



## RESEARCH ARTICLE

### Yumurta sarısına enjekte edilen bisfenol A' nın tavuklarda iskelet kası gelişimi üzerindeki etkileri

Yasemin Öznurlu<sup>1\*</sup>, Tuğba Özaydın<sup>1</sup>, Emrah Sur<sup>1</sup>, Tansu Kuşat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Geliş: 16.12.2021, Kabul: 19.04.2022  
\*yoznurlu@selcuk.edu.tr

### The effects of bisphenol A injected into egg yolk on skeletal muscle development in chicken

Eurasian J Vet Sci, 2022, 38, 2, 90-100  
DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2022.369

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada, yumurtaya verilen farklı dozlarda BPA'nın iskelet kası gelişimi üzerindeki etkilerinin histolojik metotlarla belirlenmesi amaçlanmaktadır.

**Gereç ve Yöntem:** Isa Brown ırkı sağlıklı ticari anaçlardan elde edilen 310 adet dömlü tavuk yumurtası kontrol, taşıyıcı, 50,100 ve 250 µg/yumurta olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Test solüsyonları inkübasyon öncesi yumurta sarısına enjekte edildi. Kuluçkanın 13, 18 ve 21. günlerinde, her gruptan 10 canlı embriyo elde edilinceye kadar rastgele yumurta seçilerek açıldı. Embriyolardan alınan iskelet kası (musculus fibularis longus, musculus sternocoracoideus pectoralis) doku örnekleri %10'luk formol solüsyonunda tespit edildi ve rutin histolojik tekniklerle işlenerek parafinde bloklandı. Kesitler Crossmon'un üçlü boyama yöntemi ile boyandı. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) reaktivitesi ise immünohistokimyasal yöntemle belirlendi.

**Bulgular:** Kas gelişiminin BPA uygulanan gruplarda geri kaldığı ve PCNA pozitif hücre sayısının da daha yüksek olduğu dikkati çekti ( $p<0.05$ ). Söz konusu bu gruplarda enine bandlaşmanın çok zayıf olduğu ve miyotüp organizasyonunun ise henüz tamamlanmadığı gözlemlendi.

**Öneri:** BPA'nın iskelet kası dokusunun gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerinin ileride hayvanlardan beklenen bazı performans parametrelerinde düşüşe neden olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Bisfenol A, PCNA, iskelet kası, embriyonik gelişim

#### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to determine of the effects of in ovo administered BPA on embryonic development skeletal muscle using histological methods in chickens.

**Materials and Methods:** 310 fertile eggs of Isa Brown laying parent stock were divided into 5 groups as control, vehicle control, 50, 100, and 250 µg/egg BPA. At the 13th, 18th and 21st days of incubation, eggs were randomly opened from each group until 10 live embryos were obtained. Skeletal muscle tissue samples (musculus fibularis longus, musculus sternocoracoideus pectoralis) taken from embryos were fixed in 10% formol solution and processed with routine histological techniques and immersed in paraffin. Sections were stained with Crossmon's triple staining method. Also, PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) reactivity was determined by immunohistochemical method.

**Results:** Embryonic development of skeletal muscle was retarded in BPA treated groups. The mean count of PCNA positive cells significantly increased in BPA treated groups when compared to control and vehicle control groups on 21 day of incubation ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** These results have suggested that developmental exposure to BPA adversely affected development of skeletal muscle.

**Keywords:** Bisphenol A, PCNA, skeletal muscle, embryonic development



## Giriş

Endokrin bozucu kimyasal maddeler (Endocrine Disrupting Chemicals-EDCs) çeşitli reseptörlerle etkileşime girerek hormonların biyolojik aktivitelerini taklit eden ya da antagonistik etki gösteren doğal ya da sentetik bileşiklerdir (Pisapia ve ark 2012, Liu ve ark 2014). Endüstriyel sahada sıklıkla kullanılan EDC'lerden biri de polikarbonat, epoksi rezin, polisülfon ve poliakrilat gibi polimerlerin üretiminde kullanılan bisfenol A'dır [2,2-bis(4hydroxyphenyl) propane, BPA] (Ballesteros-Gómez ve ark 2009). Sağlam ve ısıya dayanıklı olmalarından dolayı polikarbonat plastikler ve epoksi reçineler yiyecek-içecek saklama kapları ve ambalajlarında kullanılmaktadırlar (García ve Losada 2004, Rubin 2011, Gens ve ark 2012). Yüksek üretim kapasitesi ve farklı kullanım alanları göz önüne alındığında çevreye yüksek miktarda BPA geçişi olması kaçınılmazdır (Yıldız 2009). Canlılar BPA'ya başta gıda yoluyla olmak üzere, solunum ya da dermal absorpsiyon ile de maruz kalmaktadırlar (Le ve ark 2008, Cooper ve ark 2011, Liao ve Kannan 2011, Şise 2011).

Östrojenik etkisiyle ön plana çıkan BPA tıpkı doğal östrojen hormonu (17 $\beta$ -östradiol, E2) gibi etkisini spesifik olarak östrojen reseptörleri  $\alpha$  (ER-  $\alpha$ ) ve  $\beta$  (ER-  $\beta$ )'ya bağlanarak göstermektedir (Meltzer ve Pfeiffer 2001). Ayrıca BPA'nın E2 ile yarışarak östrojenik yanıtı bloke edip anti-östrojen olarak da davranabileceği ileri sürülmektedir (Vandenberg ve ark 2010, Liu ve ark 2014). Birçok hücrede ekspres edildiği bilinen ER'lerin miyoblastlarda ve iskelet kaslarında da bulunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle iskelet kası BPA için hedef dokulardan biri olmaktadır (Wiik ve ark 2009, Goa ve ark 2018). BPA'nın farklı organlardaki östrojen reseptörlerine de bağlanabilme özelliği bu kimyasala maruz kalan canlıyı çeşitli hastalıklara ve fonksiyon bozukluklarına duyarlı hale getirebilmektedir (Fernandez ve ark 2007, Chapin ve ark 2008, Clayton ve ark 2011, Li ve ark 2011).

BPA memelilerde plasenta bariyerinden kolaylıkla geçebilmektedir. Kanatlı hayvanlarda ise BPA gibi kimyasalların eliminasyonunda yumurta sarısı ile atılım önemli bir yoldur. Ayrıca yumurta sarısı memelilerdeki plasentanın karşılığı olarak görev yapmakta ve yavrunun temel besin kaynağı olarak da işlev görmektedir. Dolayısıyla kanatlılar da memeliler gibi gelişimin erken aşamalarından itibaren bu kimyasala maruz kalabilmektedir (Ikezuki ve ark 2002, Berg ve ark 2004, Crain ve ark 2007, Flint ve ark 2012, Bauer ve ark 2013). Yapılan deneysel çalışmalar canlıların gelişiminde kritik bir süreç 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).

