T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YUMURTAYA VERİLEN BİSFENOL A 'NIN, TAVUKLARDA TİMUSUN GELİŞİMİ VE PERİFER KAN ALFA NAFTİL ASETAT ESTERAZ POZİTİF LENFOSİT ORANI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK VE ENZİM HİSTOKİMYASAL METODLARLA BELİRLENMESİ

Didem YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Yasemin Öznurlu

KONYA-2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YUMURTAYA VERİLEN BİSFENOL A 'NIN, TAVUKLARDA TİMUSUN GELİŞİMİ VE PERİFER KAN ALFA NAFTİL ASETAT ESTERAZ POZİTİF LENFOSİT ORANI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK VE ENZİM HİSTOKİMYASAL METODLARLA BELİRLENMESİ

Didem YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Yasemin Öznurlu

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16202018 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2017

ÖNSÖZ

Sunulan bu çalışma ile dünyada yaygın olarak kullanılan endokrin bozucu kimyasallardan biri olan Bisfenol A' nınembriyonik dönemde kan ve timus dokusunda meydana getirdiği değişimlerin histolojik ve enzim histokimyasal yöntemler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

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

Çalışmanın gerçekleştirilmesinde ve yüksek lisans eğitimim boyunca, akademik bilgi ve deneyimleriyle büyük katkıları olan aynı zamanda değerli fikirleriyle bana yol gösteren ve her zaman destek olan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Öğretim Üyesi ve Danışmanım Prof. Dr. Yasemin Öznurlu'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, tez çalışmam da bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ olmak üzere, Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. İlhami ÇELİK, Prof. Dr. Emrah SUR, Prof. Dr. Murat BOYDAK, Doç. Dr. Tuğba ÖZAYDIN ve laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Araş. Gör. İlknur ÜNDAĞ ile Araş. Gör. Banu KANDİL'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR iv
1.GİRİŞ 1
1.1.1.Bisfenol A'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 2
1.1.2.Bisfenol A'nın Kullanım Alanları 3
1.1.4.Bisfenol A'nın Bozunma Mekanizması 5
1.1.5.BPA'nın Östrojenik Etkisi 5
1.1.6.BPA'nın İmmun Sistem Üzerine Etkileri 6
1.2.Kanatlılarda Timusun Histolojik Yapısı ve Embriyonal Gelişimi 7
1.2.1.Timusun Histolojik Yapısı 7
1.2.2.Timusun Embriyonik Gelişimi 10
1.2.3.Timusun İnvolüsyonu 10
1.3. Mast hücreleri 10
1.3.1. Timus Dokusunda Mast Hücreleri 12
1.4. Alfanaftil Asetat Esteraz (ANAE) Enzimi 13
2.MATERYAL METOT 14
2.1.Yumurtaya Enjekte Edilecek Solüsyonların Hazırlanması 14
2.1.1.Taşıt Maddenin Hazırlanması 14
2.1.2.Etken Maddenin Hazırlanması 14
2.1.3.Deney Gruplarının Oluşturulması ve Enjeksiyon İşlemleri 14
2.1.4.Yumurtaların Açılması ve Doku Örneklerinin Alınması 15
2.1.5.Enzimhistokimyasal Yöntemler 16
2.1.6.İstatistiki Analizler 17
3.BULGULAR 18
3.1.İnkübasyonun On Üçüncü Günü 18
3.2.İnkübasyonun On Sekizinci Günü 23
3.3.İnkübasyonun Yirmi Birinci Günü (Kuluçkadan Çıkış Günü) 27
3.4. Timus Dokusunda Mast Hücreleri 34
4.TARTIŞMA 39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 47
6.KAYNAKLAR 48
7. EKLER 58
EK-A: Etik Kurul Kararı 58
8. ÖZGEÇMİŞ 59

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANAE: Alfa Naftil Asetat Esteraz

BPA: Bisfenol A

CHEST: Tavuk Embriyotoksisitesi Belirleme Testi

DMSO: Dimetilsülfoksid

ERα: Östrojen Reseptör alfa

ERβ: Östrojen Reseptör beta

g: gram

HCl: Hidro Klorik Asit

IgE: Immünglobulin E

kDa: kilodalton

kg: kilogram

L: litre

mg: miligram

µg: mikrogram

µl: mikrolitre

mL: mililitre

NaF: Sodyum Florid

NaOH: Sodyum Hidroksit

N: Normal

ng: Nanogram

PVC: Polivinil klorür

TCR: T hücre reseptörü

TNF: Tümör nekroz faktör

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ

Şekil 1.1.BPA'nın Fenol ve Asetondan Kondensasyonu

Şekil 1. 2.Dünyada yıllık BPA üretimi

Şekil 1.3. Yaş gruplarına göre tahmini hesaplanan günlük BPA alımı

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

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

Şekil 3.3. İnkübasyonun on üçüncü gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti.

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

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

Şekil 3.6.İnkübasyonun on üçüncü gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.7. İnkübasyonun on üçüncü gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti.

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

Şekil 3.9.İnkübasyonun on sekizinci gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.10.İnkübasyonun on sekizinci gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.11.İnkübasyonun on sekizinci gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.12.İnkübasyonun on sekizinci gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.13.İnkübasyonun on sekizinci gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.14.İnkübasyonun on sekizinci gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti.

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

Şekil 3.16. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti

Şekil 3.17. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz kalan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

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

Şekil 3.19. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.20. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.21. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.22. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.23. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.24. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.25. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.26. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.27.İnkübasyonun on üçüncü gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.28. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.29. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde taşıyıcı grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.30. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde taşıyıcı grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.31. İnkübasyonun on sekizinci gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.32. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Şekil 3.33. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti.

Çizelge 2.1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.

Çizelge 3.1. Kuluçkadan çıkışın ilk günü (21. gün) kontrol grupları ve BPA verilen gruplarda ANAE pozitif lenfosit oranları (%).

Çizelge 3.2. Embriyonik dönemin on sekiz ve yirmi birinci günlerinde kontrol grupları ve deney gruplarına ait mast hücre sayısı.

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YUMURTAYA VERİLEN BİSFENOL A 'NIN, TAVUKLARDA TİMUSUN GELİŞİMİ VE PERİFER KAN ALFA NAFTİL ASETAT ESTERAZ POZİTİF LENFOSİT ORANI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK VE ENZİM HİSTOKİMYASAL METODLARLA BELİRLENMESİ

Didem YILMAZ

Histoloji ve Embriyoloji (Vet) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2017

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

Bu amaçla Isa Brown ırkı yumurtacı tavuklara ait 310 adet her biri 50-55 gr ağırlağında olan döllü 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 doku örnekleri alındı.

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 ($p<0.05$). BPA'nın timus dokusundaki mast hücreleri üzerinde de olumsuz bir etkisinin olduğu, BPA verilen gruplarda mast hücre sayısında istatistiki açıdan önemli bir azalma olduğu dikkati çekti ($p<0.05$).

BPA' nın timusun embriyonik gelişimini baskıladığı, ANAE pozitif lenfosit oranında ve mast hücre sayısında düşüşlere 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

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

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 MEANS OF HISTOLOGICAL AND ENZYMEHISTOCHEMICAL METHODS IN CHICKEN

Didem YILMAZ

Department of Histology and Embryology (Vet)

MASTER THESIS/KONYA-2017

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 means of histological and enzymehistochemical methods in chicken.

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

On the 13th, 18th and 21th 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 ($p < 0.05$). It was also noted that BPA had a negative effect on the mast cells in the thymus tissue and a significant decrease in mast cell count in the BPA-treated groups ($p < 0.05$).

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

Anahtar Sözcükler: ANAE, BPA, chicken embryo, thymus

.

1.GİRİŞ

Endokrin bozucu kimyasal 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). Aynı zamanda bu kimyasal maddeler hormonların metabolizmasını etkileyebilecekleri gibi, hormon reseptör ekspresyonunu da değiştirebilmektedirler (Richter ve ark 2007). Endokrin bozucular, 1962'de biyolog Rachel Carson'un 'Silent Spring' isimli, pestisitlerin kuşlar üzerindeki zararlı etkilerini konu alan bir kitap yayınlamasıyla ilk olarak gündeme gelmiştir (Toker 2011).

Endokrin bozucu kimyasallara maruz kalma, mesleki maruziyetten anne karnındaki maruziyete kadar değişmektedir. Birçok endokrin bozucu kimyasal maddenin diğer birçok özellikleri yanında oldukça kararlı yapıları bu kimyasalları endüstri için uygun kılarken; son kullanımlarından yıllar sonra bile su, hava ve toprakta kalıntı bırakmalarına neden olmaktadır. Bu durumda canlıların bu maddelere maruz kalma süresi uzamaktadır (Clayton ve ark 2011). Bu kimyasal maddeler çoğunlukla gıda zincirine girmek suretiyle besinler yoluyla vücuda alınırlar. Kişisel bakım ürünleri, deterjanlar ve kozmetiklerin kullanımı sırasında deri yoluyla da bu maddelere maruz kalınabilmektedir. Ayrıca bu kimyasalların üretim endüstrisinde çalışan işçilerin bu bileşiklere maruz kalma riski çok daha yüksektir (Ergün 2013). Genel olarak bu bileşiklerin suda çözünebilirlikleri düşükken, yağda çözünebilirlikleri oldukça fazladır. Bu nedenle bu kimyasalların biyoakümülasyonu canlılarda yağ dokularında daha fazla olmaktadır (Sharpe 2001).

Endokrin bozucu kimyasal maddeye maruz kalınan dönem zararlı etkinin ortaya çıkışı açısından oldukça önemlidir. Bu kimyasal maddelere maruz kalan yetişkinlerde de önemli zararlı etkiler görülmekte birlikte, fötal dönemde ve yaşamın ilk yıllarındaki maruziyet canlının yaşamı boyunca çok daha ciddi etkilere yol açabilmektedir (Yeşilkaya 2008,Rogers ve ark 2013).

Endokrin bozucu maddelere maruz kalma durumunda erken veya geç ergenlik, sperm sayısında azalma, sperm kalitesinde azalma, üreme sistemi gelişim sorunları (kriptorşidizm, hipospadias), testesteron düzeyinde azalma, endometriyozis, vajen kanseri, meme kanseri, testis kanseri, prostat kanseri gibi hormonal ilişkili

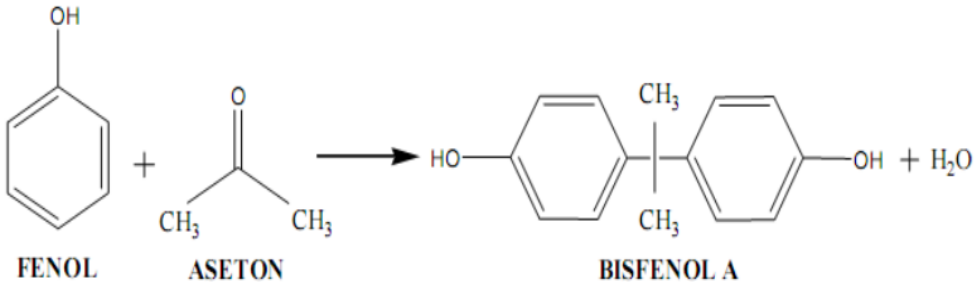
kanserlerin görülme sıklığında artış olduğu belirtilmiştir. İntrauterin dönemde bu kimyasallara maruz kalmak, embriyo ve fetüs ölümlerine, düşük doğum ağırlığına ve çeşitli malformasyonlara yol açabilecektir. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalara göre obezite, hiperaktivite ve öğrenme problemlerinin de günlük hayatta kullanımı oldukça artan endokrin bozucu kimyasal maddelerle ilişkili olabileceğini ifade etmektedir (Vos ve ark 2000, Çetinkaya 2009). Avrupa Birliği'nin 2002 yılında yayınladığı endokrin bozucular ile ilgili raporunda; bazı ilaçlar, dioksin ve dioksin benzeri bileşikler, poliklorlu bifeniller, bazı pestisitler, fitalatlar ve bisfenol A (BPA) gibi plastizer maddeleri de içeren 60 kimyasal maddenin çevre ve insan sağlığına zararı açık olarak belirtilmiştir (Durmaz ve Koçer Giray 2013).

1.1.Bisfenol A

Endokrin bozuculardan biri olan Bisfenol A (2,2-bis(4hydroxyphenly) propane, BPA), dünyada yaygın kullanım alanına sahip kimyasallardan biridir (Ballesteros-Gomez ve ark 2009). Üretim maliyeti düşük ve üretim süreci basit olan BPA 1950'li yıllardan itibaren polikarbonat plastik ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanılmaktadır. BPA'nın toksik bir bileşik olduğu ve bebek biberonlarında kullanılmaması gerektiği ilk olarak 2010 yılında Kanada'da açıklanmış ve 2011 yılı itibariyle tüm Avrupa ülkelerinde BPA'nın bebek biberonlarında kullanımı yasaklanmıştır (Rogers ve ark 2013).Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı Kararı ile 1 Haziran 2011 tarihinden itibaren BPA içeren bebek biberonlarının üretimi ve satışı yasaklanmıştır. Ancak halen birçok yiyecek ve içecek saklama kaplarının üretiminde bu kimyasal madde kullanılmaktadır (Durmaz ve Koçer Giray 2013).

1.1.1.Bisfenol A'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bisfenol A ilk defa 1891' de Rus kimyacı Aleksandr Dianin tarafından iki mol fenol ve bir mol asetonun düşük pH ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile sentezlenmiştir (Şişe 2011). 1930'lu yıllarda ise sentetik östrojen kaynağı araştırmalarında incelenmiştir (Krishnan ve ark 1993). Üretilen BPA'nın saflığı genel olarak %99-99,8 arasında olmaktadır (Prokop ve ark 2004).

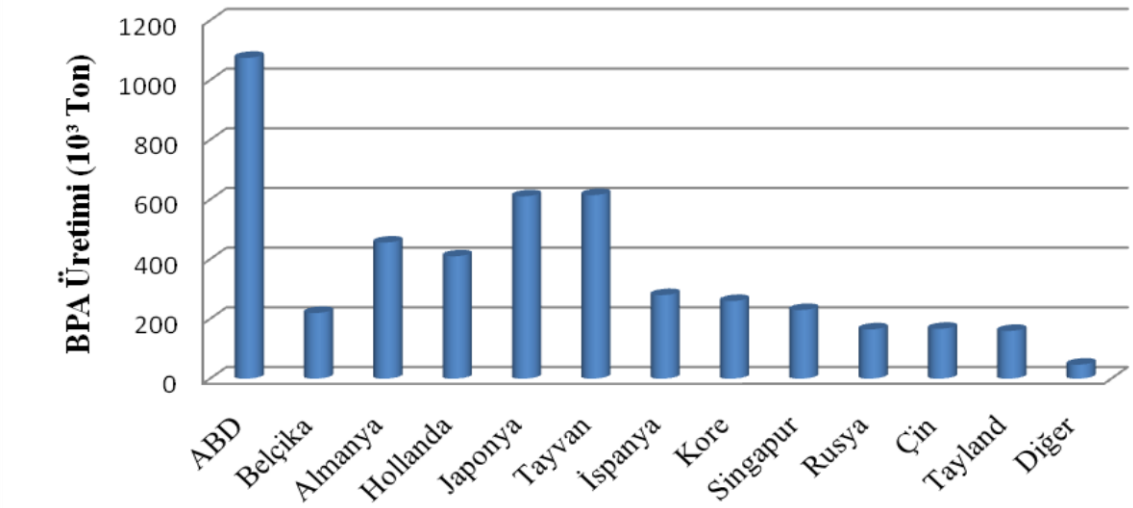


Şekil 1.1. BPA'nın Fenol ve Asetondan Kondensasyonu (Ergün 2013).

BPA katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte ve kristal yapıdadır. Etanol, aseton ve dimetilsülfoksid (DMSO) gibi çözücülerle iyi çözünmektedir. Sudaki çözünürlüğü 25°C'de 120 mg/L'dir. 25°C'deki yoğunluğu 1,1-1,2 g/L'dir (Tsai 2006).

1.1.2.Bisfenol A'nın Kullanım Alanları

Kullanım hacmi en yüksek olan kimyasallardan biri olan BPA'nın talep artışı sonucunda yıllık üretimi de giderek artmıştır (Gülnaz 2006, Dündar 2014). Bu kimyasalın dünyadaki üretim hacmi 1980'lerde yaklaşık bir milyon ton iken, 2009'da bu miktar 2,2 milyon tonun üzerine çıkmıştır (Taylor 2010). Bundan dolayı BPA'ya maruz kalma oranı da giderek artmıştır.



Şekil 1.2.Dünyada yıllık BPA üretimi (Huang ve ark 2011)

BPA'nın en fazla kullanıldığı alan %60'lık oranla polikarbonat plastik üretimidir. Bunu %26'lık oranla epoksi reçine üretimi takip etmektedir (Şişe 2011, Dündar 2014). Epoksi reçineler; yiyecek ve içecek kaplarının iç kaplamasında gıda ile temasının kesilmesi, bazı plastikleştirici maddelerde kimyasal antioksidan olarak, PVC'de ise katkı maddesi olarak kullanılırlar (Markey ve ark 2001,Lintelmann ve ark 2003).Paketleme uygulamalarında 7 çeşit plastik kullanılmaktadır. Geri dönüşüm kodu 1, 2, 4, 5 ve 6 olan plastikler polimerizasyon ya da paketleme formunda BPA içermemektedir. Geri dönüşüm kodu 3 olan plastiklerde BPA bulunabilir, geri dönüşüm kodu 7 olan plastikler "diğer" sınıf olarak adlandırılmış olup polikarbonat ve epoksi gibi malzemeleri içermektedir (Sevencan ve Vaizoğlu 2007).

1.1.3.BPA'nın Çevreyle Temas Yolları

BPA'nın yüksek üretim kapasitesi ve farklı kullanım alanlarına bakıldığında çevreye çok miktarda BPA yayılımı olduğu tahmin edilebilmektedir (Yıldız 2009). BPA'nın çevreye yayılması; üretim esnasında oluşan atıkların yeterince arıtılmadan yüzey suyuna verilmesi veya BPA depolarında meydana gelen kaçaklar ve taşımacılık sırasındaki kazalar sebebiyle gerçekleşmektedir (Staples ve ark 1998).Günümüzde endüstriyel, zirai veya başka amaçlarla kullanılan birçok organik kimyasal madde, işlevini gördükten sonra çoğunlukla kanalizasyon yoluyla su ortamlarına salınmaktadır (Şişe 2011). Plastik üreten endüstriyel fabrikalar ve çöp depolama alanlarından da önemli ölçüde BPA çevreye yayılmaktadır (Wang ve ark 2006).

BPA'ya maruz kalınan yollardan en önemlisi gıda yoluyla olmaktadır. Çünkü BPA kolaylıkla besin ambalajlarından besin içeriğine karışabilmektedir (Şise 2011).BPA normal koşullarda da polimerlerden gıdaya sızmakta ancak ısıtma, kaynatma gibi yüksek sıcaklığa maruz kalma durumunda gıdaya geçiş oranı büyük ölçüde artmaktadır (Braniste ve ark 2010). Ayrıca BPA'nın gıdaya geçiş oranı gıda ile ambalaj materyalinin temas yüzeyinin alanı ve süresi, ambalaj materyalinin fiziksel ve kimyasal özellikleri, gıda maddesinin agregat durumu, gıdanın yağlı, sulu, asitli olma durumu gibi özellikleri ve ürünün migragatlara olan ilgisi gibi faktörlere göre değişebilmektedir. BPA içeren kaplara mikrodalga ile pişirme gibi yüksek sıcaklık uygulandığında reçineler bozunmaya başlayarak ambalajdan gıdaya BPA geçişi daha yoğun ve hızlı olmaktadır (Dündar 2014). Kang ve ark (2003) yaptıkları

çalışmada konserve kutularına %5-10 sodyum klorid veya bitkisel yağ varlığında 121℃'de sıcaklık uygulandıklarında BPA geçişinin arttığını bildirmişlerdir (>10 ng/mL).

BPA plasenta bariyerini geçerek fötusa ulaşabilmektedir (Le Corre ve ark 2015). Bu nedenle canlılar intrauterin yaşamdan başlayarak ömürleri boyunca BPA ile karşılaşabilmektedirler (Chapin ve ark 2008).İnsanlarda oral yolla alınan BPA'nın emilim oranı konusunda çok az bilgi vardır. Fakat deri ile temas sonucunda %10'a yakın bir miktarda emilim olabileceği gösterilmiştir (Chapin ve ark 2008). Vücutta idrarda, kanda, yağ dokusunda, semende, anne sütünde, amniyotik sıvıda, plasenta ve fötusta, kolostrumda, umbikal kord kanında, tükürükte BPA bulanabileceği belirtilmiştir (Fernandez ve ark 2007,Chapin ve ark 2008, Li ve ark 2011).

