



RESEARCH ARTICLE

Yumurtaya verilen bisfenol a 'nın, tavuklarda timusun gelişimi ve perifer kan alfa naftil asetat esteraz pozitif lenfosit oranı üzerindeki etkilerinin histolojik ve enzim histokimyasal yöntemlerle belirlenmesi

Didem Yılmaz^{1,a}, Yasemin Öznurlu^{1*,b}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Received:09.04.2019, Accepted: 26.06.2019

*yoznurlu@selcuk.edu.tr

^aORCID: 0000-0001-6435-8704, ^bORCID: 0000-0002-6296-3107

The determination of effects of in ovo administrated bisphenol a on the development of thymus and proportion of alpha-naphthyl acetate esterase enzyme lymphocyte by using histological and enzyme histochemical methods in chicken

Eurasian J Vet Sci, 2019, 35, 3, 144-151

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2019.233

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı yumurtaya verilen Bisfenol A'nın, tavuklarda timusun gelişimi ve perifer kan alfa naftil asetat esteraz (ANAE) pozitif lenfosit oranı üzerindeki etkilerinin histolojik ve enzimhistokimyasal metodlar kullanılarak belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla Isa Brown ırkı yumurtacı tavuklara ait 310 adet her biri 50-55 g ağırlığında olan dömlü yumurta kontrol, taşıyıcı kontrol, 50, 100, 250 µg/yumurta BPA olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Test solüsyonları inkübasyondan önce yumurta sarısına enjekte edildi. Kuluçkanın 13, 18 ve 21. günlerinde her gruptan 10'ar adet yumurta açıldı ve elde edilen embriyolardan kan ve timus dokusu örnekleri alındı.

Bulgular: Kuluçkanın 13. 18. ve 21. günlerinde BPA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre timus dokusunun embriyonik gelişiminin geri olduğu tespit edildi. Aynı zamanda BPA verilen gruplarda lenfoid dokunun daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu ve ANAE pozitif lenfositlerin sayıca azaldığı dikkati çekti. Perifer kan ANAE pozitif lenfosit oranlarının da kontrol gruplarına göre BPA verilen gruplarda önemli oranda düştüğü tespit edildi ($p < 0.05$).

Öneri: BPA' nın timusun embriyonik gelişimini baskıladığı, ANAE pozitif lenfosit oranında düşüslere yol açtığı tespit edilmiş ve bu nedenle etkilenen hayvanların immun sistem fonksiyonlarında önemli bozukluklara neden olabileceği, BPA kullanımı ile yapılacak yasal düzenlemelerin yeniden gözden geçirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: ANAE, BPA, kanatlı embriyo, timus

Abstract

Aim: The aim of this study is to the determination of effects of in ovo administrated Bisphenol A on the development of thymus and proportion of alpha-naphthyl acetate esterase enzyme lymphocyte by using histological and enzyme histochemical methods in chicken.

Materials and Methods: For this purpose, 310 fertile eggs, weighed 50-50 g, of Isa Brown laying parent stock were divided into 5 groups as control, vehicle- control , 50 100, and 250 µg/egg BPA. Test solutions were injected into yolk before incubation. At the 13th, 18th and 21st days of incubation, 10 eggs were opened from each group and blood and thymus tissue samples were taken from the obtained embryos.

Results:On the 13th, 18th and 21st days of incubation, BPA-treated groups were found to be retarded embryonic development of thymus tissue compared to the control group. At the same time, in BPA-treated groups, lymphoid tissue had less cell density and the number of ANAE positive lymphocytes decreased. The percentage of peripheral blood ANAE positive lymphocytes was significantly lower in the BPA-treated groups than in the control groups ($p < 0.05$).

Conclusion:It has been found that BPA inhibits embryonic development of thymus, decreases ANAE positive lymphocyte rate. It was concluded that significant disturbances in the immune system function of the affected animals might be occurred and regulation on the use of BPA should be revised.

Keywords: ANAE, BPA, avian embryo, thymus



Giriş

Endokrin bozucu kimyasal (EDC) maddeler spesifik reseptörlerle etkileşime girerek hormonların normal biyolojik aktivitelerini taklit eden ya da tam tersi etki gösteren doğal yada sentetik bileşiklerdir (Pisapia ve ark 2012, Liu ve ark 2014). EDC'lerden biri olan bisfenol A [2,2-bis(4hydroxyphenyl) propane, BPA] polikarbonat, epoksi rezin, polisülfon ve poliakrilat gibi polimerlerin üretiminde kullanılan başlıca monomerdir. Sağlam ve ısıya dayanıklı olmalarından dolayı polikarbonat plastikler ve epoksi reçineler yiyecek-içecek saklama kapları ve ambalajlarında kullanılmaktadırlar (García ve Losada 2004, Rubin 2011, Geens ve ark 2012).

Geniş kullanım alanı nedeniyle BPA dünya çapında en çok üretilen ve bu nedenle canlıların doku ve vücut sıvılarının yanı sıra toprak, su ve toz örneklerinde tespit edilebilir bir çevre kirleticisi haline gelmiştir (Liao ve Kannan 2011, Şişe 2011, Hormann ve ark 2014, Michałowicz 2014). BPA kolaylıkla gıda ve yem ambalajları ile ekipmanlarından besin içeriği ve suya karışabildiğinden canlılar BPA'ya çoğunlukla gıda yoluyla maruz kalırlar (Şişe 2011). Yüksek üretim kapasitesi ve farklı kullanım alanları göz önüne alındığında çevreye yüksek miktarda BPA geçişi olması da kaçınılmazdır (Yıldız 2009). Canlılar BPA'ya solunum ya da dermal absorpsiyon ile de maruz kalabilmektedirler (García ve Losada, 2004, Rubin 2011, Liao ve Kannan 2011, Loganathan ve Kannan 2011, Geens ve ark 2012).