Kas gelişimi hiperplazi ve hipertrofi olmak üzere 2 periyotta gerçekleşmektedir. Hiperplazi miyoblast hücre sayısının embriyonik dönemdeki artışıyla karakterizedir. Bu dönemde miyoblastlar çoğalır, çok hücreli miyotüplere farklılaşır ve kas telini oluştururlar (Latschaw 1987, Schultz ve McCormick 1994, Moore ve ark 2005). Kanatlılarda kas telinin sayıca artışı ile karakterize olan hiperplazi periyodu kuluçka süresince büyük oranda tamamlanır ve çıkış sonrası kas tellerinin sayıları sabit kalır. Hipertrofik periyot ise kas tellerinde yeni miyofibriller oluşumu ile karakterize olup, çeşitli faktörlerin etkisi altında kalan dinamik bir süreçtir (Remignon ve ark 1995, Velleman 2007). Bu nedenle embriyonik dönemde hiperplazik periyodu ve miyotüp organizasyonunu etkileyen faktörler civcivin çıkış sonrası büyüme performansını da etkileyebilecektir.

Bu çalışmada yumurta sarısına enjekte edilen BPA'nın tavuklarda iskelet kaslarının embriyonik gelişimi üzerindeki olası etkileri histolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Materyal

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun 26.02.2016 tarihli ve 2016/21 karar sayılı izniyle gerçekleştirildi. Çalışmada Isa Brown ırkı sağlıklı ticari anaçlardan elde edilen 310 adet fertil tavuk yumurtası kullanıldı.

### Yumurtaya enjekte edilecek solüsyonların hazırlanması

Taşıt madde solüsyonunun hazırlanması için 1.5 mL diklormetan (UN1593, VWR Chemicals) içinde 1gr lesitin (I.078.K.034.0010, Koza Gıda) eritildikten sonra üzerine 10 mL yerfıstığı yağı eklendi. Ardından hazırlanan bu karışım 60 °C'lik etüvde kapağı açık erlen içerisinde 1 gece bekletilerek diklormetanın uçması sağlandı. Her bir doz grubu için kullanılacak olan Bisfenol A (MKBQ5209V, Sigma) tartıldıktan sonra bir miktar etanol ile eritildi. Ardından 100  $\mu$ l'inde istenen miktarda BPA içerecek hacimde taşıt madde solüsyonu eklendi.

### Deney gruplarının oluşturulması ve enjeksiyon işlemleri

Yumurtalar enjeksiyon işlemlerinden önce kapalı bir kabinde 15 dakika süreyle dezenfekte edildi (21 g potasyum permanganat + 42 mL formaldehit/m<sup>3</sup>). Yumurtalar rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki yumurtalara (n=45) hiçbir işlem uygulanmazken, taşıyıcı madde grubundaki yumurtalara (n=50) 100  $\mu$ l hacminde taşıyıcı solüsyon enjekte edildi. Deney gruplarındaki yumurtalara ise daha

önce BPA'nın yumurtaya enjekte edildiği çalışmalarda dozlara benzer olarak (Kandil ve Sur 2018, Çetin ve Özaydın 2021) yumurta başına 50 µg (n=60), 100 µg (n=70) ve 250 µg (n=85) dozlarında BPA 100 µl hacminde enjekte edildi.

Test solüsyonları kuluçka başlangıcında steril insülin enjektörleri aracılığıyla yumurta sarısına enjekte edildi. Kuluçka işlemleri, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarında bulunan kuluçka makinesinde, optimal koşullarda (37.8°C sıcaklık ve %65 nispi nem) gerçekleştirildi.

#### *Yumurtaların açılması ve doku örneklerinin alınması*

Kuluçkanın 13, 18 ve 21. günlerinde, her gruptan 10 canlı embriyo elde edilinceye kadar rastgele yumurta seçilerek açıldı. Embriyolardan alınan bacak (musculus fibularis longus) ve göğüs kası (musculus sternocoracoideus pectoralis) doku örnekleri %10'luk formol solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edildi. Ardından rutin histolojik yöntemlerle işlenen doku örnekleri parafinde bloklandı. Bloklardan 6 µm kalınlığında alınan kesitler genel histolojik yapının belirlenmesi için Crossmon'nun üçlü boyama yöntemi ile boyandı. Ayrıca kesitler PCNA reaktivitesinin belirlenmesi amacıyla immünohistokimyasal yöntemle boyandı.

İmmünohistokimyasal işlemler için alınan doku örneklerinin boyanması streptavidin-biotin-peroksidaz kompleksi (sABC) esasına dayanan prosedürle gerçekleştirildi. Bu amaçla poli-L-lizin kaplı lamlara alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler bir gece 37°C'lik etüvde bekletilerek kurutuldu. Takiben, kesitler deparafinize ve rehidre edilerek, antijenik epitoplara

açıya çıkarılması (antijen retrieval) için sitrat tampon solüsyonunda (pH 6) mikrodalga fırınında 5 dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz aktivitesinin inhibisyonu için %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 20 dakika bekletilen kesitler, bloklama solüsyonunda (ScyTek UHP 125, USA) 5 dakika inkübe edilerek nonspesifik bağlanma bölgeleri bloke edildi. Kesitler daha sonra, oda sıcaklığında 1 saat süreyle primer antikorla (PCNA antibody, Abcam Ab 29), takiben de biotinli keçi polivalan antikoruyla (ScyTek UHP 125, USA) 30 dakika süreyle inkübe edildi. Tamponlu fosfat salin (PBS, Biotech) ile yıkanan kesitler streptavidin-peroksidazla (HRP, ScyTek UHP 125, USA) oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edildi. Kromojen olarak DAB (3-3'-diaminobenzidine, ScyTek ACK 125) kullanılırken, çekirdek boyası için Mayer's hematoxilen solüsyonu tercih edildi. Negatif kontrol preparatları, doku kesitlerinin primer antikor yerine PBS ile inkübe edilmesiyle hazırlandı.

Tüm preparatlar DFC-320 model kamera ataçmanı olan Leica DM-2500 model ışık mikroskobu ile incelendi ve daha sonra gerekli bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi. İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan kesitlerde PCNA pozitif hücreler rastgele seçilen 10.000 µm<sup>2</sup>'lik 3 farklı bölgede sayıldı.

