

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BPA’NIN ÖTESİNDE: DENİZ MODELLERİNDE BPE,  
BPZ VE BADGE’NİN SUCUL ORGANİZMALAR  
ÜZERİNE FİZYOLOJİK ETKİLERİNİN  
EKOTOKSİKOLOJİK BİR BAKIŞ AÇISIYLA  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Beyza NALBANTLAR**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özlem ÇAKAL ARSLAN**

**Su Ürünleri Temel Bilimler**

**Su Ürünleri Temel Bilimler Doktora Programı**

**İZMİR**

**2023**



## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Beyza NALBANTLAR** tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**BPA’nın ötesinde: Deniz modellerinde BPE, BPZ ve BADGE’nin sucul organizmalar üzerine fizyolojik etkilerinin ekotoksikolojik bir bakış açısıyla değerlendirilmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve // tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza :**

**Jüri Başkanı :**

**Raportör Üye :**

**Üye :**

**Üye :**

**Üye :**



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum **“BPA’nın ötesinde: Deniz modellerinde BPE, BPZ ve BADGE’nin suçul organizmalar üzerine fizyolojik etkilerinin ekotoksikolojik bir bakış açısıyla değerlendirilmesi”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / .. /

İmzası

Adı-Soyadı

Beyza NALBANTLAR



## ÖZET

### **BPA'nın Ötesinde: Deniz Modellerinde BPE, BPZ ve BADGE'nin Sucul Organizmalar Üzerine Fizyolojik Etkilerinin Ekotoksikolojik Bir Bakış Açısıyla Değerlendirilmesi**

NALBANTLAR, Beyza

Doktora Tezi, Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özlem ÇAKAL ARSLAN

Eylül 2023, 109 sayfa

İnsanlık var olma sürecinin başlangıcından beri sürekli olarak hem bulunduğu çevreden etkilenmekte hem de bulunduğu çevreyi etkilemektedir. Çevreye giriş yapan çeşitli sayıdaki kimyasal/kirleticilerden biri bisfenol gruplarıdır. Plastik olmak üzere çeşitli uygulamalarda polimer olarak kullanılan Bisfenol A'nın başta endokrin bozucu etkisi olmak üzere, canlılarda olumsuz birçok etkisinin ortaya çıkmasından sonra kullanımında kısıtlamaya ve engellemeye geçilmiştir. Bu sürecin hemen akabinde "bisfenol analogları" olarak adlandırılan Bisfenol A türevleri çevreye giriş yapmıştır. Bu tezde analoglardan Bisfenol E (BPE), Bisfenol Z (BPZ) ve Bisfenol A diglisidil eter'in (BADGE) biyoindikatör tür olan *Mytilus galloprovincialis* üzerindeki etkileri araştırılarak ekotoksikolojik profillerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Çalışmada BPE, BPZ ve BADGE'nin midyeler (*Mytilus galloprovincialis*) üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için farklı test yöntemleri uygulanmıştır. İstatiksel analizler ile değerlendirme yapılarak BPA ile karşılaştırılmıştır. Genel olarak her üç analogun midye üzerinde farklı toksik etkilere yol açtıkları belirlenmiştir. Fertilizasyon başarısını ve larval gelişim sürecini etkilemekle beraber, histolojik açıdan dejenerasyona yol açtıkları, genotoksik etkiye ve apoptoz indüklenmesine neden oldukları saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** BPE, BPZ, BADGE, BPA, *Mytilus galloprovincialis*, Mikronükleus testi, Apoptoz, Histopatoloji, Fertilizasyon ve embriyotoksisite.



**ABSTRACT****Beyond BPA: Evaluation of The Physiological Effects of BPE, BPZ, and BADGE on Aquatic Organisms in Marine Models from an Ecotoxicological Perspective**

NALBANTLAR, Beyza

PhD in Marine and Inland Water Science  
Supervisor: Prof. Dr. Özlem ÇAKAL ARSLAN  
September 2023, 109 pages

Since the beginning of the human existence process, it has been constantly affected by the environment and affects the environment in which it is located. One of the various chemicals/pollutants entering the environment is bisphenol groups. The use of Bisphenol A, which is used as a polymer in various applications, including plastic, has been restricted and prevented after the emergence of many negative effects on living things, especially its endocrine-disrupting effect. Immediately after this process, bisphenol derivatives called “bisphenol analogs” entered the environment. This thesis aims to reveal the ecotoxicological profiles of the analogs Bisphenol E (BPE), Bisphenol Z (BPZ), and Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) by investigating the effects on the bioindicator species *Mytilus galloprovincialis*.

In the study, different test methods were applied to determine the effects of BPE, BPZ, and BADGE on mussels (*Mytilus galloprovincialis*). It was evaluated with statistical analysis and compared with BPA. In general, it has been determined that all three analogs cause different toxic effects on mussels. It has been determined that although they affect the fertilization success and larval development process, they cause degeneration in terms of histology, cause genotoxic effects, and induce apoptosis.

**Keywords:** BPE, BPZ, BADGE, BPA, *Mytilus galloprovincialis*, Micronucleus Assay, Apoptosis, Histopathology, Fertilization and embryotoxicity.



## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, Prof. Dr. Özlem ÇAKAL ARSLAN danışmanlığı ile tamamlanmış, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne doktora tezi olarak sunulmuştur. Bu çalışmada, Bisfenol A'nın yerine kullanılan Bisfenol E, Bisfenol Z ve Bisfenol A diglisidil eter'in midyeler üzerindeki etkileri araştırılarak yorumlanmıştır.

Çalışma midyelerin maruz bırakıldığı BPE, BPZ, BADGE ile ilk kez gerçekleştirilmektedir. Araştırma sonuçları, diğer analoglar ve farklı türlerle gerçekleştirilecek olan diğer çalışmalara ışık tutarak, daha fazla çalışmanın yapılmasına gereklilik olduğunu savunmaktadır. Sucul ekosistemin güvenliği ve sürdürülebilirliği için oluşturulacak yasal düzenlemeler açısından önem arz etmekle beraber eylem planlarının belirlenmesinde bir perspektif oluşturarak yarar sağlayacaktır.

İZMİR

BEYZA NALBANTLAR

/10/2023



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Bisfenol A (BPA).....	2
1.2. Bisfenol Analogları .....	4
1.3. Bisfenol Analoglarının Sucul Ekosisteme Girişi .....	6
1.4. Sucul ekosistemde kirliliğin belirlenmesinde kullanılan testler.....	14
1.5. Biyomarker (Biyobelirteç) .....	15
1.5.1. Genotoksik biyobelirteç mikronükleus .....	18
1.5.2. Apoptoz.....	21
1.5.3. Histopatoloji.....	24
1.5.4. Embriyotoksisite .....	25
1.6. Biyoidikatör ve Sentinel Türler.....	26
1.7. Literatür Bildirisi.....	29

2. GEREÇ ve YÖNTEMLER .....	36
2.1. Gereç .....	36
2.1.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819) türünün karakteristik özellikleri .....	36
2.1.2. <i>Mytilus galloprovincialis</i> türünün üreme biyolojisi ve yaşam döngüsü .....	38
2.2. Kimyasallar ve stokların hazırlanması .....	40
2.2.1. Bisfenol A (Cas numarası:80-05-7) 4-[2-(4- hydroxyphenyl) propan-2-yl]phenol	40
2.2.2. Bisfenol E (Cas Numarası:2081-08-5) 4-[1-(4- hydroxyphenyl)ethyl] phenol .....	42
2.2.3. Bisfenol Z (Cas numarası:843-55-0) 4-[1-(4- hydroxyphenyl) cyclohexyl]phenol	43
2.2.4. Bisfenol A diglisidil eter (Cas numarası:1675-54-3) 2-[[4-[2-[4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl] propan-2-yl]phenoxy] methyl]oxirane .....	44
2.3. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin <i>Mytilus galloprovincialis</i> türü ile gerçekleştirilen toksisite testleri .....	45
2.3.1. Akut toksisite testi .....	46
2.3.2. Fizyolojik Parametreler: condition (büyüme) indeks ve gonadosomatik indeks ....	47
2.3.3. Subletal toksisite testleri .....	48
2.3.4. Midye fertilizasyon (döllenme başarısı) ve embriyotoksisite testi.....	48
2.3.5. Mikronükleus testi.....	50
2.3.6. Histolojik boyama ve Apoptoz testi.....	53
2.3.7. İstatiksel değerlendirmeler .....	57
3. BULGULAR.....	58

3.1. Akut Toksikite testi sonuçları.....	58
3.2. Fizyolojik parametreler: Condition (büyüme) indeks ve Gonadosomatik indeks.....	58
3.3. Midye fertilizasyon (döllenme) başarısı sonuçları.....	64
3.4. Apoptoz ve Histopatoloji sonuçları.....	81
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	90
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	101
TEŞEKKÜR.....	128
ÖZGEÇMİŞ.....	129

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Bisfenol analogları .....	4
Şekil 1.2. Türkiye kıyılarında BPA konsantrasyonlarının belirlendiği istasyonlar .....	14
Şekil 1.3. Organizmaların tepkileri alt organizma, tüm organizma ve/veya popülasyon/komünite tepkilerinde kullanılan biyomarker (biyobelirteçler).....	17
Şekil 1.4. Apoptoz süreci .....	23
Şekil 2.1. Midye morfolojisi.....	37
Şekil 2.2. Midye trokofora larvası.....	39
Şekil 2.3. Midye yaşam döngüsü.....	40
Şekil 2.4. BPA'nın kimyasal yapısı.....	41
Şekil 2.5. BPE'nin kimyasal yapısı.....	42
Şekil 2.6. BPZ'nin kimyasal yapısı.....	43
Şekil 2.7. BADGE'nin kimyasal yapısı.....	44
Şekil 2.8. Akut toksisite test düzeneği.....	46
Şekil 2.9. Büyüme indeks ve gonadosomatik indeks örneklemelerinin kurutulmuş hali.....	48
Şekil 2.10. Midye sperm ve yumurta eldesi.....	48
Şekil 2.11. Midye döllenmiş yumurta ve larval aşamaları.....	50
Şekil 2.12. Mikronükleus testi için midye diseksiyonu.....	51
Şekil 2.13. Midye iç görünüm ve solungaç dokusu.....	52
Şekil 2.14. Ksilolde şeffaflaşan solungaç ve hepatopankreas dokuları.....	53
Şekil 2.15. Doku kesiti örneği.....	54
Şekil 3.1. BPA konsantrasyonuna bağlı olarak bulunan %CI değerleri.....	59
Şekil 3.2. BPE konsantrasyonuna bağlı olarak bulunan %CI değerleri.....	60
Şekil 3.3. BPZ konsantrasyonuna bağlı olarak bulunan %CI değerleri.....	60
Şekil 3.4. BADGE konsantrasyonuna bağlı olarak bulunan %CI değerleri.....	61
Şekil 3.5. BPA'nın konsantrasyona bağlı bulunan %GSI.....	62

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 3.6. BPE'nin konsantrasyona bağlı bulunan %GSI.....	62
Şekil 3.7. BPZ'nin konsantrasyona bağlı bulunan %GSI.....	63
Şekil 3.8. BADGE'nin konsantrasyona bağlı bulunan %GSI.....	63
Şekil 3.9. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin midye dölleme başarısı üzerine etkileri.....	64
Şekil 3.10. Kimyasallara bağlı bulunan % anormal larva değerleri.....	66
Şekil 3.11. Mikronükleus.....	66
Şekil 3.12. Nükleer tomurcuklanma (NUB) .....	68
Şekil 3.13. Uygulanan BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin 1000 µg/L konsantrasyonunda belirlenen mikronükleus frekansı.....	71
Şekil 3.14. Uygulanan BPE konsantrasyonlarına ve zamana bağlı olarak nükleer tomurcuklanma ve mikronükleus frekansı.....	72
Şekil 3.15. Uygulanan BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin 1000 µg/L konsantrasyonunda belirlenen mikronükleus frekansı.....	76
Şekil 3.16. Uygulanan BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin 1000 µg/L konsantrasyonunda hepatopankreas dokusunda belirlenen mikronükleus frekansı.....	81
Şekil 3.17. Hepatopankreas hemotoksilen-eozin boyama.....	84
Şekil 3.18. Solungaç hemotoksilen-eozin boyama.....	86
Şekil 3.19. Hepatopankreas Tunel boyama.....	88
Şekil 3.20. Solungaç Tunel Boyama.....	90

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Bisfenol analoglarının cas numaraları ve moleküler ağırlıkları.....	5
Çizelge 1.2. BPA ve analoglarının suda ve sedimentte bulunan konsantrasyonları .....	9
Çizelge 1.3. BPA ve analoglarının suda ve sedimentte bulunan konsantrasyonları .....	11
Çizelge 1. 4. BPA ve analoglarının suda ve sedimentte belirlenen konsantrasyonları .....	13
Çizelge 2.1. BPA'nın fizikokimyasal özellikleri.....	41
Çizelge 2.2. BPE'nin fizikokimyasal özellikleri.....	42
Çizelge 2.3. BPZ'nin fizikokimyasal özellikleri .....	43
Çizelge 2.4. BADGE'nin fizikokimyasal özellikleri.....	45
Çizelge 3.1. BPA, BPE, BPZ ve BADGE için bulunan LC <sub>50</sub> değerleri .....	58
Çizelge 3.2. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin hesaplanan DE değerleri.....	65
Çizelge 3.3. Uygulanan BPA konsantrasyonlarına bağlı hemolenf hücrelerinde bulunan mikronükleus frekansı.....	67
Çizelge 3.4. Uygulanan BPE konsantrasyonlarına bağlı hemolenf hücrelerinde bulunan mikronükleus frekansı.....	68
Çizelge 3.5. Uygulanan BPE konsantrasyonlarına bağlı olarak hemolenf hücrelerinde belirlenen nükleer tomurcuklanma frekansı.....	69
Çizelge 3.6. Uygulanan BPZ konsantrasyonlarına bağlı olarak hemolenf hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	70
Çizelge 3.7. Uygulanan BADGE konsantrasyonlarına bağlı olarak hemolenf hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	71
Çizelge 3.8. Uygulanan BPA konsantrasyonlarına bağlı olarak solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	73
Çizelge 3.9. Uygulanan BPA konsantrasyonlarına bağlı olarak solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	74
Çizelge 3.10. Uygulanan BPZ konsantrasyonlarına bağlı olarak solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	75
Çizelge 3.11. Uygulanan BADGE konsantrasyonlarına bağlı olarak solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	76
Çizelge 3.12. Uygulanan BPA konsantrasyonlarına bağlı olarak hepatopankreas hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	77
Çizelge 3.13. Uygulanan BPE konsantrasyonlarına bağlı olarak hepatopankreas hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	78
Çizelge 3.14. Uygulanan BPZ konsantrasyonlarına bağlı olarak hepatopankreas hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	79
Çizelge 3.15. Uygulanan BADGE konsantrasyonlarına bağlı olarak hepatopankreas hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı.....	80

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
BPA	Bisfenol A
BPE	Bisfenol E
BPZ	Bisfenol Z
BADGE	Bisfenol a diglisidil eter
BPB	Bisfenol B
BPC	Bisfenol C
BPAF	Bisfenol AF
BPAP	Bisfenol AP
BPG	Bisfenol G
BPM	Bisfenol M
BPS	Bisfenol S
BPF	Bisfenol F
BPBP	Bisfenol BP
BPFL	Bisfenol FL
BPPH	Bisfenol PH
BPTMC	Bisfenol TMC
TBBPA	Tetrabromobisfenol A
TBPS	Tetrabromobisfenol S
BPDFGE	Bisfenol f diglisidil eter
BP	Bisfenoller
BCF	Biyokonsantrasyon faktörü
BAF	Biyoakümülyasyon faktörü
Log Kow	Oktanól-su partitasyon katsayısı

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
LOD	Gözlenebilme Sınırı (Level of Detection)
LOQ	Tayin Sınırı (Limif of Quantification)
ND	Algılanmayan (Not detected)
NA	Mevcut değil (Not available)
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
L	Litre
Σ	Ortalama

## 1. GİRİŞ

İnsanoğlu var olduğu dönemden bu yana daha iyi bir yaşam için gelişme adı verilen bir süreci yaşamaktadır. Gelişmenin bir mihenk taşı olduğu düşünölen sanayi devrimi ile üretim hızla artmış ve çeşitli ürünlerle beraber bu ürünlerin yapımında kullanılan kimyasallar da hayatımıza giriş yapmıştır. Çevreye giriş yapan ve her geçen gün sayısı artan bu kimyasallar/kirleticiler doğal ekosistemin her bir öğesi için tehlike oluşturmaya başlamıştır. Doğal ekosistemin bir parçası olan sucul ekosistemlerde bu tehlikeyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Sucul ekosistemlere kazara ya da bilerek bırakılan çeşitli sayıda kimyasallar/kirleticiler bulunmaktadır.

Kimyasallar/kirleticiler sucul ekosisteme giriş yaptıktan sonra kimyasal, biyolojik, fiziksel olmak üzere farklı bir dizi süreçten geçmektedirler. Kimyasallar belirli süreçlerle (fotoliz, hidroliz, ph vb...) parçalanarak ikincil ürünlere dönüştükleri gibi, biyolojik olarak ksenometabolizma süreçlerinde detoksifiye olması, Faz I ve Faz II detoksifikasyon süreçlerinde zararsız/zararlı metabolitlere dönüşmesi söz konusudur. Biyolojik olarak ksenometabolizma süreçlerinde ortaya çıkan metabolitler; esas maddeden daha toksik olarak ortaya çıkabilmektedirler. Kimyasalların fizikokimyasal özellikleri degradasyon sürecinde oldukça önemlidir. Moleküler ağırlık, erime/kaynama noktası, buhar basıncı, suda çözünabilirliği, oktanol/su partitasyon katsayısı, dayanıklılığı, adsorpsiyon/desorpsiyon özellikleri, uçuculuk gibi özellikler kimyasalların sucul ekosistemlerdeki kaderini etkilemektedir. Kimyasalların çevresel akıbetinin belirlenmesinde fiziko-kimyasal süreçler ve kimyasal analizler belirteç olsa da, sucul ortamdaki etkilerinin ve etki mekanizmalarının tahmin edilmesi için ekotoksikolojik testlerin ve test canlıların seçilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ekotoksikolojik çalışmaların temelinde kirletici/kimyasalların çevreye giriş yaptıktan sonra, her bir trofik seviyede yer alan organizmalar üzerindeki olası etkilerin oluşabileceğinin belirlenmesi için biyolojik testlerin yapılması yatmaktadır. Sonraki aşamada ise belirlenen etkilerin popölasyon ve komünite üzerinde yaratabileceği olası olumsuz sonuçların neler olabileceği ortaya çıkarılmaya çalışılır. Aynı zamanda ekotoksikolojik çalışmalar; tüm sucul ekosistemin korunması, sürdürülebilirliği, güvenliği için alınması gerekebilecek eylem planlarının belirlenmesinde yardımcı olmaktadır.

Kimyasallar/kirleticiler organizma üzerinde farklı birçok etkiye neden olabilmektedir. Bu etkilerin belirlenmesi için akut ve sublethal toksisite testleri kullanılmaktadır. Akut toksisite testleri ile belirlenen  $LC_{50}/EC_{50}$  değerlerinden sonra subletal toksisite testlerine odaklanılarak farklı parametrelerle incelenmektedir. Bu parametreler fizyolojik çalışmaları (fotosentez, solunum, beslenme, kalp atış hızı vb.), biyokimyasal çalışmaları (enzim aktiviteleri, hormonal fonksiyonlar vb.), üreme çalışmaları (döllenme, embriyo gelişimi, yumurta ve sperm kalitesi vb.), genetik çalışmaları (kromozom hasarları, mutajenik, teratojenik, karsinogenik vb.), histopatolojik çalışmaları (anormal büyümeler, doku hasarları vb.) içermektedir. İndikatör canlılar ve test protokolleri ile yapılan araştırmalarla kimyasalların sublethal etkileri ortaya çıkarılarak genel anlamda toksikolojik profilleri oluşturulması hedeflenmektedir. Özellikle sucul ekosisteme giriş yapan yeni kimyasalların sublethal etkilerinin (üreme, genetik, endokrin bozucu vb.) belirlenmesi oldukça önemlidir. Çünkü belirlenen bu etkiler bir sonraki çalışmaların temelini oluşturarak kapsamlı araştırmaların yapılmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca hem sucul ekosistemin hem de insan sağlığı açısından ne tür bir risk oluşturabileceklerini göstergesi olarak görülmektedir.

Kimyasalların etkilerinin bilinmesiyle beraber kullanım alanlarına göre yeni ya da aynı kimyasalların analogları üretilmeye başlanmıştır. Asıl kimyasal yerine üretilen analoglar daha zararsız olabilecekleri gibi daha veyahut benzer derecede toksik olma potansiyeline sahip olabilmektedirler. Üretilen bu kimyasalların doğal ekosistem için oluşturabilecekleri riskler ise belirsiz olmakla beraber güvenilirlikleri şüphelidir.

### **1.1. Bisfenol A (BPA)**

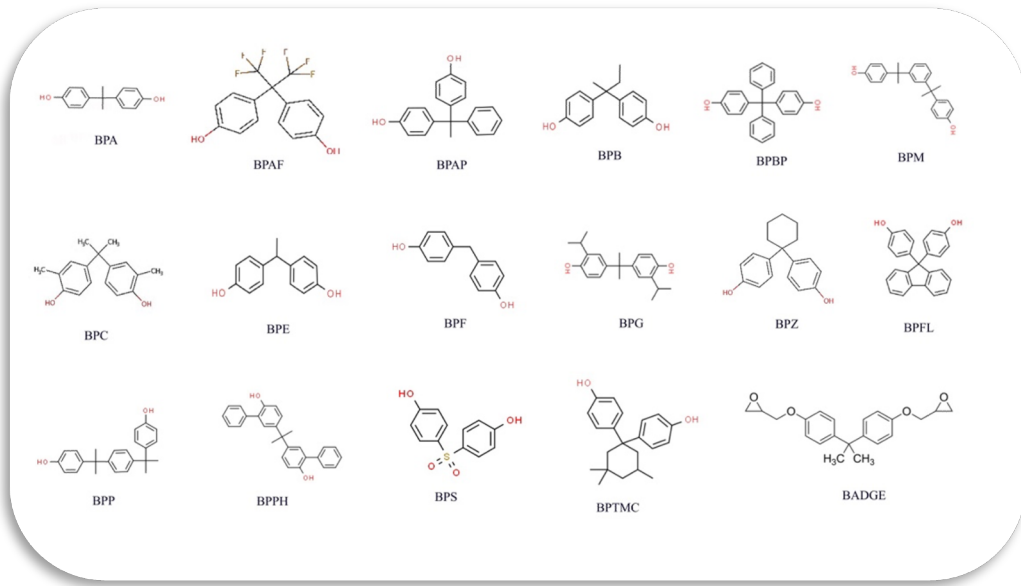
Endokrin bozucu bileşikler (EDC) endojen hormon tepkilerini uyarabilen veya baskılayabilen, canlı organizmaların üreme ve gelişim süreçlerine müdahale etmekten sorumlu olan eksojen maddeler olarak tanımlanmaktadır (Ghosh et al., 2022; Rosenfeld, 2021; Metcalfe et al., 2022). Şu ana kadar Avrupa Birliği tarafından yaklaşık 900 kimyasal endokrin bozucular olarak tanımlanmıştır ve kabul edilmiştir (Plattard et al., 2021; EU, 2020). Endokrin aktiviteye sahip bilinen maddeler arasında antropojenik (sentetik hormonlar (diethylstilbestrol, 17- $\alpha$ -etinilestradiol), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), pestisitler, poliklorlu bifeniller, bisfenol A (BPA) ve analogları ve doğal olarak oluşan kimyasallar (doğal hormonlar (estron, estradiol, estriol, progesteron, testosteron), fitoöstrojenler) bulunmaktadır (Czarny et al., 2017).

İlk olarak 1891 yılında sentezlenen BPA, iki hidrofenoksil grubu içeren difenil metan türevidir. 1957 yılından bu yana ticari ürün olarak polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerin üretimi için bir monomerdur. Ayrıca, termal kağıtlarda renk geliştirici bir madde olarak kullanılmaktadır (Zhou et al., 2021; Vaccher et al., 2022; Xing et al., 2022). Plastik kaplar ve şişeler, yemek takımları, oyuncaklar, tıbbi ekipmanlar, diş dolgu malzemeleri, polivinil klorür boruları, sigara filtreleri, otomobil parçaları ve metal gıda kutularının iç kaplamaları dahil olmak üzere birçok ürünün imalatı için bir hammaddedir (Pelch et al., 2019; Adhikary, 2021; Tarafdar et al., 2022). 2015 yılında, 7,7 milyon metrik tona yakın BPA üretimi gerçekleşmiştir ve 2022 yılında yaklaşık 10,6 milyon metrik ton üretiminin olduğu düşünülmektedir (Fabrello and Matazzo, 2022). Yüksek üretimi ve kullanımıyla çevreye giriş yapması kaçınılmaz olan bu kimyasal su, toprak, sediment, iç mekân tozları, insan dokuları olmak üzere farklı çevresel bölümlerde tespit edilmiştir (Kang et al., 2006; Roark, 2020). Bisfenol A'nın yıllar içerisinde yapılan çok sayıdaki araştırmanın sonucunda endokrin bozucu olmasının yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar, obezite, diyabet, üreme bozuklukları ve meme kanseri gibi olumsuz sağlık etkilerine neden olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Rochester, 2013; Giulivo et al., 2016; Ziv-Gal and Flaws, 2016). Hem insan hem de diğer tüm canlılar için risk oluşturduğu ve olumsuz birçok etkiye neden olduğu ortaya çıkmasından sonra bisfenol A'nın üretimi/kullanımı ile ilgili kısıtlamaya gidilmiştir. İlk olarak, 2010 yılında Kanada'da biberonların üretiminde kullanımı yasaklanmıştır (Czarny- Krzysińska, et al., 2023). Daha sonra Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletler'inde, 2011-2012 yıllarında polikarbonat biberonlarda kullanımları yasaklanmıştır (EU, 2011; FDA, 2012). Avrupa Kimyasallar Ajansı (ECHA) östrojenik aktivitesinin bir sonucu olarak bisfenol A'yı yüksek önem arz eden bir madde olarak sınıflandırmıştır (ECHA, 2017). 2020 yılında ise termal kâğıttan kaynaklanan bisfenol A maruziyetini azaltmak amacıyla Avrupa Birliği, termal kağıtlarda bisfenol A'nın içeriğini ağırlıkça %0,02'nin altına düşürmüştür (Czarny-Krzysińska, et al., 2023). Avrupa Komisyonu düzenlemeleri uyarınca, oyuncakların ve gıda ile temas eden malzemelerin üretiminde bisfenol A'nın kullanımına sırasıyla 0,04 mg kg<sup>-1</sup> ve 0,05 mg kg<sup>-1</sup> özel migrasyon limitiyle (SML) izin verilmektedir (EU, 2017; EU, 2018).

Çeşitli kısıtlamaların/yasaklamaların gerçekleştirilmesinin akabinde Bisfenol A yerine geçebilecek kimyasal üretimine başlanılmıştır. BPA analogları olarak adlandırılan bu yeni kimyasallar doğal ekosistemin bir parçası olma yolunda hızla ilerlemektedirler.

## 1.2. Bisfenol Analogları

Bisfenol analogları, bisfenol A'ya benzer kimyasal yapılarla birbirine bağlanmış iki fenol grubundan oluşmaktadır. Hem iki hidroksifenil arasındaki kimyasal grup hem de bromlu ve klorlu bileşiklerin mevcudiyeti bakımından diğer



Şekil 1.1. Bisfenol analogları

kimyasal gruplarından farklıdır. ECHA (2021) raporuna göre bisfenol yapısına sahip 17 bisfenol vardır. Bisfenollerde ortak yapısal özelliklere sahip olan ve bisfenol türevleri olarak adlandırılan toplam 148 madde bulunmaktadır (Şekil 1.1) Moleküler ağırlıkları ve Cas numaraları yer alan Çizelge 1.1.'de şu ana kadar bilinen bisfenol analogları yer almaktadır. Tüm bisfenol analogları ile ilgili aynı düzeyde bilgiler bulunmamaktadır. Bisfenol analoglarından en fazla bilgiye sahip olunanlar BPS, BPF, BPAF olarak sıralanabilir.

**Çizelge 1.1.** Bisfenol analoglarının cas numaraları ve moleküler ağırlıkları

Kimyasal Adı	Cas numarası	Moleküler ağırlık (g/mol)
Bisfenol A	80-05-7	228,29
Bisfenol AF	1478-6 1-1	336,23
Bisfenol AP	1571-75-1	290,36
Bisfenol B	77-40-7	242,32
Bisfenol BP	1844-01-5	352,43
Bisfenol C	79-97-0	256,34
Bisfenol F	620-92-8	200,23
Bisfenol E	2081-08-5	214,27
Bisfenol G	127-54-8	312,45
Bisfenol M	13595-25-0	346,46
Bisfenol P	2167-51-3	346,46
Bisfenol S	80-09-1	250,27
Bisfenol Z	843-55-0	268,36
Bisfenol A diglicidil eter	1675-54-3	340,4
Bisfenol PH	24038-68-4	380,48
Bisfenol FL	3236-71-3	350,41
Bisfenol TMC	129188-99-4	310,43

Bisfenol analoglarından Bisfenol S (BPS), Bisfenol F (BPF) ve Bisfenol AF (BPAF), Bisfenol A yerine polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Bousoumah et al., 2021; Shamhari et al., 2021). Ayrıca BPS'nin epoksi yapıştırıcılar, termal makbuz kağıtları, boya katkı maddelerinde (Chen et al., 2016); BPF'nin gıda ambalajlarında, astarlarda, su borularında, diş dolgu macunlarında, cilalarda, endüstriyel zeminlerde (Chen et al., 2016; Rochester and Bolden, 2015); BPAF'nin elektronikte ve optik fiberlerde çapraz bağlayıcı gibi yaygın polimer uygulamalarında, poliamidler, polyesterler, polikarbonat kopolimerler ve özel polimerler için yüksek performanslı bir monomer olarak kullanıldığı bilinmektedir (Chen et al., 2016).

Bisfenol AP (BPAP)'nin plastik, kauçuk, polimer malzemelerin sentezlenmesinde, kimya endüstrisinde ve medikal endüstrisinde plastikleştirici ve alev geciktirici olarak kullanılmaktadır, benzer şekilde Bisfenol C (BPC)'de alev geciktirici olarak endüstriyel ürünlerin üretiminde yer almaktadır (Han et al., 2021). Analoglardan Bisfenol C, Bisfenol E ve Bisfenol Z kişisel bakım ürünleri, gıda ambalajları ve kâğıt ürünlerinde bulunmaktadır.

BPE, plastik malzemelerin sağlamaştırılması (sertleştirilmesinde) işlemlerinde (Lee et al., 2019); BPZ ise fensiklidin (PCP) gibi anestezi kimyasalların sentezinde kullanılabilir (Schmidt, 2013). Yüksek üretim hacimli olduğu bilinen BADGE epoksi reçinelerinin üretiminde bir monomer olmakla beraber, yiyecek ve içecek kaplarının kaplama malzemesi, antikorozyon kaplama ve dış kompozitlerin kaplama maddesi olarak üretim içerisinde yer almaktadır (Chamorro-Garcia et al., 2012; Szczepanska et al., 2019; Miyazaki et al., 2020; Zhag et al., 2021). Yine alev geciktirici olarak kullanılan tetrabromobisfenol A (TBBPA) ve tetrabromobisfenol S (TBPS) ve bunların analogları/türevleri olarak tanımlanan bromlu bisfenoller üretilmiştir (Liu et al., 2016). Bisfenol M (BPM), Bisfenol C (BPC), Bisfenol P (BPP), Bisfenol E (BPE), Bisfenol Z (BPZ), Bisfenol AP (BPAP) farklı ve çeşitli ürünlerin üretimi esnasında kullanılmalarının yanı sıra plastik, reçine, dental ürünlerde polimer olarak görev almaktadırlar (Owczarek et al., 2018). Farklı ve çeşitli ürünlerin üretimi aşamasında kullanılmalarının bilinmesine karşılık genel olarak tüm analogların üretim ve kullanım miktarları hala tam olarak bilinmemektedir. Analogların birçoğu üretim aşamasında polimer görevine sahip olmaları sonucunda kuşkusuz üretim miktarlarının tahmin edilen ya da tespit edilebilen değerlerden daha yüksek olacağı yönündedir. Şu ana kadar rapor edilen miktarlara bakıldığında 2016 yılında Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından BPS'nin yıllık üretiminin 1000-10000 ton olduğu, BPAF'nin 100-1000 ton olduğu yönündedir (EFSA, 2020). Aynı raporda bromlu bisfenoller arasında yıllık en yüksek üretimin TBBPA'nın 170.000 metrik ton/yıl olduğu bildirilmiştir. Bir diğer analog BADGE içinse, 2015 yılında sadece ABD'de yıllık üretimin 453-9072 ton olduğunun tahmin edildiği rapor edilmiştir (Wang et al., 2021). Diğer analogların üretim ve kullanım miktarları ile ilgili bilgi bulunmamasına karşılık endüstriyel ürünlerinde kullanılmaları göz önüne alındığında sucul ekosisteme girişleri ve insan maruziyeti kaçınılmaz olmaktadır.

### **1.3. Bisfenol Analoglarının Sucul Ekosisteme Girişi**

BPA ve analoglarının varlığı antropojenik bir aktivitenin sonucu olmakla beraber (Huang et al., 2012), üretimleri ve kullanımları esnasında ve bertaraf edilmeleri sırasında da çevreye girişleri meydana gelebilmektedir (Liu et al., 2021). Yine yapılan çalışmalar, BPA ve analoglarının yüksek sıcaklıkta, asidik veya alkali ortamlardaki difüzyonu ve hidrolizi sırasında bisfenol bazlı malzemelerden (polikarbonat ve epoksi reçineler) çevreye geçiş yapabileceğini göstermektedir (Michałowicz, 2014; Muhamad et al., 2016; Usman and Ahmad, 2016; Wu et al.,

2018; Cantoni et al., 2021). Yaygın olarak kullanılan bu analoglar sucul ekosistemlere öncelikle bisfenollerin ve bisfenollere dayalı ürünlerin üretimi, arıtılması ve işlenmesi ile ilgili tesislerdeki atık su deşarjlarından, atık su arıtma işlemleri sırasındaki verimsiz (yetersiz) giderimden, düzenli depolama alanlarındaki sızıntı sularından ve evsel katı atıklarından giriş yapmaktadırlar (Im and Loffler, 2016; Godiya and Park, 2022; Huang et al., 2021; Liu et al., 2021). BPA konsantrasyonlarının ( $<LOD-2780.0000 \mu g L^{-1}$ ) diğer analoglara göre çok daha yüksek olmasıyla beraber analoglar arasından BPS, BPF ve BPAF'nin ( $<LOD-3.8400 \mu g L^{-1}$ ) tespit edilme sıklığı ve belirlenen konsantrasyonları BPA içermeyen ürünlerin üretiminde kullanıldığını göstermektedir (Ballesteros-Gómez et al., 2007; Bahramifar et al. 2014; Caban and Stepnowski, 2020; Cesen et al., 2018; Fries et al., 2016; Gorga et al., 2013).

Huang et al., (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada atık suyun girişindeki ve çıkışındaki BPA ve analoglarının seviyelerini araştırmışlardır. Çalışmada bisfenollerin uzaklaştırılmasında atık su arıtma tesislerinin yeterli olduğunu belirlemişlerdir ve atık su arıtma tesislerinden boşaltılan atık suların sucul ekosistemlerdeki bisfenollerin varlığı açısından önemli bir kaynak teşkil edebileceklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca, çalışmada giriş ve çıkış sularında belirlenen  $\Sigma$ BP's (BPA, BPAF, BPBP, BPC, BPE, BPF, BPG, BPS ve BPZ) konsantrasyonlarının sırasıyla 0,6653–5,4495 ve 0,0380–2,8415  $\mu g L^{-1}$  arasında değişmekte olduğu tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada ise, hastane atık suları ve depolama sahası sızıntı suları incelenmiştir. Her iki alan için BPA, BPAF, BPAP, BPBP, BPE, BPF, BPG, BPP, BPS ve BPZ'nin belirlenen konsantrasyonları sırasıyla  $<LOD-0,9730$  ve  $<LOD-27,6000 \mu g L^{-1}$  olduğu rapor edilmiştir (Huang et al., 2021). Bu çalışmalar göz önüne alındığında, bisfenol analoglarının sucul ekosisteme depolama sızıntı alanları haricinde hastane atık suları aracılığıyla da giriş yaptığı ve önemli bir girdi kaynağı oluşturabileceği düşünülmektedir.

Sucul ekosisteme girişinin bir diğer kaynağı ise, bisfenollerin hidrofobik (su sevmeyen) olmalarından kaynaklanmaktadır. Bisfenoller bu özellikleri nedeniyle kanalizasyon çamurunu adsorbe edebilmektedirler. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, atık su tortusundaki  $\Sigma$ BP'lerin (BPA, BPAF, BPBP, BPC, BPE, BPF, BPG, BPS ve BPZ) konsantrasyonları 0,2690–2,0909  $\mu g g^{-1}$  olarak rapor edilmiştir (Huang et al., 2020). Arıtma çamurunun tarımda gübre olarak kullanılması, adsorplanmış bisfenol analoglarının toprağa ve yer altı sularına salınmasına yol açabileceği bildirilmiştir (Hu et al., 2019; Liu et al., 2021). Üretildikleri ve kullanıldıkları fabrikalardan ve bunlara dayalı ürünlerin yakılması sırasında da gaz

olarak atmosfere salınabilirler (Xing et al., 2022). Ayrıca binaların dış duvarlarına döşenen yalıtım levhalarının üretiminde kullanılan fenolik reçinenin sentezi için birçok bisfenol analogunun kullanılması (Zhao et al., 2021) sonucunda şehirlerden ve tarım arazilerinden gelen yağış aracılığıyla da sucul ortam için noktasal olmayan önemli bir bisfenol kaynağı olmaktadır.

Genel olarak bir kimyasalın moleküler ağırlığı, moleküler yapısı, biyokonsantrasyon faktörü (BCF), oktanol-su partitasyon katsayısı (log Kow), sudaki çözünürlükleri, yarılanma ömürleri, biyoakümülyasyon faktörü (BAF) ve biyotransformasyon yarı-ömürleri, sucul ekosistemlere giriş yaptıktan sonraki davranışı için bilgi sağlamaktadır. Tüm kimyasallar için spesifik olarak tespit edilen bu değerler onların sucul ortamdaki çevresel kaderlerinin tahmin edilmesine yardımcı olmaktadır. Bunlardan oktanol-su partitasyon katsayısı ise ayrı bir öneme sahiptir.  $\log Kow \geq 3$ 'ten büyük olan kimyasalların organik maddelere bağlanması ve biyolojik olarak birikmesi söz konusudur;  $\log Kow \leq 3$ 'ten küçük ise bu kimyasalların su kolonunda yer alacağı sonucuna varılmaktadır (Parlak vd., 2011). BPA'nın tahmin edilen log Kow değeri 3,64 iken BPAF, BPAP, BPB, BPBP, BPC, BPFL, BPG, BPM, BPP, BPE, BPZ, BADGE, TBBPA gibi birçok bisfenol analog yüksek log Kow (3,19-7,34) değerine sahiptir (Czarny-Krzyminska et al., 2023). Bu analogların BPA'dan daha fazla biyolojik olarak birikebilme potansiyellerine sahip olduklarını düşündürmektedir. BPS, BPF ve BPSIP gibi analogların log Kow değerleri  $\leq 3$ 'ten (1,65-2,42) düşüktür (Czarny-Krzyminska, et al., 2023) ve bu analogların hidrofilik (su seven) doğasını ve suda çözünebilme eğilimlerini yansıtmaktadır.

Avrupa Birliği Kimyasalların Kaydı, Değerlendirmesi ve İzni (REACH) kriterlerine göre,  $BCF > 2000 \text{ kg L}^{-1}$  olan kirleticiler biyobirikimli olarak kabul edilmektedirler (Arnot et al., 2022). BPBP, BPFL, BPG, BPM, BPP, BPPH, BPZ'nin tahmini BCF'si  $4,74 \times 10^3$  ila  $1,1 \times 10^4 \text{ kg L}^{-1}$  arasında değişerek yüksek biyobirikim potansiyeli gösterirken, BPA ve diğer analogların  $3,35\text{--}747 \text{ kg L}^{-1}$  gibi düşük bir BCF değerine sahip oldukları bildirilmiştir (Czarny-Krzyminska, et al., 2023). Czarny-Krzyminska et al., (2023) çalışmasına göre log BCF ile log Kow arasında pozitif bir korelasyon ( $r^2 = 0.9664$ ) vardır. Lipofilikliğin (yağda çözünen) sucul organizmalarda bisfenol analoglarının birikmesi için ana itici bir güç olabileceğini bildirmişlerdir. BPA, BPAP, BPB, BPC, BPF, BPE, BPS, BPZ gibi birçok bisfenol analoglarının, 0,05 ile 0,834 gün arasında biyotransformasyon yarı ömrü ile hızla metabolize edilebilmektedirler. Böylece yüksek log Kow değerine sahip olan analoglar için biyolojik birikim potansiyelleri azalabilir (Czarny-

Krzyminska, et al., 2023). BPAF, BPBP, BPFL, BPG, BPM, BPP, BPPH, TBBPA ve BADGE gibi diğer analogların biyotransformasyon yarı ömürleri 1 günden fazladır ve orta-dereceli biyodönüştürülebilir bileşikler olarak sınıflandırılabilirler (Czarny-Krzyminska, et al., 2023). BPA ve analoglarının, sediment, toprak ve sudaki yarı ömürleri sırasıyla 0–1621, 0–360 ve 0–180 gün arasında değişmektedir (Czarny-Krzyminska, et al., 2023) ve bu durumda sedimentte daha kalıcı olmaları beklenmektedir. Buna karşılık, atmosferik oksidasyon nedeniyle analogların havadaki yarı ömürleri ise düşüktür ve 0.11–3,62 gün arasında değişmektedir (Czarny-Krzyminska, et al., 2023). Bisfenol A ve analoglarının kıta ve ülkeler düzeyinde yapılan araştırmalar sonucu yüzey sularında ve sediment için belirlenen konsantrasyonlar Çizelge 1.2, Çizelge 1.3 ve Çizelge 1.4’te yer almaktadır. Çizelge 1.2’de görüldüğü üzere BPS, BPF ve BADGE, atık su ve atık su çamurunda tespit edilmiştir. Xue et al. (2015) tarafından yapılan çalışmada atık su arıtma çamurunda BPA tespit edilememişken, analoglardan BADGE’nin tespit edilmiş olması, analogların sucül ekosisteme giriş yollarından biri olarak düşünülen atık suların önemli bir kaynak olabileceğini doğrular niteliktedir (Çizelge 1.2). 2015 yılında deniz sedimentinde BPA ve analoglarının varlıklarının araştırıldığı bir diğer çalışmada ise analoglar ile ilgili mevcut bilgi bulunmuyorken, BPA varlığı rapor edilmiştir (Çizelge 1.2).