BPA spesifik olarak östrojen reseptörü- α (ER- α) ve - β (ER- β)'ya bağlanır ve östrojenik etkilere sahiptir (Kuiper ve ark 1998). Nükleer östrojen reseptörleri için 17 β -östradiol'e (doğal östrojen) göre daha düşük affiniteye sahip olan BPA, non-nükleer östrojen reseptörleri aracılığıyla oluşan yanıtlar dikkate alındığında 17 β -östradiol ile eşit östrojenik güce sahiptir. Ayrıca BPA endojen östrojen ile yarışarak östrojenik yanıtı bloke etmek suretiyle bir anti- östrojen olarak da hareket edebilir (Rochester 2013, Liu ve ark 2014). BPA'nın farklı organlardaki östrojen reseptörlerine de bağlanabilme özelliği bu kimyasala maruz kalan canlıyı çeşitli hastalıklara ve fonksiyon bozukluklarına duyarlı hale getirebilmektedir (Chapin ve ark 2008, Clayton ve ark 2011, Fernandez ve ark 2007, Li ve ark 2011).

Endokrin sistem ve immün sistem arasındaki ilişki göz önüne alındığında BPA gibi endokrin bozucu kimyasal maddelerin immün sistem fonksiyonlarını da etkilemesi muhtemeldir (Seaman ve ark 1978, Ahmed 2000, Clayton ve ark 2011). Nitekim endokrin bozucu kimyasalları içeren pestisitlere maruz kalan insanlarda CD4⁺CD8⁺lenfosit oranında artış, periferik kan mononükleer hücrelerin proliferasyonunda azalma, otoantikörlerin sıklığında artış gibi immünolojik değişiklikler gözlenmiştir (Rosenberg ve ark 1999, Ahmed 2000, Clayton ve ark 2011). Çevre Koruma Ajansı ve Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı BPA'nın günlük tolere edilebilir alım miktarını

4 μ g/kg olarak belirlemişlerdir (Clayton ve ark 2011, Liao ve Kannan 2011, EFSA 2017). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar BPA'nın düşük dozlarında bile uzun süreli maruziyetin kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, genital sistem, santral sinir sistemi ve immün sistem üzerine olumsuz etkilerinin olabileceğini göstermektedir (Nakamura ve ark 2006 ve 2007, Richter ve ark 2007, Romano ve ark 2015, Kandil ve Sur 2018, Özyayın ve ark 2018).

Kanatlı embriyoları fiziksel ve kimyasal maddeler, ilaçlar, toksinler ve endokrin bozucular gibi günlük yaşamda sıklıkla karşılaşılabileceğimiz bazı ajanların embriyotoksik, genotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan deneysel testlerde en sık tercih edilen materyallerden birisidir (Stoloff ve ark 1972, Berg ve ark 1999). Jelinek (1977) dömlü tavuk yumurtalarının kullanıldığı ve Tavuk Embriyo Toksikitesi Belirleme Testi (Chicken Embryotoxicity Screening Test-CHEST) olarak adlandırılan bir yöntem geliştirmiş ve bu yöntem birçok kimyasal maddenin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlendiği çalışmalarda kullanılmıştır. CHEST yöntemi kullanılarak belirlenen toksik dozun sulandırma oranının 10⁻² ile çarpılmasıyla oluşan değer, memelilerde annenin canlı ağırlığının kg' mı başına alması gereken toksik doz olduğu bildirilmektedir (Jelinek 1977).

Bu teknik kolay, ucuz ve kısa sürede sonuç vermesinden dolayı avantajlıdır. Bu tekniğin diğer bir avantajı ise memelilerdeki toksikolojik çalışmalarda kullanılacak olan deney hayvanı sayısını ve deneme sayısını azaltmasıdır. Bu sayede canlı bir organizmaya verilebilecek ağrı ve acı da en az seviyeye indirilmekle birlikte, etik kurallar ve yasal kısıtlamalar ile Hayvan Haklarını Koruma Kanunu da ihlal edilmemiş olmaktadır (Jelinek ve ark 1985, Kemper ve Luepke 1986, Veselý ve Vesela 1991).

T lenfositlerin olgunlaştığı primer bir lenfoid organ olan timus taslağında kuluçkanın 7. gününde iri bazofilik hücrelerin arttığı; 10-13. günde küçük lopçukların oluşmaya başladığı, 13. günden sonra korteks-medulla ayırımının yapılabildiği, 15 ile 18. günler arasında ise kapsül bölgesinde ve lopçuklar arası bölgelerde hücrel ve ipliksel yapılarda artış olduğu, organın gelişimini inkubasyonu takiben 9-11. günlerde tamamladığı bildirilmiştir (Sandıkçı ve Çelik 2000, Sur ve Çelik 2005).

