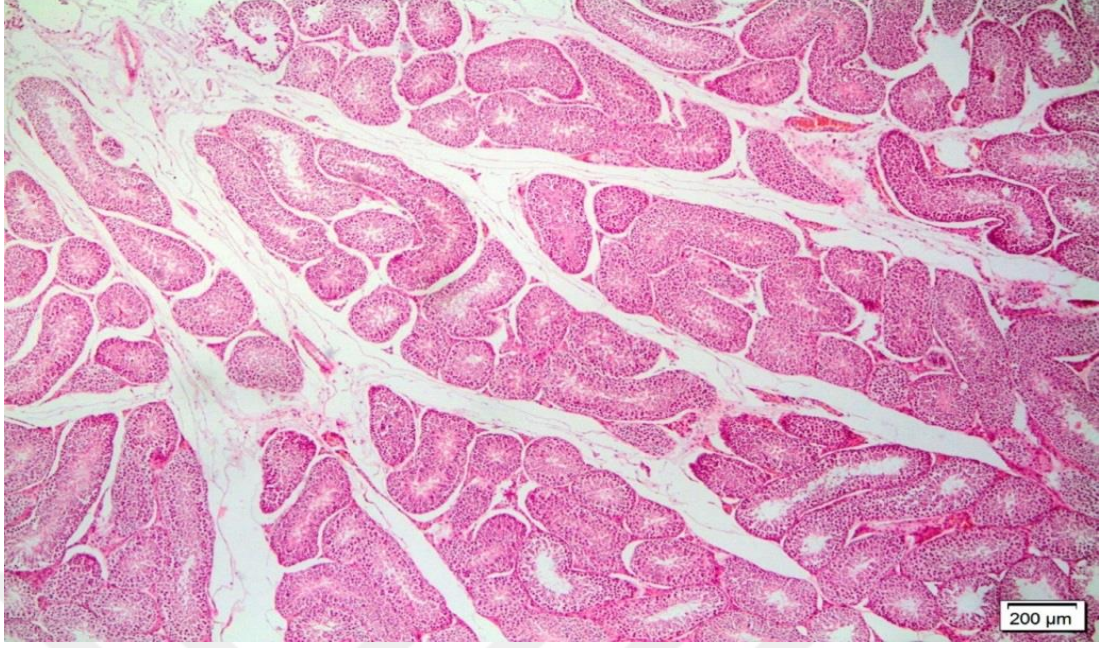


Resim 3.8: BPAF+Safranal grubuna ait testis dokusunun normale yakın histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X100

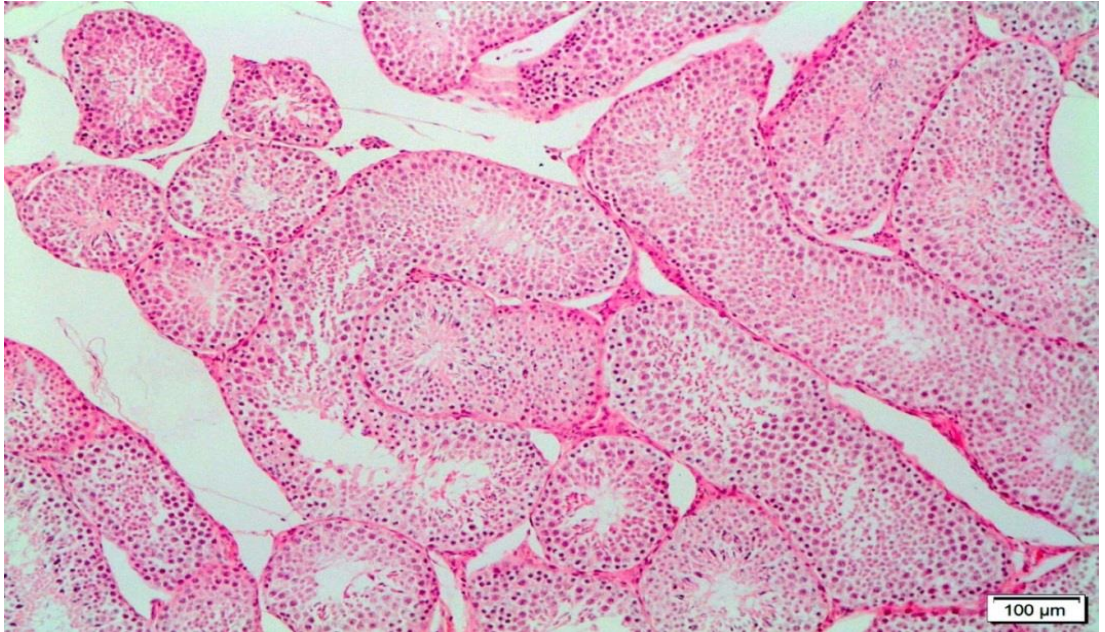


Resim 3.9: BPAF+Safranal grubuna ait testis dokusunda germinatif epitel hücre serileri ve interstisyumda yer alan Leydig hücreleri ile vasküler yapıların normale yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

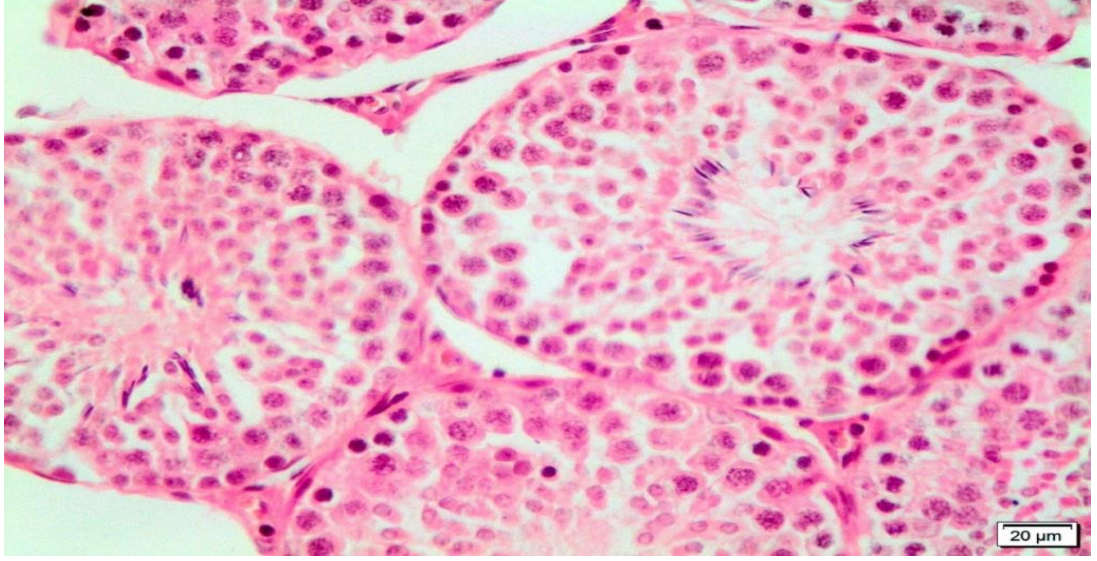
Safranal uygulaması yapılan gruba ait tavşanların testis dokularında, tubulus bazal membranı, tubulus duvarındaki spermatogenik hücre serilerini oluşturan spermatogonyum, spermatosit, spermatid hücreleri ile destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ile Leydig hücrelerini de kapsayan interstisyel alanın kontrol grubuna benzer bir histolojik yapıda olduğu, spermatogenezin normal devam ettiği gözlemlendi (Resim 3.10, 3.11 ve 3.12).



Resim 3.10: Safranal grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X40



Resim 3.11: Safranal grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X100



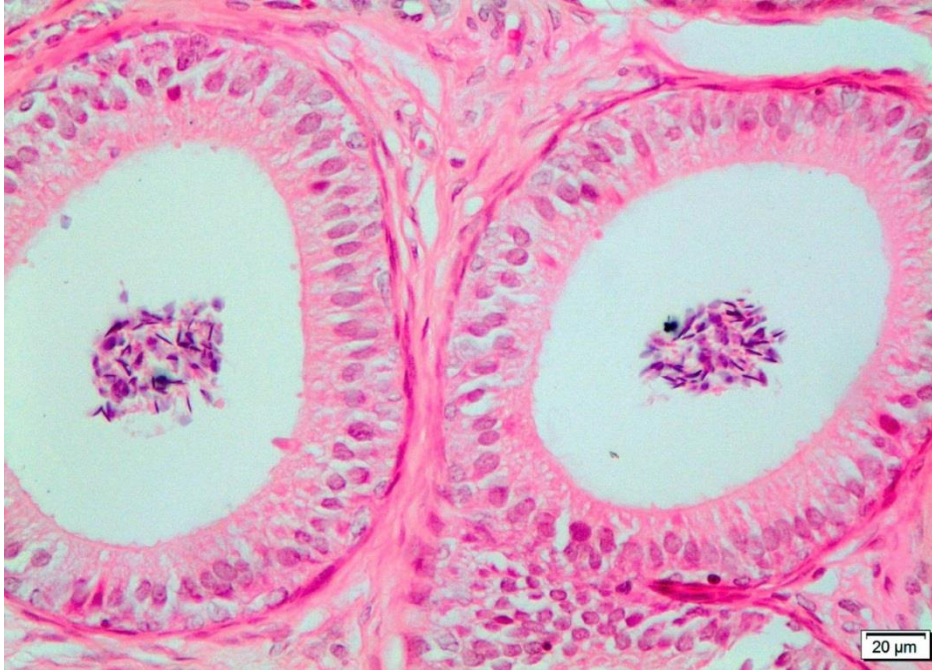
Resim 3.12: Safranal grubuna ait testis dokusunun normal histolojik yapısının daha yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

3.7.2. Epididimis Dokusuna Ait Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait tavşanların epididimislerinin kauda bölümündeki kanallar, histolojik olarak oval şekilli ve normal epitel kalınlığı olan ve intraluminal sperm varlığı ile karakterizedydi. İnterstisyumda normal vasküler yapılar gözlemlendi. Temel hücre tipleri; esas hücreler, bazal hücreler ve şeffaf (berrak) hücreler olan duktusların epitel katmanları normal histolojik yapıda izlendi. Duktus epididimislerde aralarda açık renk sitoplazmaları ile ayırt edilen şeffaf (berrak) hücreler de normal histolojik yapıda izlendi. Ayrıca bu gruba ait duktuslar arasındaki intersitisyel bağ dokuda kollajen lif demetleri ve bağ doku hücreleri normal olarak görüldü (Resim 3.13 ve 3.14).

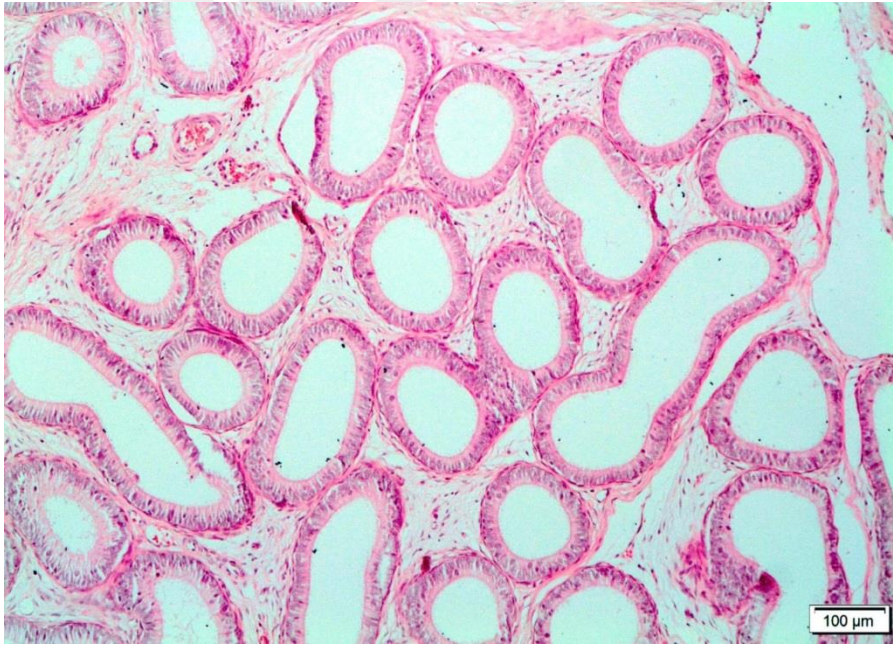


Resim 3.13: Kontrol grubuna ait epididimis dokusunun normal histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X100

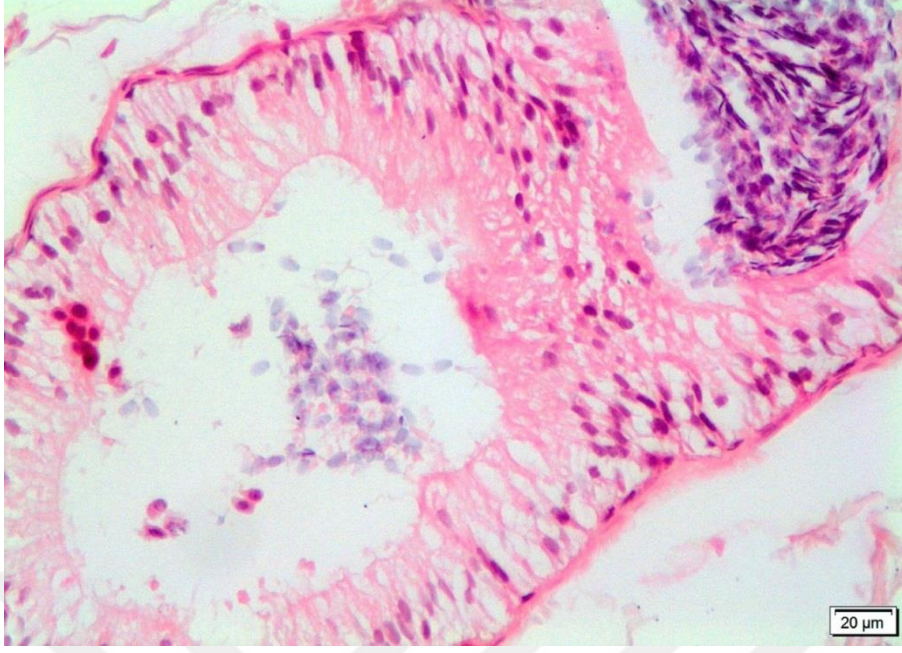


Resim 3.14: Kontrol grubuna ait epididimis dokusunun normal histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

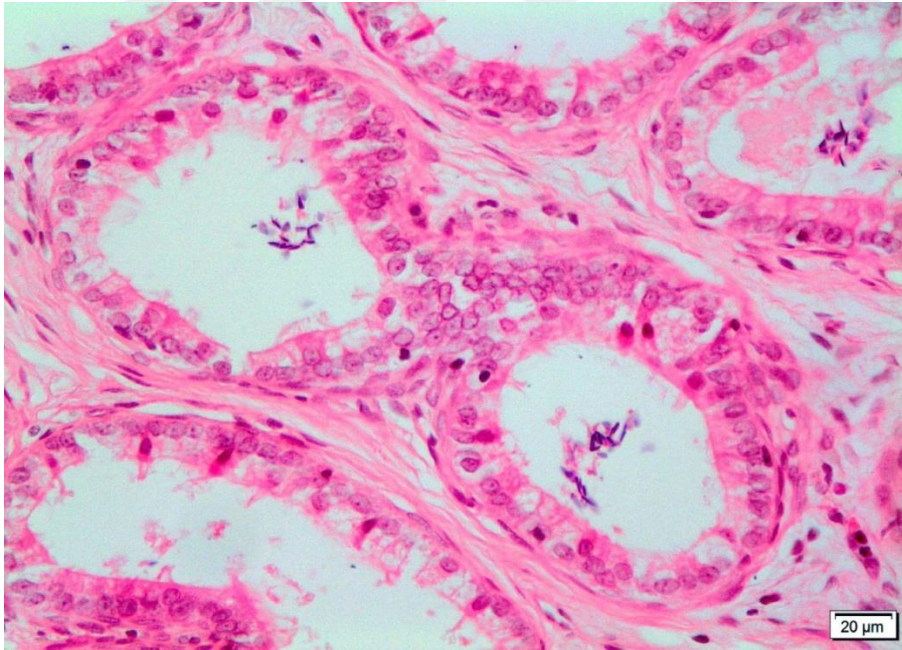
BPAF grubuna ait tavşanların epididimal kanallarından bazıları kontrol grubuna göre normal şekil ve yapılarını kaybederek morfolojilerinin bozulduğu, bazılarının bazal membranının daha kıvrımlı hal aldığı veya birkısım duktusların bazal membranının ayrıldığı, bazı duktuslarda yer yer kanal duvarını döşeyen epitel dokusunun kayba uğrayarak incelendiği, bazı duktuslarda duvarı oluşturan epitel hücrelerin sitoplazmalarında vakuolleşmelerin olduğu yapılarla karakterize dejenerasyonların ve piknotik çekirdekli koagulatif nekrotik değişikliklerin olduğu, epitel katmanda yapı bütünlüğünün bozulduğu, birkısım duktusların epitel hücrelerinin lümene döküldüğü dikkati çekti. Ayrıca bazı duktuslarda luminal sperm azlığı veya yokluğu da tespit edildi. Duktusları çevreleyen sirküler kas tabakasında yer yer ayrılmalar ile interstisyel bağ dokuda az da olsa kayıplar olduğu izlendi. Bazı kanalların şeffaf hücrelerinde hiperplazi görüldü (Resim 3.15, 3.16, 3.17 ve 3.18).