Yaş grubu	**Günlük medyan BPA alımı (*μ*g/kg/gün)**
Süt çocuğu (0-6 aylık) Mama Anne sütü	1-24 0.2-18
Süt çocuğu (6-12 ay)	1.65-13
Çocuk (1,5-6 yaş)	0.043-14,7
Yetişkin	0.008-1,5

Şekil 1.3. Yaş gruplarına göre tahmini hesaplanan günlük BPA alımı (Chapin ve ark 2008).

1.1.4.Bisfenol A'nın Bozunma Mekanizması

BPA biyodegradasyon ve fotodegradasyonla yıkıma uğramaktadır. Yüzeysel sularda, atık su arıtma tesislerinde ve biyolojik atık su sistemlerinde hızlı bir şekilde biyodegradasyona uğramakta iken sıvı çevrede fotooksidasyon veya fotoliz yoluyla bozunmaktadır. Saf suda fotodegradasyon daha yavaştır (Bahadır 2011).

1.1.5.BPA'nın Östrojenik Etkisi

Östrojenler steroid yapılı hormonlar olup, fonksiyonlarını dokularda bulunan iki reseptör ile yerine getirirler. Östrojen reseptörlerinin kemik dokusu, merkezi sinir

sistemi, kardiyovasküler sistem, immün sistem, ürogenital sistem, sindirim sistemi, böbrekler, karaciğer, akciğerler ve memede eksprese olduğu belirtilmiştir. Östrojen reseptörü alfa (ER α) daha çok uterus, meme dokusu ile embriyonik gelişimlerini devam ettiren dişi ve erkeklerin müller kanalında; östrojen reseptörü beta (ER β) ise immün sistem, merkezi sinir sistemi, sindirim sistemi, kardiyovasküler sistem, ürogenital sistem ve solunum sisteminin birçok doku ve organlarında eksprese edildiği bildirilmiştir (Meltzer ve Pfeiffer 2001).

Endokrin bozucu kimyasallar yapısal bakımdan hormonlarla benzerlik gösterdikleri için, hormon reseptörlerine bağlanabilmektedirler. Başka bir ifade ile yalancı bir hormon olarak faaliyet gösterebilmektedir. BPA östrojen reseptörleri için 17-beta estradiol'e göre daha düşük bir affiniteye sahiptir (Liu ve ark 2014). BPA hem ERα hem de ERβ'ya bağlanır fakat ERβ'ya 10 kat daha fazla affinite gösterdiği belirtilmektedir (Vandenberg ve ark 2010).

1.1.6.BPA'nın İmmun Sistem Üzerine Etkileri

Seks steroidlerinin immünomodulatör rolleri uzun süredir bilinmektedir. Seks hormonları timusta T lenfositlerin, kemik iliğinde B lenfositlerin farklılaşması ve maturasyonunu etkilemekte ve dalak ile timus ağırlığı, timik hormonların sekresyonu, sitokinlerin sekresyonu ve antikorların üretimi gibi çeşitli immün fonksiyonların homeostazına katılmaktadır (Sakazaki ve ark 2002). Endokrin sistem ve immün sistem arasındaki ilişki göz önüne alındığında BPA gibi endokrin bozucu kimyasal maddelerin immün sistem fonksiyonlarını da etkilemesi muhtemeldir (Clayton ve ark 2011). Nitekim endokrin bozucu kimyasalları içeren pestisistlere maruz kalan insanlarda $CD4^{+}CD8^{+}$lenfosit oranında artış, periferal kan mononükleer hücrelerin proliferasyonunda azalma, otoantikorların sıklığında artış gibi immünolojik değişiklikler gözlenmiştir (Rosenberg ve ark 1999, Straube ve ark 1999, Ahmed 2000, Clayton ve ark 2011).

Doğal östrojen'in timus ve kemik iliğinin morfolojisini bozduğu, T ve B lenfositler ile antijen sunan hücreleri apoptozisten koruduğu, doğal katil hücrelerin aktivitesini baskıladığı, serum ve dişi genital kanalda antikorların sentezini düzenlediği bildirilmiştir. BPA gibi östrojenik etkiye sahip endokrin bozucu kimyasalların benzer etkiler göstermesi muhtemeldir (Seaman ve ark 1978,Verthelyi ve Donner ve ark 1999, Ahmed 2000, Clayton ve ark 2011). Deney hayvanları ile

gerçekleştirilen laboratuvar çalışmaları göstermektedir ki BPA, IL-4 üretimi ve IgE düzeyinin artmasıyla alerji gelişimine yol açabilmektedir (Lee ve ark 2003, Chalubinski ve Kowalski 2006, Clayton ve ark 2011).

1.2.Kanatlılarda Timusun Histolojik Yapısı ve Embriyonal Gelişimi

1.2.1.Timusun Histolojik Yapısı

Timus, kanatlı ve memelilerde T-lenfositlerin olgunlaştığı primer bir lenfoid organdır. Kanatlılarda boyun bölgesinin her bir tarafında *sulcus jugularis* boyunca aralıklarla konumlanmış olan timus, oval şekilli yaklaşık 7-9 adet bağımsız lopdan oluşmaktadır. Boynun her iki tarafında da üçüncü boyun omuru hizasında başlar ve göğüs boşluğundaki tiroit bezinin yakınına kadar devam eder. Timus lopları, bağ dokudan oluşan bir kapsülle çevrilidir. Kapsülün dışı, gevşek bağ dokusu ile yağ dokusundan iç kısmı ise kollegen türdeki bağ doku iplikleri ve elastik ipliklerden oluşmaktadır (Hodges 1974). Kapsülden ayrılarak lopların içine giren ince bağ dokusu bölmeleri organı tam olmayan lopçuklara ayırır. Lopçuklar, kesitlerde koyu ve açık renkli olmak üzere iki farklı bölge olarak ayırt edilir. Koyu olan bölge korteks, açık renkli olan bölge ise organın medullasıdır (Tanyolaç 1999).

Kanatlılarda timus lopçuklarının medullalarında memelilerdeki gibi yuvarlak şekilli ve kornifiye durumdaki konsentrik lamellerden oluşan Hassal cisimciklerine oldukça az sayıda rastlanmaktadır (Sandıkçı ve Çelik 2000). Buna karşın kanatlılarda Hassal cisimciklerinin diffüz tipi olarak nitelendirilen ve retikulum hücrelerinin değişikliğe uğramalarıyla şekillenen kistik yapılar görülmektedir (Hodges 1974, Hoshimoto ve Sujimora 1976, Sandıkçı ve Çelik 2000). Bu yapıların oluşumu, medulladaki bazı retikulum hücrelerinin sitoplazmalarında küçük veziküllerin şekillenmesiyle başlamakta; birbirleriyle kaynaşan veziküller, hücrenin sitoplazmasını tamamen kaplayan iri ve yuvarlak vakuolleri oluşturmaktadır. Birkaç vakuolün birleşmesi sonucu oldukça iri vakuoller ve kistik yapılar oluşmaktadır. Bu yapıların lümenleri genellikle eozinofilik bir maddeyle dolu şekildedir. Kistlerin duvar yapısını ise epiteloid karakterdeki yassılaşmış ve uzamış retikulum hücreleri oluşturmaktadır. Bu morfolojik özellikleri sebebiyle kanatlı timusunun medulla kısımlarında çoğunlukla rastlanan ve diffüz Hassal cisimcikleri olarak da adlandırılan bu yapıların, dejenere olan retikulum hücrelerinden çok, lenfositlerin yıkımı esnasında şekillenen yapılar oldukları bildirilmektedir (Hodges 1974).

Organ kapsülünün altında, ektoderm kökenli, tek katlı ince bir epitel katmanı bulunur. Bu epitel, kapsülden timus parenşimine giren damarların etrafını dıştan sararak kan-timus bariyerini şekillendirir. Timustaki kapillar damarların çok kalın bazal laminası vardır özellikle proteinlerin geçişini önleyerek antijenlerin T lenfositlere ulaşmasını engeller. Kan-timus bariyeri gelişmekte olan lenfositleri antijen temasından koruyan fiziksel bir bariyerdir. T lenfositler ve kortikal kan damarlarının lümenleri arasındaki kan timus bariyeri komponentleri; damar duvarında endotel, bazal membran, perivasküler bağdoku; timus dokusuna ait olarak da Tip I retikulum hücreleri ve bu hücrelerin bazal membranından oluşmaktadır. Medulladaki kapillar damarlarda kan-timus bariyeri bulunmaz.

Kemik iliğinde bulunan bazı embriyonel pluripotent köken hücreler, bazı sitokinlerin uyarıcı etkisiyle gelişip, pre-T lenfosit haline farklılaşırlar (Diker 1994). Timusa gelen bu hücreler süratle çoğalıp gelişerek olgunlaşır (Diker 1994, Andersan 2001).Bu olgunlaşma timusun korteksinde başlar. Bu olgunlaşma aşamalarında bazı özelleşmiş yüzey molekülleri (TCR, CD) kazanarak antijenik uyarımlara cevap verebilecek bir özelliğe kavuşurlar. T lenfositler medullaya gelince özellikle CD'ler iki farklı özellik sergilerler. $CD4^{+},8^{-}$ yapısını gösterenler yardımcı T lenfositleri $CD4^{-},8^{+}$ yapısını gösterenlerse baskılayıcı (sitotoksik) T lenfositleri oluştururlar (Akay 1994,Diker 1998). Bu farklılaşma antijenleri aynı zamanda bu iki lenfositi işlevsel olarak da birbirinden ayırır. T lenfositler timusta bu önemli özelliğin yanı sıra çok önemli bir fonksiyon daha kazanırlar. Bu özellik ise kendinden olan ile olmayan antijenik molekülleri ayırt edebilmeleridir.

Timusun korteksinde bulanan lenfositlerin (kortikal timositlerin) büyük kısmı küçük tip lenfositlerdir. Bununla birlikte kuluçkadan çıkışla birlikte ilk 5 hafta süresince CD4 (+) lenfositlerin korteks ve medullada aynı miktarda dağılım gösterdiği, 9. haftadan sonra bu hücrelerin korteksi terk edip çoğunlukla medullada yerleştikleri bildirilmektedir. CD8 (+) lenfositlerin ise kuluçkadan çıkıştan sonraki gelişim dönemlerinde genellikle çoğunlukla kortekste yerleştikleri ileri sürülmektedir (Khan ve ark 1988).

Hücresel homeostazis, self immünolojik toleransın sağlanması ve sitotoksik T hücrelerinin hedef hücreleri öldürmesinde apoptozis olayı görülmektedir. Self toleransın oluşması şu mekanizma ile sağlanır: embriyonel dönemde, immun

sistemin gelişmesi sırasında, T lenfositleri oluşturacak olan lenfoid sistem hücreleri ilk olarak kan yoluyla timusa gelirler. Bu hücrelerin proliferasyonu, diferensiyasyonları ve genlerinin regülasyonu timusta gerçekleşmektedir (Allen ve ark 1993). Timustaki gelişmesi sırasında lenfositler, spesifik bir yüzey antijeni olan TCR (T hücre reseptörü)'lerini rastgele gen düzenlemesi mekanizması ile kazanmaktadırlar. Bu rastgele düzenleme sonucunda, yabancı antijenlere spesifik T hücrelerinin yanında, hem self-MHC moleküllerini tanımayan T hücreleri, hem de self antijenlere spesifik T hücreleri oluşmaktadır. İmmun sisteme yararı açısından, yabancı antijenlere spesifik T hücrelerinin olgunlaştırılarak sekonder lenfoid organlara gönderilmesi gerekir. Ancak, self-MHC moleküllerini tanımayan, dolayısıyla vücuda hiçbir yararı olmayacak olan T hücreleri immun yanıtta kullanılmayacaktır. Diğer taraftan, self antijenlere spesifik lenfositler, eğer gelişirlerse, vücudun kendi antijenlerine karşı immun yanıt oluşturacaklar, bu da vücut için zararlı olacaktır (Abastado 1996). Bu nedenlerle vücuda yararlı olmayan ve zararlı olacak lenfositlerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Timusta böyle hücrelerin seçimi ve ortadan kaldırılması, 'pozitif seleksiyon' ve 'negatif seleksiyon' denen iki aşamalı bir işlemle gerçekleştirilmektedir.

Pozitif seleksiyon, timusa giren öncü T hücrelerinin self-MHC moleküllerini tanıyanlarının seleksiyonu ve bu hücrelerinin çoğalmalarının sağlanması işlemidir. Öncü T lenfositleri timusa girdikten sonra self-MHC moleküllerine sahip olan epitel hücreleriyle karşılaşırlar. Eğer öncü T hücreleri, epitel hücrelerinin self-MHC moleküllerini tanıyarak bunlara bağlanırlarsa, bu olay apoptozisin başlamasına engel olur. Böylece self-MHC moleküllerini tanıyan timositler gelişimlerini sürdürebilir (pozitif seleksiyon) (Kendal 1995, Klein ve ark 2011 ve 2014).

Negatif seleksiyon ise, pozitif seleksiyondan geçmiş ve TCR'leri oluşmuş timositlerin self antijenlere spesifik olanlarının seçilmesi işlemidir. Bunun için öncelikle, self antijenlerin timositlere sunulması gerekir. Bu işi de dendritik hücreler ve makrofajlar yapar. Vücudun tüm hücreleri için ortak olan self-antijenleri timusta bulunmaktadır. Vücudun timus dışındaki self antijenleri ise kan yoluyla timusa taşınır veya makrofajlar tarafından timusa getirilir. Antijen sunan hücreler self-antijenleri, MHC molekülleri ile birlikte timositlere sunarlar. Eğer rastgele genetik düzenleme sırasında bir T hücresi self-antijenlere spesifik TCR'lere sahip olursa; bu hücre self antijene bağlanır ve apoptozis mekanizması işlemeye başlar (negatif

seleksiyon). Timustaki seleksiyonlar sırasında seçilen hücrelerin apoptozisinde CD95'in önemli rolü vardır. Sonuçta olgunlaşan bir T hücresi, kendi MHC molekülleri yardımıyla sunulan antijenik şifreleri alırken; ait olduğu organizmanın kendi antijenlerine yanıt vermeyen hücre olarak kan yoluyla sekonder lenfoid organların belirli bölgelerine giderler (Kendal 1995, Öznurlu 1999, Klein ve ark 2011 ve 2014).

1.2.2.Timusun Embriyonik Gelişimi

Kanatlılarda timus taslağı 3. ve 4. yutak ceplerinin endoderminden gelişmektedir (Maskar 1976, Carlson 1981, Kelly ve ark 1984, Latshaw 1987). Endodermal epitelyum kökenli timus taslağına, lenfoid hücrelerin öncüllerini oluşturan iri bazofilik sitoplazmalı, pretimik kök hücreleri kan damarları aracılığıyla gelerek yerleşirler. Epitelyal hücreler, lenfoid hücrelerinin öncüllerinin diferensiye olmalarını sağlayacak şekilde bir araya gelerek bir ağ oluşturur (Bochman 1997). Kuluçkanın ilerleyen aşamalarında çoğalan hücre kümeleri boğumlanarak lopları şekillendirmeye başlar (Maskar 1976). Sandıkçı ve Çelik (2000) kuluçkanın 7. gününde organ taslağını oluşturan hücreler arasındaki iri bazofilik hücre sayısının arttığını, 10. günde küçük lopçukların oluşmaya başladığını, 13. günde ise korteks-medulla ayrımının yapılabildiğini bildirmişlerdir. Kuluçkanın 15 ile 18. günleri arasında ise kapsül bölgesinde ve lopçuklar arası bölgelerde hücresel ve ipliksel yapılarda artış olduğunu, organın gelişimini inkubasyonu takiben 9-11. günlerde tamamladığını bildirmişlerdir (Sandıkçı ve Çelik 2000, Sur ve Çelik 2005)

1.2.3.Timusun İnvolüsyonu

Kuluçkadan çıkışı takip eden ilk 17 hafta boyunca gelişimini sürdüren timus, ilerleyen haftalarda yavaş yavaş küçülmeye başlar. Dördüncü haftada medullada ortaya çıkan kistik yapılar da bu süreç içerisinde artarlar. On sekizinci haftada ise korteks hemen hemen tamamen ortadan kalkar ve devam eden sürede tamamıyla invole olarak yerinde küçük lenfoid doku odakları, yağ hücresi toplulukları ve dejenere retikulum hücresi toplulukları kalır (Hodges 1974, Sandıkçı ve Çelik 2000).

1.3. Mast hücreleri

Mast hücreleri, biyojenik aminler, nötr serin proteazlar ve sitokinler gibi mediatörler içeren çok sayıda büyük sitoplazmik granül ile karakterize, benzersiz

salgı hücreleridir (Dvorak 1991,Crivellato ve ark 2005). Bu hücreler kan dolaşımına sahip bütün türlerde mevcut olan filogenetik olarak eski hücrelerdir. Mast hücreleri kemikiliğindekihematopoietik kök hücrelerinden farklılaşırlar, diferensiyasyonları ve olgunlaşmaları periferal dokularda gerçekleşmektedir. Bu olay büyüme faktörleri ve sitokinler gibi lokal mikro çevre faktörleri özellikle de c-kit ligand (kök hücre faktör) tarafından düzenlenmektedir (Gurish ve Austen 2001). Mast hücreleri hemen hemen vücudun tüm organ ve dokularında (memelilerde mineralize kemik, kıkırdak ve kornea gibi avasküler dokular hariç) özellikle kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler gibi bağ doku yapılarıyla ilişkili olarak bulunmaktadır (Crivellato ve ark 2005). Bu stratejik yerleşiminden dolayı allerjen ve mikroorganizmalar gibi dış etkenli uyaranlara sıklıkla maruz kalırlar ve içerdikleri mediatörleri salgılarlar. Mast hücrelerinin doğal ve kazanılmış immunite, enfeksiyon, allerji, kardiyovasküler ve nöroljik hastalıklar, yara iyileşmesi ve otoimmun hastalıklarda önemli görevleri vardır (Benoist ve Mathis 2002, Erpek 2004). Mast hücrelerinde çeşitli uyaranlar ile açığa çıkan mediatörlerin bir kısmı (histamin, proteoglikan ve proteazlar) granüllerde daha önceden sentezlenip depolanmaktadırlar. Diğer bir kısmı ise IgE ve antijen gibi uyarımlar sonucunda sentezlenip hemen serbest bırakılırlar (araşidonik asit oksidasyon ürünleri). Üçüncü grup ise sitokin ve kimokinlerdir. Bu grupta bulunan TNF α hem önceden sentezlenip depolanır hem de aktive olan hücrelerde sentezlenir. Allerjik reaksiyonlar dışında otoimmun hastalıklar ve yangısel olaylarda mast hücresinin degranüle olması nadir olarak görülmektedir. Dvorakve ark (1994) mast hücrelerinin granül içeriklerinin granül membranlarının korunması suretiyle sitoplazmaya verdiklerini tespit etmişlerdir. Letourneau ve ark (2003) yaptıkları elektron mikroskopik bir çalışmada belirgin bir degranülasyon olmadan hücrenin granüllerinin elektron yoğun yapılarında belirgin değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir. Bu şekildeki granülasyon"piecemealdegranülasyon" (PMD) olarak isimlendirilmiştir. Diğer bir granülasyon tipi "anafilaktikdegranülasyon"(AND) dur. Bu tip degranülasyonda ise granüller patlayarak içeriklerini boşaltmaktadırlar (Erpek 2004, Crivellato ve ark 2005).