Lizozomal bir enzim olan alfa -naftil asetat esteraz (ANAE), başta insan olmak üzere sığır, tavuk, köpek ve faredede T lenfositlerin ayırımında kullanılmaktadır. Pratikte gerek doku kesitlerinde gerekse de periferik kan frotilerinde T lenfosit, B lenfosit ve monositlerin birbirinden ayırt edilmesinde kullanılan bu enzim, T lenfosit olgunlaşmasının ileri aşamalarında kazanılmaktadır (Mueller ve ark 1975, Knowles ve Holck 1978, Sur ve Çelik 2005). Timus dokusunda yapılan çalışmalarda, timusun kortiko-medullar sınıra yakın bölgelerindeki medullar timositlerin ANAE pozitif reaksiyon verirken, kor-

tekste lokalize olan timositlerin negatif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Mueller ve ark 1975, Çelik ve Sur 2005).

Bu çalışmada dömlü tavuk yumurtasına verilen farklı dozlarda BPA'nın kan ve timus dokularının gelişimi üzerindeki etkilerinin histolojik ve enzim histokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma S.Ü. Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK)' nun 29.01.2016 tarih ve 2016/10 sayılı etik kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada İsa Brown ırkı yumurtacı tavuklara ait her biri 50-55 g ağırlığında olan 310 adet dömlü tavuk yumurtası kullanılmıştır.

Taşıt maddenin hazırlanması

1gr lesitin (I.078.K.034.0010, Koza Gıda) 1.5mL diklormetilen (UN1593, VWR Chemicals) içerisinde çözülürken üzerine 10mL yerfıstığı yağı eklendikten sonra diklormetilenin uçmasını sağlamak için 60 °C' lik etüvde kapağı açık erlen içerisinde 1 gece bekletildi.

Etken maddenin hazırlanması

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

Deney gruplarının oluşturulması ve enjeksiyon işlemleri

Yumurtalar enjeksiyon işlemlerinden önce kapalı bir kabinde 15 dakika dezenfekte edildi. Takiben yumurtalar rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı: Grup 1 (Kontrol grubu), Grup 2 (taşıyıcı madde grubu), Grup 3 (50 µg/yumurta BPA enjekte edilen grup), Grup 4 (100 µg/yumurta BPA enjekte edilen grup) ve Grup 5 (250 µg/yumurta BPA enjekte edilen grup). Tüm enjeksiyonlar yumurta sarısına ve kuluçka başlangıcında gerçekleştirildi. Delikler özel yumurta delicisi ile yumurtanın yan tarafından açılarak steril insülin enjektörleri aracılığıyla test solüsyonları enjekte edildi ve takiben hemen sıvı parafinle kapatıldı. Kuluçka işlemleri, kuluçka makinesinde (Prodi HB 500S) ve optimal koşullarda (37.8°C sıcaklık ve % 65 nispi nem) gerçekleştirildi.

Kuluçkanın 13, 18 ve 21.günlerinde her gruptan 10'ar adet yumurta açıldı ve elde edilen embriyolardan kan ve timus doku örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden 4 adet froti hazırlandı. Havada kurutulan frotiler ANAE enzimi demonstrasyonu ve May Grünwald-Giemza boyaması için -10 °C'deki

glutaraldehid-aseton tespit solüsyonunda (pH=4, 8) 3 dakika süreyle tespit edildi. Bu sürenin sonunda distile su ile 3 kez yıkanan frotilerden ikişer adedi, ANAE enzimi için hazırlanan inkübasyon solüsyonu içerisinde 37 °C'de 2 saat kontrollü bir şekilde bekletildi ve ardından %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı. Kalan 2 froti ise May Grünwald-Giemza boyama metodu ile boyandı.

Timus dokusundan alınan örnekler 2 parçaya ayrıldı. Parçalardan birisi %10'luk tamponlu -formol salin (pH 7,4) solüsyonunda tespit edilirken; ikinci parça ise ANAE enzim demonstrasyonu için 24 saat formol-sükroz (+4 °C, pH 6,8) solüsyonunda tespit edildikten sonra 22 saat de Holt solüsyonunda (+4 °C) bekletildi. Daha sonra bu doku örneklerinden kriyostatta (Leica) alınan 12 µm kalınlığındaki kesitler, önceden formol-jelâtin karışımı ile muamele edilmiş olan lamlara alındı ve ANAE enzimi için hazırlanan inkübasyon solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 15 dakika süreyle kontrollü bir şekilde bekletildi. Kırmızı-kahverengi granüllerin ortaya çıkmasının ardından birkaç kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı. %10 tamponlu formol salin solüsyonunda tespit edilen dokular rutin histolojik metotlarla takip edilerek parafinde bloklandı ve bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler ise Crossmon'ın üçlü boyama metodu (Crossmon 1937) ile boyandı.

İstatistik analizler

Elde edilen veriler SPSS 10.0 programı yardımıyla analiz edildi. Kan sayımı sonuçları Açık (Arc Sinus) transformasyon metodu kullanılarak analiz edildikten sonra tek yönlü varyans analizi yapıldı.