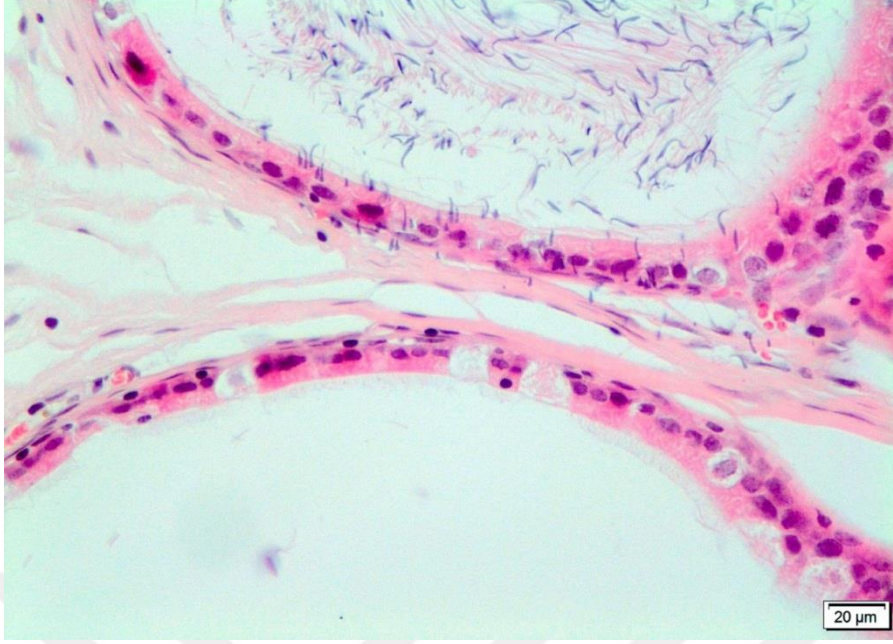
Resim 3.15: BPAF grubuna ait epididimis dokusunda dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin mikroskopik görünümü. H.E. X100



Resim 3.16: BPAF grubuna ait epididimis dokusunda epitel hücrelerde vakuoler dejenerasyon ve piknotik çekirdekli koagulasyon nekrozlarının olduğu yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

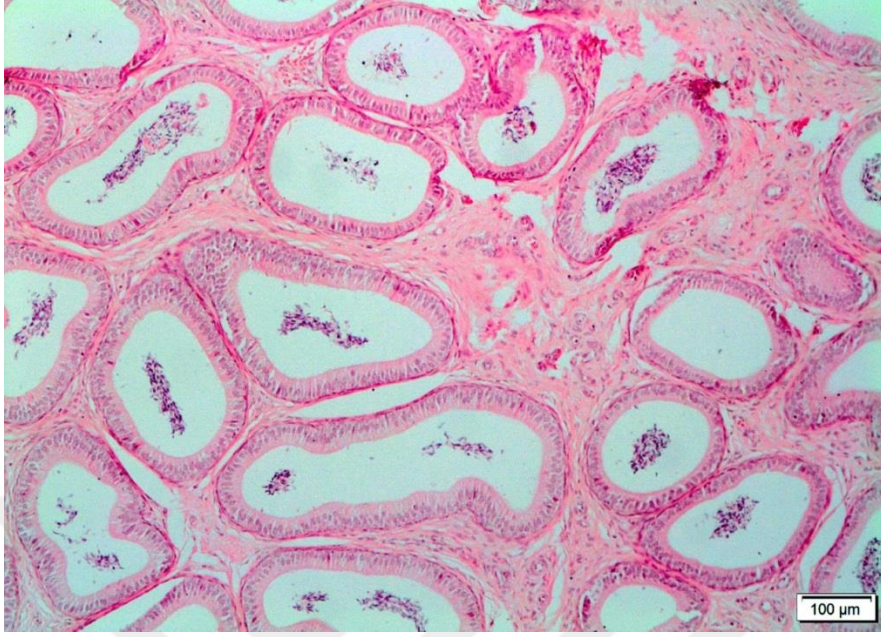


Resim 3.17: BPAF grubuna ait epididimis dokusunda dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

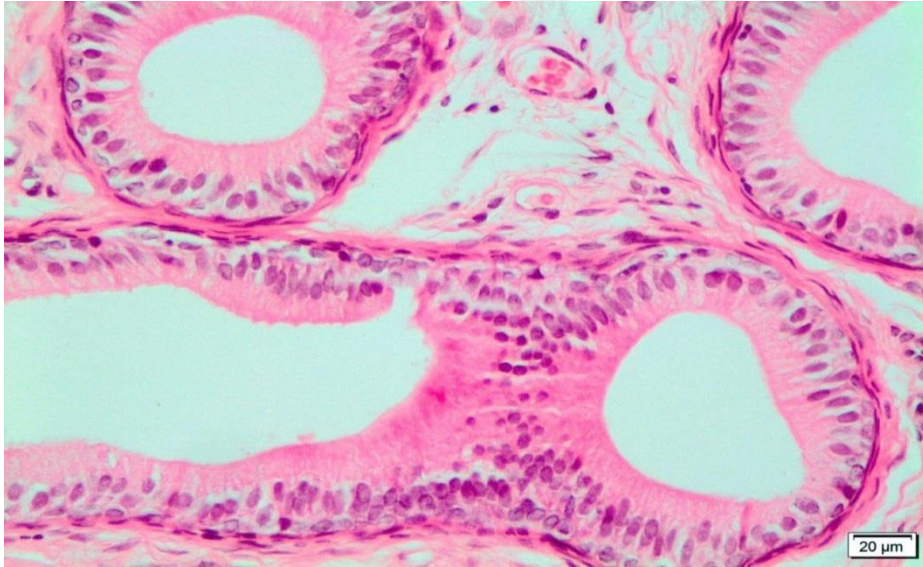


Resim 3.18: BPAF grubuna ait duktus epididimis dokusunda şeffaf hücrelerinde hiperplazi ve koagülasyon nekrozların yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

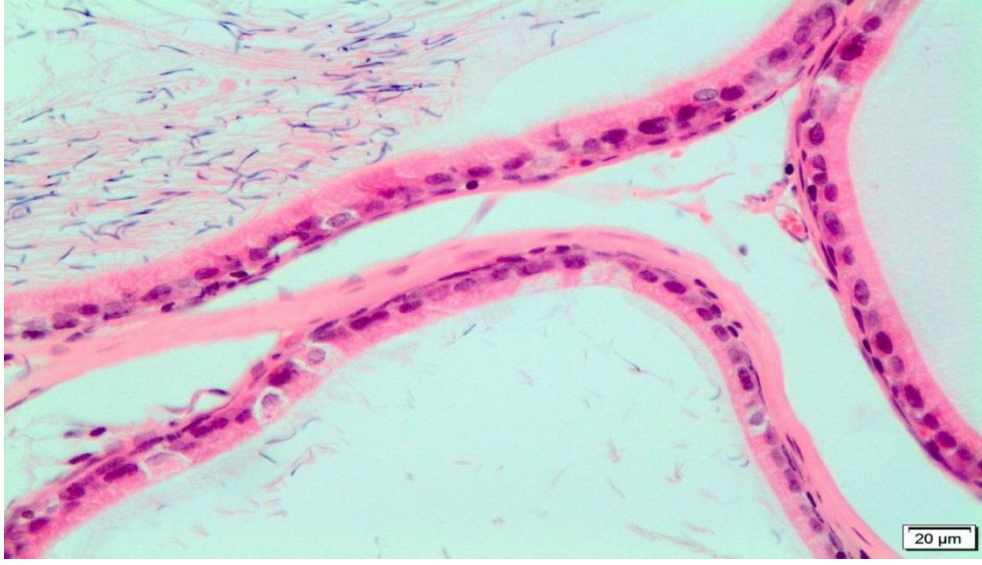
B+S grubuna ait tavşanlarda epididimal kanalların ve intersitisiyel bağ dokusunun sadece BPAF verilen gruba göre morfolojik yapılarının korunmuş olduğu tespit edildi. Kısım de olsa bazı kanal epitel hücrelerinde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler görülmekle birlikte bu duktuslarda duvarı döşeyen epitel dokusunun kaybının önemli ölçüde azaldığı, epitel katmanda yapı bütünlüğünün sürdürüldüğü, dolayısıyla sadece BPAF uygulanan gruba kıyasla kanal duvarında incelmanin belirgin bir önlendiği gözlemlendi. Benzer şekilde BPAF ile birlikte Safranal uygulamasıyla bazı kanalların şeffaf hücrelerinde hiperplazinin de azaldığı görüldü. Yine kontrol grubuna göre bazı epididimal kanallarda sperm yoğunluğunda azalma olmakla birlikte sadece BPAF verilen grupla kıyaslandığında intraluminal sperm yoğunluğunda belirgin bir artış izlendi. Epididimal kanalları çevreleyen periduktal sirküler kas dokusunun düzenli görünüm sergilediği görüldü. İnterduktal alandaki intersitisiyel bağ dokusunun sadece BPAF verilen gruba oranla bağ doku hücreleri ve kollajen liflerin yoğunluğu ve vasküler oluşumlar açısından normale yakın bir yapıda olduğu, bu itibarla kontrol grubuna yakın bir histolojik görünüm arzettiği görüldü (Resim 3.19, 3.20 ve 3.21).



Resim 3.19: BPAF+Safranal grubuna ait epididimis dokusunun normale yakın histolojik yapısının mikroskopik görünümü. H.E. X100

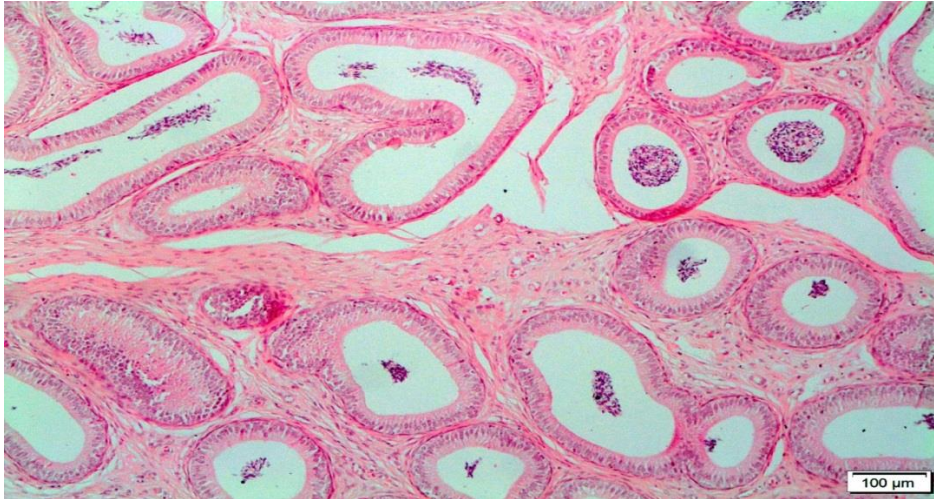


Resim 3.20: BPAF+Safranal grubuna ait epididimis dokusunun normale yakın histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

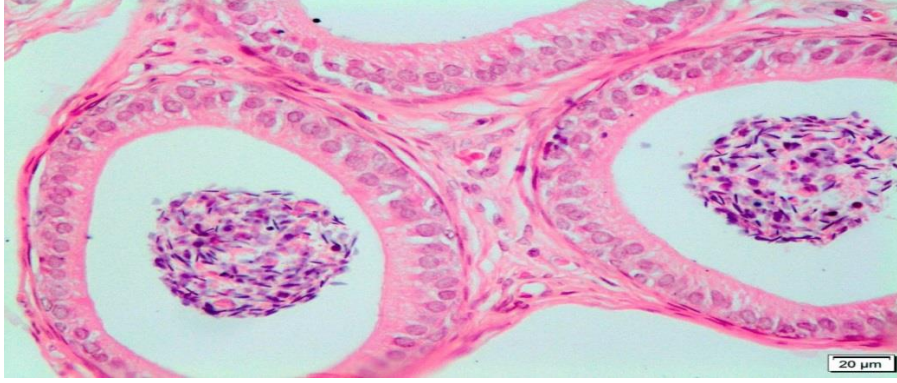


Resim 3.21: BPAF+Safranal grubuna ait duktus epididimis dokusunun şeffaf hücrelerinde hiperplazi haricinde normale yakın histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400.

Safranal uygulanan gruba ait tavşanların epididimislerinin duktuslarının morfolojik yapıları, kanalların duvarını döşeyen epitel hücreleri, luminal sperm yoğunluğu, interstisyel yapıların durumunun kontrol grubu ile benzer bir histolojik görüntü arzettiği görüldü (Resim 3.22 ve 3.23).



Resim 3.22: Safranal grubuna ait epididimis dokusunun normal histolojik yapısının mikroskopik görünümü H.E. X100



Resim 3.23: Safranal grubuna ait epididimis dokusunun normal histolojik yapısının yakın mikroskopik görünümü. H.E. X400

3.7.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Testis dokusundan alınan örneklerin hematoxilen-eozin tekniğine göre boyanarak ışık mikroskopu altında Johnsen skorları kriterlerine göre skorların ortalamaları aşağıdaki çizelgede (Çizelge 3.10) sunulmuştur. Johnsen testiküler biyopsi skoru sonuçlarına göre Kontrol grubu ile Safranal grubu skorlarının benzer, BF grubu ile K grubu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli ölçüde düşük, B+S grubunun K grubuna yakın, BPAF grubundan istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edildi ($P = 0,0001$).

Çizelge 3.10: Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (ortalama $\pm$ SD)

	K	BF	SF	B+S	P=
Johnsen skoru	9.5 ± 0.54^a	3.5 ± 1.04^c	9.1 ± 0.44^a	$7,1 \pm 0.75^b$	0.0001

K= Kontrol grubu, BF= Bisfenol AF grubu, SF= Safranal grubu, B+S= Bisfenol AF+Safranal grubu. Aynı satırdaki farklı üst simge harfleri (a, b, c) gruplar arasında istatistiksel “ $\pm$ ” olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Endokrin bozucu kimyasallar (EDC'ler), hayvanların endokrin sistemine müdahale etme ve suda yaşayan omurgalıların üreme sağlığını etkileme kabiliyetine sahip oldukları için çevrede bulunan maddelerin tehlike değerlendirmesinde odak noktası olmuştur (Urbatzka vd., 2012, Schiller vd., 2013). Yirmibirinci yüzyılda giderek artan endüstriyel Bisfenol AF (BPAF) kullanımına bağlı olarak, hem hayvansal hem de bitkisel kaynaklardan elde ettiğimiz ürünlerin bu kimyasal ile kontamine olması ve dolayısı ile çevremizdeki bütün memelilerin besin zinciri içerisinde bulunması kaçınılmazdır. Bu yüzden, bisfenol A (BPA) ve analogları, her yerde bulunmaları ve dolayısıyla insanlar ve organizmalar tarafından çevreden ve besin zinciri yoluyla artan maruziyetleri nedeniyle giderek bir endişe kaynağı olmuştur (Song vd., 2012, Li vd., 2013, Jo vd., 2014). BPA analogları arasında BPAF, BPA'nın en yaygın kullanılan alternatiflerinden biridir ve gıda ambalajı, elektronik ürünler ve optik elyaf üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Matsushima vd., 2010). Günümüzde besin ile temas eden birçok malzemede artan BPAF kullanımı, BPAF'yi de önemli bir doğa kirleticisi yapmıştır (Feng vd., 2012).

BPAF'nin yüksek sıcaklık kompozitlerinde, elektronik malzemelerde ve gaz geçirgen membranlarda polikarbonat kopolimerlerde sıkça kullanılması, BPAF'nin sedimanlarda veya toprakta kilogram başına birkaç mikrograma ve nehir suyunda litre başına bir düzine mikrograma kadar konsantrasyonlara sahip su sistemleri de dahil olmak üzere çok çeşitli çevresel matrislerde sürekli olarak tespit edilmesine yol açmıştır (Song vd., 2012, Yang vd., 2014b). BPAF'nin toksikolojik etkileri hakkında sınırlı bilgi mevcuttur ve BPAF'nin maruz kalma sınırlarına ilişkin veri bulunmamaktadır. Bu sebepten dolayı, yapılan bu çalışmada en çok kullanılan bir BPA analogu olarak BPAF ile güçlü bir antioksidan olan safranal'ın Yeni Zelanda Beyaz tavşanlarındaki spermatolojik, oksidan-antioksidan ve çeşitli kan parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Bisfenol A (BPA) ve analogları serum albümine bağlanarak kan tarafından taşınır (Zhao vd., 2021). Bu yüzden BPA, bazı biyokimyasal ve hematolojik parametreleri etkileyebilmektedir. BPA'nın bu etkilerini dişi ratlarda inceleyen bir çalışmada, WBC değerleri artarken lenfosit yüzdelerinde önemli bir düşüş olduğu belirtilmiştir.

Aynı zamanda bu çalışmada nötrofil yüzdelерinde de anlamlı bir artış olduğu görölmektedir. Çalışmamızda BPAF'nin mevcut etkilerinin, BPA'nın bu etkisine benzer olduğu görölmektedir. Ayrıca granülosit değерlerimizde ki bu artış, nötrofil artışı ile ilişkilendirilebilir (Abid ve Hassan, 2016). BPAF ile yapılan *in vitro* bir çalışmada insan periferik kan mononükleer hücreleri üstünde sitotoksik potansiyelinin olduğu belirtilmiştir (Michałowicz vd., 2015).

BPAF'nin, BPA ve diğer BPA analoglarına göre eritrositlerde daha güçlü apoptotik potansiyel sergilediği bildirilmiştir (Maćczak vd., 2016). BPA'nın, Yeni Zelanda tavşanlarında ise WBC, lenfositler, monositler, granülositler ve trombositler üstünde herhangi bir etkisi bulunmazken, eritrosit sayısı ve hemoglobin üstünde negatif etki göstermiştir (Gulay ve Yıldız Gulay, 2018). Alabalıklarda ise BPA eritrositlerde mikronükleus sıklığında artışa neden olmuştur (Frenzilli vd., 2021). Polikistik Over Sendromlu kadınlarda BPA; HCT, MCV, MCH, WBC ve MPV gibi kan değерlerinde herhangi bir değışikliğe neden olmamıştır (Kawa vd., 2019). Erkek ratlarda yapılan bir çalışmada RBC, HGB, HCT, MCHC değерleri BPA'nın oral maruziyeti sonucunda kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Baralić vd., 2020). Yine başka bir çalışmada farelerde BPA'nın farklı dozlarda hematolojik parametrelerde değışikliklere neden olduğu görölmüştür (Alabi vd., 2021). İsviçre albino farelerinde yapılan çalışmada ise BPA hemoglobin değерlerinde anlamlı olarak düşüşe sebep olmuştur (Hoque vd., 2020). Aynı zamanda BPAF eritrositler üstünde oksidatif stres ve hasara da neden olmuştur (Maćczak vd., 2017). Literatür bilgilerine bakıldığında BPAF'nin özellikle lökosit değерleri üzerine olan etkilerinin genel anlamda BPA ve diğer analogları ile uyumlu olduğu ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında BPAF tavşanlarda kırmızı kan hücrelerine ait parametrelerde herhangi bir değışiklik göstermemiştir. Bu durumun çalışmamızda kullanılan BPAF dozunun erkek tavşanlarda kırmızı kan hücreleri üzerinde olumsuz bir etki oluşturacak düzeyde olmadığını düşündürmektedir.