Mast hücrelerinin fenotipik olarak farklı alt populasyonlara sahip olduğu ve sadece türe özgü spesifiklik değil aynı zamanda bulunduğu bölgeye göre de heterojenite gösterdiği bilinmektedir. Rodentlerde, sekretorik granüllerinin boyanma özelliklerine göre mukozal (mucosal mast cell- MMC) ve bağ doku mast hücreleri

(connective tissue mast cell - CTMC) olmak üzere iki farklı fenotip tanımlanmıştır (Enerback 1966). Benzer şekilde insanlarda mast hücreleri granüllerindeki proteaz içeriklerine göre sınıflandırılmıştır. MCT (Tryptase – pozitif, chymase- negatif)' lertriptaz içerirler, solunum ve intestinal mukozada yerleşmişlerdir. MCTC (Tryptase – pozitif, chymase - pozitif)'ler ise hem triptaz hem de şimaz içermektedir. Bu hücreler çoğunlukla deri, mide ve bağırsak submukozası, miyokardium, lenf düğümü, konjktiva ve synovia gibi bağ doku bölgelerinde bulunmaktadır. Buradaki isimlendirme rodentlerdeki MMC ve CTMC'lerin analoğudur (Crivellato ve ark 2004 ve 2005, Karaca ve Yörük 2005).

Mast hücre granülleri içerdikleri glikozaminoglikanların asidik radikalleri nedeniyle toluidin mavisi, metilen mavisi, tiyonin vb.bazik boyalarla boyandıklarında boyaların renginde (mavi) değil de mor-kırmızı renkte (metakromazi) boyanırlar. Mast hücreleri ayrıca alcianblue, safranin, astrablue ve metilen mavisi ile de boyanmaktadır (Karaca ve Yörük 2005). Mast hücrelerinin boyanma özellikleri kullanılan tespit solusyonunun türüne göre değişmektedir. Tespit solüsyonu olarak Carnoy, Mota ve izotonik formol asetik asit (IFAA) kullanılmaktadır.

1.3.1. Timus Dokusunda Mast Hücreleri

Yapılan histokimyasal, immunositokimyasal ve ultrastrüktürel çalışmalar memelilerde, kanatlılarda ve amfibilerde timus dokusunda mast hücrelerinin varlığını göstermektedir (Bigaj ve ark 1991, Xu ve ark 1993, Crivellato ve ark 2005). Timustaki mast hücre lokalizasyonu türe göre organın gelişim evresi, organı etkileyen yaşlanma ve involüsyon süreçleri ve aynı zamanda patolojik durumlara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Erişkin hayvanlarda mast hücreleri çoğunlukla kapsül ve interlobüler septumdaki bağ dokusunda lokalize iken (Kendal 1989), aynı zamanda da timik lobların içinde de yerleşim gösterdikleri bildirilmiştir. Bu bölgede mast hücrelerinin ya perivasküler alanlarda ya da lenfoid ve stromal hücreler arasında özellikle de peptiderjik sinirlere yakın olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Lorton ve ark 1990, Muller ve Weihe 1991). Mast hücrelerinin timus dokusundaki yerleşimlerinin önemi üzerinde çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Erişkin hayvanlarda intratimik mast hücrelerinin peptiderjik sinirlerle temasının nöroendokrin- immun bağlantı ile ilişkili olduğu ve nöroendokrin eksen üzerinde

manüplasyonları içeren deneysel çalışmaların organdaki mast hücre sayısındaki değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Barbini ve ark 1981, Abou-Rabia ve Kendall 1994).

1.4. Alfanaftil Asetat Esteraz (ANAE) Enzimi

Lizozomal bir enzim olan ANAE, başta insan olmak üzere sığır, tavuk, köpek ve farede T lenfositlerin ayırımında kullanılmaktadır. Pratikte gerek doku kesitlerinde gerekse de perifer kan frotilerinde T lenfosit, B lenfosit ve monositlerin birbirinden ayırd edilmesinde kullanılan bu enzim, T lenfosit olgunlaşmasının ileri aşamalarında kazanılmaktadır (Mueller ve ark 1975, Knowles ve Holck 1978, Sur ve Çelik 2005). ANAE pozitivitesi, lenfosit, monosit ve makrofajlarda farklı şekilde görülmektedir. İnsan perifer kan lenfositlerinde iki tip pozitivite tespit edilmiştir. İlki bir yada birkaç adet kırmızı-kahverengi granülden ibaret nokta tarzındaki T lenfositlere özgü olan pozitivite iken, ikincisi lenfosit morfolojisine sahip olan ve "NullCells" olarak da adlandırılan hücrelere ait ince granül tarzında pozitivitedir. Monosit ve maktofajlarda ise sitoplazmada diffüz ve güçlü bir pozitivite gözlenmektedir (Mueller ve ark 1975, Kajikawa ve ark 1983, Çelik ve ark 1991). Timus dokusunda yapılan çalışmalarda, timusun kortiko-medullar sınıra yakın bölgelerindeki medullar timositler pozitif reaksiyon verirken, kortekste lokalize olan timositlerin negatif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Mueller ve ark 1975, Çelik ve Sur 2005).

Bu çalışmanın amacı döllü tavuk yumurtasına verilen üç farklı dozdaki BPA' nın embriyoların kan ve timus dokularının gelişimi üzerindeki olası etkilerinin histolojik ve enzim histokimyasal yöntemlerle belirlenmesidir.

2.MATERYAL METOT

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 (EK-A). Çalışmada Isa Brown ırkı yumurtacı tavuklara ait her biri 50-55 g ağırlığında olan 310 adet döllü tavuk yumurtası kullanılmıştır.

2.1.Yumurtaya Enjekte Edilecek Solüsyonların Hazırlanması

2.1.1.Taşıt Maddenin Hazırlanması

1gr lesitin (I.078.K.034.0010, Koza Gıda) 1.5mL diklormetilen (UN1593, VWR Chemicals) içerisinde çözdürülerek üzerine 10mL yerfıstığı yağı eklendikten sonra diklormetilenin uçmasını sağlamak için 60 ˚C' lik etüvde kapağı açık erlen içerisinde 1 gece bekletildi (Özaydın 2016).

2.1.2.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 ethanol eklenerek BPA' nın erimesi sağlandı. Ethanolde 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.

2.1.3.Deney Gruplarının Oluşturulması ve Enjeksiyon İşlemleri

Yumurtalar enjeksiyon işlemlerinden önce kapalı bir kabinde 21 g potasyum permanganat + 42 mL formaldehit/m^3 karışımıyla elde edilen buharla 15 dakika dezenfekte edildi. Dezenfekte edilen yumurtalar rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.

Gruplar	**Yumurtalara uygulanan işlem**
Grup 1(Kontrol grubu), n=45	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Grup 2 (Taşıyıcı madde grubu), n=50	Propilen glikol, lesitin ve fıstık yağı karışımından oluşan 100 µl hacminde taşıyıcı solüsyon yumurta sarısına enjekte edildi.
Grup 3(50 µg/yumurta BPA), n=60	100 µl hacminde taşıyıcı madde içerisinde çözdürülmüş 50 µg/yumurta dozunda BPA yumurta sarısına enjekte edildi.
Grup 4(100 µg/yumurta BPA, n=70)	100 µl hacminde taşıyıcı madde içerisinde çözdürülmüş 100 µg/yumurta dozunda BPA yumurta sarısına enjekte edildi.
Grup 5(250 µg/yumurta BPA), n=85	100 µl hacminde taşıyıcı madde içerisinde çözdürülmüş 250 µg/yumurta dozunda BPA yumurta sarısına enjekte edildi.

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.

Çalışmada BPA'nın düşük, orta ve yüksek (50, 100, 250 µg/yumurta) olmak üzere üç farklı dozu kullanılmıştır (Kandil 2016). Kuluçka işlemleri, S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuarında bulunan kuluçka makinesinde (Prodi HB 500S), optimal koşullarda (37.8ºC sıcaklık ve % 65 nispi nem) gerçekleştirildi.

2.1.4.Yumurtaların Açılması ve Doku Örneklerinin Alınması

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 ^{o}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 ^{o}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 ^{o}C, pH 6,8) solüsyonunda tespit edildikten sonra 22 saat de Holt solüsyonunda (+4 ^{o}C) bekletildi ve ANAE enzim demonstrasyonu yapıldı. %10 tamponlu formol salin solüsyonunda tespit edilen dokular rutin histolojik metotlarla takip edilerek parafinde bloklandı ve bloklardan alınan 6 μm kalınlığındaki kesitler ise Crossman'ın üçlü boyama metodu (Crossmon 1937) ve Toludun Blue boyama metodu (Demir 2001) ile boyandı.

2.1.5.Enzimhistokimyasal Yöntemler

Alfa naftil asetat esteraz (ANAE) enzimi demonstrasyonu için inkübasyon solüsyonunun hazırlanması: Bu amaçla pH'sı 5.0 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml'sine 0.8 ml aseton (Merck) içerisinde eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthyl acetate, N–8505-Sigma) yavaş bir şekilde damlatıldı. Ardından 2.4 ml %4'lük sodyum nitrit (S–3421, Merck) solüsyonu ile 2.4 ml pararozanilin (P–3750, Merck) (1 gr pararozanilin, 20 ml distile su, 5 ml konsantre HCl) solüsyonunun 2 dakika süreyle bekletilmesi sonucunda elde edilen 4.8 ml hekzazotize edilmiş pararozanilin karışımı, substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklendikten sonra hazırlanan solüsyonun pH'sı 1N NaOH solüsyonu ile 5.8'e ayarlandı. Hazırlanan inkübasyon solüsyonu içerisindeki preperatlarda oda sıcaklığında 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.

Enzim demonstrasyonu yapılan kan preparatlarının her birinde toplam 200 adet lenfosit sayılarak ANAE (+) lenfosit oranları belirlenirken, timus dokusunda ise T lenfositlerin dokudaki yerleşimleri belirlendi.

Parafinde bloklanan kesitlerden hazırlanan preparatlarda ise organın embriyonik gelişimi histolojik yöntemlerle değerlendirildi. Mast hücre sayımı ise rastgele seçilen 10.000 μm^2 'lik 10 farklı bölgede gerçekleştirildi. Tüm preparatlar DFC–320 model kamera ataçmanı olan Leica DM–2500 model ışık mikroskobu ile incelendi ve daha sonra gerekli bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi.

2.1.6.İstatistiki Analizler

Elde edilen veriler SPSS 10.0 programı yardımıyla analiz edildi. Kan sayımı sonuçları Açı (Arc Sinus) transformasyon metodu kullanılarak analiz edildikten sonra tek yönlü varyans analizi yapıldı. Mast hücre sayımları içinOne-Way Anova testi (tek yönlü varyans analizi) ve ardından çoklu karşılaştırma testlerinden DUNCAN testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi.

3.BULGULAR

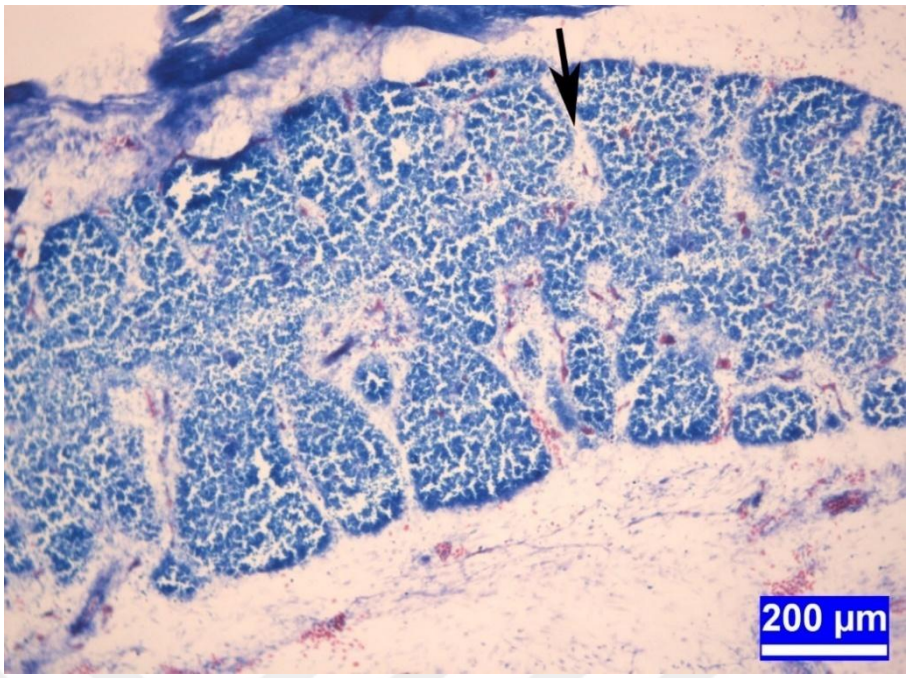
3.1.İnkübasyonun On Üçüncü Günü

İnkübasyonun 13.gününde timus dokusunun embriyonun boyun bölgesinin her iki tarafında sulcus jugularis boyunca vena jugularis'e paralel yerleşim gösterdiği görüldü. BPA verilen gruplardaki embriyolarda Hamburger Hamilton skalasına göre belirgin bir gelişme geriliği dikkati çekerken, timusun da bu gelişme geriliğine paralel olarak küçüldüğü tespit edildi.

Kontrol gruplarına ait embriyoların timus dokularından alınan histolojik kesitler üzerinde yapılan incelemelerde korteks-medulla ayrımının henüz belli olmadığı görüldü. Kapsülü oluşturan mezenkimal bağ dokunun organı tam olmayan lopçuklara ayırdığı tespit edildi. Lopçuklarda kan damarlarına rastlandı (Şekil 3.1 ve 3.2). 50,100 ve 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan deney gruplarında lop gelişiminin kontrol gruplarına göre oldukça geride olduğu tespit edildi. Lopların merkezindeki vaskülarizasyonun zayıf olduğu dikkati çekti (Şekil 3.3, 3.4 ve 3.5). BPA verilen gruplarda lenfosit morfolojisi gösteren hücre yoğunluğunda azalma olduğu tespit edildi (Şekil 3.6).



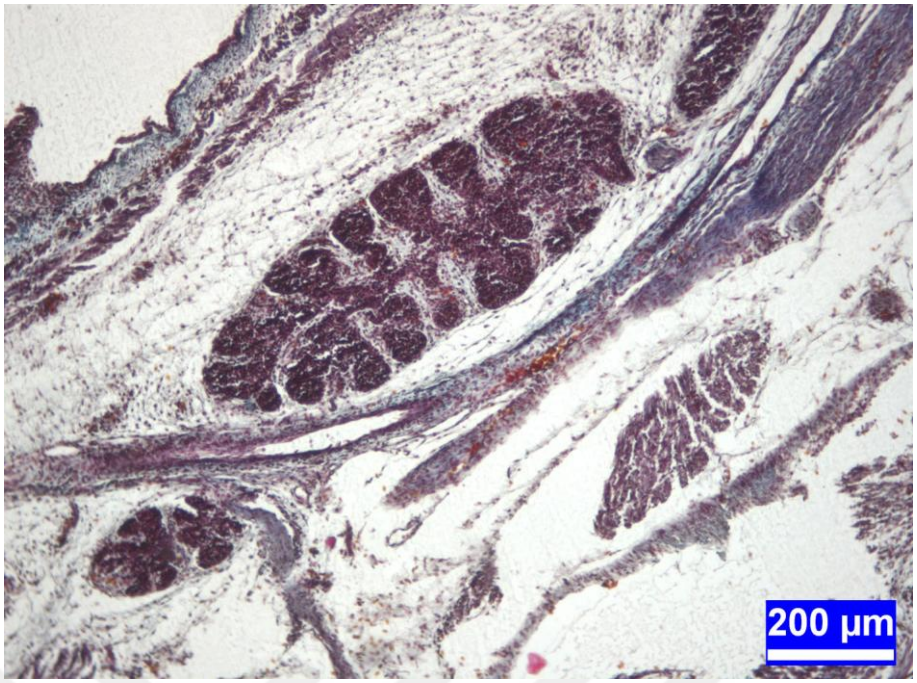
Şekil 3.1. İnkübasyonun on üçüncü gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Oklar: İnterlobuler mezenşim. Üçlü boyama. Bar: 200µm.



Şekil 3.2.İnkübasyonun on üçüncü gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Ok: İnterlobuler mezenşim. Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar: 200µm.



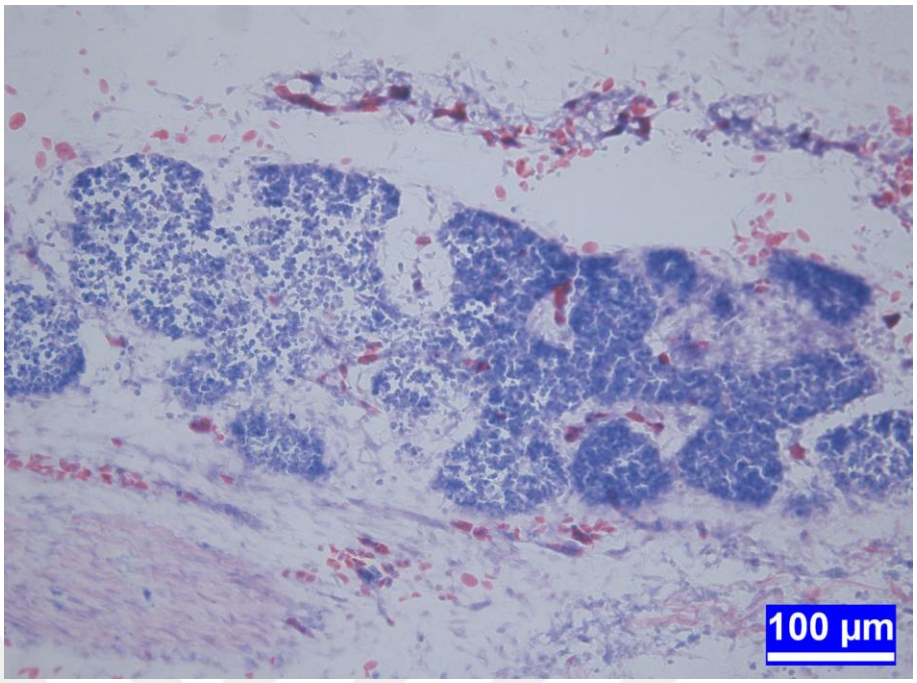
Şekil 3.3. İnkübasyonun on üçüncü gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Üçlü boyama. Bar: 200µm.



Şekil 3.4. İnkübasyonun on üçüncü gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Üçlü boyama. Bar: 200µm.

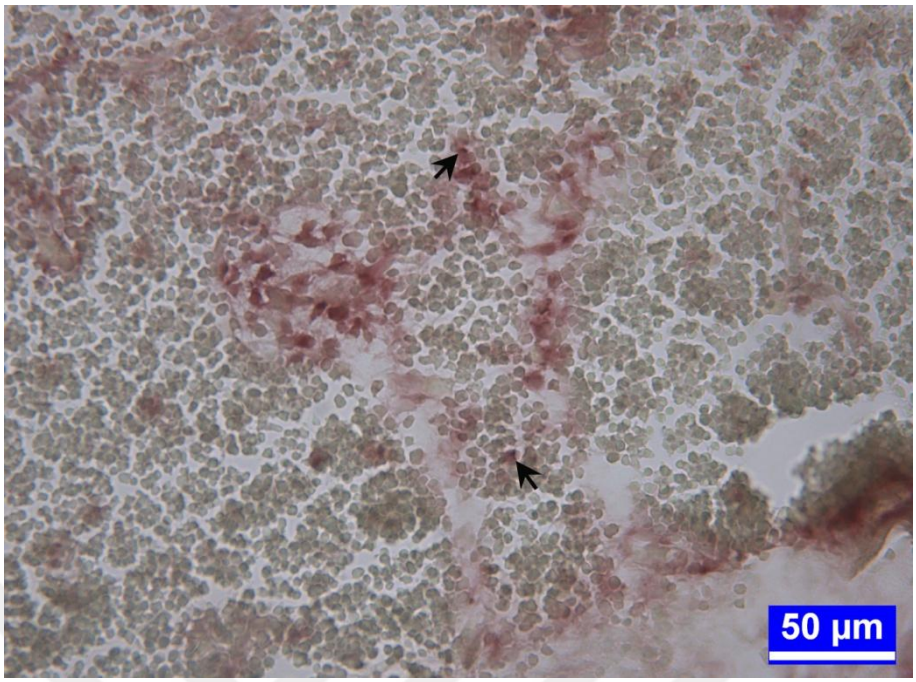


Şekil 3.5. İnkübasyonun on üçüncü gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Üçlü boyama. Bar: 200µm.