**Çizelge 1.2.** BPA ve analoglarının suda ve sedimentte bulunan konsantrasyonları

Örnek	Ülke	Suda ( $\mu\text{g/L}$ ) ve sediment ( $\text{ng/L}$ ) konsantrasyon aralığı		Referans
		BPA	Analoglar	
Amerika				
Yüzey suları	Brezilya (n=12) USA (n=10)	ND-1,4600 0,00137-0,2384	NA NA	Ramos et al., (2021) Wang et al., (2012)
Atık su	USA (n=32)	<LOQ-8,5500	BPF<LOQ-1,700 BPS<LOQ-0,7070 BADGE<LOQ-0,0380	Xue (2019)
İçme suyu	Brezilya (n=14)	<LOQ-0,0062	NA	Sodré and Sampaio, (2020)
Atık su arıtma çamuru	USA (n=76)	NA	BADGE<2,30-1980,00	Xue et al., (2015)
Deniz sedimenti	USA	ND-3,00	NA	Wang et al., (2015)

2013 yılında Taihu gölündeki BPA, BPAF, BPAP, BPB, BPF BPS ve BPZ konsantrasyonları sırasıyla 0,0042–0,0140, 0,0001–0,0110, ND-0,0004, ND, ND-0,0056 0,0003–0,0670 ve ND  $\mu\text{g L}^{-1}$  iken; 2017 yılında aynı göldeki BPA, BPAF, BPAP, BPB, BPF BPS ve BPZ konsantrasyonları sırasıyla 0,0280–0,5600, 0,0007–0,0230, 0,0010–0,0150, ND-0,028, ND-1,6000, 0,0045–1,6000 ve ND-0,0170  $\mu\text{g L}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir (Jin and Zhu, 2016; Yan et al., 2017). 2017 yılında Luoma gölündeki BPA, BPB, BPF, BPS ve BPZ'nin çevresel konsantrasyonları sırasıyla 0,0490–0,1100, 0,0064–0,0230, 0,0035–0,0140 ve ND-0,0040  $\mu\text{g L}^{-1}$  iken; 2019 yılında aynı göldeki BPA, BPB, BPF, BPS ve BPZ'nin çevresel konsantrasyonları sırasıyla 0,1100–0,2800, ND-0,0079, 0,0213–0,2300 ve 0,0032–0,0077  $\mu\text{g L}^{-1}$  olarak belirlenmiştir (Yan et al. 2017; Wang et al., 2022). Her iki çalışmada analogların endüstriyel ürünlerin üretimleri sırasında kullanılmalarının artmakta olduğunu göstermektedir. Bir başka çalışmada ise kaynak ve içme sularındaki bisfenol analoglarının varlığı araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, kaynak suyunda BPA, BPAF, BPB, BPE, BPF ve BPS aşağıdaki konsantrasyon aralıklarında tespit edilmiştir: BPA (nd – 34,9 ng / L), BPAF (nd– 10,8 ng / L), BPB (nd – 14,3 ng / L), BPE (nd – 6,2 ng / L), BPF (nd – 12,6 ng / L) ve BPS (nd – 5,2 ng / L). İçme suyunda ise BPA, BPAF, BPB, BPE, BPF ve BPS şu şekilde tespit edilmiştir ve bulunan değerler sırasıyla (nd - 6,5 ng / L), (nd – 4,7 ng / L), (nd – 3,2 ng / L), ( nd – 0,6 ng / L), (nd – 0,9 ng / L) ve (nd – 1,6 ng / L)'dir (Zhang et al., 2019). Çalışma doğal sulardaki BPE varlığını ilk defa bildiren olma niteliğini taşımaktadır.

Ambalajlama malzemeleri olarak kullanılan polikarbonat (PC) ve polietilen tereftalat (PET) Çin'in şişelenmiş sularında yaygın olarak kullanılmaktadır ve östrojenik bisfenol analoglarının şişelenmiş sulara geçebileceğini araştıran Wang et al., (2022) 10 bisfenol analogun varlığını tespit etmişlerdir. (BPA, BPE, BPB, BPC, BPF, BPP, BPS, BPZ, BPAP, BPAF). Yapılan çalışmada, 11 PET şişelenmiş su markasının tümünde BPA'nın 12,4-44,9 ng/L konsantrasyon aralığında tespit ettiklerini; BPE ve BPAF konsantrasyonlarının sırasıyla 1.8, ve 2,2 ng/L aralığında olduğunu, diğer analogların ise tespit edilmediğini rapor etmişlerdir. Çizelge 1.3'te görüldüğü üzere Çin'de yapılan çalışmalarda deniz ve nehir sedimentlerinde bisfenol analoglarının (BPC, BPZ, BPB, BPS, BPF vd) varlığı rapor edilmiştir. Elde edilen veriler, Çin'in bisfenol üretimi ve kullanımı açısından dikkat çeken bir ülke olduğunun göstergesi niteliğindedir. Ayrıca, deniz yüzey suları ve sediment dahil olmak üzere nehir/göllerde de tespit edilmeleri analogların tatlı su kaynaklarına

girişinin olduğunu ve bunların deşarj sularının deniz kirliliği açısından önemli bir kaynak oluşturabileceği düşünölmektedir (Çizelge 1.3.).

**Çizelge 1.3.** BPA ve analoglarının suda ve sedimentte bulunan konsantrasyonları

Örnek	Ülke	Suda (µg/L) ve sediment (ng/L) konsantrasyon aralığı		Referans
		BPA	Analoglar	
Asya				
Yüzey suları	Çin (n=23)	0,0059-0,1410	BPS 0,0002-0,0520 BPAF 0,0005-0,0096 BPAP ND-0,00005 BPFL ND-00007 BPZ ND-0,0007	Jin and Zhu (2016)
	Çin (n=25)	0,0139-0,1260	BPF ND-0,0131 BPS ND-0,1244 BPAF ND-0,1231 BPAP ND-0,0089 BPB ND-0,0088 BPC ND-0,0094 BPZ 0-0,0080 BPE ND-0,027 BPP ND-0,0028	Wang et al., (2022)
Atık su	Çin (n=10, giriş suyu)	0,6410-5,1900	BPF 0,0052-0,2330 BPS 0,0070-0,9230 BPAF ND-0,0185 BPC ND-0,0004 BPBP ND-0,0002 BPE ND-0,0071 BPG ND-0,0018	Huang et al., (2020)

Çöp sızıntı suyu	Çin (n=1)	27,6000	BPF 3,8400 BPS 0,0620 BPAF 0,0186 BPAP 0,0050 BPZ 0,0115 BPBP 0,0007 BPE 0,0979 BPP 0,0282	Huang et al., (2021)
Deniz sedimenti	Çin (n=28)	2,20-34,00	BPF ND-5,40 BPS 0,10-5,40 BPAF ND-1,00 BPAP ND-1,20 BPZ ND-1,20 TBBPA ND-0,30	Xie et al., (2022)
Nehir sedimenti	Çin (n=26)	26,60-1970,00	BPF 16,00-1040,00 BPS ND-5,60 BPAF ND-4,40 BPC ND-2,67 BPZ ND-2,32 BPBP ND-0,35 BPG ND-210,00 BPE ND-2,25	Huang et al., (2020)
Atık su sedimenti	Çin (n=9)	10,90-1027,00	BPF 141,00-1058,00 BPS 0,64-1,71 BPAF 3,3-6,98 BPB 0,10-0,48 BPG ND-0,53 BPE ND-3,17	Huang et al., (2020)

Çizelge 1.4'te görüldüğü üzere Slovenya ve İspanya atık sularında yapılan iki farklı çalışmada, İspanya için analoglardan BADGE için bulunan değer aralığı 0,5700-1,1500  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Ballesteros-Gómez et al., 2007) iken; Slovenya atık sularında ise BPE ve BPZ için bulunan değer aralıkları sırasıyla <LOD-0,2380 <LOD-0,4030 olduğu bildirilmiştir (Cesen et al., 2018).

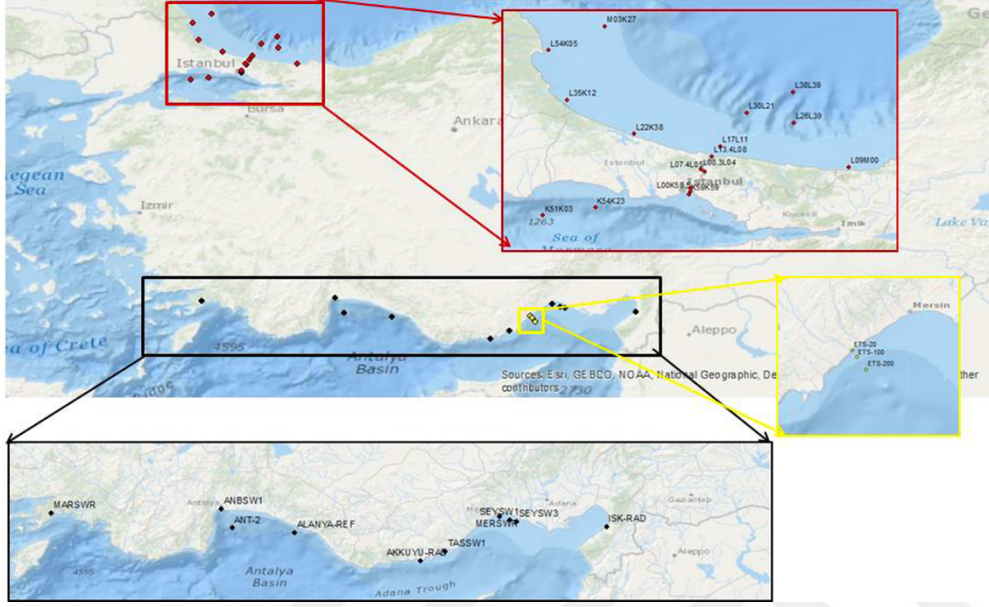
Çizelge 1. 4. BPA ve analoglarının suda ve sedimentte belirlenen konsantrasyonları

Örnek	Ülke	Suda ( $\mu\text{g/L}$ ) ve sediment ( $\text{ng/L}$ ) konsantrasyon aralığı		Referans
		BPA	Analoglar	
Avrupa	İspanya (n=3)	0,1000-0,3200	NA	Ballesteros-Gómez et al., (2007)
Atık su				
Atık su	Slovenya (n=47)	NA	BPF <LOD-0,0367 BPS <LOD-0,1640 BPAF <LOD-0,0490 BPAP <LOD-0,0846 BPB <LOD-0,0277 BPC <LOD-2,5600 BPZ <LOD-0,4030 BPE <LOD-0,2380	Cesen et al., (2018)
Çöp sızıntı suyu	Bosna Hersek ve Sırbistan Cumhuriyeti	700,0000-2780,0000	NA	Narevski et al., (2021)

Türkiye sularındaki BPA oluşumu ve dağılımının araştırıldığı ilk çalışma 2019 yılında gerçekleştirilmiştir. Şekil 1.2’de görüldüğü üzere Karadeniz, Akdeniz ve Marmara yüzey deniz suları ve dört bölgesel nehirden (Göksu, Lamas, Berdan ve Seyhan) yapılan örneklemeler sonucunda genel olarak BPA konsantrasyonlarının deniz suyunda 4,16-16,92  $\mu\text{g/l}$  ve nehir sularında ise 4,62–29,92  $\mu\text{g/l}$  aralığında değiştiği bildirilmiştir (Özhan ve Kocaman, 2019).

Nehirlerin yüksek seviyelerde BPA içerdiğini ve sürekli deşarjın deniz kirliliğine önemli bir katkısı olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca çalışmada BPA’nın derin denize (>500 m) ulaştığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, BPA’nın Türkiye denizlerindeki dağılımının kıydan açık denizlere doğru yaklaşık 13 km geniş bir alana yayıldığı ve tespit edilen konsantrasyonların üst sınırdaki olduğu rapor edilmiştir. Türkiye deniz ve tatlı sularında analogların varlığı ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Tüm çalışmalar sonucunda analogların sediment, yüzey

suları, atık sular, doğal kaynak ve içme suları dahil olmak üzere tüm çevresel kompartımanlarda tespit edildikleri görülmektedir. Bu durumda, sucul ekosistem ve insanlar için risk oluşturabilecek olmalarının yanı sıra var olan kirliliğe katkı sağlayarak sucul ekosistemin dengesinin bozulmasına yol açabilirler.



Şekil 1.2. Türkiye kıyılarında BPA örnekleme yapılan istasyonlar (Özhan ve Kocaman, 2019)

#### 1.4. Sucul ekosistemde kirliliğin belirlenmesinde kullanılan testler

Doğal ortama verilen herhangi bir kirletici/kimyasal maddenin ortamda yaşayan canlılar üzerindeki etkileri toksisite testleri ile belirlenebilmektedir. Bu testler kısa süreli etkileri veya uzun süreli etkileri ortaya çıkarmak amacıyla kullanılmaktadır. Çevresel kirliliğin yarattığı stres bireyden başlayarak trofik seviyelerdeki daha üst kademelerine kadar yani popülasyon, komünite ve ekosisteme etki edebilmektedir. Herhangi bir sistematik etkiyi belirleyebilmek için öncelikle bireylerin normal değerlerini gösteren veri bilgilerine gerek duyulmaktadır. Çevresel kirliliğin artışıyla beraber canlının adaptasyonu ve toleransı normal aralığın üzerine çıkabilmektedir. Canlılar doğal ortamlarda ksenometabolizma sayesinde değişiklikleri zarar görmeden atlatabilir ve bu mekanizmalar sayesinde kirleticilerin subletal etkilerine tolerans gösterebilmektedirler (Parlak vd., 2011). Ancak bu durum onların uzun süre hayatta kalma oranlarını azaltır ve kirliliğin artışıyla beraber ölüm gerçekleşir. Doz-cevap ilişkisi çevresel kimyasalların sebep olduğu risk ve zararın değerlendirilmesi için bir temel oluşturmaktadır. Ekotoksikolojik

açından bakıldığında ise çevreye giren veya bulunan çok düşük konsantrasyonlardaki kimyasallar/kirleticiler toksik etki yapabilmektedir. Çeşitli yöntemlerle belirlenen toksik etkilerden en yaygın olanı “ölüm” parametresi ile değerlendirilmez. Canlılar üzerindeki etkiler iki gruba ayrılmaktadır: a) Doğrudan letal toksisite b) subletal toksisite: üreme, fizyolojik, biyokimyasal veya davranış aktivitelerinin bozulması ve bunların moleküler düzeyde belirlenmesi.

Subletal toksik etkiyi belirlemek için yapılan çalışmalar genel olarak iki gruba ayrılabilir (Parlak vd., 2011);

- **Bütün organizma ile yapılan testler;** Tam yaşam döngüsü, kısmi yaşam döngüsü veya erken yaşam evreleri kullanılarak yapılan testler
- **Organizmanın içinde yapılan testler;** toksik aksiyonun mekanizmasını ortaya koymaya çalışan testlerdir.

### 1.5. Biyomarker (Biyobelirteç)

Deniz ve tatlı sular insanların dolaylı veya doğrudan etkisiyle beraber her geçen gün kirlenmektedirler. Çeşitli ve çok sayıdaki kimyasalın sucul ortamlara giriş yaptığı bilinmektedir. İnsanlar için yarar sağlayan deniz suları ve kaynakları oldukça önemlidir. Ancak, deniz sularının ve kaynaklarının insanlar tarafından bilinçsizce/sürdürülemez kullanılması ve tahrip edilmesi birçok deniz ekosisteminin yapısını ve işlevini büyük ölçüde değiştirmiştir (Osterblom et al., 2017; Rocha et al., 2015). Antropojenik etkiler biyolojik çeşitlilik kaybı (Worm et al., 2006), ötrofikasyon (Nixon, 1995; Wurtsbaugh et al., 2019), kimyasal ve kirletici salınımları (Amato et al., 2006; Fliedner et al., 2020; Tornero and Hanke, 2016), deniz çöpleri (Bergmann et al., 2015; Consoli et al., 2020) olmak üzere farklı şekillerde kendilerini göstermektedirler. Ekosistemin sağlıklı bir şekilde devamlılığı açısından kimyasalların organizma seviyesinden başlayarak, popülasyon ve komünite seviyelerine kadar nasıl ve ne derecede etkilediği sorusunun cevabının bulunması gerekmektedir. Bu durumda kimyasalların yarattığı etkileri ortaya çıkarabilmek için ekotoksikolojik testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kimyasalların sudaki ve sedimentteki bulunma miktarları, birikimleri ve onların ölümlerine yol açan eşik konsantrasyonların bilinmesi kompleks bir yapıdan oluşan sucul ekosistemin güvenliği ve devamlılığı açısından yeterli değildir. Bu bağlamda, ilk biyomarker (biyobelirteç) yaklaşımı orijinal olarak farmakoloji/tıbbi toksikoloji

alanında geliştirilmiş ve daha sonra çevresel değerlendirme ve izleme çalışmalarında kullanışlı hale getirilmiştir (McCarty et al., 2002).

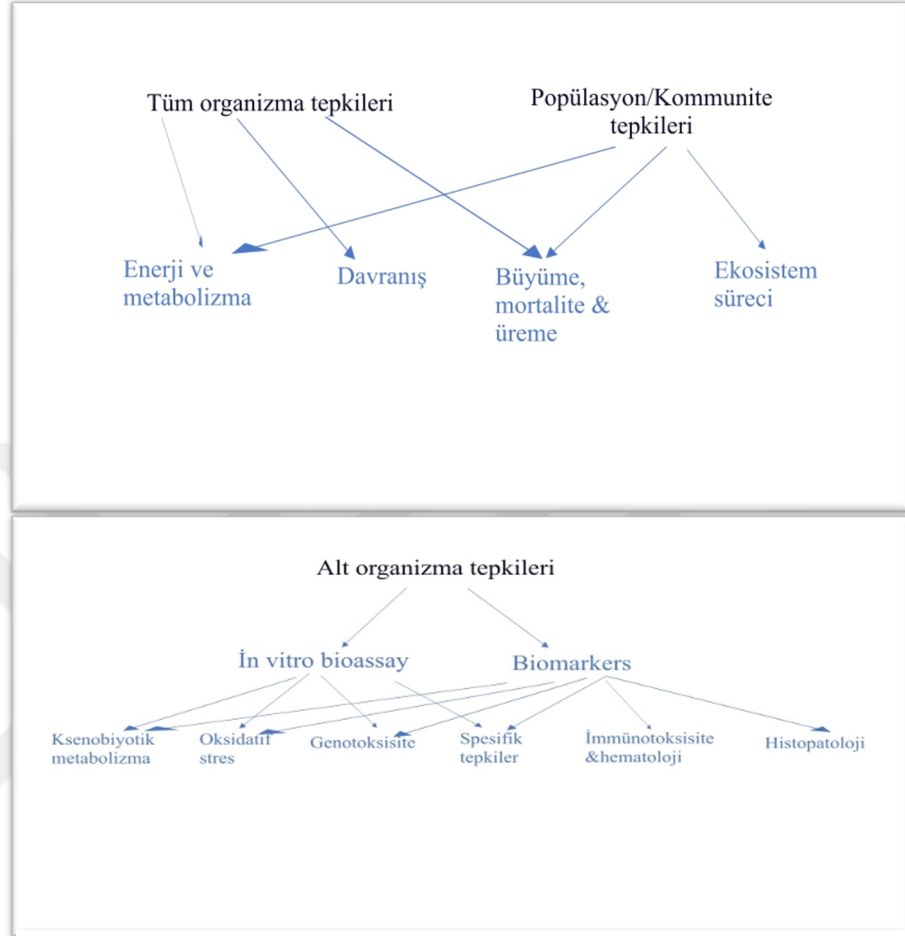
Ulusal Bilimler Akademisi/ Ulusal Araştırma Konseyi Biyobelirteç Komitesi (NAS/NRC), (1989) tarafından tanımlanan daha sonra da Shugart et al. (1992) tarafından değiştirilen tanımlama “Biyomarker (biyobelirteç), biyolojik bir sistem veya örnekten ölçülebilen hücrenel veya biyokimyasal bileşenler veya süreçlerde, yapılarda veya işlevlerde ksenobiyotik olarak indüklenen bir varyasyondur.” McCarty and Munkittrick, (1996) biyomarker’ı şu şekilde tanımlamışlardır: “Biyomarker (biyobelirteç), biyolojik bir örnek veya sistemde ölçülebilen biyokimyasal, fizyolojik veya ekolojik bileşenlerde, süreçlerde veya yapılarda antropojenik olarak indüklenen bir varyasyondur.” Bir diğer tanımlama ise Parlak vd., (2011) tarafından yapılmıştır. Bu tanım ise şu şekildedir: “Toksik maddenin canlıya geçtiğini, dokular içinde dağıldığını ve hedef organlarda toksik etkiler yaptığını ortaya koyabilecek hassas belirleyicilerdir.”

Her üç tanım göz önüne alındığında, kimyasalların/kirleticilerin laboratuvar ortamında ya da kirlili bölgelerde yaşayan sucul organizmalardaki etkilerin değerlendirilmesi için bütünsel bir araç olarak görülebileceği sonucuna varılmaktadır. Canlı vücudundaki kimyasal konsantrasyonun ölçülmesi canlıdaki etkileri ortaya koymamaktadır. Biyobelirteç ölçümleri, bir organizmanın o toksik maddeye maruz kaldığını ve detoksifiye edemeyecek veya etkisini ortadan kaldıramayacak seviyede olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, hedef moleküler veya hücrenel tepkiler oluşmaktadır (Parlak vd., 2011).

Biyobelirteç ölçümlerinin avantajları ise şu şekilde sıralanabilir (Parlak vd., 2011):

- Koordineli araştırma programlarında biyoişaret ölçümleri komünite ve popülasyon verilerini daha iyi değerlendirmesini sağlamaktadır.
- Biyoişaretler vücutta biriktirilmeden çabucak metabolize edilerek atılan PAH gibi bileşiklere maruz kalınıp kalınmadığını gösteren deliller sunmaktadır.
- Kompleks kirleticilerin etkisini ortaya koymaktadır.
- Popülasyon biyolojik gözlemlerinden elde edilen veriler ekolojik etkinin son göstergesi olup, oysa biyoişaret ölçülerek yapılan biyolojik gözlemler daha

hassas ve kesin gösterge niteliği taşımaktadır ve etkinin sebebinin ortaya çıkarılmasına yardımcı olmaktadır.



**Şekil 1.3.** Organizmaların tepkileri alt organizma, tüm organizma ve/veya popülasyon/komünite tepkilerinde kullanılan biyomarker

Şekil 1.3'te organizmaların tepkileri alt organizma, tüm organizma ve/veya popülasyon/komünite tepkilerinde kullanılan biyobelirteç'ler yer almaktadır (Schuijt et al., 2021).

Ulusal Araştırma Konseyi Biyobelirteç Komitesi (NRC) ve Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 3 farklı biyobelirteç kavramından söz edilmektedir. Bu kavramlar kirletici maddelerin varlığına, düzeyine ve organizmada geliştirdikleri reaksiyonlara bağlı olarak vücut sıvılarında, hücrelerde ve dokularda ölçülebilmesine dayanmaktadır. Bu kriterlere göre; maruz kalmaya bağlı olanlar, etkilenmeye bağlı olanlar ve duyarlılığa bağlı olanlar şeklindedir (Dönmez ve Yılmaz, 2015).

**Maruz kalmaya bağlı olanlar;** ekzojen maddelerin kendilerinin, metabolitlerinin veya ksenobiyotik bir ajan ile etkileşimleri sonucu ortaya çıkmış bir ürünün hedef molekül veya hücrelerde ölçülmesi ile elde edilmiş belirteçlerdir.

**Etkilenmeye bağlı olanlar;** olası bir sağlık sorunu ya da hastalık durumunda doku veya vücut sıvılarında biyokimyasal, fizyolojik ve diğer hasarların ölçülebilir olanlarını gösteren belirteçlerdir.

**Duyarlılığa bağlı olanlar;** ekzojen etkene maruz kalındığında organizmanın duyarlılığını farklılaştıran reseptörlerde şekillenen değişiklikler ile spesifik bir ekzojen etkene maruz kalındığında genetik faktörleri de içeren doğal ve kazanılmış yanıt yeteneğinde farklılaşmalardır (Van der Oost et al., 2003).

### 1.5.1. Genotoksik biyobelirteç mikronükleus

En genel kapsamıyla genotoksik etki, DNA ve genomun replikasyonunu sağlayan enzimlerle etkileşime girerek mutasyona neden olan kimyasalların DNA'da hasar oluşturması ve mutasyona yol açması şeklinde tanımlanmaktadır. Genotoksik bir maddeye maruz kalan hücrelerde çeşitli değişiklikler meydana gelebilmektedir. Ortaya çıkan hasarların DNA tamir mekanizmalarıyla tamir edilememesiyle beraber normal olmayan DNA yapıları oluşumu (kromozomal aberasyonlar, mikronükleus, anöploidi vb.) gerçekleşmektedir. Bir başka açıdan ise bu hasarlar patolojik boyutlarda (neoplazi, tümör, kanser vb.) oluşabilmektedir (Parlak vd., 2011). Sucul ekosistemlere salınan bu kirleticilerin/kimyasalların belirlenmesi ilk olarak doğal popülasyonların genetiklerinin korunması için önemli olmakla beraber, suda yaşıyan organizmalarda etkilerinin belirlenmesi insan gıda zincirine girmesini önlemek açısından da önem arz etmektedir (Osman, 2014). Bir diğer açıdan, toksik maddeye maruz kalınması canlı hücrelerin DNA'sına zarar verebilir. Bu DNA lezyonları onarılmazsa hücresel, morfolojik ve tüm hayvanda, popülasyonda ve son olarak komünite düzeyinde bir dizi biyolojik sonuçlar başlatabilir (Lee et al., 2003). Bu yüzden, sucul ekosistemlerde genotoksik etkilere neden olabilecek kirleticilerin/kimyasalların belirlenmesinde kullanılan genotoksik yöntemler oldukça önem kazanmaktadır. 1970'li yıllardan bu yana su kirliliğinin genotoksik etkilerinin araştırılması ve risklerin belirlenmesi için çeşitli teknikler geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bu testlerden kardeş kromatid testi ve kromozom aberasyonların zaman alıcı olması, çoğalan hücre popülasyonunu gerektirmesi, birçok sucul organizmanın kromozomlarının nispeten küçük olması nedeniyle çok etkili olduğu düşünülmemektedir (Osman 2014). Bu dezavantajların aksine

sonuçların hızlı elde edilebilmesi, metafaz safhasında tespit edilebilmesi, her denemede 1000'lerce hücre sayılmasına olanak vermesini sağlayan mikronükleus testi geliştirilmiştir (Bolognesi et al., 1996; Nalbantlar ve Arslan, 2017).

Mikronükleus (MN), bölünen hücrenin anafazından geriye kalan ve telofaz sırasında ana çekirdeğe dahil olmayan tüm kromozomlar/kromatitler veya asentrik kromatid/kromozom fragmentleri olarak tanımlanır. Küçük ekstra nükleer cisim (nuclear body) olarak da tanımlanan mikronükleus bir zar ile çevrilidir ve boyutları daha küçük olmasına rağmen yavru çekirdeğin yapısına benzemektedir (Fenech et al., 2011). MN'deki tüm kromatitler veya kromozomlar, genellikle mitotik iş yetmezliği, kinetokor hasarı, sentromerik DNA hipometilasyonu ve hücre döngüsü kontrol sistemindeki kusurların neden olduğu anafaz sırasında kromozom ayırımındaki eksiklikler nedeniyle oluşmaktadır (Fenech et al., 2011; Luzhna et al., 2013). Mikronükleus testi, çevresel kirleticilere maruz kalmanın genotoksik etkilerini tahmin etmek için 1980'li yılların başından beri kullanılmaktadır. Mikronükleus oluşumu, herhangi bir türün bölünen hücrelerinin herhangi birinde meydana gelebilir. Mikronükleus sayısı, kromozom kırıklarına ve mitotik iş ipliği bozulmalarına bir kanıt (belirti) olarak hizmet etmektedir (Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000). Çevresel mutajenez araştırmalarında suda yaşayan organizmaları kullanarak gerçekleştirilen MN testinin, su kirliliğinin biyolojik etkisini değerlendirmek için basit, güvenilir, hassas ve ucuz bir prosedür olduğu kanıtlanmıştır (Bolognesi et al., 1996; Osman, 2014; Arslan vd., 2021).

Klastojenik ve mutajenik kimyasalların belirlenmesine olanak sağlayan mikronükleus testi, interfaz aşamasındaki hücreleri hedef alarak gerçekleştirildiği için tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk olarak memeli türleri ile geliştirilen bu test, günümüzde omurgasızlar midye, balık, deniz kestanesi, istiridye, yengeç ve solucanlar dahil olmak üzere farklı sucul organizmalarda uygulanabilmektedir (Bolognesi and Hayashi, 2011). Ayrıca bu test, omurgasızlarla ve balıklarla kontamine alanların biyolojik izleyicisi olarak (Klobučar et al., 2003; Arslan et al. 2010) ve in vivo doğrudan veya dolaylı maruziyetten sonra kimyasalların genotoksitesitelerini (Bolognesi et al., 2004) belirlemek için başarıyla kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar tarafından nükleer lezyonlar (NL) genotoksik kökenli olarak kabul edilmektedirler ve sucul organizmalarda sitogenetik hasarın bir göstergesi olarak kullanılmaktadırlar. Nükleer lezyonların çoğu mikronükleus ile benzer bir kökene sahiptirler, bu tür anormal hücre bölünmesi kanserojenizde (kansere yol açan, kanser yapıcı) de yer alabilen hücrelerin genetik dengesizliği ile sonuçlanmaktadır (Rodilla et al., 1993). Araştırmacıların bir kısmı ise bazı nükleer

lezyonların MN'nin öncüsü olabileceğini savunmaktadırlar. Nükleer lezyonların (anomalilerin) oluşumunun çekirdekdeki güçlü halde yer alan genlerin ortadan kaldırılmak için bir süreci temsil ettiği düşünülmektedir (Osman, 2014).

Fenech (2007) protokolüne göre MN testi nükleer tomurcuklanma (nuclear bud), apoptozis, nükleoplazmik köprü gibi diğer nükleer anomaliler olarak adlandırılan genotoksik olarak kabul edilen yapıların belirlenmesinde kullanılan bir test yöntemidir. DNA zincir kırıklarının yanlış onarılması, aynı zamanda disentrik halka kromozomlarının ve zincirlenmiş halka kromozomlarının oluşumuna yol açabilir ve bu da nükleoplazmik köprünün (NPBs) oluşumuyla sonuçlanabilir. Nükleoplazmik köprülerin oluşumu için bir diğer mekanizma telomer kısalması, telomeri kaplayan proteinlerin kaybı, telomer uç füzyonudur. Bu durumda nükleoplazmik köprülere her zaman asentrik kromozom fragmanı veya bir MN eşlik etmemektedir. NPB'lerin oluşumu kemirgen ve insan bağırsak kanser hücrelerinde gözlemlenmiştir ve telomer uzunluğu ile ilişki olduğu tespit edilmiştir (Rudolph et al., 2001). Gerçek zamanlı in vitro çalışmalar, geç anafaz sırasında birden fazla bölgede anafaz köprülerinin kırılabilceğini, bunun da asentrik kromozom parçalarının ve sonunda MN'nin oluşumuna yol açabileceği belirlenmiştir (Hoffelder et al., 2004; Shimizu et al., 2005). Bu nedenle, bazı MN'ler kırık anafazdan da kaynaklanabileceği için nükleoplazmik köprü oluşumu ve sayısı önemlidir (Fenech, 2007). Nükleer tomurcuklanma (nuclear bud) (NBUD), tomurcuklanma aşamasına bağlı olarak çekirdeğe bir ok gibi bağlanması dışında bir MN ile aynı morfolojiye sahip olarak karakterize edilmektedir. MN ile morfolojik olarak benzemesine karşılık NBUD'ların kökeninin farklı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Fenech et al., 2011). NBUD oluşumu nükleer bölünmeden sonra fazla kalan DNA parçasından veyahut nükleoplazmik köprünün kırılmasından hemen sonra geçici olarak oluşabilmektedir. Genel olarak kromozomal instabilite (kararsızlık, dengesizlik) ile ilişkilendirilmektedir. Kromozomal istikrarsızlık, değişen gen miktarı nedeniyle, homeostatik kontrol mekanizmalarından ve bağışıklık mekanizmalarından kaçabilen çeşitli anormal genom tiplerine hızla evrilme ve mutasyona uğrama potansiyeline yol açmaktadır (Gisselsson et al., 2001; Negrini et al., 2010). Anafaz köprülerinin veya NPB'nin oluşumu, hücrelerde kromozomal istikrarsızlığın ana itici gücü olan kırılma-füzyon-köprüsü (BFB) döngülerine yol açan başlatıcı olaydır. Anafaz köprüleri eşit olmayan bir şekilde kırıldığında, ki bu neredeyse her zaman olur, yavru hücrelerden biri ek gen kopyaları olan bir kromozom alır ve diğer yavru hücre bazı genleri kaybeder. Bu tür kırık kromozomlar, kırık uçta telomer dizilerinden yoksun olduklarından, DNA sentezinden sonra replikalarıyla kaynaşmaları muhtemeldir ve

bu BFB döngüsünü sonraki hücre bölünmelerinde devam ettirir (Fenech et al., 2011). Çoğaltılan genler sonunda rekombinasyonel mekanizmalar tarafından bu anormal kromozomdan çok küçük kromozomlara dönüşür. Küçük kromozomlar, mikro hücreler oluşturmak üzere hücreden çıkarılmadan önce geçici olarak MN haline gelerek nükleer tomurcuklanma yoluyla kopyalanabilir ve/veya ortadan kaldırılabilir. Diğer nükleer anomalilerin mekanizmaları ve oluşumları ile ilgili farklı görüşlerin olmasına karşılık genel anlamda Mikronükleus gibi genotoksik biyobelirteçler olduğu bilinmektedir ve kabul edilmektedir. İnsan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı ile bir popülasyonun kanser riski arasındaki ilişkiler tanımlanmıştır (Bonassi et al. 2011; Maffei et al. 2014). Bu bilgiler ışığında, mikronükleus testinin tüm canlılar için uygulanabildiğini, aynı zamanda hassas sonuçlar verdiğini göstermektedir.

### 1.5.2. Apoptoz

Apoptoz, diğer adıyla programlanmış hücre ölümü, çok hücreli organizmaların yaşam evrelerinde görülen doğal bir süreçtir. Apoptoz Yunanca'da, apo: ayrı ve ptozis: düşen kelimelerin bileşimi olan ve sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir. İlk kez 1972 yılında Kerr, Wylie ve Currie tarafından "fizyolojik hücre ölümü" ifadesi tanımlanarak, yine ilk olarak Wylie ve Kerr tarafından yapılan deneysel bir çalışma ile gösterilmiştir (Kidd and Tang, 1998). Çok hücreli canlıların erişkin bireylerinde hücrelerin sayısal dengenin korunması ve canlının sağlıklı bir şekilde hayatına devam edebilmesi çok önemlidir. Gelişim biyolojisinde hücrelerin programlı ölümleri etkin rol oynar. Organ gelişiminin sağlıklı bir şekilde olabilmesi embriyonik gelişme sırasında gerçekleşen hücre ölümlerine bağlıdır. Yetişkin bir insanda yaklaşık 1010 hücre programlı hücre ölümü ile her gün elenir. Bu da bir yıl içerisinde tüm vücut ağırlığına karşılık gelmektedir (Bagci, 2007). Apoptozun işlevleri arasında;

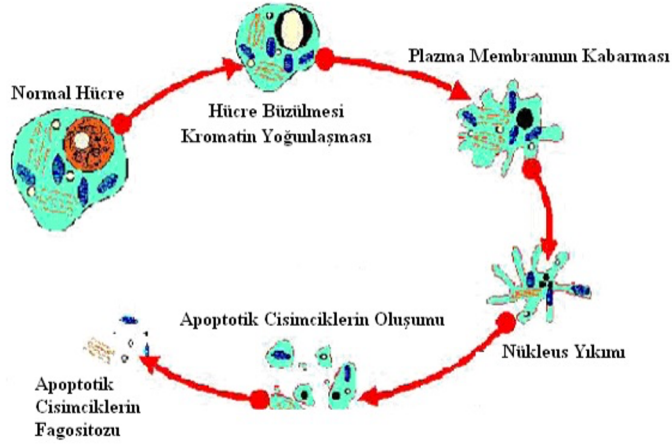
1. Dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur.

2. Organizma için tehlike arz eden hücrelerin tümüyle ortadan kaldırılmasını sağlayarak önemli bir savunma da oluştururlar (Virüsle enfekte hücreler)

3. DNA hasarı oluşması durumunda, hasarın meydana geldiği hücre apoptoz ile ortadan kaldırılır. Bu şekilde DNA yapısında zararlı mutasyonları bulduran hücrelerin kanserleşme potansiyeli ortadan kaldırılmış olmaktadır.

Organizmanın yaşamı boyunca ihtiyacı olan faaliyetleri devam ettirebilmesi için bazı hücrelere ihtiyacı varken bazı hücrelere ise bir süre sonra ihtiyacı kalmamaktadır. İhtiyacının kalmadığı bu hücreler genelde ya hasar almış ya da enfekte olmuş hücrelerdir ve canlıya zarar vermemesi için bu hücrelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir (Yıldırım, 2010). Bu süreçte programlı hücre ölümü devreye girer ve canlının ihtiyaç duymadığı hücreler çevredeki hücrelere zarar vermeden ortadan kalkmaktadır (Yıldırım, 2010). Olmaması gereken bir durumda apoptoz gerçekleşir ise ya da olması gereken bir durumda apoptoz gerçekleşmez ise bu durumlar organizma için oldukça büyük bir tehlike yaratmaktadır. Apoptozisin hızlandığı hastalıklar; AIDS, Nörodejeneratif hastalıklar, İnsüline bağlı tip diyabet, Hepatit C enfeksiyonu, Miyokard enfarktüsü iken apoptozisin yavaşladığı hastalıklar; Otoimmün hastalıklar ve kanserdir.

Hücre, ölüm sinyalini aldıktan sonra biyokimyasal ve morfolojik olarak değişiklikler oluşmaya başlamaktadır ve hücre yapısında meydana gelen bu değişiklikler ile hücre geri dönüşü olmayan bir yola girmektedir (Yıldırım, 2010). Akut bir hasar alan hücre nekroza uğrar ve hücrenin çekirdeği şişer, organellerin bütünlüğünün bozulması sonucunda hücre şişerek patlar. Böylece hücre içerikleri çevreye dağılır ve çevresindeki hücrelere etki ederek onlara da zarar vermiş olur. Diğer bir hücre ölümü şekli olan apoptozda ise hücre ölüm sinyalini aldıktan sonra büzülür ve yoğunlaşır (King, 2000) (Şekil 1.4). Apoptoza uğramış olan bir hücre artık morfolojik olarak değişmiştir. Hücrenin morfolojisindeki büzüşmenin nedeni,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücrenin içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Bu durum apoptoza uğramış olan hücrenin makrofajlar ve diğer komşu hücreler tarafından fagosite edilmesini kolaylaştırır. Nekroz komşu hücrelere zarar verirken, apoptoz ise ölen hücrelerin organik bileşiklerinin onu sindiren hücrelerde yeniden kullanılmasını sağlar (Alberts et al., 1983).



Şekil 1. 4. Apoptoz süreci

Apoptoz hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda çeşitli çevresel veya doğal stres faktörleri tarafından hücre içeriğinin dışsal veya içsel yolla bozulmasına yol açan bir süreçtir (Tittel and Steller, 2000). Apoptotik mekanizma kromatin yoğunlaşması, çekirdek parçalanması ve apoptik cisimlerin görünümü (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980) dahil morfolojik değişikliklerin yanı sıra DNA'nın önce büyük parçalara ve ardından oligonükleozomlar olarak (Wyllie et al., 1980; Schwartzman and Cidlowski 1993; Zheng et al., 1998; Enari et al., 1998) adlandırılan daha küçük parçalara indirgenmesi gibi biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilmektedir. Apoptoz sürecinde kaspazlar (yapısal olarak sistein proteazlar; sistein-bağımlı aspartik asit-spesifik proteazdır) başlatıcı ve efektör olarak sınıflandırılmaktadır. Romero et al., (2011) çalışmasında midye için kaspaz 2 ve kaspaz 8'i başlatıcı, kaspaz 3/7-1, kaspaz 3/7-2, kaspaz 3/7-3 ve kaspaz 3/7-4'ü efektör kaspazlar olarak tanımlamışlardır. Apoptozun erken evrelerinde sentezlenen kaspaz proteinleri hücreyel birçok bileşenin hidrolizinde görev alırlar. Apotozun merkezinde rol alan bu proteinler; ölüm sinyalinin iletilmesi ve apoptoz da ortaya çıkan biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere sebep olan birçok hücreyel proteinin parçalanması olmak üzere iki temel göreve sahiptirler (Salvesen and Dixit, 1997). Bu bilgiler ışığında, apoptoz sucul ekosistemde kimyasalların/kirleticilerin farklı trofik seviyelerdeki canlılar üzerinde yarattığı etkilerin araştırılması için tercih edilen spesifik olmayan-biyobelirteç olarak da tanımlanan yöntemlerden biridir.

### 1.5.3. Histopatoloji

Hücre, doku ve organ örneklerinin mikroskopik inceleme sonrasında yorumlanması yoluyla hastalıkların araştırılması ve incelenmesidir. Bir organizmanın kimyasal maddelere maruz kalmasının etkilerini veya riskini araştırmak için bir biyobelirteç olarak tanımlandığında ise, kirlilik derecesine erişim dahil olmak üzere morfolojik dereceleri değerlendirmek için güçlü bir araç olarak kabul edilmektedir. Kimyasallara maruz kalmanın olumsuz etkileri göz önüne alındığında histopatolojik bulgular önemli biyolojik veriler sağlamaktadır (Yancheva et al., 2016). Histopatolojik analizler çevresel değerlendirmelerde de kullanılmaktadır. Subletal düzeydeki stresörlere maruz orta düzeyde bir yanıt olarak ortaya çıkması ile farklı doku ve organlarda özellikle kronik vakalarda irkiltici maddenin etkisini göstermede çabuk bir teknik olması nedeniyle önemlidir (Bernet et al., 1999). Ksenobiyotikler metabolizmada değişikliklere yol açan enzimlerin salınımına neden olarak hücrel toksikasyona ve hücre ölümlerine yol açmakta ve bu da histopatolojik incelemede nekroz alanları ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca histolojik değişikliklerin duyarlılığı yüksektir ve erken gelişmektedir.