Safranal, diğer safran bileşenleri ve E vitamini ile karşılaştırılmalı yapılan bir çalışmada sıçanlarda WBC değерlerinde bir etkisi görölmemiş fakat RBC, HCT ve hemoglobin üstünde bazı değışikliklere neden olmuştur (Hariri vd., 2011). Yine bu sonuçlara benzer şekilde olan erkek sıçanlarda 21 gün safranal uygulamasında WBC

sayısı değişmezken RBC, HCT ve hemoglobin değerlerinde anlamlı bir düşüş olduğu belirtilmiştir (Hosseinzadeh vd., 2013). Başka bir çalışmada, safranal sıçanlarda RBC, HCT ve hemoglobin değerlerinde hiçbir değişikliğe neden olmamıştır (Arihan vd., 2016). Farelerde safranal farklı dozlarda kullanıldığında WBC, nötrofil, lenfosit ve monosit sayılarında gruplar arasında bir fark bulunmamıştır (Riahi-Zanjani vd., 2015). Çalışmamızda bakmış olduğumuz kan parametreleri üzerine safranal uygulaması K grubunda bulunan tavşanlarla kıyaslandığında herhangi değişikliğe yol açmamıştır. Bununla birlikte safranal'ın WBC değerleri üzerine BF grubuna göre olumlu yönde etkileri olduğu gözlenmiştir.

Leydig hücreleri tarafından kolesterolden sentezlenen testosteron hormonu, erkek üreme sisteminin gelişmesinde ve testislerde spermatogenezde anahtar rol oynar (Ye vd., 2011). Testosteron, spermatositlerin gelişimi sırasında mayoz bölünmenin tamamlanması için gereklidir. Testosteron ayrıca spermatidin vaktinden önce seminifer tübüle geçmesini önlemede rol oynarken, olgun spermilerin seminifer tübüle geçişini ise kolaylaştırır (Xiao vd., 2014). Sıçanlarda deneysel oral BPAF uygulamasının kolesterol biyosentezi, taşınması ve steroid biyosentezi süreçleri ile ilgili hem genlerin hem de proteinlerin ekspresyon seviyelerinde dramatik bir düşüşe neden olduğu görülmüştür (Feng vd., 2012). BPAF maruziyetinin, testosteron biyosentez yolundaki genlerin ve proteinlerin değiştirilmesi yoluyla testosteron düzeylerini etkilediği doğrulanmıştır (Fic vd., 2015). Ayrıca bu uygulamanın serum (Feng vd., 2012; Yu vd., 2022), plazma ve testiküler testosteron (Huang vd., 2020) düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. BPAF, erkek zebra balıklarında da testosteron seviyelerinde azalmaya neden olmuştur (Yang vd., 2016). Çalışmamızda testiküler ve serum testosteron düzeylerinde istatistiki anlamda bir farklılık saptanmamıştır. Sadece BPAF uygulanan grubun testiküler testosteron düzeyinde sayısal bir azalmanın olduğu fakat bu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görüldü. Literatür bilgileri genelde BPAF'nin testosteron düzeyini düşürdüğünü bildirmiş olsa da (Feng vd., 2012; Yu vd., 2022), erkek tavşanlar üzerinde yapmış olduğumuz bu çalışma uygulanan BPAF dozunun testosteron seviyeleri üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Farklı sonuçlar, hayvan türü, bisfenol maruziyetinin dozu ve farklı hayvanlardaki metabolizmasının farklı oluşu, uygulama yolu ve süresine bağlı olabilir.

Omurgalılarda, testosteron gibi östrojen hormonu da, cinsiyet farklılaşmasında, cinsel olgunlaşmada ve üreme aktivitesinde rol oynar (Chang vd., 2013). Bu bağlamda, BPAF'nin zebra balıklarında östrojen seviyesinde bir artışa neden olduğuna dair veriler bulunmaktadır (Feng vd., 2012, Yang vd., 2016). Ayrıca, BPA'ya maruz kaldıktan sonra kandaki E₂ seviyelerinin arttığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Lassen vd., 2014; Scinicariello vd., 2016). Östrojenin leydig hücrelerinin işleyişini ve testosteron üretimini bozduğu düşünülmektedir (Hecker vd., 2005). Ancak Stoker ve diğerleri (2020) ile Alboghobeish ve diğerleri (2019) tarafından yapılan çalışmalarda BPA'ya maruz kalan yetişkin erkek sıçanların kan dolaşımındaki östrojen seviyelerinde düşüş tespit edilmiştir. Zebra balıkları ile yapılan başka bir çalışmada da 125 µg/L dozundaki BPAF'nin östrojen seviyeleri üzerine olumsuz bir etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir (Shi vd., 2015). Çalışmamızda BPAF uygulanan gruba ait serum ve testiküler östrojen seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmadığı saptandı. Sadece safranal verilen grubun serum ve testiküler östrojen düzeyi kontrol ve BPAF gruplarına göre anlamlı şekilde düştü. BPAF ile birlikte safranal verilen grubun serum ve testiküler östrojen düzeyleri kontrol grubu ve BPAF grubu ile kıyaslandığında östrojen düzeyinin istatistiki açıdan anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Bu bağlamda, çalışmamızdan elde ettiğimiz serum ve testiküler östrojen bulgularımız BPAF maruziyetinin östrojen düzeyini arttırdığını bildiren bazı literatür bilgisi ile uyumsuzluk göstermektedir.

Farklı çalışmalarda elde edilen artmış, azalmış veya değişiklik göstermemiş östrojen seviyeleri, BPAF'nin balıklar ve memeliler de dahil olmak üzere farklı hayvan türlerinde ve farklı gelişim aşamalarında (embriyonik-puberte öncesi- yetişkin) ve çok geniş bir doz düzeyinde kullanılmasından kaynaklanmaktadır. BPA ve analogları, dehidroepiandrosteronun androstenediona dönüştürüldüğü arka kapı yolağını etkileyerek testiküler testosteron sentezinin azalttığı düşünülmektedir. Androstenedion, $\Delta 4$ yolundan sorumludur ve bu yol, östrojenin aşırı üretimini uyarma açısından yüksek risk teşkil eder. Bu arka kapı yolu, p450 aromataz aktivasyonunu içeren testiküler steroidogeneze alternatif yol olarak da bilinir. Aromatazin aktivasyonu CYP19A1'in artan gen ve protein ekspresyonu ile sergilenir ve bu da cAMP'nin aktivasyonuna yol açar. Bu mekanizma testiste östrojenin aşırı

üretimine neden olur ve bu da BPA ve analoglarının bir etkisi olarak ortaya çıkar (Eladak vd., 2015, Feng vd., 2016, Ullah vd., 2018, Ullah vd., 2019). Bununla birlikte, BPA ve analoglarının $\Delta 4$ yolundaki etkileri doza bağlı farklılık göstermektedir ve farklı çalışmalarda elde edilen sonuçları da etkilemektedir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular kullanılan dozda BPAF'nin östrojen seviyeleri üzerinde bir etkisini olmadığını göstermiş olsa da, safranal uygulamasının östrojen seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir; sonuçlar incelendiğinde safranal'in testiküler dokuda androjenlerden östrojen dönüşümünü azaltıyor gibi gözükmektedir.

Hipotalamus-hipofiz eksen (HPG), erkek üreme sistemi de dahil olmak üzere insan ve çiftlik hayvanlarında endokrin hormon üretimini düzenleyen ana merkezdir (Park vd., 2018). Hipotalamus, hipofiz bezlerinin nöroendokrin aktivitesini uyarmaktan sorumlu hormonları ya ön ya da arka bezde salgılar. Ön hipofiz bezi tarafından düzenlenen nöroendokrin aktivitelerden biri de HPG eksenidir (Chakraborty, 2020). Örneğin, GnRH enzimatik reaksiyona giren bir polipeptitten meydana gelerek hipotalamusun arkuat nükleusunda özelleşmiş nöronlarında üretilir ve aksonlardan eminentia mediana (median eminens)'nin dış bölgesine taşınan depolama granüllerinde paketlenir. Bu hormon, ön hipofiz bezinden LH ve FSH'nin biyosentezini ve sekresyonunu uyarmak için her 30-120 dakikada bir yaklaşık 1000 nöronun sinir uçlarından senkronize uyarılarla hipofizer portal sistemine salınır (Millar, 2005). LH ve FSH ise glikoprotein yapıda hormonlardır ve ön hipofiz bezinde gonadotrop adı verilen aynı hücrelerden salgılanırlar. Hipotalamusta GnRH bulunmadığında, hipofiz bezinden LH ya da FSH hemen hemen hiç salgılanmaz. FSH seminifer tübüllerde, özgül FSH reseptörleriyle Sertoli hücrelerine bağlanır. Bu olay, hücrelerin büyümesine ve çeşitli spermatogenik maddelerin salgılanmasına neden olur. Aynı anda, interstisyel alanlardaki Leydig hücrelerinden tübüller içine difüze olan testosteron hormonu spermatogenez üzerinde şiddetli bir tropik etki gösterir. Bu nedenle, spermatogenezin başlaması için, FSH ve testosteron hormonlarının her ikisi de gereklidir. Testislerin interstisyel Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması, ancak hipofiz bezinden salgılanan LH'nin uyarısı ile gerçekleşebilmektedir (Guyton ve Hall, 2000).

Dolayısı ile HPG eksenini üç seviyede hormon üretimiyle karşılaştırır: hipotalamus GnRH salgılar, ön hipofiz bezi FSH ve LH salgılar ve testis, özellikle Leydig hücreleri, testosteron sentezler. Hipotalamustan salınan GnRH, FSH ve LH salgılaması için ön hipofiz bezini uyarır. Her iki hormon da testosteron, östrojen, progesteron ve inhibin gibi hedef hormonları salgılamak için testislere etki eder. Bu mekanizmanın birincil amacı homeostaz dengesini sağlamak ve hormon düzenlemesinin pozitif ve negatif geri bildirimini düzenlemektir (Castillo-Sanchez vd., 2020, Talpade vd., 2018). GnRH, LH ve FSH salgısı, kiss1 geni tarafından düzenlenen nöropeptid kisspeptin (KISS1) tarafından kontrol edilir (Bakar vd., 2017, Kang vd., 2006, Kawamura vd., 2014). Genel olarak, KISS1 ve G protein-bağlı reseptör 54 (GPR54) kompleksi HPG eksenini geri bildirim düzenlemelerinde yer alır (Zhu vd., 2020). KISS1, kiss1 reseptörü olarak da bilinen GPR54'e bağlanarak bir Kiss1/GPR54 kompleksi oluşturur. Bu kompleks, GnRH salınımını uyarmak için GnRH nöronunu hedef alarak nöroendokrin üreme eksenini düzenler (Dedes, 2012). Daha sonra, GnRH, gonadotropik hormonların, özellikle LH ve FSH'nin salgılanmasını indüklemek için ön hipofiz bezindeki nöron iletimini uyarır. Ayrıca ER α , üreme ve cinsel davranışların düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar (Khabouz vd., 2020, Weiser vd., 2008). E₂ hipotalamusta ER α 'ya bağlandığında, GnRH salgılanmasını baskılar (Chimento vd., 2014).

Çeşitli deneysel çalışmalar, BPA ve BPF, BPS ve BPAF gibi analoglarının, mRNA gen ekspresyonunu hedefleyerek KISS1 ve ER α aracılığıyla HPG eksenini bozduğunu ortaya koymuştur. Perinatal dönemde 2 μ g/kg/ağırlık dozunda kullanılan BPA'nın beyindeki GnRH nöron miktarını artırdığı ve erkek sıçan yavrularının kanındaki LH seviyelerinde bir artışa yol açtığı bulunmuştur. Buna karşılık, daha önceki birkaç çalışma, oral gavaj veya intraperitoneal enjeksiyon yoluyla 25 mg/kg/ağırlık ila 200 mg/kg/ağırlık arasında değişen çeşitli BPA dozlarına maruz kaldıklarında yetişkin erkek sıçanların kanındaki FSH ve LH seviyelerinde bir azalma olduğunu bildirmiştir (Shamhari vd., 2021). Bisfenollerin karşılaştırılmalı toksikolojik etkilerini inceleyen bir çalışmada ise BPAF analogunun bazı dozlarda GnRH, FSH ve LH hormon seviyelerini artırdığı görülmüştür (Qiu vd., 2021). Ayrıca, BPA'ya maruz kalan sıçan ve zebra balığı gibi laboratuvar hayvanlarının beyinde Kiss1 mRNA ekspresyonunda artış gösterdiğini bildirmiştir (Qiu vd., 2016,

Stoker vd., 2020, Bai vd., 2011, Cao vd., 2012). İçme suyu yoluyla 50 µg/kg dozunda BPA'ya maruz kalma Kiss 1 mRNA ifadesinde artışa neden olmuştur (Stoker vd., 2020). Aynı bulgular sıçanların yavru ve yavrularında ve zebra balığının transgenik embriyosunda da kaydedilmiştir (Qiu vd., 2016, Bai vd., 2011, Cao vd., 2012). Zebra balığı embriyolarının döllenme sonrası 120. saatte 1000 µg/L BPA ve BPS'ye maruz bırakılması Kiss1 geninin ifadesinin arttığını ortaya koymuştur. Dahası, Kiss 1 reseptörü yüksek oranda ifade edilmiş ve hipotalamusta GnRH3 nöronlarının sayısında artışa yol açmıştır (Qiu vd., 2016). GnRH3 nöronu, zebra balığında üreme sisteminin hipofiz gonadal eksenini dolaylı olarak kontrol eden bir nöromodülatördür (91,92). Ayrıca, Qiu ve diğerleri (Qiu vd., 2016) 0,1 ve 1 mg/L BPF içeren bir akvaryumdaki erkek zebra balıklarının GnRH nöronlarının artışını etkileyen GnRH reseptörlerinin (GnRHR1 ve GnRHR2) ekspresyonunda bir artış gösterdiğini bulmuştur. Bir başka BPA analogu olan BPAF'nin da *gnrh2*, *fshβ* ve *lhβ*'nin mRNA ekspresyonunu artırarak erkek zebra balığı yavrularında HPG eksenini bozduğu bildirilmiştir (Shi vd., 2015). Zebra balığında *gnrh2*, *fshβ* ve *lhβ* sırasıyla insan GNRH2, FSHβ ve LHβ ile ortologdur.

Bununla birlikte, BPA ve analoglarının doğrudan veya dolaylı etkileri olduğuna dair çalışmalar olsa da, etkileri hala tartışmalıdır. Bu analoglar, erkek üreme sistemi üzerinde BPA ile aynı olumsuz etkileri gösterebilir; ancak erkek üreme hormonlarının fizyolojik fonksiyonlarını açıklayan toksikolojik verileri hala sınırlıdır ve erkek üreme sistemindeki hormonların fizyolojik fonksiyonları üzerindeki etkileri, HPG eksenini, steroidogenez ve spermatogeneze üzerinde odaklanılmasına rağmen tam olarak ispatlanamamıştır (Shamhari vd., 2021). Bu çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara baktığımızda; bisfenol analoglarından BPAF'nin uygulanan dozlarda GnRH, FSH ve LH seviyeleri üzerinde herhangi bir artırıcı veya azaltıcı etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. BPA ve analoglarının beyindeki GnRH ile plazmadaki FSH, LH ve testosteron seviyeleri arasındaki korelasyon üzerindeki etkileri hala şüphelidir. Farklılıkların sebebi ise farklı dozlardan, maruz kalma şekline, hayvan türlerinden ve çalışma süresinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Korelasyonu içeren başka mekanizmalar da olabilir. Örneğin; bisfenoller üreme hormonlarının düzenlenmesinde negatif/pozitif geri bildirim sisteminin mekanizmasını bozabilir

veya bunu beyinde veya testiste reseptör seviyesinde rekabetçi inhibisyon yoluyla yapabilir.

Ejakülatta bulunan motil sperm sayısı ejakülat kalitesi açısından önemli bir parametredir. Belirli miktarda sperm sayısına sahip olmayan ejakülatlarda fertilité oranlarında düşüş gözlenmektedir (WHO, 2010). Mevcut çalışmamızda erkek tavşanlarda BPAF maruziyetinin sperm konsantrasyonunda ve sperm motilitesinde anlamlı düzeyde azalmalara neden olduğu tespit edilmiştir. BPAF grubundaki tavşanlardan elde edilen ejakülatlardaki sperm sayısı kontrol grubuna göre %30'dan daha fazla oranda azalmıştır. Progresif motilite, BPAF grubunda %45'ler civarına düşmüştür. Bu bulgular daha önce BPA ve analogları ile elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Sıçanlarda (Majid vd., 2019) ve farelerde (Vom Saal vd., 1998) yapılan deneysel çalışmalarda BPA'ya bağı spermatojik parametrelerde olumsuz değişiklikler bildirilmiştir. BPAF'nin kan-testis bariyer bütünlüğünü bozduğu, sperm miktarını önemli ölçüde azalttığı ve insan ovaryum granüloza hücresi benzeri hücrelerde apoptozisini indüklediği görülmüştür (Huang vd., 2020, Wu vd., 2019). BPA pubertal sıçanlarda günlük sperm üretimini azaltmıştır (Herath vd., 2004). BPA maruziyeti spermatogenezde bozulma gibi üreme bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir (Wang vd., 2016). BPA'ya bağı spermatogenez süreci olumsuz etkilenmiş ve ardından olgun spermde bir azalmaya yol açmıştır (Hecker vd., 2005). Ayrıca insanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalardan da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Rochester, 2013; Salian vd., 2011).