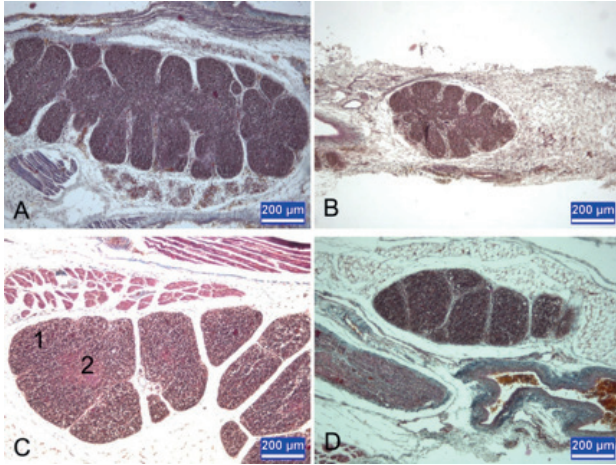
Bulgular

Timus dokusunda histolojik ve enzim histokimyasal bulgular

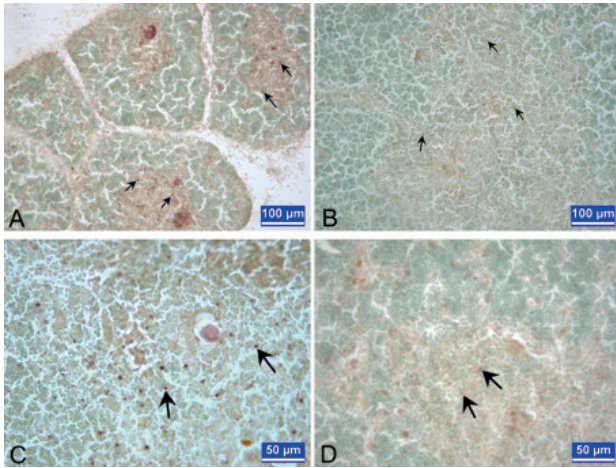
İnkübasyonun 13. günü

İnkübasyonun 13.gününde kontrol ve taşıyıcı gruplarına ait embriyoların timus dokularından alınan histolojik kesitlerde loplara saran kapsülü oluşturan mezenkimal dokunun gelişmiş olduğu ve loplara tam olmayan lopçuklara ayırdığı, korteks-medulla ayrımının ise henüz belli olmadığı gözlemlendi (Şekil 1A). BPA verilen gruplarda ise timusun gelişiminin baskılanmış olduğu ve lop gelişiminin kontrol gruplarına göre oldukça geride olduğu tespit edildi (Şekil 1B).

Bu dönemde kontrol ve deney gruplarında timus dokusunda ANAE pozitifitesi gösteren ve lenfosit morfolojisine sahip hücrelere rastlandı. Ancak BPA verilen gruplarda ANAE pozitif hücre yoğunluğunun kontrol gruplarına göre daha az olduğu dikkati çekti.



Şekil 1. İnkübasyonun 13. gününde (A) ve 18. gününde (C) kontrol grubuna ait embriyolardan elde edilen timus dokusu kesitleri. 1: Korteks 2: Medulla. İnkübasyonun 13. gününde 250 µg/yumurta grubu (B) ile inkübasyonun 18. gününde 50 µg/yumurta grubuna (D) ait embriyolardan elde edilen timus dokusu kesitleri. Üçlü boyama.



Şekil 2. İnkübasyonun 18. gününde (A) ve 21. gününde (C) kontrol grubuna ait embriyolardan elde edilen timus dokusu kesitleri. İnkübasyonun 18. gününde (B) ve 21. gününde (D) 250 µg/yumurta grubuna ait embriyolardan elde edilen timus dokusu kesitleri. Oklar: ANAE pozitif hücreler. ANAE demonstrasyonu.

İnkübasyonun 18. günü

İnkübasyonun 18. gününde timus dokusunun hem morfolojik hem de histolojik olarak gelişiminin ilerlediği, BPA verilen gruplardaki embriyolara ait timus dokusunda bu gelişimin kontrol gruplarına göre geride olduğu dikkati çektirdi (Şekil 1C ve 1D). Timusun histolojik gelişiminin bu dönemde hemen hemen tamamlandığı, korteks ve medulla ayrımının belirgin olduğu tespit edildi.

Medullada dejenere retikulum hücrelerinin oluşturduğu Hassal cisimciklerinin oluşmaya başladığı, lopların arasında interlobuler bağ dokusu bölmelerinin genişlediği, medulla-daki vaskülarizasyonun artmış olduğu görüldü (Şekil 1C).

BPA verilen gruplarda, korteks ve medulla ayrımının çok belirgin olmadığı, özellikle de 250 µg/yumurta BPA verilen

grupta medullada lenfosit morfolojisine sahip hücre yoğunluğunun az olduğu dikkati çektirdi (Şekil 1D).

Bu dönemde kontrol gruplarına ait timus dokusu kesitlerinin medullasında ANAE pozitivitesi gösteren ve lenfosit morfolojisine sahip hücrelere bir önceki döneme göre daha sıklıkla rastlandı. BPA verilen gruplarda ANAE pozitif hücre yoğunluğunun kontrol gruplarına göre daha az olduğu dikkati çektirdi (Şekil 2A ve 2B).

İnkübasyonun 21. günü

İnkübasyonun yirmi birinci günü timus dokusunun hem morfolojik hem de histolojik olarak gelişimini tamamladığı ancak BPA verilen gruplarda timus dokusunun daha küçük olduğu dikkati çektirdi. Histolojik gelişimini tamamlamış olan loplarda korteks ve medulla ayrımının iyice belirginleştiği ve medulla bölgesindeki Hassal cisimcikleri ve kistik yapıların bir önceki döneme göre daha belirgin olduğu tespit edildi.

BPA verilen gruplarda kontrol gruplarına göre timus lop ve lopçuklarının oldukça küçülmüş olduğu, loplardaki lenfosit morfolojisine sahip hücre yoğunluğunun azaldığı, medulla bölgesinde kistik yapılarda belirgin bir artış olduğu dikkati çektirdi.