Histolojik biyobelirteçlerin kullanımının en büyük avantajlarından biri, belirli hedef organları inceleme olanağı sağlaması ve doğrudan/dolaylı toksik etkilerin dokuları nasıl etkilediğinin belirlenmesine olanak sağlamasıdır (Oliveira Ribeiro et al., 2006; Salamat and Zarie, 2016). Histopatolojik değişikliklerin kontamine alanlara maruz kalınmasının bir biyobelirteci olarak kabul edilmesinin izleme, tehlike takibi veya yasal değerlendirmeler açısından oluşturulacak çevresel inceleme programlarına önemli bilgiler sunduğu kaydedilmektedir (Reddy, 2012).

1970'li yıllardan itibaren histopatolojik değerlendirme artan kirlilik ve oluşan çevre duyarlılığı nedeniyle tercih edilen bir biyobelirteç olarak, 1990 yılından itibaren ise "kimyasal ve hücrel etkileşimi izleyen daha yüksek düzeyde bir yanıt" olarak çevre ve sucul organizmaların sağlığı için tanımlanan bir biyobelirteçtir (Rašković and Poleksić, 2017). Histopatolojik değerlendirme, özellikle düşük seviyeli toksik stres için güvenilir ve kolay ölçülebilir bir indeks sağlamaktadır (Osman et al., 2010). Histopatolojik indeksler, tanımlanan lezyonun ciddiyetini ve organdaki yayılma seviyesini dikkate alan yarı kantitatif yöntemlere dayalı olarak hesaplanabilmektedir. Bu hesaplama yöntemi de kirlleticilere maruz kalmanın biyolojik etkilerinin değerlendirilmesi için önem taşımaktadır (Briaudeau, 2019). Histopatolojik biyobelirteçler, organizmanın bir veya daha fazla toksik maddeye, geçmişte veya o anda maruz kalmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan doku

lezyonlarını kapsadığı için genellikle karaciğer, böbrek, solungaç, ovaryumlar, iskelet ve deri dokularında tespit edilen lezyonlar biyobelirteç yanıtlar olarak değerlendirilmektedir (Reddy, 2012). Ekotoksikolojik çalışmalarda en yaygın örneklenen organlar; solungaçlar, karaciğer, böbrek ve deridir; yumuşakçalar söz konusu olduğunda solungaçlar daha öncelikli incelenen bir doku olarak ortaya çıkmaktadır (Fontanetti et al., 2010).

#### 1.5.4. Embriyotoksosite

Sucul organizmalar kritik yaşam döngülerinde ve hatta tüm yaşam döngülerinde çeşitli kirleticilere/kimyasallara sürekli maruz kalmaktadırlar. Bu maruz kalmanın sonucunda sucul kirleticiler organizmalarda, popülasyon ve ekosistem seviyesinde, organ fonksiyonlarında, üreme safhalarında veya organizma üzerinde çok yönlü zararlara neden olmaktadır. Sucul canlıların larvalarının çevresel kirleticilere karşı yetişkinlerden daha duyarlı olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Arslan ve Parlak, 2008; His et al., 1997).

Kirleticilerin/kimyasalların subletal toksik etkiyi belirlemek için erken yaşam evreleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Larva aşaması metamorfoz, morfolojik gelişme, beslenme, büyüme önemli süreçlerdir. Kirleticilerin bu dönemde yaratacağı kritik etkiler ise; biyokimyasal değişimler, fizyolojik zarar, deformiteler, davranış değişiklikleridir (Parlak vd., 2011).

Erken yaşam evreleri canlıların en hassas olduğu dönemlerdir. Gelişimdeki hızlı değişim embriyo, larva hatta ilk jüvenil evrelerde yüksek mortaliteye (ölüme) neden olmaktadır. Bu dönemde yapılan testler, kimyasalların/kirleticilerin etkilerinin belirlenmesini sağlamakla beraber su kalitesi kriterlerinin oluşturulmasına olanak sağlamaktadır ve yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Yeni yumurtadan çıkmış balıkların çeşitli toksik maddelere 4 günlük bir maruziyetten sonra yapılan nükleik asit (DNA, RNA) ölçümleri 29 günlük testlere eş değer sonuçlar verdiği ve etkinin çok erken safhalarda ve hızlı olduğu sonucuna varılmaktadır (Parlak vd., 2011). Balıklar dahil omurgasız canlılar (deniz kestanesi, midye, rotifer) toksisite testlerinde oldukça yoğun kullanılmaktadır.

Özellikle *Daphnia spp.*, *Paracentrotus lividus*, *Arbacia lixula* türleri ile hem kimyasalların etkileri hem de biyomonitör (biyoizleme) çalışmalarında su-sediment kirliliği belirlenmektedir (Arslan ve Parlak, 2008, 2017). Omurgasız türlerle yapılan bu çalışmalarda hızlı sonuç alınması, yumurta ve sperm alımının kolay ve

sürekli olması gibi avantajlar söz konusudur (Arslan vd., 2008). Bu safhada kirleticilerin/kimyasalların organizmayı etkileyen konsantrasyonlarının belirlenmesi ekosistemin sağlığı ve güvenliği açısından oldukça önemlidir.

### 1.6. Biyoindikatör ve Sentinel Türler

“Biyoindikatör (biyolojik göstergeler)” terminolojisi belirli bir ekosistemdeki değişikliklerle ilgili tüm biyotik ve abiyotik reaksiyon kaynaklarını tanımlayan bir gözetim terimidir. Taksonlar çevredeki doğal değişikliklerin veya ekosistemdeki değişikliklerin etkilerini göstermek için kullanılmaktadırlar. Ayrıca ekosistemdeki biyoçeşitliliği etkileyebilecek kirliliğin meydana gelmesiyle oluşan değişikliklerin tespit etmek için kullanılabilirler. Biyolojik sistemdeki her varlık, çevresi için biyolojik bir gösterge işlevi görebilmektedir. Çeşitli kirleticilerin sinerjistik ve antagonistik etkilerini tespit edebilmek ve kirleticilerin biyotoya yönelik beklenen zararlı etkilerini belirleyebilmek için kullanılmaktadırlar. Bununla beraber, belirli bir biyolojik göstergenin gücü kirlilik açısından bir erken uyarı sinyali görevine sahip olunmasını sağlamaktadır (Zaghloul et al., 2020). Biyolojik gösterge kriterleri, kirliliğe hızlı ve doğru tepki verme, hedeflenen amaca uygunluk, belirli ekosistemde yanlış yönetim ve kullanım, kirlilik ve/veya iklim değişikliklerinin sebep olduğu değişimleri tespit etme yeteneğidir (Zaghloul et al., 2020). Biyolojik göstergelere verilen yanıtlar, bazı durumlarda karmaşık bir yapıya sahip olmasına rağmen, esasen fizyolojik bir bağlam içerisindedirler. Buna karşılık, en değerli biyolojik gösterge kanıtları içerisinde yer alan büyüme, beslenme ve üreme doğrudan gözleme tabi oldukları için istisna olarak kabul edilmektedirler (Parlak vd., 2011). Öte yandan, yapısal olarak adlandırılan tepkiler en görünür olanlarıdır ancak neden olan kirletici tarafından başlatılan bir sürecin sonunda ortaya çıkmalarından dolayı kullanım açısından zorlukları vardır. Bir komünite içerisinde yaşayan farklı canlı türlerinin kirleticilere/kimyasallara karşı her zaman aynı tepkiyi vermedikleri ve aynı derecede yansıtmadıkları bilinmektedir. Bu yüzden çok düşük konsantrasyonlarda bulunan kimyasalların etkilerini belirleyebilmek için biyolojik göstergenin hassasiyet aralığının buna göre belirlenmesi gerekmektedir. Biyolojik göstergelerin en büyük faydalarından birisi fiziksel ve kimyasal analizlerin sınırlı kaldığı alanlarda kirleticilerin biyota üzerindeki etkilerini sergileme (ortaya çıkarabilme, gösterebilme) yetenekleridir. Biyolojik göstergelerin genel amacı, belirli bir ekosistemin kalitesini ve zaman içinde nasıl değiştiğini değerlendirmek için tek bir türü veya küçük bir biyota grubunu kullanmaktır. Biyolojik göstergelerin sürekli olarak ekosistemlerinin genetik, fiziksel ve kimyasal bileşenlerinden gelen bilgileri entegre edilmesini sağladığı bildirilmektedir (Nkwoji et al., 2010). Herhangi bir iyileştirme sürecinin nihai hedefi sadece kirliliği

ortadan kaldırmak değil, aynı zamanda ekosistem sağlığını korumaktır. Günümüzde biyolojik göstergeler, örneğin Dünya Koruma Birliği, Uluslararası Doğayı Koruma Birliği gibi çeşitli kuruluşlar tarafından biyolojik izlemeyi ele alan araçlar olarak kullanılmakta ve onaylanmaktadır.

19. yüzyıldan bu yana “Sentinel Türler” kavramı kullanılmaktadır ve birçok araştırmacı tarafından tanımlanan bu terim zaman içerisinde farklı bağlamlarda gelişerek farklılıklar ortaya çıkmıştır. Günümüzde “Sentinel Türler”in tanımı; çevredeki bir işlevin bozukluğu veya dengesizliği hakkında uyarı veren öte yandan maddelerin insan sağlığına yönelik tehlikeleri hakkında uyarı veren herhangi bir tür olarak kabul edilmektedir. Daha geniş kapsamla sentinel türler;

- Yokluğuna (veya varlığına) ve/veya bireylerin bolluğuna göre bilgi sağlayan bir biyogösterge tür,
- Çevredekinden çok daha yüksek seviyelerde kirletici madde biriktirme kapasitesi olan biyobirikimli tür,
- Kirleticilerin varlığıyla ilişkili riskleri tahmin etmek için bir veya çeşitli organizasyon seviyelerinde (moleküler, hücresel, fizyolojik, organizma veya davranışsal) biyolojik parametrelerin modifikasyonlarının kullanıldığı bir tür olarak tanımlaması yapılmaktadır (Berthet et al., 2013).

Yukarıda belirtilen kriterlere göre deniz ekosistemlerinin biyolojik olarak izlenmesi için farklı ekolojik organizasyon düzeylerinden geniş bir tür listesi (esas olarak Crustaceans, Mollusc, Balık) önerilebilmektedir (Waykar and Deshmukh, 2012; Zuykov et al., 2013; Tlili and Mouneyrac, 2019). Çoğu Bivalve türleri geniş bir coğrafi dağılıma sahip olmaları, sesil yaşamaları ve sınırlı bir hareketlilik sergilemelerinden dolayı yaşadıkları habitatların durumunu yansıtmaktadırlar. İlk olarak Profesör Edward D. Goldberg tarafından 1975 yılında “Midye İzleme Programı” önerildikten sonra biyolojik izleme programlarında sentinel organizmalar için mükemmel bir aday olarak bilinmektedirler (Farrington et al., 2016). O zamandan beri dünya çapında birçok uluslararası midye izleme programı geliştirilmiştir (Bricker et al., 2014; Farrington et al., 2016).

Sentinel türler olarak çift kabukluların kullanılmasının birçok avantajı bulunmaktadır. Küresel olarak geniş ve erişilebilir popülasyonlarda bulunurlar, yerleşiktirler, bu nedenle belirli bir yerin su kirliliğine karşı oldukça hassastırlar ve

birçok ksenobiyotiği biyolojik olarak biriktirebilirler (Chiesa et al., 2018). Çift kabuklular, birçok kıyı bölgesinde bulunabilmektedir, bu sayede dünyanın farklı yerlerinde araştırma yapılmasına olanak tanımaktadırlar (Farrington et al., 2016). Ayrıca, balık ve diğer kabuklularla karşılaştırıldığında, organik bileşikleri metabolize etme kabiliyetlerinin daha düşük olduğu bildirilmektedir. Çift kabuklular, olumsuz koşullar altında hayatta kalabilen ve izleme değerlendirmeleri için transplantasyona direnebilen dirençli organizmalar olarak kabul edilmektedirler (Farrington et al., 2016; Świacka et al., 2019).

Bununla beraber, besin zincirinde önemli bir halkada yer almaktadırlar ve balık, deniz yıldızı, kuş gibi farklı canlıların besin kaynağını oluşturmaktadırlar (Świacka et al., 2019). Birincil tüketiciler olan bu türler kirleticileri daha yüksek trofik seviyelere aktarabilmektedirler. Biyolojik avantajlarından bir diğeri hidrofilik/lipofilik kimyasalları asimile edebilmeleridir. Lipofilik kimyasallar sindirim sistemi tarafından alınırken, vücudun açıkta kalan kısımlarıyla (örneğin solungaçlar) temas sırasında doğrudan sudan daha az lipofilik kirleticilerin birikimi gerçekleşebilmektedir (Staniszewska et al., 2017). Esas olarak eser metaller, organoklorlu bileşikler ve petrol hidrokarbonlar gibi kirleticilere odaklanan midye izleme programlarından bu yana, midyenin çevresel kirlenmenin koruyucusu olarak kullanımı farmasötikler (Świacka et al., 2019), mikroplastikler (Li et al., 2019) ve endokrin bozucu bileşikler gibi ortaya çıkan diğer kirleticilere kadar uzanmıştır (Chiu et al., 2018). Özellikle endokrin bozucu bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi ve çevredeki durumlarının biyolojik olarak izlenmesi için sentinel türler olarak çift kabuklular model organizmalar olarak kabul edilmektedirler (Omar et al., 2019).

## 1.7. Literatür Bildirişi

Bilinen bir endokrin bozucu olan BPA, östradiole kıyasla nükleer östrojen reseptörlerine (Er $\alpha$ , Er $\beta$ ), bağlanma afinitesi 1000-10000 kat daha zayıf olan bir ksenoöstrojen olarak tanımlanmaktadır (Rubin, 2011; Michałowicz, 2014; Ribeiro et al., 2017; Niu et al., 2021). Yapılan son çalışmalar düşük konsantrasyonlarda bile organizmalar üzerinde çok çeşitli biyolojik etkilere neden olabileceğini göstermektedir (Michałowicz, 2014; Arslan ve Parlak, 2008). BPA'nın olumsuz etkilerine odaklanılırken analoglar ile yapılan çalışmalar ise hala sınırlıdır. Yüksek derecede yapısal benzerlikler ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle analogların BPA'ya benzer östrojenitesi (Ji et al., 2013; Rochester, 2013), sitotoksitesi (Eladak et al., 2015), genotoksitesi (Lee et al., 2013), üreme ve nörotoksite (Rochester and Bolden, 2015; Shi et al., 2015) gibi olumsuz etkilere neden olabileceği yönündedir. Ayrıca, BPA'dan daha toksik biyolojik etkiler gösterebildiği çalışmalar bulunmaktadır (Chen et al., 2016; Liu et al., 2021).

BPA ve analogları, bakteri toplulukları üzerinde potansiyel bir olumsuz etki sergilemektedirler. B1BPA, B2BPA, B3BPA, BPC, BPF, BPFL ve BPG'nin (EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> = 1,16–7,92 mg L<sup>-1</sup>) biyoluminesans bakterisi *Vibrio fischeri* için BPA'dan (EC<sub>50</sub> = 4.20–8,61 mg L<sup>-1</sup>) daha toksik olduğu rapor edilmiştir. Buna karşılık, elde edilen EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> değerlerine göre TBBPA, BPAF, BPE, BPM, BPP, BPS ve BPZ'nin (EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> = 4,80->204,54 mg L<sup>-1</sup>) BPA'ya göre daha az etki gösterdiği rapor edilmiştir (Debenest et al., 2010; Owczarek et al., 2018; Tisler et al., 2016). Bir başka çalışmada ise Zühlke et al., (2016) BPA, BPC, BPE, BPF ve BPZ'nin aktif çamurdan izole edilen *Bacillus amyloliquefaciens* türü tarafından degrade olduklarını rapor etmişlerdir. Tek hücreli ökaryot *Tetrahymena thermophila* türünün model organizma olarak kullanıldığı çalışmada ise 60 saat boyunca 2,6  $\mu$ M veya 13,0  $\mu$ M'lik konsantrasyonlarına beş analog (BPA, BPAF, BPE, BPS, BPB) maruz bırakıldığında bireysel büyümeyi ve popülasyonun çoğalmasını inhibe ettikleri rapor edilmiştir (Li et al., 2020). Aynı çalışmada popülasyonu bastırma kapasitesi BPB > BPA  $\approx$  BPAF > BPE > BPS şeklinde olduğu bildirilmiştir.

Sucul ekosistemde birincil üreticiler olan fitoplanktonik organizmalar siyanobakteriler, diatom ve yeşil algler gibi birkaç taksonomik gruptan oluşmaktadırlar. Bu fotosentetik mikroorganizmalar su ekosistemlerinde karbon, besin (N ve P) ve oksijen biyojeokimyasal döngülerine aracılık etmektedirler. Bununla beraber, birincil üreticiler olarak besin ağında önemli bir rol oynamakla kalmazlar (Paerl and Justic, 2011); daha yüksek trofik seviyelerdeki diğer

organizmalar üzerinde ciddi olumsuz etkilere neden olabilirler. Bu yüzden, ekotoksikolojik çalışmalarda başlangıç canlıları olarak görülürler ve yeni kimyasalların etkilerinin ilk tepkisini belirlemek için kullanılmaktadırlar (Parlak vd., 2011). *Synechococcus leopoliensis* türünde BPA için ( $3g-EC_{50} = 4,80 \text{ mg L}^{-1}$ ) belirlenen  $EC_{50}$  değeri, BPF ( $3g-EC_{50} = 5,20 \text{ mg L}^{-1}$ ) için belirlenen değerle karşılaştırıldığında daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Elersek et al., 2021).

*Anabaena variabilis* ve *Microcystis aeruginosa* türleri üzerinde BPAF, BPC ve BPB'nin ( $14g-EC_{50} = 12,98-54,77 \text{ mg L}^{-1}$ ) BPA'dan ( $14g-EC_{50} = 55,27-78,96 \text{ mg L}^{-1}$ ) daha güçlü olumsuz etki gösterdiği bildirilmiştir (Czarny et al., 2021). Yine aynı çalışmada, BPE ve BPBP'ye maruz kalan bu iki siyanobakteri türleri için bulunan  $14g-EC_{50}$  değerleri sırasıyla  $73,54-81,54 \text{ mg L}^{-1}$  ve  $320,23-488,61 \text{ mg L}^{-1}$ 'dir. Bununla birlikte, *Chlorella vulgaris* türüne karşı test edilen tüm BP'ler arasında BPM, BPP ve BPZ için belirlenen  $14g-EC_{50}$  değeri  $48,76-19930,34 \text{ mg L}^{-1}$  arasında değişmektedir ve BPA'dan daha az toksik oldukları bildirilmiştir.

Diğer yeşil alg türleri ile karşılaştırıldığında, *Selenastrum capricornutum*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Tetraselmis sp* ve *Tetraselmis chuii* türlerinin  $EC_{50}/IC_{50}$   $0,57-2,70 \text{ mg L}^{-1}$  arasında belirlenen değerlere göre BPA'ya çok daha duyarlı oldukları rapor edilmiştir (Alexander and Doill, 1998; Debenest et al., 2010; Falcao et al., 2019; Jung et al., 2020; Yang et al., 2021).

Fitoplankton hücrelerinin bisfenollerin etkilerine karşı farklı duyarlılık göstermeleri muhtemelen hücre duvarının yapısı ve bileşimindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Parlak vd., 2011). Sucul ekosistemde tüm organizmalar bu bileşiklere kompleks olarak maruz kalmaktadırlar ve sinerjistik-antagonistik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu doğrultuda, BPA ve altı analog (BPAF, BPAP, BPG, BPM, BPP ve BPZ) ( $14d-EC_{50} = 18,22-28,56 \text{ mg L}^{-1}$ ) karışımına maruz kalan yeşil alg türleri *Chlorella vulgaris* ve *Desmodesmus armatus* toksisitesinin incelendiği çalışmada karmaşık karışımın sinerjistik bir etki sergilediği rapor edilmiştir (Czarny et al., 2021). Arslan vd., (2023) *Phaeodactylum tricornutum* denizel türüne 0,5, 0,8, 1,0, 1,5 ve 2,0 mg/L BPA ve analoglarını maruz bıraktıkları çalışmada  $IC_{50}$  değerlerine göre toksik bulunan analoglar sırasıyla BPAF (0,76 mg/L)>BPS (2,94 mg/L) >BPA (3,91 mg/L)>TGSA (5,16 mg/L)>BFDGE (5,69 mg/L)>BPB (7,83 mg/L)>BPF (9,17 mg/L)>BADGE (11,71 mg/L) olduğunu rapor etmişlerdir. Deniz kestanesi embriyonik gelişiminin etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada 72 s sonunda BPA için *Arbacia lixula* ve *Paracentrotus lividus* türleri için hesaplanan  $EC_{50}$  değerleri sırasıyla  $1,396 \text{ mg/L}$  ve  $0,676 \text{ mg/L}$  olarak belirlenmiştir. *A. lixula*

türünde BPS, BPF ve BPAF için hesaplanan EC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 2,673 mg/L, 1,129 mg/L, 0,314 mg/L olduğu rapor edilmiştir (Arslan vd., 2023). Aynı çalışmada, *P. lividus* türünde BPS, BPF ve BPAF için hesaplanan EC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 0,621 mg/L, 0,301 mg/L, 0,263 mg/L olduğu bildirilmiştir (Arslan vd., 2023).

BPA'nın embriyolar üzerinde güçlü toksik etkisi olduğunu rapor edilen çalışmalardan birinde *Ciona intestinalis* türünün embriyonik gelişimi üzerinde (malformasyonlar, hareketlilikte bozukluk) teratojenik etkilere sahip olduğu ve elde edilen teratojenik konsantrasyon (TC<sub>50</sub>) değerinin 0,17 mg L<sup>-1</sup> olduğu rapor edilmiştir (Matsushima et al., 2013). Bir diğer çalışmada ise BPA'nın *Ciona robusta* türünün sinir sistemi gelişimini etkilediği ve 0,02 mg L<sup>-1</sup>'ye kadar düşük konsantrasyonlarda gelişimsel değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Messinetti et al., 2019). BPA, TBBPA, B1BPA, B2BPA ve B3BPA'nın *Hydra* sp. türü üzerinde morfolojik değişikliklere neden olduğu ve belirlenen 4g- EC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> değerlerinin BPA (1,30–5,14 mg L<sup>-1</sup>)'nin analoglarından (0,10–0,20 mg L<sup>-1</sup>) daha az toksik olduğu rapor edilmiştir (Debenest et al., 2010; Murugadas et al., 2016). Yapılan önceki çalışmalarda BPA'nın yumuşakçaların endokrin sistemini olumsuz etkilediği, davranış değişiklikleri, kalp atışı hızında azalma gibi birçok zararlı etkilere neden olabileceği rapor edilmiştir (de Andrade et al., 2017). *Brachionus koreanus* rotifer türünde BPS'nin (1g-LC<sub>50</sub> = ND, NOEC=>100,00 mg L<sup>-1</sup>) BPA ve BPF'den (1g-LC<sub>50</sub> = 20,92–42,89 mg L<sup>-1</sup>, NOEC = 10,00–15,00 mg L<sup>-1</sup>) daha toksik olduğu rapor edilmiştir (Park et al., 2018). BPA'nın *Daphnia magna* ve *Artemia* sp türleri üzerinde yapılan çeşitli akut toksisite çalışmalarında elde edilen EC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 7,30–20,50 ve 50,40–107,20 mg L<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur ve BPA'nın toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Alexander and Doill, 1998; da Silva and de Sousa Abessa et al. 2019; Kalcikova et al., 2012; Liu et al., 2020; Naveira et al., 2021; Tisler et al., 2016).

*Astacus leptodactylus* türüne maruz kalan BPA'nın (2g-IC<sub>50</sub>= 0,00006 ve 0,00011 mg L<sup>-1</sup>) erkek ve dişi gonodal hücreleri üzerinde güçlü bir sitotoksik etki yarattığını ve bunun hücrelerdeki kalsiyum iyon homeostazını bozan kalsiyum kanallarını inhibe etmesinden kaynaklı olabileceği rapor edilmiştir (Yurdakok-Dikmen vd., 2020). BPA, BPF, BPS'nin *Daphnia magna* türünde beslenme oranlarını azalttığını, akut toksisite testinde BPF'nin, BPA ve BPS'den daha toksik bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Liu et al., 2019). Ayrıca çalışmada, BPA ve analogların oksidatif stresi tetiklediği, sindirim ve sinir sistemi üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu belirlenmiştir. *Daphnia magna* türü ile yapılan bir başka

çalışmada ise BPF'nin 0,001 mg L<sup>-1</sup>'den kadar düşük konsantrasyonlarda sinir sistemini bozabileceği ve antioksidan enzim aktivitesini indükleyebileceği bulunmuştur (Liu et al., 2020). BPE'nin *Daphnia magna* türünde 24s-EC<sub>50</sub>'si 36 mg/L olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada, 10<sup>-6</sup>-10<sup>-4</sup> M BPE konsantrasyon aralığında anlamlı östrojenik aktivite gözlemlendiği rapor edilmiştir (Chen et al., 2001; Lee et al., 2013).

BPA'nın ve onun yerine geçen analogların omurgalılar üzerindeki olumsuz etkisine ilişkin araştırmaların çoğu, esas olarak balıklara odaklanmıştır. Son çalışmalar, BPA ve birçok analogun östrojenik etki gösteren ve östrojen reseptörleri ile etkileşime girebilen antropojenik endokrin bozucu bileşikler olarak karakterize edildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Chen et al., 2019). Östrojen reseptörlerine (ER'ler) güçlü bağlanma afinitesi, balık hepatositlerinde artan vitellogenin (vtg) üretimine önemli bir katkıda bulunduğu bildirilmiştir. (Chen et al., 2019).

BPA ve analoglarının balık türleri üzerindeki olumsuz etkilerine ilişkin çalışmalar, esas olarak zebra balığı *Danio reio* türüne odaklanmıştır. Çeşitli akut toksisite çalışmaları, BPA'nın *Danio reio* türü üzerinde toksik etki gösterdiği ve elde edilen EC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> değerinin 0,24–30,13 mg L<sup>-1</sup> olduğu rapor edilmiştir (Gu et al., 2020)

Gu et al., (2020) BPA'nın *Danio rerio* türünde toksisitenin zamana bağlı olarak arttığını ve LC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 gün için 9,13- 8,95- 8,56 ve 7,40 mg L<sup>-1</sup> olduğu bildirilmiştir. Benzer bulgular, BPA için elde edilen LC<sub>50</sub> değerlerinin 3, 6, 9, 12 ve 15 günlük maruz kalma süresi boyunca 0,24'ten 0,17 mg L<sup>-1</sup>'e düştüğü rapor edilmiştir (Chen et al., 2019). BPA ve analoglarının *Danio rerio* üzerinde östrojenik etki gösterdiğini ve embriyolar üzerindeki toksik etkilerinin (4g-LC<sub>50</sub>) BPAF (1,60–1,95 mg L<sup>-1</sup>) >BPA (10,43–12,00 mg L<sup>-1</sup>)>BPF (19,59–32,00 mg L<sup>-1</sup>)>BPS (199,00 mg L<sup>-1</sup>) sırasıyla azaldığı bildirilmiştir (Moreman et al., 2017; Mu et al., 2018). *Danio rerio* türü ile yapılan başka bir araştırmada ise embriyo ve larvalarında BPA (4g-EC<sub>50</sub> = 5,25–8,04 mg L<sup>-1</sup>) ve TBBA'nın (4g-EC<sub>50</sub> = 1,09–5,27 mg L<sup>-1</sup>) 1vtg1 mRNA ekspresyonunu indüklediği bulunmuştur (Chow et al., 2013). Zebra balığının BPFL'ye (4g-LC<sub>50</sub> = 1,01 mg L<sup>-1</sup>) akut maruz kalmasının gelişmede gecikmeye, malformasyona ve apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (Mi et al., 2020).

Bisfenol analoglarının biyoakümülyasyonu ve biyomagnifikasyonu ile ilgili yapılan bir araştırmada Çin'in Taihu gölünden farklı trofik seviyelerde yer alan sucul organizmalar toplanarak değerlendirilme yapılmıştır. BPA, BPAF ve BPS'nin sudaki en baskın analoglar olduğu; BPAF, BPC, BPZ'nin trofik magnifikasyon faktörleri nedeniyle besin zincirinde (ağında) biomagnifike potansiyeline sahip oldukları bildirilmiştir (Wang et al., 2017). *Cyprinus carpio* türünde Bisfenol A-B-C-E-S-Z-AF ve AP olmak üzere 8 yaygın bisfenol analogun toksikokinetiği ve biyokonsantrasyonu araştırılmıştır. Bisfenollerin hem serbest hem de toplam formları çeşitli balık dokularında ölçölmüş, BPA dışında sazan dokusundaki tüm bisfenollerin konsantrasyonu böbrek > karaciğer >> kas şeklinde olduğu bildirilmiştir (Wang et al., 2020).

BADGE'nin sulu veya asidik matrislerle teması üzerine, BADGE·H<sub>2</sub>O ve BADGE·2H<sub>2</sub>O gibi türevleri hidrolize edilebilir (Suarez et al. 2000). Bu türevlerinin çoğunun hem sitotoksik hem de genotoksik etkileri indüklediği gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Suarez et al. 2000). BADGE ve hidrolitik türevleri insan idrarı, plazması ve adi poz yağında bulunmuştur (Wang et al. 2012; Wang et al. 2015). BADGE'nin suda kolayca hidrolize olması, kaplama solüsyonlarının klorin içermesi nedeniyle epoksi konsantrasyonlarında tespit edilmesi zordur ve bu nedenle, bozunma etkilerini tahmin edilemeyebileceği öngörülmektedir (Williams et al., 2020). Ayrıca BADGE, BPA'ya benzer östrojenik aktivite ve üreme/gelişimsel toksisite gösterdiği bildirilmiştir (Hyoung et al. 2007; Nakazawa et al. 2002). Model organizma olarak *Drosophila melanogaster* türünün kullanıldığı ve tam transkriptom sıralaması yapıldığı çalışmada, BADGE içeren gıdalarda larvaların yetiştirilmesinin hemosit artışına neden olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda gelişim boyunca ksenobiyotik BADGE'ye kronik maruz kalmanın hücre proliferasyonunu indükleyebileceği sonucuna varılmıştır (Williams et al., 2020). Marqueño et al., (2021) gerçekleştirdikleri çalışmada BPA, BPF ve BADGE\*2HCl'nin oksidatif stresi indüklediğini ve zebra balığı ZFL hepatik hücre hattının lipid homeostazını etkilediğini bildirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda, BADGE\*2HCl (1g-EC<sub>50</sub> = 6,58 mg L<sup>-1</sup>)'in BPA (1g-EC<sub>50</sub> = 30,13 mg L<sup>-1</sup>) ve BPF (1g-EC<sub>50</sub> = 77,48 mg L<sup>-1</sup>) ile karşılaştırıldığında en sitotoksik bileşik olduğunu rapor etmişlerdir.

Bisfenol analoglarının varlığı insan maruziyetini kaçınılmaz yapmıştır. BPA'nın insan üzerine olan olumsuz etkilerinden sonra analogların etkilerinin araştırılması oldukça yenidir ve hala sınırlıdır. Polonya'da toplanan insan serum

örneklerinde BPS, BPF ve BPZ sırasıyla 0,845-4,844, ve 1,415 ng/mL'ye kadar tespit edilmiştir (Owczarek et al., 2018).

Çalışma raporlarına göre, kontamine yem yiyen hayvanlardan elde edilen hayvansal gıda maddelerinin (ör. Yumurta, süt ve et) tüketilmesiyle insan vücudunda biyolojik olarak biriktikleri için bisfenollerin ciddi toksik bileşikler olarak kabul edilebilir olduğu bildirilmiştir (Russo et al., 2019). İspanya'da yapılan bir araştırmada, konserve ürünlerde 88,66 µg/kg BPA konsantrasyonunun saptandığı ve bu konsantrasyonun, belirlenen 50 µg/kg migrasyon sınırını aştığı bildirilmiştir (González et al., 2020). Bisfenol analoglarının migrasyon yoluyla insan maruziyetinin artmasına yol açabilecekleri düşünülmektedir.

Analoglardan BADGE ve BFDGE'nin tümörijenik ve mutajenik oldukları bildirilmiştir (Míguez et al., 2012). Bu bileşiklerin BPA ile benzer bir yapıya sahip olması ve aynı zamanda biyolojik olarak parçalanabilirliğe karşı direnç göstermesi nedeniyle obezite ve tip 2 diyabet risklerini arttırdığına dikkat çekilmektedir (Vilarinho et al., 2019).

BPA, BPF ve BPS maruziyetinin papiller tiroid kanseri (PTC) arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada idrar konsantrasyonları ile PTC riski arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Yaşa ve sigaraya göre sınıflandırmadan sonra, yalnızca sigara içmeyen kadınlarda istatistiksel anlamlılığın korunduğu BPF maruziyetinin, özellikle kadınlarda PTC riski üzerindeki olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Zhang et al., 2023).

Bir başka çalışmada, BPA ve BPA-içermeyen 6 analogun (BPZ, BPAF, BPAP, BPB, BPF, BPS) insanlardaki östrojenik etkileri araştırılmıştır. Analogların östrojenik potansiyellerinin BPA ile aynı aralıkta kalmış olmasına rağmen BPAF, BPB ve BPZ'nin BPA'dan daha güçlü östrojenik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Mesnage et al., 2017). Bir diğer çalışmada ise BPA, BPS, BPZ, BPAF ve BPF'nin hem kanser hem de sağlıklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri, MTT testi uygulanarak araştırılmıştır. Hem kanser hücreleri (MCF-7) hem de erkek üreme hücreleri (HseC) üzerindeki toksik etkisine bakılan çalışmada, BPF'nin en az sitotoksik etki gösterdiği, daha sonra BPS'nin geldiği belirlenmiştir. BPAF ise diğer iki analoga göre daha sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. HseC hücre hattında en yüksek sitotoksik etkiyi BPA ve BPZ'nin gösterdiğini, MCF-7 hücre hattında ise BPZ ve BPA'nın eşit derecede sitotoksik olduğunu rapor etmişlerdir (Seda vd., 2022).

Yaygın olarak üretilen ve kullanılmaya başlanılan bu analogların hem insanlar hem de diğer canlılar üzerindeki olumsuz etkilerinin ortaya çıkarılmasıyla beraber yasal düzenlemelerin gerekliliği doğmuştur. Şu ana kadar bu analogların olası etkilerine dikkat çekilmesi amacıyla 2012-2015 yılları arasında BPM, BPS, BADGE ve TBBPA, potansiyel endokrin bozucular olarak Topluluk Sürekli Eylem Planına (CoRAP) dahil edilmiştir (Beausoleil et al., 2022). 2018 yılında ise TEDx tarafından BPA, BPAF, BPB, BPC, BPE, BPF, BPM, BPS, BPZ ve TBBPA potansiyel endokrin bozucular listesine eklenmiştir. Endüstriyel üretimde kullanılması sınırlandırılan analoglar ise BPS ve BADGE'dir. 10/2011 sayılı Komisyon Tüzüğü (AB) kapsamında iki analogun plastik gıda kaplarının üretiminde kullanılmasına sınırlama getirilmiştir ve sırasıyla 0,05-9 mg kg<sup>-1</sup> SML izin verilmektedir (EU, 2005; EU, 2011). BPA-free (BPA içermeyen) olarak tanımlanan ürünlerin üretiminde analogların kullanımını kısıtlayan/sınırlandıran başka bir mevzuat bulunmamaktadır.

Bu tez projesi kapsamında Bisfenol A yerine üretilen/kullanılan analoglardan Bisfenol E, Bisfenol Z ve Bisfenol A diglisidil eter'in biyoindikatör tür *Mytilus galloprovincialis* üzerine etkileri belirlenerek kimyasalların ekotoksikolojik profilleri oluşturulmaya çalışılmıştır. Biyoindikatör tür ile gerçekleştirilen bu çalışmada akut ve subletal etkileri farklı biyobelirteç test yöntemleri ile belirlenmiştir. Sucul ekosistemin devamlılığı ve sağlığı açısından oluşabilecek olası olumsuz etkileri yorumlanmaya çalışılmıştır.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) türünün karakteristik özellikleri

Tropik sulardan kutuplara kadar geniş bir yayılım gösteren *Mytilus sp* türleri genel olarak 6-9 m derinlikte yayılım gösterirler. *Mytilus galloprovincialis* türü İngiltere, İspanya, İtalya, Fransa, Atlantik kıyıları, Akdeniz de yaygın olarak bulunur. Bu türün Japonya, Amerika'nın Batı kesimleri, Kore, Çin, Avustralya, Yeni Zelanda ve Güney Afrika'da da kaydı bulunmaktadır (Gossling, 1992).

*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) sistematikteki yeri;

Phylum: Mollusca

Clasis: Bivalvia

Subclasis: Pteriomorphia

Superfamily: Mytiloide

Family: Mytilidae

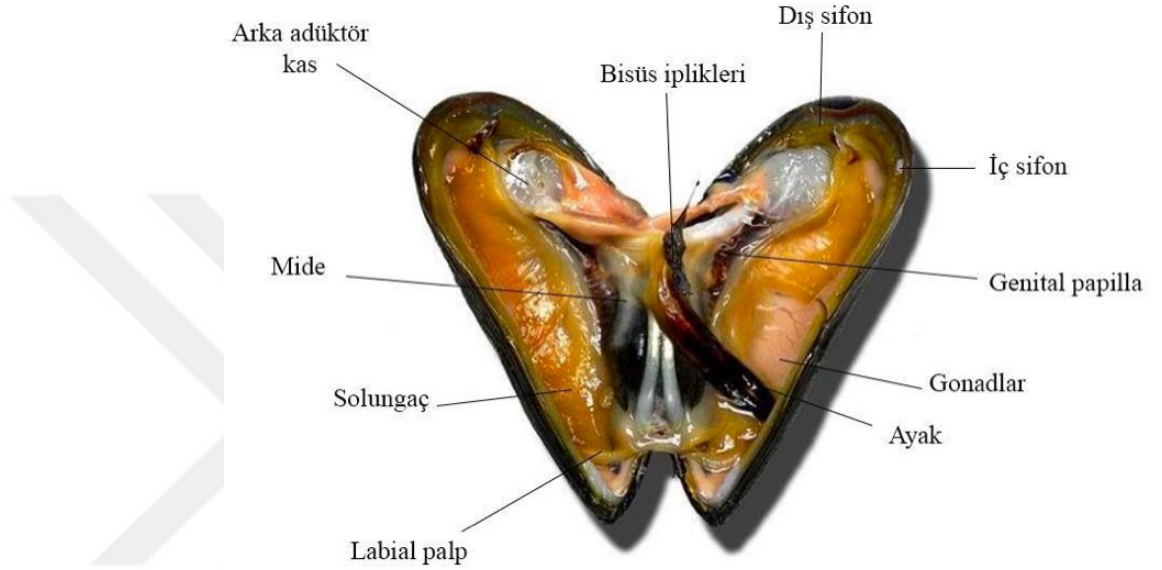
Order: Mytilida

Genus: *Mytilus*

Kabuklarının rengi, yaşa ve tutunduğu zemine göre farklılıklar göstermektedir (Mitton, 1977). Ülkemiz'de Akdeniz ve Ege kıyılarında dağılım gösteren bu türün kabuk rengi siyamsı mor, kahve, siyah ve mavi tonlarındadır (Alpbaz, 1993). Bu türün yaygın boy uzunluğu 7-8 cm olmasına rağmen, maksimum 10-11 cm uzunluğuna ulaşabilirler.

Genel anatomisine bakıldığında bilateral simetrik olan vücutları iki kabuk ile kuşatılmıştır. Anteriör, posteriör, ventral ve dorsal olmak üzere dört kenardan oluşmaktadır (Uysal, 1970). İki kabuklu olup eşit olan bu kabuklar uç kısımdan

birbirine bağlanmıştır. Ventral kısımda bulunan bysus iplikleri ile sert zeminlere tutunmaktadır ve bu iplikler yabancı cisimlerin girişine engel oluşturur (Alpbaz, 1993). Dorsal kenar ise midyenin sırt kısmını meydana getirir ve ön kısmında kabukları birbirine bağlayan ligamente sahiptir. Ligament, kaslar ile zıt kuvvetli olmasından dolayı ölü midyelerin kabukları kasların kapama gücünün olmamasından açılır (Atay, 1997).



Şekil 2.1. Midye morfolojisi

Midyelerin yumuşak olan vücutları manto denilen bir zar ile kaplıdır. Solunum organları olarak manto boşluğunun her iki yanında dikey konumda asılı olarak bulunan bir çift ktenidium vardır. Ktenidium'lar eksen boyunca iki sıra halinde dizili solungaç filamentlerinden oluşur. Bunların üzerinde bulunan sillerle birbirlerine bağlanmıştır. Ayrıca manto epiteli de solunumda rol oynar. (Uysal, 1970). (Şekil 2.1). Ligament eksenini üzerinde ve anterior addüktör kasın arkasında ince yarık şeklinde yer alan ağız, altta ve üstte birer çift bulunan ağız kolu (labial palp) adı verilen iki çift dudakla çevrilidir. Ağız boşluğunda çene ve tükürük bezi yoktur. Mide torba şeklindedir. Anterior kasların hemen altında ve mide etrafında koyu kahve renkli karaciğer bezleri yer alır. Son bağırsak ise perikard boşluğundan ve çoğunlukla kalbin ventrikül (karıncık) içinden geçerek posterior addüktör kasın üzerinden kloak boşluğuna açılır. Boşaltım organı olarak bir çift nefridyum vardır (Uysal, 1970). Açık dolaşım sistemi olan midyelerde kan, kan damarları içerisinde taşınmaz. Midyelerdeki dokular, kan ve besin alışverişi için hemolenf ile kaplıdır.

Oksijenli hemolenf, kalpten kan damarları yoluyla vücut organlarına pompalanır. Gazların, besinlerin ve atıkların değiş tokuş edildiği hemoseollere taşınırlar. Hemolenf kalbe geri dönmeden önce solungaçlarda ve mantoda yeniden oksijenlenmektedir.