Diğer yandan, çalışmamızda kontrol ve safranal grupları arasında sperm konsantrasyonu, sperm motilite oranı ve ejakülat hacmi gibi parametreler açısından bir farklılık belirlenememiştir. Öte yandan, safranal uygulamasının BPAF'nin neden olduğu sperm motilitesindeki azalmaları B+S grubunda anlamlı şekilde düzelttiği görüldü. Aynı uygulamanın sperm konsantrasyonu üzerindeki etkileri de olumlu bulundu. Benzer şekilde farklı antioksidan özellikteki kimyasallar da sperm kalitesi üzerine olumlu etkiler göstermekte ve oksidatif hasara karşı koruyucu olabilmektedir. Punikalajinin Yeni Zelanda tavşanlarında BPA'nın yol açtığı oksidatif hasar üzerine olumlu etkileri gözlenmiştir (Yıldız Gülay vd., 2020). Kaliforniya tavşanlarda yapılan bir çalışmada nano-selenyum (Se), sarımsak yağının

ve bunların kombinasyonlarının besinlere ilave edilmesiyle ejakülat hacminde, sperm motilitesinde ve canlılığında artışın olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca anormal sperm yüzdesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Nano-Se ve sarımsak yağı ile takviye edilmiş diyetlerle beslenen tavşanlarda, serum testosteron seviyesinin arttığı ifade edilmiştir (Abdel-Wareth vd., 2019). Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında askorbik asidin semen kalitesi ve seminal plazma enzimlerini artırdığı, serbest radikal seviyelerini ise azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca, askorbik asidin alüminyum ve endosülfan kaynaklı üreme toksisitesinin korunmasında etkili olabileceğini göstermiştir (Yousef vd., 2005; Ata vd., 2007). Saf Çinkonun (Zn) erkek tavşan yemine ilavesi bazı reproduktif özelliklerine olumlu yönde etkilemiştir (Amen ve Muhammad, 2016). *Nauclea latifolia* (Afrika Şeftalisi) ile tedavinin erkek cinsel fonksiyonunu ve testisleri oksidatif hasardan koruduğu bildirilmiştir (Alabi vd., 2018).

Keçiboynuzunun kaynatılmasıyla hazırlanan keçiboynuzu ekstratı verilen tavşanlarda sağ ve sol testis ağırlığında belirgin bir artışa neden olmuştur. Aynı şekilde epididimis ağırlığı artmış ve seminifer tübüllerin çapları büyümüştür. Ayrıca serum testosteron seviyeleri yükselmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda ileri hareket motilitesinin yüzdesi, sperm yüzdesi ve konsantrasyonu başlangıca göre artış göstermiştir (Ata vd., 2018). *Moringa oleifera* yaprak unu ile ikame edilen ticari yemle beslenen tavşanlarda, sperm membran bütünlüğünün olumlu yönde etkilendiği bildirilmiştir (Suarni vd., 2016). Yine arı poleninin de tavşanlarda plazmadaki androjenleri artırdığı bildirilmiştir (Attia vd., 2011). Çalışmamızda, diğer araştırmalara benzer bir şekilde safranal'ın yüksek dozlarda testis dokusunu BPAF'nin negatif etkilerine karşı koruyabileceği ve spermatolojik parametreleri olumlu yönde etkileyebileceği gözlenmiştir. Bu çalışmamızda safranal'ın sperm konsantrasyonu ve motilitesi üzerine pozitif etkileri olabileceği ve erkek tavşanlarda üreme fizyolojisi üzerine önemli katkılar sağlayabileceği görülmektedir.

Daha önceki çalışmalar, günlük BPA uygulamalarının SOD ve CAT gibi enzim aktivitelerini etkilediği lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve bu yüzden toplam antioksidan kapasitesini azaltabildiğini göstermiştir (Mahmoudi vd., 2018). BPA ve analogları dokulardaki antioksidan kapasiteyi tüketebilecek bir toksin gibi rol oynayabilir (Aboul Ezz vd., 2015). Kalp dokusu (Aboul Ezz vd., 2015), karaciğer

dokusu ve böbrek dokusunda (Ola-Davies ve Olukole, 2018) olduğu gibi, testis dokusunda da lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesini artırarak ve toplam antioksidan düzeylerini azaltarak oksidatif hasara neden olmuş olabilir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada da BPAF'nin testiküler MDA seviyelerini arttırdığı ve antioksidan seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Tian vd., 2022). Farelerde ise BPAF uygulamasının karaciğer dokusu MDA düzeyini etkilemediği bildirilmektedir (Meng vd., 2019). MDA, membran lipid peroksidasyonunun en önemli ürünlerinden biridir ve üretimi membran hasarını şiddetlendirebilir. Bu çalışmada sadece BPAF uygulanan grubun testis dokusu MDA düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi. Kontrol ve güçlü bir antioksidan olan safranal uygulanan gruplarda ise MDA seviyeleri daha düşük olarak ölçüldü. BPAF, Bisfenol A gibi erkek tavşanlarda oksidatif strese ve doku dejenerasyonuna neden olabilmektedir (Karabulut ve Gulay, 2022). Bulgularımız, çalışmamızda ölçülen reproduktif hormonların seviyelerinde bir değişiklik olmamasına rağmen BPAF'ye bağlı gözlenen spermatolojik parametrelerdeki olumsuz değişikliklerin artmış oksidatif strese bağlı olabileceğini desteklemektedir.

Kimyasal kirleticilerin neden olduğu oksidatif stresin aşırı ROS üretimini indüklediği ve böylece antioksidan savunma sistemini veya hücre sel bileşenleri bozduğu gösterilmiştir (Martínez vd., 2020; Mourabit vd., 2019). SOD ve CAT gibi antioksidan enzimler, redoks durumunun korunmasında ve oksidatif hasarın önlenmesinde esastır (Gu ve vd., 2020). MDA seviyesi, antioksidan savunmanın azalması ve ROS oksidasyonundan kaynaklanan lipid peroksidasyonunun derecesini yansıtır (Ge vd., 2015). BPAF'nin zebra balıklarında SOD ve CAT enzimlerinin aktivitesini inhibe ettiği ve MDA seviyesini artırdı gösterilmiştir (Gu vd., 2020). Ayrıca, BPA ve analoglarının plazma, testis ve spermde oksidatif stresi indüklediği ve bunun da spermatogenez bozukluğuna neden olduğu bildirilmektedir (Gules vd., 2019). Çalışmamızda BPAF'nin testis dokusunda MDA seviyelerini yükselttiği gözlenmiştir. Testis dokusunda artan oksidatif stres leydig, sertoli ve germ hücre disfonksiyonu sonucu sperm kalitesinde bir azalmaya ve testis anormalliklerine yol açar (Yusoff vd., 2017). BPAF'nin testosteron sentezini düşürerek, kritik steroidogenez ile ilgili genlerin ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyerek, ROS ve apoptoz/otofajik hücre ölümünü indükleyerek leydig hücrelerinin yenilenmesini

bloke edebilir (Yu vd., 2022). Ayrıca sertoli hücresindeki hücre iskeletinin düzensizliğini indüklediği ve sertoli hücresinin spermatogenezi desteklemek için seminifer epitelde gerçekleştirmiş olduğu hücresel homeostazisi engellediği gözlemlenmiştir. Farelerde BPAF maruziyetinin, doza bağlı bir şekilde kan-testis bariyer bütünlüğü, sperm miktarı ve sperm kalitesini olumsuz yönde etkilediği vurgulanmıştır (Wu vd., 2019).

BPA ve analoglarına maruz kaldıktan sonra spermatogenezin bozulması, germ hücrelerinin çapı ve epitel yüksekliğinde azalma, germinal epitelin atrofisi ve ayrılması ve düzensiz seminifer tübül yapısı gibi histolojik gözlemlerle gösterilebilir (Zahra vd., 2020, Wang vd., 2016). Önceki çalışmalar, BPA maruziyetinin, germ hücrelerinin vakuolasyonu, dejenerasyonu ve düzensizliği ile kanıtlanan histopatolojik değişikliklere neden olduğunu bildirmiştir (Zahra vd., 2020, Wang vd., 2016). Yetişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlarında 52 gün boyunca oral gavaj yoluyla veya 30 gün boyunca alternatif günlerde intraperitoneal enjeksiyon yoluyla BPA'ya maruz kaldıktan sonra germ hücrelerinin vakuolasyonu ve dejenerasyonu bildirilmiştir (Zahra vd., 2020). BPA'ya 50 mg/kg dozunda 14 gün boyunca oral gavaj yoluyla maruz kalan yetişkin erkek Wistar sıçanlarının seminifer tübülünde spermatogenez sürecinin zayıf olduğu ve durduğu tespit edilmiştir (Akintunde vd., 2019). Ayrıca, aynı çalışmada spermatositlerin BPA uygulaması yapılmış sıçanlarda en çok etkilenen germ hücreleri arasında olduğu da bulunmuştur (Akintunde vd., 2019). Wang ve diğerleri (Wang vd., 2016) oral gavaj yoluyla 200 mg/kg dozunda BPA'nın germ hücrelerinde düzensizliğe neden olduğunu bulmuştur (Wang vd., 2016). Ancak, bu değişiklikler farklı BPA analogları uygulamış sıçanlarda gözlenmemiştir. Ayrıca, yetişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlarında BPF ve BPS gibi BPA analogları seminifer tübüllerin lümeninde bulunan olgun sperm hücre sayısını azalmakta ve spermatogenezi olumsuz etkilemektedir (Jiang vd., 2016, Ullah vd., 2018, Ullah vd., 2019). BPA ve analogları (BPS ve BPAF) hücre canlılığını azaltmakta ve spermatogonyum hücre hattının (C18-4) DNA hasarını artırmaktadır (81). Bu bisfenoller arasında BPAF, maruziyetten sonraki 24 saat içinde en düşük konsantrasyonlarda önemli sonuçlara neden olmaktadır (81).

BPA ve analogları spermatogenezi bozarak, sperm kalitesinde bir azalma ile kanıtlanan sonucun bozulmasına yol açar. Toksik maddelerin neden olduğu düşük sperm üretimi genellikle oksidatif stres ve kan dolaşımındaki testosteronun azalması ile ilişkilidir (Jubaidi vd., 2019, Kamaruzaman ve Mat Noor, 2012). Ayrıca, sperm gelişimindeki azalma, spermatogenez için gerekli olan yetersiz beslenmeye neden olan anormal sertoli hücrelerine de bağlı olabilir (Li vd., 2009). Önceki çalışmalara göre, yetişkin erkek sıçanların BPA'ya maruz kalması, sperm üretiminde, sayısında, hareketliliğinde, canlılığında ve sperm akrozomunun bütünlüğünde ve plazma membran mitokondriyal aktivitesinde azalma ile kanıtlanan sperm kalitesinde bir düşüşe neden olmaktadır (Alboghobeish vd., 2019, Jiang vd., 2016, Zahra vd., 2020, Wang vd., 2016, Majid vd., 2019, Wisniewski vd., 2015, Akintunde vd., 2019). BPA, 14 gün boyunca 50 mg/kg dozunda leydig hücrelerinde hafif ödem oluşturarak testosteronda azalmaya yol açmış ve böylece yetişkin erkek Wistar sıçanlarının sperm kalitesini düşürmüştür (Akintunde vd., 2019). Mitokondri, sperm hareketi için gerekli enerji üretimini sağlayan tek ATP kaynağı olduğundan, spermde mitokondriyal aktivite ile hareketlilik arasında da bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Wisniewski vd., 2015). Sperme özgü iyon kalsiyum kanalı (CatSper) da sperm hareketliliği, hiperaktivasyonu ve akrozom reaksiyonu için çok önemlidir. Bu pH'a duyarlı kanal, sperm fonksiyonu için yeterli Ca^{2+} sağlamaktan sorumludur (Sun vd., 2017). Önceki bulgular, CatSper kanalının ifadesinin ve yüklerin, farelerin 10, 50 ve 250 $\mu\text{g/kg/kg}$ BPA dozlarına oral yoldan maruz kaldıktan sonra spermin önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir (Wang vd., 2016). Sağlıklı insan sperminin 10 μM BPA analoglarına maruz bırakılması CatSper kanalının yeteneği üzerinde benzer bir etki göstermiştir. Bir çalışmada, araştırmacılar BPG, BPAF, BPBP, BPC ve BPB'nin progesteron kaynaklı Ca^{2+} 'yı inhibe eden güçlü kimyasallar olduğunu bulmuşlardır (Rehfeld vd., 2020). Bu BPA analoglarının Ca^{2+} sinyalini etkilediği ve bunun da normal CatSper sinyaline müdahale ederek kısırlığa yol açabileceği gösterilmiştir (Rehfeld vd., 2020).

Eksojen olarak alınan antioksidanların çoğu bitkilerden elde edilen fitokimyasallardır (Sarangarajan vd., 2017). Safran çiçeği *Crocus sativus*'un stigmalarından elde edilen safranal'in önemli derecede antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve oksidatif stres nedeniyle ortaya çıkan hastalıklarda iyi bir terapötik ajan olabileceği

vurgulanmaktadır (Rahaiee vd., 2015). Safranal, safranin ana aktif bileşenlerinden biridir ve antioksidan etkilerinden sorumludur. Safranal, hücre zarlarını stabilize eder, ROS'u temizler ve doymamış membran lipidlerinin peroksidasyonunu azaltır. Bu nedenle, safranal, radikal süpürücü etkinliğin nörodejeneratif hastalıklar gibi etkili bir rol oynadığı durumlarda terapötik değere sahip olabilir (Samarghandian vd., 2015). Ratlarda yapılan çalışmalarda safranal'ın lipid peroksidasyonu ve MDA düzeyini azalttığı ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Hosseinzadeh vd., 2009). BPAF ile birlikte safranal uygulanan grubun testis dokusu MDA düzeyinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Bu sonuç, daha uzun süreli safranal kullanımının MDA değerlerinin normal düzeylere gelme ihtimalini de güçlendirmiştir. Ataei ve Rahbarian (2020), diyabetik ratlarda yaptığı çalışmada safranal'ın bu etkisini desteklemektedir. Oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkar. GSH, hücreleri serbest radikal hasarından koruyan en önemli hücre içi hidrofilik antioksidan olarak kabul edilir (Pandey ve Rizvi 2010). Sıçanlarda BPAF maruziyetinin testis dokusunda GSH düzeylerini azalttığı ve oksidatif hasara neden olduğu ifade edilmektedir (Tian vd., 2022). Bu çalışmada BPAF'nin testis dokusu GSH düzeyinde safranal ve BPAF+safranal grubuna göre anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu belirlendi. Safranal uygulamasının BPAF'nin düşürmüş olduğu testis dokusu GSH düzeyini arttırdığı gözlemlendi. Kontrol, safranal ve tedavi grubunun GSH düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Glutatyon peroksidaz, spermatogenezin erken aşaması için gerekli olan ve spermatozoonun mitokondriyal kapsüllerinde yapısal bir protein olarak işlev gören bir antioksidan enzimdir (Schneider vd., 2009). Hem BPA hem de BPAF'nin, zebra balığı ve insan vasküler endotelial hücrelerinde süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesinde azalma dahil olmak üzere antioksidan savunma sisteminin ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyerek oksidatif stresi indükleyebildiği bildirilmiştir (Gu vd., 2020). Farelerde BPAF maruziyetinin karaciğer dokusu SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak farklılığa neden olmadığı bildirilmektedir (Meng vd., 2019). Bu çalışmada testis dokusu CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri açısından gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi. Çalışmanın antioksidan enzim aktivite sonuçlarının literatür

bilgileriyle uyumsuzluğunun deney hayvanı türü farklılığından veya BPAF'nin uygulama süresinden kaynaklanabileceği değerlendirildi. Oksidan ve antioksidan parametreler açısından sonuçlar değerlendirildiğinde tavşanlarda BPAF uygulamasının testis dokusu MDA düzeyini arttırdığı, GSH düzeyini ise azalttığı ve oksidatif strese neden olduğu belirlendi. Aynı çalışmada safranal uygulamasının BPAF'nin neden olduğu testis dokusu MDA düzeyi artışını ve GSH düzeyi azalışını önlediği, güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve BPAF'nin neden olduğu oksidatif strese karşı testis dokusunu koruduğu tespit edildi.

Histopatolojik bulgular sonucunda; testis dokusunun seminifer tubuluslarının bozulması ile BPAF'nin erkek üreme patolojisindeki diğer bulguları desteklemektedir (Sutherland vd., 2019). Fare, *Xenopus laevis* (Afrika pençeli kurbağası), zebra balığı gibi farklı tür hayvanlarda ve tavuk embriyosunda yapılan çalışmalarda olduğu gibi testislerin histolojik yapısı bozulmuştur (Wu vd., 2019; Yang vd., 2016; Mentor vd., 2020; Cai vd., 2020). Bisfenol A'nın sıçanların epididimisinde oksidatif stres ve epitel dejenerasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Chitra vd., 2003). Ratlarda yapılan başka bir çalışmada BPA maruziyetinin testis ve epididim dejenerasyonu, tıkanıklık, atrofi ve germinal hücre döküntüsü gibi histopatolojik değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (Aydoğan vd., 2010). Çalışmada kontrol grubunun testis ve epididimis dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde bazal membran, seminifer tubullerin germinatif epiteli ve sertoli hücreleri ile interstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri normal histolojik yapıda gözlemlendi. Safranal grubunda tubulus bazal membranı, tubulus duvarındaki spermatogenik hücre serilerini oluşturan spermatogonyum, spermatosit ve spermatid hücreleri ile destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ile Leydig hücrelerini de kapsayan interstisyel alanın kontrol grubuna benzer bir histolojik yapıda olduğu ve spermatogenezin normal devam ettiği belirlendi. Sadece BPAF'ye maruz bırakılan gruptaki tavşanlarda testis dokusunda tubulusların çoğunluğunun morfolojilerinin bozulduğu ve bazılarının atrofiye olduğu tespit edildi. BPAF ile birlikte safranal uygulanan grupta tubulusların büyük oranda morfolojik olarak normale yakın görünümde olduğu görüldü. Fakat bazı tubuluslarda ve leydig hücrelerini de içeren interstisyel alanda hafif derecede morfolojik değişiklikler, dejenere tubuluslarda

spermatogenik hücre serisinde kısmen hafif derecede bozulmalar ve bazı germinatif hücrelerde az miktarda vakuollerin varlığı tespit edildi.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tavşanlarda yapılan bu çalışmada sonuç olarak canlı ağırlık ve yem tüketiminde gruplar arasında bir fark görülmedi. BPAF, kan değerlerinde granülosit (%) ve toplam lökosit sayısını (WBC) önemli düzeyde artırırken, lenfosit (%) değerini düşürdü. Safranal ise sadece toplam lökosit sayısında kısmi bir şekilde azalttı. Analiz edilen diğer kan parametrelerinde ise grupların birbirine yakın olduğu anlaşılmıştır. Serum ve testis dokusunda östrojen hormonu en yüksek BF grubunda olmasına rağmen kontrol grupları ile arasında anlamlı bir farkın olmadığı görüldü. Sperm konsantrasyonu ve motilite değerlerinde BPAF önemli bir düşüşe sebep oldu ve safranal bu değerleri B+S grubunda kontrol seviyelerine yükseltti. Testis dokusunda MDA değerleri BF grubunda anlamlı olarak yükseldi. Safranal tedavisi ise BPAF'nin MDA üzerindeki bu olumsuz etkisini S+F grubunda pozitif yönde değiştirdi. GSH, GPx, CAT düzeylerinde ise önemli bir farklılık bulunmamıştır. Histopatolojik olarak BPAF testis ve epididimis dokularına hasara yol açarken, safranal'ın BPAF uygulamasının oluşturduğu histopatolojik hasar üzerine düzeltici bir etkisinin olduğu gözlemlendi. BPAF ve safranal, reproduktif hormonlar olan GnRH, FSH ve LH düzeylerinde bir değişikliğe neden olmamıştır.

