



**FLUORENE-9-BİSPHENOL'UN TATLI SU MİDYELERİNDE TOKSİK  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Fatma Nur AKINCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ÇEVRE BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2023**

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Fatma Nur AKINCI

06/01/2023



# FLUORENE-9-BİSPHENOL'UN TATLI SU MİDYELERİNDE TOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatma Nur AKINCI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2023

## ÖZET

BPA (Bisfenol A), plastik malzemelerin yapı maddesinde yaygın olarak kullanılan bir bileşik olup canlı hayatı ve çevreye verdiği toksik etkilerinden dolayı kullanımı kısıtlandırılmıştır. Bu çalışmada BPA'nın ikamesi olan Flourene-9-Bisfenol (BHPF)'un tatlı su midyeleri üzerindeki toksik etkileri araştırılmıştır. Probit analiz yöntemi kullanılarak 24, 48, 72 ve 96 saat süreli ortalama öldürücü konsantrasyonları ( $LC_{50}$ ) (%95 güven aralığı) hesaplanmıştır. 24 saatlik  $LC_{50}$  değeri 9,54 mg/L (5,37-18,89 mg/L), 48 saatlik  $LC_{50}$  değeri 3,95 mg/L (2,0-8,32 mg/L), 72 saatlik  $LC_{50}$  değeri 1,33 mg/L (0,65-2,6 mg/L), 96 saatlik  $LC_{50}$  değeri 0,84 mg/L (0,42-1,57 mg/L) olarak saptanmıştır. 96 saatlik  $LC_{50}$  değerinin 1/5, 1/10 ve 1/100'lik konsantrasyonları, subletal konsantrasyonlar olarak belirlenmiş ve tatlı su midyelerinin toplam hemosit sayısı, dokularındaki malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) ve ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) düzeylerine etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre toplam hemosit miktar değerleri (THS/ml) BHPF'ye maruz kalma sonucunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda azalma göstermiştir ( $p<0.05$ ). 2 ve 7 günlük süre sonlandığında kontrol grubu canlılarına kıyasla sindirim bezi ve solungaç dokularındaki MDA düzeylerinin istatistiksel olarak artış gösterdiği saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Sindirim bezi ve solungaç dokularındaki GSH seviyesinin 2 ve 7 günlük süre sonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Sindirim bezi ve solungaç dokularındaki AOPP düzeylerinin ise 2 ve 7 günlük süre sonunda kontrol grubuna göre fazla bir değişikliğe uğramadığı belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Sonuç olarak, BHPF'nin subletal konsantrasyonlarda bile tatlı su midyelerinin toplam hemosit sayıları ve biyokimyasal parametrelerini etkilediği saptanmıştır.

Bilim Kodu : 20302  
Anahtar Kelimeler : Flourene-9-Bisfenol (BHPF), Tatlı su midyesi,  $LC_{50}$ , THS, AOPP, MDA, GSH  
Sayfa Adedi : 57  
Danışmanı : Prof. Dr. Aysel Çağlan GÜNAL

DETERMINATION OF TOXIC EFFECTS OF FLUORENE-9-BISPHENOL ON  
FRESHWATER MUSSELS

(Master's Thesis)

Fatma Nur AKINCI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January, 2023