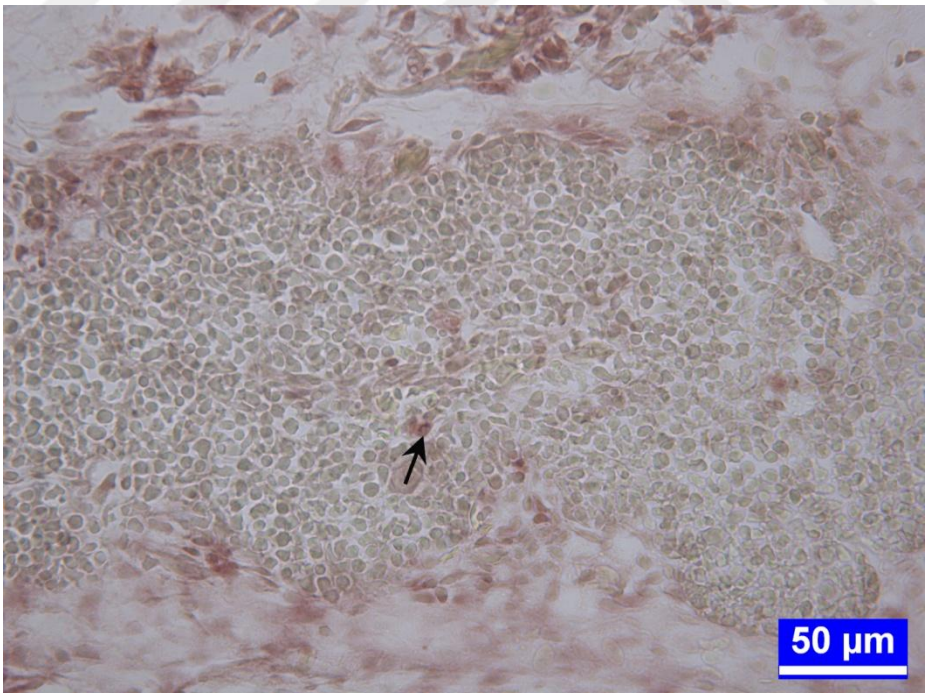


Şekil 3.6.İnkübasyonun on üçüncü gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar: 100µm.

Bu dönemde kontrol ve deney gruplarında timus dokusunda alfa -naftil asetat esteraz (ANAE) pozitivitesi gösteren ve lenfosite ait morfolojik özelliklere sahip hücrelere rastlandı (Şekil 3.7).BPA verilen gruplarda ANAE pozitif hücre yoğunluğunun kontrol gruplarına göre daha az olduğu dikkati çekti (Şekil 3.8). Aynı dönemde alınan kan örneklerinde de ANAE pozitif lenfositlere rastlandı ancak sayıca çok az oldukları için sayım yapılamadı.



Şekil 3.7. İnkübasyonun on üçüncü gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Oklar: ANAE pozitif hücreler. ANAE demonstrasyonu. Bar: 50 µm.



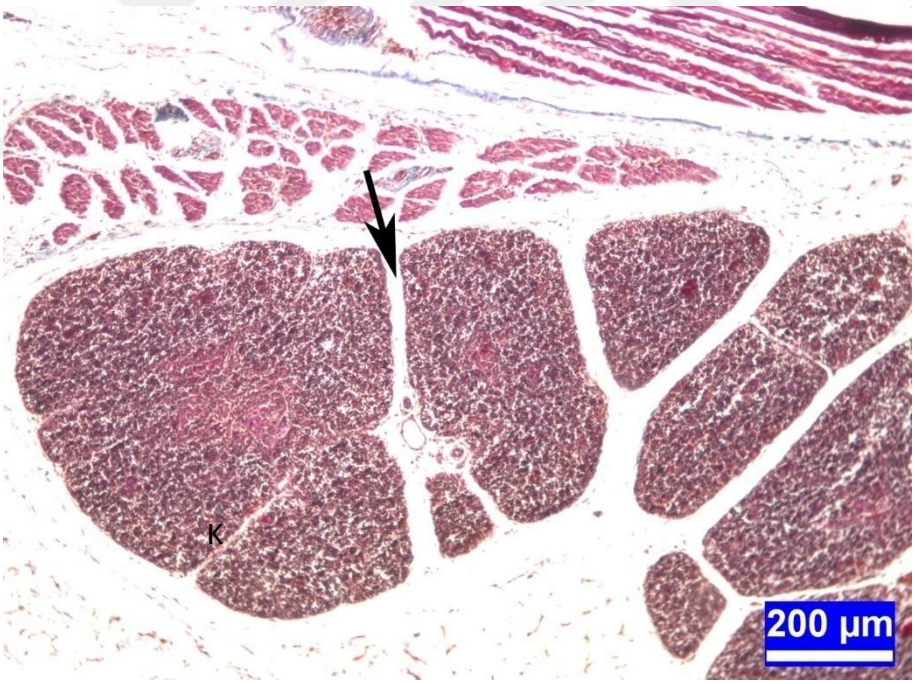
Şekil 3.8.İnkübasyonun on üçüncü gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Ok: ANAE pozitif hücre. ANAE demonstrasyonu. Bar: 50 µm.

3.2.İnkübasyonun On Sekizinci Günü

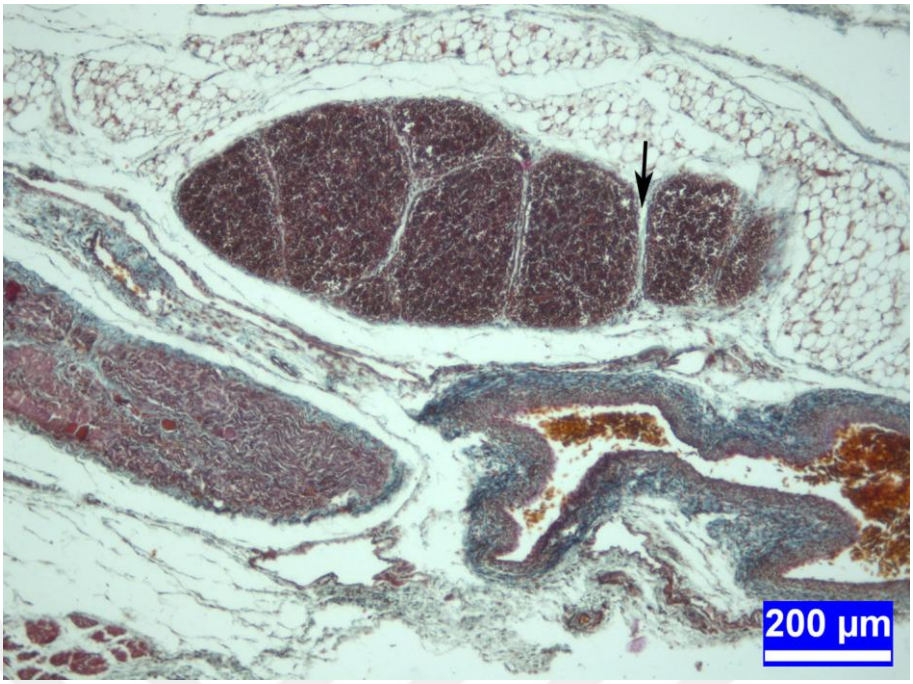
Bu dönemde timus dokusunun hem morfolojik hem de histolojik olarak gelişiminin ilerlediği görüldü. BPA verilen gruplardaki embriyolara ait timus dokusunda bu gelişimin kontrol gruplarına göre biraz geride olduğu dikkati çekti.

Timusun histolojik gelişiminin bu dönemde hemen hemen tamamlandığı, korteks ve medulla ayrımının belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 3.9). Medullada dejenere retikulum hücrelerinin oluşturduğu Hassal cisimciklerinin oluşmaya başladığı, lopların interlobuler bağ dokusu bölmelerinin genişlediği, medulladaki vaskülarizasyonun artmış olduğu ve kistik yapıların irileşerek belirginleştiği görüldü. BPA verilen gruplarda, korteks ve medulla ayırımının çok belirgin olmadığı (Şekil 3.10 ve 3.11), özellikle de 250 µg/yumurta grubunda medullada lenfosit morfolojisine sahip hücre yoğunluğunun az olduğu dikkati çekti (Şekil 3.12).

.



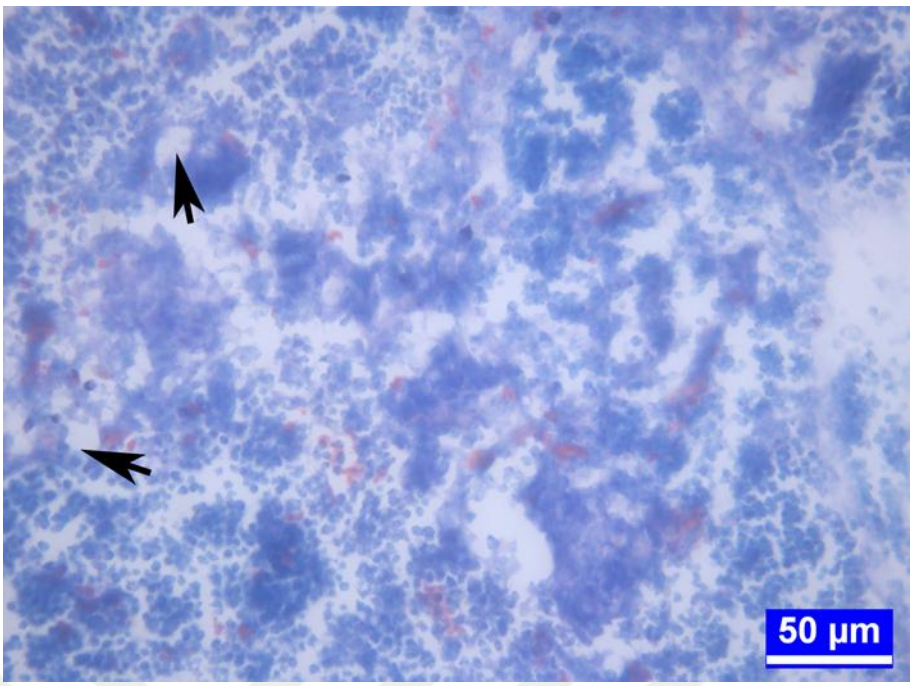
Şekil 3.9.İnkübasyonun on sekizinci gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Ok: İnterlobuler mezenşim. Üçlü Boyama. Bar: 200µm.



Şekil 3.10.İnkübasyonun on sekizinci gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Ok: İnterlobuler mezenşim Üçlü boyama. Bar:200µm.

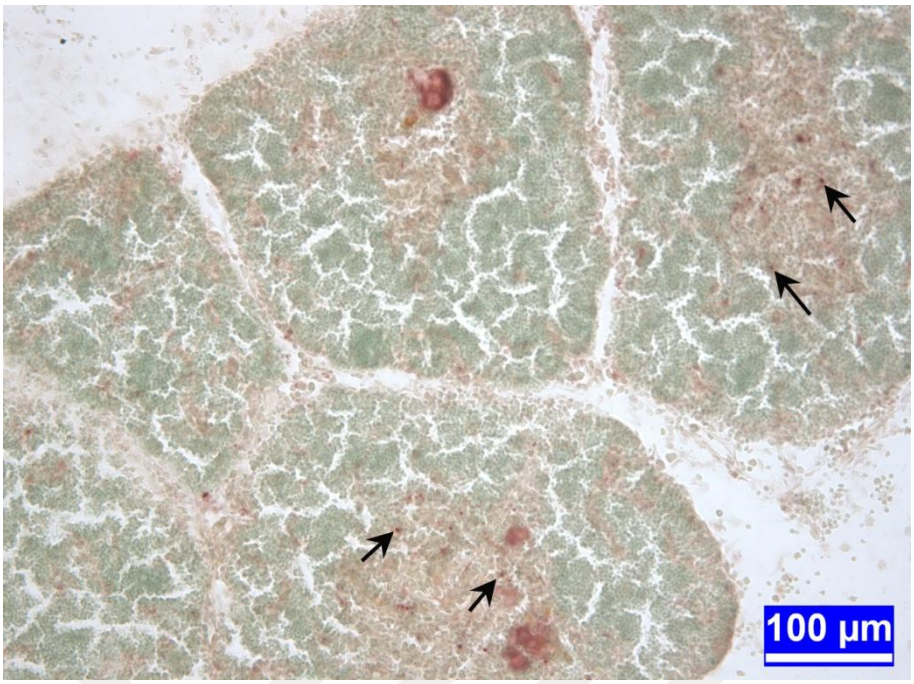


Şekil 3.11.İnkübasyonun on sekizinci gününde 100µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Ok: İnterlobuler mezenşim. Üçlü Boyama. Bar: 200µm.

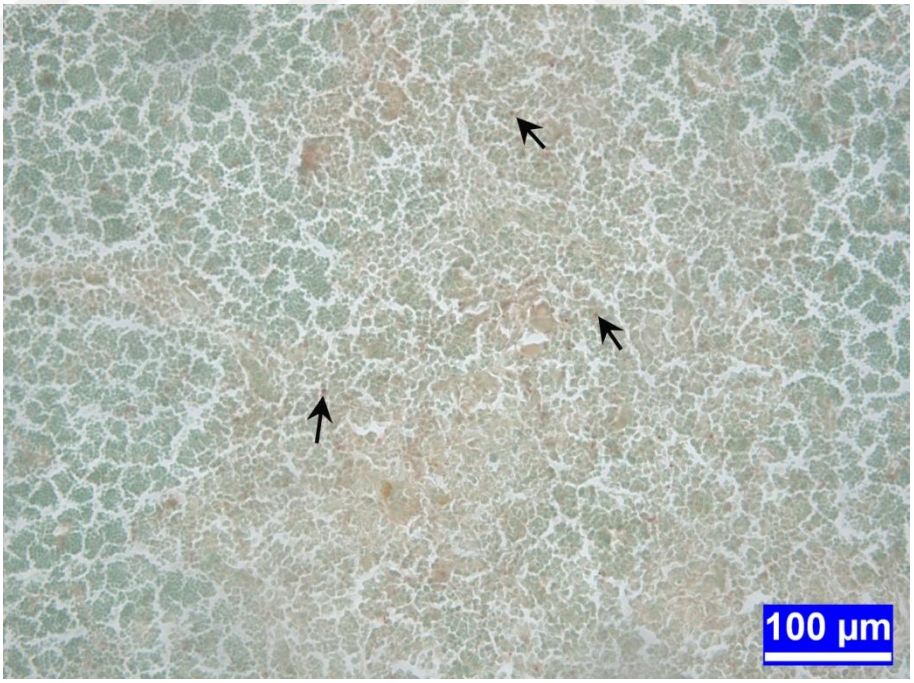


Şekil 3.12.İnkübasyonun on sekizinci gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Oklar: Medullar kistler. Pappenheim'ın panoptik boyası. Bar 50 µm.

Bu dönemde kontrol gruplarına ait timus dokusu kesitlerinin medullasında ANAE pozitivitesi gösteren ve lenfosite ait morfolojik özelliklere sahip hücrelere bir önceki döneme göre daha sıklıkla rastlandı. BPA verilen gruplarda ANAE pozitif hücre yoğunluğunun kontrol gruplarına göre daha az olduğu dikkati çekti (Şekil 3.13 ve 3.14).



Şekil 3.13.İnkübasyonun on sekizinci gününde taşıyıcı grubundan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. Oklar: ANAE pozitif hücreler. ANAE demonstrasyonu. Bar:100 µm.

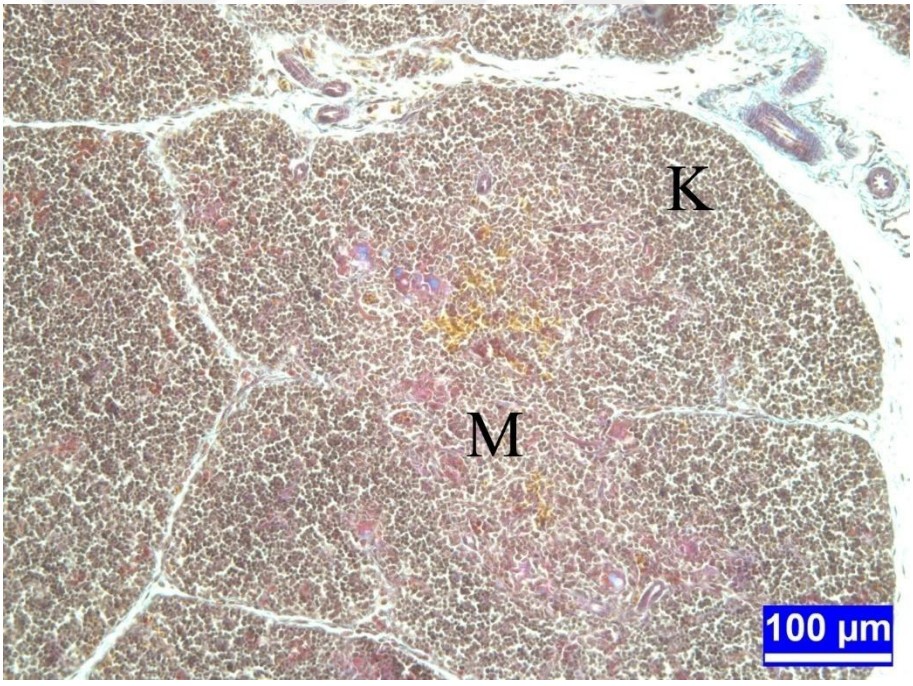


Şekil 3.14.İnkübasyonun on sekizinci gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokuskesiti. Oklar: ANAE pozitif hücreler. ANAE demonstrasyonu. Bar: 100 µm.

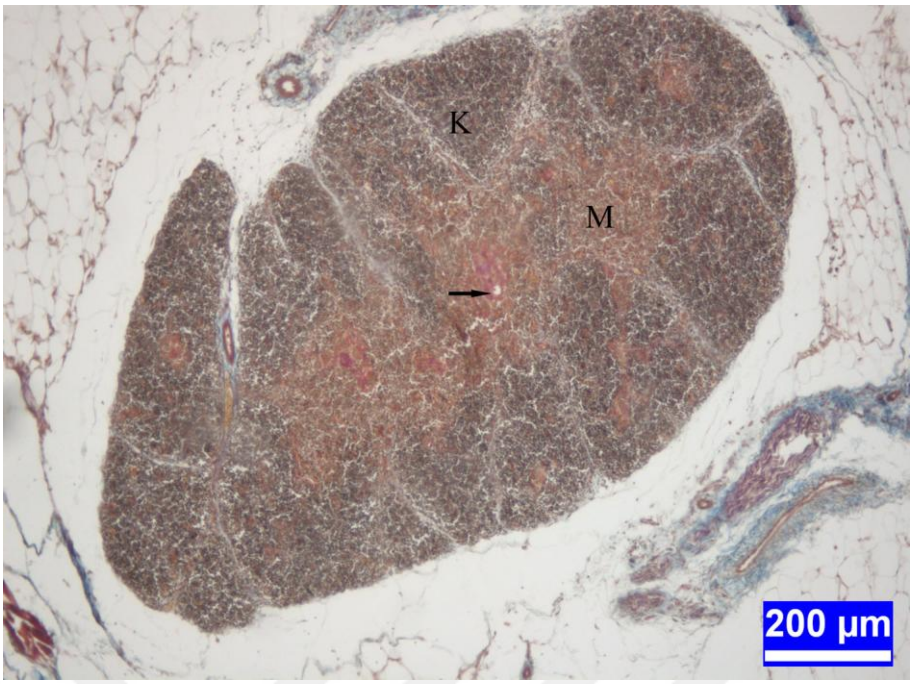
3.3.İnkübasyonun Yirmi Birinci Günü (Kuluçkadan Çıkış Günü)

Bu dönemde timus dokusunun hem morfolojik hem de histolojik olarak gelişimini tamamladığı ancak BPA verilen gruplarda timus dokusunun daha küçük olduğu dikkati çekti.