Bu dönemde kontrol gruplarına ait timus dokusu kesitlerinin medullasında ANAE pozitivitesi gösteren ve lenfosit morfolojisine sahip hücrelerin bir önceki dönemlere göre fazla olduğu dikkati çektirdi. Medullada sitoplazmalarında diffuz granüler ANAE pozitivitesi gösteren makrofaj ve retikulum hücreleri gözlemlendi (Şekil 2 C). BPA verilen gruplarda ise ANAE pozitif hücre yoğunluğunun kontrol gruplarına göre daha az olduğu tespit edildi (Şekil 2 D).

Perifer kan dokusunda enzim histokimyasal bulgular

Perifer kan frotileri üzerinde yapılan ANAE pozitif lenfosit sayımlarında da timus dokusundaki bulguları destekler nitelikte sonuçlar elde edildi. Kontrol gruplarına göre BPA verilen gruplarda ANAE pozitif lenfosit sayısında istatistiki açıdan önemli bir azalma tespit edildi (Tablo 1, $p < 0.05$).

Tartışma

Endokrin sistem büyüme, gelişme ve metabolizma ile ilgili hayati olayların düzenlenmesinin yanı sıra embriyonik gelişim ve seksüel olgunlaşma gibi süreçler üzerinde de düzenleyici ve belirleyici etkisi olan bir sistemdir. Çevresel kirleticilerin çoğu bu sistemin etkisinden sorumlu hormonların hedef hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak söz konusu sistemin sorumlu olduğu süreçleri durdurmakta ya da tetikle-mektedir (Colborn ve Clement 1992, McLachan 2001, Flint ve ark 2012). İmmün sistem ve endokrin sistem arasında karşılıklı olarak bir etkileşimin olduğu ve bu etkileşimde

Tablo 1. Kuluçkadan çıkışın ilk günü (21. gün) kontrol grupları ve BPA verilen gruplarda ANAE pozitif lenfosit oranları (%)

Gruplar n=6	ANAE pozitif lenfosit oranları x±SD
Kontrol	34,85±1,42 ^a
Taşıyıcı	34,79±3,89 ^a
50 µg/yumurta BPA	26,45±3,19 ^b
100 µg/yumurta BPA	23,40±4,04 ^b
250 µg/yumurta BPA	21,89±2,42 ^b

hormonlar ve sitokinlerin önemli bir rol aldığı bilinmektedir. Bu karşılıklı etkileşim özellikle BPA gibi östrojenik etkili endokrin bozucu kimyasal maddeler tarafından bozulabilmektedir (Ahmed 2000, Yoshino ve ark 2003, Rogers ve ark 2013, Özaydın ve ark 2018).

Yaygın kullanım alanına sahip BPA'nın çevresel konsantrasyonlarının ciddi sorunlara yol açtığı yapılan son çalışmalarla tespit edilmiştir (Allsop ve ark 1997). BPA'nın plasenta bariyerinden kolaylıkla geçmesi ve ayrıca yumurta sarısı ile de atılmasından dolayı hem memeliler hem de kanatlılar embriyonik dönemden başlamak üzere bu maddelere maruz kalabilmektedirler (Ikezuki ve ark 2002, Berg ve ark 2004, Crain ve ark 2007, Flint ve ark 2012, Le Corre ve ark 2015). Yapılan deneysel çalışmalar canlıların gelişiminde kritik bir dönem olan embriyonik dönemde BPA'ya maruz kalmanın daha ciddi sonuçlara yol açabileceğini göstermektedir (Manfo ve ark 2014). Bu kimyasal maddenin embriyo üzerindeki olumsuz etkileri sadece halk sağlığı açısından önemli bir sorun olarak kalmayıp, aynı zamanda yaban hayatı ve kanatlı sektörü için de önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Ikezuki ve ark 2002, Berg ve ark 2004, Crain ve ark 2007, Flint ve ark 2012). Halldin ve ark (2001) BPA'nın yumurtaya maternal transferinin düşük seviyede olduğunu bildirmişlerdir. Ancak BPA'nın düşük dozlarda bile nükleer reseptörlere bağlanarak hücre ve dokuların fizyolojik fonksiyonlarını etkileyebileceği ortaya konmuştur. Berg ve ark (2001) 67 ve 200 µg/g yumurta dozlarında BPA'yı yumurta sarısına enjekte etmişler, tavuk embriyolarında BPA verilen gruplarda mortalitenin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Jessl ve ark (2018) yumurtaya kuluçka başlangıcında tek bir enjeksiyonun gelişen embriyo için kronik maruziyete neden olduğunu ileri sürerek; 75, 100 ve 300 µg/g yumurta dozlarında BPA'yı yumurta sarısına enjekte etmişler ve BPA uygulanan gruplarda mortalitenin arttığını gözlemişlerdir.