ABSTRACT

BPA (Bisphenol A) is a widely used compound in plastic materials and its use has been restricted due to its toxic effects on living life and the environment. In this study, the toxic effects of Flourene-9-Bisphenol (BHPF), a substitute for BPA, on freshwater mussels were investigated. LC<sub>50</sub> values (95% confidence interval) for 24, 48, 72 and 96 hours were calculated using the probit analysis method. LC<sub>50</sub> value in 24 hours was 9.54 mg/L (5.37-18.89 mg/L), LC<sub>50</sub> value in 48 hours was 3.95 mg/L (2.0-8.32 mg/L), LC<sub>50</sub> value in 72 hours was 1.33 mg/L (0.65-2.6 mg) /L) and LC<sub>50</sub> value of 96 hours was determined as 0.84 mg/L (0.42-1.57 mg/L). Concentrations of 1/5, 1/10 and 1/100 of the 96 hour LC<sub>50</sub> value were determined as sublethal concentrations and freshwater mussels were exposed to 8.5, 85 and 170 µg/L concentrations of BHPF. As a result of the experiment, the effects of freshwater mussels on total hemocyte count, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and advanced oxidation protein products (AOPP) levels in their tissues were determined. According to the results obtained, total hemocyte amount values (THS/ml) showed a statistically significant decrease compared to the control group as a result of exposure to BHPF (p<0.05). After 2 and 7 days, MDA levels in the digestive gland and gill tissues increased statistically compared to the control group animals (p<0.05). GSH levels in the digestive gland and gill tissues were found to be statistically decreased compared to the control group at the end of 2 and 7 days (p<0.05). It was determined that AOPP levels in the digestive gland and gill tissues did not change much compared to the control group at the end of 2 and 7 days (p<0.05). In conclusion, it was determined that BHPF affected the total hemocyte counts and biochemical parameters of freshwater mussels even at sublethal concentrations.

Science Code : 20302  
Keywords : Flourene-9-Bisphenol (BHPF), Freshwater mussel, LC<sub>50</sub>, THS, AOPP, MDA, GSH  
Number of Pages : 57  
Advisor : Prof. Dr. Aysel Çağlan GÜNAL

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca her türlü desteği ile yanımda olan, sevgili danışmanım Prof. Dr. Aysel Çağlan GÜNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarımın aşamalarında verdiği bilgi ve destekler için Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN hocama minnettarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili annem Aysel AKINCI ve sevgili babam Alaattin AKINCI ve arkadaşlarıma minnetlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                            | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                                 | iv    |
| ABSTRACT.....                                                              | v     |
| TEŞEKKÜR.....                                                              | vi    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                          | vii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                                                  | ix    |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....                                                   | x     |
| RESİMLERİN LİSTESİ .....                                                   | xii   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                               | xiii  |
| 1. GİRİŞ.....                                                              | 1     |
| 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ .....                                                | 5     |
| 2.1. Endokrin Bozucular ve Özellikleri.....                                | 5     |
| 2.2. Flourene-9-Bisfenol Yapısı ve Özellikleri .....                       | 8     |
| 2.2.1. BHPF'nin eşeyssel organlar üzerindeki etkileri .....                | 10    |
| 2.2.2. BHPF'nin sinir sistemi üzerindeki etkileri.....                     | 13    |
| 2.2.3. BHPF'nin canlı davranışları üzerindeki etkileri.....                | 14    |
| 2.2.4. BHPF'nin vücut organları üzerindeki etkileri.....                   | 15    |
| 2.3. <i>Unio terminalis</i> Midye Türünün Ekolojisi ve Özellikleri .....   | 18    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                | 23    |
| 3.1. Materyal .....                                                        | 23    |
| 3.1.1. Tatlı su midyelerinin laboratuvar ortamına getirilme koşulları..... | 23    |
| 3.1.2. Tatlı su midyelerine uygulanan deney ortamı .....                   | 23    |
| 3.1.3. BHPF çözeltisinin hazırlanma aşamaları.....                         | 25    |
| 3.2. Yöntem.....                                                           | 26    |
| 3.2.1. Deneyin yöntemi ve dozlama .....                                    | 26    |