Fitoplanton ve asılı haldeki partiküller ile beslenirler. Besinlerini süzerek alırlar ve sudaki maddeleri dokularında biriktirebilirler. Bir midye saatte 10-15 lt suyu süzebilme özelliğine sahiptir (Uysal, 1970). Midyelerin filtrasyon hızı; midye büyüklüğüne, partikül yoğunluğuna, partikül türüne, su sıcaklığına göre değişmektedir (Bayne et al., 1976).

### **2.1.2. *Mytilus galloprovincialis* türünün üreme biyolojisi ve yaşam döngüsü**

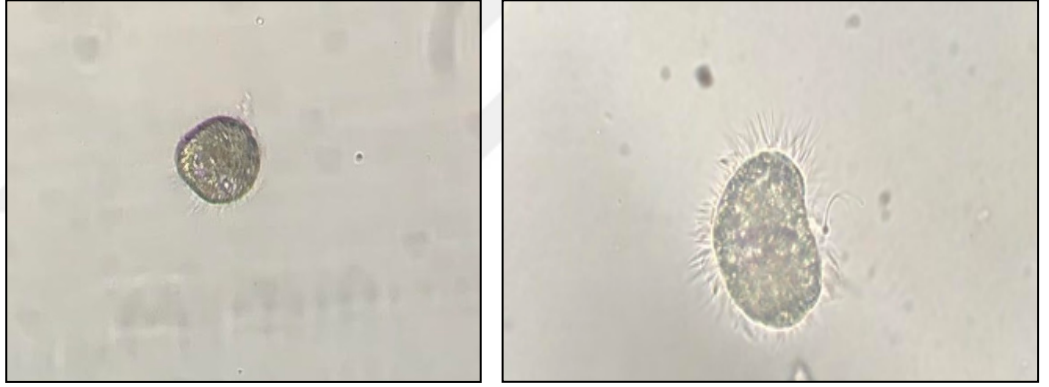
Midyelerde üreme sistemi bütün vücuda yayılmış kanal ve kanalcıklardan oluşmaktadır. Bu sistem manto loblarının her tarafındaki bağ dokusu içerisine yayılmıştır. Üreme zamanlarında manto dokusu tamamen üreme hücreleriyle doludur, ayrıca bu hücreler mesosomada, perikardial boşluğun hemen altında, vücudun yan duvarlarında, karaciğerin hemen üzerindeki dokularda yayılırlar. Üreme sistemi solungaçlar, kaslar ve ayak hariç vücudun her tarafına yayılmıştır. Mantonun anterioründe yani karaciğerin üstünde, lateralde ve mesosomada mevcut kanallardan gelen kanalların birleşmesi ile oluşan genital kanal, mantonun iç yüzeyine, buradan arkaya döner; vücudun diğer tarafından gelen diğer kanalla birlikte ventral kanalda solungaçların kenarına paralel olarak uzanır ve posterior kapama kasının hemen yanından dışarı açılır. Burası canlılığın çoğalma organı açıklığıdır ve kontrolü altında açılıp kapanır (Seed and Suchanek, 1992).

Midyeler ayrı eşeyli olup, olgun erkeklerde gonadlar krem-beyaz, dişilerde ise portakal sarısı tonlarındadır. Kabuklar kapalı iken cinsiyet ayrımı yapılmaz. Ancak olgun üreme hücreleri suya bırakıldığında oluşan renklenme ile ayırt edilebilir. Ege ve Akdeniz kıyılarındaki üreme zamanı Eylül-Aralık ve Mart-Mayıs ayları arasındadır. Üreme hücrelerini boşaltan bireyler 1 ay içerisinde yeniden kendini toplar.

Midyeler ayrı eşeyli olmakla beraber nadir olarak hermafroditlik görülür (Lubet, 1959; Sugiura, 1962). Manto içerisindeki dokularda gelişen sperm ve yumurtalar olgunlaşınca genital kanallardaki siller vasıtası ile dışarı atılırlar. Erkekler spermlerini uzun ip şeklinde su içerisine bırakırken, dişiler ince uzun

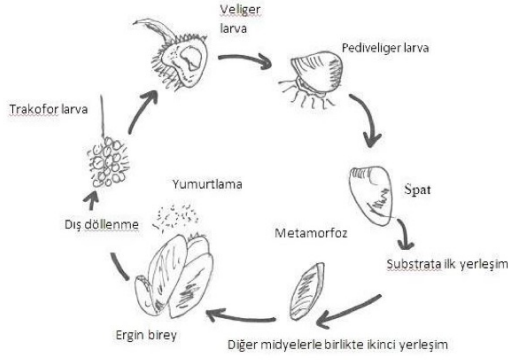
paketler halinde su içrisine bırakır. Laboratuvar ortamında erkek bireyler ilk suya konulduktan sonraki ilk 2 saat içrisinde sperm bırakırken, dişi bireylerin yumurta bırakması ilk 24 saat içrisinde gerçekleşmektedir. Laboratuvar ortamında üreme hücrelerinin elde edilmesi 1-3 gün içrisinde gerçekleşir. Olgun yumurtalar alesital tipte, soluk kahverengi, küre şeklinde ve 60-70 $\mu$ m çapındadır. Yumurtaların ortasında kısmında nükleus, nükleus etrafında da yumurta granülleri yer alır. Spermiler toplu iğne şeklinde olup, baş, boyun ve kuyruk bölgelerinden oluşur. Sperm 3.55 $\mu$ m'dur. Spermilere hareket sağlayan kuyrukları ise 40-60 $\mu$ m arasında değişen uzunluklara sahiptir.

Yumurta ve sperm bırakılmasından 30 dk içrisinde dölleme gerçekleşir. Döllemeden 90 dk sonra 2'li bölünme, 180-210 dk sonra 4'lü bölünme gerçekleşir. Döllemeden 24 saat sonra silli trokofora safhasına ulaşılır. Bu evrede larva sillerini kullanarak hareket eder (Şekil 2.2.).



**Şekil 2.2.** Midye trokofora safhası

30 saat sonra trokofora larvasında sindirim sistemi ve dorsal bölgenin posteriyör tarafında kabuk bezinin faaliyeti sonucunda kalınlaşan ilk kabuk görülür. Daha sonra hızla gelişerek sağ ve sol taraf olmak üzere iki kabuk haline gelir. Larvanın yüzmesi ve beslenmesini sağlayan bu organa 'velum' adı verilir. Velum, 24-48 saat arası sürede oluşur ve larva enine ekseninde 90  $\mu$ m boya sahiptir. Bu evre 'D-shape (veliger)' olarak adlandırılır.



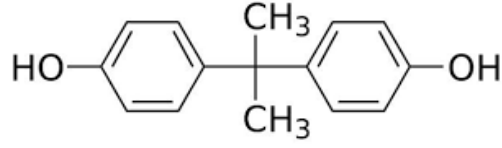
**Şekil 2.3.** Midye yaşam döngüsü

2-4 hafta planktonik olarak bir yaşam sürerek su sütununda aktif olarak yüzerler ve beslenirler. Larva 210 µm boya ulaştığında ayak, gözler ve iki pigmentli noktalar tamamı ile görünür haldedir. Bu evre ‘pediveliger’ olarak adlandırılır (His et al., 1999). Bu aşamadan sonra larvalar 15-30 gün içerisinde metamorfoz aşamasına ulaşır ve yerleşmeye başlar. Sıcaklık, metamorfoz evresine ulaşma zamanı ve süresini etkilemektedir. 1-1,5 mm boya ulaşınca juvenil bireyler olarak adlandırılırlar ve buldukları filamentli substratta yerleşik olarak kalırlar. Daha sonra substrattan ayrılır ve diğ er midye popülasyonları veya bysus iplikleri ile yeni bir substrat buluncaya kadar dibe sürüklenirler (Newell, 1990). 5 cm boya ulaştıklarında ergin birey olarak adlandırılırlar ve son tutunmalarını gerçekleştirirler (Şekil 2.3.)

## 2.2. Kimyasallar ve stokların hazırlanması

### 2.2.1. Bisfenol A (Cas numarası:80-05-7) 4-[2-(4- hydroxyphenyl)propan-2-yl]phenol

Bisfenol A (BPA)  $C_{15}H_{16}O_2$  formülü ile karakterize edilmektedir. Bisfenol A, iki hidrofenoksil grubu içeren difenil metan türevidir (Şekil 2.4.). Polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanılan bir monomerdur. Ayrıca plastik şişeler ve kaplarda, oyuncaklarda, tıbbi ekipmanlarda, sigara filtrelerinde, termal kağıtların üretimi olmak üzere birçok üründe kullanılmaktadır.



Şekil 2. 4. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı

Çizelge 2.1'de BPA'nın moleküler ağırlık, oktanol-su partitasyon katsayısı (log Kow), suda çözünürlüğü, yarılanma ömrü, biyokonsantrasyon faktörü (BCF), biyobirikim faktörü (BAF) ve biyotransformasyon yarı-ömrü bulunmaktadır.

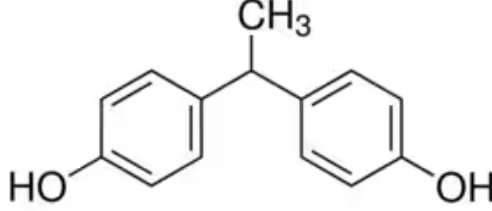
Çizelge 2.1. BPA'nın fizikokimyasal özellikleri

<b>BPA</b>	
<b>Moleküler ağırlık</b>	228,29 g/mol
<b>Log Kow</b> Tahmin edilen/ölçülen (25 °C)	3,64/3,32
<b>Suda çözünürlüğü mg/L (tahmin edilen)</b>	146,15
<b>Yarılanma ömrü (gün)</b> Hava/su/toprak/sediment	0,13/38/75/338
<b>Log BCF/BCF</b> (L/kg, wet-w)	1,86/72
<b>Log BAF/BAF</b> (L/kg, wet-w)	2,24/173
<b>Biyotransformasyon yarı ömrü gün</b> (10 g balığa normalize edilmiş)	0,263

Sigma-Aldrich firmasından alınan Bisfenol A, Dimetil sülfoksit (Sigma, Cas. No: 67-68-5) içerisinde çözüldü. Stok çözeltiler hacimsel şişeler kullanılarak seyrelti ve karanlıkta muhafaza edildi. Tüm deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonda 0.1% (v/v), genel olarak test türü için belirlenen NOEC (*M. galloprovincialis* için 2,2 g L<sup>-1</sup>) değerinin altındaki DMSO çözeltileriydi.

## 2.2.2. Bisfenol E (Cas Numarası:2081-08-5) 4-[1-(4-hydroxyphenyl)ethyl] phenol

Bisfenol E (BPE),  $C_{14}H_{14}O_2$  formülü ile karakterize edilmektedir. (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. BPE kimyasal yapısı

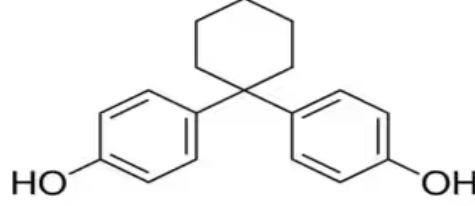
Plastik malzemelerin dayanıklılığının artırılması için, kişisel bakım ürünleri, gıda ambalajlarında ve ayrıca, plastik, reçine ve dental ürünlerinde monomer olarak kullanılmaktadır. Çizelge 2.2’de BPE’nin belirlenen fiziko-kimyasal özellikleri yer almaktadır. Sigma-Aldrich firmasından alınan Bisfenol E, Dimetil sülfoksit (Sigma, Cas. No: 67-68-5) içerisinde çözüldü. Stok çözeltiler hacimsel şişeler kullanılarak seyrelti ve karanlıkta muhafaza edildi. Tüm deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonda 0.1% (v/v), genel olarak test türü için belirlenen NOEC (*M. galloprovincialis* için  $2,2 \text{ g L}^{-1}$ ) değerinin altındaki DMSO çözeltileriydi.

Çizelge 2.2. BPE’nin fizikokimyasal özellikleri

<b>BPE</b>	
<b>Moleküler ağırlık</b>	214,27 g/mol
<b>Log Kow</b> <b>Tahmin edilen/ölçülen (25 °C)</b>	3,19/3,74
<b>Suda çözünürlüğü mg/L (tahmin edilen)</b>	321,64
<b>Yarılanma ömrü (gün)</b> <b>Hava/su/toprak/sediment</b>	0,13/15/30/135
<b>Log BCF/BCF</b> <b>(L/kg, wet-w)</b>	1,77/59,1
<b>Log BAF/BAF</b> <b>(L/kg, wet-w)</b>	1,66/45,6
<b>Biyotransformasyon yarı ömrü gün</b> <b>(10 g balığa normalize edilmiş)</b>	0,153

### 2.2.3. Bisfenol Z (Cas numarası:843-55-0) 4-[1-(4- hydroxyphenyl) cyclohexyl]phenol

Bisfenol Z (BPZ),  $C_{18}H_{20}O_2$  formülü ile karakterize edilmektedir. (Şekil 3.2). Gıda ambalajları, kişisel bakım ürünleri, kâğıt ürünleri, fensiklidin (PCP) gibi anestezik kimyasalların sentezinde ve ayrıca plastik, reçine ve dental ürünlerde polimer olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.6. BPZ'nin kimyasal yapısı

Çizelge 2.3.'de BPZ'nin belirlene fiziko-kimyasal özellikleri yer almaktadır.

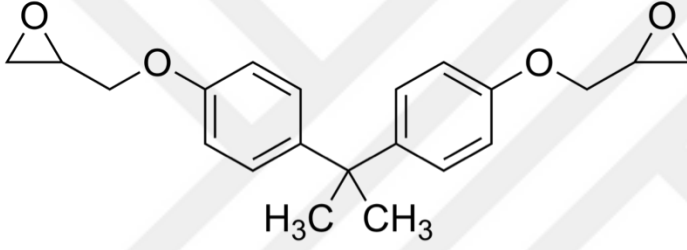
Çizelge 2.3. BPZ'nin fizikokimyasal özellikleri

BPZ	
Moleküler ağırlık	268,36 g/mol
Log Kow Tahmin edilen/ölçülen (25 °C)	5,48/(n/a)
Suda çözünürlüğü mg/L (tahmin edilen)	1,47
Yarılanma ömrü (gün) Hava/su/toprak/sediment	0,13/38/75/338
Log BCF/BCF (L/kg, wet-w)	3,29/1,93*10 <sup>3</sup>
Log BAF/BAF (L/kg, wet-w)	2,21/162
Biyotransformasyon yarı ömrü gün (10 g balığa normalize edilmiş)	0,403

Sigma-Aldrich firmasından alınan Bisfenol Z, Dimetil sülfoksit (Sigma, Cas. No: 67-68-5) içerisinde çözüldü. Stok çözeltiler hacimsel şişeler kullanılarak seyrelti ve karanlıkta muhafaza edildi. Tüm deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonda 0.1% (v/v), genel olarak test türü için belirlenen NOEC (*M. galloprovincalis* için 2,2 g L<sup>-1</sup>) değerinin altındaki DMSO çözeltileriydi.

#### 2.2.4. Bisfenol A diglisidil eter (Cas numarası:1675-54-3) 2-[[4-[2-[4-(oxiran-2-ylmethoxy)phenyl]propan-2-yl]phenoxy] methyl]oxirane

Bisfenol A diglisidil eter (BADGE), C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub> formülü ile karakterize edilmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. BADGE'nin kimyasal yapısı

Epoksi reçinelerinin üretiminde bir monomerdir. Bununla beraber, yiyecek ve içecek kaplarının kaplama malzemesi, antikorozyon kaplama ve dış kompozitlerin kaplama maddesi olarak kullanılmaktadır. Çizelge 2.4'te BADGE'nin fiziko-kimyasal özellikleri yer almaktadır.

Sigma-Aldrich firmasından alınan Bisfenol A diglisidil eter, Dimetil sülfoksit (Sigma, Cas. No: 67-68-5) içerisinde çözüldü. Stok çözeltiler hacimsel şişeler kullanılarak seyrelti ve karanlıkta muhafaza edildi. Tüm deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonda 0.1% (v/v), genel olarak test türü için belirlenen NOEC (*M. galloprovincalis* için 2,2 g L<sup>-1</sup>) değerinin altındaki DMSO çözeltileriydi

Çizelge 2.4. BADGE'nin fizikokimyasal özellikleri

<b>BADGE</b>	
<b>Moleküler ağırlık</b>	340,4 g/mol
<b>Log Kow</b> <b>Tahmin edilen/ölçülen (25 °C)</b>	3,84/(n/a)
<b>Suda çözünürlüğü mg/L (tahmin edilen)</b>	0,74
<b>Yarılanma ömrü (gün)</b> <b>Hava/su/toprak/sediment</b>	0,16/60/120/542
<b>Log BCF/BCF</b> <b>(L/kg, wet-w)</b>	2,20/160
<b>Log BAF/BAF</b> <b>(L/kg, wet-w)</b>	2,60/400
<b>Biyotransformasyon yarı ömrü gün</b> <b>(10 g balığa normalize edilmiş)</b>	2,09

### 2.3. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *Mytilus galloprovincialis* türü ile gerçekleştirilen toksisite testleri

Bisfenol A ve analoglarının biyoindikatör tür *Mytilus galloprovincialis* üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla temiz olduğu bilinen İzmir-Mordoğan bölgesinden toplanarak toksisite testleri yapılmıştır. İlk olarak aklimasyon sürecine 7 gün boyunca tabi tutulmuştur. Bu sürede laboratuvar ortamında hazırlanan yapay deniz suyu (%36) içerisinde tutularak gün aşırı su değişimi yapılmıştır ve her bir akvaryuma havalandırma takılmıştır. Vücut ağırlıklarına göre besleme yapılmıştır. Besleme için daha önce kültürü hazırlanan belli bir yoğunluğa getirilen denizel diatom türü *Phaeodactylum tricornutum* kullanılmıştır ve akvaryumlara gün aşırı 30 ml olacak şekilde eklenmiştir. 12/12 saat aydınlık/karanlık periyodunda ve uygun sıcaklıkta (16 °C) tutulmuşlardır. Aklimasyon sürecinin bitiminden sonra denemelere başlanılmıştır.

### 2.3.1. Akut toksisite testi

İlk olarak midye akut toksisite testi gerçekleştirilmiştir. Deneme düzeneğinde cam akvaryumlar içerisine hazırlanan yapay deniz suyu konulmuştur ve havalandırma takılmıştır. Daha sonra her bir cam akvaryum içerisine 20 midye konulmuştur. Tüm deneme boyunca sıcaklık 16 °C’de, oksijen ve pH ölçümleri yapılarak optimum koşullar sağlanmıştır. BPA, BPE, BPZ ve BADGE’nin midye üzerindeki akut etkisinin belirlenmesi için kontrole ek olarak midyeler 5 konsantrasyona maruz bırakılmıştır (Şekil 2.8). Maruziyet konsantrasyonları 2-4-8-16-32 mg/L olarak belirlenmiştir. Deneme sırasında her bir kimyasal grubu için hazırlanan stok çözeltiler seyreltilerek kullanılmıştır. 96 saat boyunca her bir 24 saat sonunda akvaryumdaki ölen ve yaşayan midyelerin sayısı gözlemlenerek kaydedilmiştir. Ölen ve yaşayan midyelerin ayırımında kabukların açıklığı kriteri kullanılmıştır. Midyelerin kabukları tamamıyla açık olduğunda ölü olduğu kabul edilmektedir. Çünkü ölen midyelerin kasları ile ligament arasında ters bir kuvvet etkisi vardır. LC<sub>50</sub> değerleri EPA probit programı kullanılarak hesaplama yapılmıştır.



Şekil 2.8. Akut toksisite test düzeneği

### 2.3.2. Fizyolojik Parametreler: condition (büyüme) indeks ve gonadosomatik indeks

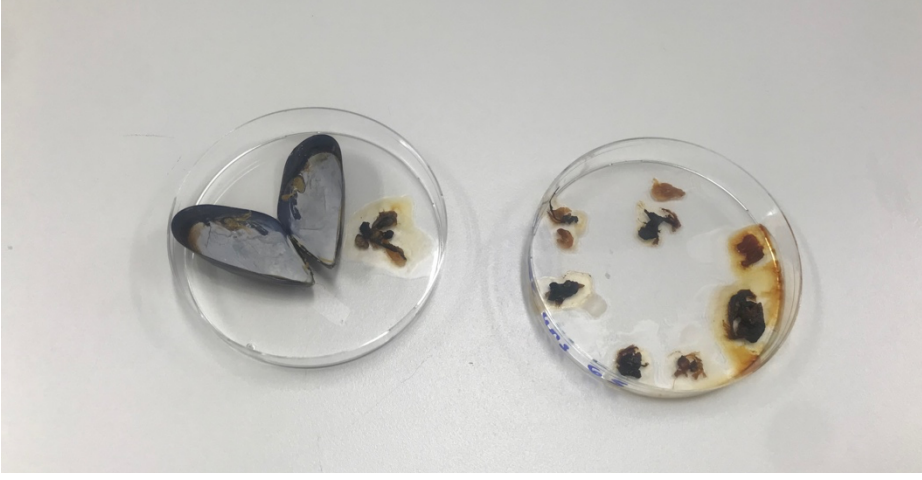
Bisfenol A ve analoglarının (BPE, BPZ, BADGE) midye üzerindeki fizyolojik etkilerinin belirlemek amacıyla büyüme ve gonadosomatik indeks testleri gerçekleştirilmiştir. Deneme düzeninde cam akvaryum içerisine hazırlanan yapay deniz suyu, havalandırma takıldıktan sonra her bir akvaryuma 8 midye konulmuştur. Tüm deneme boyunca sıcaklık 16 °C'de, oksijen ve pH ölçümleri yapılarak optimum koşullar sağlanmıştır. 14 gün boyunca midyeler kontrole ek olarak akut toksisite testi için belirlenen 5 konsantrasyona (2-4-8-16-32 mg/L) maruz bırakılmışlardır. Deneme sırasında her bir kimyasal grubu için hazırlanan stok çözeltiler seyreltilerek kullanılmıştır. 96 s midye akut toksisite testinin sonucunda yaşamaya devam eden midyelerle deneme yapılmıştır.

Büyüme indeksi (CI) Matozzo et al., (2012) göre belirlenmiştir. Kontrol ve her bir kimyasal (BPA, BPE, BPZ ve BADGE) grubundaki konsantrasyonlara maruz kalan 4'er bireyin kabukları ayrılarak yumuşak dokuları alınmıştır (Şekil 3.6.) Kabuk ve yumuşak dokuların her ikisi de 60 °C'de 48 saat boyunca etüv içerisinde kurutulmuştur. Daha sonra ise yumuşak dokuların ve kabukların ağırlık ölçümleri yapılarak aşağıda yer alan formüle göre hesaplamalar yapılmıştır.

$$CI (\%) = \frac{\text{kuru doku ağırlığı (g)}}{\text{Kuru kabuk ağırlığı (g)}} \times 100$$

Gonadosomatik indeks (GSI) Peters and Granek (2016) göre belirlenmiştir. Kontrol ve her bir kimyasal (BPA, BPE, BPZ ve BADGE) grubundaki konsantrasyonlara maruz kalan 4'er birey disekte edilmiştir. Gonadlar ve tüm doku birbirinden ayrılmıştır (Şekil 3.6) ve 60°C'de 48 saat boyunca etüv içerisinde kurutulmuştur. Daha sonra ise gonadlar ve yumuşak dokuların ağırlık ölçümleri yapılarak aşağıda yer alan formüle göre hesaplamalar yapılmıştır.

$$GSI (\%) = \frac{\text{Gonadların kuru ağırlığı (g)}}{\text{toplam yumuşak doku kuru ağırlığı (g)}} \times 100$$

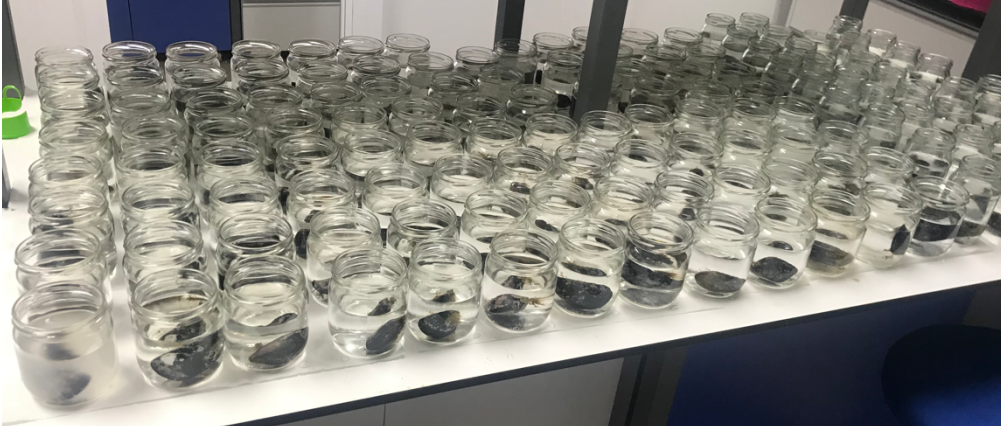


Şekil 2.9. Condition indeks ve gonadosomatik indeks örneklerinin kurutulmuş hali

### 2.3.3. Subletal toksisite testleri

### 2.3.4. Midye fertilizasyon (döllenme başarısı) ve embriyotoksisite testi

BPE, BPZ ve BADGE'nin midye fertilizasyon başarısına olan etkisini belirlenmeye çalışılmıştır. Aklimasyon sürecinden çıkan midyelerin her biri yapay deniz suyunun olduğu cam kavanozlar içerisine konulmuştur (Şekil 2.10). Cinsel olgunluğa sahip olan midyelerin yumurta ve sperm bırakılması için beklenilmiştir. Doğal olarak sperm ve yumurta alınması için su sıcaklığının artırılması yöntemi kullanılmıştır.



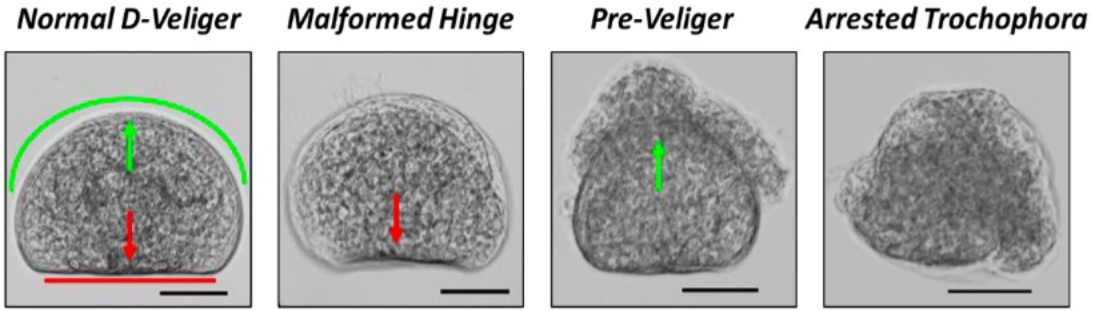
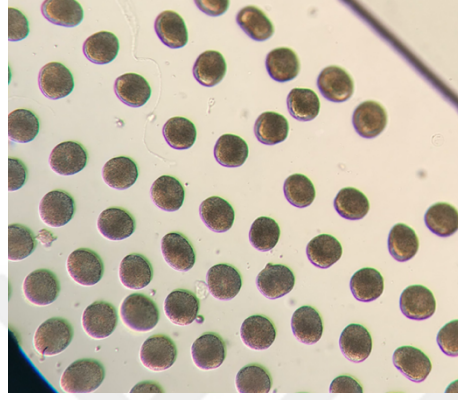
Şekil 2.10. Midye sperm ve yumurta eldesi

Daha sonra yumurta ve sperm salınması gözlemlenmiştir. Sudaki renk değişimiyle ayırt edilen dişi ve erkek bireyler belirlendikten sonra yumurtalar ve spermeler sırasıyla 100 µm ve 55 µm filtreden geçirilmiştir. Daha sonra sağlıklı olan 3 dişi ve 3 erkek bireyler seçilerek His et al., (1999) ve Fabbri et al., (2014) göre deneme gerçekleştirilmiştir. BPE, BPZ ve BADGE için konsantrasyonlar hesaplanan LC<sub>50</sub> değerlerine göre belirlenmiştir ve 0,01-0,1-1-100-1000 µg/L'dir. Her bir kimyasal için hazırlanan stok çözeltileri seyreltilerek kullanılmıştır. 6'lı well plate içerisine 9 ml yapay deniz suyu ve artan kimyasal konsantrasyonları konulduktan sonra yumurta:sperm oranı 1:10 olacak şekilde eklenmiştir. 30 dk sonra fertilizasyon başarısının mikroskopik gözlemlenmesi için formol (%4) ile fiks edilmiştir. Döllenmiş yumurtalar döllenme zarının oluşumuna göre ayırt edilmektedir (Şekil 2.11). Embriyotoksisite denemesi için artan konsantrasyonların ve yapay deniz suyunun eklendiği well-plate'ler içerisine embriyolar eklendikten sonra 16±1 °C'de 48 saat boyunca 16 saat ışık: 8 saat karanlık fotoperiyodu ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler (%4) formalin ile fiks edilerek mikroskopik gözleme geçilmiştir ve her bir well-plate kuyucuğundan 100 birey sayılmıştır Test sonuçlarının kabul edilebilirliği, kontrol grubundaki normal D-veliger evresindeki larvaların >%75'ten yüksek olması gerekmektedir (ASTM, 2004). Başarılı fertilizasyon döllenme zarının oluşumu ile anlaşılmaktadır. Fertilizasyon başarısını belirlenirken fertilizasyon Oranı (FO = % döllenmiş yumurta) dikkate alınmıştır. Negatif kontrol gurubunda gözlenen fertilizasyon oranı (FO kont) ve toksikant gurubunda gözlenen fertilizasyon oranı (FO göz) karşılaştırılarak düzeltilmiş endeks (DE) değerleri hesaplanmıştır (Arslan ve Parlak, 2008).

$$DE = \frac{FO_{göz} - FO_{kont}}{FO_{kont}} \times 100$$

Düzeltilmiş endeks ile her bir örnekteki fertilizasyon başarısındaki nispi artış (DE> 0) veya depresyon (DE<0) kolaylıkla görülebilmektedir.

48 s sonunda mikroskopik gözlemler His et al., (1999) kriterlerine göre yapılmıştır. Bu kriterlere göre larvalar D-veliger safhasına eriştiğinde ve manto dışarı çıkmadığında normal olarak kabul edilmektedir. Trokofora aşamasında kalması, gelişimsel anomaliler (konkav veya konveks kabuk, girintili kenar boşlukları, bozulmuş veya hasar görmüş kabuk, çıkıntılı manto) anormal larva olarak kabul edilmektedir.

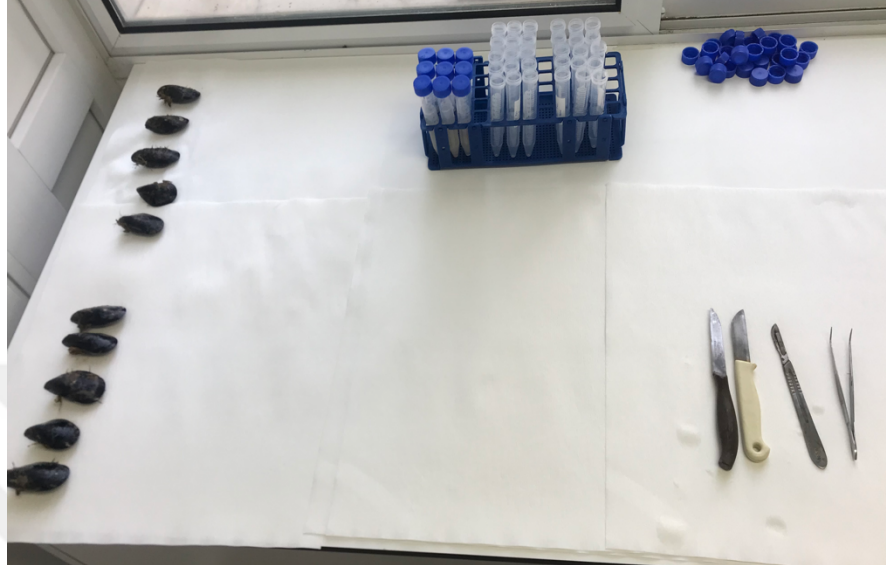


Şekil 2. 11. Midye döllenmiş yumurta ve larval aşamaları

### 2.3.5. Mikronükleus testi

BPA ve analoglarının genotoksik bir etkiye neden olup olmadığının belirlenmesi için mikronükleus testi gerçekleştirilmiştir. Aklimasyon sürecinden sonra deneme düzeneği kurulmuştur. Cam akvaryumlar içerisine yapay deniz suyu (3 litre) ve havalandırma takıldıktan sonra her bir akvaryuma 15 midye eklenmiştir. Tüm deneme boyunca sıcaklık 16 °C'de ve pH ölçümleri yapılarak optimum koşullar sağlanmıştır. BPA, BPE, BPZ ve BADGE için uygulanan konsantrasyonlar kontrole ek beş konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Midyelerin maruz kaldığı konsantrasyonlar 0,01-0,1-1-100-1000 µg/L'dir. Denemenin güvenilirliğini göstermek için daha önceden toksik olduğu bilinen CdCl<sub>2</sub> pozitif kontrol olarak belirlenmiştir. 72 saat süren denemede her bir 24 saat diliminde her bir kimyasal

grubu ve konsantrasyonlar için örnekleme (her gün için 5 midye) yapılmıştır. Örnekleme yapıldıktan sonra su değişimi ve kimyasallar yeniden eklenmiştir. 3 gün süren deneme boyunca her bir canlının hemolenf, solungaç ve karaciğer dokuları alınmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 2. 12. Mikronükleus testi için midye diseksiyonu

**Hemolenf:** İnce uçlu şırınga ile alınan hemolenf fikstatif (3:1 etanol:asetik asit) içerisine 15 ml'lik falcon tüplere konulmuştur. Daha sonra 1000 rpm 10 dk santrifüjlenmiştir ve süpernant uzaklaştırılmıştır. Pelet lam üzerine 2 tekrarlı olacak şekilde yayıldıktan sonra etanol bulunan şale içerisine alınarak fiks edilmiştir. Lamlar doğal olarak kuruduktan sonra %5'lik hazırlanan Giemsa boyasını içeren şaleler içerisine alınmıştır ve boyama yapılmıştır. Boyadan çıkarılan lamlar saf su ile yıkanmıştır. Doğal olarak kurumaya bırakılan lamlar hava almaması için entellan ve lamel yardımıyla kapatılarak mikroskopik gözlemlere hazır hale getirilmiştir.

**Solungaç:** Hemolenf alımından sonra bistürü ile midyeler disekte edilerek solungaçlar alınmıştır (Şekil 2.13). Fikstatif içeren 15 ml'lik falconlara konulmuştur. Solungaç epitellerinin cam pastör pipet yardımıyla dökülmesi sağlanmıştır. Büyük solungaç dokularının uzaklaştırılması için filtre edilmiştir. Santrifüj edildikten (2000 rpm 10 dk) edildikten sonra süpernant uzaklaştırılmıştır. Pelet lam üzerine 2 tekrarlı olacak şekilde yayıldıktan sonra etanol bulunan şale içerisine alınarak fiks edilmiştir. Lamlar doğal olarak kuruduktan sonra %5'lik hazırlanan Giemsa boyasını içeren şaleler içerisine alınmıştır ve boyama yapılmıştır. Boyadan çıkarılan lamlar saf su ile yıkanmıştır. Doğal olarak kurumaya

bırakılan lamlar hava almaması için entellan ve lamel yardımıyla kapatılarak mikroskopik gözlemlere hazır hale getirilmiştir.



Şekil 2.13. Midye iç görünüm ve solungaç dokusu

**Hepatopankreas:** Solungaçlar alındıktan sonra hepatopankreas dokuları disekte edilmiştir. Fikstatif (asetik asit) içeren 15 ml'lik falconlara konulmuştur. Daha sonra %45'lik asetik asit içeren falconlara alınarak cam pastör pipet yardımıyla dokunun parçalanması sağlanmıştır. Filtre edilen hücreler solungaç dokularında olduğu gibi santrifüjlenerek lam üzerine 2 tekrarlı olacak şekilde yayılmıştır. Etanol bulunan şale içerisine alınarak fiks edilmiştir. Lamlar doğal olarak kuruduktan sonra %5'lik hazırlanan Giemsa boyasını içeren şaleler içerisine alınmıştır ve boyama yapılmıştır. Boyadan çıkarılan lamlar saf su ile yıkanmıştır. Doğal olarak kurumaya bırakılan lamlar hava almaması için entellan ve lamel yardımıyla kapatılarak mikroskopik gözlemlere hazır hale getirilmiştir.

Mikroskopik gözlemler sırasında ZEISS primostar mikroskobu kullanılmıştır. Hazırlanan her bir lamdan rastgele 1000 hücre sayımı yapılarak mikronükleus oluşumu gözlenmiştir. Bir kimyasal maruziyetinde kontrolle beraber hemolenf, solungaç ve hepatopankreas dokuları için toplam 540 lam hazırlanmıştır. BPA, BPE, BPZ ve BADGE için toplam 2.160 lam hazırlanarak 2,160,000 hücre mikroskopta gözlemlenerek sayılmıştır.

### 2.3.6. Histolojik boyama ve Apoptoz testi

Apoptoz kimyasalların canlılar üzerinde genotoksik bir etkiye sebep olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan biyobelirteçlerden biridir. Mikronükleus testiyle beraber kimyasalların/kirleticilerin etkilerini belirlenmesinde uygulanmaktadır.

Aklımasyon sürecinden sonra deneme düzeneği kurulmuştur. Cam akvaryumlar içerisine yapay deniz suyu (3 litre) ve havalandırma takıldıktan sonra her bir akvaryuma 10 midye eklenmiştir. Tüm deneme boyunca sıcaklık 16°C’de, oksijen ve pH ölçümleri yapılarak optimum koşullar sağlanmıştır. BPA, BPE, BPZ ve BADGE için uygulanan konsantrasyonlar kontrole ek beş konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Midyelerin maruz kaldığı konsantrasyonlar 0,01-0,1-1-100-1000 µg/L’dir. 7 gün sonunda 5 midye histolojik boyama ve apoptoz için, 5 midye ise daha sonraki enzim çalışması için disekte edilerek hepatopankreas ve solungaç dokuları alınmıştır. Enzim çalışması için alınan dokular -80°C’de muhafaza edilmek üzere konulmuştur.

Histolojik boyama ve apoptoz için alınan dokular ise %4’lük paraformaldehit içerisine alınmıştır. Burada fikse edildikten sonra 24-48s arası fiksatifte bekletilmiştir. 48s sonrasında pH 7,2/ 7,4 arası olan PBS solüsyonuna alınıp fiksatiften arındırmak amacıyla gece boyu bekletilmiştir. Dokular öncelikle %80’den başlamak şartıyla sırasıyla %95 ve 2 kez %96 olacak şekilde artan alkol serisinden geçirilmiştir. Daha sonrasında şeffaflama olarak adlandırılan basamakta dokulardan alkolün uzaklaştırılması amacıyla dokular ksilole alınmıştır ve gözle takip yöntemiyle şeffaflama gözleninceye kadar dokular ksilolde bekletilmiştir (Şekil 2.14).



Şekil 2. 14. Ksilolde şeffaflaşan solungaç ve hepatopankreas dokuları

Şeffaflandırılması tamamlanan dokular parafin 1 içerisinde alınmıştır. Dokuların içerisindeki ksilol uzaklaşarak dokunun içine parafinin nüfuz etmesi beklenilmiştir. Yarım saat parafin 1 de kalan dokular parafin 2'ye alınmıştır ve burada da yarım saat kadar bekletilmiştir. Sonrasında bloklama aşamasına geçilmiştir ve burada dokular bir kalıp içine konulmuş parafinde donmaya bırakılmıştır (Buhur ve Yavaşoğlu, 2017; Çakalağaoğlu, 2005).

Dokular bloklama işleminden sonra oda sıcaklığında 1 gün ve kesit alma işlemine başlamadan 1 saat önce buzdolabında +4 derecede bekletilmiştir. Dokulardan ışık mikroskopik incelemeler için Leica RM 2145 mikrotomda 5 µ'luk kesitler alınarak 37°C su banyosunda kesitlerin açılması sağlanarak rodajlı ve polilizinli lamlar üzerine doku kesitleri alınmıştır (Şekil 2.15) (Buhur ve Yavaşoğlu, 2017; Çakalağaoğlu, 2005).



Şekil 2.15. Doku kesiti örneği

**Histolojik Boyamalar:** Tüm boyamalardan önce dokuların deparafinizasyonu için öncelikle etüvde 57°C'de 1 saat boyunca bekletilmiştir. Etüvden çıkan preparatlar soğuduktan sonra ksilole dizilmiştir ve bir gece boyunca bekletilmiştir.

### **Hematoksilen Eozin Boyama**

Gece boyu ksilolde bekleyen preparatlar çıkartılıp kurutulmuştur. Daha sonra ise dokuların genel morfolojik ve histolojik özelliklerini gözlemlemek amacıyla aşağıda yer alan boyama protokolü uygulanmıştır.

#### **UYGULANAN İŞLEMLER**

#### **SÜRE**

1 % 100 Alkol

2 dakika

2 % 100 Alkol

2 dakika

3 % 95 Alkol

2 dakika

4 % 80 Alkol

2 dakika

5 Distile suda yıkama

3 dakika

6 Hematoksilende

3 dakika

7 Akarsu

5 dakika

8 Asit alkol

Doku pembe renk alana kadar batırıp çıkarılır.

9 Akarsuda yıkama

Daldır çıkar şeklinde

10 Amonyaklı su

Doku mor renk alana kadar batırıp çıkarıldı

11 Akarsu

Daldır çıkar şeklinde

12 Distile suda yıkama

5 dakika

13 Eozin

1 dakika

14 % 95 Alkol yıkama	Daldır çıkar şeklinde
15 % 95 Alkol yıkama	Daldır çıkar şeklinde
16 % 95 Alkol yıkama	Daldır çıkar şeklinde
17 Dışarıda kurutuldu	Birkaç saniye
18 Ksilol	30 dakika

19 Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatılmıştır.

Bu aşamadan sonra preparatlar mikroskop altında incelenmiştir.

### **Tunel Boyama Protokolü**

Bu boyama protokolü dokulardaki apoptotik hücreleri saptamak için yapılmaktadır. Solungaç ve hepatopankreas dokuları için aşağıda yer alan protokol uygulanmıştır.