#### *İstatistiksel analizler*

Elde edilen veriler SPSS 10.0 programı kullanılarak One-Way Anova testi (tek yönlü varyans analizi) ve ardından çoklu karşılaştırma testlerinden DUNCAN testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi (p<0.05).

Tablo 1. İnkübasyonun 21. gününde bacak ve göğüs kaslarının enine kesitlerinde 10000 µm<sup>2</sup> birim alandaki PCNA pozitif hücre sayısı(x ±SD)

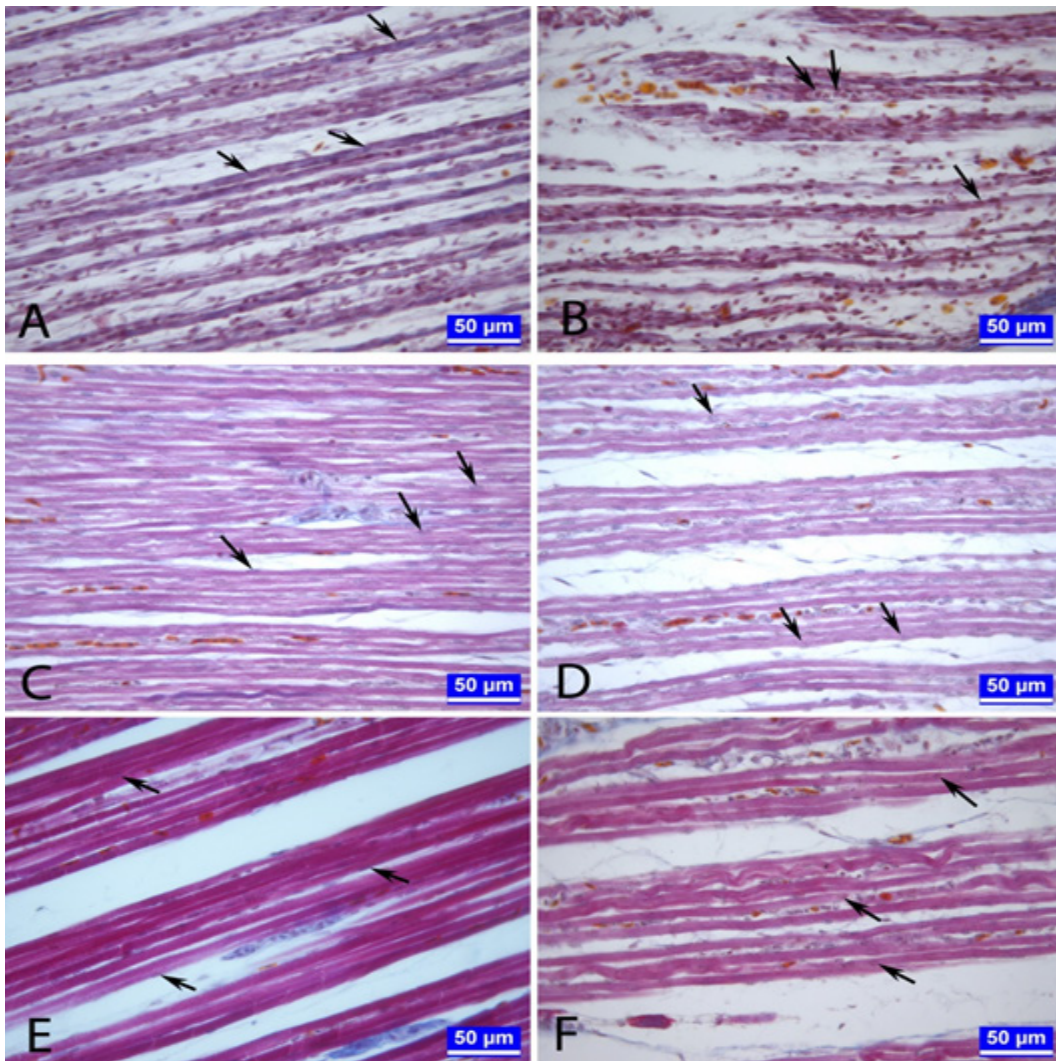
Gruplar	Bacak kası	Göğüs kası
Kontrol	18,6923±5,76 <sup>c</sup>	25,5000±4,75 <sup>c</sup>
Taşıyıcı kontrol	16,3125±4,15 <sup>c</sup>	19,5000±6,71 <sup>c</sup>
50 µg/yumurta BPA	34,8500±10,69 <sup>a</sup>	32,7000±9,23 <sup>b</sup>
100 µg/ yumurta BPA	29,371±9,82 <sup>b</sup>	32,1667±8,14 <sup>b</sup>
250 µg/ yumurta BPA	35,33±9,68 <sup>a</sup>	43,2222±7,48 <sup>a</sup>

a-cAynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0.05).