|                                                                              | <b>Sayfa</b> |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.2.2. Deney esnasında yapılan uygulamalar .....                             | 26           |
| 3.2.3. Hemolemf alınma işlemi ve hemosit değerlerinin ölçülmesi .....        | 28           |
| 3.2.4. Canlı modelinden doku örneklerinin çıkartılması .....                 | 28           |
| 3.2.5. Doku analizlerinin yapılması.....                                     | 29           |
| 3.2.6. İstatistik değerlendirme .....                                        | 34           |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                     | <b>35</b>    |
| 4.1. BHPF'nin <i>U.terminalis</i> Üzerindeki Etkileri .....                  | 35           |
| 4.1.1. BHPF'nin 24 saatlik akut toksisite bulguları .....                    | 35           |
| 4.1.2. BHPF'nin 48 saatlik akut toksisite bulguları .....                    | 36           |
| 4.1.3. BHPF'nin 72 saatlik akut toksisite bulguları .....                    | 38           |
| 4.1.4. BHPF'nin 96 saatlik akut toksisite bulguları .....                    | 39           |
| 4.1.5. <i>U.terminalis</i> 'in MDA biyobelirteç değerleri.....               | 41           |
| 4.1.6. <i>U.terminalis</i> 'in GSH biyobelirteç değerleri .....              | 43           |
| 4.1.7. <i>U.terminalis</i> 'in AOPP biyobelirteç değerleri.....              | 45           |
| 4.2. BHPF'nin <i>U.terminalis</i> Hemosit Sayısının Üzerindeki Etkileri..... | 47           |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>                                            | <b>49</b>    |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                       | <b>53</b>    |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                        | <b>57</b>    |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                         | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 3.1. BHPF çözeltisinin hazırlanması süreci ve kullanılan malzemeler .....               | 25    |
| Çizelge 3.2. MDA, AOPP ve GSH solüsyonlarının hazırlanması .....                                | 30    |
| Çizelge 4.1. 24 saatlik LC <sub>50</sub> değerleri ve % 95’lik güven aralığı .....              | 35    |
| Çizelge 4.2. 48 saatlik LC <sub>50</sub> değerleri ve % 95’lik güven aralığı .....              | 37    |
| Çizelge 4.3. 72 saatlik LC <sub>50</sub> değerleri ve % 95’lik güven aralığı .....              | 38    |
| Çizelge 4.4. 96 saatlik LC <sub>50</sub> değerleri ve % 95’lik güven aralığı .....              | 40    |
| Çizelge 4.5. MDA verilerinin solungaç dokunun üzerindeki değerleri (nM/mg doku)..               | 41    |
| Çizelge 4.6. MDA verilerinin sindirim bezi dokusunun üzerindeki değerleri (nM/mg doku) .....    | 42    |
| Çizelge 4.7. GSH verilerinin solungaç dokunun üzerindeki değerleri (μmol/mg doku)               | 43    |
| Çizelge 4.8. GSH verilerinin sindirim bezi dokusunun üzerindeki değerleri (μmol/mg doku) .....  | 44    |
| Çizelge 4.9. AOPP verilerinin solungaç dokunun üzerindeki değerleri (μM/mg protein) .....       | 45    |
| Çizelge 4.10. AOPP verilerinin sindirim bezi dokusunun üzerindeki değerleri(μM/mg protein)..... | 46    |
| Çizelge 4.11. Toplam hemosit değerleri (hücreX10 <sup>3</sup> )/ml .....                        | 47    |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.1. BPA'ya maruz kalma yolları.....                                                                           | 2     |
| Şekil 2.1. Endokrin Bozucu Kimyasalların Hormon Taklidi ve Hormon Bloke Özellikleri.....                             | 5     |
| Şekil 2.2. Endokrin bozucu kimyasalların etkilediği yapı ve organlar .....                                           | 7     |
| Şekil 2.3. BHPF'nin yapısal formülü .....                                                                            | 9     |
| Şekil 2.4. BHPF maruziyet kaynakları .....                                                                           | 10    |
| Şekil 2.5. BHPF, domuz oositlerinde anormal iğ oluşumuna neden olur.....                                             | 11    |
| Şekil 2.6. Farelerin rahim iç zarının incelenmesi .....                                                              | 12    |
| Şekil 2.7. BHPF grubundan bir farenin uterusunda ölü bir fetüs.....                                                  | 13    |
| Şekil 2.8. BHPF'nin karaciğer organı üzerindeki etkileri .....                                                       | 16    |
| Şekil 2.9. Zebra balığının BHPF maruziyeti sonucu anormal embriyosu .....                                            | 17    |
| Şekil 2.10. Midyelerin Ekosistem Hizmetler .....                                                                     | 19    |
| Şekil 2.11. Midye kabuğunun dış (A) ve iç (B) görüntüsü.....                                                         | 20    |
| Şekil 2.12. Midyelerin vücut kısımları .....                                                                         | 21    |
| Şekil 3.1. Adaptasyon için uygulanan aşamalar .....                                                                  | 24    |
| Şekil 3.2. Hemolemf alınması ve incelenmesi için uygulanan işlemler .....                                            | 28    |
| Şekil 3.3. <i>U. terminalis</i> 'in doku örneklerinin çıkartılması.....                                              | 29    |
| Şekil 3.4. Glutatyon metodu aşamaları .....                                                                          | 34    |
| Şekil 4.1. <i>U.terminalis</i> 'in 24 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği ..... | 36    |
| Şekil 4.2. <i>U.terminalis</i> 'in 48 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği ..... | 37    |
| Şekil 4.3. <i>U.terminalis</i> 'in 72 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği ..... | 39    |
| Şekil 4.4. <i>U.terminalis</i> 'in 96 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği ..... | 40    |
| Şekil 4.5. Maruziyet sürelerine göre solungaç dokusu MDA değerleri (nM/mg doku) .                                    | 41    |