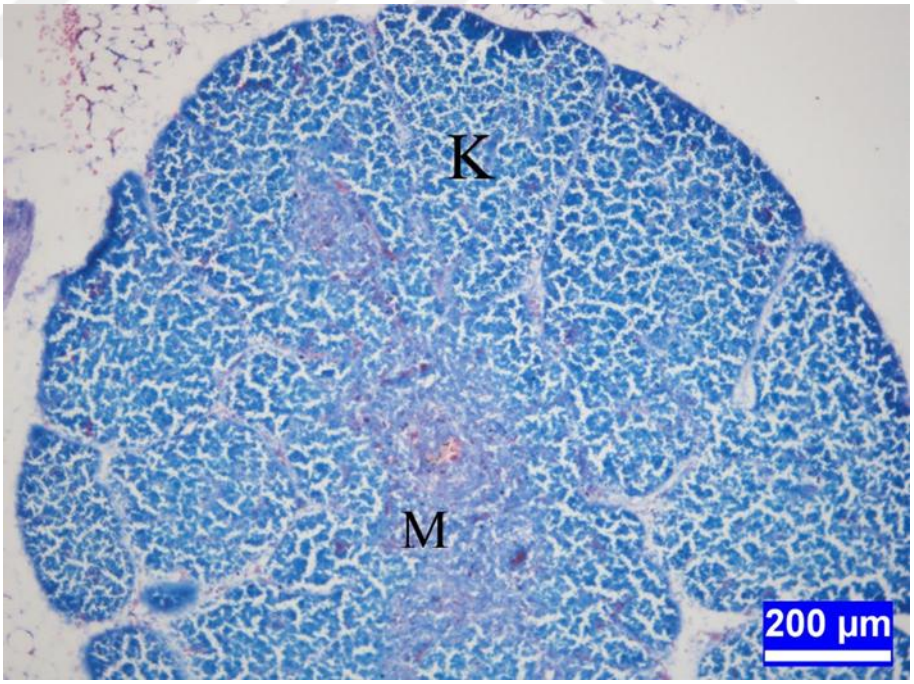
Histolojik gelişimini tamamlamış olan loplarda korteks ve medulla ayrımının iyice belirginleştiği, medulla bölgesindeki Hassal cisimcikleri ve kistik yapıların bir önceki döneme göre biraz daha genişlediği tespit edildi (Şekil 3.15). Bu dönemde apoptotik cisimcikleri fagosite etmiş olan makrofajlara (Tingible body macrophages, TBM) korteks bölgesinde sık olarak rastlandı. BPA verilen gruplarda ise 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 çekti (Şekil 3.16, 3.17, 3.18, 3.19 ve 3.20).



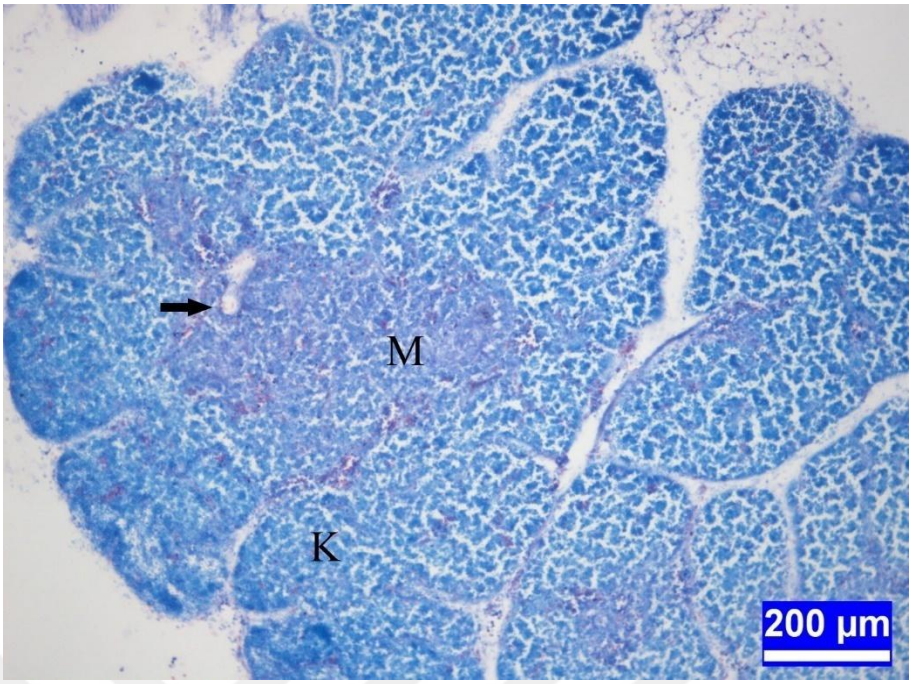
Şekil 3.15. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti. K:Korteks, M: Medulla, Üçlü boyama. Bar:100 µm.



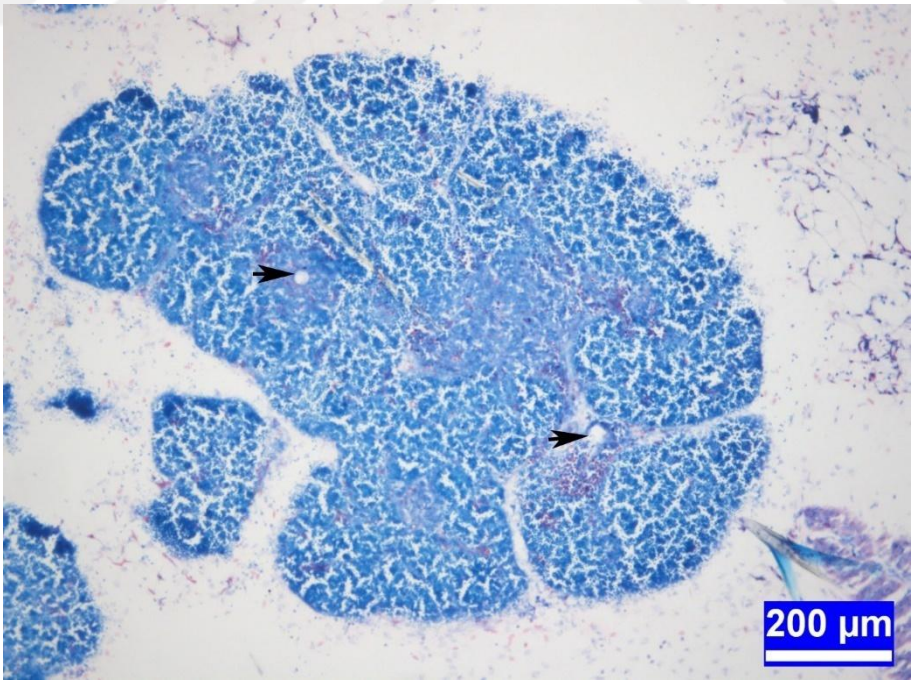
Şekil 3.16. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir embriyoya ait timus dokusu kesiti. K:Korteks, M: Medulla. Ok: Medullar Kist. Üçlü boyama. Bar 200 µm.



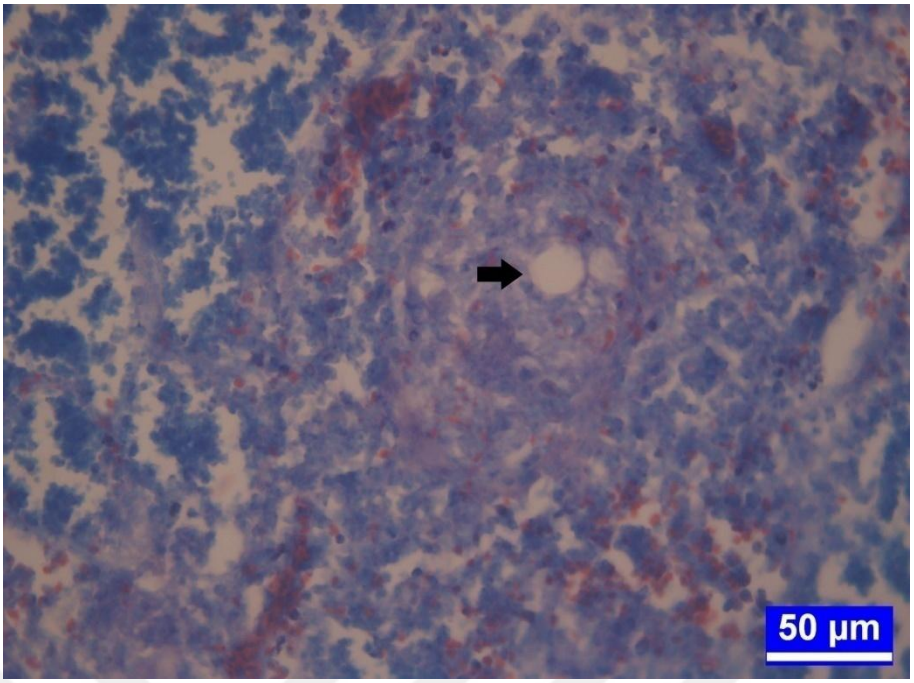
Şekil 3.17. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz kalan bir civcive ait timus dokusu kesiti. K:Korteks, M:Medulla. Pappenheim'ın panoptik boyası. Bar 200 µm.



Şekil 3.18. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. K:Korteks, M:Medulla, Ok: Medullar kistler, Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar:200 µm.

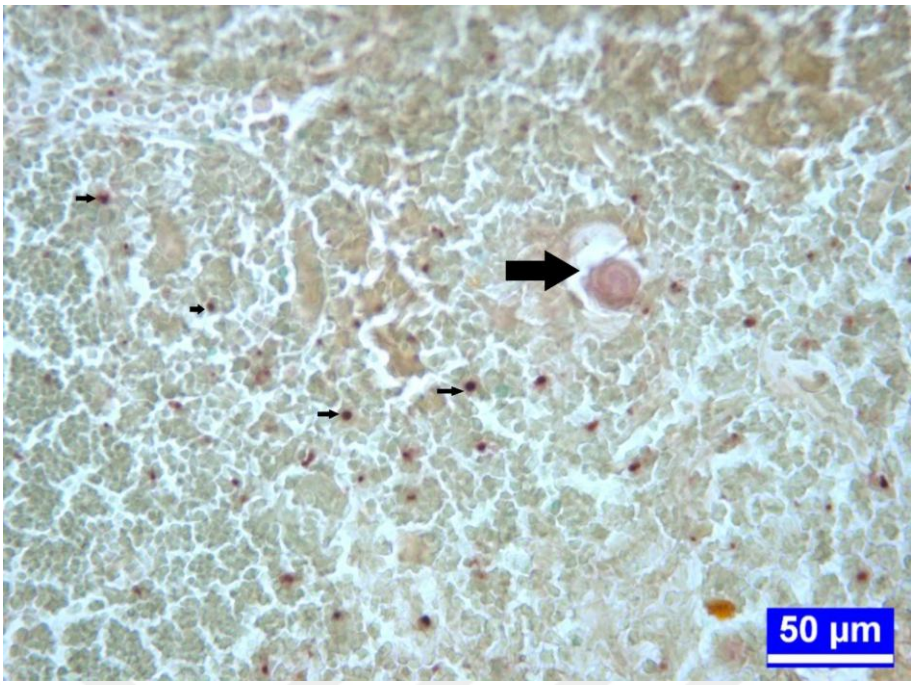


Şekil 3.19. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: Medullar kistler. Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar:200 µm.

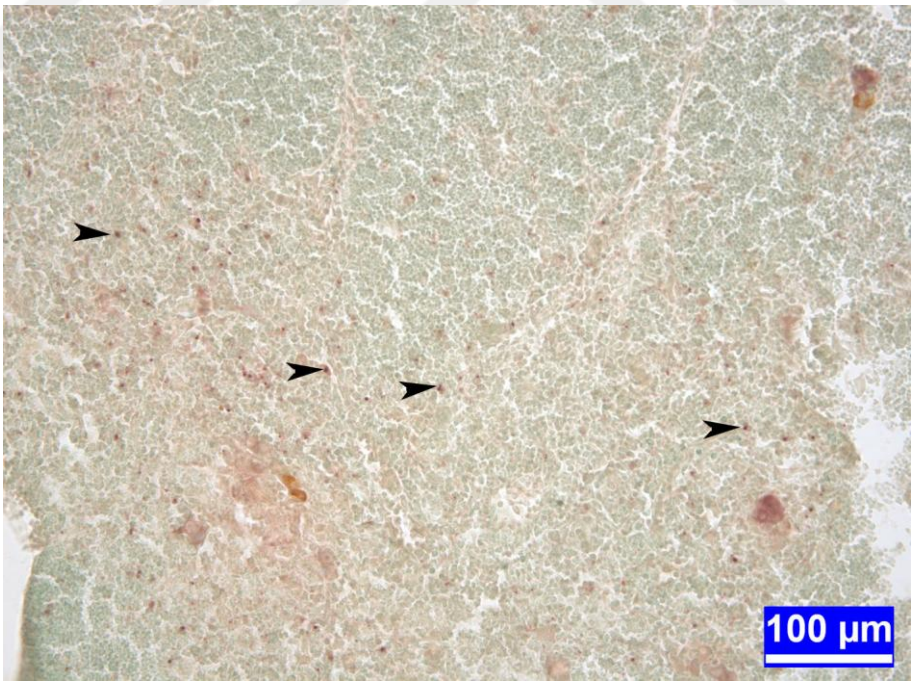


Şekil 3.20. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Ok: Medullar Kist, Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar: 50 µm.

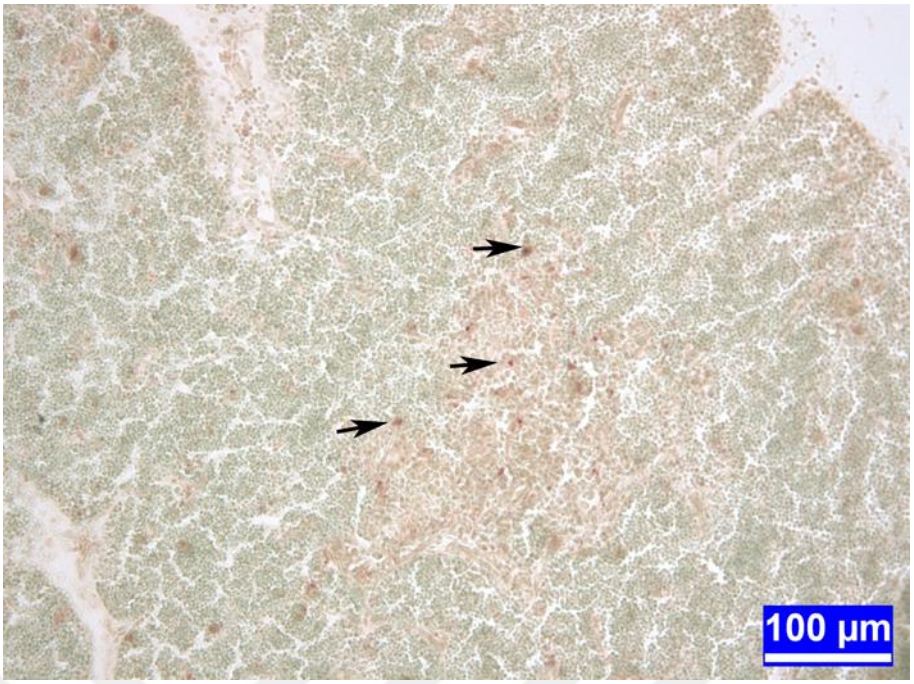
Bu dönemde kontrol gruplarına ait timus dokusu kesitlerinin medullasında ANAE pozitivitesi gösteren ve lenfosite ait morfolojik özelliklere sahip hücrelerin bir önceki dönemlere göre fazla olduğu dikkati çekti (Şekil 3.21, Şekil 3.22). Medullada sitoplazmalarında sodyum florid'e (NaF) duyarlı diffuz granüler ANAE pozitivitesi gösteren makrofaj ve retikulum hücreleri gözlendi. BPA verilen gruplarda ise ANAE pozitif hücre yoğunluğunun kontrol gruplarına göre daha az olduğu tespit edildi (Şekil 3.23, 3.24, 3.25 ve 3.26). Kan dokusunda da timus dokusundaki bulgulara benzer sonuçlar elde edildi (Çizelge 3.1.). Kontrol gruplarına göre BPA verilen gruplarda ANAE pozitiflenfosit sayısında istatistiki açıdan önemli bir azalma tespit edildi ($p<0.05$).



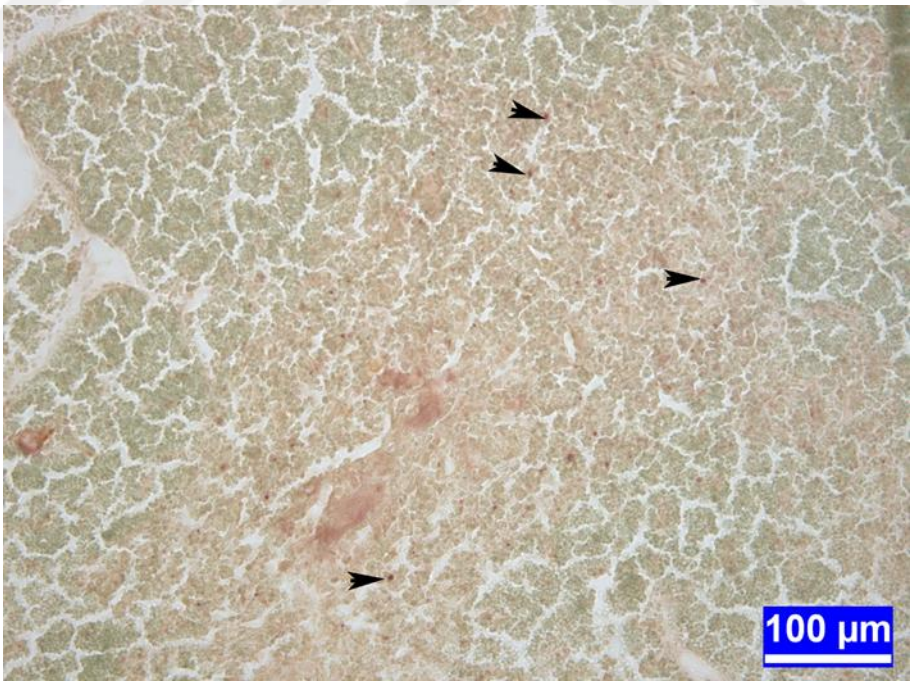
Şekil 3.21. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Kalın Ok: Hassal cisimciği, Oklar: ANAE Pozitif Lenfositler. ANAE demonstrasyonu. Bar: 50 µm.



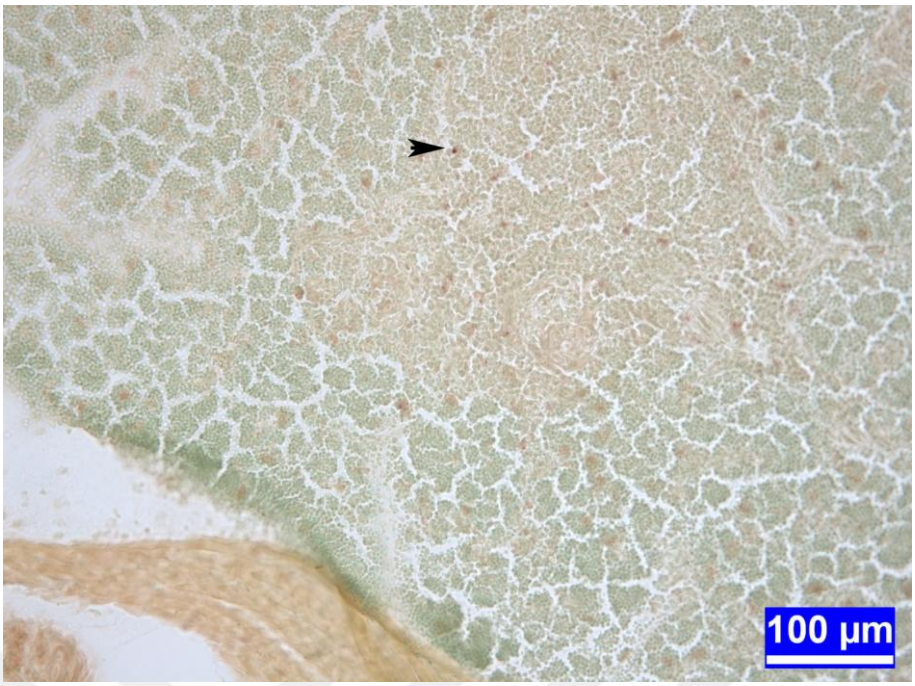
Şekil 3.22. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait timus kesiti. ANAE demonstrasyonu. Ok başları: ANAE pozitif lenfosit. NaF inhibisyonu. Bar: 100 µm.