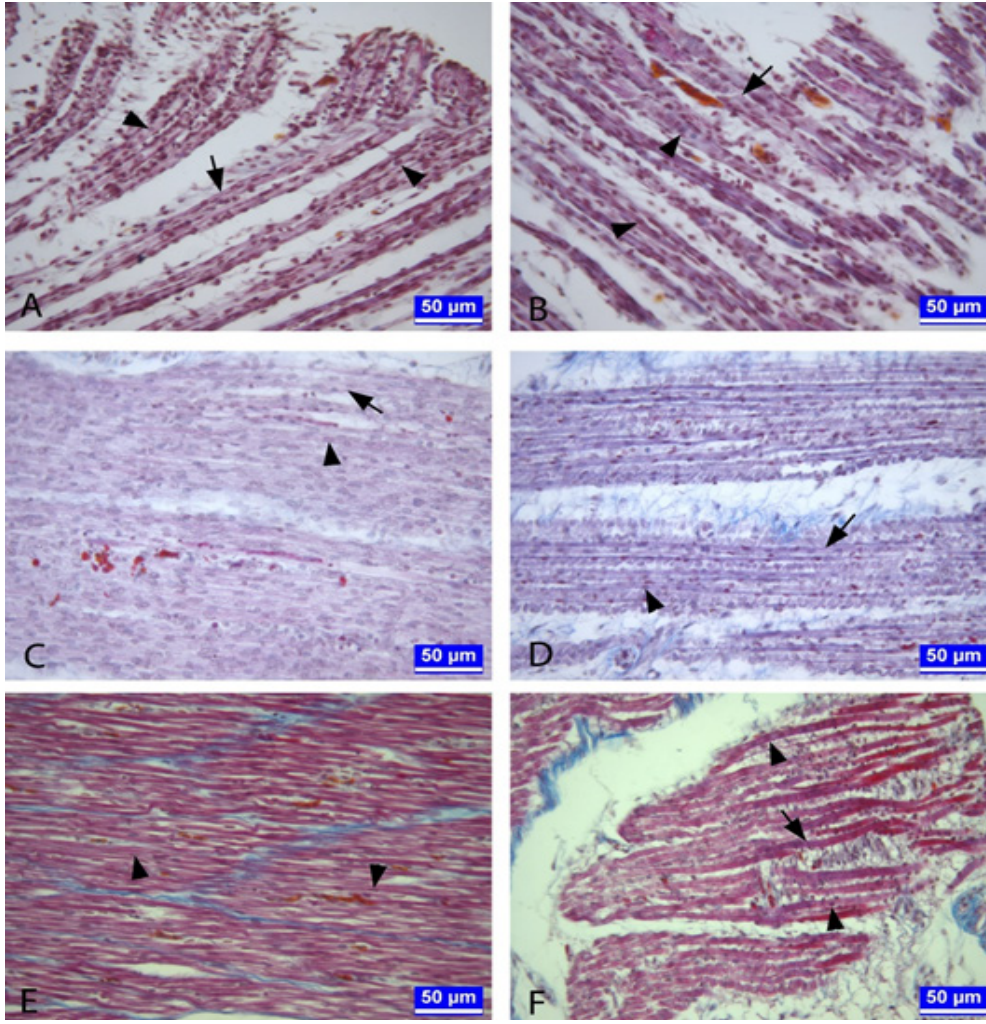
## Bulgular

Kuluçkanın 13. gününde tüm gruplarda hem bacak hem de göğüs kası kesitlerinde miyoblastların miyotüpleri şekillendirmek üzere bir araya gelip birleştikleri görüldü. Miyotüpleri şekillendiren miyoblastların çekirdekleri oval ve miyotüpün merkezinde yerleşim göstermekteydi (Şekil 1A, 1B, 2A, 2B).

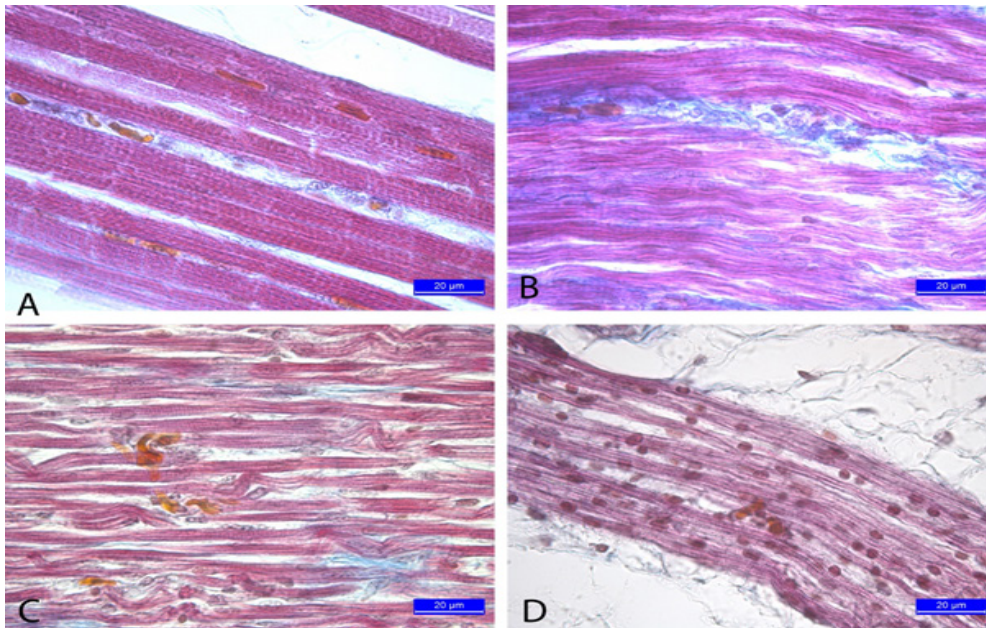
Kuluçkanın 18. gününde kontrol grubu ve taşıyıcı kontrol grubunda miyofibrillerin şekillenip organize olmasıyla birlikte enine bandlaşmanın belirginleşmeye ve çekirdeklerin de perifere doğru kaymaya başladığı görüldü (Şekil 1C, 2C). Miyotüp organizasyonunun hala devam ettiği BPA gruplarında enine bandlaşmanın da zayıf olduğu dikkati çektirdi (Şekil 1D, 2D).



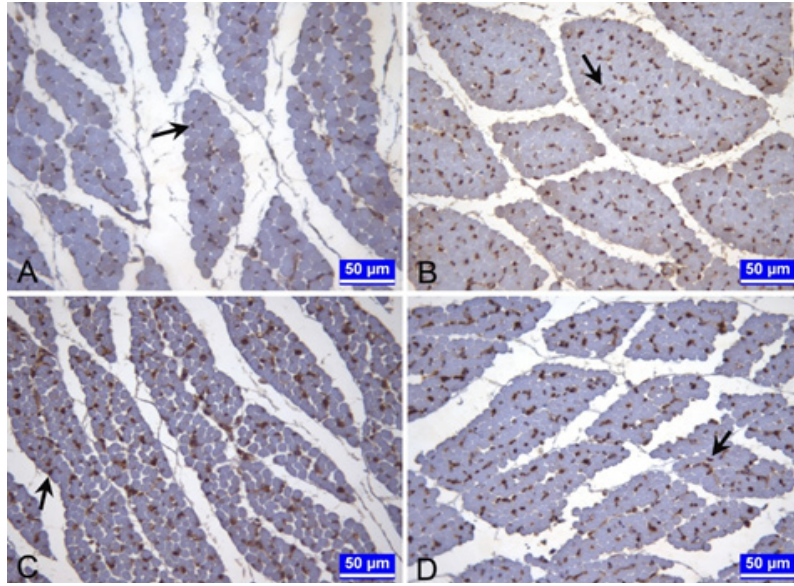
Şekil 1. Kuluçkanın 13. gününde kontrol (A) ve 100 µg/BPA (B); 18. gününde kontrol (C) ve 50 µg/BPA (D); 21. gününde kontrol (E) ve 100 µg/BPA (F) gruplarına ait bacak kasının boyuna kesitleri. Oklar: Şekillenmekte olan kas telleri. Kontrol gruplarına göre BPA gruplarında miyotüp organizasyonunun geciktiği ve enine bandlaşmanın zayıf olduğu görülmektedir. Crosson'un üçlü boyama yöntemi, Bar: 50 µm.