UYGULANAN İŞLEMLER	SÜRE
1 %100 Alkol	2 dk
2 %95 Alkol	2 dk
3 %80 Alkol	2 dk
4 Distile suda yıkama	3 dk
5 %0.1 Triton X solüsyonu (pH:7.4)	5 dk
6 Dokunun etrafını çizme	
7 Proteaz K eklenerek, cover slip ile kapatma	20 dk
8 PBS ile yıkama 2 kez	2 dk

9 Vial 1 ve Vial 2 birleştirilerek hazırlanan solüsyondan

50 µl eklenerek lamaların üzeri cover slip ile kapatılır.

37C'de inkübe edilir.	60 dk
10 PBS ile yıkama 3 kez	2 dk
11 Dokuların üzerine 50-100 µl DAB substrat eklenir.	Göz ile takip
12 PBS ile yıkama 3 kez	2 dk
13 Mayers hematoksilin ile boyama	1 dk
14 Çeşme suyu ile yıkama	2 dk
15 Distile su ile yıkama	2 dk
16 %80 Alkol ile yıkama	Daldır çıkar şeklinde
17 %95 Alkol ile yıkama	Daldır çıkar şeklinde
18 %100 Alkol ile yıkama	Daldır çıkar şeklinde
19 Dışarıda kurutuldu	Birkaç saniye
20 Ksilol	30 dk
21 Kapatma	Entallen ile

### 2.3.7. İstatiksel değerlendirmeler

İstatiksel hesaplamalar Statistica uygulamasının 12.0 versiyonu ile Tukey's (Hill et al. 2002), Dunnet ve t testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LC<sub>50</sub> hesaplamaları EPA probit analiz programı versiyon 1.5 ile gerçekleştirilmiştir.

### 3. BULGULAR

Çalışmamızda BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin farklı konsantrasyonlarına maruz kalan *Mytilus galloprovincialis* türü üzerindeki etkileri akut ve subletal testlerle belirlenmeye çalışılmıştır. Tüm kimyasalların bu tür üzerindeki toksikolojik profilleri değerlendirilmiştir.

#### 3.1. Akut Toksikite testi sonuçları

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *Mytilus galloprovincialis* türü üzerindeki akut etkisini belirlemek amacıyla yapılan 96 saatlik test sonuçları Çizelge 4.1'de yer almaktadır. Uygulanan konsantrasyonlara (2-4-8-16-32 mg/L) göre hesaplanan LC<sub>50</sub> değerlerine göre en BPA>BPE>BPZ>BADGE şeklinde olduğu belirlenmiştir. Akut toksisite test sonuçlarına göre en etkili bileşik BPA olduğu tespit edilirken analoglar arasında karşılaştırma yapıldığında BPE diğer iki analogdan daha fazla etkilemektedir.

Çizelge 3. 1. BPA, BPE, BPZ ve BADGE için bulunan EC<sub>50</sub> değerleri

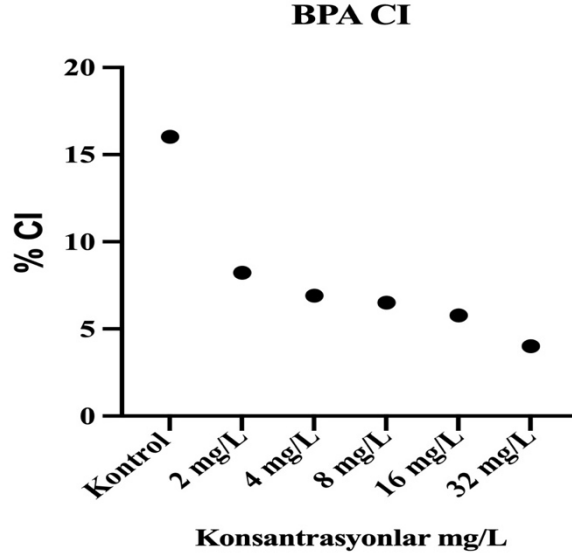
mg/L	BPA	BPE	BPZ	BADGE
LC <sub>50</sub>	2,085	5,391	11,246	15,40

LC<sub>50</sub> sonuçlarına göre bisfenollerin sucul ekosisteme giriş yapmasından sonra ulaştıkları bu konsantrasyonlarda midyelerin akut etkisinin olacağı ve popülasyonda ölüm gözleneceği tespit edilmiştir.

#### 3.2. Fizyolojik parametreler: Condition (büyüme) indeksi ve Gonadosomatik indeksi

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *Mytilus galloprovincialis* türü üzerindeki fizyolojik etkileri belirlenmiştir. Büyüme indeksi için maruziyet sonucunda kabuk ve tüm yumuşak dokunun kurutulup ağırlıklarının ölçülerek %CI formülü ve istatistiksel hesaplamalar yapılarak anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenmiştir.

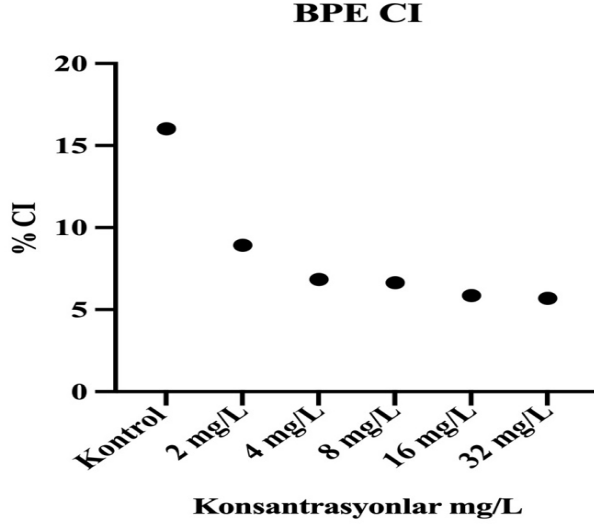
Artan BPA konsantrasyonlarına maruz kalmanın sonucunda büyüme indeksin kontrole (%16) göre azaldığı belirlenmiştir. 2 mg/L BPA konsantrasyonunda CI % 8'e indiği, 32 mg/L BPA konsantrasyonunda CI %4'e indiği belirlenmiştir.



**Şekil 3.1.** BPA konsantrasyonuna bağlı olarak bulunan %CI değerleri

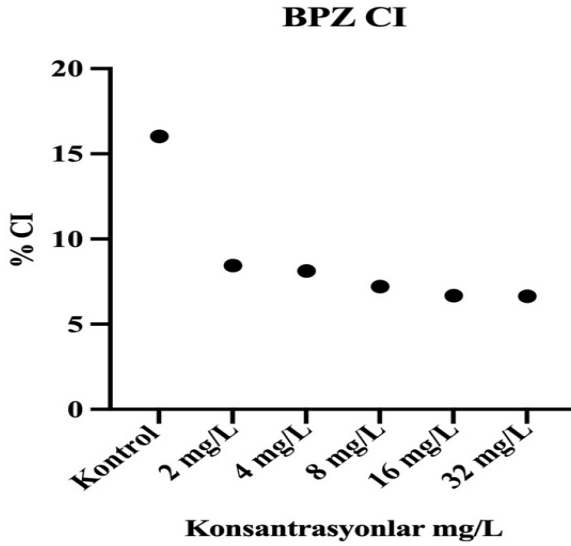
BPA'nın 4 mg/L ve 16 mg/L konsantrasyonlarında CI benzer şekilde etkilediği tespit edilmiştir. Genel olarak konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ) (Şekil 3.1).

Artan BPE konsantrasyonlarına maruz kalınmasının sonucunda kontrolle kıyaslandığında %CI değerlerinin düştüğü tespit edilmiştir. 2 mg/L BPE konsantrasyonunda CI'in %8'e düştüğü, 32 mg/L BPE konsantrasyonunda ise %5'lere düştüğü belirlenmiştir. Kontrol (%16) ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda bir düşme eğilimi tespit edilmiştir ancak konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında önemli derecede bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. BPE'nin konsantrasyona bağlı bulunan %CI

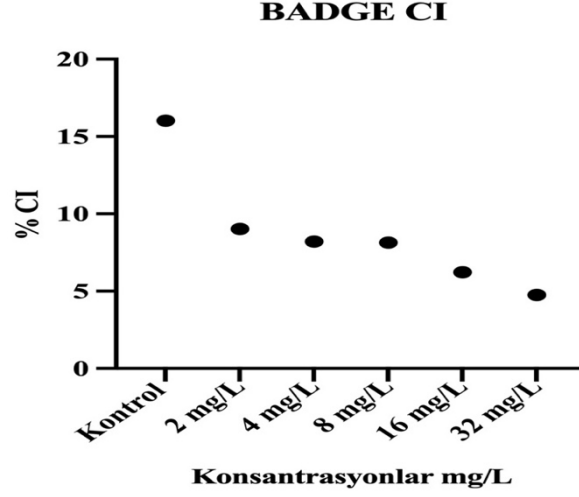
2 mg/L ve 4 mg/L BPZ konsantrasyonunun CI'i %8'e düştüğü, en yüksek konsantrasyon olan 32 mg/L'de ise CI'in %6'ya düştüğü tespit edilmiştir. Kontrol (%16) ile karşılaştırıldığında artan konsantrasyonlarda anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında yine BPE ile benzer önemli derecede bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. BPZ'nin konsantrasyona bağlı bulunan %CI

2 mg/L BADGE konsantrasyonunun CI'ni %9'a düşürdüğü, 32 mg/L BADGE konsantrasyonunun CI'ni %4'e düşürdüğü tespit edilmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında artan konsantrasyonlara bağlı olarak CI'in düştüğü

belirlenmiştir. (Şekil 3.4). Konsantrasyonlar arasında önemli derecede bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.

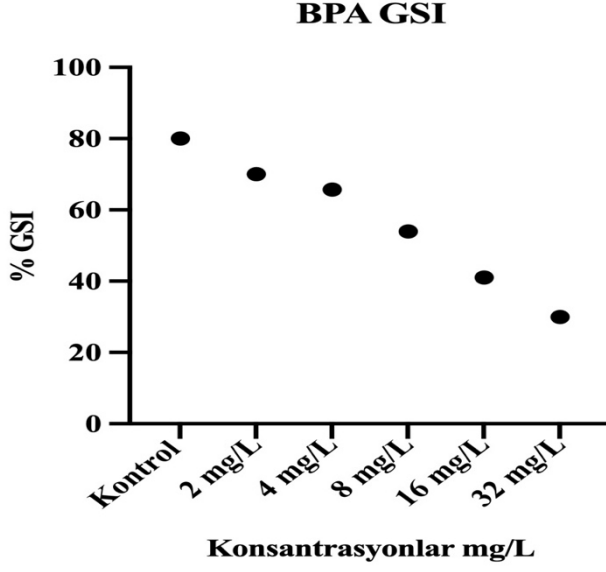


Şekil 3.4. BADGE'nin konsantrasyona bağlı bulunan %CI

Genel olarak BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *M. galloprovincialis* türünün büyüme indeksi üzerindeki etkili oldukları belirlenmiştir. Tüm bisfenoller kontrol ile kıyaslandığında bisfenollerin artan konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda anlamlı bir düşüşün olduğu belirlenmiştir. Bisfenoller arasında ise en yüksek konsantrasyona göre Büyüme indeksi BPA=BADGE> BPE>BPZ'nin olduğu tespit edilmiştir.

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *M. galloprovincialis* türünün gonadosomatik indeksine olan etkileri belirlenmiştir. Fiziksel parametrelerden biri olan % GSI, gonad ve diğer yumuşak dokunun kurutulmasından sonra ağırlık ölçümleri yapılarak ve formüle göre hesaplamalar yapılmıştır.

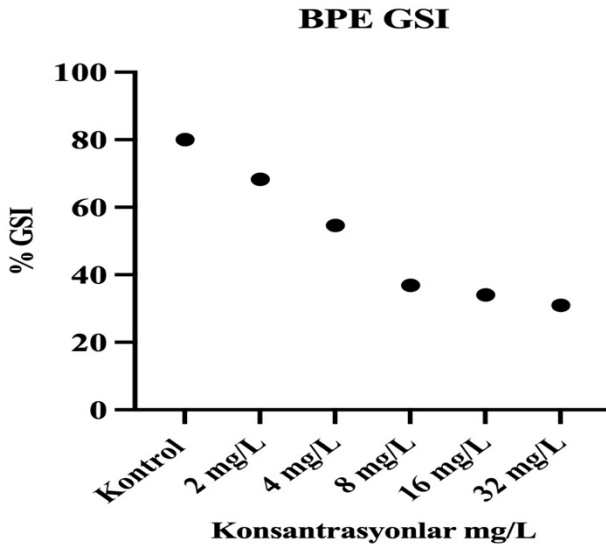
Artan BPA konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir düşüşün olduğu tespit edilmiştir. İlk konsantrasyonda (2 mg/L) GSI %70'lik bir azalma olduğu en yüksek konsantrasyon olan 32 mg/L'de GSI'nin %29'lara düştüğü belirlenmiştir (Şekil 3.5). Konsantrasyonlar arasında da anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).



Şekil 3.5. BPA'nın konsantrasyona bağlı bulunan %GSI

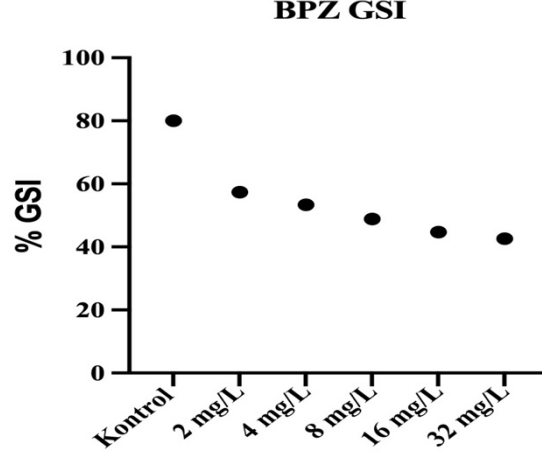
Artan BPE konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda kontrol ile kıyaslandığında 2 mg/L BPE konsantrasyonunda GSI % 68'e düştüğü, 4 mg/L BPE konsantrasyonunda %54'e düştüğü belirlenmiştir.

32 mg/L BPE konsantrasyonunda ise GSI'nin %30'lara düştüğü tespit edilmiştir. Konsantrasyonlar arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.6).



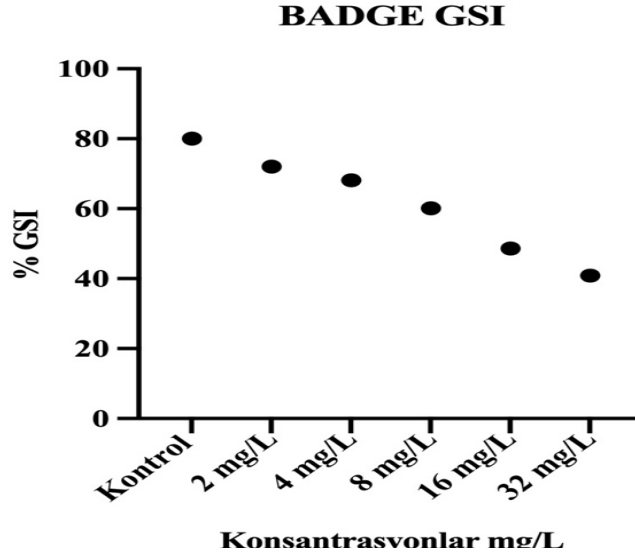
Şekil 3. 6. BPE'nin konsantrasyona bağlı bulunan %GSI

2 mg/L BPZ konsantrasyonunda GSI %57'ye düştüğü kontrol ile kıyaslandığında diğer konsantrasyonlar arasında bir fark olduğu belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 32 mg/L BPZ %42'lik bir düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında önemli bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir (şekil 3.7).



şekil 3.7. BPZ'nin konsantrasyona bağlı bulunan %GSI

BADGE'nin 2 mg/L konsantrasyonunda kontrol ile kıyaslandığında GSI %72'lik bir düşüşe neden olduğu, 32 mg/L konsantrasyonunda ise %40'lık bir düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (şekil 3.8).

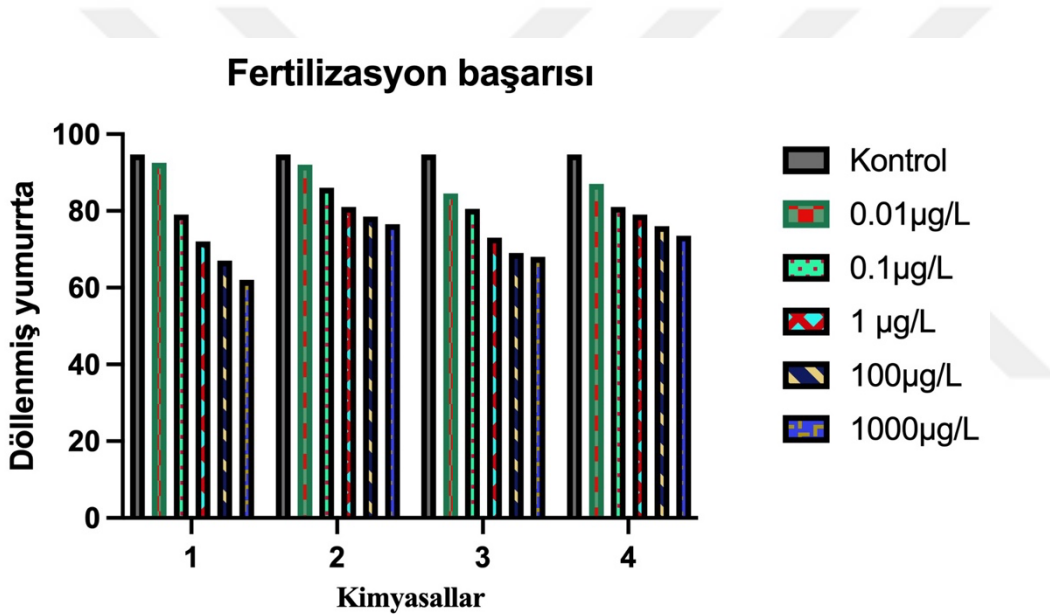


şekil 3.8. BADGE'nin konsantrasyona bağlı bulunan %GSI

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *M. galloprovincialis* türünün gonadları üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. BPA ve BPE'nin, BPZ ve BADGE'nin etkileri birbirine yakındır. Midyeler muhtemelen BPA, BPE, BPZ ve BADGE alımını önlemek için süzerek beslenme aktivitesini azaltmıştır. Metabolizma ve üreme için kullanılmayan enerjinin, savunma ve onarım mekanizmalarında kullanılacağı düşünülmektedir.

### 3.3. Midye fertilizasyon (döllenme) başarıları

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin midye döllenme üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Mikroskobik sayımlardan sonra DE değeri formüle göre hesaplanmıştır. Şekil 3.9'da BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin artan konsantrasyonlara göre döllenme başarıları yer almaktadır.



Şekil 3.9. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin midye döllenme başarıları üzerine etkisi 1:BPA, 2:BPE, 3:BADGE, 4:BPZ

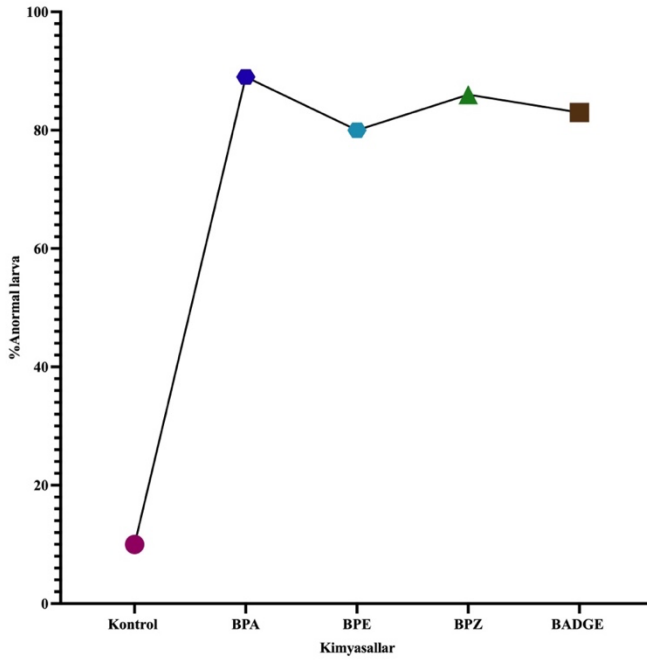
BPA'nın döllenme üzerinde diğer analoglara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. BPA'dan sonra BPZ ve BADGE döllenme üzerinde birbirine yakın etkiye neden oldukları, BPE'nin ise döllenme üzerinde etkisi en az olan bisfenol olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin hesaplanan %DE değerleri

	Konsantrasyon (µg/L)	%FO	DE	Döllenmemiş yumurta
Kontrol		94,67± 0,88		5,33 ± 0,88
BPA	0,01	93,5 ± 1,5	-1,23	6,5 ± 1,5
	0,1	77,5 ± 0,5	-18,13	22,5± 0,5
	1,0	72 ± 1	-25,23	28 ± 1
	100	68 ± 2	-28,16	32 ± 2
	1000	64,5 ± 0,5	-31,86	35,5±0,5
BPE	0,01	92 ± 2	-2,81	8 ± 2
	0,1	86 ± 1	-9,15	14 ± 1
	1,0	81 ± 1	-14,43	19 ± 1
	100	78,5 ± 0,5	-17,07	21 ± 0,5
	1000	76,5 ± 0,5	-19,19	23,5±0,5
BPZ	0,01	84,5 ± 1,5	-10,73	15 ± 1,5
	0,1	80,5 ± 1,5	-14,96	19 ± 1,5
	1,0	73 ± 2	-22,88	27 ± 2
	100	69 ± 1	-27,11	31 ± 1
	1000	68±1	-26,33	32 ± 1
BADGE	0,01	87 ± 1	-8,09	13 ± 1
	0,1	81± 2	-12,27	19 ± 2
	1,0	79 ± 1	-12,91	21 ± 1
	100	76 ± 1	-13,59	24 ± 1
	1000	73,5±0,5	-14,00	26,5 ± 0,5

0,01 µg/L BPE konsantrasyonunda döllenmeyi arttıran bir etkiye neden olduğu aynı durumun BPA için de geçerli olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.2). 0,1 µg/L BPZ ve BADGE konsantrasyonlarında döllenme başarısının azalmaya başladığı, BPA ve BPE'den daha etkili olduğu bulunmuştur. 1 µg/L konsantrasyonundan itibaren ise tüm bisfenollerin maruziyetinin fertilizasyon başarısını negatif yönde etkilediği tespit edilmiştir. Döllenme başarısını etkileme dereceleri ise sırasıyla BPA>BPZ>BADGE>BPE olarak bulunmuştur (Çizelge 3.2).

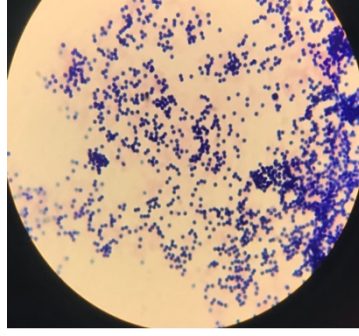
0,01-0,1-1-100-1000  $\mu\text{g/L}$  BPA, BPE, BPZ ve BADGE maruz kalan midyelerin larvaları kontrole göre artan konsantrasyonda D-veliger safhasına ulaşamamıştır. Tüm konsantrasyonlarda larvaların arrested trokofora larvasında ve preveliger safhasında kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, malformasyon olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan konsantrasyonlara göre BPA, BPE, BPZ ve BADGE’de belirlenen anormal larva %50-%90 arasında olduğu için Woelke (1956) kriterlerine göre letal eşik ve letal toksik olarak bulunmuşlardır. En yüksek konsantrasyona göre belirlenen anormal larvaların kontrole göre % değişimine göre BPA en toksik bisfenol olarak bulunmuştur (Şekil 3. 10).



Şekil 3.10. Kimyasala bağlı bulunan % anormal larva

### 3.3. Mikronükleus testinin sonuçları

BPA, BPE, BPZ ve BADGE’ye maruz kalan *M. galloprovincialis* türünün hemolenf, solungaç ve hepatopankreas dokularında oluşan mikronükleus frekansı tespit edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 2.3.73.11. Mikronükleus

### 3.3.1. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin hemolenf hücreleri üzerine etkisi

0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BPA konsantrasyonlarına maruz kalan midyelerin hemolenf hücrelerinde oluşan mikronükleus frekansı kontrole göre artan konsantrasyonlara bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. 0,01 µg/L BPA konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %7 olan MN frekansı aynı konsantrasyon için 72. saatte %14 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BPA konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24. saatte %21 olan MN frekansı aynı konsantrasyon için 72. saatte %31,2 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Uygulanan BPA konsantrasyonlarına bağlı hemolenf hücrelerinde bulunan mikronükleus frekansı (\*p<0,05)

Konsantrasyonlar µg BPA/L	Hemolenf hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,5±0,28	999,5±0,28	999,5±0,23	0,5±0,28	0,5±0,28	0,5±0,23
CdCl <sub>2</sub>	998,6±0,34	997,3±0,61	991,4±0,76	1,4±0,34*	2,7±0,61*	8,6±0,76*
0,01	993±0,81	990,25±0,62	986±0,40	7±0,81*	9,75±0,62*	14±0,40*
0,1	987±1,08	984,75±0,85	981,3±0,62	13±1,08*	15,3±0,85*	18,75±0,62*
1,0	982,8±0,47	999,25±0,62	977,5±0,52	17,3±0,47*	20,8±0,62*	22,5±0,52*
100	981±0,40	976,5±0,28	972,9±0,63	19±0,40*	23,5±0,28*	27,1±0,63*
1000	978,3±0,47	973,5±0,64	968,8±0,40	21,8±0,47*	26,5±0,64*	31,2±0,40*

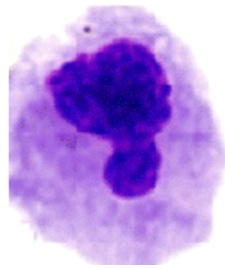
0,01-0,1-1-100-1000  $\mu\text{g/L}$  BPE konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda kontrole bağılı olarak mikronükleus frekansında artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, zamana bağılı olarak MN frekansının yükseldiği belirlenmiştir. 0,01  $\mu\text{g/L}$  BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %3,5 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %10,5 olarak bulunmuştur. 1000  $\mu\text{g/L}$  BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %12,8 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %26,1 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.4.** Uygulanan BPE konsantrasyonlarına bağılı hemolenf hücrelerinde bulunan mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar $\mu\text{g BPE/L}$	Hemolenf hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,5 $\pm$ 0,28	999,5 $\pm$ 0,28	999,5 $\pm$ 0,23	0,5 $\pm$ 0,28	0,5 $\pm$ 0,28	0,5 $\pm$ 0,23
CdCl <sub>2</sub>	998,6 $\pm$ 0,34	997,3 $\pm$ 0,61	991,4 $\pm$ 0,76	1,4 $\pm$ 0,34*	2,7 $\pm$ 0,61*	8,6 $\pm$ 0,76*
0,01	993,5 $\pm$ 0,64	988,8 $\pm$ 0,85	985 $\pm$ 0,66	3,5 $\pm$ 0,5*	6,8 $\pm$ 0,25*	10,5 $\pm$ 0,48*
0,1	987 $\pm$ 1,08	983,3 $\pm$ 0,85	980 $\pm$ 0,25	7,8 $\pm$ 0,62*	10 $\pm$ 0,92*	13,8 $\pm$ 0,82*
1,0	984,3 $\pm$ 0,94	981,3 $\pm$ 0,75	977,3 $\pm$ 0,55	9,3 $\pm$ 0,47*	11,5 $\pm$ 0,64*	16,1 $\pm$ 0,95*
100	981,3 $\pm$ 0,47	978,8 $\pm$ 0,85	971,8 $\pm$ 0,71	11,8 $\pm$ 0,25*	12,8 $\pm$ 0,47*	21,3 $\pm$ 0,56*
1000	980,3 $\pm$ 3,42	974 $\pm$ 1,35	967,1 $\pm$ 0,56	12,8 $\pm$ 1,03*	15,5 $\pm$ 0,28*	26,1 $\pm$ 1,50*

\*p<0,05

BPE'nin hemolenf hücrelerinde BPA'dan farklı olarak diğer nükleer anomalilerden ve genotoksik olarak kabul edilen nükleer tomurcuklanma (NUB) oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.12). Kontrol ile karşılaştırıldığında konsantrasyona ve günlere bağılı olarak NUB frekansında artış olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 3.12.** Nükleer tomurcuklanma (NUB)

0,01 µg/L BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %3 olan NUB frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %4,5 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %9,5 olan NUB frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %6,8 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.5). 72. saatte NUB oluşumunda bir azalma olmasına karşılık, MN frekansında bir artış olduğu ve birbirleriyle ters bir paralellik gösterdikleri belirlenmiştir. Buna bağlı, olarak BPE hemolenf hücrelerinde gözlemlenen MN frekansı diğer bisfenoller ile karşılaştırıldığında daha az etkilemiş olarak görünmesine rağmen bu durumun NUB oluşumundan kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

**Çizelge 3.5.** Uygulanan BPE konsantrasyonlarına bağlı olarak hemolenf hücrelerinde belirlenen NUB frekansı

Konsantrasyonlar µg BPE/L	Hemolenf hücreleri		
	Nükleer tomurcuklanma (n=10)		
	24h	48h	72h
<b>Kontrol</b>	<b>0,0±0,00</b>	<b>0,0±0,00</b>	<b>0,0±0,00</b>
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	<b>0,0±0,00</b>	<b>0,0 ±0,00</b>	<b>0,0±0,00</b>
<b>0,01</b>	<b>3±0,00</b>	<b>4,5±0,64*</b>	<b>4,5±0,67*</b>
<b>0,1</b>	<b>5,3±0,47*</b>	<b>6,8±0,47*</b>	<b>5,6±0,92*</b>
<b>1,0</b>	<b>6,5±0,64*</b>	<b>7,3 ±0,85*</b>	<b>6,6±0,98*</b>
<b>100</b>	<b>7±0,40*</b>	<b>8,5±0,5*</b>	<b>6,8±0,43*</b>
<b>1000</b>	<b>9,5±2,10*</b>	<b>10,5±1,19*</b>	<b>6,8±1,22*</b>

\*p<0,05

0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BPZ konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda, konsantrasyonlar ve günlere bağlı olarak MN frekansının kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir. 0,01 µg/L BPZ konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %4,25 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %9,17 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %19,5 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %28,6 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.6).

0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BADGE konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda, konsantrasyonlar ve günlere bağlı olarak MN frekansının kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir. 0,01 µg/L BADGE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %0,25 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %6,17 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BADGE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %10,8 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %21,6 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.7).

**Çizelge 3.6.** Uygulanan BPZ konsantrasyonlarına bağlı olarak hemolenf hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BPZ/L	Hemolenf hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,5±0,28	999,5±0,28	999,5±0,23	0,5±0,28	0,5±0,28	0,5±0,23
CdCl <sub>2</sub>	998,6±0,34	997,3±0,61	991,4±0,76	1,4±0,34*	2,7±0,61*	8,6±0,76*
0,01	995,8±0,47	994±0,40	990,8±0,35	4,25±0,47*	6±0,40*	9,17±0,38*
0,1	992±0,40	989±1,29	982,8±0,44	8±0,40*	11±1,29*	17,3±0,44*
1,0	989,3±0,47	985,3±0,47	979,3±0,71	10,8±0,47*	14,8±0,47*	20,7±0,71*
100	986±1,08	983,8±0,47	974,8±0,50	14±1,08*	16,3±0,47*	25,3±0,50*
1000	980,5±0,64	978,5±0,95	971,4±0,54	19,5±0,64*	21,5±0,95*	28,6±0,54*

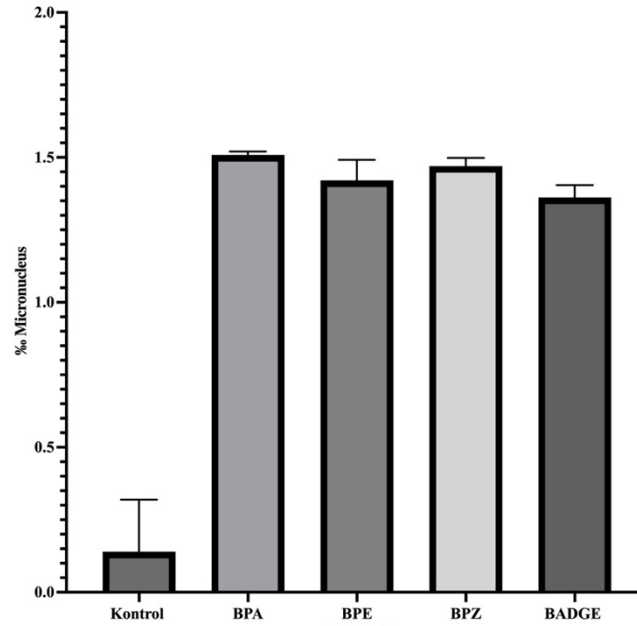
\*p<0,05

**Çizelge 3.7.** Uygulanan BADGE konsantrasyonlarına bağlı olarak hemolenf hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BADGE/L	Hemolenf hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,5±0,28	999,5±0,28	999,5±0,23	0,5±0,28	0,5±0,28	0,5±0,23
CdCl <sub>2</sub>	998,6±0,34	997,3±0,61	991,4±0,76	1,4±0,34*	2,7±0,61*	8,6±0,76*
0,01	999,8±0,25	997,25±0,47	993,8±0,36	0,25±0,25*	2,75±0,47*	6,17±0,36*
0,1	997,5±0,28	994,5±0,64	989,6±0,70	2,5±0,28*	5,5±0,64*	10,4±0,70*
1,0	999,5±0,64	991,25±0,47	985,3±0,33	4,5±0,64*	8,75±0,47*	14,7±0,33*
100	992±1,08	988,5±1,04	9981,9±0,37	8±1,08*	11,5±1,04*	18,1±0,37*
1000	989,25±0,75	983,75±1,31	978,4±0,65	10,75±0,75*	16,25±1,31*	21,6±0,65*

\*p<0,05

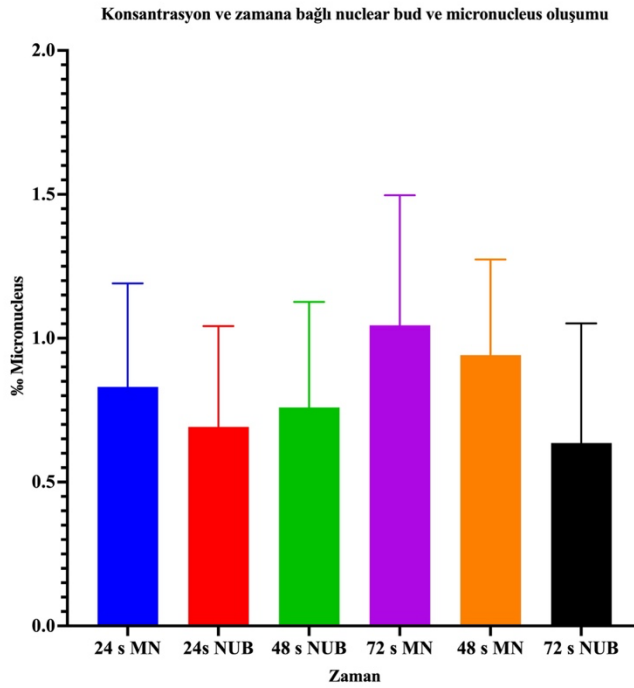
BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin 1000 µg/L konsantrasyonunda (72s) kontrolle karşılaştırıldığında MN frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.13) (p<0,05).



**Şekil 3.13.** Uygulanan BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin 1000 µg/L konsantrasyonunda belirlenen mikronükleus frekansı

72s sonunda hemolenf hücrelerindeki MN frekansı sırasıyla BPA>BPZ>BPE>BADGE olduğu belirlenmiştir. BPA yerine üretilen analoglar kendi açısından karşılaştırıldığında ise BPZ hemolenfleri daha çok etkilemiştir.

BPE'nin hemolenf üzerindeki etkilerinden biri olan NUB oluşumu göz önüne alındığında zamana bağlı olarak aralarındaki ilişkinin ters paralellik gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.14). İlk 24 saatte tespit edilen MN frekansı NUB'dan yüksek iken, 72. saatte tespit edilen MN frekansının NUB frekansından oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tüm bisfenoller arasında hemolenf hücrelerini en az etkileyen ise BADGE olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.14. Uygulanan BPE konsantrasyonlarına ve zamana bağlı olarak nükleer tomurcuklanma ve mikronükleus frekansı

### 3.3.2. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin solungaç hücreleri üzerindeki etkisi

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin artan konsantrasyonlarına maruz kalan midyelerin solungaç hücrelerinin hemolenf hücrelerinden daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak değişim gözlenmiştir.

0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BPA konsantrasyonlarına maruz kalan midyelerin solungaç hücrelerinde oluşan MN frekansı kontrole göre artan konsantrasyonlara bağlı olarak artmakta olduğu tespit edilmiştir. 24-48-72 saate bağlı olarak da MN frekansının arttığı belirlenmiştir. 0,01 µg/L BPA konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %8,5 olan MN frekansı, aynı konsantrasyon için 72. saatte %12,8 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BPA konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24. saatte %22 olan MN frekansı, aynı konsantrasyon için 72. saatte %32 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.8).

**Çizelge 3.8.** Uygulanan BPA konsantrasyonlarına bağlı olarak solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BPA/L	Solungaç hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,3±0,47	999±0,57	999,2±0,24	0,8±0,47	1±0,57	0,8±0,24
CdCl <sub>2</sub>	995,5±0,26	993,3±0,36	989,1±0,40	4,5±0,26*	6,7±0,36*	10,9±0,40*
0,01	991,5±0,64	988,5 ±0,64	987,25±0,47	8,5±0,64*	11,5±0,64*	12,8±0,47*
0,1	987±0,40	983,5±0,28	983±0,40	13±0,40*	16,5±0,28*	17±0,40*
1,0	981,5±0,64	980,25±0,85	980,2±0,41	18,5±0,64*	19,75 ±0,85*	19,8±0,41*
100	979±0,40	977 ±0,70	973,63±0,41	21±0,40*	23±0,70*	26,37±0,41*
1000	977,25±0,47	975,5 ±0,86	968±0,85	22,75±0,47*	24,5±0,86*	32±0,85*

\*p<0,05

0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BPE konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda kontrole bağlı olarak MN frekansında artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, zamana bağlı olarak da MN frekansının yükseldiği belirlenmiştir. 0,01 µg/L BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %5,5 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %13,4 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %21,8 olan MN

frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %24,6 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.9).

**Çizelge 3.9.** Uygulanan BPE konsantrasyonlarına bağlı olarak solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BPE/L	Solungaç hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,3±0,47	999±0,57	999,2±0,24	0,8±0,47	1±0,57	0,8±0,24
CdCl <sub>2</sub>	995,5±0,26	993,3±0,36	989,1±0,40	4,5±0,26*	6,7±0,36*	10,9±0,40*
0,01	994,5±0,64	990,5±0,5	986,6±0,43	5,5±0,64*	9,5±0,5*	13,4±0,43*
0,1	990,3±0,47	986,3±0,75	981,9±0,51	9,75±0,47*	13,8±0,75*	18,1±0,51*
1,0	985,8±0,47	984,8±0,47	980,3±0,35	14,3±0,47*	15,3±0,47*	19,8±0,35*
100	982,5±0,5	979,8±1,10	977,1±0,29	17,5±0,5*	20,3±1,10*	22,9±0,29*
1000	978,3±0,75	977±0,91	975,4±1,35	21,8±0,75*	23±0,91*	24,6±1,35*

\*p<0,05

0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BPZ konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda, konsantrasyonlar ve günlere bağlı olarak MN frekansının kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir. 0,01 µg/L BPZ konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %5,3 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %13,1 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %17,5 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %24,6 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3. 10).

**Çizelge 3.10.** Uygulanan BPZ konsantrasyonlarına bağlı olarak solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BPZ/L	Solungaç hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,3±0,47	999±0,57	999,2±0,24	0,8±0,47	1±0,57	0,8±0,24
CdCl <sub>2</sub>	995,5±0,26	993,3±0,36	989,1±0,40	4,5±0,26*	6,7±0,36*	10,9±0,40*
0,01	994,8±0,62	991,8 ±0,25	986,9±0,58	5,3±0,62*	8,3±0,25*	13,1±0,58*
0,1	991,3±0,47	988 ±0,70	984,6±0,28	8,8±0,47*	12 ±0,70*	15,4±0,28*
1,0	989±0,70	986 ±0,40	982,7±0,28	11±0,70*	14 ±0,40*	17,3±0,28*
100	986,3±0,62	983,3 ±0,47	980,3±0,33	13,8±0,62*	16,8±0,47*	19,7±0,33*
1000	982,5±0,64	981,9 ±0,40	975,4±0,55	17,5±0,64*	19±0,40*	24,6±0,55*

\*p<0,05

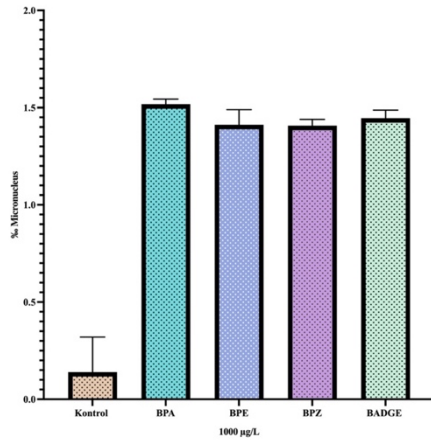
0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BADGE konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda, konsantrasyonlar ve günlere bağlı olarak MN frekansının kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir. 0,01 µg/L BADGE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %1 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %6,3 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BADGE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %12,5 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %26,5 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.11).

**Çizelge 3.11.** Uygulanan BADGE konsantrasyonlarına bağlı olarak solungaç hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BADGE/L	Solungaç hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,3±0,47	999±0,57	999,2±0,24	0,8±0,47	1±0,57	0,8±0,24
CdCl <sub>2</sub>	995,5±0,26	993,3±0,36	989,1±0,40	4,5±0,26*	6,7±0,36*	10,9±0,40*
0,01	999±0,40	996,8 ±0,75	993,7±0,49	1±0,40*	3,25±0,75*	6,3±0,49*
0,1	997,7±0,47	990±1,41	985,4±0,98	2,3±0,47*	10 ±1,41*	14,63±0,98*
1,0	994,25±0,85	986,5±0,95	982±0,53	5,75±0,85*	13,5 ±0,95*	18±0,53*
100	990,7±0,25	982,3 ±0,47	976,5±0,61	9,3±0,25*	17,75±0,47*	23,5±0,61*
1000	987,5±0,64	980,5 ±0,28	973,5±0,80	12,5±0,64*	19,5±0,28*	26,5±0,80*

\*p<0,05

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin 1000 µg/L konsantrasyonunda (72s) kontrol ile karşılaştırıldığında MN frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.15). Solungaç hücrelerini etkileme açısından sırasıyla BPA>BADGE>BPE=BPZ şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Hemolenf hücrelerindeki gibi solungaç hücreleri açısından da BPA en sitotoksik etkiyi göstermesine karşılık analoglar kendi aralarında karşılaştırıldığında BADGE'nin daha etkili olduğu, buna karşılık BPE ve BPZ'nin aynı derecede etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.