| <b>Şekil</b>                                                                                    | <b>Sayfa</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 4.6. Maruziyet sürelerine göre sindirim bezi dokusu MDA değerleri (nM/mg doku) .....      | 42           |
| Şekil 4.7. Maruziyet sürelerine göre solungaç dokusu GSH değerleri (µmol/mg doku) .....         | 43           |
| Şekil 4.8. Maruziyet sürelerine göre sindirim bezi dokusu GSH değerleri (µmol/mg doku) .....    | 44           |
| Şekil 4.9. Maruziyet sürelerine göre solungaç dokusu AOPP değerleri (µM/mg protein) .....       | 45           |
| Şekil 4.10. Maruziyet sürelerine göre sindirim bezi dokusu AOPP değerleri (µM/mg protein) ..... | 46           |
| Şekil 4.11. Maruziyet sürelerine göre toplam hemosit sayısı (hücreX10 <sup>3</sup> )/ml .....   | 48           |

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                                                | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 3.1. Uygulanan biyodeney düzeneği.....                                                                         | 24    |
| Resim 3.2. Uygulanan beslenme yöntemi.....                                                                           | 24    |
| Resim 3.3. BHPF çözeltisinin hazırlanması .....                                                                      | 25    |
| Resim 3.4. Midyelerin canlılık tespiti ve ölü örnekler.....                                                          | 27    |
| Resim 3.5. <i>U. terminalis</i> 'in ağırlık (g), uzunluk (mm), yükseklik (mm) ve kalınlık (mm) ölçüm aşamaları ..... | 27    |
| Resim 3.6. Solüsyonların hazırlanması.....                                                                           | 30    |
| Resim 3.7. Doku tartımının yapılması .....                                                                           | 30    |
| Resim 3.8. Homojenizasyon, Santrifüj ve Süpernatant alınması işlemleri.....                                          | 31    |
| Resim 3.9. MDA parametresi için su banyosu işlemleri .....                                                           | 32    |
| Resim 3.10. AOPP parametresinin uygulanması ve spektrofotometre cihazında okuma.....                                 | 32    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Çalışmada kullanılmış olan kısaltmalar ve simgeler açıklamalarıyla aşağıda verilmiştir.