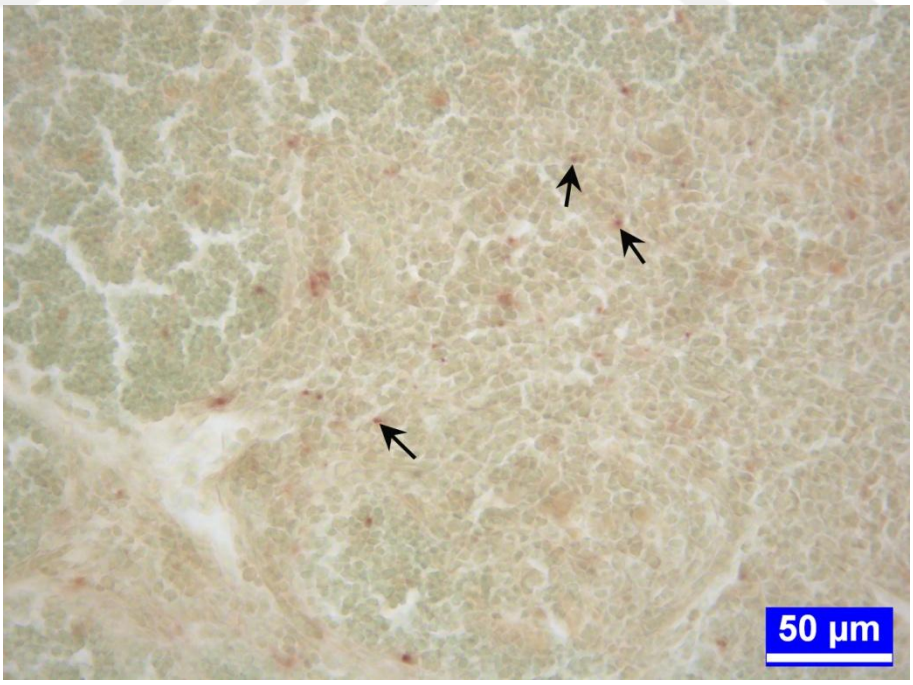
Şekil 3.23. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: ANAE Pozitif Lenfositler. ANAE demonstrasyonu. Bar: 100 µm.



Şekil 3.24. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: ANAE Pozitif Lenfositler. ANAE demonstrasyonu. Bar: 100 µm.



Şekil 3.25. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: ANAE Pozitif lenfositler. ANAE demonstrasyonu NaF inhibisyonu. Bar: 50 µm.



Şekil 3.26. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: ANAE Pozitif lenfositler. ANAE demonstrasyonu NaF inhibisyonu. Bar: 50 µm.

Çizelge 3.1. Kuluçkadan çıkışın ilk günü (21. gün) kontrol grupları ve BPA verilen gruplarda ANAE pozitiflenfosit oranları (%).

Gruplar (n=6)	ANAE pozitif lenfositoranları 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]

a-b: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiksel açıdan önemvardır($p<0.05$)

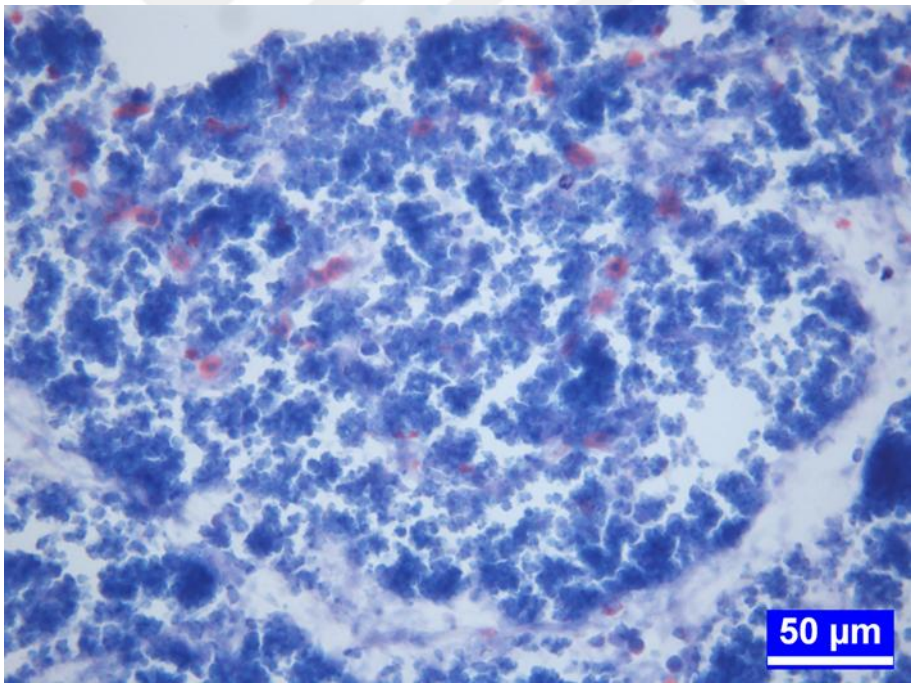
3.4. Timus Dokusunda Mast Hücreleri

Mast hücrelerine ilk olarak kuluçkanın on üçüncü gününde timus dokusunun medulla bölgesinde çok az sayıda rastlandı (Şekil 3.27). Bu hücrelerin özellikle medulla bölgesinde kan damarlarına yakın yerlerde lenfoid hücreler arasında lokalize olduğu ve sonraki dönemlerde sayıca arttığı dikkati çekti (Şekil 3.28, 3.29 ve 3.30). Korteks bölgesinde ise mast hücre yoğunluğunun çok az olduğu tespit edildi. Ayrıca interlobuler septumda ve timik lobuller arasında da bu hücrelere rastlandı. On sekiz ve yirmi birinci günlere ait mast hücre sayısı Çizelge 3.2 ‘de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi kontrol gruplarına göre BPA verilen gruplarda mast hücre sayısında istatistiki açıdan önemli bir düşüş dikkati çekti ($p<0.05$, Şekil 3.31, 3.32 ve 3.33).

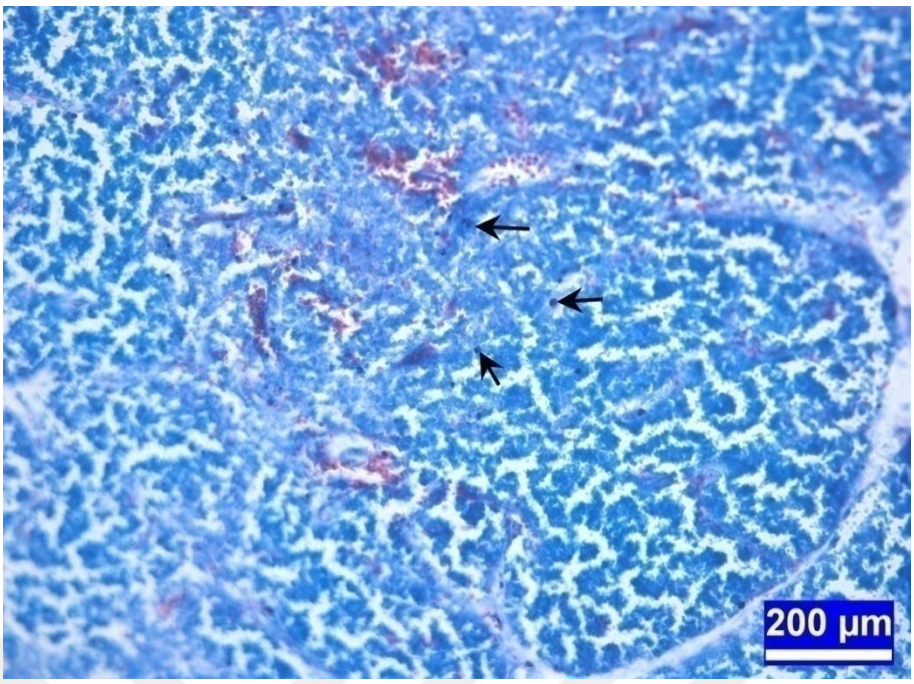
Çizelge 3.2. Embriyonik dönemin on sekiz ve yirmi birinci günlerinde kontrol grupları ve deney gruplarına ait mast hücre sayısı.

Gruplar (n=6)	18. gün x±SD	21. gün x±SD
Kontrol	4,06±0,53[a]	6,50±1,78[a]
Taşıyıcı	3,78±0,47[a]	6,41±1,86[a]
50 µg/yumurta BPA	2,38±0,79[b]	4,09±1,02[b]
100 µg/yumurta BPA	2,59±0,80[b]	3,13±0,71[b]
250 µg/yumurta BPA	2,60±0,78[b]	3,18±0,46[b]

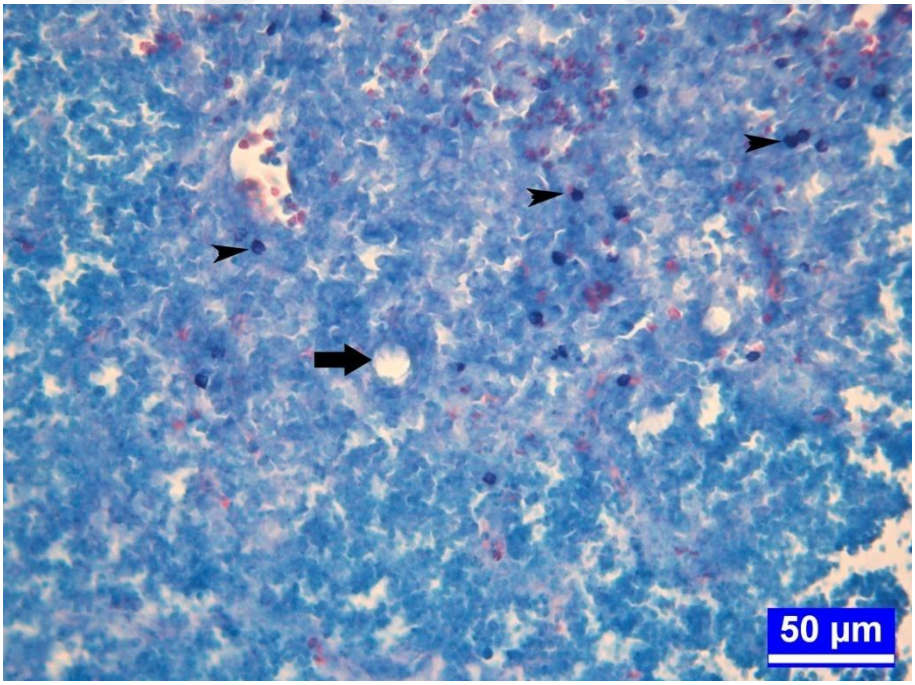
a-b: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiksel açıdan önem vardır($p<0.05$)



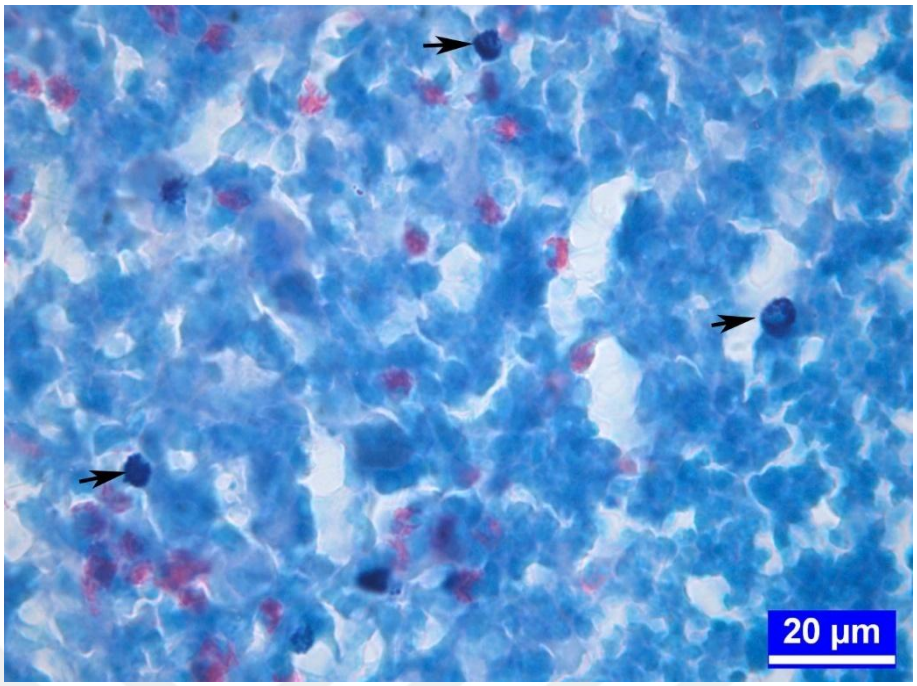
Şekil 3.27.İnkübasyonun on üçüncü gününde 100µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar:50 µm.



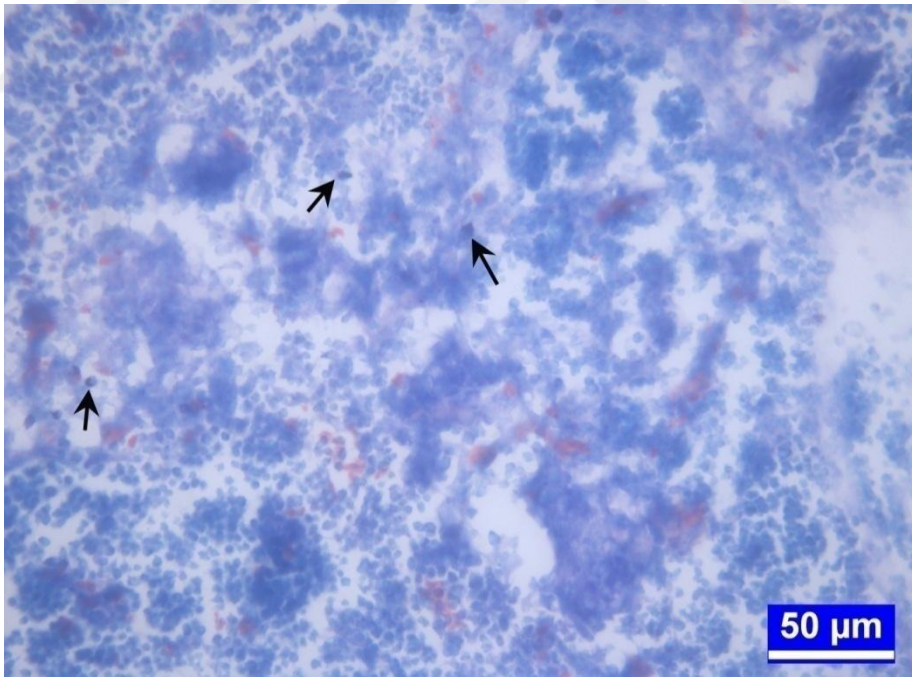
Şekil 3.28. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: Mast Hücreleri, Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar:200 µm.



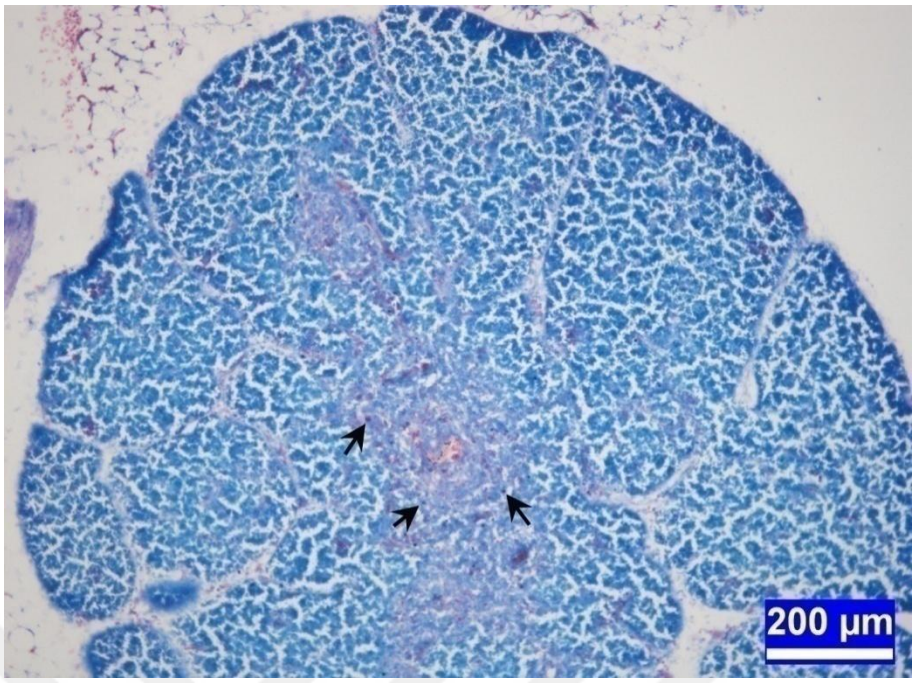
Şekil 3.29. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde taşıyıcı grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti. İnce Oklar: Mast hücreleri, Kalın Oklar: Medullar Kistler. Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar:50 µm.



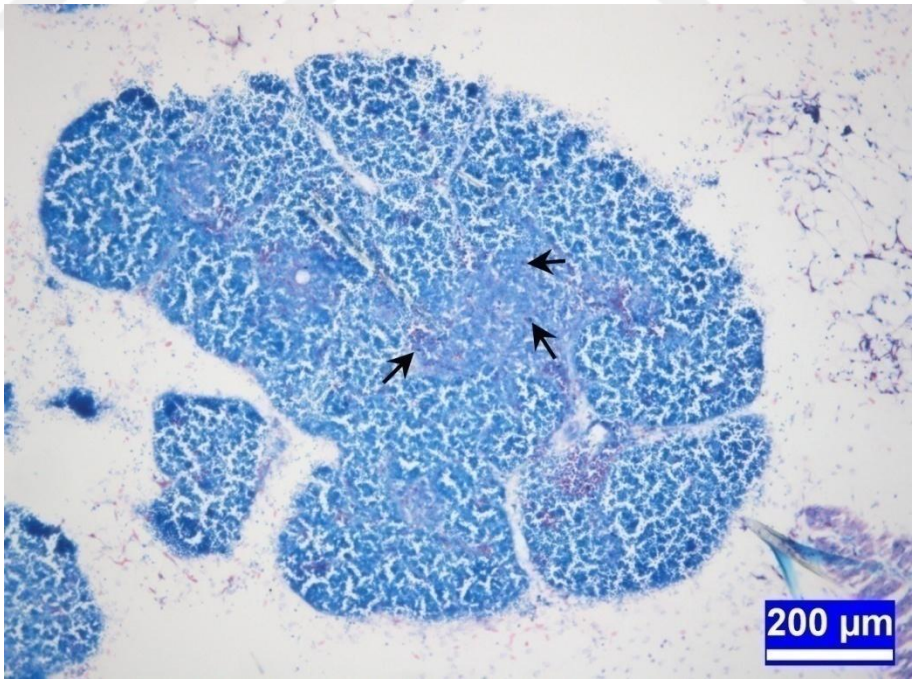
Şekil 3.30. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde taşıyıcı grubundan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: Mast hücreleri. Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar:20 µm.



Şekil 3.31. İnkübasyonun onsekizinci gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: Mast hücreleri, Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar:50 µm.



Şekil 3.32. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: Mast hücreleri. Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar:200 µm.



Şekil 3.33. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA'ya maruz bırakılan bir civcive ait timus dokusu kesiti. Oklar: Mast hücreleri. Pappenheim'ın Panoptik Boyası. Bar:200 µm.

4.TARTIŞMA

Endokrin sistem büyüme, gelişme ve metabolizma ile ilgili hayati olayların düzenlenmesinin yanısıra 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 sözkonusu sistemin sorumlu olduğu süreçleri durdurmakta ya da tetiklemektedir (Colborn ve Clement 1992, McLachan 2001, Flint ve ark 2012). İmmün sistem ve endokrin sistem arasında karşılıklı olarak bir etkileşimin olduğu ve bu etkileşimde 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, Özaydın ve ark 2016).

Yaygın kullanım alanına sahip BPA'nın çevresel konsantrasyonlarının ciddi sorunlara yol açtığı yapılan son çalışmalarla tespit edilmiştir (Allsop et al. 1997). BPA'nın plasentayı geçmesi ve yumurta sarısı ile atılmasından dolayı hem memeliler hem de kanatlılarda canlı embriyonik dönemden başlamak üzere bu maddelere maruz kalmaktadır (Ikezuki ve ark 2002, Berg ve ark 2004, Crain ve ark 2007, Flint ve ark 2012). Ikezuki ve ark (2002) yaptıkları çalışmada hamile kadınlardan farklı dönemlerde kan, kordon kanı, amniyotik sıvı örnekleri almışlar ve bu örneklerde BPA tespit etmişlerdir. Berg ve ark (2004), embriyonik dönemin erken evrelerinde östrojenik etkili maddelere maruz kalan tavuklarda yaptıkları araştırmada yumurta kabuklarının ince olduğunu ve kabuk kalitesinin de kötü olduğunu belirtmişlerdir.