**Şekil 3.15.** Uygulanan BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin 1000 µg/L konsantrasyonunda belirlenen mikronükleus frekansı

### 3.3.3. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin hepatopankreas hücreleri üzerine etkileri

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin artan konsantrasyonlarına maruz kalan midyelerin hepatopankreas hücreleri üzerinde etkili oldukları ve zamana bağlı olarak MN frekansında değişim olduğu gözlenmiştir. 0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BPA konsantrasyonlarına maruz kalan midyelerin hepatopankreas hücrelerinde oluşan MN frekansının kontrole göre artan konsantrasyonlara bağlı olarak artmakta olduğu tespit edilmiştir. 0,01 µg/L BPA konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %6,5 olan MN frekansı, aynı konsantrasyon için 72. saatte %12,8 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BPA konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24. saatte %19,8 olan MN frekansı, aynı konsantrasyon için 72. saatte %27,7 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3. 12).

**Çizelge 3.12.** Uygulanan BPA konsantrasyonlarına bağlı olarak hepatopankreas hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BPA/L	Hepatopankreas hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,8±0,25	999,8±0,25	999,5±0,23	0,3±0,25	0,3±0,25	0,5±0,23
CdCl <sub>2</sub>	998,6±0,34	997,3±0,61	991,4±0,76	1,4±0,34*	2,7±0,61*	8,6±0,76*
0,01	993,5±0,64	990,25±0,47	987,25±0,47	6,5±0,64*	9,75±0,47*	12,8±0,47*
0,1	989,5±0,64	986,5±0,64	984±0,40	10,5±0,64*	13,5±0,64*	16±0,40*
1,0	985,5±0,64	983,25±0,47	980,5±0,40	14,5±0,64*	16,75±0,47*	19,5±0,40*
100	982,75±0,47	981±0,40	978±0,53	17,25±0,47*	19±0,40*	22±0,53*
1000	980,25±0,25	977,25±0,47	972,3±0,67	19,8±0,25*	22,75±0,47*	27,7±0,67*

0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BPE konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda kontrole bağlı olarak MN frekansında artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, zamana bağlı olarak da MN frekansının yükseldiği belirlenmiştir. 0,01 µg/L BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %3,8 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %9 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %13,3 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %21 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3. 13).

**Çizelge 3.13.** Uygulanan BPE konsantrasyonlarına bağlı olarak hepatopankreas hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BPE/L	Hepatopankreas hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,8±0,25	999,8±0,25	999,8±0,25	999,5±0,23	0,3±0,25	0,3±0,25
CdCl <sub>2</sub>	995,5±0,26	993,3±0,36	989,1±0,40	4,5±0,26*	6,7±0,36*	8,3±0,59*
0,01	996,3±0,25	994,5±0,28	991±0,44	3,8±0,25*	5,5±0,28*	9±0,44*
0,1	994±0,40	991,5±0,64	986,5±0,28	6±0,40*	8,5±0,64*	13,5±0,28*
1,0	992,3±0,25	987,5±0,64	984,9±0,25	7,8±0,25*	12,5±0,64*	15,1±0,25*
100	989,5±0,86	985,8±0,47	982,4±0,41	10,5±0,86*	14,3±0,47*	17,6±0,41*
1000	986,8±0,47	983,3±0,47	979±0,33	13,3±0,47*	16,8±0,47*	21±0,33*

\*p<0,05

0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BPZ konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda, konsantrasyonlar ve günlere bağlı olarak MN frekansının kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir. 0,01 µg/L BPZ konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %5 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %8,17 olarak bulunmuştur. 1000 µg/L BPE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %15,8 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %22,1 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3. 14).

**Çizelge 3.14.** Uygulanan BPZ konsantrasyonlarına bağlı olarak hepatopankreas hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BPZ/L	Hepatopankreas hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,8±0,25	999,8±0,25	999,8±0,25	999,5±0,23	0,3±0,25	0,3±0,25
CdCl <sub>2</sub>	998,6±0,34	997,3±0,61	991,4±0,76	1,4±0,34*	2,7±0,61*	8,6±0,76*
0,01	995±0,91	993,8±0,62	991,8±0,48	5±0,91*	6,3±0,62*	8,17±0,48*
0,1	993±0,70	991±0,40	987,9±0,43	7±0,70*	9±0,40*	12,1±0,43*
1,0	988,5±0,64	986,5±0,64	984,4±0,31	11,5±0,64*	13,5±0,64*	15,6±0,31*
100	986,5±1,04	983,3±0,47	981±0,32	13,5±1,04*	16,8±0,47*	19±0,32*
1000	984,3±0,25	980,5±0,28	977,9±0,47	15,8±0,25*	19,5±0,28*	22,1±0,47*

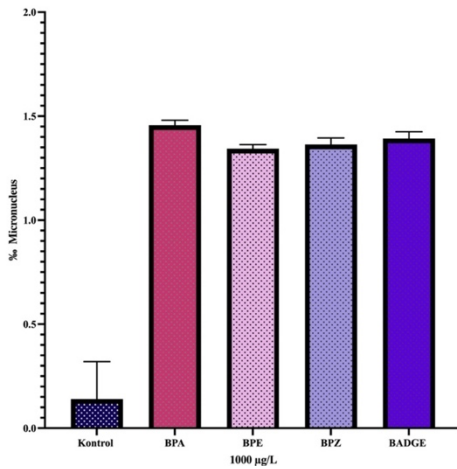
0,01-0,1-1-100-1000 µg/L BADGE konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda, konsantrasyonlar ve günlere bağlı olarak MN frekansının kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir. 1000 µg/L BADGE konsantrasyonuna maruz kalınması sonucunda 24.saatinde %15,5 olan MN frekansı, aynı konsantrasyonun 72. saatinde %23,4 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.15).

**Çizelge 3.15.** Uygulanan BADGE konsantrasyonlarına bağlı olarak hepatopankreas hücrelerinde belirlenen mikronükleus frekansı

Konsantrasyonlar µg BADGE/L	Hepatopankreas hücreleri					
	N (n=10)			MN (n=10)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Kontrol	999,8±0,25	999,8±0,25	999,5±0,23	0,3±0,25	0,3±0,25	0,5±0,23
CdCl <sub>2</sub>	998,6±0,34	997,3±0,61	991,4±0,76	1,4±0,34*	2,7±0,61*	8,6±0,76*
0,01	997,5±0,28	993,75±0,62	991,75±0,39	2,5±0,28*	6,25±0,62*	8,3±0,39*
0,1	995,3±0,47	991,75±0,47	987,75±0,52	4,75±0,47*	8,25±0,47*	12,25±0,52*
1,0	992±0,40	988,25±0,85	983,3±0,47	8±0,40*	11,75±0,85*	16,17±0,47*
100	988,5±0,64	982,25±0,85	980,1±0,23	11,5±0,64*	14,75±0,85*	19,9±0,23*
1000	984,8±0,47	982±0,40	976,6±0,56	15,25±0,47*	18±0,40*	23,4±0,56*

\*p<0,05

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin 1000 µg/L konsantrasyonunda (72s) kontrol ile karşılaştırıldığında MN frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.16). Hepatopankreas hücrelerini etkileme açısından sırasıyla BPA>BADGE>BPZ>BPE şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Hemolenf ve solungaç hücrelerindeki gibi hepatopankreas hücreleri açısından da BPA en sitotoksik etkiyi göstermesine karşılık analoglar kendi aralarında karşılaştırıldığında BADGE'nin, BPE ve BPZ'den daha fazla etkili olduğu bulunmuştur.



**Şekil 3.16.** Uygulanan BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin 1000 µg/L konsantrasyonunda hepatopankreas dokusunda belirlenen mikronükleus frekansı

Genel olarak bisfenollerin midyelerde 72 saatlik maruziyet sonucunda hemolenf, solungaç, hepatopankreas hücrelerinde MN oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin MN oluşumu arasında farklılıklar belirlenmiştir. BPA'nın tüm örnekleme dokularında (hemolenf, solungaç, hepatopankreas) en yüksek MN frekansına neden olan bileşik olduğu saptanmıştır. En yüksek konsantrasyon (1000 µg/L) BPA'ya maruz kalınması sonucunda, en yüksek MN frekansı (72s) solungaç (% 32) hücrelerinde saptanmıştır. Bunu sırasıyla hemolenf (% 31,2) ve hepatopankreas (% 27,7) hücreleri takip etmektedir. BPE, BPZ ve BADGE'nin MN oluşumunda etkili olduğu bulunmasına karşılık örnekleme dokularında tespit edilen MN frekanslarında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyon (1000 µg/L) BPE'ye maruz kalınması sonucunda, en yüksek MN frekansı (72s) hemolenf hücrelerinde (% 26,1) bulunmuştur. Daha sonra sırasıyla solungaç (% 24,6) ve hepatopankreas hücreleri (% 21) gelmektedir. BPZ'de ise en yüksek MN frekansı (72s) hemolenf (% 28,6) > Solungaç (% 24,6) > hepatopankreas (% 22,1) hücrelerinde saptanmıştır. BADGE açısından bakıldığında ise en yüksek MN frekansı (72) solungaç hücrelerinde (% 26,5) tespit edilmiştir. Daha sonra hepatopankreas (% 23,4) ve hemolenf (% 21,6) hücreleri gelmektedir.

Çalışmamızda BPA ve BADGE'nin solungaç hücrelerinde benzer sitotoksik etki gösterdikleri, BPE ve BPZ'nin ise hemolenf hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye neden oldukları tespit edilmiştir. Bununla beraber, BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *M. galloprovincialis* türünde genotoksik bir etkiye neden oldukları, tüm hücrelerde sitotoksositeye yol açtıkları saptanmıştır.

### **3.4. Apoptoz ve Histopatoloji sonuçları**

#### **3.4.1. Histopatoloji bulguları**

Hepatopankreas ve solungaç dokularının artan BPA, BPE, BPZ ve BADGE konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda histolojik değişimleri değerlendirilmiştir (Şekil 3.17-Şekil 3.18).

#### **Hepatopankreas:**

Kontrol grubu hepatopankreas histolojik kesitleri genel histolojik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Buna göre, digestif tübül epitel hücrelerinde intrasitoplazmik vakuoller gözlenmektedir. Digestif tübül epiteli bütünlüğünü korumuştur, tübül epitel hücrelerinde hücresel kayıp gözlenmemiştir.

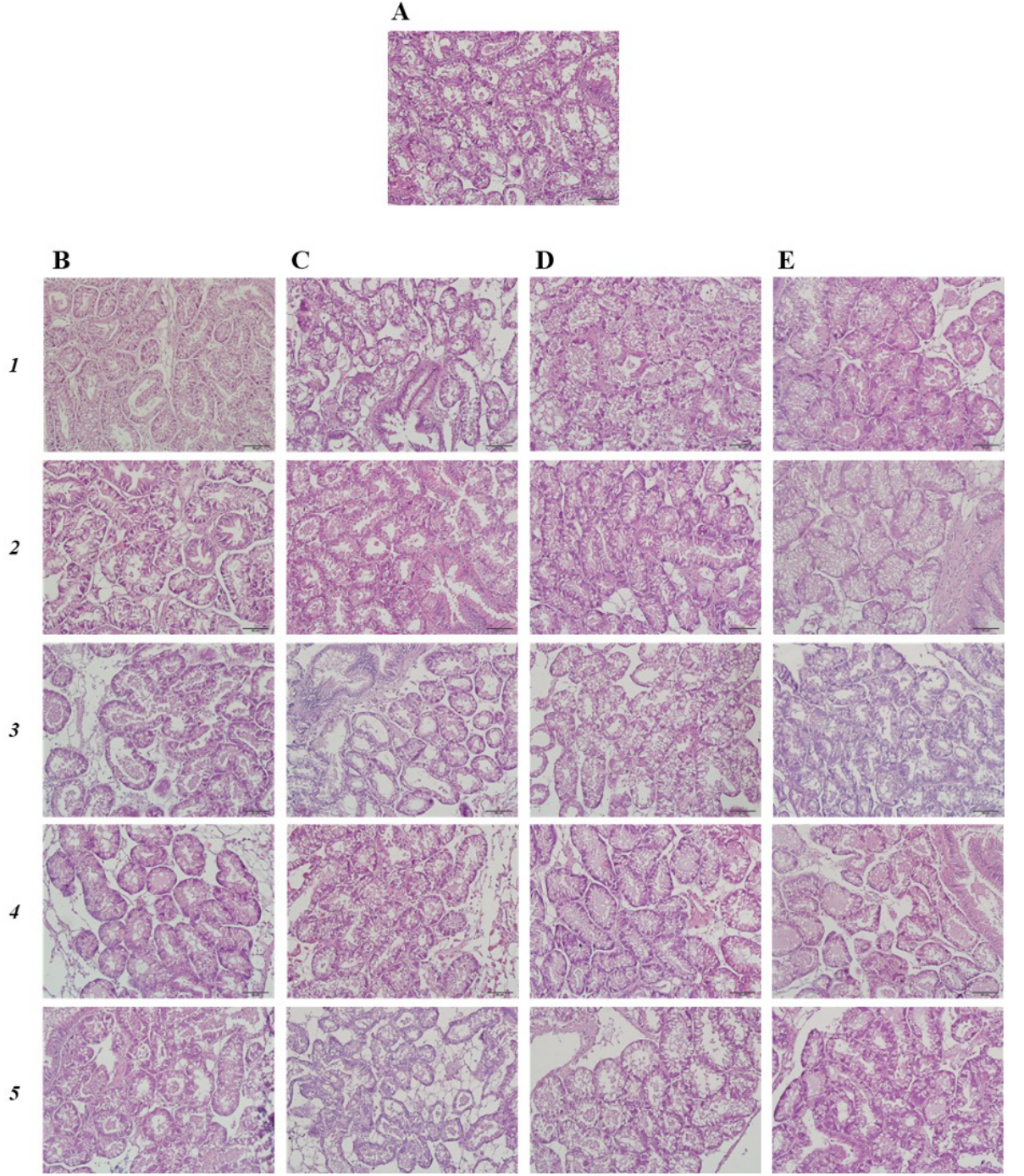
Digestif tübül epitel normal kalınlıkta izlenmiştir. İntersititial dokuda hemolitik infiltrasyon gözlenmemiştir.

BPA grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında digestif tübül epitel hücrelerinde artmış intrasitoplazmik vakuoller ve buna bağlı olarak bazı tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve hücreyel kayıplar izlenmektedir. Bu dejenerasyon ve vakuolleşme düşük konsantrasyonda BPA uygulanmasında hafif seyrederken, artan BPA konsantrasyonu ile birlikte ağırlaşmaktadır. Özellikle yüksek konsantrasyonda BPA uygulanan gruplarda bazı digestif tübüllerde tübül epitel bütünlüğünü kaybetmiş ve yer yer epitelde incelmeler gözlenmiştir. Ayrıca, kontrol grubundan farklı olarak intersititial dokuda konsantrasyona bağlı artış gösteren hemolitik infiltrasyon görülmektedir.

BPE grubu, kontrol ile karşılaştırıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak histolojik değişikliklerde de artış gözlenmiştir. Burada gözlemlenen dejenerasyon farklılıkları da BPA grubunda olduğu gibi konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. Digestif tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve hücreyel kayıplar izlenmektedir. Hemen hemen tüm digestif tübüllerin epitel bütünlüğünü kaybetmiş, epitelde incelmeler ve hatta çoğu tübülde tamamen epitel kayıpları gözlenmiştir. Ayrıca, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında intersititial dokuda daha yaygın hemolitik infiltrasyon görülmektedir.

BPZ grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında histolojik değişiklikler daha fazla olmasına rağmen, diğer gruplarla karşılaştırıldığında digestif tübül epitelinde gözlemlenen dejenerasyon ve vakuolleşmede bir farklılık gözlemlenmemektedir. Diğer gruplarda olduğu gibi artan BPZ konsantrasyonu ile digestif tübül epitelindeki dejenerasyon, hücreyel kayıplar ve vakuolleşme artmaktadır.

BADGE grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında artan BADGE konsantrasyonu ile birlikte yoğunlaşan digestif epitel ve interstisyel doku değişiklikleri gözlemlenmektedir. Diğer gruplar ile kıyaslandığında artan BADGE konsantrasyonunda değişiklikler artan BPA ile oluşan değişikliklere daha yakın gözlemlenmiştir.



**Şekil 3.17.** Hepatopankreas Hematoksilen-Eozin boyama. A: Kontrol grubu; B1: BPA. 0,01µg/L uygulaması; B2: BPA 0,1 µg/L uygulaması; B3: BPA 1 µg/L uygulaması; B4: BPA 100 µg/L uygulaması; B5: BPA 1000 µg/L uygulaması; C1: BPE 0,01 µg/L uygulaması; C2: BPE 0,1 µg/L uygulaması; C3: BPE 1 µg/L uygulaması; C4: BPE 100 µg/L uygulaması; C5: BPE 1000 µg/L uygulaması; D1: BPZ 0,01 µg/L uygulaması; D2: BPZ 0,1 µg/L uygulaması; D3: BPZ 1 µg/L uygulaması; D4: BPZ 100 µg/L uygulaması; D5: BPZ 1000 µg/L uygulaması; E1: BADGE 0,01 µg/L uygulaması; E2: BADGE 0,1 µg/L uygulaması; E3: BADGE 1 µg/L uygulaması; E4: BADGE 100 µg/L uygulaması; E5: BADGE 1000 µg/L uygulaması. Hematoksilen- Eozin boyama. x40 Büyütme

Kontrol grubu solungaç histolojik kesitleri genel histolojik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Solungaç filamentleri doku bütünlüğünü genel olarak korumuştur. Frontal, abfrontal ve lateral solungaç filamentleri bölgeleri normal histolojik görünümde izlenmiştir. Bununla birlikte, bazı solungaç filamentlerinde minimal düzeyde olmak üzere frontal ve abfrontal silyalarda silyar kayıp ve füzyonu gibi histolojik değişikliklere rastlanmıştır. Lateral silyalar normal görünümde değerlendirilmiştir. Bazı solungaç epitel hücrelerinde vakuolizasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca, solungaç filamentleri damar lümenlerinde minimal düzeyde şişme görülmüştür. Buna rağmen, solungaç lümeni bazal laminası normal görünümde izlenmiştir.

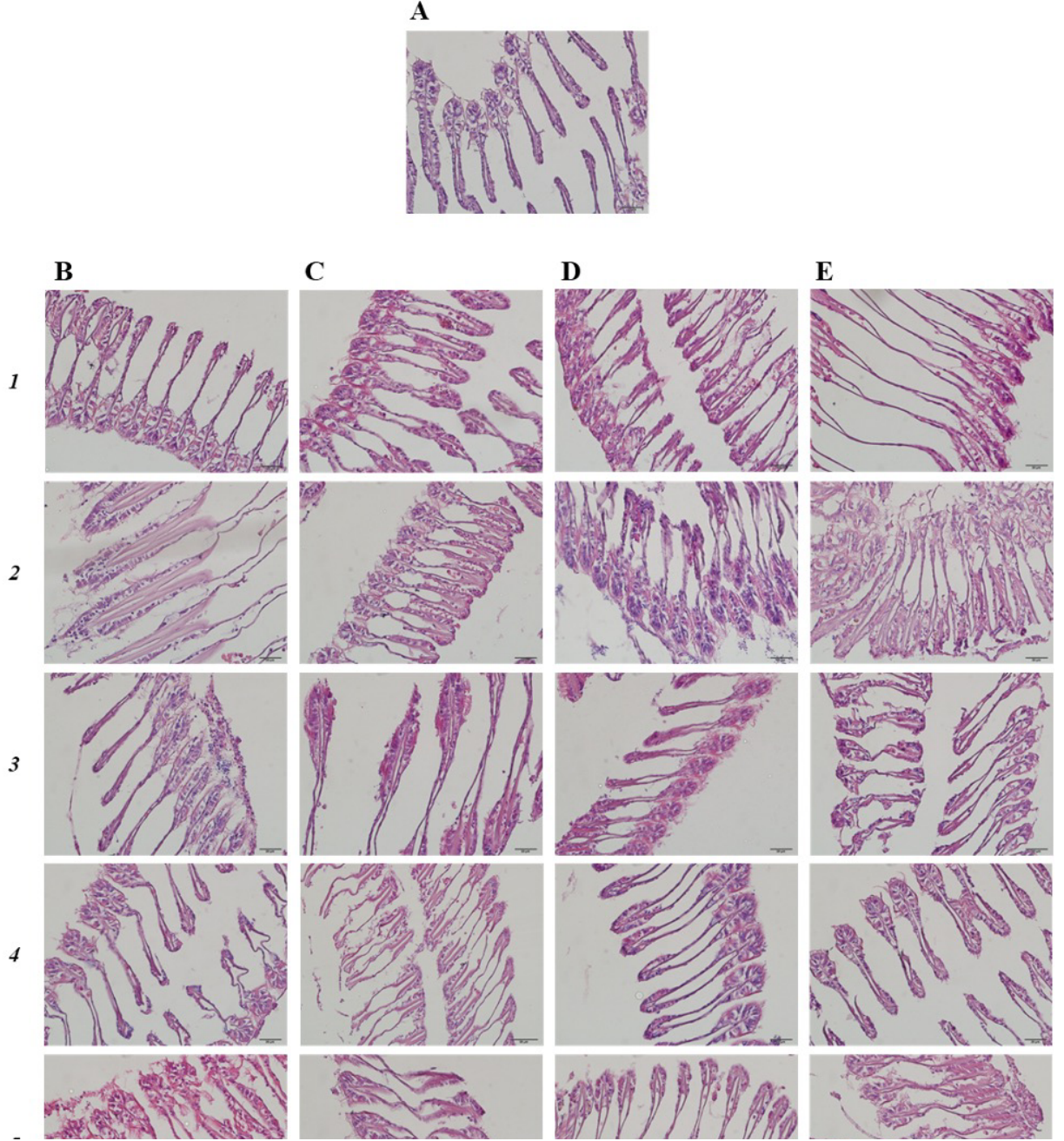
BPA grubu solungaç histolojik kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında solungaç filamentleri frontal, lateral ve abfrontal bölgelerinde mevcut silyalarda kırılma ve füzyon, silyar erezyon; frontal, lateral ve abfrontal solungaç filamentleri epitel hücrelerinde artan BPA konsantrasyonu ile orantılı olarak dejenerasyon ve hücre kayıpları izlenmiştir. Ek olarak, solungaç filamentleri damar lümeninde lateral bölgede genişleme görülürken, abfrontal ve frontal bölgelerde daralma izlenmiştir. Ayrıca, abfrontal ve frontal bölge lümenini çevreleyen bazal laminada kalınlaşma görülürken, lateral bölge bazal laminası normal görünümde değerlendirilmiştir.

BPE grubu, kontrol ile karşılaştırıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak histolojik değişikliklerde de artış gözlenmiştir. Buna göre, solungaç filamentlerinin tüm bölgelerinde silyar erezyon izlenmiştir. Tüm solungaç filamentleri bölgeleri epitel hücrelerinde dejenerasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca, abfrontal ve frontal bölge damar lümeninde maksimal daralma ve bazal lamina kalınlaşması izlenmiştir. Lateral bölge damar lümeninde genişleme görülmüştür.

BPZ grubu, kontrol ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında histolojik değişikliklerin bu grupta da konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı gözlemlenmektedir. BPA ve BPE gruplarına benzer şekilde solungaç filamentlerinin doku bütünlüğü bozulmuştur. Bununla birlikte, lateral, frontal ve abfrontal silyalarda, silyar kayıp ve füzyon gibi histolojik değişikliklere rastlanmıştır.

BADGE grubu artan konsantrasyonlara bağlı olarak BPA grubu ile karşılaştırıldığında solungaç lümeni bazal laminasında hafif düzeyde

kalınlaşmagörölmüştür. Diğer histolojik değişiklikler BPA grubu ile benzerlik göstermektedir.



**Şekil 3.18.** Solungaç Hematoksilen-Eozin boyama. A: Kontrol grubu; B1: BPA. 0,01µg/L uygulaması; B2: BPA 0,1 µg/L uygulaması; B3: BPA 1 µg/L uygulaması; B4: BPA 100 µg/L uygulaması; B5: BPA 1000 µg/L uygulaması; C1: BPE 0,01 µg/L uygulaması; C2: BPE 0,1 µg/L uygulaması; C3: BPE 1 µg/L uygulaması; C4: BPE 100 µg/L uygulaması; C5: BPE 1000 µg/L uygulaması; D1: BPZ 0,01 µg/L uygulaması; D2: BPZ 0,1 µg/L uygulaması; D3: BPZ 1 µg/L uygulaması; D4: BPZ 100 µg/L uygulaması; D5: BPZ 1000 µg/L uygulaması; E1: BADGE 0,01 µg/L uygulaması; E2: BADGE 0,1 µg/L uygulaması; E3: BADGE 1 µg/L uygulaması; E4: BADGE 100 µg/L uygulaması; E5: BADGE 1000 µg/L uygulaması. Hematoksilen- Eosin boyama. x40 Büyütme

### 3.4.2. Apoptoz bulguları

Histolojik değerlendirmelerden sonra BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin artan konsantrasyonlarına maruz kalan hepatopankreas ve solungaç dokularında apoptotik hücre oluşumu açısından TUNEL immunohistakimyası açısından değerlendirilmiştir (şekil 3.19-şekil 3.20).

#### **Hepatopankreas:**

Kontrol grubu hepatopankreas histoloji kesitleri TUNEL immunohistakimyası açısından değerlendirilmiştir. Hepatopankreatik tübülleri döşeyen birçok epitel hücresinde düşük düzeyde apoptotik hücreler izlenmiştir.

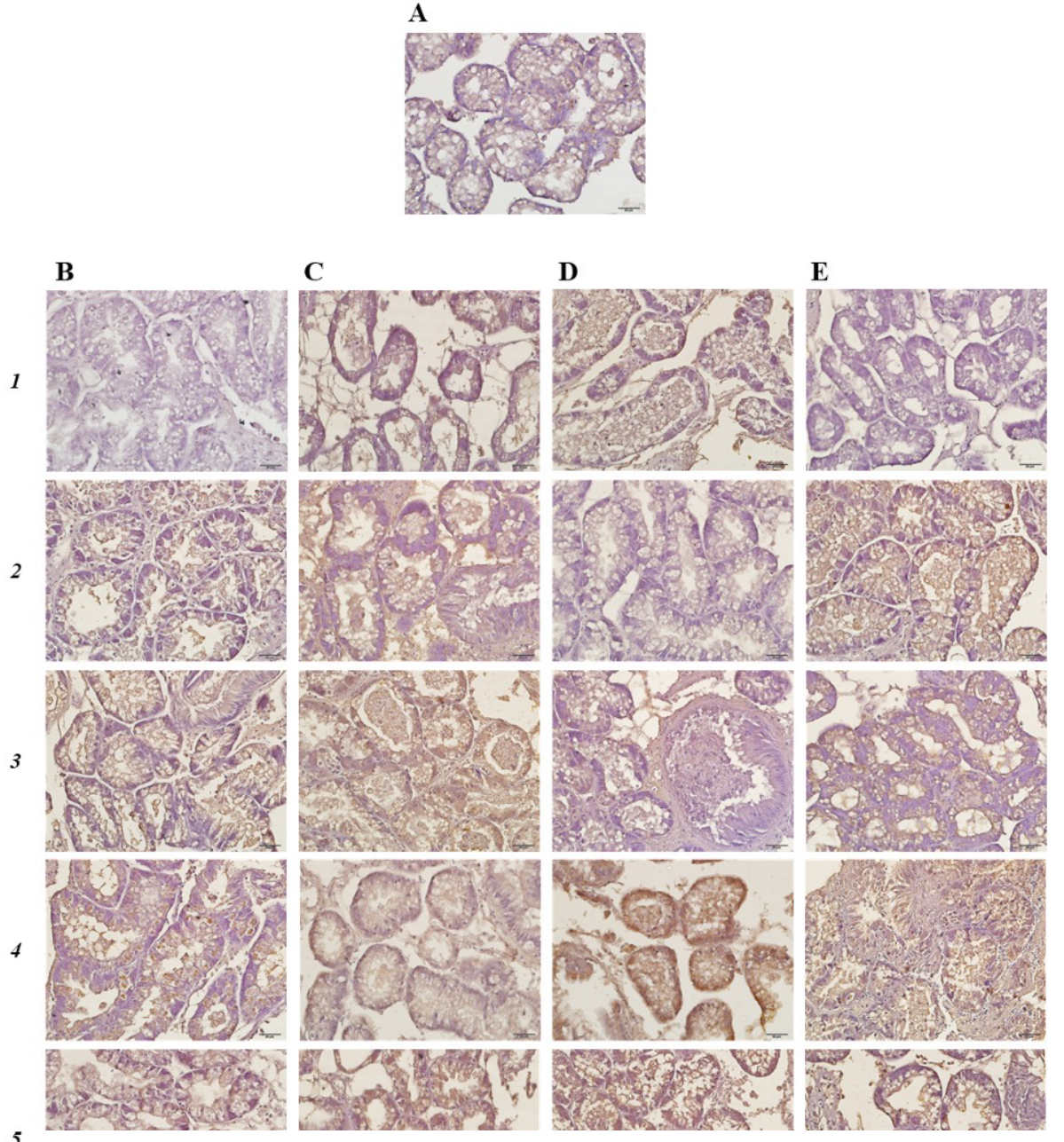
BPA grubu histolojik kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artan konsantrasyonlara bağlı olarak hepatopankreatik tübülleri döşeyen birçok epitel hücresinde apoptotik hücreler izlenmiştir. Bununla birlikte, digestif tübül epitellerinde dejenerasyon ve vakuolleşmenin konsantrasyona bağlı olarak artmasından dolayı apoptotik hücrelerin gözlemlenmesi azalmaktadır.

BPE grubu histolojik kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artan konsantrasyonlara bağlı olarak BPA ile benzer sonuçlar gözlemlenmektedir. Digestif tübül epitellerinde dejenerasyonun yüksek olmasının sonucunda apoptotik hücrelerin oluşumu azalmakla beraber, hepatopankreatik tübülleri döşeyen epitel hücrelerinde apoptotik hücreler izlenmiştir. Apoptotik hücrelerin, artan BPE konsantrasyonlarına bağlı olarak bu bölgelerde artış gösterdiği belirlenmiştir.

BPZ grubu, kontrol grubu ve diğer analoglar ile kıyaslandığında histolojik kesitlerinde gözlemlenen apoptotik hücrelerin izlenmesi benzerdir. BPZ konsantrasyonlarına bağlı olarak gözlemlenen apoptotik hücrelerin oluşumunun daha az olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedenin ise BPZ'nin histolojik kesitlerinde digestif tübül epitellerinde gözlemlenen yüksek dejenerasyon ve vakuolleşmeden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

BADGE grubu, kontrol grubu ve diğer bisfenollerle karşılaştırıldığında histolojik kesitlerinde gözlemlenen apoptotik hücrelerin izlenmesi benzerdir. Özellikle hepatopankreatik tübülleri döşeyen epitel hücrelerinde izlenen apoptotik hücrelerin BPA ile benzer düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Dejenerasyon ve

vakuolleşmenin bu grup içinde apoptotik hücrelerin izlenmesini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir.



**Şekil 3.19.** Hepatopankreas TUNEL. A: Kontrol grubu; B1: BPA. 0,01µg/L uygulaması; B2: BPA 0,1 µg/L uygulaması; B3: BPA 1 µg/L uygulaması; B4: BPA 100 µg/L uygulaması; B5: BPA 1000 µg/L uygulaması; C1: BPE 0,01 µg/L uygulaması; C2: BPE 0,1 µg/L uygulaması; C3: BPE 1 µg/L uygulaması; C4: BPE 100 µg/L uygulaması; C5: BPE 1000 µg/L uygulaması; D1: BPZ 0,01 µg/L uygulaması; D2: BPZ 0,1 µg/L uygulaması; D3: BPZ 1 µg/L uygulaması; D4: BPZ 100 µg/L uygulaması; D5: BPZ 1000 µg/L uygulaması; E1: BADGE 0,01 µg/L uygulaması; E2: BADGE 0,1 µg/L uygulaması; E3: BADGE 1 µg/L uygulaması; E4: BADGE 100 µg/L uygulaması; E5: BADGE 1000 µg/L uygulaması. TUNEL boyama. x40 Büyütme

**Solungaç:**

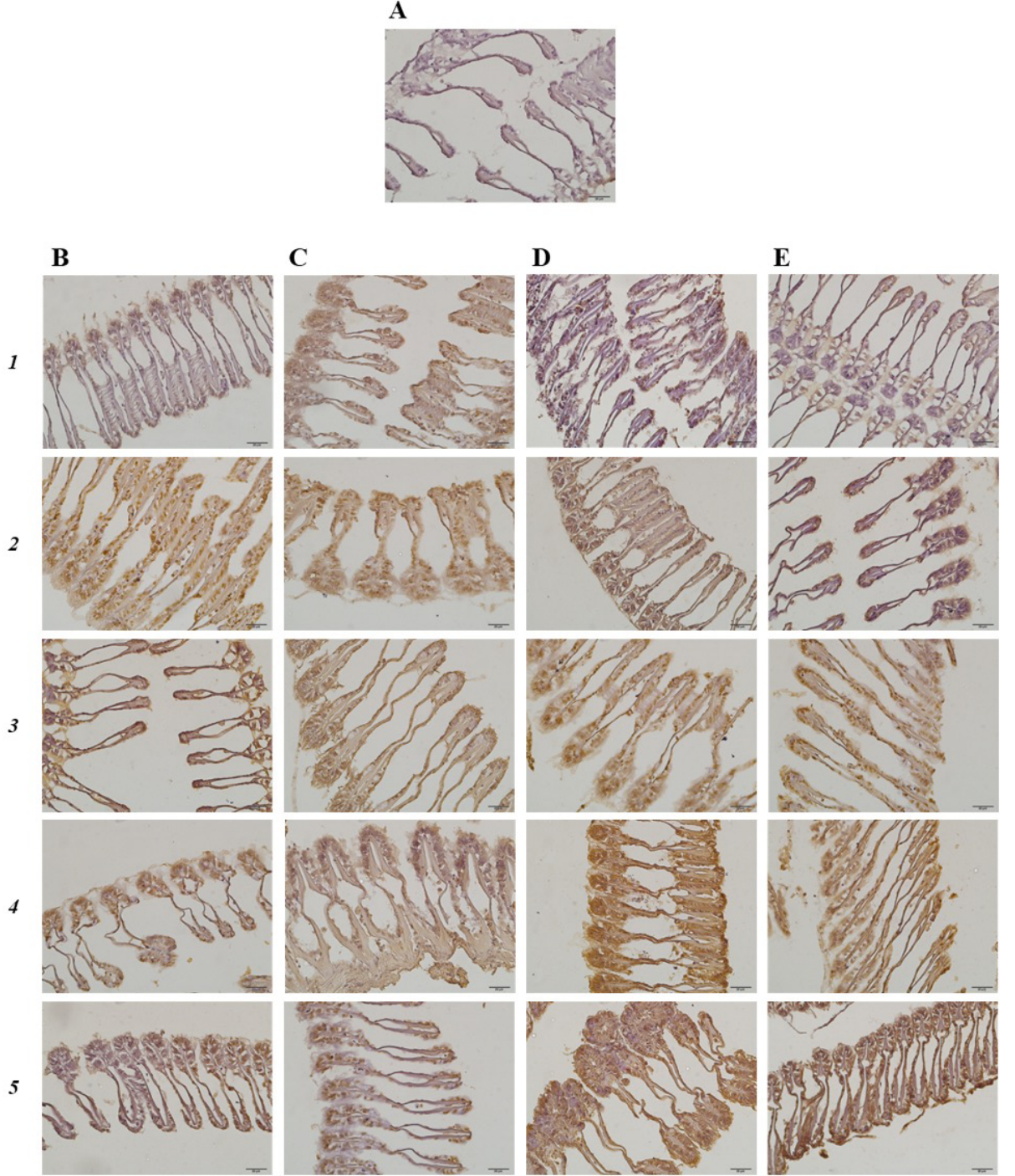
Kontrol grubu solungaç histolojik kesitleri TUNEL immunohistokimyası açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre az sayıda solungaç epitel hücresinde ekspresyon izlenmiştir.

BPA grubu histolojik kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oldukça fazla sayıda solungaç epitel hücresinde apoptotik hücre gözlenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak apoptotik hücre sayısında yüksek düzeyde artış gösterdiği tespit edilmesine karşılık, hücre kayıplarının olmasından ve dejenerasyondan etkilendiği bunun da apoptotik hücrelerin oluşumunu etkilediği belirlenmiştir.

BPE grubu histolojik kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında solungaç epitel hücrelerinde apoptotik hücre gözlenmiştir. BPE'nin düşük konsantrasyonlarında kontrole yakın ekspresyon görülmesine karşılık, yüksek konsantrasyonlarda apoptotik hücrelerde artış olduğu tespit edilmiştir. Ancak, filamentlerdeki dejenerasyondan kaynaklı apoptotik hücrelerin gözlemlenmesini etkilediği belirlenmiştir.

BPZ grubu histolojik kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında solungaç epitel hücrelerinde apoptotik hücre gözlenmiştir. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak apoptotik hücre oluşumunda artmakla beraber, kayıp ve füzyondan etkilendiği belirlenmiştir.

BADGE grubu histolojik kesitleri kontrol grubu ile solungaç epitel hücrelerinde apoptotik hücre gözlenmiştir. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak apoptotik hücrelerde artış gözlemlenmiştir ve BPA ile benzer bir etkinin olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 3.20.** Solunagç TUNEL. A: Kontrol grubu; B1: BPA. 0,01 µg/L uygulaması; B2: BPA 0,1 µg/L uygulaması; B3: BPA 1 µg/L uygulaması; B4: BPA 100 µg/L uygulaması; B5: BPA 1000 µg/L uygulaması; C1: BPE 0,01 µg/L uygulaması; C2: BPE 0,1 µg/L uygulaması; C3: BPE 1 µg/L uygulaması; C4: BPE 100 µg/L uygulaması; C5: BPE 1000 µg/L uygulaması; D1: BPZ 0,01 µg/L uygulaması; D2: BPZ 0,1 µg/L uygulaması; D3: BPZ 1 µg/L uygulaması; D4: BPZ 100 µg/L uygulaması; D5: BPZ 1000 µg/L uygulaması; E1: BADGE 0,01 µg/L uygulaması; E2: BADGE 0,1 µg/L uygulaması; E3: BADGE 1 µg/L uygulaması; E4: BADGE 100 µg/L uygulaması; E5: BADGE 1000 µg/L uygulaması. TUNEL boyama. x40 Büyütme

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda BPA ve yerine üretilen analoglardan olan BPE, BPZ ve BADGE'nin biyoindikatör (biyobelirteç tür) *Mytilus galloprovincialis* üzerindeki etkileri incelenerek ekotoksikolojik profilleri ortaya çıkarılmıştır.

Yeni üretilen kimyasalların/kirleticilerin etkilerini belirlemek amacıyla ve aynı zamanda bölgesel izleme çalışmalarında biyoindikatör tür *M. galloprovincialis* model organizma olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan çok sayıdaki çalışma göstermektedir ki bu model organizma farklı seviyelerdeki etkilerin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Sahip olduğu karakteristik özellikler ve biyolojisinin iyi bilinmesinden dolayı farklı testlerin uygulanması kolaylaşmaktadır ve kimyasalların etkilerinin belirlenmesinde iyi bir araçlardır. Midyeler ile yapılan çalışmaların odak noktasında biyobirikim potansiyelleri göz önüne alınmakla beraber açık dolaşım sistemine sahip olmaları hemolenfin (hemositlerin) tüm vücut içerisinde dolaşarak solungaç ve hepatopankreasın sürekli olarak etkilenmesine neden olmaktadır. Bu yüzden, yapılan çalışmalarda hedef organ olarak solungaç, hemolenf ve hepatopankreas dokuları tercih edilmektedir. Bununla beraber, kimyasalların fizyolojik etkilerinin ortaya çıkarılmasına da olanak sağlamaktadırlar.

Çalışmamızda BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *M. galloprovincialis* türündeki akut toksisite sonuçlarına göre belirlediğimiz LC<sub>50</sub> değerlerine göre BPA (2,085 mg/L) için düşük konsantrasyonlarda bile popülasyon üzerinde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Analoglar için belirlenen değerlere göre (BPE LC<sub>50</sub>: 5,391; BPZ LC<sub>50</sub>: 11,246 mg/L; BADGE LC<sub>50</sub>: 15,40 mg/L) sucul ekosistemdeki popülasyonların etkilenmesi için yüksek miktarlarda girişin olmasının gerektiği belirlenmiştir. Bu da BPA'nın çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabileceğini gösteren çalışmaları doğrular nitelik taşımaktadır. Çalışmamız BPE, BPZ ve BADGE için midye akut toksisite için hesaplanan LC<sub>50</sub> değerleri ilk olmak özelliğine sahiptir. BPA'nın farklı sucul türlerle gerçekleştirilen akut toksisite çalışmalarına bakıldığında, çalışmamızdaki türün içerisinde olduğu Mollusca filumundaki farklı canlılarla gerçekleştirildiği görülmüştür. BPA'nın *Heleobia australis* türü için bulunan LC<sub>50</sub> değeri 11,50 mg/L (Naveira et al., 2021) tatlı su salyongozu *Marisa cornuarietis* türü için ise bulunan değer 2,24 mg/L olduğu bildirilmiştir (Mihaich et al., 2009). Omurgasız tür *Artemia sinica* ile yapılan çalışmada BPA için bulunan EC<sub>50</sub> değeri 50,40 mg/L'dir (Shaukat et al., 2014). *Daphnia magna* immobilizasyon (hareketsizlik) kriteri ile yapılan çalışmada BPA için EC<sub>50</sub> değeri 10,00 mg/L iken BPE için bulunan EC<sub>50</sub> değeri ise 18,00 mg/L

olarak rapor edilmiştir (Chen et al., 2001). Her tür için spesifik olarak bulunan LC<sub>50</sub> ve EC<sub>50</sub> değerlerine göre subletal etkinin belirlenmesinde uygulanacak konsantrasyonlar için fikir oluşturmaktadır. Türler açısından spesifik olmakla beraber, aynı türün yetişkin ve larvalarında belirlenen LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> değerleri de birbirinden farklı olabilmektedir. Tato et al., (2018) yaptıkları çalışmada BPA, nonilfenol ve triklozan'a maruz bıraktıkları *M. galloprovincialis* larvalarında BPA için bulunan EC<sub>50</sub> değeri 2085 µg/L olduğunu rapor etmişlerdir. BPA açısından bakıldığında çalışmamızda yetişkinlerde uygulanarak belirlenen LC<sub>50</sub> değeri (2,085 mg/L) ile larvalar için belirlenen EC<sub>50</sub> değeri farklıdır ve larvaların yetişkinlerine kıyasla daha hassas olduklarının bir göstergesidir.