### Simgeler

### Açıklamalar

|                        |                         |
|------------------------|-------------------------|
| <b>g</b>               | Gram                    |
| <b>rpm</b>             | Dakikadaki devir sayısı |
| <b>LC<sub>50</sub></b> | Letal konsantrasyon     |
| <b>L</b>               | Litre                   |
| <b>µg</b>              | Mikrogram               |
| <b>µl</b>              | Mikrolitre              |
| <b>µM</b>              | Mikrometre              |
| <b>µmol</b>            | Mikromol                |
| <b>mg</b>              | Miligram                |
| <b>ml</b>              | Mililitre               |
| <b>mm</b>              | Milimetre               |
| <b>nm</b>              | Nanometre               |
| <b>pH</b>              | Potansiyel hidrojen     |
| <b>°C</b>              | Santigrat               |

### Kısaltmalar

### Açıklamalar

|             |                                            |
|-------------|--------------------------------------------|
| <b>ALT</b>  | AlaninAminotransferaz                      |
| <b>AOPP</b> | Advanced Oxidation Protein Products        |
| <b>AST</b>  | Aspartat Aminotransferaz                   |
| <b>ATP</b>  | Adenintrifosfat                            |
| <b>BHPF</b> | Flourene-9-Bisphenol                       |
| <b>BPA</b>  | Bisphenol A                                |
| <b>CDC</b>  | Centers for Disease Control and Prevention |
| <b>CG</b>   | Kortikal granüller                         |
| <b>CNS</b>  | Central Nervous System                     |
| <b>DDT</b>  | DikloroDifenilTrikloretan                  |

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

|                                     |                                                  |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>DES</b>                          | Dietilstilbesterol                               |
| <b>DMSO</b>                         | Dimetilsülfoksit                                 |
| <b>DTNB</b>                         | Ellman reaktifi                                  |
| <b>EDC</b>                          | Endocrine disruptors                             |
| <b>GFP</b>                          | Green fluorescent protein                        |
| <b>GSH</b>                          | Glutasyon                                        |
| <b>HPT</b>                          | Hipotalamik-hipofizer-tiroid                     |
| <b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>  | Metafosforik asit                                |
| <b>KCl</b>                          | Potasyum klorür                                  |
| <b>KOH</b>                          | Potasyum hidroksit                               |
| <b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | Dipotasyum fosfat                                |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | Monopotasyum fosfat                              |
| <b>MBP</b>                          | Majör bazik protein                              |
| <b>MDA</b>                          | Malondialdehit                                   |
| <b>NAFLD</b>                        | Non-alcoholic fatty liver disease                |
| <b>NHANES</b>                       | National Health and Nutrition Examination Survey |
| <b>PBE</b>                          | Polar gövde ekstrüzyonu                          |
| <b>PCB</b>                          | Poliklorlu bifeniller                            |
| <b>ROS</b>                          | Reaktif Oksijen Türleri                          |
| <b>SV-BA</b>                        | Sinus venosus- bulbus arteriosus                 |
| <b>TH</b>                           | Tiroit hormon                                    |

## 1. GİRİŞ

Sanayi Devrimi sonucu nüfusun hızla artmasıyla çevreye bırakılan kimyasalların artması doğru orantılıdır. Bu durum sağlık problemlerinde önemli bir artışa sebep olmuştur. Bu gibi kimyasallara örnek verilen endokrin bozucu kimyasallar (EBK, endocrine disruptor chemicals EDC), ekosistemin her kısmında bulunabilmektedir. Yaygın olarak kullanılan ev malzemelerinde, tıbbi malzemelerde ve tarımsal alanlarda kullanıma sunulan pestisitlerin üretilmesinde kullanılırlar. Günlük hayatta oldukça sık kullanılan çeşitli malzemeler aracılığıyla maruz kalınan endokrin bozucu kimyasallar: Canlıların çevredeki davranışları, gelişimi, üremesi ve hormonal sistemleri üzerinde olumsuz etkilere yol açar (Tang, Xu, Deng, Lian ve Yu, 2020).