BPA'nın östrojenik etkilerini ortaya koyabilmek amacıyla çok sayıda araştırma yapılmıştır. Östrojenin bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynadığı, humoral bağışıklık üzerinde uyarıcı bir etki gösterirken, hücresel bağışıklık üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Ablin ve ark 1974, Seaman ve ark 1978, Paavone ve ark 1981, Holdstock ve ark 1982). Yoshino ve ark (2003) in vitro ve in vivo ça-

lışmalarında BPA'nın immün sistem üzerinde önemli etkileri olabileceğini ve bu kimyasalın immün sistem üzerindeki etkisinin östrojen benzeri etkisiyle açıklanabileceğini ifade etmişlerdir. Östrojenin humoral immün yanıtı artırmak suretiyle otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol aldığı, ayrıca sitokin üretimi ve T lenfosit alt tiplerinin dağılımını etkilediği bilinmektedir (Nakamura ve Kariyazono 2010). Östrojen biyolojik etkilerini östrojen reseptörü-α (ERα) ve -β (ERβ) aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Nakamura ve Kariyazono 2010). ERα daha çok üreme ile ilgili olaylarda, ERβ ise birçok dokunun fizyolojik fonksiyonlarında görev almaktadır (Gustafsson 1999). Lenfositler başta olmak üzere immün sistemin birçok hücresinde östrojen reseptörünün bulunduğu bildirilmektedir (Nalbandian ve Kovats 2005). BPA spesifik olarak ER- α ve ER- β'ya bağlanabileceği ancak hedef hücrede ERβ' ya bağlanma affinitesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Wetherill ve ark 2007). BPA dokudaki endojen östrojeni taklit edebilme, etkisini artırabilme ya da inhibe edebilme yeteneğine sahiptir (Wetherill ve ark 2007, Holladay ve ark 2010).

İmmün sistem üzerinde BPA'nın etkileri prenatal, perinatal ve erişkin dönemde sitokin üretimi, lenfoid organların histolojisi, lenfosit proliferasyonu, antikor yanıtı ve T hücre fonksiyonları bakımından araştırılmıştır (Yoshino ve ark 2003 ve 2004, Yan ve ark 2008, Nakajima ve ark 2012, Ahmed ve ark 2015, Özaydın ve ark 2018). Ahmed ve ark (2015) oral olarak 150mg/kg/gün dozunda 70 gün süreyle BPA uyguladıkları erişkin ratlarda dalak dokusunda beyaz pulpa alanları, trabeküler kan damarları ve sinuslarda genişlemenin olduğunu bildirmişlerdir. Tian ve ark (2014) embriyonik dönemin 9. gününde allantoise 250 µg/yumurta dozunda BPA enjekte etmiş, bursa Fabricii'nin hem ağırlığında hem de lenf folikülü sayısında, timusta ise korteks ve medulla kalınlığında kontrol grubuna göre azalmalar tespit etmişlerdir. Miao ve ark (2008) ise oral olarak 4, 40 ve 400 mg/kg/gün dozunda BPA uyguladıkları ratlarda ilk iki doz grubunda dalak dokusunda herhangi bir histolojik değişiklik olmadığını, ancak yüksek doz grubunda (400 mg/kg/gün) beyaz pulpa dokusunda belirgin bir küçülme tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Yoshino ve ark (2004) prenatal dönemde 3, 30, 300 ve 3000 µg/kg/gün BPA'ya maruz kalan 8 haftalık farelerin timus ve dalak dokusunda histolojik olarak herhangi bir değişiklik olmadığını, ancak dalak dokusunda hem CD4⁺(yardımcı T-lenfosit) hem de CD8⁺(sitotoksik T lenfosit) hücre sayısında önemli oranda artış olduğunu ve CD8⁺ hücre sayısındaki artışın CD4⁺ hücre sayısına göre çok daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Yiğit ve ark (2013) embriyolu tavuk yumurtalarına 67 ve 134 µg/g/yumurta dozunda BPA'yı yumurta sarısına enjekte etmişler, yüksek doz grubundaki hayvanlarda bursa Fabricii'nin folikül sayısı ve çapının kontrol ve düşük doz BPA grubuna göre azaldığını tespit etmişlerdir. Sugita-Konishi ve ark (2003) farelerde 5 gün boyunca 5mg/kg dozunda BPA'ya maruz kalmanın non spesifik doğal savunmayı azalttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da dömlü tavuk yumurtasına 50,

100 ve 250 µg/yumurta dozlarında BPA yumurta sarısına enjekte edilmiş ve BPA verilen gruplarda timusun embriyonik gelişiminin geri kalmış olduğu, özellikle 250 µg/yumurta doz grubunda timus loplularının gelişimindeki gerilemenin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda BPA verilen gruplarda lenfoid dokunun daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu ve ANAE pozitif lenfositlerin sayıca azaldığı dikkati çekmiştir. Dokudaki bu bulgularla uyumlu olarak perifer kan ANAE pozitif lenfosit oranlarının da kontrol gruplarına göre BPA gruplarında önemli oranda düştüğü tespit edilmiştir ($p < 0.05$, Tablo 1).

Öneriler

Yapılan çalışmalardan ve bu çalışmanın sonuçlarından da anlaşılmaktadır ki BPA'nın düşük dozları da biyolojik sistemler üzerine oldukça etkilidir. BPA'nın suluk ve yemlik gibi ekipmanların üretiminde de sıklıkla kullanılmasından dolayı kanatlı sektörü açısından da risk taşıdığı düşünülmektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı BPA'nın günlük tolere edilebilir dozunu düşürmek için çalışmalarını sürdürmektedir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar ve bu çalışmadan elde edilen bulgular BPA'nın çok düşük dozlarda da ciddi sorunlara yol açtığını göstermektedir. Bu nedenle BPA kullanımı ile ilgili yapılacak yasal düzenlemelerin yeniden gözden geçirilmesi gerekmektedir. Kanatlılarda ise timusun embriyonik gelişiminde meydana gelebilecek aksaklıkların yaşamın ilerleyen dönemlerinde canlıyı çeşitli hastalıklara predispoze kılmasının yanı sıra verimi ve karlılığı da olumsuz etkileyeceği düşünülmektedir. Yapılacak çalışmalarda BPA'nın kuluçka sonrası dönemlerde de timus üzerine etkilerinin gösterilmesi kanatlı sektörü açısından önemli olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Didem YILMAZ' ın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No:16202018) tarafından desteklenmiştir. Ayrıca "7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress " 'inde poster olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