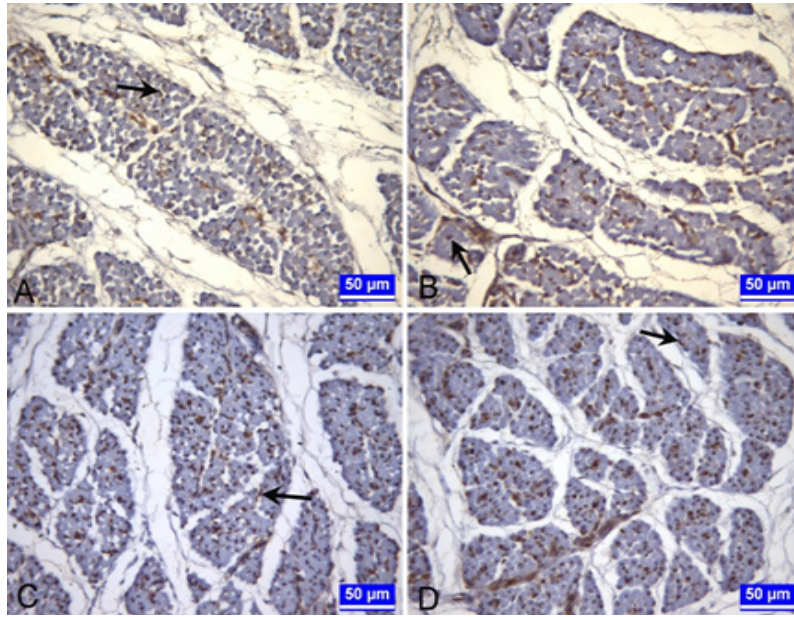
Şekil 2. Kuluçkanın 13. gününde kontrol (A) ve 250 µg/BPA (B); 18. gününde taşıyıcı kontrol (C) ve 50 µg/BPA (D); 21. gününde kontrol (E) ve 100 µg/BPA (F) gruplarına ait göğüs kasının boyuna kesitleri. Oklar: Şekillenmekte olan kas telleri, Ok başları: Çekirdekler. Kontrol gruplarına göre BPA gruplarında miyotüp organizasyonunun geciktiği görülmektedir. Crossmon'un üçlü boyama yöntemi. Bar: 50 µm



Şekil 3. Kuluçkanın 21. gününde, kontrol (A) ve 250 µg/BPA (B) gruplarına ait bacak kasının boyuna kesitleri ile kontrol (C) ve 250 µg/BPA (D) gruplarına ait göğüs kasının kesitleri. Kontrol gruplarına göre BPA gruplarında miyotüp organizasyonunun geciktiği ve enine bandlaşmanın zayıf olduğu görülmektedir. Crossmon'un üçlü boyama yöntemi. Bar: 20 µm



Şekil 4. Kuluçkanın 21. gününde kontrol (A), 50 µg/BPA (B), 100 µg/BPA (C) ve 250 µg/BPA (D) gruplarına ait bacak kasının enine kesiti. Oklar: PCNA pozitif hücreler. PCNA pozitif hücrelerin BPA verilen gruplarda kontrol gruplarına göre daha fazla sayıda olduğu dikkati çekmektedir. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Bar:50µm.



Şekil 5. Kuluçkanın 21. gününde kontrol (A), 50 µg/BPA (B), 100 µg/BPA (C) ve 250 µg/BPA (D) gruplarına ait göğüs kasının enine kesiti. Oklar: PCNA pozitif hücreler, PCNA pozitif hücrelerin BPA verilen gruplarda kontrol gruplarına göre daha fazla sayıda olduğu dikkati çekmektedir. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Bar:50µm.

Kuluçkanın 21. gününde kontrol ve taşıyıcı kontrol grubunda kas telinin normal histolojik yapısını kazandığı, enine bandlaşmanın daha da belirginleştiği, çekirdeklerin ise sarkolemin hemen altında ve çok sayıda olduğu görüldü (Şekil 1E, 2E, 3A, 3C). BPA verilen tüm gruplarda ise enine bandlaşmanın çok zayıf olduğu ve miyotüp organizasyonunun henüz tamamlanmadığı dikkati çekerken, doza bağlı belirgin bir fark bulunmadığı tespit edildi (Şekil 1F, 2F, 3B, 3D)

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan bacak ve göğüs kası enine kesitlerinde PCNA pozitif hücre sayısının BPA verilen gruplarda kontrol ve taşıyıcı kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu, ayrıca BPA doz grupları arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu dikkati çekti ( $p < 0.05$ , Tablo 1, Şekil 4, 5).

## Tartışma

BPA yüksek üretim kapasitesi ve farklı kullanım alanlarından dolayı canlıların günlük hayatta sıklıkla maruz kaldığı endokrin bozucu kimyasallardan biridir (Crain ve ark 2007, Yıldız 2009, Flint ve ark 2012). Çevre Koruma Ajansı ve Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı insanlarda BPA'nın günlük tolere edilebilir alım miktarını 4 µg/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, sinir sistemi ve immün sistem üzerine olumsuz etkilerinin olabileceğini göstermektedir (Nakamura ve ark 2006, Nakamura ve ark 2007, Richter ve ark 2007, Romano ve ark 2015, Özyayın ve ark 2018a, 2018b).

BPA'nın plasentayı geçmesi ve yumurta sarısı ile atılmasından dolayı hem memeliler hem de kanatlılar embriyonik dönemden itibaren bu maddeye maruz kalabilmektedirler (Ikezuki ve ark 2002, Berg ve ark 2004, Crain ve ark 2007, Flint ve ark 2012). Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar prenatal dönemde BPA'ya maruz kalmanın üreme sistemi, sinir sistemi ve immün sistem üzerinde ciddi etkilere neden olduğunu göstermektedir (Dessi-Fulgheri ve ark 2002, Ramos ve ark 2003, Yan ve ark 2008).

Kanatlı embriyoları ilaçlar, fiziksel ve kimyasal maddeler, toksinler ve endokrin bozucular gibi bazı ajanların embriyotoksik, genotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda en sık tercih edilen materyallerden birisidir (Stoloff ve ark 1972, Berg ve ark 1999). Jelinek (1977) dömlü tavuk yumurtalarının kullanıldığı ve Tavuk Embriyo Toksisitesi Belirleme Testi (Chicken Embryotoxicity Screening Test-CHEST) olarak isimlendirilen bir yöntem geliştirmiş ve bu yöntem çok sayıda kimyasal maddenin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlendiği birçok çalışmada 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 dozun mg olarak karşılığı olduğu bildirilmektedir (Jelinek 1977). Bu tekniğin kolay olması, ucuz ve kısa sürede sonuç vermesi testi avantajlı hale getirmektedir.