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 çalışmalarında 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 patogenezinde rol aldığı, ayrıca sitokin üretimi ve T lenfosit alt tiplerinin dağılımını etkilediği bilinmektedir (Nakamura ve

Kariyazono, 2010). Östrojen biyolojik etkilerini östrojen reseprörü-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 üzereimmün sistemin birçok hücresinde östrojen reseptörünün bulunduğu bildirilmektedir (Nalbandian ve Kovats, 2005). BPA spesifik olarak ER- α ve ER- β'ya bağlanabildiği ancak hedefhücrede 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). BPA 'nın östrojen reseptörlerine bağlanma affinitesiaktif östrojen molekülü olarak bilinen 17-östradiol β'ya göre çok daha zayıftır (Wetherill ve ark 2007).

BPA'nın düşük dozlarda bile nükleer reseptörlere bağlanarak hücre ve dokuların fizyolojik fonksiyonlarını etkileyebildiği ortaya konmuştur. BPA'nın düşük dozlarının, geleneksel toksikoloji çalışmalarında sözkonusu maddenin farmasotik etkilerini ortaya çıkaran doz aralığında görülmeyen etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durum "U" ya da ters "U" şeklinde ifade edilen non monotonik ya da çizgisel olmayan doz eğrisiyle açıklanmaktadır (Wetherill ve ark 2007, Acconcia ve ark 2015). Çevre Koruma Ajansı ve Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı BPA'nın günlük tolere edilebilir alım miktarını 50 µg/kg olarak belirlemişlerdir (Clayton ve ark 2011, Liao ve Kannan 2011). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bu referans doz ve altındaki dozlara uzun süreli maruziyetin kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, genitalsistem, santral sinir sistemi ve immun sistem üzerine olumsuz etkilerinin olabileceğini göstermektedir (Nakamura ve ark 2006 ve 2007, Richter ve ark 2007, Romano ve ark 2015, Özaydın ve ark 2016).

İmmun 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 2015, Özaydın ve ark 2016). Ahmed ve ark (2015) oral olarak 150 mg/kg/gün dozunda 70 gün süreyle BPA uyguladıkları erişkin ratlarda dalak dokusunda beyaz pulpa alanları, trabeküler kan damarları ve sinuslarda genişlemenin olduğunu bildirilmişlerdir. Tian ve ark

(2014) embriyonik dönemin 9. gününde allantoise 250 µg/yumurta dozunda BPA enjekte etmiş, bursa Fabricii'nin hem ağırlığında hemde lenfatik folikül sayısında azalma, timusta ise korteks ve medulla kalınlığında kontrol grubuna göre azalma 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 (400mg) 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 (2012) embriyolu tavuk yumurtalarına 67 ve 134µg/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 kalma durumunda non spesifik doğal savunmayı azalttığını bildirmişlerdir. Menard ve ark (2014) perinatal dönemde BPA'ya maruz kalan ratlarda gıda antijenlerine karşı hücresel yanıtın bozulduğu ve bağırsak parazit enfestasyonlarına duyarlılığın arttığını ileri sürmüşlerdir. Liu ve ark (2014) BPA'ya maruz kalan insan makrofaj hücreleriyle yaptıkları çalışmada pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF-α ve IL-6) ekspresyonunda artış ve anti-inflamatuar sitokinlerin (TGF-β ve IL-10) ekspresyonunda ise düşüş gözlemlemişlerdir. Yapılan laboratuvar çalışmaları göstermektedir ki BPA, IL-4 üretimi ve IgE düzeyini artırarak allerji gelişimine yol açabilmektedir (Lee ve ark 2003, Chalubinski ve Kowalski 2006, Clayton ve ark 2011). Özaydın ve ark (2016) 5, 50 ve 500µg/kg/gündozunda oral yolla ratlara verilen BPA'nın lenfoid dokuların histolojik yapılarında değişikliklere yol açmadığını ancak bazı plazma sitokin düzeyleri (IL-4, IL-6 ve TNF-α) ile dalak ve sindirim sisteminin lenfoid dokusuna ait T-lenfosit alt popülasyonu ve dalakta MHC pozitif hücre dağılımını etkilediğini bildirmişlerdir.

BPA'nın immun sistem üzerindeki etkileriyle ilgili çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıkların araştırmalarda kullanılan hayvanların türünden, BPA'ya

maruz kalınan dönemden, maruz kalınan miktardan, süreden, uygulama şeklinden ve BPA'nın bifazik doz etkisinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Le Corre ark 2015).

Yapılan bu çalışmada da döllü tavuk yumurtasına 50µg, 100µg ve 250 µg/yumurta dozlarında BPA yumurta sarısına enjekte edilmiş ve timusun embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kontrol gruplarında timusun embriyonik gelişiminin, daha önceki araştırıcıların bulgularıyla uyumlu olduğu belirlendi (Sandıkçı ve Çelik 2000, Sur ve Çelik 2005). Ancak deney gruplarında timusun embriyonik gelişiminin geri kalmış olduğu dikkati çekti. Özellikle 250 µg/yumurta dozunda BPA uygulanan grupta timus loplarının gelişimindeki gerilemenin daha belirgin olduğu tespit edildi. Aynı zamanda BPA verilen gruplarda lenfoid dokunun daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu ve ANAE pozitif lenfositlerin sayıca azaldığı dikkatiçekti. Dokudaki bu bulgularla uyumlu olarak perifer kan ANAE pozitif lenfosit oranlarının da kontrol gruplarına göre BPA gruplarında önemli oranda düştüğü tespit edildi ($p<0.05$, Çizelge 3.1).

Kanatlı embriyoları fiziksel ve kimyasal maddeler, ilaçlar, toksinler ve endokrin bozucular gibi günlük yaşamda sıklıkla karşılaşabileceğimiz bazı ajanların embryotoksik, 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) döllü tavuk yumurtalarının kullanıldığı ve Tavuk Embriyo Toksisitesi 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 değerin, 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 sayısınıve 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).

CHEST'te elde edilen sonuçların istatistiki açıdan güvenilir olması için her doz grubunda kullanılan yumurta sayısı önemlidir. Yapılan birçok çalışmada her grup için 20 yumurtanın yeterli olacağı bildirilirken (Verret ve ark 1964, Kemper ve Leupke 1986, Prelusky ve ark 1987), BPA' ile yapılan çalışmalarda 20-80 arasında yumurta kullanıldığı görülmektedir (Berg 2000, Yiğit ve ark 2013, Kandil 2016). Bu çalışmada da BPA'nın dozuna bağlı olarak artan sayılarda her bir grup için 45-85 adet yumurta kullanılmıştır.

Döllü tavuk yumurtalarının kullanıldığı çalışmalarda, test edilecek etken maddelerin yumurtaya veriliş yolları üzerinde farklı görüşler vardır. Uygulama kolaylığı, verilen solüsyonun hızlı bir şekilde diffüze olması, yumurtaların enfekte olma riskinin en düşük düzeyde olması ve diğer yöntemlerde meydana gelebilecek yumurta içi basınçtaki artışın embriyoda meydana getirebileceği mekanik hasarları ortadan kaldırdığı için bir çok çalışmada hava kamarasına enjeksiyon ile uygulama yönteminin tercih edildiği görülmektedir (Stoloff ve ark 1972, Kemper ve Luepke 1986, Sur ve Celik 2003, Öznurlu ve ark 2012). Ancak Drake ve ark (2006) ve Verret ve ark (1964) yumurta sarısına enjeksiyon yöntemi ile embriyoya verilen zararın en aza indirgendiği ve test edilecek etken maddenin en homojen dağılımının gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir. Etken maddenin veriliş yolu belirlenirken etken madde ve taşıyıcı olarak kullanılan maddelerin kimyasal yapılarının da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Berg ve ark (1999) yumurta sarısının kanatlının almış olduğu lipofilik maddelerin atılım yolu olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle lipofilik ve hidrofilik maddelerin yumurta sarısında homojen dağılım göstereceği ve emileceği ifade edilmiştir (Berg ve ark 1999). Ayrıca yumurta sarısı bir dereceye kadar memelilerdeki plasentanın karşılığı olarak görev yapmakta, yavrunun temel besin kaynağı olarak işlev görmektedir (Bauer ve ark 2013). Kuluçkadan çıkmadan kısa bir süre öncede yavrunun karın boşluğu içerisine çekilen yumurta sarısı, kuluçka sonrası birkaç gün yavrunun besin ihtiyacını karşılamaktadır (Bhanja ve ark 2009). Bu sebeplerden dolayı özellikle gebelik boyunca anneden yavruya geçen maddelerin embriyotoksik etkilerinin test edileceği CHEST yöntemi kullanılacaksa yumurta sarısına enjeksiyon tercih edilmesidaha uygundur. Bu çalışmada da taşıyıcı madde ve

BPA içeren solüsyonların verilmesi yumurta sarısına enjeksiyon yöntemi ile gerçekleştirildi.

CHEST yönteminin kullanıldığı çalışmalarda etken maddenin çözdürülmesinde kullanılan taşıyıcı maddenin içeriği, oluşturulan doz grupları ve etken maddenin hacmi oldukça önemlidir. Berg (2000) ve Özaydın ve ark (2016) BPA'nın yağda ve suda zor çözünen bir madde olmasından dolayı ilk olarak alkolde çözdürülmesinin, ardından fıstık yağı ve lesitin ilavesi ile bir emülsiyon hazırlanmasının uygun olduğunu bildirmişlerdir. Hazırlanan bu emülsiyonun yağ içeriğininin yumurta sarısına çok benzer olmasından dolayı homojen dağılımın sağlanmasında etkili olacağı ileri sürülmüştür (Berg 2000).

Yumurtaya enjekte edilen test solüsyonlarının hacmi yapılan birçok çalışmada 20-100 µl arasında değişiklik göstermektedir (Berg 2000, Yiğit ve ark 2013, Berktay 2014, Öznurlu ve ark 2014, Kandil 2016). Bu çalışmada da yumurta sarısına test solüsyonları 100 µl hacminde enjekte edilmiştir.

Embriyotoksisite çalışmalarında test edilecek maddelerin etkilerinin belirlenebilmesi için farklı dozlar gerekmektedir. Verrett ve ark (1964) her solüsyon için en az 2 farklı doz önerirlerken, Brown ve ark (1986) ise en az 3 farklı dozun denenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Jelinek (1977) etkili dozu tespit edebilmek için etkisiz en yüksek doz ile etkili en düşük doz arasındaki dozların tercih edilmesi gerektiğini bildirmektedir. Yiğit ve ark (2013) BPA'yı 67 ve 134µg/g yumurta dozunda yumurta sarısına enjekte ederken, Tian ve ark (2014) ise 250 µg /yumurta BPA'yı allantoik boşluğa enjekte etmişlerdir. Yapılan bu çalışmadada BPA'nın düşük, orta ve yüksek (50, 100 ve 250 µg/yumurta) üç farklı dozu kullanılmıştır.

Kanatlılarda primer lenfoid organlardan biri olan timus hücresel immunolojik yanıttan sorumlu bir organdır (Aita ve ark 2007). Embriyonik gelişimi sırasında, T hücre öncülleri çeşitli retiküloepitelyal hücreler ve timik mikro çevreyi oluşturan hümoral faktörler tarafından işlenmektedir. Timus dokusu kanatlılarda da organogenezis boyunca mast hücre gelişiminin bir bölgesidir. Bu hücreler esas olarak timik lobullerde, timositler ve timik epitelyal hücreler arasında, çoğunluklada medulla bölgesinde bulunurlar. Farklı türlerde embriyogenezis sürecinde intratimik mast hücrelerinin miktarında bir değişkenlik olduğu bildirilmiştir (Bodey ve ark

1998, Crivellato ve ark 2005). Organın gelişmesi esnasında görülen mast hücrelerinin hematopoezisle ilişkili olduğu düşünülmüş, bununla birlikte mast hücre degranülasyonunun ultrastrüktürel özellikleri ve mast hücresi ile ekstraselüler matriks arasındaki yakın ilişkinin timusun organogenezisi sırasında farklı bir görevinin olduğu konusuna dikkat çekmiştir. Mast hücreleri, interlökin (IL) -1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 ve IL-7 benzeri sitokinleri ile timosit apoptozisini önleyen, timosit ve timik epitelyal hücre fonksiyonlarını stimule eden tümör nekroz faktörü (TNF α), granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) gibi geniş bir büyüme faktörü peptidlerini sentezleyip serbest bırakırlar (Durkin ve Waksman 2001, Stampachiacchiere ve ark 2004, Soumelis ve Liu 2004, Ribatti ve Crivellato 2016). Bu nedenle mast hücreleri embriyonik dönem boyunca timik hücreler için zengin bir sitokin kaynağıdır. Ayrıca fibroblast aktivitesini ve bağ dokusu matriks birikimini uyaran fibroblast büyüme faktörü-2 'yi (FGF-2) de üretmektedirler (Gruber ve ark 1997, Artuc ve ark 2002). Mast hücreleri matriks ile ilişkili sitokinlerin mobilizasyonu ve bağ dokusu yıkımlanmasına/bozunumuna (degradation) sebep olan matriks metalloproteinazlar üzerinde etki gösteren serin proteazları da serbest bırakırlar. Böylece, mast hücreleri erken organogenezis sırasında timusun ekstraselüler matriksinin yeniden oluşmasında hala belirlenemeyen bir rol oynamaktadırlar. Timik matriksinin yapısı hemapoietik prekürsör hücrelerin gidecekleri bölgeleri, timosit göçü ve farklılaşmasını da etkilemektedir (Savino ve ark 2002). Timik medulla'daki mast hücrelerinin yoğunluğu ve dentritik hücrelere yakın yerleşimi "kendine" ait yapılara karşı tolerans indüksiyonu mekanizmaları ile ilgili en son görüşlerin ışığında daha fazla bir görevinin olduğunu akla getirmektedir. Genellikle timik medullanın T hücrelerinin negatif seleksiyonu (otoreaktif T-hücre klonlarının silinmesi) ve immünolojik "merkezi" toleransın indüksiyonu için asıl yer olduğu (Sprent ve Kishimoto 2002) kabul edilmektedir. Timus medullası Hassal cisimciği gibi diğer dokulardaki organizasyon, morfoloji ve fonksiyonel aktiviteyi sergileyen sabit hücre grupları içermektedir. Buna ek olarak, timik medulla'nın, paratiroid hormonu, tiroglobulin, insülin, nöropeptidler, nöroendokrin markırlar, amilaz I, C-reaktif protein gibi ektopik, dokuya spesifik kompleks moleküllerini ifade eden timik epitelyal hücrelerin (medüller timik epitel hücrelerinin % 1-5'i) heterojen popülasyonunu içermektedir. Bu yüksek karakteristik mikroanatomi ve fenotipik ekspresyonun timusta periferik toleransın korunmasında (immünolojik homunculus) görev alabileceği gibi merkezi tolerans ve organa spesifik otoimmunite

duyarlılığında da etkili olduğu hipotezi ileri sürülmüştür (Klein ve Kyewski 2000).Timik mast hücrelerinin granüllerinde depo edilmiş antijenik materyalin interdigital hücrelerin yüzeyine doğrudan salınması yoluyla tolerans mekanizması sürecini aktive edebileceğini bildirilmişdir (Crivellato 2004).

Karaca ve ark (2006 ve 2010) kanatlılarda lenfoid organlarda mast hücrelerinin varlığını ve yaşla birlikte bu sayının değiştiğini ve bu hücrelerin timus dokusunda medullar bölgede kortikal bölgeye göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Ribatti ve Crivellato (2016) kanatlı timusunda mast hücrelerinin medulla, kapsül, interlobuler septum ve timik lobuller arasındaki bağ dokuda yerleşim gösterdiğini ve yetişkinlerde embriyoya göre sayısının fazla olduğunu bildirmişlerdir. Amin ve ark (2012) mast hücrelerinin akut bir inflamatuvar cevap başlatarak atopik astım ve diğer alerjik hastalıkların gelişmesinde kritik bir rol oynadığını bildirmektedir. Yapılan çalışmalar BPA'nın mast hücre aktivasyonunu artırabileceğini göstermektedir (Shim ve Lim 2009, Lee ve Lim 2010,Lee ve ark 2012, O'Brien ve ark 2014). Bu çalışmada ise embriyonik dönemde maruz kalınan BPA'nın timus dokusundaki mast hücreleri üzerinde olumsuz bir etkisinin olduğu, BPA verilen gruplarda mast hücre sayısında istatistiki açıdan önemli bir azalma olduğu dikkati çekti ($p<0.05$, Çizelge 3.2). Mast hücrelerinin yerleşiminin özellikle medullada olduğu, interlobuler septumda ve timik lobuller arasında da rastlandığı görüldü. Embriyonik dönemdeki mast hücrelerinin organın yapısal ve antijenik heterojenitesinin devamlılığında katkısı olabileceği ve muhtemelende mast hücre yüzeyindeki antijenlere (antijenlerin yanında salgı granüllerinde depolanan ve salınan granüllerdeki sayısız moleküle) karşı immunolojik tolerans sürecini uyardığı düşünülmektedir. Bu nedenle embriyonik dönemde maruz kalınan BPA'nın hayatın ileri zamanlarında görülebilecek otoimmun hastalıklarada predispoze edici bir faktör olabileceğini akla getirmektedir. Bundan sonra embriyonik dönemde timus dokusu üzerinde yapılacak çalışmalarda mast hücre gelişimi ve heterojenitesinin daha detaylı olarak çalışılmasının klinik yönden önemli olacağı sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bisfenol A (BPA), günlük hayatta sık olarak karşılaştığımız ve dünya genelin de de üretimiyüksek olan endokrin bozucu kimyasallardan birisidir. Kuluçka başlangıcında döllü tavuk yumurtasına farklı dozlarda enjekte edilen bu maddenin primer lenfoid organlardan biri olan timus dokusunun embriyonik gelişimini baskıladığı, ANAE-pozitif T lenfosit ve mast hücre sayısınıda düşürdüğü gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler BPA gibi endokrin bozucu kimyasallara özellikle prenatal ve postnatal dönemde maruz kalan canlıların üreme sistemi, solunum sistemi, sinir sistemi ve immun sistemlerinde morfolojik ve fonksiyonel bozuklukların ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı BPA'nın günlük tolere edilebilir dozunu 5 µg/kg'a düşürmek için çalışmalarını sürdürmektedir. Ancak yapılan çalışmalardan ve bu çalışmanın sonuçlarındanda anlaşılmaktadır ki BPA'nın düşük dozları da biyolojik sistemler üzerine oldukça etkilidir. Bu nedenle BPA kullanımı ile yapılacak yasal düzenlemelerin yeniden gözden geçirilmesi gerekmektedir. Ayrıca söz konusu kimyasalın immün sistem üzerindeki etkilerinin detaylı olarak bilinmesi son yıllarda özellikle çocuklarda görülen allerjik hastalıklar ve otoimmun hastalıkların oluşum mekanizmasının açıklanmasına da katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

6.KAYNAKLAR

Allsopp M, Santillo D, Johnston P, 1997. Impacts of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife and Human Health.

Ablin RJ, Bruns GR, Guinan P, Bush IM. The effect of estrogen on the incorporation of H-thymidine by PHAstimulated human peripheral blood lymphocytes. J Immunol 1974; 113:705–10.

Abou-Rabia N, and Kendall M.D. (1994). Involution of the rat thymus in experimentally induced hypothyroidism. Cell Tissue Res. 277: 447-455.

Abastado JP, 1996. Apoptosis: function and regulation of celldeath, Res. İmmunol, 147, 443-456.

Acconcia F, Pallottini V, Marino M, 2015. Molecular mechanisms of action of BPA. Dose-Response:

An International Journal, 13, 4, 1-9.

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.

Aita M, Carafelli E, Alfei L, Caronti B. Thymic development in surgically bursectomized embryonic chicken: expression of PCNA, CD3, CD4 and CD8 markers European Journal of Histochemistry 2007; vol. 51 issue 4 (October-December):241-250.

Allen PD, Bustin SA, Newland AC, 1993. The Role of Apoptosis(Programmed Cell Death) in Haemopoiesis and TheImmuneSystem, Blood Reviews, 7, 63-73.

Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. Resp Med. 2012; 106:9–14.

Anderson G, Jenkinson EJ, 2001. Lymphostromalinteractions in thymicdevelopment and function. Nat Rev. Immunol. 1,31-40.

Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, Diker KS, 1994. İmmunoloji. 1.baskı, Medisan Yayın Evi, Ankara, p.119-150,7.