- Ablin RJ, Bruns GR, Guinan P, Bush IM, 1974. The effect of estrogen on the incorporation of H-thymidine by PHA-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol*, 113,705-10.
- Ahmed SA, 2000. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology*, 150, 191-206.
- Ahmed WMS, Moselhy WA, Nabil TM, 2015. Bisphenol A toxicity in adult male rats: Hematological, biochemical and histopathological approach, *Global Veterinaria*, 14 (2), 228-238.
- Berg C, Blomqvist A, Holm L, Brandt et al., 2004. Embryonic exposure to oestrogen causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. *Reproduction*, 128 (4), 455-61.
- Berg C, Halldin K, Brunström B, 2001. Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (12), 2836-40.
- Berg C, Halldin K, Fridolfsson AK, Brandt I, et al., 1999. The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Science of the Total Environment*, 233, 1, 57-66.
- Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Jr et al., 2008. NTP-CERHR Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol a. *Birth Defects Research (Part B)*, 83, 157-395.
- Clayton EMR, Todd M, Dowd JB, Aiello AE, 2011. "The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003-2006", *Environmental Health Perspectives*, 119(3), 390-396.
- Colborn T, Clement C, 1992. Chemically-induced alterations and functional development: The Wildlife / Human connection. Princeton Scientific Publishing Co., Inc., NJ. 403 pp.
- Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling et al., 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*, 24 (2), 225-39.
- Crossmon G, 1937. A modification of Mollory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *The Anatomical Record*, 69 (1), 33-8.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2017. Ursula Gundert-Remy, Johanna Bodin, Cristina Bosetti, Rex Fitzgerald, Annika Hanberg, Ulla Hass, Carlijn Hooijmans, Andrew A. Rooney, Christophe Rousselle, Henk van Loveren, Detlef Wölfle, Fulvio Barizzone, Cristina Croera, Claudio Putzu and Anna F. Castoldi, Bisphenol A (BPA) hazard assessment protocol, TECHNICAL REPORT.
- Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufiki J, Naval'on et al., 2007. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive Toxicology*, 24, 259-64.
- Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E, 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *Journal of environmental management*, 104, 19-34.
- García RS, Losada PP, 2004. Determination of bisphenol A diglycidyl ether and its hydrolysis and chlorohydroxy derivatives by liquid chromatography-mass spectrometry" *Journal of Chromatography A*, 1032, 37-43.
- Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon et al., 2012. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3725-3740.
- Gustafsson JA, 1999. Estrogen receptor β -a new dimension in estrogen mechanism of action. *Journal of Endocrinology*, 163 (3), 379-83.
- Halldinn K, Berg C, Bergman A, 2001. Distribution of Bisphenol A and tetrabromobisphenol A in quail eggs, embryos and laying birds and studies on reproduction variables in adults following in ovo exposure. *Arch. Toxicol* 75, 597-603.
- Holdstock G, Chastenay BF, Krawitt EL, 1982. Effects of tes-