Çalışmamızda akut toksisite testine yanıt vermeyen ve yaşamaya devam eden midyelerde herhangi bir fizyolojik değişimin olup olmadığını ortaya çıkarmak amaçlanmıştır. Bu yüzden, 96s sonunda yaşayan midyelerin maruz kalma süresi 14 güne çıkarılmıştır. Denemenin sonunda fizyolojik parametreler olan büyüme indeksi ve gonadosomatik indeksi hesaplamalarına göre BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin fizyolojik etkilere neden olduğu tespit edilmiştir. Bisfenollerin kendi aralarındaki %CI üzerindeki etki dereceleri sırasıyla BPA=BADGE>BPE>BPZ olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4). Her bir kimyasal grubunun kontrol ile kıyaslandığında konsantrasyon artışına paralel olarak %CI değerini düşürdüğü belirlenmiştir. Gonadosomatik indeks üzerinde de BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin benzer bir etkiye neden olduğu ve konsantrasyon arttıkça %GSI değerinin düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8). %CI ve %GSI genel olarak kıyı izleme çalışmalarında kirlenmiş bölgedeki durumu belirlemek için kullanılmaktadırlar. Yapılan çalışmalar sonucunda genel olarak %CI değerinin ağır metaller ile ters orantılı, organik bileşiklerle doğru orantılı olduğu rapor edilmiştir (Andral et al., 2004). Kirlenmiş bölgeden ve midye yetiştiricilik alanlarından toplanan canlılar ile yapılan çalışmada her iki bölge için hesaplanan %CI değerlerinin yüksek olduğu ve kirlenmiş bölgedeki ağır metallerin pozitif yönde etkiye neden oldukları bildirilmiştir (Andral et al., 2004) Bir başka çalışmada ise karbamazepin maruziyetinin *M. galloprovincialis* türünde %CI ve %GSI'nin düşmesine neden olduğu rapor edilmiştir (Oliveira et al., 2017). Çalışmamızdaki BPA, BPE, BPZ ve BADGE maruziyetlerinin sonucunda *M. galloprovincialis* türünde %CI ve %GSI'nin düşmesine neden olduğu belirlenmiştir. *M. galloprovincialis* türünün kimyasalların fizyolojik etkilerin belirlenmesi (büyüme ve gonadosomatik indeks) için iyi bir biyoindikatör tür olduğu çalışmamız ile bir kere daha ortaya konulmuştur.

Napoli'de iki midye çiftliğinden toplanan *M. galloprovincialis* türünde yapılan çalışmada gonadosomatik indeks, yumurtalığın yapısal organizasyonu, apoptoz varlığı, östrojen reseptörlerinin ekspresyonu ve ayrıca yumurtalıklardaki bisfenol A (BPA) içeriği değerlendirilmiştir. A ve B alanı olarak adlandırdıkları örnekleme alanlarından, B alanında BPA'nın oldukça yüksek konsantrasyonlarda olduğu ve buna bağlı olarak da tüm biyobelirteçleri önemli derecede etkilediği bildirilmiştir. BPA için çalışmamızla paralellik göstermektedir (Şekil 3.5.) ve BPA %GSI'nın düşmesine neden olmaktadır.

Çalışmamızda BPA, BPE, BPZ ve BADGE maruz kalınması sonucunda *M. galloprovincialis* türünde %CI düşmesi ile büyüme üzerinde olumsuz etkiye neden oldukları saptanmıştır. Filter-feeding (süzerek beslenen) yapan midyelerin beslenmesinin yavaşladığı buna bağlı olarak da suyu süzme hızlarının da doğru orantılı olarak etkilendiği sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde %GSI'nın olumsuz etkilendiği saptanmıştır. Artan konsantrasyonlarda BPA, BPE, BPZ ve BADGE maruziyetinin üreme hücreleri üzerinde negatif bir etkiye neden olduğu bulunmuştur. *M. galloprovincialis* türünde BPA, BPE, BPZ ve BADGE'ye uzun süreli maruz kalınması durumunda üreme ve büyüme için harcanması gereken metabolik enerjinin savunma sistemi için kullanıldığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu durumda biyobirikim özelliğinin (kapasitelerinin) azalacağı buna karşılık farklı etkilerin ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *M. galloprovincialis* türü için bulunan LC<sub>50</sub> değerlerine göre olası subletal etkiler belirlenmeye çalışılmıştır. İlk olarak üreme üzerindeki etkileri belirlemek amacıyla gerçekleştirilen fertilizasyon (döllenme) başarısı testine göre elde edilen bulgularda döllenme başarısını olan etkileri tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında BPA'nın ve BPE'nin ilk konsantrasyonda döllenme başarısına pozitif yönde etkilediği yani döllenmeyi arttırdığı belirlenmiştir. Buna karşılık, BPZ ve BADGE'ye maruz kalınmasının ise ilk konsantrasyon itibaren etkili olduğu tespit edilmiştir. Hesaplanan %DE değerlerine göre bisfenollerin döllenme başarıları üzerindeki etkileri sırasıyla BPA>BPZ>BADGE>BPE şeklinde olduğu saptanmıştır.

*M. galloprovincialis* türünün BPA'ya maruz bırakıldığı bir çalışmada (0,05-0,5-5 µM) 24-28-32-48s post larvalarda kabuğun gelişimi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda BPA'ya maruz kalmanın kabuğun gelişimini etkilediği, kalsifikasyona neden olduğu ve en yüksek konsantrasyonda larvaların büyük bir kısmının normal D-veliger safhasına erişemediği ve malformasyonun yüksek

olduğu bildirilmiştir (Miglioli et al., 2021). Çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermekte olup BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin benzer bir etkiye neden olduğu düşünülmektedir. 0,01-0,1-1,100-1000 µg/L konsantrasyonları kabuk oluşumunu sınırlandırdığı, yüksek malformasyonlara neden olduğu ve gelişimi yavaşlatarak geç kalmış trokofora larvasını arttırdığı bulunmuştur (Şekil 3.10, Çizelge 3.2). BPA gibi plastik üretiminde ana monomer olarak kullanılan stirenin *M. galloprovincialis* türüne maruz bırakılarak embriyolojik gelişim üzerine etkileri araştırılmıştır. Embriyotoksisite sonuçlarına göre 0,01µg-1mg/L konsantrasyonlarının normal embriyo gelişimini bozduğu, normal D-veliger oluşumunu %40 azalttığı ve larva boyutunu da %20 oranında etkilediği bildirilmiştir (Wathsala et al., 2018). Çalışmamızda da plastik üretiminde monomer olan BPA ve onun yerine üretilen analogların (BPE, BPZ ve BADGE) *M. galloprovincialis* türünün embriyo gelişimini etkilediği ve malformasyona neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.10.) ve bu çalışmayla paralellik göstermektedir. BPA'nın midye embriyoları üzerindeki olası moleküler etkilerin araştırıldığı bir başka çalışmada ise 13 genin transkripsiyonu değerlendirilmiştir. Döllenmiş yumurtaların BPA'ya (10 µg/L) maruz bırakılması, 24 saat postlarvada genel bir yukarı regülasyona, ardından 48 saat postlarvada aşağı regülasyona neden olduğu, Mytilus Östrojen Reseptörleri, serotonin reseptörü ve biyomineralizasyona dahil olan genlerin BPA tarafından etkilendiği, ilk kabuklu embriyonun oluşumunun BPA için hassas bir hedefi temsil ettiği, kabuk düzensizliklere neden olduğu rapor edilmiştir (Balbi et al., 2016). Çalışmamızda uygulanan konsantrasyonlar sonucu elde edilen veriler göstermektedir ki BPA ile yapılan diğer çalışmaların sonucu benzerlik taşımaktadır. Bununla beraber, BPA ve onun yerine üretilen BPE, BPZ ve BADGE'nin embriyolojik gelişim üzerinde olumsuz bir etkiye neden olduğu hem döllenme başarısı hem de embriyotoksisite çalışmalarıyla belirlenmiştir. BPE, BPZ ve BADGE'ye maruz kalınması döllenmenin gerçekleşmesine olanak sağlamasına karşılık yine de döllenme başarısını etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca, embriyo gelişimini sınırlandırdıkları ve yavaşlattıkları, yüksek malformasyona neden oldukları saptanmıştır. BPE, BPZ ve BADGE'nin en az BPA kadar toksik etkiye neden oldukları tespit edilmiştir. Üç analog için gen seviyesinde incelemelerin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin *M. galloprovincialis* türünde genotoksik hasara yol açtıkları tespit edilmiştir. *M. galloprovincialis* türünün hemolenf (hemositler) ve solungaç hücrelerinde mikronükleus testi çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Bolognesi et al., 1996; Arslan vd., 2010, 2021, 2017; Kolarević et al., 2023; Burgeot et al., 1996; Brunetti et al., 1992).

Midyelerin açık dolaşım sistemine sahip oldukları için hemositleri sitogenetik hasarı belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Pavlica, 2001). Bununla beraber, solungaç kimyasallara/kirleticilere ilk maruz kalan organ olduğundan ve hemolenf (hemositler) sürekli dolaşımdaki hücreler olduğundan MN testi için hedef dokulardır. Bağışıklık savunmasında rol oynayan hemositlerin (Cheng, 1975), onları genotoksik ksenobiyotikler gibi kirleticilere/kimyasallara karşı diğer hücrelere göre daha savunmasız hale getirdiği öne sürülmüştür (Venier et al., 1997). Bu çalışma, yapmış olduğumuz çalışmanın verileri ile karşılaştırıldığında, elde edilen MN frekansındaki artışlar BPA ve analoglarının midyelerde bağışıklık sistemini bozduğunu göstermektedir.

*M. galloprovincialis* hemolenf ve solungaç hücrelerinde mikronükleus oluşumunu inceleyerek farklı kirleticilerin/kimyasalların genotoksik potansiyellerinin belirlendiği birçok çalışma bulunmaktadır. Romdhani et al. (2022), yaptıkları çalışmada *M. galloprovincialis* türünü 3 gün süreyle çevreden topladıkları mikroplastik (50µg/L), benzo[a]piren (1 µg/L) ve bunların karışımlarına maruz bırakmışlardır. Üçüncü günün sonunda hemositlerde MN sıklığının kontrole göre arttığı bildirilmiştir. En yüksek MN frekansı benzo[a]piren (%20) için belirlenmiştir. Daha sonra mikroplastik (%18,66) ve bunların karışımı (%17,33) için tespit edildiği rapor edilmiştir. Çalışmada çevreden toplanan mikroplastikler için belirlenen MN, çalışmamızda BPE hepatopankreas hücresi (%21) ve BPZ (%22,1 ve %24,6) hepatopankreas ve solungaç hücreleri için bulunan değere yakındır. Başka bir çalışmada *Mytilus galloprovincialis* hemolenf hücreleri ile 96 saat boyunca floranten (10 mg/ml), polistiren partikülleri (100 mg/ml) ve bunların karışımlarına maruz bırakılarak mikronükleus testi yapılmıştır. 96s sonucunda hemolenf hücrelerinde adsorbe edilmiş floranten, floranten ve polistiren partiküllerine maruz kalan gruplarda MN frekansının kontrole göre anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (Kolarević et al., 2023). Çalışmamızda 72s sonunda, BPA ve BPZ'nin hemolenf hücrelerini etkilediğinin tespit edilmesinin (Çizelge 3.3, Çizelge 3.6) yanı sıra BPE'nin hemolenf hücrelerinde NUB oluşumuna (Çizelge 3.4, Çizelge 3.5) yol açtığı belirlenmiştir ve hemolenf ile yapılan diğer çalışmalarla paralellik taşımaktadır. Mezzalani et al., (2023), ilaçların çevresel etkilerini araştırdıkları çalışmalarında *Mytilus galloprovincialis* türünü 14 gün boyunca karbamazepin (0,5 µg/L), valsartan (0,5 µg/L) ve bunların kombine karışımlarına maruz bırakmışlardır. Çalışmalarında birçok farklı biyokimyasal ve genotoksik test yöntemi kullanarak hemolenf hücrelerinde mikronükleus oluşumunu araştırmışlardır. 14 günün sonunda valsartan için yüksek bir MN frekansı bulmuşlardır. 14 günlük depurasyon ve ardından 14 gün daha maruz

kalmanın ardından, kontrole kıyasla karbamazepin için MN frekansında bir artış olduğu rapor edilmiştir. Canlı ortamda radyoaktif  $^{32}\text{P}$ 'ye maruz kalan iki çift kabuklu *Dreissena polymorpha* (tatlı su) ve *M. galloprovincialis* türleri üzerinde yapılan bir çalışmada, solungaçların ve sindirim bezlerinin hücrelerine mikronükleus-comet testi uygulanarak etkileri araştırılmıştır. Çalışmada deniz türlerinin DNA hasarına karşı daha yüksek hassasiyet gösterdiğini bildirmişlerdir (Vernon et al., 2020). Bu da çalışmamızdaki test canlısı biyoindikatör türün (*M. galloprovincialis*) farklı kimyasalların/kirleticilerin belirlenmesi için uygun test canlısı olduğu bir kere daha ortaya konulmuştur ve diğer çalışmalarla paralellik taşımaktadır.

Arslan vd. (2023) *M. galloprovincialis* türünü bisfenol analoglarından BPS, BPF, BPB, BPAF, BADGE, BFDGE, TGSA'nın artan konsantrasyonlarına (1,5-3-6-12-25 mg/L) maruz bıraktıkları çalışmada genotoksik hasarı belirlemişlerdir. Çalışmada BPS, BPF, BPAF, BFDGE ve BPB'nin hemolenf hücrelerini daha fazla etkilediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki analoglardan BPE ve BPZ için bulunan MN frekansıyla uyumludur (Çizelge 3.6, Çizelge 3.4). Yine aynı çalışmada BADGE ve BPAF'nin (%26) solungaç hücreleri için bulunan MN frekansı çalışmamızda BADGE'nin ((%26,5) solungaç hücrelerinde tespit edilen MN frekansı ile aynıdır (Çizelge 3.11). Arslan vd. (2023) BPS ve BPF'nin solungaç hücrelerinde mikronükleus oluşumunun yanı sıra apoptotik hücre ve nükleer tomurcuklanma oluşumunun gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda ise sadece BPE hemolenf hücrelerinde nükleer tomurcuklanma oluşumu gözlenmiştir. Bu durum analogların farklı dokularda benzer anomalilere neden olabileceğini göstermektedir.

MN frekanslarındaki farklılıklar konsantrasyon, maruz kalma süresi ve kullanılan test kimyasalları gibi farklı deneysel faktörlerden etkilenmektedir (Mersch et al., 1996). Bu açıdan incelendiğinde BPE, BPZ ve BADGE için tespit edilen MN frekansları BPA'dan düşük olmasına karşılık genotoksik potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Mikronükleus doğal olarak tüm canlılarda oluşmaktadır ve %5'in altı normal olarak kabul edilmektedir (Bolognesi and Fenech, 2012). Ancak, genotoksik kimyasallara maruz kalındığında bu mikronükleus frekansı artar. Mikronükleus oluşumundan sonra kaderinin dört şekilde olabileceği varsayılmaktadır. Bunlar; bozunma, rekombinasyon, ekstrüzyon ve kalıcılık (ayrıca, prematüre kromozom yoğunlaşması/kromotripsi ve apoptoz ile mikronükleer hücrelerin eliminasyonu). Mikronükleusun kaderi, mikronükleus oluşturucu maddeye (klastojenik veya anöjenik), hücre tipine (birincil veya tümör

orijini) ve incelenen türlere bağılı olarak farklılık gösterebilir. (Hintzsche et al., 2017). Fenech et al., (2011) göre nükleer tomurcuk oluşumu, kromozomal instabilite (kararsızlık) olaylarıyla ilişkilendirilmiştir ve nükleer tomurcuğun (NBUD) muhtemelen nükleoplazmik köprü (NPB) yırtılmasından sonra geçici olarak meydana gelebileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda sonradan zaman-konsantrasyon değişikliğine bağılı olarak hemolenf hücrelerinde azalma göz önüne alındığında benzer bir durumun var olduğunu düşünmekteyiz ve BPE hemolenfleri için bu durumun geçici olarak gerçekleştiği kanısına varılmıştır (Şekil 3.14). Ancak zaman, konsantrasyon ve diğer birçok faktör göz önüne alındığında, kesin bir yargıya varmak için farklı çalışmaların yapılması gerektiğini düşünülmektedir. Maruz kalma süresinin uzaması ile mikronükleus frekansında artış olabilir veya tamamen farklı bir süreç olan apoptoz oluşumu ile sonlanabilir. Hücrede sabit kalabilir ve maruz kalma süresi ne kadar uzun olursa mikronükleus frekansı o kadar fazla gözlemlenebilir. Rekombinasyon meydana gelirse devam eden mitoz sırasında tekrar ortaya çıkabilir veya hücre dışına atılarak organizmalar için zararsız hale gelebilir.

Çalışmamızın sonuçları, bisfenol A yerine üretilen bu analogların (BPE, BPZ, BADGE) potansiyel genotoksik kimyasallar olduğunu, mikronükleus testinin hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir ve çalışmamız önceki çalışmalarla uyumludur.

BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin artan konsantrasyonlarına maruz kalan *M. galloprovincialis* türünün hepatopankreas ve solungaç hücrelerinde histolojik ve apoptotik değişimlere neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20). Histolojik çalışmalarda ve TUNEL immunohistokimyasal sonuçlara göre kimyasalların hepatopankreas ve solungaç hücrelerinde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Hepatopankreas dokusunda intrasitoplazmik vakuoller ve buna bağılı olarak bazı tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve hücresel kayıplar izlenmesinin yanı sıra epitel bütünlüğünde bozulmaların olduğu tespit edilmiştir. Pagano et al., (2022) reçetesiz ilaçlardan asetilsalisilik asit (aspirin) hedef dışı organizma olan *M. galloprovincialis* türüne maruz bıraktıkları (10-100 µg/L) çalışmada solungaç ve sindirim bezinde histolojik değişimleri incelemişlerdir. Solungaç ve sindirim bezlerinde zamana ve konsantrasyona bağılı olarak liposufin birikintileri, hemosit infiltrasyonu, epitel yapılarıdaki değişiklikler, vakuolasyon, lamel füzyonu gibi çok sayıda değişimin olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda bulunun sonuçlarla uyumluluk göstermektedir ve midyelerin farklı kimyasalların histolojik etkilerinin belirlenmesinde uygun test canlıları olduğu görülmektedir

(Şekil 3.17, Şekil 3.18). Midyelerin farklı kimyasallara maruz kalması sonucunda histolojik etkilerin belirlenmesinde uygun test canlılarının olduğunu gösteren bir başka çalışmada ise,  $TiO_2$  formuna maruz bırakılan *M. galloprovincialis* türünün solungaç ve sindirim bezlerindeki histolojik değişimlerin gözlenmesi sonucunda; sindirim tübül lümeninde genişleme, hemositlerin infiltrasyonuna, cilia kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Leite et al., 2020). Yine bir başka çalışmada, *M. galloprovincialis* türünün lantan (La) elementine maruz kalmasının gonad, solungaç ve sindirim bezleri üzerinde histolojik etkilere neden olduğu rapor edilmiştir (Pinto et al., 2019). Tüm bu sonuçlar çalışmamızdaki bisfenollerin midyeler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için seçilen yöntemin (histoloji) ve hepatopankreas/solungaç dokularının güvenilirliğini göstermektedir.

Apoptoz sucül ekosistemde kimyasalların/kirleticilerin farklı trofik seviyelerdeki canlılar üzerinde yarattığı etkilerin araştırılması için tercih edilen yöntemlerden biridir. Tarımsal alanlarda kullanılan deltamethrin'i farklı konsantrasyonlarda (0,25- 0,5- 1 ve 2  $\mu g/L$ ) zebra balığına maruz bırakılarak gerçekleştirilen çalışmada biyobelirteç olarak apoptotik hücre oluşumu incelenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda apoptoz oluşumunun gözlemlendiği ve artmakta olduğu bildirilmiştir (Petrovici et al., 2020). Zebra balığı ile yapılan bir başka çalışmada ise yüksek konsantrasyonda bisfenol A'ya (2000  $\mu g/L$ ) maruz kalmanın apoptoz oluşumunda bir artışa sebep olduğu rapor edilmiştir (González-Rojo et al., 2019). Çalışmamızda elde edilen verilerle uyumluluk göstermektedir ve BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin midyede apoptoz oluşumunu indüklediği belirlenmiştir (Şekil 3.19, Şekil 3.20). Yavaşoğlu vd., (2016) Aliğa, Foça ve Urla kıyılarından topladıkları midye *M. galloprovincialis* türünün hepatopankreas ve solungaç dokularında apoptoz oluşumunu incelemiştir. Referans bölge olan Urla ile karşılaştırıldığında Aliğa ve Foça'dan toplanan midyelerde yüksek apoptotik hücre gözlemlendiğini aynı zamanda çevresel kirliliğin belirlenmesinde hepatopankreasın solungaçtan daha duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen verilerle benzerlik taşımaktadır (Şekil 3.19, Şekil 3.20). Çinko piriton ( $ZnPT$ ) akut maruz kalan (48-96 saat; 20-40  $\mu g/L$ ) *M. galloprovincialis* türünde konsantrasyon artışına bağlı olarak hepatopankreas ve solungaç dokularında ciddi histolojik değişikliklerin gözlemlendiği, her iki dokuda da apoptotik hücrelerin oluşumunun konsantrasyona bağlı olarak artmakta olduğu rapor edilmiştir (Katalay vd., 2022). Ji et al., (2016) yaptıkları çalışmada ise TBBPA (tetrabromobisfenol A)'ya maruz kalan *M. galloprovincialis* solungaç dokularında apoptoz oluşumunu incelemiştir. Çalışma sonucunda dişi ve erkek bireylerin her ikisinde de solungaç filamentlerinde

anormal morfolojinin gözlemlendiğini ve apoptotik çekirdeklerin belirgin olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda; BPA, BPE, BPZ ve BADGE'nin biyoindikatör tür *M. galloprovincialis* türündeki ekotoksikolojik profilleri ortaya çıkarılmıştır. Çalışmamız BPE, BPZ, BADGE ve *M.galloprovincialis* türü ile yapılan ilk araştırma niteliğini taşımaktadır. Yapılan sayısız çalışma BPA'nın tüm canlılar için olumsuz birçok etkiye neden olduğu bulunmuştur. Analoglar ile yapılan çalışmaların hala sınırlı olduğu, BPA ile karşılaştırıldığında ne derecede etkili oldukları tam olarak bilinmemektedir.

BPA'nın *M. galloprovincialis* türü üzerindeki ekotoksikolojik profiline baktığımızda,

- akut olarak düşük miktarlarda popülasyonu etkilediği,
- büyüme indeksi ve gonadosomatik indeksi düşürdüğü,
- midye fertilizasyon başarısını azalttığı ve anormal larval oluşumuna yol açtığı,
- mikronükleus frekansında artışa neden olarak genotoksik olarak etkilediği,
- histolojik açıdan ise dokularda yüksek derecede dejenerasyona neden olarak doku kaybına yol açtığı ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.

BPE'nin *M. galloprovincialis* türü üzerindeki ekotoksikolojik profiline baktığımızda,

- akut olarak popülasyonu etkilediği,
- büyüme indeksi ve gonadosomatik indeksi düşürdüğü,
- midye fertilizasyon başarısını azalttığı ve larvalarda malformasyona neden olduğu,

- mikronükleus frekansında artışa neden olduğu,
- histolojik açıdan ise dokularda dejenerasyona neden olarak doku kaybına yol açtığı ve apoptozu indüklediği saptanmıştır.

*BPE'nin, gonadal gelişim üzerindeki negatif etkisinin (gonadosomatik indeksi) ve akut toksisitesinin BPA ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Diğer tüm parametrelerde tek başına etki ettiği görülmekle beraber, analoglar açısından daha az etkili olduğu belirlenmiştir.*

BPZ'nin *M. galloprovincialis* türü üzerindeki ekotoksikolojik profiline bakıldığında,

- akut olarak popülasyonu etkilediği,
- büyüme indeksi ve gonadosomatik indeksi düşürdüğü,
- midye fertilizasyon başarısını azalttığı ve larvalarda malformasyona neden olduğu,
- mikronükleus frekansında artışa neden olduğu,
- histolojik açıdan ise dokularda dejenerasyona neden olarak doku kaybına yol açtığı ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.

*BPZ'nin, fertilizasyon başarısına ve anormal larval gelişimine olan etkisinin BPA ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Spesifik olarak da hemolenf mikronükleus frekansının artışına yol açtığı görülmüştür. Diğer analoglar ile karşılaştırıldığında ise BPZ'nin, fertilizasyon başarısına olan etkisi ve larval gelişim üzerine etkisinin BPE'den daha yüksek olduğu, ayrıca histolojik açıdan ve apoptoz indüklemesi açısından da daha etkili olduğu belirlenmiştir. Mikronükleus frekansının artışına bakıldığında ise BPZ'nin, BPE'den daha genotoksik etkiye neden olduğu görülmektedir.*

BADGE'nin *M. galloprovincialis* türü üzerindeki ekotoksikolojik profiline baktığımızda,

- akut olarak popülasyonu etkilediği,

- büyüme indeksi ve gonadosomatik indeksi düşürdüğü,
- midye fertilizasyon başarısını azalttığı ve larvalarda malformasyona neden olduğu,
- mikronükleus frekansında artışa neden olduğu,
- histolojik açıdan ise dokularda dejenerasyona neden olarak doku kaybına yol açtığı ve apoptozu indüklediği saptanmıştır.

*BADGE'nin, BPA'ya benzer etkilere sahip olan analog olduğu tespit edilmiştir. Özellikle, solungaç ve hepatopankreas dokularındaki mikronükleus frekansındaki artışa neden olduğu ve ayrıca, histolojik olarak bu iki dokuda da yüksek derecede dejenerasyona yol açtığı, apoptoz indükleme derecesinde BPA'ya en yakın analog olduğu saptanmıştır. Bu açıdan bakıldığında BPA'dan sonra genotoksik etkiyi en fazla gösteren analog BADGE'dir.*

Sonuç olarak her üç analog da genotoksik etkiye yol açan kimyasallardır. BADGE'nin özellikle midyenin büyümesini negatif yönde etkilediği ve genotoksik etkiye yol açtığı tespit edilmiştir. BPZ'nin ise midyenin fertilizasyon başarısını ve larval gelişimi üzerinde negatif etkiye neden olduğu, BPE'nin ise özellikle akut olarak popülasyonu etkileyebileceği saptanmıştır. Tüm parametreler açısından bakıldığında, genel olarak analogların BPA'ya yakın toksik etkilere neden olabilecekleri belirlenmiştir.

Bu bağlamda, analogların Türkiye kıyılarında ve nehirlerinde varlıklarının belirlenmesi gerekmektedir. İnsan gıdası olarak yüksek miktarlarda tüketilen midye üzerinde toksik etkilere neden olan BPE, BPZ ve BADGE için daha kapsamlı araştırmaların yapılmasının gerekli olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, hem sucül ekosistemin güvenliği ve sürdürülebilirliği açısından hem de analogların insan sağlığı üzerine olabilecek olumsuz etkileri göz önüne alındığında analoglarla ilgili gerekli eylem planlarına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adhikary, A.**, 2021, Bisphenol A: prenatal exposure and its effect on obesity and male reproductive system. *Proc. Zool. Soc.* 74, 660–670s.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.**, 2002, *Molecular biology of the cell*. 4th edn. *Ann Bot.* 2003 Feb; 91(3): 40. PMC4244961.
- Alexander, H. and Doill, D.**, 1998, Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 19–26s.
- Alpbaz, A.G.**, 1993, Kabuklu ve eklembacaklılar yetiştiriciliği, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fak., Yay. No: 26; 315s.
- Amato, E., Alcaro, L., Corsi, I., Della Torre, C., Farchi, C., Focardi, S., Marino, G. and Tursi, A.**, 2006, An integrated ecotoxicological approach to assess the effects of pollutants released by unexploded chemical ordnance dumped in the southern Adriatic (Mediterranean Sea). *Mar. Biol.* 149 (1), 17–23 s.
- Andral, B., Stanisiere, J. Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F. and Boissery, P.**, 2004, Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10), 704-712s.
- Arnot, J.A., Toose, L., Armitage, J.M., Embry, M., Sangion, A. and Hughes, L.**, 2022, A weight of evidence approach for bioaccumulation assessment. *Integrated Environ. Assess. Manag.* <https://doi.org/10.1002/ieam.4583>
- Arslan, C.O., Boyacıoğlu, M., Karaaslan, M.A.**, 2023, Bisfenol-A Tarihinde Yeni Bir Dönem: Bisfenol- a yerine Kullanılan Potansiyel Kimyasallar Sucul Canlılar için Gerçekten Güvenli mi? Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (Tübitak), 119Y246 numaralı proje final raporu, 450s (yayımlanmış).
- Arslan, C.O., Parlak, H., Karaaslan, M.A., Boyacıoğlu, M., Nalbantlar B.**, 2017, Cytotoxic and Cytogenetic Effects of Bisphenol-A in *Mytilus Galloprovincialis* (Lamarck 1819). *Aquaculture Studies*, 17(1), 93-101s.
- Arslan, O.C ve Parlak, H.**, 2008, Effects of bisphenol A on the embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Environmental Toxicology: An International Journal*, 23(3), 387-392s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arslan, O.C. ve Parlak, H.**, 2008, Effects of bisphenol-a on the embryological development of the sea urchin *Arbacia Lixula* (Linnaeus, 1758). *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(2), 127s.
- Arslan, O.C., Parlak, H., Boyacioglu, M. ve Karaaslan, M.A.**, 2017, Determination of sediment and water contamination by sea urchin embryotoxicity test with *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*. *Fresenius Environ. Bull*, 26(6), 3956-3962s.
- Arslan, Ö.Ç., Boyacioglu, M., Nalbantlar, B., Gülsever, G. ve Karaaslan, M.A.**, 2021, Micronucleus formation in mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) haemolymph, liver, and gill cells as a biomarker in the assessment of genotoxicity in Izmir Bay (Aegean Sea, Turkey). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(2), 189-197s.
- Arslan, Ö.Ç., Parlak, H., Katalay, S., Boyacioglu, M., Karaaslan, M. A. ve Guner, H.**, 2010, Detecting micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Turkey). *Environmental Monitoring & Assessment*, 165s.
- ASTM.**, 2004, Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. 10.1520/E0724-98. 21s.
- Atay, D.**, 1997, *Kabuklu Su Ürünleri ve Üretim Tekniği*. Ankara, Ankara Üniv., Ziraat Fak., Yayınları No: 1478: 441-348s.
- Ayllon, F. and Garcia-Vazquez, E.**, 2000, Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(2), 177-186s.
- Bagci, E.Z.**, 2007, *Mathematical modeling and simulation of apoptosis and nitric oxide effects* (Doctoral dissertation, University of Pittsburgh).
- Bahramifar, N., Rahnama, R. and Saberimoghaddam, S.**, 2014, Trace determination of bisphenol-a in landfill leachate samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 28, 329–338s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Balbi, T., Franzellitti, S., Fabbri, R., Montagna, M., Fabbri, E. and Canesi, L.,** 2016, Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: effects on gene transcription. *Environmental pollution*, 218, 996-1004s.
- Ballesteros-Gómez, A., Ruiz, F., Rubio, S. and Pérez-Bendito, D.,** 2007, Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography–fluorimetry. *Anal. Chim. Acta* 603, 51–59s.
- Bayne, B.L., Widdows, J. and Thompson, R.J.,** 1976, *Physiology: I.* In: Bayne, B.L. (ed.). *marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press. pp. 122-159s.
- Beausoleil, C., Le Magueresse-Battistoni, B., Viguie, C., Babajko, S., Canivenc-Lavier, M. C., Chevalier, N., Emond, C., Habert, R., Picard-Hagen, N. and Mhaouty-Kodja, S.,** 2022, Regulatory and academic studies to derive reference values for human health: the case of bisphenol S. *Environ. Res.* 204, 112233s.
- Bergmann, M., Gutow, L. and Klages, M.,** 2015, Regulation and management of marine litter, *Marine Anthropogenic Litter*, 428 s.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T.,** 1999, Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, 22(1), 25-34s.
- Berthet, B.,** 2013, Sentinel species. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S. (Eds.), *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, Boca Raton, pp. 155–186.
- Bolognesi, C. and Fenech, M.,** 2012, Mussel micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 7(6), 1125-1137s.
- Bolognesi, C. and Hayashi, M.,** 2011, Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213s.
- Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A. and Rossi, C.,** 2004, Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of the Total Environment*, 333(1-3), 127-136s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bolognesi, C., Rabboni, R. and Roggieri, P.,** 1996, Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 113(2), 319-323s.
- Bolognesi, C., Rabboni, R. and Roggieri, P.,** 1996, Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 113(2), 319-323s.
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C. And Fenech, M.,** 2011, Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1), 93-100s.
- Bousoumah, R., Leso, V., Iavicoli, I., Huuskonen, P., Viegas, S., Porrás, S.P. and Ndaw, S,** 2021, Biomonitoring of occupational exposure to bisphenol A, bisphenol S and bisphenol F: A systematic review. *Science of the Total Environment*, 783, 146905s.
- Briaudeau, T.,** 2019, A "biomarker + histopathology" tool box in *Solea* spp. for the assessment of the biological effects of pollution in the context of the EU Marine Strategy Framework Directive. International PhD Thesis, Department of Zoology and Animal Cell Biology Research Group: Cell Biology in Environmental Toxicology, Euskal Herriko Unibertsitatea, Plentzia, Spain, 252p.
- Bricker, S., Lauenstein, G., and Maruya, K.,** 2014, NOAA's mussel watch program: incorporating contaminants of emerging concern (CECs) into a long-term monitoring program. *Marine pollution bulletin*, 81(2), 289-290s.
- Brunetti, R., Gabriele, M., Valerio, P. and Fumagalli, O.,** 1992, The micronucleus test: temporal pattern of base-line frequency in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, 75-78s.
- Buhur, A. ve Yavasoglu, A.,** 2017, Diyabetin neden olduğu testis hasarı üzerine losartan'ın olası anti-apoptotik etkisinin araştırılması, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, tez numarası: 494681, 169s.
- Burgeot, T., Woll, S. and Galgani, F.,** 1996, Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 32(1), 39-46s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Caban, M. and Stepnowski, P.**, 2020, The application of isotopically labeled analogues for the determination of small organic compounds by GC/MS with selected ion monitoring. *Anal. Methods* 12, 3854–3864s.
- Cantoni, B., Cappello Riguzzi, A., Turolla, A. and Antonelli, M.**, 2021, Bisphenol A leaching from epoxy resins in the drinking water distribution networks as human health risk determinant. *Sci. Total Environ.* 783, 146908s.
- Cesen, M., Lenarčič, K., Mislej, V., Levstek, M., Kovačič, A., Cimrmančič, B., Uranjek, N., Kosjek, T., Heath, D., Dolenc, M.S. and Heath, E.**, 2018, The occurrence and source identification of bisphenol compounds in wastewaters. *Sci. Total Environ.* 616–617, 744–752s.
- Chamorro-García, R., Kirchner, S., Li, X., Janesick, A., Casey, S. C., Chow, C. and Blumberg, B.**, 2012, Bisphenol A diglycidyl ether induces adipogenic differentiation of multipotent stromal stem cells through a peroxisome proliferator–activated receptor gamma-independent mechanism. *Environmental health perspectives*, 120(7), 984–989s.
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y.L., Wu, Y. And Widelka, M.**, 2016, Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity: a review. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5438–5453s.
- Chen, H., Zhao, L. and Yu, Q.J.**, 2019, Determination and reduced life expectancy model and molecular docking analyses of estrogenic potentials of 17beta-estradiol, bisphenol A and nonylphenol on expression of vitellogenin gene (*vtg1*) in zebrafish. *Chemosphere* 221, 727–734s.
- Chen, M., Ike, M. and Fujita, M.**, 2001, Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environ. Toxicol.* 17, 80–86s.
- Cheng, T.C.**, 1975, Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Annls. Acad. Sci. N.Y.*, 266: 343–379s.
- Chiesa, L. M., Nobile, M., Malandra, R., Panseri, S. and Arioli, F.**, 2018, Occurrence of antibiotics in mussels and clams from various FAO areas. *Food Chemistry*, 240, 16–23s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Chiu, J.M., Po, B.H., Degger, N., Tse, A., Liu, W., Zheng, G. and Wu, R.S.,** 2018, Contamination and risk implications of endocrine disrupting chemicals along the coastline of China: a systematic study using mussels and semipermeable membrane devices. *Science of the total environment*, 624, 1298-1307s.
- Chow, W.S., Chan, W.K. and Chan, K.M.,** 2013, Toxicity assessment and vitellogenin expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae acutely exposed to bisphenol A, endosulfan, heptachlor, methoxychlor and tetrabromobisphenol A. *J. Appl. Toxicol.* 33, 670–678s.
- Consoli, P., Sinopoli, M., Deidun, A., Canese, S., Berti, C., Andaloro, F. and Romeo, T.,** 2020, The impact of marine litter from fish aggregation devices on vulnerable marine benthic habitats of the central Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 152, 110928.
- Czarny-Krzywińska, K., Krawczyk, B. and Szczukocki, D.,** 2023, Bisphenol A and its substitutes in the aquatic environment: Occurrence and toxicity assessment. *Chemosphere*, 137763s.
- Czarny, K., Krawczyk, B. and Szczukocki, D.,** 2021, Toxic effects of bisphenol A and its analogues on cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Microcystis aeruginosa*. *Chemosphere* 263, 128299s.
- Czarny, K., Szczukocki, D., Krawczyk, B., Zieliński, M., Miękoś, E. and Gadzała-Kopciuch, R.,** 2017, The impact of estrogens on aquatic organisms and methods for their determination. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 47, 909–963s.
- Çakalağaoğlu, F.,** 2005, Tissue processing – Doku takibi\*. *Aegean Pathol J Ulus Patoloji Sempozyumu* 2(2):29–34s. Available from: [www.epd.org.tr/apj.php](http://www.epd.org.tr/apj.php).
- da Silva, A.Q. and de Souza Abessa, D.M.,** 2019, Toxicity of three emerging contaminants to non-target marine organisms. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26, 18354–18364s.
- de Andrade, A.L.C., Soares, P.R.L., da Silva, S., da Silva, M.C.G., Santos, T.P., Cadena, M. R.S., Soares, P.C. and Cadena, P.G.,** 2017, Evaluation of the toxic effect of endocrine disruptor Bisphenol A (BPA) in the acute and chronic toxicity tests with *Pomacea lineata* gastropod. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 197, 1–7s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Debenest, T., Gagne, F., Petit, A.N., Andre, C., Kohli, M. and Blaise, C.,** 2010, Ecotoxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) and its derivatives to aquatic organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 152, 407–412s.
- Dönmez, A.E. ve Yılmaz, D.,** 2015, Sucul Ortamlarda Biyoindikatör ve Biyobelirteçler. *Aquaculture Studies*, 15 (3), 53-64 s.
- ECHA,** 2017, Agreement of the Member State Committee on the Identification of 4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol A) as a Substance of Very High Concern. European Chemicals Agency (ECHA).
- ECHA,** 2021, Assessment of Regulatory Needs. Version 1.0, 16 December 2021, Availableonline:[https://echa.europa.eu/documents/10162/3448017/GMT\\_109\\_Bisphenols\\_Report\\_public\\_23502\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/3448017/GMT_109_Bisphenols_Report_public_23502_en.pdf) (accessed on 12 August 2022).
- EFSA,** 2020, FitzGerald, R.; Van Loveren, H.; Civitella, C.; Castoldi, A.F.; Giovanni Bernasconi, G. Assessment of New Information on Bisphenol S (BPS) Submitted in Response to the Decision under REACH Regulation (EC) No1907/2006; EFSA Supporting Publication; European Food Safety Authority (EFSA): Parma, Italy, 2020; p. 39.
- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S. and Habert, R.,** 2015, A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and sterility*, 103(1), 11-21s.
- Elersek, T., Notersberg, T., Kovacic, A., Heath, E. and Filipic, M.,** 2021, The effects of bisphenol A, F and their mixture on algal and cyanobacterial growth: from additivity to antagonism. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 28, 3445–3454s.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S.,** 1998, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43–50s.
- EU,** 2011, Commission regulation (EU) 10/2011, on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Off. J. Eur. Union* 12, 1–89s.
- EU,** 2017, Commission Directive 2017/898 amending, for the purpose of adopting specific limit values for chemicals used in toys, Appendix C to

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Annex II to Directive 2009/48/EC on the safety of toys, as regards bisphenol A. Off. J. Eur. Union 138,128.
- EU, 2018. Commission regulation (EU) 2018/213, on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials. Off. J. Eur. Union 41, 6–12s.
- EU, 2020. Endocrine Disruptors List. <https://edlists.org/the-ed-lists>.
- EU., 2005, Commission Regulation (EU) 1895/2005, on the restriction of use of certain epoxy derivatives in materials and articles intended to come into contact with food. Off. J. Eur. Union 302, 28–32s.
- Fabbri, R., Montagna, M., Balbi, T., Raffo, E., Palumbo, F. and Canesi, L.,** 2014, Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. Marine environmental research, 99, 1-8s.
- Fabrello, J. and Matozzo, V.,** 2022, Bisphenol analogs in aquatic environments and their effects on marine species—a review. Journal of Marine Science and Engineering, 10(9), 1271s.
- Falcao, V.G.O., Carneiro, D.C., Pereira, S.A., da Silva, M.R.D., Cande, A.A. and da Cunha Lima, S.T.,** 2019, Analyzing the toxicity of bisphenol-A to microalgae for ecotoxicological applications. Environ. Monit. Assess. 192, 8s.
- Farrington, J. W., Tripp, B. W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J. L., Wade, T. L. and Knap, A.H.,** 2016, Edward D. Goldberg's proposal of “the mussel watch”: reflections after 40 years. Marine pollution bulletin, 110(1), 501-510s.
- FDA., Food and Drug Administration,** 2012, Indirect Food Additives, vol. 77. Federal Register. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2012-07-17/pdf/2012-17366.pdf>.
- Fenech, M.,** 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature protocols, 2(5), 1084-1104.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J. and Thomas, P.,** 2011, Molecular mechanisms of micronucleus,

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-132s.

**Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J. and Thomas, P.,** 2011, Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-132s.

**Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J. and Thomas, P.,** 2011, Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-132s.

**Fliedner, A., Rüdell, H., Dreyer, A., Pirntke, U. and Koschorreck, J.,** 2020 Chemicals of emerging concern in marine specimens of the German Environmental Specimen Bank. *Environ. Sci. Eur.* 32 (1)

**Fontanetti, C. S., Christofolletti, C. A., Pinheiro, T. G., Souza, T. S. and Pedro-Escher, J.,** 2010, Microscopy as a tool in toxicological evaluations. *Microscopy: Science, technology, applications and education*, 2, 1001-1007s.

**Fries, E., Mahjoub, O., Mahjoub, B., Berrehouc, A., Lions, J. and Bahadir, M.,** 2016, Occurrence of contaminants of emerging concern (cec) in conventional and non conventional water resources in Tunisia. *Fresenius Environ. Bull.* 25, 3317–3339s.

**Ghosh, A., Tripathy, A. and Ghosh, D.,** 2022, Impact of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on reproductive health of human. *Proc. Zool. Soc.* 75, 16-30s.

**Gisselsson, D., Björk, J., Höglund, M., Mertens, F., Dal Cin, P., Åkerman, M. and Mandahl, N.,** 2001, Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *The American journal of pathology*, 158(1), 199-206s.

**Giulivo, M., Lopez de Alda, M., Capri, E. and Barcelo, D.,** 2016, Human exposure to endocrine disrupting compounds: their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ. Res.* 151, 251–264s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Godiya, C. and Park, B.**, 2022, Removal of bisphenol A from wastewater by physical, chemical and biological remediation techniques. A review. *Environ. Chem. Lett.* 20- 1801-1837s.
- González-Rojo, S., Lombó, M., Fernández-Díez, C. and Herráez, M.P.**, 2019, Male exposure to bisphenol a impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes. *Environmental Pollution*, 248, 368-379s.
- González, N., Cunha, S. C., Ferreira, R., Fernandes, J. O., Marquès, M., Nadal, M. and Domingo, J.L.**, 2020, Concentrations of nine bisphenol analogues in food purchased from Catalonia (Spain): Comparison of canned and non-canned foodstuffs. *Food and Chemical Toxicology*, 136, 110992.
- Gorga, M., Petrovic, M. and Barcelo, D.**, 2013, Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1295, 57–66s.
- Gosling, E.M.**, 1992, Systematics and Geographic Distribution of *Mytilus*. in: Gosling, E.(ed.). *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, New York, pp. 1-17s.
- Gu, J., Wu, J., Xu, S., Zhang, L., Fan, D., Shi, L., Wang, J. and Ji, G.**, 2020, Bisphenol F exposure impairs neurodevelopment in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 188, 109870s.
- Han, Y., Fei, Y., Wang, M., Xue, Y., Chen, H. and Liu, Y.**, 2021, Study on the joint toxicity of BPZ BPS, BPC and BPF to Zebrafish. *Molecules* 26, 4180s.
- Hintzsche, H., Hemmann, U., Poth, A., Utesch, D., Lott, J. and Stopper, H.**, 2017, Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 771, 85-98s.
- His, E., Beiras, R. and Seaman, M.N.L.**, 1999, The assessment of marine pollution-bioassays with bivalve embryos and larvae. In *Advances in marine biology* (Vol. 37, pp. 1-178). Academic press.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- His, E., Seaman, M.N.L. and Beiras, R.,** 1997, A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research*, 31(2), 351-355s.
- Hoffelder, D. R., Luo, L., Burke, N. A., Watkins, S. C., Gollin, S. M. and Saunders, W. S.,** 2004. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma*, 112, 389-397s.
- Hu, Y., Zhu, Q., Yan, X., Liao, C. and Jiang, G.,** 2019, Occurrence, fate and risk assessment of BPA and its substituents in wastewater treatment plant: a review. *Environ. Res.* 178, 108732s.
- Huang, Y.Q., Wong, C.K., Zheng, J.S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlstrom, B., Neretin, L. and Wong, M.H.,** 2012, Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ. Int.* 42, 91–99s.
- Huang, Z., Zhao, J.L., Yang, Y.Y., Jia, Y.W., Zhang, Q.Q., Chen, C.E., Liu, Y.S., Yang, B., Xie, L. and Ying, G.G.,** 2020. Occurrence, mass loads and risks of bisphenol analogues in the Pearl River Delta region, South China: urban rainfall runoff as a potential source for receiving rivers. *Environ. Pollut.* 263, 114361s.
- Huang, Z., Zhao, J.L., Zhang, C.Y., Rao, W.L., Liang, G.H., Zhang, H., Liu, Y.H., Guan, Y. F., Zhang, H.Y. and Ying, G.G.,** 2021, Profile and removal of bisphenol analogues in hospital wastewater, landfill leachate, and municipal wastewater in South China. *Sci. Total Environ.* 790, 148269s.
- Hyoungh, U.J., Yang, Y.J., Kwon, S.K., Yoo, J.H., Myoung, S.C., Kim, S.C. and Hong, Y.P.,** 2007, Developmental toxicity by exposure to bisphenol A diglycidyl ether during gestation and lactation period in Sprague- Dawley male rats. *J PreventMed Public Health* 40:155–161s.
- Im, J. and Loffler, F.E.,** 2016, Fate of bisphenol A in terrestrial and aquatic environments. *Environ. Sci. Technol.* 50, 8403–8416s.
- Ji, C., Li, F., Wang, Q., Zhao, J., Sun, Z. and Wu, H.,** 2016, An integrated proteomic and metabolomic study on the gender-specific responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* to tetrabromobisphenol A (TBBPA). *Chemosphere*, 144, 527-539s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ji, K., Hong, S., Kho, Y. and Choi, K.,** 2013, Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental science & technology*, 47(15), 8793-8800s.
- Jin, H.B. and Zhu, L.Y.,** 2016, Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from liaohe river basin and Taihu lake, China. *Water Res.* 103, 343–351s.
- Jung, J.W., Kang, J.S., Choi, J. and Park, J.W.,** 2020, Chronic toxicity of endocrine disrupting chemicals used in plastic products in Korean resident species: implications for aquatic ecological risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 192, 110309s.
- Kalcikova, G., Zagorc-Koncan, J. and Zgajnar Gotvajn, A.,** 2012, *Artemia salina* acute immobilization test: a possible tool for aquatic ecotoxicity assessment. *Water Sci. Technol.* 66, 903–908s.
- Kang, J.H., Kondo, F. and Katayama, Y.,** 2006, Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226(2-3), 79-89s.
- Katalay, S., Guner, A., Dagdeviren, M., Yigitturk, G., Yavasoglu, A., Gunal, A.C. ve Oltulu, F.,** 2022, Oxidative stress-induced apoptotic changes after acute exposure to antifouling agent zinc pyrithione (ZnPT) in *Mytilus galloprovincialis* Lamark (Mediterranean mussels) tissues. *Chemistry and Ecology*, 38(4), 356-373s.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R.,** 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257s.
- Kidd, V.J. And Tang, D.,** 1998, Cleavage of DFF-45/ICAD by Multiple Caspases is Essential for Its Function During Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(44): 28549-52.
- King, W.A.,** 2000, Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, 8(1):57-68s.
- Klobučar, G. I., Pavlica, M., Erben, R. and Papeš, D.,** 2003, Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic toxicology*, 64(1), 15-23s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kocaman, E. and Ozhan, K.,** 2019, Degradation of bisphenol A in natural and artificial marine and freshwaters in Turkey. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 103, 496-500s.
- Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Marić, J. J., Djordjević, J., Vuković-Gačić, B., Joksimović, D. and Ramšak, A.,** 2023, Single and combined potential of polystyrene microparticles and fluoranthene in the induction of DNA damage in haemocytes of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Mutagenesis*, 38(1), 3-12s.
- Lee, S., Kim, C., Shin, H., Kho, Y. and Choi, K.,** 2019, Comparison of thyroid hormone disruption potentials by bisphenols A, S, F, and Z in embryo-larval zebrafish. *Chemosphere*, 221, 115-123s.
- Lee, S., Liu, X., Takeda, S. and Choi, K.,** 2013, Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*, 93(2), 434-440s.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J. and Kim, V. N.,** 2003, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419.
- Leite, C., Coppola, F., Monteiro, R., Russo, T., Polese, G., Lourenço, M. A. and Pereira, E.,** 2020, Biochemical and histopathological impacts of rutile and anatase (TiO<sub>2</sub> forms) in *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, 719, 134886s.
- Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I.L.N. and Shi, H.,** 2019, Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental pollution*, 244, 522-533s.
- Li, J., Wang, J., Hou, S., Huang, Y., Chen, H., Sun, Z. and Chen, D.,** 2020, Exposure to bisphenol analogues interrupts growth, proliferation, and fatty acid compositions of protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Journal of hazardous materials*, 395, 122643s.
- Liu, J., Shen, J., Lu, G., Xu, X., Yang, H., Yan, Z. and Chen, W.,** 2020, Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol F concentrations in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 240, 124917s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, J., Zhang, L., Lu, G., Jiang, R., Yan, Z. and Li, Y.,** 2021, Occurrence, toxicity and ecological risk of Bisphenol A analogues in aquatic environment - a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111481s.
- Liu, K., Li, J., Yan, S., Zhang, W., Li, Y. and Han, D.,** 2016, A review of status of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in China. *Chemosphere* 148, 8–20s.
- Liu, Y., Yan, Z., Zhang, L., Deng, Z., Yuan, J., Zhang, S., Chen, J. and Guo, R.,** 2019, Food up-take and reproduction performance of *Daphnia magna* under the exposure of Bisphenols. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 47–54s.
- Lubet, P. E.,** 1959, Reserches sur le cycle sexuel et L’emission des Gametes Chez les Pectinides et les Mytilides. *Rev. Trav. Ist. Pm.* 23(4), pp. 396-545, Paris.
- Luzhna, L., Kathiria, P. and Kovalchuk, O.,** 2013, Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in genetics*, 4, 131.
- Maffei, F., Zolezzi Moraga, J. M., Angelini, S., Zenesini, C., Musti, M., Festi, D. and Hrelia, P.,** 2014, Micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes as a biomarker for the early detection of colorectal cancer risk. *Mutagenesis*, 29(3), 221-225s.
- Marqueño, A., Pérez-Albaladejo, E., Denslow, N. D., Bowden, J.A. and Porte, C.,** 2021, Untargeted lipidomics reveals the toxicity of bisphenol A bis (3-chloro-2-hydroxypropyl) ether and bisphenols A and F in zebrafish liver cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 219, 112311s.
- Matozzo, V., Formenti, A., Donadello, G. and Marin, M.G.,** 2012, A multi-biomarker approach to assess effects of Triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine environmental research*, 74, 40-46s.
- Matsushima, A., Ryan, K., Shimohigashi, Y. and Meinertzhagen, I.A.,** 2013, An endocrine disruptor, bisphenol A, affects development in the protochordate *Ciona intestinalis*: hatching rates and swimming behavior alter in a dose-dependent manner. *Environ. Pollut.* 173, 257–263s.
- McCarty, L.S. and Munkittrick, K.R.,** 1996, Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? *Human Ecol. Risk Assess.* Int. J. 2 (2), 268–274 s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- McCarty, L.S., Power, M. and Munkittrick, K.R.**, 2002, Human and ecological risk assessment: an international probability concepts in ecological risk assessment. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 8 (1), 159–164 s.
- Mesnager, R., Phedonos, A., Arno, M., Balu, S., Corton, J.C. and Antoniou, M.N.**, 2017, Editor's highlight: transcriptome profiling reveals bisphenol A alternatives activate estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Toxicological Sciences*, 158(2), 431-443.
- Messinetti, S., Mercurio, S. and Pennati, R.**, 2019, Bisphenol A affects neural development of the ascidian *Ciona robusta*. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol* 331, 5–16s.
- Metcalf, C.D., Bayen, S., Desrosiers, M., Munoz, G., Sauve, S. and Yargeau, V.**, 2022, An introduction to the sources, fate, occurrence and effects of endocrine disrupting chemicals released into the environment. *Environ. Res.* 207, 112658s.
- Mezzelani, M., Peruzza, L., d'Errico, G., Milan, M., Gorbi, S. and Regoli, F.**, 2023, Mixtures of environmental pharmaceuticals in marine organisms: Mechanistic evidence of carbamazepine and valsartan effects on *Mytilus galloprovincialis*. *Science of The Total Environment*, 860, 160465s.
- Mi, P., Tang, Y.Q. and Feng, X.Z.**, 2020, Acute fluorene-9-bisphenol exposure damages early development and induces cardiotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 202, 110922s.
- Michalowicz, J.**, 2014, Bisphenol A – sources, toxicity and biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 738–758s.
- Miglioli, A., Balbi, T., Besnardeau, L., Dumollard, R. and Canesi, L.**, 2021, Bisphenol A interferes with first shell formation and development of the serotonergic system in early larval stages of *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, 758, 144003s.
- Míguez, J., Herrero, C., Quintás, I., Rodríguez, C., Gigoso, P.G. and Mariz, O.C.**, 2012, A LC–MS/MS method for the determination of BADGE-related and BFDGE-related compounds in canned fish food samples based on the formation of  $[M+NH_4]^+$  adducts. *Food chemistry*, 135(3), 1310-1315s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Mihaich, E.M., Friederich, U., Caspers, N., Hall, A. T., Klecka, G. M., Dimond, S.S. and Hentges, S.G.,** 2009, Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(5), 1392-1399s.
- Mitton, J.B.,** 1977, Shell color and pattern variation in *Mytilus edulis* and its adaptive significance, *Chesapeake Science*, 18(4), 387-390s.
- Miyazaki, I., Kikuoka, R., Isooka, N., Takeshima, M., Sonobe, K., Arai, R., Funakoshi, H., Quin, K.E., Smart, J., Zensho, K. and Asanuma, M.,** 2020, Effects of maternal bisphenol A diglycidyl ether exposure during gestation and lactation on behavior and brain development of the offspring. *Food Chem. Toxicol.* 138, 111235s.
- Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T. and Tyler, C.R.,** 2017, Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12796–12805s.
- Mu, X., Huang, Y., Li, X., Lei, Y., Teng, M., Li, X., Wang, C. and Li, Y.,** 2018, Developmental effects and estrogenicity of bisphenol A alternatives in a zebrafish embryo model. *Environ. Sci. Technol.* 52, 3222–3231s.
- Muhamad, M.S., Salim, M.R., Lau, W.J. and Yusop, Z.,** 2016, A review on bisphenol A occurrences, health effects and treatment process via membrane technology for drinking water. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 11549–11567s.
- Murugadas, A., Zeeshan, M., Thamaraiselvi, K., Ghaskadbi, S. and Akbarsha, M.A.,** 2016. Hydra as a model organism to decipher the toxic effects of copper oxide nanorod: eco-toxicogenomics approach. *Sci. Rep.* 6, 29663s.
- Nakazawa, H., Yamaguchi, A., Inoue, K., Yamazaki, T., Kato, K., Yoshimura, Y. and Makino, T.,** 2002, In vitro assay of hydrolysis and chlorohydroxy derivatives of bisphenol A diglycidyl ether for estrogenic activity *Food Chem Toxicol* 40:1827–1832s.
- Nalbantlar, B. ve Arslan OC.,** 2017, Determination of the perflorooctane sulfonate-induced genotoxic response in *Mytilus galloprovincialis* using a micronucleus assay. *Zoology and Ecology*, 27(2), 161-167s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Narevski, A., Novakovi´c, M., Petrovi´c, M., Mihajlovi´c, I., Maodu´s, N. and Vuji´c, G., 2021,** Occurrence of bisphenol A and microplastics in landfill leachate: lessons from South East Europe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 1–8s.
- Naveira, C., Rodrigues, N., Santos, F.S., Santos, L.N. and Neves, R.A.F., 2021,** Acute toxicity of Bisphenol A (BPA) to tropical marine and estuarine species from different trophic groups. *Environ. Pollut.* 268, 115911s.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G. and Halazonetis, T. D., 2010,** Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(3), 220-228s.
- Newell, C.R., 1990,** A guide to mussel quality control, Maine Sea Grant Technical Report E- MSG-90-1, 17 pp.
- Niu, Y., Zhu, M., Dong, M., Li, J., Li, Y., Xiong, Y., Liu, P. and Qin, Z., 2021,** Bisphenols disrupt thyroid hormone (TH) signaling in the brain and affect TH-dependent brain development in *Xenopus laevis*. *Aquat. Toxicol.* 237, 105902s.
- Nixon, S.W., 1995,** Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41 (1), 199–219 s.
- Nkwoji, J.A., Igbo, J.K., Adeleye, A.O. and Obienu, J.A., 2010,** Implications of biological indicators in ecological health: study of a coastal lagoon, Lagos, Nigeria. *Agric Biol J Noth Am* 1:683–689s.
- Oliveira Ribeiro, C.A., Filipack, F., Mela, M., Silva, P.H., Randi, M.A.F., Costa, J.R.A. and Pelletier, E., 2006,** Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead and tributyltin chloride. *Environmental Research* 101: 74-80s.
- Oliveira, P., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Wrona, F. J. and Freitas, R., 2017,** Physiological and biochemical alterations induced in the mussel *Mytilus galloprovincialis* after short and long-term exposure to carbamazepine. *Water research*, 117, 102-114s.
- Osman, A.G., 2014,** Genotoxicity tests and their contributions in aquatic environmental research. *Journal of Environmental protection*, 5(14), 1391.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Osman, A.G.M., Abd El Reheem, A.M, AbuelFadl, K.Y. and Gad El-Rab, A.G.,** 2010, Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in fishes. *Natural Science*, 2(11), 1302-1311s.
- Owczarek, K., Kudlak, B., Simeonov, V., Mazerska, Z. and Namiesnik, J.,** 2018, Binary mixtures of selected bisphenols in the environment: their toxicity in relationship to individual constituents. *Molecules* 23(12), 3226s.
- Ozhan, K. and Kocaman, E.,** 2019, Temporal and spatial distributions of bisphenol A in marine and freshwaters in Turkey. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 76, 246-254s.
- Österblom, H., Crona, B.I., Folke, C., Nyström, M. and Troell, M.,** 2017. *Marine Ecosystem*
- Paerl, H. and Justic, D.,** 2011, Primary producers: phytoplankton ecology and trophic dynamics in coastal waters. In: Wolanski, E., McLusky, D.S. (Eds.), *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, 6, pp. 23–42s.
- Pagano, M., Savoca, S., Impellitteri, F., Albano, M., Capillo, G. and Faggio, C.,** 2022, Toxicological evaluation of acetylsalicylic acid in non-target organisms: chronic exposure on *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Frontiers in Physiology*, 13, 920952s.
- Park, J.C., Lee, M.C., Yoon, D.S., Han, J., Kim, M., Hwang, U.K., Jung, J.H. and Lee, J.S.,** 2018, Effects of bisphenol A and its analogs bisphenol F and S on life parameters, antioxidant system, and response of defensome in the marine rotifer *Brachionus koreanus*. *Aquat. Toxicol.* 199, 21–29s.
- Parlak, H., Arslan, Ç.Ö., Boyacıoğlu, M. ve Karaaslan, M.A.,** 2011, *Ekotoksikoloji Ders Kitabı*, Ege Üniversitesi Yayınları, 339 s.
- Pavlica, M., Klobučar, G. I., Mojaš, N., Erben, R. and Papeš, D.,** 2001, Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 490(2), 209-214s.
- Pelch, K., Wignall, J.A., Goldstone, A.E., Ross, P.K., Blain, R.B., Shapiro, A.J., Holmgren, S.D., Hsieh, J.H., Svoboda, D., Auerbach, S.S., Parham, F.M., Masten, S.A., Walker, V., Rooney, A. and Thayer, K.A.,** 2019, A scoping review of the health and toxicological activity of

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. *Toxicology* 424, 152235s.

**Peters, J.R. and Granek, E.F.**, 2016, Long-term exposure to fluoxetine reduces growth and reproductive potential in the dominant rocky intertidal mussel, *Mytilus californianus*. *Science of the Total Environment*, 545, 621-628s.

**Petrovici, A., Strungaru, S. A., Nicoara, M., Robea, M. A., Solcan, C. and Faggio, C.**, 2020, Toxicity of deltamethrin to zebrafish gonads revealed by cellular biomarkers. *Journal of marine science and engineering*, 8(2), 73s.

**Pinto, J., Costa, M., Leite, C., Borges, C., Coppola, F., Henriques, B. and Freitas, R.**, 2019, Ecotoxicological effects of lanthanum in *Mytilus galloprovincialis*: Biochemical and histopathological impacts. *Aquatic toxicology*, 211, 181-192s.

**Plattard, N., Dupuis, A., Migeot, V., Haddad, S. and Venisse, N.**, 2021, An overview of the literature on emerging pollutants: chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClxBPA). *Environ. Int.* 153, 106547s.

**Ramos, R.L., Lebron, Y.A.R. and Moreira, V.R.**, 2021, Phenolic compounds in surface water: methodology and occurrence in Doce River, Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 193, 687s.

**Rašković, B. and Poleksić, V.**, 2017, Fish histopathology as biomarker in ecotoxicology. *Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health*, 27, 155-181s.

**Reddy, P.B.**, 2012, Histopathological studies as potential and direct biomarkers of pollution. *Trends in Life sciences*, 1(1), 27-31s.

**Ribeiro, E., Ladeira, C. and Viegas, S.**, 2017, Occupational exposure to bisphenol A (BPA): a reality that still needs to Be unveiled. *Toxics* 5

**Roark, A.M.**, 2020, Endocrine Disruptors and Marine Systems, *Encyclopedia of the World's Biomes*, 188-194s.

**Rocha, J., Yletyinen, J., Biggs, R., Blenckner, T. and Peterson, G.**, 2015. Marine regime shifts: drivers and impacts on ecosystems services. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370 (1659), 20130273.

**Rochester, J. R. and Bolden, A.L.**, 2015, Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental health perspectives*, 123(7), 643-650s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rochester, J.R.**, 2013, Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive toxicology*, 42, 132-155s.
- Rochester, J.R.**, 2013, Bisphenol A and human health: are view of the literature. *Reprod.Toxicol.*42,132-155s.
- Rodilla, V., Pellicer, J. A., Serrano, A. and Pertusa, J.**, 1993, Possible relationship between micronucleated and binucleated cells induced by cisplatin in cultured CHO cells. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 291(1), 35-41s.
- Romdhani, I., De Marco, G., Cappello, T., Ibala, S., Zitouni, N., Boughattas, I. and Banni, M.**, 2022, Impact of environmental microplastics alone and mixed with benzo [a] pyrene on cellular and molecular responses of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Hazardous Materials*, 435, 128952s.
- Romero, A., Este´vez-Calvar, N., Dios, S., Figueras, A. and Novoa, B.**, 2011, New Insights into the Apoptotic Process in Mollusks: Characterization of Caspase Genes in *Mytilus galloprovincialis*, *Plos One*, 6 (2): 17003s.
- Rosenfeld, C.S.**, 2021, Xenoestrogen effects on the gut microbiome. *Curr Opin Endocr Metab Res* 19, 41–45s.
- Rubin, B.S.**, 2011, Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 27–34s.
- Rudolph, K. L., Millard, M., Bosenberg, M. W. and DePinho, R. A.**, 2001, Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nature genetics*, 28(2), 155-159s.
- Russo, G., Barbato, F., Mita, D.G. and Grumetto, L.**, 2019, Occurrence of Bisphenol A and its analogues in some foodstuff marketed in Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110575s.
- Salamat, N. and Zarie, M.**, 2016, Fish histopathology as a tool for use in marine environment monitoring: a review. *Comparative Clinical Pathology*, 25, 1273-1278s.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M.**, 1997, Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443–446s.
- Schmidt, J., Kotnik, P., Trontelj, J., Knez, Ž. and Mašič, L.P.**, 2013, Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicology in vitro*, 27(4), 1267-1276s.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schwartzman, R.A. and Cidlowski, J.A.**, 1993, Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14:133–151s.
- Seda, İ., İyigündoğdu, İ., Üstündağ, A. and Duydu, Y.**, 2022, Evaluation of the Cytotoxic Effect of Bisphenol A and Its Analogs in MCF-7 and HSeC Cell Lines in vitro. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(47), 13-22s.
- Seed, R. and Suchanek, T.H.**, 1992, Population and community ecology of *Mytilus*. In: Gosling, E.(ed.). *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, New York, pp. 87-157s.
- Shamhari, A. A., Abd Hamid, Z., Budin, S. B., Shamsudin, N. J. and Taib, I.S.**, 2021, Bisphenol a and its analogues deteriorate the hormones physiological function of the male reproductive system: A mini-review. *Biomedicines*, 9(11), 1744s.
- Shaukat, A., Liu, G., Li, Z., Xu, D., Huang, Y. and Chen, H.**, 2014, Toxicity of five phenolic compounds to brine shrimp *Artemia sinica* (Crustacea: Artemiidae). *Journal of Ocean University of China*, 13, 141-145s.
- Shi, J., Jiao, Z., Zheng, S., Li, M., Zhang, J., Feng, Y. and Shao, B.**, 2015, Long-term effects of bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (*Danio rerio*), and the impact on offspring. *Chemosphere*, 128, 252-257s.
- Shimizu, N., Shingaki, K., Kaneko-Sasaguri, Y., Hashizume, T. and Kanda, T.**, 2005, When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Experimental cell research*, 302(2), 233-243s.
- Shugart, L.R., McCarthy I, J.F.M. and Halbrook, R.S.**, 1992, Biological markers of environmental and ecological contamination: An overview. *Risk Anal.* 12 (3), 3–14 s.
- Sodré, F. and Sampaio, T.**, 2020, Development and application of a SPE-LC-QTOF method for the quantification of micropollutants of emerging concern in drinking waters from the Brazilian capital. *Emergin Cont* 6, 72–81s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Staniszewska, M., Graca, B., Sokolowski, A., Nehring, I., Wasik, A. and Jendzul, A.**, 2017, Factors determining accumulation of bisphenol A and alkylphenols at a low trophic level as exemplified by mussels *Mytilus trossulus*. *Environmental Pollution*, 220, 1147-1159s.
- Suarez, S., Sueiro, R.A. and Garrido, J.**, 2000, Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrin of BADGE. *Mutat Res* 470: 221–228s.
- Sugiura, Y.**, 1962, Electrical induction of spawning in two marine invertebrates (*Urechis unucintus* and hermaphroditic *Mytilus edulis*). *Biol. Bull. Woods Hole*, 123: 203-206s.
- Świacka, K., Maculewicz, J., Smolarz, K., Szaniawska, A. and Caban, M.**, 2019, Mytilidae as model organisms in the marine ecotoxicology of pharmaceuticals-a review. *Environmental Pollution*, 254, 113082s.
- Szczepanska, N., Kubica, P., Kudlak, B., Namiesnik, J. and Wasik, A.**, 2019, Stabilities of bisphenol A diglycidyl ether, bisphenol F diglycidyl ether, and their derivatives under controlled conditions analyzed using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 6387–6398s.
- Tarafdar, A., Sirohi, R., Balakumaran, P.A., Reshmy, R., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Kumar, Y., Kumar, D. and Sim, S.J.**, 2022, The hazardous threat of Bisphenol A: toxicity, detection and remediation. *J. Hazard Mater.* 423, 127097s.
- Tato, T., Salgueiro-González, N., León, V. M., González, S. and Beiras, R.**, 2018, Ecotoxicological evaluation of the risk posed by bisphenol A, triclosan, and 4-nonylphenol in coastal waters using early life stages of marine organisms (*Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Acartia clausi*). *Environmental Pollution*, 232, 173-182s.
- Tisler, T., Krel, A., Gerzelj, U., Erjavec, B., Dolenc, M.S. and Pintar, A.**, 2016, Hazard identification and risk characterization of bisphenols A, F and AF to aquatic organisms. *Environ. Pollut.* 212, 472–479s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Tittel, J.N. and Steller, H.,** 2000, A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol.* 1, 1–6s.
- Tlili, S. and Mouneyrac, C.,** 2019, The wedge clam *Donax trunculus* as sentinel organism for Mediterranean coastal monitoring in a global change context. *Regional environmental change*, 19, 995-1007s.
- Tornero, V. And Hanke, G.,** 2016, Chemical contaminants entering the marine environment from sea-based sources: a review with a focus on European seas. *Mar. Pollut. Bull.* 112 (1-2), 17–38 s.
- Usman, A. and Ahmad, M.,** 2016, From BPA to its analogues: is it a safe journey? *Chemosphere* 158, 131–142s.
- Uysal, H.,** 1970, Türkiye sahilllerinde bulunan midyeler “*Mytilus galloprovincialis* Lamarck” üzerinde biyolojik ve ekolojik araştırmalar, E.Ü. Fen. Fak., İlmi Raporlar Serisi, 79.
- Vaccher, V., Lopez, M.E., Castano, A., Mol, H., Haji-Abbas-Zarrabi, K., Bury, D., Koch, H.M., Dvorakova, D., Hajslova, J., Nubler, S., Kaur Sakhi, A., Thomsen, C., Vorkamp, K., Goen, T. and Antignac, J.P.,** 2022, European interlaboratory comparison investigations (ICI) and external quality assurance schemes (EQUAS) for the analysis of bisphenol A, S and F in human urine: results from the HBM4EU project. *Environ. Res.* 210, 112933s.
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. P.,** 2003, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149 s.
- Venier, P., Maron, S. and Canova, S.,** 1997, Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo [a] pyrene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 390(1-2), 33-44s.
- Vernon, E.L., Bean, T.P. and Jha, A.N.,** 2020, Assessing relative biomarker responses in marine and freshwater bivalve molluscs following exposure to phosphorus 32 (32P): Application of genotoxicological and molecular biomarkers. *J Environ Radioact* 213:106120s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Vilarinho, F., Sendón, R., Van der Kellen, A., Vaz, M.F. and Silva, A.S., 2019,** Bisphenol A in food as a result of its migration from food packaging. Trends in food science & technology, 91, 33-65s.
- Wang, D., Zhao, H., Fei, X., Synder, S.A., Fang, M. and Liu, M., 2021,** A comprehensive review on the analytical method, occurrence, transformation and toxicity of a reactive pollutant: BADGE. Environ. Int. 155, 106701s.
- Wang, G.D., Ma, P., Zhang, Q., Lewis, J., Lacey, M., Furukawa, Y., O'Reilly, S.E., Meaux, S., McLachlan, J. and Zhang, S., 2012,** Endocrine disrupting chemicals in New Orleans surface waters and Mississippi Sound sediments. J. Environ. Monit. 14, 1353–1364s.
- Wang, G.D., Ma, P., Zhang, Q., Lewis, J., Lacey, M., Furukawa, Y., O'Reilly, S.E., Meaux, S., McLachlan, J. and Zhang, S., 2012,** Endocrine disrupting chemicals in New Orleans surface waters and Mississippi Sound sediments. J. Environ. Monit. 14, 1353–1364s.
- Wang, H., Liu, Z., Tang, Z., Zhang, J., Yin, H., Dang, Z., Wu, P. and Liu, Y., 2020,** Bisphenol analogues in Chinese bottled water: quantification and potential risk analysis. Sci. Total Environ. 713, 136583s.
- Wang, H., Tang, Z., Liu, Z.H., Zeng, F., Zhang, J. and Dang, Z., 2022,** Occurrence, spatial distribution, and main source identification of ten bisphenol analogues in the dry season of the Pearl River, South China. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 29, 27352–27365s.
- Wang, L., Wu, Y., Zhang, W. and Kannan, K., 2012,** Widespread occurrence and distribution of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its derivatives in human urine from the United States and China. Environ Sci Technol 46:12968–12976s.
- Wang, L., Xue, J. and Kannan, K., 2015,** Widespread occurrence and accumulation of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives in human blood and adipose fat. Environ Sci Technol 49:3150–3157s.
- Wang, Q., Chen, M., Shan, G., Chen, P., Cui, S., Yi, S. and Zhu, L., 2017,** Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China. Science of the Total Environment, 598, 814-820s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Wathsala, R. H. G. R., Franzellitti, S., Scaglione, M. and Fabbri, E.,** 2018, Styrene impairs normal embryo development in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquatic toxicology*, 201, 58-65s.
- Waykar, B. and Deshmukh, G.,** 2012, Evaluation of bivalves as bioindicators of metal pollution in freshwater. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88, 48-53s.
- Williams, M.J., Cao, H., Lindkvist, T., Mothes, T.J. and Schiöth, H.B.,** 2020, Exposure to the environmental pollutant bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) causes cell over-proliferation in *Drosophila*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 25261-25270s.
- Worm, B., Barbier, E.B., Beaumont, N., Duffy, J.E., Folke, C., Halpern, B.S., Jackson, J.B., C., Lotze, H.K., Micheli, F., Palumbi, S.R., Sala, E., Selkoe, K.A., Stachowicz, J.J. and Watson, R.,** 2006, Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* 314 (5800), 787–790 s. *Science on an Intertwined Planet. Ecosystems* 20 (1), 54–61 s.
- Wu, L.H., Zhang, X.M., Wang, F., Gao, C.J., Chen, D., Palumbo, J.R., Guo, Y. and Zeng, E.Y.,** 2018, Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: a short review. *Sci. Total Environ.* 615, 87–98s.
- Wurtsbaugh, W.A., Paerl, H.W. and Dodds, W.K.,** 2019, Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 6(5), e1373.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. and Cuttue, A.R.,** 1980, Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251–306s.
- Xie, J., Zhao, N., Zhang, Y., Hu, H., Zhao, M. and Jin, H.,** 2022, Occurrence and partitioning of bisphenol analogues, triclocarban, and triclosan in seawater and sediment from East China Sea. *Chemosphere* 287, 132218s.
- Xing, J., Zhang, S., Zhang, M. and Hou, J.,** 2022, A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 254, 109275s.
- Xue, J., Venkatesan, A., Wu, Q., Halden, R. and Kannan, K.,** 2015, Occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers (BADGEs) and novolac glycidyl ethers (NOGEs) in archived biosolids from the U.S. EPA's

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- targeted national sewage sludge survey. *Environ. Sci. Technol.* 49, 6538–6544s.
- Yan, Z., Liu, Y., Yan, K., Wu, S., Han, Z., Guo, R., Chen, M., Yang, Q., Zhang, S. and Chen, J., 2017**, Bisphenol analogues in surface water and sediment from the shallow Chinese freshwater lakes: Occurrence, distribution, source apportionment, and ecological and human health risk. *Chemosphere* 184, 318–328s.
- Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S. And Georgieva, E., 2016**, Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. *Applied ecology and environmental research*, 14(1), 47-75s.
- Yang, Q., Xu, W., Luan, T., Pan, T., Yang, L. And Lin, L., 2021**, Comparative responses of cell growth and related extracellular polymeric substances in *Tetraselmis* sp. To nonylphenol, bisphenol A and 17alpha-ethinylestradiol. *Environ. Pollut.* 274, 116605s.
- Yavaşoğlu, A., Özkan, D., Güner, A., Katalay, S., Oltulu, F. ve Yavaşoğlu, N.Ü.K., 2016**, Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819) following exposure to environmental pollutants. *Marine pollution bulletin*, 109(1), 184-191s.
- Yıldırım, A., 2010**, Moleküler Biyoloji. Nobel Yayın Dağıtım, 425-445, İstanbul, Türkiye.
- Yurdakok-Dikmen, B., Turgut, Y., Gunal, A.C., Uyar, R., Kuzukiran, O., Filazi, A. ve Erkoc, F., 2020**, In vitro effects of selected endocrine disruptors (DEHP, PCB118, BPA) on narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) primary cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 56, 783–791s.
- Zaghloul, A., Saber, M., Gadow, S. and Awad, F., 2020**, Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-11s.
- Zhang, C., Hu, J., Song, J., Wu, M. and Zhang, Z., 2021**, Development of ic-ELISAs for the detection of bisphenol A diglycidyl ether and its derivatives in canned luncheon meats. *ACS Food Sci Technol* 2, 160–168s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Zhang, H., Zhang, Y., Li, J. and Yang, M.**, 2019, Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China. *Sci. Total Environ.* 655, 607–613s.
- Zhang, L., Zhang, J., Fan, S., Zhong, Y., Li, J., Zhao, Y. and Wu, Y.**, 2023, A case-control study of urinary concentrations of bisphenol A, bisphenol F, and bisphenol S and the risk of papillary thyroid cancer. *Chemosphere*, 312, 137162s.
- Zhao, J.L., Huang, Z., Zhang, Q.Q., Ying-He, L., Wang, T.T., Yang, Y.Y. and Ying, G.G.**, 2021, Distribution and mass loads of xenoestrogens bisphenol a, 4-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol in rainfall runoff from highly urbanized regions: a comparison with point sources of wastewater. *J. Hazard Mater.* 401, 123747s.
- Zheng, T.S., Schlosser, S.F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I.N., Boyer, J.L. and Flavell, R.A.**, 1998, Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13618–13623.
- Zhou, R., Xia, M., Zhang, L., Cheng, W., Yan, J., Sun, Y., Wang, Y. and Jiang, H.**, 2021. Individual and combined effects of BPA, BPS and BPAF on the cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 220, 112366s.
- Ziv-Gal, A. and Flaws, J.A.**, 2016, Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007–2016). *Fertility and sterility*, 106(4), 827-856s.
- Zuykov, M., Pelletier, E. and Harper, D.A.**, 2013, Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere*, 93(2), 201-208s.
- Zühlke, M. K., Schlüter, R., Henning, A. K., Lipka, M., Mikolasch, A., Schumann, P. and Schauer, F.**, 2016, A novel mechanism of conjugate formation of bisphenol A and its analogues by *Bacillus amyloliquefaciens*: detoxification and reduction of estrogenicity of bisphenols. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 109, 165-173s.

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Prof. Dr. Özlem ÇAKAL ARSLAN danışmanlığı ile tamamlanmış, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne doktora tezi olarak sunulmuştur.

Tez araştırmasının yürütülmesinde ve tezin her aşamasında yardımcı olan, lisans öğrenimimden beri akademik çalışmalarımı beraber yürüttüğüm, her konuda yardımını ve bilgisini benden esirgemeyen, değerli danışman hocam Prof. Dr. Özlem ÇAKAL ARSLAN'a en derin şükranlarımı arz ederim.

Tez araştırmamın önemli bir kısmının gerçekleştirilmesine olanak sağlayarak tamamlama yardımcı olan, her türlü desteği sağlayan Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLUN'a,

Tez çalışmamda, test canlısının temini sırasında bana tüm desteğini veren ve her daim yardım eden Doç. Dr. Şükrü Yıldırım'a, Laboratuvar bilgi ve deneyimlerini paylaşmaya hazır olan ve destekleyen Doç. Dr. Meltem BOYACIOĞLU'na,

Tez çalışmamın zorlu dönemlerinde yeni bir bakış açısıyla her daim yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen Doç Dr. Ertan DAĞLI'ya, Histoloji laboratuvar çalışmalarım sırasında benden hiçbir yardımcı esirgemeyen ve tüm desteklerini sağlayan Aylin Buhur'a, Araş. Gör. Çevik GÜREL ve Ceren GÜREL'e

Son olarak, tüm öğrenim hayatım boyunca her daim yanımda olan, bu çalışmanın her aşamasının yürütülmesine tanıklık eden, annem SEVİL ÜZER'e, ablam Bedia NALBANTLAR ULUDAĞ'a ve yeğenim YAĞMUR ULUDAĞ'a

Tüm içtenliklerimle sonsuz teşekkürlerimi iletirim.

Bu çalışma 22892 nolu proje ile BAP kapsamında desteklenmiştir.

Beyza NALBANTLAR

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Beyza NALBANTLAR

### Öğrenim Durumu:

Lisans: Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 2007-2012

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Temel Bilimler, 2013-2017

Doktora: Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Temel Bilimler, 2019-

**Yüksek Lisans Tezi:** “Perflorooktan Sülfonat’a maruz kalan midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) DNA hasarının mikronükleus testi ile saptanması”.

Prof. Dr. Özlem ÇAKAL ARSLAN

### Çalıştığı projeler

- Doğal Ortamından Alınmış Midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) Genetik Biyo-işaretler Kullanılarak İzmir Körfezi Kirliliği'nin Belirlenmesi, BAP projesi, 16-SÜF-006.
- Propranolol ve Metilparaben'in Birlikte Deniz Kestanesi (*Arbacia lixula*) Embriyo Gelişimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, BAP projesi, 16-SÜF-007.
- Aliğa Körfezi Sedimentinin Deniz kestanesi (*Arbacia lixula*) Üzerine Embriyotoksik Etkilerinin Araştırılması, BAP projesi, 14-SÜF-023.
- Perflorooktan sülfonat (PFOS)'ın Midyelerde (*Mytilus galloprovincialis*) Genotoksik ve Biyokimyasal Etkilerinin İncelenmesi, TÜBİTAK Araştırma Projesi, 114Y386.
- “Bisfenol-A tarihinde Yeni Bir Dönem: Bisfenol-A yerine kullanılan Potansiyel Kimyasallar Sucul Canlılar için Gerçekten Güvenli mi?”, TÜBİTAK Araştırma Projesi, 119Y246.

### Yayımlar

• Nalbantlar, B., & Çakal Arslan, Ö. (2017). Determination of the perflorooctane sulfonate-induced genotoxic response in *Mytilus galloprovincialis* using a micronucleus assay. *Zoology and Ecology*, 27(2), 161-167.

• Boyacıoğlu, M., Parlak, H., Arslan, Ö. Ç., Karaaslan, M. A., Tez, S., Gülsever, G., & Nalbantlar, B. (2017). Gölçük Gölü (İzmir, Türkiye) sedimentinin *Desmodesmus (Scenedesmus) dimorphus* üzerine fitotoksitesi. *Su Ürünleri Dergisi*, 34(2), 145-150.

• Arslan, Ö. Ç., Parlak, H., Karaaslan, M. A., Boyacıoğlu, M., Nalbantlar, B. (2017). Cytotoxic and Cytogenetic Effects of Bisphenol-A in *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819). *Aquaculture Studies*, 17(1), 093-101.

• Arslan, Ö. Ç., BOYACIOGLU, M., Nalbantlar, B., Gülsever, G., & Karaaslan, M. A. (2021). Micronucleus formation in mussel'(*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) haemolymph, liver, and gill cells as a biomarker in the assessment of genotoxicity in Izmir Bay (Aegean Sea, Turkey). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(2), 189-197.