Endokrin bozucu kimyasallar (bisfenoller vb.), endojen hormon biyosentezini, metabolizmasını, sinyalini veya etkisini bozarak endokrin homeostazına müdahale edebilir. Böylece insan ve hayvanlarda üreme sorunlarına neden olabilir. Ayrıca organ ve dokularda oksidatif stresi indükleyerek fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. Bisfenol, östrojen reseptörü agonist aktivitesine sahip çevresel bir endokrin bozucu olarak sınıflandırılmıştır. Toksik, endokrin bozucu ve olası kanserojen etkileri nedeniyle, BPA şu anda bazı tüketici ürünlerinden aşamalı olarak kaldırılmaktadır. BPA'nın yerine giderek artan miktarlarda bisfenol AF, bisfenol F ve bisfenol S gibi yapısal analoglar kullanılmaktadır. BPAF, bisfenol A'ya benzer kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen daha fazla östrojenik ve toksik etkiye sahiptir. Bu çalışmanın bulguları incelendiğinde BPAF maruziyetinin erkek tavşanların testis dokusunda oksidatif strese ve östrojen hormonlarının salınımında değişikliğe neden olduğu görüldü. Bu etkiler sperm parametrelerinde ve testis dokusu

histolojik yapısında istenmeyen sonuçlara sebep oldu. Ayrıca toplam lökosit sayısı, lenfosit ve granülosit yüzdelerinde değişikliğe neden olan BPAF'nin *in vivo* olarak farklı dozlarda ve farklı tür hayvanlarda kan parametreleri üstündeki etkisinin incelenmesinde gerekmektedir. Daha yüksek dozlarda kullanılacak BPAF'nin bu etkilerinin daha belirgin olacağı değerlendirildi. Safranal'in testis dokusunda antioksidan aktivite gösterdiği ve BPAF'nin testis dokusunda neden olduğu olumsuz etkileri azaltabileceği değerlendirildi. Sperm parametreleri üstünde safranal'in etkisinin ilk defa incelendiği bu çalışmada, sperm konsantrasyonu ve motilite değerlerinde pozitif etkisini göstererek erkek üreme problemlerinde yeni bir alternatif terapötik ajan olabilir. Safranal'in herhangi bir toksik etkisini görmediğimiz bu çalışmada elde ettiğimiz verilerle değerlendirilerek tedavi edici özellikleri araştırılabilir. Bu amaçla hem BPAF'nin tavşan testis dokusunda etkilerinin tam olarak ortaya çıkarılabilmesi hem de safranal'in koruyucu etkilerinin ortaya konulabilmesi için değişik doz, farklı hayvan türü, uygulama metodu ve sürelerde moleküler düzeyde yeni bilimsel araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Wareth, A. A. A., Ahmed, A. E., Hassan, H. A., Abd El-Sadek, M. S., Ghazalah, A. A., Lohakare, J. (2019). Nutritional impact of nano-selenium, garlic oil, and their combination on growth and reproductive performance of male Californian rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 249, 37-45.
- Abid, Q.H., Hassan, A.H. (2016). Effect of Bisphenol-A-on Some Biochemical and Hematological Parameters of Female Rats (*Rattus norvegicus*). *J Nat Engineer Res Stud.*, 6(11-12), 33-40.
- Adams, C.E., Singh, M.M. (1981). Semen characteristics and fertility of rabbits subjected to exhaustive use. *Lab. Anim.*, 15(2), 157-161.
- Aebi, H. I. (1983). Methods of enzymatic analysis. *Catalase*, 673-686.
- Akintunde, J.K., Farouk, A.A., Mogbojuri, O. (2019). Metabolic treatment of syndrome linked with Parkinson's disease and hypothalamus pituitary gonadal hormones by turmeric curcumin in Bisphenol-A induced neuro-testicular dysfunction of wistar rat. *Biochem. Biophys. Rep.*, 17, 97-107.
- Alabi, O.A., Ologbonjaye, K.I., Sorungbe, A.A., Shokunbi, O.S., Omotunwase, O.I., Lawanson, G., Ayodele, O.G. (2021). Bisphenol A-induced Alterations in Different Stages of Spermatogenesis and Systemic Toxicity in Albino Mice (*Mus musculus*). *J. Health Pollut.*, 11(29). <https://doi.org/10.5696/2156-9614-11.29.210307>
- Alabi, Q.K., Olukiran, O.S., Adefisayo, M.A., Fadeyi, B.A. (2018). Effects of treatment with *Nauclea latifolia* root decoction on sexual behavior and reproductive functions in male rabbits. *J. Diet. Suppl.*, 15(5), 649-664.
- Alavi, M.S., Fanoudi, S., Fard, A.V., Soukhtanloo, M., Hosseini, M., Barzegar, H., Sadeghnia, H.R. (2019). Safranal attenuates excitotoxin-induced oxidative OLN-93 cells injury. *Drug Res.*, 69(06), 323-329.
- Alayunt, Ö.N., Lacine, A., Karafakıoğlu, Y.S., Sevimli, S. (2019). Assessment of Anti-inflammatory and Antioxidant Properties of Safranal on CCl4-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rats. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 91. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920181235>
- Alboghobeish, S., Mahdavinia, M., Zeidooni, L., Samimi, A., Oroojan, A.A., Alizadeh, S., Dehghani, M.A., Ahangarpour, A., Khorsandi, L. (2019). Efficiency of naringin against reproductive toxicity and testicular damages induced by bisphenol A in rats. *Iran J. Basic Med. Sci.*, 22, 315-323.
- Alboghobeish, S., Mahdavinia, M., Zeidooni, L., Samimi, A., Oroojan, A.A., Alizadeh, S., Dehghani, M.A., Ahangarpour, A., Khorsandi, L. (2019). Efficiency of naringin against reproductive toxicity and testicular damages induced by bisphenol A in rats. *Iran J. Basic Med. Sci.*, 22(3), 315-323.

- Al-Hrout, A., Chaiboonchoe, A., Khraiwesh, B., Murali, C., Baig, B., El-Awady, R., Tarazi, H., Alzahmi, A., Nelson, D.R., Greish, Y.E., Ramadan, W., Salehi-Ashtiani, K., Amin, A. (2018). Safranal induces DNA double-strand breakage and ER-stress-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells. *Sci. Rep.*, 8(1), 1-15.
- Alvarez, C.A., de Moraes, G.V., Scapinello, C., Martins, E.N., Cardozo, R.M., Mataveli, M., Kioshima, R.S. (2006). Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre as características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelho. *Acta Sci. - Anim. Sci.*, 28(2), 177-185.
- Alvariño, J.M.R. (2000). Reproductive performance of male rabbits. In Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Vol. 8, No. 1, 13-35.
- Amann, R.P. (1966). Effect of ejaculation frequency and breed on semen characteristics and sperm output of rabbits. *Reproduction*, 11(2), 291-293.
- Amann, R.P., Lambiase, J.T. (1967). The Male Rabbit: I. Changes in semen characteristics and sperm output between puberty and one year of age. *J Reprod Infertil.*, 14: 329-332.
- Amann, R.P., Lambiase, J.T. (1969). The Male Rabbit. III. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. *J. Anim. Sci.*, 28(3), 369-374.
- Amen, M.H.M., Muhammad, S.S. (2016). Effect of Zinc Supplementation on some Physiological and Growth Traits in Local Male Rabbit. *Vet. J.*, 6(3), 151-155.
- Anand, S.R. (1973). The carbohydrates of buffalo and goat semen. *Reproduction*, 32(1), 97-100.
- Arihan, O., Oto, G., Bayram, I., Aras, I. (2016). Effect of safran, safranal and crocin which are active ingredients of Saffron (*Crocus*) on erythrocyte fragility and hematological parameters in carbon tetrachloride intoxicated rats. *East. J. Med.*, 21(4), 173.
- Arrebola, D.F.A., Fernández, L.A.R. (2011). Analysis of seminal quality, a tool in fertility experimental toxicology study. *Rev. de Toxicol.*, 39- 50.
- Asadi, M.H., Zafari, F., Sarveazad, A., Abbasi, M., Safa, M., Koruji, M., Yari, A., Miran, R. A. (2014). Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. *Nephrourol Mon*, 6(1). doi: 10.5812/numonthly.12125
- Asimakopoulou, A.G., Xue, J., De Carvalho, B.P., Iyer, A., Abualnaja, K.O., Yaghmoor, S. S., Kumosani, T.A., Kannan, K. (2016). Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environ. Res.*, 150, 573-581.
- Ata, A., Hatipoglu, F.S., Yıldız Gulay, O., Gulay, M.S. (2007). The ameliorating effect of ascorbic acid on subacute sperm toxicity in male New Zealand White Rabbits treated with endosulfan. *J. Dairy Sci.*, Vol.90 (Suppl. 1), 267.
- Ata, A., Yıldız Gulay, O., Güngör, S., Balic, A., Gulay, M.S. (2018). The effect of carob (*Ceratonia siliqua*) bean extract on male New Zealand White rabbit semen. *World Rabbit Sci.*, 26(3), 209-215.

- Ataei, G., Rahbarian, R. (2020). Investigating the effect of safranal on Bax and Bcl2 and oxidative stress levels in testis tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *KAUMS Journal (FEYZ)*, 24(1), 10-20.
- Attia, Y. A., Al-Hanoun, A., Bovera, F. (2011). Effect of different levels of bee pollen on performance and blood profile of New Zealand White bucks and growth performance of their offspring during summer and winter months. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 95(1), 17-26.
- Aydoğan, M., Korkmaz, A., Barlas, N., Kolankaya, D. (2010). Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. *Drug Chem. Toxicol.*, 33(2), 193-203.
- Bai, Y., Chang, F., Zhou, R., Jin, P.P., Matsumoto, H., Sokabe, M., Chen, L. (2011). Increase of anteroventral periventricular kisspeptin neurons and generation of E2-induced LH-surge system in male rats exposed perinatally to environmental dose of bisphenol-A. *Endocrinology*, 152, 1562–1571.
- Bakar, N.A., Salleh, M.M., Umar, A.A., Shapter, J.G. (2017). Design and measurement technique of surface-enhanced Raman scattering for detection of bisphenol A. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 8, 025008. DOI: 10.1088/2043-6254/aa5e22
- Barakat, A.M.A. (2007). Some diagnostic studies on male New Zealand rabbit experimentally infected with *Toxoplasma gondii* strain. *Glob Vet*, 1(1), 17-23.
- Baralić, K., Buha Djordjevic, A., Živančević, K., Antonijević, E., Anđelković, M., Javorac, D., Ćurčić, M., Bulat, Z., Antonijević, B., Đukić-Ćosić, D. (2020). Toxic effects of the mixture of phthalates and bisphenol a—subacute oral toxicity study in wistar rats. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17(3), 746.
- Bathaie, S.Z., Mousavi, S.Z. (2010). New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 50(8), 761-786.
- Battaglini, M., Castellini, C., Lattaioli, P. (1993). Variability of the main characteristics of rabbit semen. *J. Appl. Anim. Res.*, 15, 439-439.
- Bell, D. J., Mitchell, S. (1984). Effects of female urine on growth and sexual maturation in male rabbits. *Reproduction*, 71(1), 155-160.
- Berger, M., Jean-Faucher, C., De Turckheim, M., Veyssiere, G., Blanc, M.R., Poirier, J.C., Jean, C. (1982). Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlation with sexual and behavioural development. *Eur. J. Endocrinol.*, 99(3), 459-465.
- Bharti, S., Golechha, M., Kumari, S., Siddiqui, K.M., Arya, D.S. (2012). Akt/GSK-3 β /eNOS phosphorylation arbitrates safranal-induced myocardial protection against ischemia–reperfusion injury in rats. *Eur. J. Nutr.*, 51(6), 719-727.
- Bilbao, M. M. (1996). Manejo en inseminación artificial: factores que afectan a la calidad seminal y al índice de fertilidad. In: *XXI symposium de cunicultura: Amposta: 23, 24 y 25 de mayo de 1996* (p. 1). Asociación Española de Cunicultura (ASESCU).

- Blackshaw, A.W., Salisbury, G.W. (1957). Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention. *J. Dairy Sci.*, 40(9), 1099-1106.
- Boiti, C., Castellini, C., Besenfelder, U., Theau-Clément, M., Liguori, L., Renieri, T., Pizzi, F. (2005). Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Sci.*, 13(2), 71-91.
- Bo-Qiang, L., Si-Tong, Z., Zu-Yuan, L., Wan-Yun, N., Bin, C., Yuan, L., Xuyun, L., Liangen, M., You-Chao, C., Xin-Zhen, Y., Zhong, C., Xiao-Ying, Y., Wei-Wei, H. (2018). Safranal carried by nanostructured lipid vehicles inhibits generalized epilepsy in mice. *Pharmazie*, 73(4), 207-212.
- Boskabady, M.H., Byrami, G., Feizpour, A. (2014). The effect of safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), on tracheal responsiveness, serum levels of cytokines, total NO and nitrite in sensitized guinea pigs. *Pharmacol Rep*, 66(1), 56-61.
- Branham, J.M. (1969). Movements of free-swimming rabbit spermatozoa. *J. reprod. fertil.*, 18: 97-105.
- Brewer, N.R. (2006). Biology of the rabbit. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 45(1), 8-24.
- Brown, S.A. (2001). The domestic rabbit: husbandry and clinical techniques. *Compend Contin Educ Vet*, 23(2), 15-22.
- Bukhari, S. I., Pattnaik, B., Rayees, S., Kaul, S., Dhar, M. K. (2015). Safranal of *Crocus sativus* L. inhibits inducible nitric oxide synthase and attenuates asthma in a mouse model of asthma. *Phytother. Res.*, 29(4), 617-627.
- Byskov, A. G. (1986). Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol. Rev.*, 66(1), 71-117.
- Cai, M., Li, Y. Y., Zhu, M., Li, J. B., Qin, Z. F. (2020). Evaluation of the effects of low concentrations of bisphenol AF on gonadal development using the *Xenopus laevis* model: A finding of testicular differentiation inhibition coupled with feminization. *Environ. Pollut.*, 260, 113980.
- Campos, A., Gadelha, C., Guerreiro, M., Pereira, E., Lima, I., Linard, M., Meneses, H., Castelo-Branco, K., Estevam, F. (2014). Male Rabbit Reproductive Physiology. *Res. J. Agric. Sci.*, Vol 2(8): 120–128.
- Cao, J., Mickens, J.A., McCaffrey, K.A., Leyrer, S.M., Patisaul, H.B. (2012). Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus. *Neurotoxicology*, 33, 23–36.
- Carabaño, J.A., Piquer, J. (2003). The digestive system of the rabbit. In: C. de Blas and J. Wiseman (eds). *Nutrition of the Rabbit*, 2nd ed. 333: 1-18.
- Carmona, M., Zalacain, A., Salinas, M. R., Alonso, G. L. (2007). A new approach to saffron aroma. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 47(2), 145-159.
- Castellini, C., Besenfelder, U., Pizzi, F., Theauclement, M., Vicente, J.S., Renieri, T. (2006a). Developments in the investigation of rabbit semen and buck management. *Recent Advances In Rabbit Sciences*, 53-65.

- Castellini, C., Cardinali, R., Dal Bosco, A., Minelli, A., Camici, O. (2006b). Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology*, 65(4), 703-712.
- Castellini, C., Lattaioli, P., Moroni, M., Minelli, A. (2000). Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 63(3-4), 275-282.
- Castellini, C., Mourvaki, E., Dal Bosco, A., Galli, F. (2007). Vitamin E biochemistry and function: a case study in male rabbit. *Reprod. Domest. Anim.*, 42(3), 248-256.
- Castillo-Sanchez, R., Ramirez-Ricardo, J., Martinez-Baeza, E., Cortes-Reynosa, P., Candanedo-Gonzales, F., Gomez, R., Salazar, E.P. (2020). Bisphenol A induces focal adhesions assembly and activation of FAK, Src and ERK2 via GPER in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol. Vitro.*, 66, 104871. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104871>
- Castro, A. C. S., Berndtson, W. E., Cardoso, F. M. (2002). Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Braz. J. Med. Biol.*, 35(4), 493-498.
- Česen, M., Lambropoulou, D., Laimou-Geraniou, M., Kosjek, T., Blaznik, U., Heath, D., Heath, E. (2016). Determination of bisphenols and related compounds in honey and their migration from selected food contact materials. *J. Agric. Food Chem*, 64(46), 8866-8875.
- Chakraborty, P. (2020). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev. Environ. Health*, 35, 201–210.
- Chang, J., Liu, S., Zhou, S., Wang, M., Zhu, G. (2013). Effects of butachlor on reproduction and hormone levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Toxicol. Pathol.*, 65(1-2), 205-209.
- Chang, M. C. (1959). Fertilizing capacity of spermatozoa. Recent progress in the endocrinology of reproduction, Ed:Lloyd, C. W., New York and London: Academic Press Inc., p.131-163.
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., Pezzi, V. (2014). Role of estrogen receptors and G protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis. *Front. Endocrinol.*, 5, 1. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00001>
- Chitra, K. C., Rao, K. R., Mathur, P. P. (2003). Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: a histological and biochemical study. *Asian J. Androl.*, 5(3), 203-208.
- Chrenek, P., Trandzik, J., Massanyi, P., Makarevich, A., Lukac, N., Peskovicova, D., Paleyanda, R. (2007). Effect of transgenesis on reproductive traits of rabbit males. *Anim. Reprod. Sci.*, 99(1-2), 127-134.
- Chubb, C., Ewing, L., Irby, D., Desjardins, C. (1978). Testicular Maturation in the Rabbit: Secretion of Testosterone, Dihydrotestosterone, 5 α -Androstan-3 α , 17 α -diol and 5 α -Androstan-3 α , 17 α -diol by Perfused Rabbit Testes-Epididymides and Spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, 18(2), 212-218.