Dömlü tavuk yumurtalarının kullanıldığı çalışmalarda, test edilecek etken maddelerin yumurtaya verilmiş yolları üzerinde farklı görüşler vardır (Stoloff ve ark 1972, Kemper ve Luepke 1986, Sur ve Celik 2003, Öznurlu ve ark 2012). Yumurta sarısına enjeksiyon yöntemi ile embriyoya verilen zararın en aza indirildiği, lipofilik ve hidrofilik maddelerin yumurta sarısında homojen dağılım gösterdiği ve daha iyi emildiği ileri sürülmüştür (Verret ve ark 1964, Berg ve ark 1999, Drake ve ark 2006). Yumurta sarısı memelilerdeki plasentanın karşılığı olarak görev yapmakta ve yavrunun temel besin kaynağı olarak işlev görmektedir (Bauer ve ark 2013). Yapılan

çalışmalarda test solüsyonları çoğunlukla yumurtaya 20-100 µl hacminde enjekte edilmektedir (Berg 2000, Öznurlu ve ark 2012, Yiğit ve ark 2013, Kandil ve Sur 2018, Yılmaz ve Öznurlu 2019).

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) 75, 100 ve 300 µg/g yumurta dozlarında enjekte edilen BPA'nın mortaliteyi arttırdığını tespit etmişler ve kuluçka başlangıcında yumurta sarısına yapılan tek bir enjeksiyonun gelişen embriyoda kronik maruziyet oluşturduğu sonucuna varmışlardır. Kandil ve Sur (2018) ise yumurta sarısına enjekte edilen 50, 100 ve 250 µg/yumurta dozunda BPA'nın tavuk embriyolarında östrojene benzer gelişimsel etkilere neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sunulan bu çalışmada da 50, 100 ve 250 µg/yumurta dozunda BPA içeren solüsyonlar 100 µl hacminde yumurta sarısına enjekte edilmiştir.

Östrojenler biyolojik etkilerini ERα ve ERβ aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Nakamura ve Kariyazono 2010). ER'ler kas dokusu da dahil olmak üzere çeşitli dokularda eksprese edilmektedir. Hem ER alfa hemde ER beta iskelet kası hücrelerinde eksprese edildiğinden dolayı iskelet kası östrojen ve BPA gibi ksenoöstrojenler için hedef dokulardan biridir (Wiik ve ark 2009, Goa ve ark 2018). Goa ve ark (2018) fare miyoblast C2C12 hücrelerinde BPA'nın miyoblast diferensiyasyonunu inhibe ettiğini, kas gen ekspresyonu ve miyotüp oluşumunu da azalttığını bildirmişlerdir. Receno ve ark (2014) 'nın kültüre ettikleri fare miyoblast C2C12 hücrelerini farklı dozlarda ve sürelerde BPA'ya maruz bıraktıkları bir çalışmada ise uzun süreli maruziyetin iskelet kası antioksidan profilini değiştirdiğini gözlemlemişlerdir.

Kanatlılarda kas gelişimi büyük oranda kuluçka süresince tamamlanır. Gündüz ve Öznurlu (2014) kuluçkanın 11. gününde multinükleer miyotüplerin şekillendiğini, kuluçkanın 17. gününde enine bandlaşmaların belirmeye başladığını ve 21. günde ise bandlaşmanın oldukça belirgin olduğunu gözlemlemişlerdir. Yapılan benzer çalışmalarda da (Kikuchi 1971, Henry ve Burke 1998, Uscebrka ve ark 2010, Ouyang ve ark 2017) kuluçkanın 9-20. günleri arasında miyotüp organizasyonunun ve miyoblastların farklılaşma sürecinin tamamlandığı görülmüştür. Prenatal dönemde maruz kalınan ve kas gelişimini etkileyecek ajanlar verimi ve kârlılığı önemli oranda etkilemekte, aynı zamanda tüketilen etin kalitesi ve kompozisyonunda da değişikliklere yol açabilmektedirler (Sadighara ve ark 2013, Gündüz ve Öznurlu 2014). Sadighara ve ark (2013) yumurta sarısına enjekte ettikleri farklı dozlarda BPA'nın kas dokusunda oksidatif strese yol açtığını ve



etin kompozisyonunu değiştirdiğini bildirmişlerdir.

PCNA ekspresyon düzeyi, hücre siklusunun G1 fazının ortasından itibaren hızla artmaya başlar. S fazı boyunca yüksek seviyesini koruyan bu ekspresyon G2/M fazından itibaren düşüşe geçer. Proliferatif hücrelerin tanınmasında bir belirteç olan PCNA, aynı zamanda hasarlı DNA'nın tamirinde de rol oynamaktadır (Banlunara ve ark 2005). Miyositler post-mitotik G1 evresindeki miyoblastların birleşmesi ile meydana gelen çok çekirdekli kas hücreleridir. PCNA, gerek miyoblastlar ve gerekse kas dokusunun öncül hücreleri olarak kabul edilen satellit hücrelerinin proliferatif aktivitelerinin belirlenmesinde de kullanılan önemli bir belirteçtir. Embriyonik dönemde söz konusu bu hücrelerdeki proliferasyonu etkileyen herhangi bir ajanın kuluçka sonrası dönemde beklenen kas kitlesi üzerinde de etkilerinin olabileceği bildirilmektedir (Zielińska ve ark 2012).