Artuc M, Steckelings M, Henz BM (2002).Mast cell-fibroblast interactions: human mast cells as source and inducer of fibroblast and epithelial growth factors. J Invest Dermatol 118:391–395.

Bahadır A, 2011. Ratlarda uzun dönem bisphenol a kullanımı üzerine alfa tokoferol ve alfa lipoik asitin etkileri. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayız Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun.

Bockman DE, Cooper MD, 1973.Pinocytosisbyepitheliumassociatedwithlymphoidfollicles in the bursa of fabricius, appendix, and Peyer'spatches. An electronmicroscopicstudy. Am J Anat 136, 455-478.

Barbini A, Gheri Bryk S, Balboni CG (1981) Behaviour of thymus mast cells in the rat under various experimental conditions. Boll Soc It Biol Sper 57: 645–650.

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

Benoist C, Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. Nature 2002; 420:875-878.

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

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

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

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

Berktay EA (2014). Sunset yellow FCF'nin tavukların timus ve Bursa Fabricii'sinin embriyonik gelişimi üzerindeki etkisinin histolojik ve enzimhistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, KONYA.

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

Bigaj J, Urbanska-Stopa M, Plyrycz B (1991).Argentaffin mast cells in the thymus of the frog. Folia Histochem Cytobiol 29: 45–47

Bin X, Naiyun G., Min R., Hong W. and Haihui W. 2007. Degradation of endocrinedisruptor bisphenol A in drinking water by ozone oxidation. Front. Environ. Sci. Engin. China, 1(3), 350–356.

Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE (1998) Intrathymic non-lymphatic hematopoiesis during mammalian ontogenesis. In Vivo 12: 599–618.

Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, Leveque M, Martin PG, Theodorou V, Fioramontia J, Houdeau E, 2010. Impact of oral bisphenol a at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. Pnas, 107(1), 448-53.

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

Bockman DE, Cooper MD, 1973.Pinocytosisbyepitheliumassociatedwithlymphoidfollicles in the bursa of fabricius, appendix, and Peyer'spatches. An electronmicroscopicstudy. Am J Anat 136, 455-478.

Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Jr LEG, Hayward SW, Lees PSJ, McIntyre BS, Portier KM, Schnorr TM, Selevan SG, Vandenbergh JG, Woskie SR, 2008. NTP-CERHR Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol a. Birth Defects Research (Part B), 83, 157–395.

Chalubinski M, Kowalski ML, 2006. Endocrine disrupters – potential modulators of the immune system and allergic response. Allergy, 61, 1326–35.

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, 390–96.

Colborn T. and Clement C, 1992. Chemically-induced alterations and fuctional development: The Wildlife / Human connection.Princeton Scientific Publishing Co., Inc., NJ. 403 pp.

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

Crivellato E, Nico B, Ribatti D. Endocrine-like cells in the chick embryo thymus express ultrastructural features of piecemeal degranulation. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2005; 282(2): 106-109.

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

Çelik İ, Aştı RN, Ergene N. İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immünoglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. SÜ Tıp Fak Derg.1991; 7: 497-503.

Demir R, Histolojik Boyama Teknikleri. Palme Yayıncılık. Ankara, 2001.

De Rosa C, Zichter P, Pohl H. And jones D. E, 1998.Environmental exposures that affect the endocrine system: public health implications. J. Toxicol. Environ. Health, 1: 3-26.

Diker KS, 1998. İmmunoloji. 1. Baskı. Ankara, Medisan Yayın Serisi, p. 33-4.

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

Durkin HG, Waksman BH (2001).Thymus and tolerance: is regulation the major function of the thymus? Immunol Rev 182: 33–57.

Durmaz E, Koçer Giray B, 2013. Çevresel bir endokrin bozucu: bisfenol a ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 56, 192-99.

Dündar BS, 2014. İçme sularında bisfenol-a araştırması: Ankara örneği. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.

Dvorak AM (1991) .Basophil and mast cell degranulation and recovery.In: Harris JR (ed) Blood cell biochemistry, vol. 4.Plenum Press, New York, pp 340–377.

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

Enerback, 1966a: Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I.Effects of fixation. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 66, 289–302.

Enerback, 1966b: Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. II. Dyebinding and metachromatic properties. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 66, 303–312.

Ergün SS, 2013. Nonilfenol ve bisfenol a'nın sığırlarda gamet fizyolojisine olan etkileri. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.

Erpek S, 2004. Mast Hücreleri, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 11:(2), 109-120.

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

Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufiki J, Naval´on A, Ballesteros O, Pulgar R, Vilchez JL, Olea N, 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.

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

Gruber BL, Kew RR, Jelaska A, Marchese MJ, Garlick J, Ren S,Schwartz WB, Korn JH (1997) Human mast cells activate fibroblasts. J Immunol 158:2310–2317.

Gurish M.E. and Austen, K.F., 2001. The diverse roles of mast cells, J. Exp. Med., 1: (2), F1-F5.

Gülnaz O, 2006. Bisfenol a 'nın biyolojik parçalanması, biyokonsantrasyon faktörleri ve östrojenik aktivite düzeylerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana

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

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

Huang, YQ, Wong CKC, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlström B, Neretin L.and Wong MH, 2011. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. Environment International, 42, 91–99.

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

Holladay SD, Xiao S, Diao H, Barber J, Nagy T, Ye X, Gogal RM. 2010. "Perinatal bisphenol A exposure in C57B6/129svj male mice: Potential altered cytokine/chemokine production in adulthood", International Journal of Environmental Researchand Public Health, 7, 2845-2852.

Holdstock G, Chastenay BF, Krawitt EL. Effects of testosterone, estradiol and progestrone on immune regulation. Clin Exp Immunol 1982; 47.449–56.

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

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

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

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

Kajikawa O, Koyama H, Yashikawa T, Tsubaki S, Saito H. Use of alphanaphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. Am J Vet Res. 1983;44:1549-1552.

Kandil 2016. Yumurtaya verilen bisfenol a (bpa)' nın testislerin gelişimi üzerindeki etkilerinin ışıkmikroskobik seviyede belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Kang JH, Kito K, Kondo F, 2003. Factors ınfluencing the migration of bisphenol a from cans. Journal of Food Protection, 1444-1447(4), 1343-527.

Karaca T, Yoruk M and Uslu S, 2006. Age –related changes in the numer of mast cells in the Avian lymphoid organs. Anat. Histol. Embryol. 35; 375-379.

Karaca T, Yoruk M, Arı H, Cınaroğlu S.Effect of photoperiod on number of mast cells in lymphoid organs of the japanese Quail. Journal of animal and veterinary advece 9(4): 751-755,2010.

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

Kendall, Themorphologyofperivascularspacesinthethymus, Thymus 13(1989)157–164.

Kendall MD (1995) .Hemopoiesis in the thymus. Dev Immunol. 4: 157–168.

Khan MZI, Hashimoto Y, Asaduzzman M, 1998. Development of T-cellsub-populations in postnatalchickenlymphoidorgans. VeterinarskiArch, 68(5), p.183-189.

Klein ve ark, 2014.Published in final edited form as: Nat Rev Immunol. 2014 June; 14(6): 377–391.

Klein L, Hinterberger M, von Rohrscheidt J, Aichinger M. Autonomous versus dendritic cell-dependent contributions of medullary thymic epithelial cells to central tolerance. Trends in immunology. 2011; 32: 188–193. [PubMed: 21493141].

Klein L, Kyewski B (2000) Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. Curr Opin Immunol.12: 179–186

Knowles DM, Holck S. Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid a-naphthyl acetat esterase. Lab Invest.1978b; 39: 70-76.

Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D, 1993. Bisphenol-a: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology, 132, 2279-86.

Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. J Am Med Assoc, 300, 1303–10.

Lee J, Lim, K. 2010. “Plant-originated glycoprotein (36 kDa) suppresses interleukin-4 and -10 in bisphenol A–stimulated primary cultured mouse lymphocytes”, Drug and Chemical Toxicology, 33(4), 421-429.

Le Corre L, Besnard P, Chagnon C. 2015. “BPA, an energy balance disruptor”, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55 (6), 769-777.

Letourneau R, Roznıecki JJ, Dimitridau V, Theooharides TC. Ultrastructural evidence of brain mast cell activion without degranulotion in monkey experimetal allergic encephalomyelitist. J Neuroimmunol.2003; 145 (1-1);18-26.

Lee MH, Chung SW, Kang BY, Park J, Lee CH, Hwang SY, Kim TS, 2003. Enhanced interleukin-4 production in CD4+ T cells and elevated immunolobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol a and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca2+. İmmunology, 109, 76-86.

Lee J, Lee SJ, Lim KT. CTB glycoprotein (75kDa) inhibits IgE releasing, TNFα and IL-6 expressedby bisphenol A in vivo and in vitro. Food Chem Toxicol. 2012; 50: 2109–2117. [PubMed:22446810]

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.

Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A, 2003. Endocrine disruptors in the environment. Pure Appl. Chem, 75(5), 631–81.

Liu Y, Mei C, Liu H, Wangd H, Zeng G, Lin J, Xu M, 2014. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical bisphenol-a. Biochemical and Biophysical Research Communications, 451, 592–98.

Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Wang JT, Ferber J, Herrinton LJ, Gao E, Yuan W, 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. Fertil Steril, 95, 625–30.

Li X, Ying G.G, Su H.C, Yang X.B., Wang L. 2010. Simultaneous determination andassessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled waterand baby bottles. Environment International 36, 557–562.

Lorton D, Bellınger DL, Felten SY, Felten DL, Substance P innervation of the rat thymus, Peptides, 1990,11(6):1269–1275.

Maia J, Cruz JM, Sendón R, Bustos J, Cirugeda ME, Sanchez JJ. and Paseiro P,2010. Effect of amines in the release of bisphenol A from polycarbonate babybottles. Food Research International, 43(5), 1283-1288.

Miao S, Gao Z, Kou Z, Xu G, Su Cİ, and Liu N, 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.

Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, 2005. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol- a in the female mouse genital tract. Biology of Reproduction, 72(6), 1344-51.

Maskar Ü, 1976. Embriyoloji Ders Kitabı. 5.Baskı, Sermet Matbaası, İstanbul.

Meltzer M, Pfeiffer E. Chemistry of Natural and Anthropogenic Endocrine Active Compouds: The Handbook of Enviromental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1, Meltzer M(ed), Springer- Verlag Berlin Heidelberg 2001; S. 63-80.

Ménard S, Guzylack-Piriou L, Lencina C, Leveque M, Naturel M, Sekkal S, Harkat C, Gaultier E, Olier M, Garcia-Villar R, Theodorou V, Houdeau E, 2014. “Perinatal exposure to a low dose of bisphenol A impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal,parasitic infection”, PLOS ONE, 9(11), e112752. Doi:10.1371/journal.pone.0112752.

McLachan JA, 2001. Environmental signaling: what embryos andevoluation teach us about endocrin disrupting Chemicals. Endocrinology Rewievs, 22: 319-341.

Morales TV, Ferrera ZS. and Rodríguez JJS, 2010. Determination of alkylphenolpolyethoxylates, bisphenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and itsmetabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. Journal of HazardousMaterials, 183, 701–711.

Mueller J, Brundel RG, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. Eur J Immunol.1975;5: 270-274.

Muller S, Weihe E (1991). Interrelation of peptidergic innervation with mast cells and ED-1 positive cells in rat thymus. Brain Behav Immunol 5: 55–72.

Nakamura K, Itoh K, Yaoi T, Fujiwara Y, Sugimoto T ve Fushiki S. (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.

Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, ve Fushiki S. (2007). Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. Neuroscience letters, 420(2), 100-105.

Nakamura K, Kariyazono N, 2010. "Influence of endocrine-disrupting chemicals on the immune system", Journal of Health Science, 56(4), 361-373.

Nakajima Y, Goldblum RM. and 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.

Nalbandian G, Kovats S. 2005. "Understanding Sex Biases in Immunity.Effects of Estrogen on the Differentiationand Function of Antigen-Presenting Cells", Immunologic Research, 31(2), 91-106.

O'Brien E, Bergin IL, Dolinoy, DC, Zaslona Z, Little RJ,Tao Y,Peters-Golden M, Mancuso P.Perinatal bisphenol A exposure beginning before gestation enhances allergen sensitization, but not pulmonary inflammation, in adult mice. J. Dev. Orig. Health Dis. 2014, 5, 121–131.

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

Özaydın T, Öznurlu Y, Sur E, Çelik İ, Uluışık D (2016).Bisfenol A'nın Ratlarda Sindirim Ve Solunum Sistemi Organlarının Lenfoid Dokusu İle Dalağın Histolojisi Ve Bazı Plazma Sitokin Düzeyleri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi. TÜBİTAK Projesi.

Öznurlu Y, 1999. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü). Doktora semineri, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Öznurlu Y, Celik I, Sur E, Ozaydın T, Oğuz H, Altunbaş K (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): 469-477.

Paker Ş, 1993.Histoloji, Uludağ Üniversitesi güçlendirme vakfı (11.baskı), Bursa.

Paavone´n T, Andersson LC, Adlercreutz H. Sex hormoneregulation of in vitro immune response. Estradiolenhances human B cell maturation via inhibition of supressor T cells in pokeweed mitogen stimulated culture. J Exp Med 1981;154:1935–45.

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

Pisapia L, Del Pozzo G, Barba P, Caputo L, Mita L, Viggiano E, Russo GL, Nicolucci C, Rossi S, Bencivenga U, Mita DG, Diano N, 2012.Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. General and Comparative Endocrinology 178: 54-63.

Prokop Z, Hankova L, Jerabek K, 2004. Bisphenol A synthesis – modeling of industrial reactor and catalyst deactivation. Reactive & Functional Polymers, 60, 77–83.

Rosenberg AM, Semchuk KM, McDuffie HH, Ledingham DL, Cordeiro DM, Cessna AJ, Irvine DG, Senthilselvan A, Dosman JA, 1999. Prevalence of antinuclear antibodies in a rural population. Journal of Toxicology 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.and Environmental Health, Part A, 56, 225–36.

Romano, ME, Webster GM, Vuong AM, Thomas Zoeller R, Chen A, Hoofnagle AN, Braun JM. (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

Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR., Rubin BS, Talsness CE, Vanderbergh JG, Walser-Kuntz DR., vom Saal FS. 2007. "In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies", Reproductive Toxicology, 24, 199-224.

Ribatti D, Crivellato E, The role of mast cell in tissue morphogenesis. Thymus, duodenum, and mammary gland as examples. Experimental CellResearch341(2016).105–109.

Sakazaki H, Ueno H, Nakamuro K, 2002. Estrogen receptor α in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. Toxicology Letters, 133, 221–29.

Sandıkçı M, Çelik İ, 2000. Tavuk timusunun embriyonal gelişimi ve kuluçkadan çıkıştan sonra verilen hidrokortizon asetatın bu organ üzerine etkisi, Vet Bil Derg, 16(2), 81-88.

Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, Cotta-de-Almeida V (2002) Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? Trends Immunol 23: 305–313.

Sevencan F, Vaizoğlu SA, 2007. PET ve geri dönüşümü. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni 6 (4), 307-12.

Sharpe RM, 2001. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. Toxicology Letters, 120, 221–32.

Shim JU, Lim KT. Inhibitory effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* bureau on expression of inflammation-related cytokine in bisphenol A-treated HMC-1 cells. Inflammation.2009; 32(4): 211–7. [PubMed: 19415476].

Seaman WE, Blackman MA, Gindhart TD, Roubian JR, Loeb JM, Talal N, 1978. Beta-estradiol reduces natural killer cells in mice. J. Immunol, 121, 2193-98.

Soumelis V, Liu YJ (2004) .Human thymic stromal lymphopoietin:a novel epithelial cell-derived cytokine and a potential key player in the induction of allergic inflammation. Springer Semin Immunopathol 25:325–333.

Sprent J, Kishimoto H (2002) The thymus and negative selection.Immunol Rev 185:126–135.

Stampachiacchiere B, Marinova T, Velikova K, Philipov S, Stankulov IS, Chaldakov GN, Fiore M, Aloe L (2004) Altered levels of nerve growth factor in the thymus of subjects withmyasthenia gravis. J Neuroimmunol 146:199–202.

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.

Sugita-Konishi Y, Shimura S, Nishikawa T, Sunaga F, Naito H, Suzuki Y, 2003. Effect of bisphenol a on non-specific immunodefenses against non-pathogenic escherichia coli. Toxicology Letters, 136, 217-27.

Sur E, 1999.Yumurtaya verilen aflatoksin B1(AFB1)'in tavukların lenfoid organlarının embriyonel gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Şişe Ş, 2011. Anne sütünde Nonilfenol ve bisfenol a düzeylerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.

Tanyolaç A,1999.Özel histoloji. Genişletilmiş 3.baskı ,Ankara.

Tapiero H, Nguyen BG. and Tew KD,2002.Estrogens andenvironmental estrogens. Biomed. Pharmacother, 56: 36-44.

Taylor P, 2010. Experts demand European action on plastics chemical. Erişim tarihi, 28 Aralık 2016. http://www.reuters.com/article/2010.06.22/us-chemical-bpa-health-idUSTRE65L6JN20100622

Tian J, Luo D, She R, Liu T, Ding Y, Yue Z, Xia K (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.

Toker Y, 2011. Bitkisel gıda destek ürünlerinin endokrin bozucu etki potansiyellerinin in vitro olarak belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Tsai WT, 2006. Human health risk on environmental exposure to bisphenol-a: a review. Journal of Environmental Science and Health Part C, 24, 225–55.

Usman A, Ahmad M, 2016. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? Chemosphere, 158, 131-42. 4.

Vandenberg LN, Chahoud İ, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJR, Schoenfelder G, 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies ındicate widespread exposure to bisphenol a. Environ Health Perspect, 118, 1055–70.

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

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

Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambré C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD, 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the european situation. Critical Reviews in Toxicology, 30(1), 71–133.

Xu LR, Carr MM, Bland AP, Hall GA (1993) Histochemistry and morphology of porcine mast cells. Histochem J 25:516–552.

Wang X, Zeng H, Zhao L. and Lin JM. 2006. Selective determination of bisphenol A (BPA) in water by a reversible fluorescence sensor using pyrene/dimethyl β-cyclodextrin complex. Analytica Chimica Acta 556, 313–318.

Watabe Y, Hosoya K, Tanaka N, Kondo T, Morita M. and Kubo T. 2005. LC/MSdetermination of bisphenol A in river water using a surface-modified molecularly- imprintedpolymer as an on-line pretreatment device. Anal Bioanal Chem, 381,1193–1198.

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

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.

Yeşilkaya E, 2008. Endokrin bozucular. Pediatri, 6, 76-82.

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.

Younes M,1999.Specifik issues in healht risk assesment of endocrinedisrupting chemicals and international activities. Chemosphere,39: 1253-1257.

Yoshino S, Yamaki K, Yanagisawa R, Takano H, Hayashi H. and Mori Y, 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 T, Yanagisawa R, Takano H, Taneda S, Hayashi H. and Mori Y, 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.

7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	29.01.2016	Toplantı Sayısı	2016/01	Karar Sayısı	2016/10

S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yasemin ÖZNURLU tarafından sunulan **"Yumurta verilen Bisfenol A'nın, tavuklarda timusun gelişim ve perifer kan alfa naftil aseatt esteraz pozitif lenfosit oranı üzerindeki etkilerinin histolojik ve enzim histokimyasal metodlarla belirlenmesi"** başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, BPA'nın farklı dozlarda yumurtaya enjekte edilerek, embriyoda timusun gelişimi ve perifer kan alfa naftil asetat esteraz pozitif lenfosit oranı üzerindeki etkisinin belirleneceği ifade edilmektedir.

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından **"Uygun olduğuna"** oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ Başkan	Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ Üye	Doç. Dr. Serdar İZMİRLİ Raportör Üye

Doç. Dr. Mustafa GARİP Üye (Katılmadı)	Ayşegül KURTBEYOĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi (Katılmadı)	Salih Zeki ALPTEKİN Sivil Üye

8. ÖZGEÇMİŞ

18.04.1991 tarihinde İstanbul Bakırköy ilçesinde doğdu. İlköğretim hayatını 1997-2005 yılları arasında Abdulkadir Uztürk İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Lise eğitimini ise 2005-2009 yılları arasında 50.yıl İnsa Lisesi'nde bitirdi. 2009 yılında girdiği Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden 2013 yılında mezun oldu. 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimine başladı.