- tosterone, estradiol and progesterone on immune regulation. *Clin Exp Immunol*, 47, 449–56.
- Holladay SD, Xiao S, Diao H, Barber et al., 2010. Perinatal bisphenol A exposure in C57B6/129svj male mice: Potential altered cytokine/chemokine production in adulthood. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 2845-2852.
- Hormann AM, Vom Saal FS, Nagel SC, Stahlhut et al., 2014. Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol A (BPA). *PLoS One*, 9 (10):e110509.
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei et al., 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*, 17 (11), 2839-41.
- Jelinek R, 1977. Methods in prenatal toxicology. In: *The chick embryotoxicity screening test (CHEST)*. Eds: Neubert D, Merker H, Kwasigroch T. Stuttgart: Georg Thieme, p. 381-6.
- Jelinek R, Peterka M, Rychter Z, 1985. Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian Journal of Experimental Biology*, 23, 10, 588-95.
- Jessl L, Rebecca Lenz R, Massing FG, Scheider et al., 2018. Effects of estrogens and antiestrogens on gonadal sex differentiation and embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *Peer J*, 6: e5094, DOI 10.7717/peerj.5094.
- Kandil B and Sur E, 2018. The light microscopic investigation of the effects of in-ovo administered bisphenol A (BPA) on the development of testes. *Veterinary Journal of Ankara University*, 65 (3), 273-282.
- Kemper F, Luepke N, 1986. Toxicity testing by the hen's egg test (HET). *Food and Chemical Toxicology*, 24, 6-7, 647-8.
- Knowles DM, Holck S, 1978. Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid a-naphthyl acetat esterase. *Lab Invest*, 39, 70-76.
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton et al., 1998. "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β ". *Endocrinology* 139 (10), 4252-4263.
- Le Corre L, Besnard P, Chagnon C, 2015. BPA, an energy balance disruptor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55 (6), 769-777.
- Li DK, Zhou Z, Miao M, He et al., 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril*, 95, 625–30.
- Liao C. and Kannan K, 2011. Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: implications for human exposure. *Environmental Science and Technology*, 45 (21), 9372-9379.
- Liu Y, Mei C, Liu H, Wang et al., 2014. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451, 592-598.
- Loganathan SN and Kannan K, 2011. Occurrence of bisphenol A in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. *Archives Environmental Contamination Toxicology*, 61, 68-73.
- Manfo FP, Jubendradass R, Nantia EA, Moundipa et al., 2014. Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Rev Environ Contam Toxicol.*, 228,57-82.
- McLachan JA, 2001. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrin disrupting Chemicals. *Endocrinology Rewievs*, 22, 319-341.
- Mueller J, Brundel RG, Buerki H, Keller et al., 1975. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol*, 5, 270-274.
- Miao S, Gao Z, Kou Z, Xu et al., 2008. Influence of bisphenol A on developing rat estrogen receptors and some cytokines in rats: A two-generational study. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 71(15), 1000-1008.
- Michałowicz J, 2014. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 738–758.
- Nakajima Y, Goldblum RM, Midoro-Horiuti T, 2012. Fetal exposure to bisphenol A as a risk factor for the development of childhood asthma: an animal model study. *Environmental Health*, 11, 8.
- Nakamura K, Kariyazono N, 2010. Influence of endocrine-disrupting chemicals on the immune system. *Journal of Health Science*, 56(4), 361-373.
- Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T and Fushiki S, 2007. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neuroscience letters*, 420 (2), 100-105.
- Nakamura K, Itoh K, Yaoi T, Fujiwara et al., 2006. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol A. *J Neurosci Res*, 84(6), 1197-1205. doi:10.1002/jnr.21020.
- Nalbandian G, Kovats S, 2005. "Understanding Sex Biases in Immunity.Effects of Estrogen on the Differentiation and Function of Antigen-Presenting Cells", *Immunologic Research*, 31(2), 91-106.
- Özaydın T, Öznurlu Y, Sur E, Celik et al., 2018. The effects of bisphenol A on some plasma cytokine levels and distribution of CD8 + and CD4 + T lymphocytes in spleen, ileal Peyer's patch and bronchus associated lymphoid tissue in rats. *Acta Histochemica*, 120, 728-733.
- Pisapia L, Del Pozzo G, Barba P, Caputo et al., 2012. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *General and Comparative Endocrinology*. 178, 54-63.
- Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold et al., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, 24, 199-224.
- Rochester JR, 2013. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155.
- Romano ME, Webster GM, Vuong AM, Thomas Zoeller et al., 2015. Gestational urinary bisphenol A and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: the HOME Study. *Environ Res*, 138, 453- 460. doi:10. 1016/j.envres.2015.03.003
- Rosenberg AM, Semchuk KM, McDuffie HH, Ledingham et al., 1999. Prevalence of antinuclear antibodies in a rural po-





- pulation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 56, 225-36.
- Rogers JA, Metz L, Yong VW, 2013. Review: endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-a and its potential mechanisms. *Molecular Immunology*, 53, 421-30.
- Rubin BS, 2011. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 27-34.
- Sandıkçı M, Çelik İ, 2000. Tavuk timusunun embriyonal gelişimi ve kuluçkadan çıkıştan sonra verilen hidrokortizon asetatin bu organ üzerine etkisi, *Vet Bil Derg*, 16(2), 81-88.
- Seaman WE, Blackman MA, Gindhart TD, Roubian et al., 1978. Beta-estradiol reduces natural killer cells in mice. *J. Immunol*, 121, 2193-98.
- Sugita-Konishi Y, Shimura S, Nishikawa T, Sunaga et al., 2003. Effect of bisphenol a on non-specific immunodefenses against non-pathogenic escherichia coli. *Toxicology Letters*, 136, 217-27.
- Stoloff L, Verrett MJ, Dantzman J, Reynaldo EF, 1972. Toxicological study of aflatoxin P1 using the fertile chicken egg. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 23, 3, 528-31.
- Sur E, Celik I, 2005. Effects of Aflatoxin B1 on The Development Of Chicken Thymus and Blood Lymphocyte Alpha-Naphthyl Acetate Esterase Activity. *Vlaams Dier ge nees kun dig Tijdschrift*, 74, 432- 439.
- Şişe Ş, 2011. Anne sütünde Nonilfenol ve bisfenol a düzeylerinin belirlenmesi. *Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.*
- Tian J, Luo D, She R, Liu et al., 2014. Effects of bisphenol A on the development of central immune organs of specific-pathogen-free chick embryos. *Toxicol Ind Health*, 30(3), 199-205.
- Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan et al., 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 178-98.
- Vesely D, Vesela D, 1991. The use of chick embryo for prediction of some embryotoxic effects of mycotoxins in mammals. *Vet. Med. Praha*, 36, 3, 175-81.
- Yan H, Takamoto M, Sugane K, 2008. Exposure to Bisphenol A prenatally or in adulthood promotes TH2 cytokine production associated with reduction of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Environmental Health Perspectives*, 116, 514-519.
- Yıldız N, 2009. Çevresel östrojenlerden bisfenol a ve oktilfenolün erkek sıçanlarda subkronik etkileri. *Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Yiğit F, Aktaş A, Dağlıoğlu S, 2013. Effects of bisphenol a and diethylstilbestrol on the involution of bursa of fabricius in the hens. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 39(2), 168-74.
- Yoshino S, Yamaki K, Yanagisawa R, Takano et al., 2003. Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice, *British Journal of Pharmacology*, 138, 1271-1276.
- Yoshino S, Yamaki K, Li X, Sai et al., 2004. Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice, *Immunology*, 112, 489-495.