- Cockle, S. M., Aitken, A., Beg, F., Smyth, D. G. (1989). A novel peptide, pyroglutamylglutamylproline amide, in the rabbit prostate complex, structurally related to thyrotrophin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.*, 264(14), 7788-7791.
- Cummings, B. (2001). An imprint of Addison Wesley Longman. Inc, 2, 416-434
- Cummins, J. M., Woodall, P. F. (1985). On mammalian sperm dimensions. *Reproduction*, 75(1), 153-175.
- Dedes, I. (2012). Kisspeptins and the control of gonadotrophin secretion. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 58, 121-128.
- Del Niño Jesus, A., Muños López, I., Josa, A., Espinosa, E., Gracia, M., Garcia Martinez, M. P., Leuza, A. (1997). Modifications of some parameters of the rabbit ejaculate after ablation of the vesicular gland. *World Rabbit. Sci.*, 5(1). DOI: <https://doi.org/10.4995/wrs.1997.310>
- Delkhosh-Kasmaie, F., Farshid, A. A., Tamaddonfard, E., Imani, M. (2018). The effects of safranal, a constitute of saffron, and metformin on spatial learning and memory impairments in type-1 diabetic rats: behavioral and hippocampal histopathological and biochemical evaluations. *Biomed. Pharmacother.*, 107, 203-211.
- Dimitrov, R. S. (2010). Computed tomography imaging of the prostate gland in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Arh.*, 80(6), 771-778.
- Dimitrov, R., Stamatova, K. (2011). Comparative ultrasonographic study of the prostate complex and bulbourethral glands of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, 35(3), 201-205.
- Dimitrov, R., Stamatova, K., Kostov, D. (2013). Comparative imaging of the vesicular glands in New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, 37(1), 97-101.
- Ditsa, M., Geromihalos, G., Tragoulia, E., Markala, D., Meleti, C., Sinakos, Z. (2012). C0135 In vitro and in silico study of the effect of crocin and safranal on human plasma coagulation. *Thromb. Res.*, 130, S167.
- Dontas, I. A., Marinou, K. A., Iliopoulos, D., Tsantila, N., Agrogiannis, G., Papalois, A., Karatzas, T. (2011). Changes of blood biochemistry in the rabbit animal model in atherosclerosis research; a time-or stress-effect. *Lipids Health Dis.*, 10(1), 139.
- Eddy, E.M. (2006). The Spermatozoon. In: JD Neill (Ed). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Philadelphia, AP: Elsevier, 3-54.
- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil. Steril.*, 103(1), 11-21.
- El-Azim, A.A., El-Kamash, E.M. (2011). Evaluation of semen quality and its relation to mating system for some breeds of rabbits under environmental conditions in the middle of Egypt. *Egypt. Poult. Sci*, 31(2), 467-480.

- Emmens, C. W. (1947). The motility and viability of rabbit spermatozoa at different hydrogen-ion concentrations. *Physiol. J.*, 106(4), 471-481.
- Ewuola, E. O., Egbunike, G. N. (2010). Gonadal and extra-gonadal sperm reserves and sperm production of pubertal rabbits fed dietary fumonisin B1. *Anim. Reprod. Sci.*, 119(3-4), 282-286.
- Farahmand, S. K., Samini, F., Samini, M., Samarghandian, S. (2013). Safranal ameliorates antioxidant enzymes and suppresses lipid peroxidation and nitric oxide formation in aged male rat liver. *Biogerontology*, 14(1), 63-71.
- Feng, Y., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Guo, Q., Shao, B. (2016). Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere*, 147, 9-19.
- Feng, Y., Yin, J., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Shao, B. (2012). Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicol. Lett.*, 211(2), 201-209.
- Fernández-Sánchez, L., Lax, P., Esquivia, G., Martín-Nieto, J., Pinilla, I., Cuenca, N. (2012). Safranal, a saffron constituent, attenuates retinal degeneration in P23H rats. *PLoS one*, 7(8): e43074.
- Feyzi, R., Boskabady, M.H., Seyed Hosseini Tamijani, S.M., Rafatpanah, H., Rezaei, S.A. (2016). The effect of safranal on Th1/Th2 cytokine balance. *Iran J Immunol*, 13(4), 263-273.
- Fic, A., Mlakar, S.J., Juvan, P., Mlakar, V., Marc, J., Dolenc, M.S., Brober, K., Mašič, L.P. (2015). Genome-wide gene expression profiling of low-dose, long-term exposure of human osteosarcoma cells to bisphenol A and its analogs bisphenols AF and S. *Toxicol. In Vitro*. 29(5), 1060-1069.
- Finzi, A., Morera, P., Kuzmisky, G. (2010). Sperm abnormalities as possible indicators of rabbit chronic heat stress. *World Rabbit. Sci.*, 3(4), 157-161.
- Finzi, A., Morera, P., Macchioni, P. (1994). Modifications of some rabbit spermatogenic parameters in relationship to high ambient temperatures. *Egypt. j. basic appl. sci.*, Vol.4 (2), 27-28.
- Forouzanfar, F., Asadpour, E., Hosseinzadeh, H., Boroushaki, M.T., Adab, A., Dastpeiman, S.H., Sadeghnia, H.R. (2021). Safranal protects against ischemia-induced PC12 cell injury through inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 394(4), 707-716.
- Fotoohi, A., Moloudi, M.R., Hosseini, S., Hassanzadeh, K., Feligioni, M., Izadpanah, E. (2021). A novel pharmacological protective role for safranal in an animal model of Huntington's disease. *Neurochem. Res.*, 46(6), 1372-1379.
- Frame, S.R., Hurtt, M.E., Green, J.W. (1994). Testicular maturation in prepubertal New Zealand white rabbits. *Vet. Pathol.*, 31(5), 541-545.
- Fraser, K.W. (1988). Reproductive biology of rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.), in central Otago, New Zealand. *N. Z. J. Ecol.*, 79-88.

- Frenzilli, G., Martorell-Ribera, J., Bernardeschi, M., Scarcelli, V., Jönsson, E., Diano, N., Moggio, M., Guidi, P., Sturve, J., Asker, N. (2021). Bisphenol A and bisphenol S induce endocrine and chromosomal alterations in brown trout. *Front. Endocrinol.*, 12, 645519. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.645519>
- Fukui, H., Toyoshima, K., Komaki, R. (2011). Psychological and neuroendocrinological effects of odor of saffron (*Crocus sativus*). *Phytomedicine*, 18(8-9), 726-730.
- Gao, Z., Liu, S., Tan, L., Gao, X., Fan, W., Ding, C., Li, M., Tang, Z., Shi, X., Luo, Y., Song, S. (2022). Testicular toxicity of bisphenol compounds: Homeostasis disruption of cholesterol/testosterone via PPAR α activation. *Sci. Total Environ.*, 836, 155628. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155628>
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J. (2015). Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* 63(6), 1856-1862.
- Geromichalos, G.D., Lamari, F.N., Papandreou, M.A., Trafalis, D.T., Margarity, M., Papageorgiou, A., Sinakos, Z. (2012). Saffron as a source of novel acetylcholinesterase inhibitors: molecular docking and in vitro enzymatic studies. *J. Agric. Food Chem*, 60(24), 6131-6138.
- Geromichalos, G.D., Papadopoulos, T., Sahpazidou, D., Sinakos, Z. (2014). Safranal, a *Crocus sativus* L constituent suppresses the growth of K-562 cells of chronic myelogenous leukemia. In silico and in vitro study. *Food Chem. Toxicol*, 74, 45-50.
- Golmohammadzadeh, S., Jaafari, M.R., Hosseinzadeh, H. (2010). Does saffron have antisolar and moisturizing effects?. *Iran J Pharm Res*, 9(2), 133.
- Gould, K.G., Zaneveld, L.J.D., Williams, W.L. (1971). Scanning electron microscopy of mammalian gametes. *Archiv für Gynäkologie*, 210(3), 235-250.
- Gu, J., Wang, H., Zhou, L., Fan, D., Shi, L., Ji, G., Gu, A. (2020). Oxidative stress in bisphenol AF-induced cardiotoxicity in zebrafish and the protective role of N-acetyl N-cysteine. *Sci. Total Environ.*, 731, 139190.
- Gulay, M., Yildiz Gulay, O. (2018). 246 Punicalagin is protective against Bisphenol A toxicity in male New Zealand Rabbits. *J. Anim. Sci.*, 96(3), 26.
- Gules, O., Yildiz, M., Naseer, Z., Tatar, M. (2019). Effects of folic acid on testicular toxicity induced by bisphenol-A in male Wistar rats. *Biotech Histochem*, 94(1), 26-35.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2000). Textbook of medical physiology 10 edition Philadelphia.
- Hafez, E.S.E. (1995). Reprodução Animal. 6.baskı. Editora Manole LTDA, São Paulo.
- Hagen, D.R., Gilkey, A.L., Foote, R.H. (2010). Spermatozoal velocity and motility and its relationship to fertility in the rabbit inseminated with low sperm numbers. *World Rabbit. Sci.*, 10(4), 135-140.
- Hariri, A.T., Moallem, S.A., Mahmoudi, M., Hosseinzadeh, H. (2011). The effect of crocin and safranal, constituents of saffron, against subacute effect of diazinon on hematological and genotoxicity indices in rats. *Phytomedicine*. 18(6), 499-504.

- Hassanien, H.H.M., Baiomy, A.A. (2011). Effect of breed and parity on growth performance, litter size, litter weight, conception rate and semen characteristics of medium size rabbits in hot climates. *Egypt Poult Sci J*, 31-45.
- Hazman, Ö., Bozkurt, M.F. (2015). Anti-inflammatory and antioxidative activities of safranal in the reduction of renal dysfunction and damage that occur in diabetic nephropathy. *Inflammation*, 38(4): 1537-1545.
- Hecker, M., Kim, W.J., Park, J.W., Murphy, M.B., Villeneuve, D., Coady, K.K., Jones, P.D., Solomon, K.R., Van Der Kraak, G., Carr, J.A., Smith, E.E., Preez, L.D., Kendall, R.J., Giesy, J.P. (2005). Plasma concentrations of estradiol and testosterone, gonadal aromatase activity and ultrastructure of the testis in *Xenopus laevis* exposed to estradiol or atrazine. *Aquat. Toxicol.*, 72(4), 383-396.
- Heidary, M., Vahhabi, S., Nejadi, J.R., Delfan, B., Birjandi, M., Kaviani, H., Givrad, S. (2008). Effect of saffron on semen parameters of infertile men. *Urol. J.* 5(4), 255-259.
- Herath, C.B., Jin, W., Watanabe, G., Arai, K., Suzuki, A.K., Taya, K. (2004). Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine*. 25(2), 163-172.
- Himeno, H., Sano, K. (1987). Synthesis of crocin, picrocrocin and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro. *Agric. Biol. Chem.*, 51(9): 2395-2400.
- Holt, W.V., Van Look, K.J. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, 127(5), 527-535.
- Holtz, W., Foote, R.H. (1972). Sperm production, output and urinary loss in the rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 141(3), 958-962.
- Holtz, W., Foote, R.H. (1978a). The anatomy of the reproductive system in male Dutch rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with special emphasis on the accessory sex glands. *J. Morphol.*, 158(1), 1-20.
- Holtz, W., Foote, R.H. (1978b). Composition of rabbit semen and the origin of several constituents. *Biol. Reprod.*, 18(2), 286-292.
- Hooshmandi, Z., Rohani, A.H., Eidi, A., Fatahi, Z., Golmanesh, L., Sahraei, H. (2011). Reduction of metabolic and behavioral signs of acute stress in male Wistar rats by saffron water extract and its constituent safranal. *Pharm. Biol.*, 49(9), 947-954.
- Hoque, E., Sujan, K.M., Mia, M.S., Haque, M.I., Mustari, A., Miah, M.A., Islam, M.K. (2020). Effects of bisphenol-A (BPA) on body weight, hematological parameters and histo-texture of kidney in swiss albino mice. *Asian J. Med. Biol. Res.*, 6(4), 635-640.
- Hosseinzadeh, H., Ghenaati, J. (2006). Evaluation of the antitussive effect of stigma and petals of saffron (*Crocus sativus*) and its components, safranal and crocin in guinea pigs. *Fitoterapia*, 77(6): 446-448.

- Hosseinzadeh, H., Jahanian, Z. (2010). Effect of *Crocus sativus* L.(saffron) stigma and its constituents, crocin and safranal, on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother Res*, 24(5): 726-730.
- Hosseinzadeh, H., Karimi, G., Niapoor, M. (2003). Antidepressant effect of *Crocus sativus* L. stigma extracts and their constituents, crocin and safranal, in mice. In: I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, 650, 435-445.
- Hosseinzadeh, H., Modaghegh, M.H., Saffari, Z. (2009). *Crocus sativus* L.(Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 6(3), 343-350.
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H. (2007). Protective effect of safranal on pentylenetetrazol-induced seizures in the rat: involvement of GABAergic and opioids systems. *Phytomedicine*, 14(4): 256-262.
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Ghaeni, F.A., Motamedshariaty, V.S., Mohajeri, S.A. (2012). Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Phytother. Res.*, 26(3), 381-386.
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R. (2005). Safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8(3): 394-399.
- Hosseinzadeh, H., Shakib, S.S., Sameni, A.K., Taghiabadi, E. (2013). Acute and subacute toxicity of safranal, a constituent of saffron, in mice and rats. *Iran J Pharm Res*, 12(1), 93.
- Hosseinzadeh, H., V. Khosravan (2002). Anticonvulsant Effects of Aqueous and Ethanol Extracts of *Crocus Sativus* L Stigmas in Mice. *Arch Iran Med*, 5(1): 44-47.
- Hosseinzadeh, H., Younesi, H.M. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol.*, 2(1): 1-8.
- Hosseinzadeh, H., Ziaee, T., Sadeghi, A. (2008). The effect of saffron, *Crocus sativus* stigma, extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats. *Phytomedicine*, 15(6-7), 491-495.
- Huang, M., Liu, S., Fu, L., Jiang, X., Yang, M. (2020). Bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce oxidative stress and biomacromolecular damage in human granulosa KGN cells. *Chemosphere*. 253, 126707.
- Huang, X., Zhu, M., Hua, Y., Yan, X., Jiang, R. (2019). Safranal induces autophagy by AMPK activation and protects neurons against amyloid beta in Alzheimer's disease. *Trop. J. Pharm. Res.*, 18(3), 459-464.
- Huerkamp, M.J. (2003). The Rabbit. In: B. Ballard and R. Cheek (Ed). *Exotic Animal Medicine for the Veterinary Technician*. Blackwell Publishing, 191 – 226.

- Imenshahidi, M., Hosseinzadeh, H., Javadpour, Y. (2010). Hypotensive effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and its constituents, safranal and crocin, in normotensive and hypertensive rats. *Phytother. Res.*, 24(7), 990-994.
- Imenshahidi, M., Razavi, B.M., Faal, A., Gholampoor, A., Mousavi, S.M., Hosseinzadeh, H. (2015). The effect of chronic administration of safranal on systolic blood pressure in rats. *Iran J Pharm Res*, 14(2), 585.
- Int. Kyn. 1, <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicological-priority-index-platform-incorporation-exposure-data-chemical>, 22.05.2022
- Int. Kyn. 2, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73864>, 16.06.2022
- Int. Kyn. 3, <https://lubbil.ngontinh24.com/article/rabbit-reproduction-basics-lafebervet>, 03.02.2020
- Int. Kyn. 4., <https://funflowerfacts.files.wordpress.com/2013/10/saffron-crocus.jpg>, 21.10.2020
- Int. Kyn. 5, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/61041>, 12.10.2020
- Jabini, R., Ehtesham-Gharaee, M., Dalirsani, Z., Mosaffa, F., Delavarian, Z., Behravan, J. (2017). Evaluation of the cytotoxic activity of crocin and safranal, constituents of saffron, in oral squamous cell carcinoma (KB Cell Line). *Nutr. Cancer*, 69(6), 911-919.
- Jagne, J., White, D., Jefferson, F. (2016). Endocrine-disrupting chemicals: adverse effects of bisphenol A and parabens to women's health. *Water Air Soil Pollut.*, 227(6), 1-10.
- Jiang, X., Li, Y., Feng, J.L., Nik Nabil, W.N., Wu, R., Lu, Y., Liu, H., Xi, Z.C., Xu, H.X. (2020). Safranal prevents prostate cancer recurrence by blocking the Re-activation of quiescent cancer cells via downregulation of S-phase kinase-associated protein 2. *Front. Cell Dev. Biol.*, 8, 598620. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.598620>
- Jiang, Z., Wang, J., Li, X., Zhang, X. (2016). Echinacoside and Cistanche tubulosa (Schenk) R. wight ameliorate bisphenol A-induced testicular and sperm damage in rats through gonad axis regulated steroidogenic enzymes. *J. Ethnopharmacol.*, 193, 321-328.
- Jo, A., Ji, K., Choi, K. (2014). Endocrine disruption effects of long-term exposure to perfluorodecanoic acid (PFDA) and perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) in zebrafish (*Danio rerio*) and related mechanisms. *Chemosphere*, 108, 360-366.
- Johnsen, S.G. (1970). Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Horm Res Paediatr*, 1(1), 2-25.
- Jubaidi, F.F., Mathialagan, R.D., Noor, M.M., Taib, I.S., Budin, S.B. (2019). Monosodium glutamate daily oral supplementation: Study of its effects on male reproductive system on rat model. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 65, 194-204.