Yapılan bu çalışmada BPA verilen gruplarda kontrol ve taşıyıcı grupları ile karşılaştırıldığında bacak ve göğüs kası gelişiminin gecikmiş olduğu görülmüştür. Bu gecikmenin özellikle miyotüp organizasyonu ya da oluşum sürecinin uzaması ile karakterize olduğu dikkati çekmiştir. Kuluçkanın 21. gününde PCNA immunreaktivitesinin de BPA gruplarında kontrol ve taşıyıcı kontrol gruplarına göre yüksek olduğu, ayrıca BPA doz grupları arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Özellikle bacak kasındaki PCNA immunreaktivitesinin 100 µg/yumurta grubunda 50 ve 250 µg/yumurta grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

BPA gruplarında PCNA immunreaktivitesinin daha yüksek olması söz konusu bu gruplarda henüz tamamlanmamış olan miyoblast çoğalması ve miyotüp organizasyonundan kaynaklanabilir. Endokrin bozucular organizmalarda her zaman aynı etkiye neden olmayıp doz-cevap eğrisi de her zaman doğrusal değildir. Benzer şekilde endokrin bozucu kimyasallardan biri olan BPA'nın da düşük dozlarının, geleneksel toksikoloji çalışmalarında kullanılan dozlarda belki de görülmeyen önemli etkilere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Bu durum "U" ya da "n" şeklinde ifade edilen non monotonik ya da çizgisel olmayan doz eğrisiyle açıklanmaktadır (Wetherill ve ark 2007, Acconcia ve ark 2015). Wetherill ve ark (2002), 1 nmol/L BPA'nın prostat tümör hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin 100 nmol/L BPA'dan daha fazla olduğunu ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde Miyawaki ve ark (2007) 1 µg/mL içme suyundaki BPA'nın dişi farelerde yağ dokusu artışına sebep olurken, 10 µg/mL içme suyundaki BPA'nın etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da PCNA immunreaktivitesi bakımından 100 µg/yumurta doz grubunda görülen önemli farklılık BPA'nın çizgisel olmayan doz eğrisiyle açıklanabilir.

## Öneriler

Tavuklarda yumurtaya geçen BPA'nın iskelet kaslarının gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerinin, hayvanlardan beklenen canlı ağırlık artışı gibi ekonomik önemi olan verim parametrelerinde düşüşe neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca tavuk embriyolarının deneysel embriyotoksite çalışmalarında bir model olarak kullanıldığı dikkate alındığında insanlar ve memeli hayvanlarda gebelik süresince maruz kalınan BPA'nın iskelet kası dokusunun gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerinin canlıların hayatının ilerleyen dönemlerinde ciddi kas problemlerine yol açabileceği düşünülmektedir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

## Finansal Kaynak

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17401163 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Acconcia F, Pallottini V, Marino M, (2015). Molecular mechanisms of action of BPA. Dose-Response: An International Journal, 13(4), 1-9.
- Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D, 2009. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. J Chromatogr A, 1216(3), 449-69.
- Banlunara W, Bintvihok A, Kumagai S, 2005. Immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in duckling liver fed with aflatoxin B1 and esterified glucosylmannan. Toxicol, 46(8), 954-7.
- Bauer R, Plieschnig JA, Finkes T, Riegler B, et al., 2013. The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. J Biol Chem, 288(2), 1088-98.
- Berg C, 2000. Environmental pollutants and the reproductive system in birds. PHD Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis Faculty of Science and Technology, Uppsala.
- Berg C, Blomqvist A, Holm L, Brandt I, 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. Environ Toxicol Chem, 20(12), 2836-40.
- Berg C, Halldin K, Fridolfsson AK, Brandt I, et al., 1999. The avian egg as a test system for endocrine disruptors: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. Sci Total Environ, 233(1-3), 57-66.







- Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Leg J, et al., 2008. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 83(3), 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. *Environ Health Perspect*, 119(3), 390-6.
- Cooper JE, Kendig EL, Belcher SM, 2011. Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere*, 85(6), 943-7.
- Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, et al., 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reprod Toxicol*, 24(2), 225-39.
- Dessi-Fulgheri F, Porrini S, Farabollini F, 2002. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on play behavior of female and male juvenile rats. *Environ Health Perspect*, 110(3), 403-407.
- Drake VJ, Koprowski SL, Lough JW, Smith SM, 2006. Gastrulating chick embryo as a model for evaluating teratogenicity: a comparison of three approaches birth defects. *Res A Clin Mol Teratol*, 76(1), 66-71.
- Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufik J, Navalón A, et al., 2007. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol*, 24(2), 259-64.
- Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E, 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manage*, 104, 19-34.
- Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon J, et al., 2012. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol*, 50 (10), 3725-40.
- Goa GY, Leea SJ, Joa A, Leeb JR, 2018. Bisphenol A and estradiol impede myoblast differentiation through downregulating Akt signaling pathway. *Toxicol Lett*, 292, 12-19.
- EFSA (European Food Safety Authority) Gundert-Remy U, Bodin J, Bosetti C, FitzGerald RE, et al., 2017. Bisphenol A (BPA) hazard assessment protocol, technical report. EFSA Supporting Publication 2017: EN-1354. 76 pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1354>.
- Gündüz N, Öznurlu Y, 2014. Adverse effects of aflatoxin B1 on skeletal muscle development in broiler chickens. *Br Poult Sci*, 55 (5), 684-92.
- 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(10), 597-603.
- Henry MH and Burke WH, 1998. Sexual dimorphism in broiler chick embryos and embryonic muscle development in late incubation. *Poultry Science*, 77, 728-736.
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, et al., 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod*, 17(11), 2839-41.
- Jelinek R, 1977. Methods in prenatal toxicology. In: *The chick embryotoxicity screening test (CHEST)*. Ed: Neubert D, Merker H, Kwasigrooh T, Georg Thieme, Stuttgart, p. 381-6.
- Jessl L, Rebecca Lenz R, Massing FG, Scheider J, et al., 2018. Effects of estrogens and antiestrogens on gonadal sex differentiation and embryonic development in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *PeerJ*, 6, e5094.
- Kandil B, Sur E, 2018. The light microscopic investigation of the effects of in-ovo administered bisphenol A (BPA) on the development of testes. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 65(3), 273-82.
- Kemper F, Luepke N, 1986. Toxicity testing by the hen's egg test (HET). *Food Chem Toxicol*, 24(6-7), 647-8.
- Kikuchi T, 1971. Studies on development and differentiation of muscle III. Especially on the mode of increase in the number of muscle cells. *Tohoku J Agric Res*, 22, 1-15.
- Latshaw WK, 1987. *Veterinary Developmental Anatomy*. Toronto, Philadelphia, p.184-204.
- Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, et al., 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril*, 95(2), 625-30.
- Liao C, Kannan K, 2011. Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: implications for human exposure. *Environ Sci Technol*, 45 (21),9372-9.
- Liu Y, Mei C, Liu H, Wang H, et al., 2014. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochem Biophys Res Commun*, 451(4), 592-8.
- Manfo FPT, Jubendradass R, Nantia EA, Moundipa PF, et al., 2014. Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Rev Environ Contam Toxicol*, 228, 57-82.
- Meltzer M, Pfeiffer E, 2001. Chemistry of natural and anthropogenic endocrine active compounds: The handbook of environmental chemistry, endocrine disruptors Part 1, Meltzer M(ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 63-80.
- Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, et al., 2007. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb*, 14, 245-252.
- Moore DT, Ferket PR, Mozdziak PE, 2005. Muscle Development in the late embryonic and early post-hatch poult. *Int J Poult Sci*, 4(3), 138-142.
- Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S, 2007. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci Lett*, 420(2), 100-5.
- Nakamura K, Itoh K, Yaoi T, Fujiwara Y, et al., 2006. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol A. *J Neurosci Res*, 84(6), 1197-1205.
- Nakamura K, Kariyazono H, 2010. Influence of endocrine-disrupting chemicals on the immune system. *J Health Sci*, 56, 361-73.
- Ouyang H, Wang Z, Chen X, Yu J, et al., 2017. Proteomic Analysis of Chicken Skeletal Muscle during Embryonic Development. *Front Physiol*, 8,281. doi: 10.3389/fphys.2017.00281
- Özaydın T, Öznurlu Y, Sur E, Celik İ, et al., 2018b. Effects of bisphenol A on antioxidant system and lipid profile in rats. *Biotech Histochem*, 93(4), 231-238.
- Özaydın T, Öznurlu Y, Sur E, Çelik İ, et al., 2018a. 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 Histochem*, 120(8), 728-733.
- Öznurlu Y, Celik I, Sur E, Özyayın T, et al., 2012. Determination of the effects of aflatoxin B1 given in ovo on the proximal tibial growth plate of broiler chickens: histological, histometric and immunohistochemical findings. *Avian Pathol*, 41(5) 469-77.
- Pisapia L, Del Pozzo G, Barba P, Caputo L, et al., 2012. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *Gen Comp Endocrinol*, 178(1), 54-63.
- Ramos JG, Varayoud J, Kass L, Rodríguez H, Costabel L, Muñoz-De-Toro M, Luque EH, 2003. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology*, 144, 3206-3215.
- Receno C, Benson M, Liang C, Keslacy S, et al., 2014. Effect of bisphenol A (BPA) on skeletal muscle oxidative stress. *Int J Exerc Sci, Conference Proceedings, Vol 9, Iss 2, Article 66*.
- Remignon H, Gardahaut MF, Marche G, Ricard FH, 1995. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres without changing their typing in chickens. *J Muscle Res Cell Motil*, 16(2),95-102.
- Richter CA, Birnbaum LS, Farabolini F, Newbold RR, et al., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*, 24(2), 199-224.
- Romano ME, Webster GM, Vuong AM, Thomas Zoeller R, et al., 2015. Gestational urinary bisphenol A and maternal and newborn thyroid hormone concentrations: the Home Study. *Environ Res*, 138, 453- 60.
- Rubin BS, 2011. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127(1-2), 27-34.
- Sadighara P, Khaniki GJ, Baseri E, Dehghani MH, et al., 2013. Effects of Bisphenol A on the quality characteristics of meat in a chicken embryo model. *Sci Int*, 11(1), 375-8.
- Schultz E, McCormick KM, 1994. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 23, 213-57.
- Sendón García RS, Losada PP, 2004. Determination of bisphenol A diglycidyl ether and its hydrolysis and chlorohydroxy derivatives by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1032 (1-2), 37-43.
- Stoloff L, Verret MJ, Dantzman J, Reynaldo EF, 1972. Toxicological study of aflatoxin P1 using the fertile chicken egg. *Toxicol Appl Pharmacol*, 23(3), 528-31.
- Sur E, Çelik İ, 2003. Effects of aflatoxin B1 on the development of bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. *Br Poult Sci*, 44(4), 558-66.
- Şişe Ş, 2011. Anne sütünde nonilfenol ve bisfenol a düzeylerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Uscebrka G, Stojanovic S, Zikic D and Kanacki Z Gordana Uscebrka, Slobodan Stojanovic, Dragan Zikic and Zdenko Kanacki 2010. Morphodynamics of embryonic development of skeletal musculature of broiler and layer chickens. *Avian Biology Research*, 3 (4), 179-186.
- Vandenberg LN, Chahoud İ, Heindel JJ, Padmanabhan V, et al., 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol a. *Environ Health Perspect*, 118(8), 1055-70.
- Velleman SG, 2007. Muscle development in the embryo and hatchling. *Poult Sci*, 86(5),1050-4.
- Verrett MJ, Marliac J, McLaughlin J, 1964. Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity. *J Assoc Off Anal Chem*, 47(6), 1003-6.
- Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, et al., 2002. The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther*, 1(7), 515-524.
- Wiik A, Ekman M, Johansson O, Jansson E, et al., 2009. Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol* 131(2), 181-189.
- 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. *Environ Health Perspect*, 116(4), 514-9.
- Yıldız N, 2009. Çevresel östrojenlerden bisfenol a ve oktilfenolün erkek sıçanlarda subkronik etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yılmaz D, Öznurlu Y, 2019. 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. *Eurasian J Vet Sci*, 35(3), 144-151.
- 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.
- Zielinska M, Sawosz E, Grodzik, M, Balcerak M, et al., 2012. Effect of taurine and gold nanoparticles on the morphological and molecular characteristics of muscle development during chicken embryogenesis. *Arch Anim Nutr*, 66(1), 1-13.

#### Yazar Katkıları

- Fikir/Kavram: Yasemin Öznurlu, Tuğba Özyayın, Emrah Sur  
Tasarım: Yasemin Öznurlu, Tuğba Özyayın, Emrah Sur  
Denetleme/Danışmanlık: Emrah Sur  
Veri Toplama ve/veya İşleme: Yasemin Öznurlu, Tuğba Özyayın, Emrah Sur  
Analiz ve/veya Yorum: Yasemin Öznurlu, Tuğba Özyayın, Emrah Sur, Tansu Kuşat  
Kaynak Taraması: Yasemin Öznurlu, Tuğba Özyayın, Tansu Kuşat  
Makalenin Yazımı: Yasemin Öznurlu, Tuğba Özyayın  
Eleştirel İnceleme: Emrah Sur



## Etik Onay

Sunulan çalışma, 26.02.2016 tarihli 2016/21 karar sayılı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun onayı ve izniyle yürütüldü.

**CITE THIS ARTICLE:** Öznurlu Y, Özaydın T, Sur E, Kuşat T, 2022. Yumurta sarısına enjekte edilen bisfenol A' nın tavuklarda iskelet kası gelişimi üzerindeki etkileri. *Eurasian J Vet Sci*, 38, 2, 90-100