- Kamaruzaman, K.A., Mat Noor, M. (2012). Reversible spermatotoxic effect of *Andrographis paniculata* methanol extract in Sprague Dawley rats. *Malays. Appl. Biol.*, 46, 225–232.
- Kamel, I.K., Attia, Y.A. (2011). Effect of dietary lecithin supplementation on improvement semen quality, reproductive performance plasma biochemical traits and antioxidant changes in rabbit bucks. *Egypt. Poult. Sci. J.*, 31(3), 667-681.
- Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y. (2006). Human exposure to Bisphenol A. *Toxicology*, 226, 79–89.
- Karabulut, H., Gulay, M.S. (2022). Investigation of BPA Toxicity in Male New Zealand White Rabbits. *EJVETMED*, 2(2), 6-12.
- Karafakıoğlu, Y.S., Bozkurt, M.F., Hazman, Ö., Fıdan, A.F. (2017). Efficacy of safranal to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem. J.*, 474(7), 1195-1203.
- Kawa, I.A., Masood, A., Ganie, M.A., Fatima, Q., Jeelani, H., Manzoor, S., Rizvi, S.M., Muzamil, M., Rashid, F. (2019). Bisphenol A (BPA) acts as an endocrine disruptor in women with Polycystic Ovary Syndrome: Hormonal and metabolic evaluation. *Obes. Med.*, 14, 100090. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2019.100090>
- Kawamura, Y., Etoh, M., Hirakawa, Y., Abe, Y., Mutsuga, M. (2014). Bisphenol A in domestic and imported canned foods in Japan. *Food Addit. Contam. Part A Chem.*, 31, 330–340.
- Khayyat, S.,E. Elgendy (2018). Safranal epoxide–A potential source for diverse therapeutic applications. *Saudi Pharm J*, 26(1): 115-119.
- Khbouz, B., de Bournonville, C., Court, L., Taziaux, M., Corona, R., Arnal, J.F., Lenfant, F., Cornil, C.A. (2020). Role for the membrane estrogen receptor alpha in the sexual differentiation of the brain. *Eur. J. Neurosci.*, 52, 2627–2645.
- Kianbakht, S., Hajiaghaee, R. (2011). Anti-hyperglycemic effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, in alloxan-induced diabetic rats. *J. Med. Plant Res.*, 3(39): 82-89.
- Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol. Sci.*, 84(2), 249-259.
- Kong, W.H., Zheng, G.U., Lu, J.N., Tso, J.K. (2000). Temperature dependent expression of cdc2 and cyclin B1 in spermatogenic cells during spermatogenesis. *Cell Res.*, 10(4), 289.
- Kuzminsky, G., Fausto, A.M., Morera, P. (1996). Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36(5), 565-575.
- Lakabi, L., Zerrouki, N., Menad, R., Khaldoun, H., Hamidouche, Z. (2016). Postnatal development of gonads in relation to the body growth in the male rabbit white Algerian population. *Agric. Food Sci.*, 4, 402-414.

- Lassen, T.H., Frederiksen, H., Jensen, T.K., Petersen, J.H., Joensen, U.N., Main, K.M., Skakkebaek, N.E., Juul, A., Jørgensen, N., Andersson, A.M. (2014). Urinary bisphenol A levels in young men: association with reproductive hormones and semen quality. *Environ. Health Perspect.*, 122(5), 478-484.
- Lau, I.F., Saksena, S.K. (1979). Steroids in the rete testis fluid of fertile male rabbits. *Arch. Androl.*, 2(1), 49-52.
- Lavara, R., García, M.L., Torres, C., Vicente, J.S., Baselga, M. (2008a). Genetic parameters for semen traits of rabbit males: II. Motility. In: Proceedings of the 9th WRSA Congress, 159-162.
- Lavara, R., García, M.L., Torres, C., Vicente, J.S., Baselga, M. (2008c). Genetic parameters for semen traits of rabbit males: I. Production, morphology, and sperm head morphometry. In: Proceedings of the 9th WRSA Congress, 153-158.
- Lavara, R., Vicente, J.S., Marco-Jiménez, F., Baselga, M. (2008b). Correlation between CASA and ASMA parameters in rabbit semen. In: Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 10-13 Haziran 2008, World Rabbit. Sci. Association, 381-386.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71(4), 952-958.
- Lebas, F., Coudert, P., De Rochambeau, H., Thébault, R.G. (1997). The Rabbit: husbandry, health, and production. Food and Agriculture organization of the United Nations. FAO Animal Production and Health Series, No. 21, Rome.
- Lertnimitphun, P., Jiang, Y., Kim, N., Fu, W., Zheng, C., Tan, H., Zhou, H., Zhang, X., Pei, W., Lu, Y., Xu, H. (2019). Safranin alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis and suppresses macrophage-mediated inflammation. *Front. Pharmacol.*, 10, 1281.
- Li Puma, S., Landini, L., Macedo Jr, S.J., Seravalli, V., Marone, I.M., Coppi, E., Patacchini, R., Geppetti, P., Materazzi, S., Nassini, R., De Logu, F. (2019). TRPA 1 mediates the antinociceptive properties of the constituent of *Crocus sativus* L., safranin. *J. Cell. Mol. Med.*, 23(3), 1976-1986.
- Li, J., Nan, S., Ruina, C., Yixing, F., Bing, S., Xuejiang, G., Hongxia, Z., Jiayin, D. (2016). Gestational and lactational exposure to bisphenol AF in maternal rats increases testosterone levels in 23-day-old male offspring. *Chemosphere*, 163: 552-61.
- Li, M., Yang, Y., Yang, Y., Yin, J., Zhang, J., Feng, Y., Shao, B. (2013). Biotransformation of bisphenol AF to its major glucuronide metabolite reduces estrogenic activity. *PLoS one*, 8(12), 83170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083170>
- Li, M.W.M., Mruk, D.D., Lee, W.M., Cheng, C.Y. (2009). Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41, 2302-2314.
- Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D.A. (2002). Crocus sativus-biological active constituents. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 26, 293-312.

- Liang, S., Yin, L., Shengyang Yu, K., Hofmann, M.C., Yu, X. (2017). High-content analysis provides mechanistic insights into the testicular toxicity of bisphenol A and selected analogues in mouse spermatogonial cells. *Toxicol. Sci.*, 155(1), 43-60.
- Liao, C., Kannan, K. (2013). Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *J. Agric. Food Chem*, 61(19), 4655-4662.
- Liao, C., Liu, F., Guo, Y., Moon, H.B., Nakata, H., Wu, Q., Kannan, K. (2012). Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environ. Sci. Technol.*, 46(16), 9138-9145.
- Liu, M., Amini, A., Ahmad, Z. (2017). Safranal and its analogs inhibit Escherichia coli ATP synthase and cell growth. *Int. J. Biol. Macromol.*, 95, 145-152.
- Liu, Z., Xu, X.H., Liu, T.Y., Hong, Z.Y., Urade, Y., Huang, Z.L., Qu, W.M. (2012). Safranal enhances non-rapid eye movement sleep in pentobarbital-treated mice. *CNS Neurosci. Ther.*, 18(8), 623-630.
- Lowe, J.A. (2010). 17 Pet Rabbit Feeding and Nutrition. *Nutrition of the Rabbit*, 294.
- Lowry, O.H., Nira, J.R., Lewis, F., Rose, J.R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-75.
- Lukáč, N., Massanyi, P., Kročková, J., Nad', P., Slamečka, J., Ondruška, L., Formický, G., Trandžík, J. (2009). Relationship between trace element concentrations and spermatozoa quality in rabbit semen. *Slovak J. Anim. Sci.*, 42(Supplement), 46-50.
- Luna, L.G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Co. Newyork, 32.
- Ma, Y., Liu, H., Wu, J., Yuan, L., Wang, Y., Du, X., Wang, R., Marwa, P.W., Petlulu, P., Chen, X., Zhang, H. (2019). The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environ. Res.*, 176, 108575. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108575>
- Macari, M., Machado, C.R. (1978). Sexual maturity in rabbits defined by the physical and chemical characteristics of the semen. *Lab. Anim.*, 12(1), 37-39.
- Maćczak, A., Cyrkler, M., Bukowska, B., Michałowicz, J. (2016). Eryptosis-inducing activity of bisphenol A and its analogs in human red blood cells (in vitro study). *J. Hazard. Mater.*, 307, 328-335
- Maćczak, A., Cyrkler, M., Bukowska, B., Michałowicz, J. (2017). Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (in vitro study). *Toxicol. In Vitro*, 41, 143-149.
- Macedo, A.P., Miguel, O. (1986). Puberty in New Zealand White rabbits. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo*, 23 (1):55-67.

- Madan, K., Nanda, S. (2018). In-vitro evaluation of antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase activities of safranal and determination of its sun protection factor in skin photoaging. *Bioorg. Chem.*, 77: 159-167.
- Maeda, A., Kai, K., Ishii, M., Ishii, T., Akagawa, M. (2014). Safranal, a novel protein tyrosine phosphatase 1 B inhibitor, activates insulin signaling in C 2 C 12 myotubes and improves glucose tolerance in diabetic KK-Ay mice. *Mol Nutr Food Res*, 58(6), 1177-1189.
- Majid, M., Ijaz, F., Baig, M.W., Nasir, B., Khan, M.R., Haq, I.U. (2019). Scientific Validation of Ethnomedicinal Use of Ipomoea batatas L. Lam. as Aphrodisiac and Gonadoprotective Agent against Bisphenol A Induced Testicular Toxicity in Male Sprague Dawley Rats. *Biomed. Res. Int.*, 8939854. <https://doi.org/10.1155/2019/8939854>
- Maleki, B.H., Tartibian, B., Mooren, F.C., Nezhad, F.Y., Yaseri, M. (2016). Saffron supplementation ameliorates oxidative damage to sperm DNA following a 16-week low-to-intensive cycling training in male road cyclists. *J. Funct. Foods*, 21, 153-166.
- Malekzadeh, S., Heidari, M.R., Razavi, B.M., Rameshrad, M., Hosseinzadeh, H. (2019). Effect of safranal, a constituent of saffron, on olanzapine (an atypical antipsychotic) induced metabolic disorders in rat. *Iran. J. Basic Med. Sci*, 22(12), 1476.
- Mann, T., Parsons, U. (1947). Effect of testicular hormone on the formation of seminal fructose. *Nature*, 160(4061), 294.
- Marai, I.F.M., Habeeb, A.A.M., Gad, A.E. (2002). Rabbits' productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 78(2), 71-90.
- Mardani, M., Vaez, A., Razavi, S. (2014). Effect of saffron on rat sperm chromatin integrity. *Iran. J. Reprod. Med.*, 12(5), 343.
- Martínez, M.A., Rodríguez, J.L., Lopez-Torres, B., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.R., Maximiliano, J.E., Anadón, A., Ares, I. (2020). Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ. Int.*, 135, 105414.
- Matsushima, A., Liu, X., Okada, H., Shimohigashi, M., Shimohigashi, Y. (2010). Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ER α but a highly specific antagonist for ER β . *Environ. Health Perspect.*, 118(9), 1267-1272.
- Meeker, J.D., Ehrlich, S., Toth, T.L., Wright, D.L., Calafat, A.M., Trisini, A.T., Ye, X., Hauser, R. (2010). Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod. Toxicol.*, 30(4), 532-539.
- Mehdizadeh, R., Parizadeh, M.R., Khooei, A.R., Mehri, S., Hosseinzadeh, H. (2013). Cardioprotective effect of saffron extract and safranal in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. *Iran. J. Basic Med. Sci*, 16(1), 56.
- Melnyk, J.P., Wang, S., Marccone, M.F. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Int. Food Res. J.*, 43(8), 1981-1989.

- Mendoza, G., White, I. G., Chow, P. (1989). Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology*, 32(3), 455-466.
- Meng, Z., Tian, S., Yan, J., Jia, M., Yan, S., Li, R., Zhang, R., Zhu, W., Zhou, Z. (2019). Effects of perinatal exposure to BPA, BPF and BPAF on liver function in male mouse offspring involving in oxidative damage and metabolic disorder. *Environ. Pollut.*, 247, 935-943.
- Mentor, A., Wänn, M., Brunström, B., Jönsson, M., Mattsson, A. (2020). Bisphenol AF and bisphenol F induce similar feminizing effects in chicken embryo testis as bisphenol A. *Toxicol. Sci.*, 178(2), 239-250.
- Michałowicz, J., Mokra, K., Bąk, A. (2015). Bisphenol A and its analogs induce morphological and biochemical alterations in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Toxicol. In Vitro*, 29(7), 1464-1472.
- Millar, R.P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Anim. Reprod. Sci.*, 88(1-2), 5-28.
- Moon, D.G., Sung, D.J., Kim, Y.S., Cheon, J., Kim, J.J. (2001). Bisphenol A inhibits penile erection via alteration of histology in the rabbit. *Int. J. Impot. Res.*, 13(5), 309-316.
- Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., Tyler, C.R. (2017). Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environ. Sci. Technol.*, 51(21), 12796-12805.
- Morton, D. (1988). The use of rabbits in male reproductive toxicology. *Environ. Health Perspect.*, 77, 5-9.
- Mourabit, S., Fitzgerald, J.A., Ellis, R.P., Takesono, A., Porteus, C.S., Trznadel, M., Metz, J., Winter, M.J., Kudoh, T., Tyler, C.R. (2019). New insights into organ-specific oxidative stress mechanisms using a novel biosensor zebrafish. *Environ. Int.*, 133, 105138.
- Mourvaki, E., Cardinali, R., Dal Bosco, A., Castellini, C. (2010). In vitro antioxidant activity of the prostatic secretory granules in rabbit semen after exposure to organic peroxides. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 8(1), 16.
- Mukherjee, D.P., Johari, M.P., Bhattacharya, P. (1951). The gelatinous mass in rabbit semen. *Nature*, 168(4271), 422-423.
- Müller, B., Kirchner, C. (1978). Influence of seminal plasma proteins on motility of rabbit spermatozoa. *Reproduction*, 54(1), 167-172.
- Naghshineh, A., Dadras, A., Ghalandari, B., Riazi, G.H., Modaresi, S.M.S., Afrasiabi, A., Aslani, M.K. (2015). Safranal as a novel anti-tubulin binding agent with potential use in cancer therapy: An in vitro study. *Chem. Biol. Interact.*, 238, 151-160.
- Nelson, D.A. (1953). The synthesis of safranal, Dept. of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, Doktora tezi.
- Ohkawa, H., Nobuko, O., Kunio, Y. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 351-58.

- Okab, A.B. (2007). Semen characteristics and plasma testosterone of New Zealand male rabbits as affected by environmental temperatures. *Slovak J. Anim. Sci.*, 40(4), 161-167.
- Oliveira, C.E.A., Badu, C.A., Ferreira, W.M., Kamwa, E.B., Lana, A.M.Q. (2004). Effects of dietary zinc supplementation on spermatogenic characteristics of rabbit breeders. In Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, 7-10 Eylül 2004, Puebla, Mexico.
- Orgebin-Crist, M.C. (1968). Gonadal and epididymal sperm reserves in the rabbit: estimation of the daily sperm production. *Reproduction*, 15(1), 15-25.
- Pan, P.K., Qiao, L.Y., Wen, X.N. (2016). Safranal prevents rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in an in vitro model of Parkinson's disease through regulating Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Cell. Mol. Biol.*, 62(14), 11-17.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2010). Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 3(1), 2-12.
- Park, B., Kwon, J.E., Cho, S.M., Kim, C.W., Lee, D.E., Koo, Y.T., Lee, S.H., Lee, H.M., Kang, S.C. (2018). Protective effect of *Lespedeza cuneata* ethanol extract on Bisphenol A-induced testicular dysfunction in vivo and in vitro. *Biomed. Pharmacother.*, 102, 76-85.
- Parsons, U. (1950). Fructose in rabbit semen: A study of normal fluctuations, and changes evoked by testosterone and stilboestrol. *J. Endocrinol.*, 6(4), 412-422.
- Pérez-Sánchez, F., Tablado, L., Soler, C. (1997). Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. *Theriogenology*, 47(4), 893-901.
- Phillips, D.M. (1977). Surface of the equatorial segment of the mammalian acrosome. *Biol. Reprod.*, 16(1), 128-137.
- Pintado, C., de Miguel, A., Acevedo, O., Nozal, L., Novella, J.L., Rotger, R. (2011). Bactericidal effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on *Salmonella enterica* during storage. *Food Control*, 22(3-4), 638-642.
- Pitsikas, N. (2021). *Crocus sativus* L. Extracts and Its Constituents Crocins and Safranal; Potential Candidates for Schizophrenia Treatment?. *Molecules*, 26(5): 1237.
- Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.*, 16(2), 359-364.
- Plant, T.M., Ramaswamy, S., De Gendt, K. (2016). Endocrine Control of Spermatogenesis. In: Huhtaniemi I, Martini L (eds), *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (2 nd ed) Oxford: Academic Press, 684-691.
- Prins, G.S., Zaneveld, L.J. (1979). Distribution of spermatozoa in the rabbit vas deferens. *Biol. Reprod.*, 21(1), 181-185.
- Qiu, W., Liu, S., Chen, H., Luo, S., Xiong, Y., Wang, X., Xu, B., Zheng, C., Wang, K.J. (2021). The comparative toxicities of BPA, BPB, BPS, BPF, and BPAF on the

- reproductive neuroendocrine system of zebrafish embryos and its mechanisms. *J. Hazard. Mater.*, 406, 124303.
- Qiu, W., Zhao, Y., Yang, M., Farajzadeh, M., Pan, C., Wayne, N.L. (2016). Actions of bisphenol A and bisphenol S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish. *Endocrinology*, 157, 636–647.
- Rafieipour, F., Hadipour, E., Emami, S.A., Asili, J., Tayarani-Najaran, Z. (2019). Safranal protects against beta-amyloid peptide-induced cell toxicity in PC12 cells via MAPK and PI3 K pathways. *Metab. Brain Dis.*, 34(1), 165-172.
- Rahaiee, S., Moini, S., Hashemi, M., Shojaosadati, S.A. (2015). Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review. *J. Food Sci. Technol.*, 52(4), 1881-1888.
- Rahiman, N., Akaberi, M., Sahebkar, A., Emami, S.A., Tayarani-Najaran, Z. (2018). Protective effects of saffron and its active components against oxidative stress and apoptosis in endothelial cells. *Microvasc. Res.*, 118, 82-89.
- Reece, W.O. (2009). Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals. 4th Ed., Chapter 14, 439-449.
- Regueiro, J., Wenzl, T. (2015a). Determination of bisphenols in beverages by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1422, 230-238.
- Regueiro, J., Wenzl, T. (2015b). Development and validation of a stable-isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of bisphenols in ready-made meals. *J. Chromatogr. A*, 1414, 110-121.
- Rehfeld, A., Andersson, A.M., Skakkebæk, N.E. (2020). Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and bisphenol analogs, but not bisphenol A (BPA), activate the CatSper Ca^{+2} channel in human sperm. *Front. Endocrinol.*, 11, 324.
- Rezaee, R., Hosseinzadeh, H. (2013). Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iran. J. Basic Med. Sci* 16(1): 12.
- Riahi-Zanjani, B., Balali-Mood, M., Mohammadi, E., Badie-Bostan, H., Memar, B., Karimi, G. (2015). Safranal as a safe compound to mice immune system. *Avicenna J. Phytomedicine*, 5(5), 441.
- Riaz, A., Pasha, I., Sharif, M.K., Javaria, S. (2021). Bisphenol A and its Analogues: Human Exposure and Biological Effects-A Review. *Pak. J. Sci. Ind. Res. A: Phys. Sci.*, 64(2), 173-190.
- Roca, J., Martinez, S., Vazquez, J.M., Lucas, X., Parrilla, I., Martinez, E.A. (2000). Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 C. *Anim. Reprod. Sci.*, 64(1-2), 103-112.
- Roca, J., Martinez, E., Vázquez, J.M. (1993). Seasonal variation in fructose and citric acid in seminal plasma of Murciano-Granadina goats. *Small Rumin. Res.*, 10(3), 219-226.

- Roca, J., Martínez, S., Orengo, J., Parrilla, I., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. (2005). Influence of constant long days on ejaculate parameters of rabbits reared under natural environment conditions of Mediterranean area. *Livest. Prod. Sci.*, 94(3), 169-177.
- Sabés-Alsina, M., Tallo-Parra, O., Mogas, M.T., Morrell, J.M., Lopez-Bejar, M. (2016). Heat stress has an effect on motility and metabolic activity of rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 173, 18-23.
- Sadeghnia, H.R., Hamideh, S., Fatemeh, F., Hossein, H. (2017). Neuroprotective effect of safranal, an active ingredient of *Crocus sativus*, in a rat model of transient cerebral ischemia. *Folia Neuropathol.*, 55: 206-13.
- Salleh, N., Giribabu, N., Feng, A.O.M., Myint, K. (2015). Bisphenol A, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and vinclozolin affect ex-vivo uterine contraction in rats via uterotonin (prostaglandin F2 α , acetylcholine and oxytocin) related pathways. *Int. J. Medical Sci.*, 12(11), 914.
- Samarghandian, S., Afshari, R., Sadati, A. (2014a). Evaluation of lung and bronchoalveolar lavage fluid oxidative stress indices for assessing the preventing effects of safranal on respiratory distress in diabetic rats. *Sci. World J*, vol. 2014, Article ID 251378, 6.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Samini, F. (2015). Preventive effect of safranal against oxidative damage in aged male rat brain. *Exp. Anim.*, 64(1), 65-71.
- Samarghandian, S., Borji, A., Delkhosh, M.B., Samini, F. (2013). Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 16(2), 352-362.
- Samarghandian, S., Shabestari, M.M. (2013). DNA fragmentation and apoptosis induced by safranal in human prostate cancer cell line. *Indian J Urol*, 29(3): 177.
- Samarghandian, S., Shoshtari, M.E., Sargolzaei, J., Hossinimoghadam, H., Farahzad, J.A. (2014b). Anti-tumor activity of safranal against neuroblastoma cells. *Pharmacogn. Mag*, 10(2), s.419.
- Sanchez-Rodriguez, A., Arias-Alvarez, M., Rebollar, P.G., Bautista, J.M., Lorenzo, P.L., Garcia-Garcia, R.M. (2018). Gene expression and immunolocalization of low-affinity neurotrophin receptor (p75) in rabbit male reproductive tract during sexual maturation. *Reprod. Domest. Anim.*, 53, 62-65.
- Sanchez-Rodriguez, A., Arias-Alvarez, M., Timón, P., Bautista, J.M., Rebollar, P.G., Lorenzo, P.L., Garcia-Garcia, R.M. (2019). Characterization of β -Nerve Growth Factor-TrkA system in male reproductive tract of rabbit and the relationship between β -NGF and testosterone levels with seminal quality during sexual maturation. *Theriogenology*, 126, 206-213.
- Santos-Filho, S.D., Fonseca, A.D.S.D., Bernardo-Filho, M. (2007). The male reproductive system and the effect of an extract of a medicinal plant (*Hypericum perforatum*) on the labeling process of blood constituents with technetium-99m. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 50(SPE), 97-104.

- Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., Anuradha, G. (2017). Antioxidants: Friend or foe?. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 10(12), 1111-1116.
- Schiller, V., Wichmann, A., Kriehuber, R., Schäfers, C., Fischer, R., Fenske, M. (2013). Transcriptome alterations in zebrafish embryos after exposure to environmental estrogens and anti-androgens can reveal endocrine disruption. *Reprod. Toxicol.*, 42, 210-223.
- Schneider, M., Forster, H., Boersma, A., Seiler, A., Wehnes, H., Sinowatz, F., Neumüller, C., Deutsch, M.J., Walch, A., De Angelis, M.H., Wurst, W., Ursini, F., Roveri, A., Maleszewski, M., Maiorino, M., Conrad, M. (2009). Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J.*, 23(9), 3233-3242.
- Scinicariello, F., Buser, M.C. (2016). Serum testosterone concentrations and urinary bisphenol A, benzophenone-3, triclosan, and paraben levels in male and female children and adolescents: NHANES 2011–2012. *Environ. Health Perspect.*, 124(12), 1898-1904.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25, 192-205.
- Seki, N., Suzuki, H. (1989). Electrical and mechanical activity of rabbit prostate smooth muscles in response to nerve stimulation. *Physiol. J.*, 419(1), 651-663.
- Setchell, B.P. (1991). *Reproduction in Domestic Animals. Male reproductive organs and semen*, Fourth Edition, 3, California.
- Shahat, A.S., Hassan, W.A., El-Sayed, W.M. (2022). N-Acetylcysteine and Safranal prevented the brain damage induced by hyperthyroidism in adult male rats. *Nutr. Neurosci.*, 25(2), 231-245.
- Shamhari, A.A., Abd Hamid, Z., Budin, S.B., Shamsudin, N.J., Taib, I.S. (2021). Bisphenol A and its analogues deteriorate the hormones physiological function of the male reproductive system: a mini-review. *Biomedicines*, 9(11), 1744.
- Shi, J., Zhihao, J., Sai, Z., Ming, Li., Jing, Z., Yixing, F., Jie, Y., Bing, S. (2015). Long-term effects of bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (*Danio rerio*), and the impact on offspring. *Chemosphere*, 128: 252-57.
- Siracusa, J.S., Lei, Y., Emily, M., Shenuxan, L., Xiaozhong, Y. (2018). Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review. *Reprod. Toxicol.*, 79: 96-123.
- Skinner, J.D. (1967). Puberty in the male rabbit. *Reproduction*, 14(1), 151-154.
- Song, M., Liang, D., Liang, Y., Chen, M., Wang, F., Wang, H., Jiang, G. (2014). Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 112, 275-281.
- Song, S., Ruan, T., Wang, T., Liu, R., Jiang, G. (2012). Distribution and preliminary exposure assessment of bisphenol AF (BPAF) in various environmental matrices around a manufacturing plant in China. *Environ. Sci. Technol.*, 46(24), 13136-13143.

- Stoker, C., Andreoli, M.F., Kass, L., Bosquiazzo, V.L., Rossetti, M.F., Canesini, G., Luque, E.H., Ramos, J.G. (2020). Perinatal exposure to bisphenol A (BPA) impairs neuroendocrine mechanisms regulating food intake and kisspeptin system in adult male rats. Evidences of metabolic disruptor hypothesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 499, 110614.
- Stossi, F., Bolt, M.J., Ashcroft, F.J., Lamerdin, J.E., Melnick, J.S., Powell, R.T., Dandekar, R.D., Mancini, M.G., Walker, C.L., Westwick, J.K., Mancini, M.A. (2014). Defining estrogenic mechanisms of bisphenol A analogs through high throughput microscopy-based contextual assays. *Chem. Biol*, 21(6), 743-753.
- Suarni, N.M.R., Oka, I., Mahardika, I.G., Suyadnya, I.P. (2016). Sperm membrane integrity and Mda level of male rabbit fed commercial feed substituted by Moringa oleifera leaf meal. *Int. J. Soc. Sci. Res.*, 6(3), 590-599.
- Sun, E.L., Gondos, B. (1986). Formation of the blood-testis barrier in the rabbit. *Cell Tissue Res.*, 243(3), 575-578.
- Sun, H.X., Zhu, Y., Wang, L., Ling Liu, H., Ling, Y., Li, Z.L., Sun, L.B. (2017). The Catsper channel and its roles in male fertility: A systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 15, 65.
- Sutherland, V.L., Johnson, C.L., McIntyre, B., Cunny, H., Turner, K., Foster, P.M., Elmore, S.A. (2019). Reproductive and pathology assessment of bisphenol AF. *Reprod. Toxicol.*, 88, 19-20.
- Sutherland, V., McIntyre, B., Pelch, K., Waidyanatha, S., Conley, J.M., Gray, L.E., Foster, P.M. (2017). A Comparison of In Vivo Reproductive and Developmental Toxicity (DART) Endpoints for Bisphenol AF and Bisphenol A. *The Toxicologist*, 156(1), 41-41.
- Swierstra, E.E., Foote, R.H. (1963). Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. *Reproduction*, 5(3), 309-NP.
- Swierstra, E.E., Foote, R.H. (1965). Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. *Am. j. anat.*, 116(2), 401-411.
- Talpade, J., Shrman, K., Sharma, R.K., Gutham, V., Singh, R.P., Meena, N.S. (2018). Bisphenol A: An endocrine disruptor. *J. Entomol. Zool. Stud.*, 6, 394-397.
- Tamaddonfard, E., Erfanparast, A., Farshid, A.A., Imani, M., Mirzakhani, N., Salighedar, R., Tamaddonfard, S. (2019). Safranal, a constituent of saffron, exerts gastro-protective effects against indomethacin-induced gastric ulcer. *Life Sci.*, 224, 88-94.
- Tamaddonfard, E., Farshid, A.A., Maroufi, S., Kazemi-Shojaei, S., Erfanparast, A., Asri-Rezaei, S., Taati, M., Dabbaghi, M., Escort, M. (2014). Effects of safranal, a constituent of saffron, and vitamin E on nerve functions and histopathology following crush injury of sciatic nerve in rats. *Phytomedicine*, 21(5), 717-723.
- Tarantilis, P.A., Tsoupras, G., Polissiou, M. (1995). Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid

chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 699(1-2), 107-118.

- Tian, F., Li, Q., Shi, L., Li, J., Shi, M., Zhu, Y., Li, H., Ge, R.S. (2022). In utero bisphenol AF exposure causes fetal Leydig cell dysfunction and induces multinucleated gonocytes by generating oxidative stress and reducing the SIRT1/PGC1 α signals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 116069. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116069>
- Tsunenari, I., Kast, A. (1992). Developmental and regressive changes in the testes of the Himalayan rabbit. *Lab. Anim.*, 26(3), 167-179.
- Turner, T.T., Reich, G.W. (1985). Cauda epididymidal sperm motility: a comparison among five species. *Biol. Reprod.*, 32(1), 120-128.
- Ullah, A., Pirzada, M., Afsar, T., Razak, S., Almajwal, A., Jahan, S. (2019). Effect of bisphenol F, an analog of bisphenol A, on the reproductive functions of male rats. *Environ. Health Prev. Med.*, 24, 41.
- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H., Siddiqui, M.F., Butt, M.A. (2018). Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere*, 209, 508–516.
- Urbatzka, R., Rocha, E., Reis, B., Cruzeiro, C., Monteiro, R.A.F., Rocha, M.J. (2012). Effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens on steroidogenic gene expression and specific transcription factors in zebrafish. *Environ. Pollut.*, 164, 28-35.
- Vaez, A., Mardani, M., Razavi, S. (2014). Impact of saffron on rat sperm membrane integrity and spermatogenesis status. *Adv. Biomed. Res.*, 3, 146.
- Van Praag, E. (2015). Low hanging or ground-dragging testicles caused by collagen dysplasia in non-neutered male rabbits. Medirabbit.com.
- Wang, H.F., Liu, M., Li, N., Luo, T., Zheng, L.P., Zeng, X.H. (2016). Bisphenol a impairs mature sperm functions by a CatSper-relevant mechanism. *Toxicol. Sci.*, 152(1), 145-154.
- Wang, J., Chen, C., Jiang, Z., Wang, M., Jiang, H., Zhang, X. (2016). Protective effect of Cordyceps militaris extract against bisphenol A induced reproductive damage. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 62, 249–257.
- Weiser, M.J., Foradori, C.D., Handa, R.J. (2008). Estrogen receptor beta in the brain: From form to function. *Brain Res. Rev.*, 57, 309–320.
- Wisniewski, P., Romano, R.M., Kizys, M.M.L., Oliveira, K.C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M.I., Dias-da-Silva, M.R., Romano, M.A. (2015). Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Toxicology*, 329, 1–9.
- Wu, D., Huang, C.J., Jiao, X.F., Ding, Z.M., Zhang, S.X., Miao, Y.L., Huo, L.J. (2019). Bisphenol AF compromises blood-testis barrier integrity and sperm quality in mice. *Chemosphere*, 237: 124410. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124410>

- Xiao, X., Mruk, D.D., Wong, C.K., Yan Cheng, C. (2014). Germ cell transport across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Physiology*, 29(4), 286-298.
- Xue, Y., Jin, W., Xue, Y., Zhang, Y., Wang, H., Zhang, Y., Guan, S., Chu, X., Zhang, J. (2020). Safranal, an active constituent of saffron, ameliorates myocardial ischemia via reduction of oxidative stress and regulation of Ca^{+2} homeostasis. *J. Pharmacol. Sci.*, 143(3), 156-164.
- Yang, X., Yuchen, L., Jia, L., Minjie, C., Di, P., Yong, L., Maoyong, S., Jie, Z., Guibin, J. (2016). Exposure to Bisphenol AF disrupts sex hormone levels and vitellogenin expression in zebra. *Environ. Toxicol.*, 31: 285-94.
- Yang, Y., Guan, J., Yin, J., Shao, B., Li, H. (2014). Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere*, 112, 481-486.
- Yang, Y., Lu, L., Zhang, J., Yang, Y., Wu, Y., Shao, B. (2014b). Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1328, 26-34.
- Yang, Y., Yin, J., Yang, Y., Zhou, N., Zhang, J., Shao, B., Wu, Y. (2012). Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by ultra-high-pressure liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 901, 93-97.
- Ye, L., Su, Z.J., Ge, R.S. (2011). Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules*, 16(12), 9983-10001.
- Yousef, M.I., El-Morsy, A.M., Hassan, M.S. (2005). Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology*, 215(1-2), 97-107.
- Yu, X., Xue, J., Yao, H., Wu, Q., Venkatesan, A.K., Halden, R.U., Kannan, K. (2015). Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the US EPA targeted national sewage sludge survey. *J. Hazard. Mater.*, 299, 733-739.
- Yu, Y., Xin, X., Ma, F., Li, X., Wang, Y., Zhu, Q., Chen, H., Li, H., Ge, R.S. (2022). Bisphenol AF blocks Leydig cell regeneration from stem cells in male rats. *Environ. Pollut.*, 298, 118825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118825>
- Yusoff, N.A., Budin, S.B., Taib, I.S. (2017). Pesticide exposures induce male-mediated reproductive toxicity: A review. *J. Agric. Sci.* 9, 122-135.
- Zahra, Z. Khan, M.R., Majid, M., Maryam, S., Sajid, M. (2020). Gonadoprotective ability of Vincetoxicum arnotianum extract against bisphenol A-induced testicular toxicity and hormonal imbalance in male Sprague Dawley rats. *Andrologia*, 52, e13590. <https://doi.org/10.1111/and.13590>
- Zaniboni, L., Gliozzi, T., Maldjian, A., Luzi, F., Cerolini, S. (2004). Fatty acid and tocopherol composition of semen components in the rabbit. *Proc.: 8th World Rabbit Congr., Puebla*, 365-370.

- Zargari A. Medicinal Plants. Tehran: Tehran University Press; 1990, 574–578.
- Zhang, L., Lv, J., Xu, T., Yang, L., Jiang, X., Li, Q. (2013). High efficiency removal and recovery of an endocrine disrupting compound–bisphenol AF from wastewaters. *Sep. Purif. Technol.*, 116, 145-153.
- Zhang, R.D., Wen, X.H., Kong, L.S., Deng, X.Z., Peng, B., Huang, A.P., Wan, Y., Yang, Z. W. (2002). A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchiopexy on spermatogenesis in adult rabbit testis. *Reproduction-Cambridge*, 124(1), 95-105.
- Zhang, Y., Zhao, Y., Guo, J., Cui, H., Liu, S. (2018). Anticancer activity of safranal against colon carcinoma is due to induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest mediated by suppression of mTOR/PI3K/Akt pathway. *J. B.U.ON.*, 23(3), 574-578.
- Zhao, X., Li, P., Song, S., Wang, H., Zhao, L., Zong, W., Zhang, H., Qu, G., Hu, L., Cai, Z., Jiang, G. (2021). Molecular structural heterogeneity of bisphenols governs their serum albumin binding. *Sci. Total Environ.*, 781, 146499. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146499>
- Zhu, N., Zhao, M., Song, Y., Ding, L., Ni, Y. (2022). The KiSS-1/GPR54 system: Essential roles in physiological homeostasis and cancer biology. *GENES DIS*, 9(1), 28-40.