1940'lı yıllardan itibaren kullanılan endokrin bozucu kimyasalların doğal yaşam alanlarına ve insanlara verdiği zararlar çeşitli çalışmalarla gözler önüne sunulmuştur. Son 10 yıldır ise çalışmalar oldukça aktiflik kazanmıştır. Endokrin bozucu kimyasallar, hem vahşi yaşamın hem de insanların endokrin sistemi üzerindeki normal işleyişini değiştirici özelliğe sahiptir (Kabir, Rahman ve Rahman, 2015).

Yapılan araştırmalar sonucu endokrin bozucu kimyasallar olarak karakterize edilen ajanlar(bisfenoller, fitalatlar, atrazin, poliklorlubifeniller, dikloro difenil trikloroetan ve dietilstilbesterol) insan ve vahşi yaşam sağlığı üzerinde zararlı etkilere sebep olmaktadır (Lauretta, Sansone, Sansone, Romanelli ve Appetecchia, 2019). Endokrin bozucu kimyasalların zararlı etkileri:

- Çocuk ve yetişkin obezitesi,
- Glikoz toleransının bozulması,
- Gestasyonel diyabet(gebelik şekeri),
- Doğum ağırlığının azalması,
- Semen kalitesinin düşmesi,
- Polikistik over sendromu,
- Endometriozis ve meme kanseri olarak rapor edilmiştir (Kahn, Philippat, Nakayama, Slama ve Trasande, 2020).

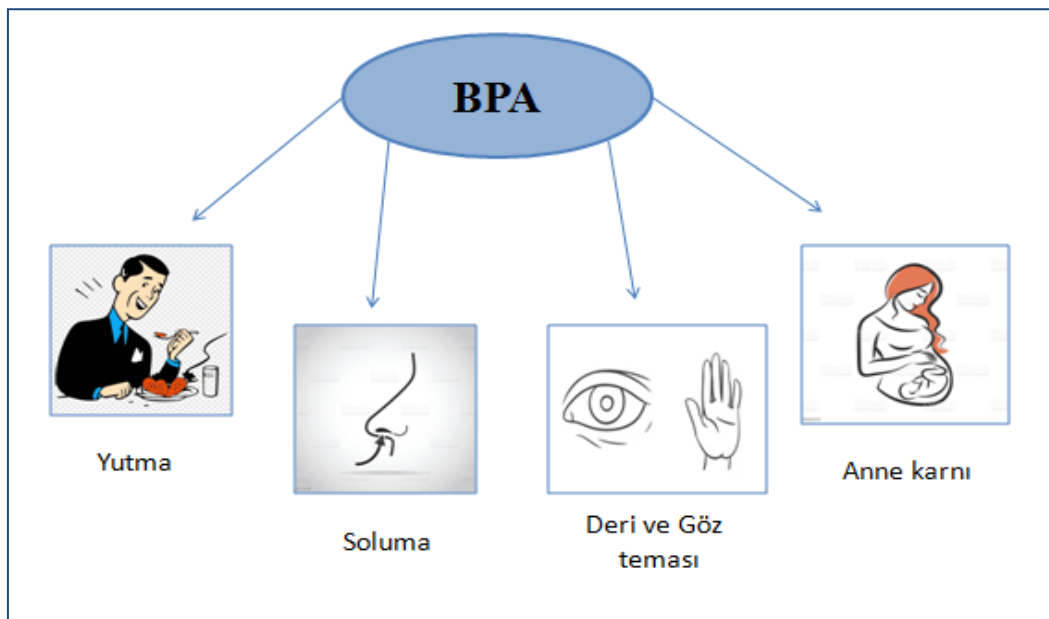


Bisphenol A(BPA), endokrin bozucu kimyasal maddelerden biri olup yapılan çalışmalarda hayvanlar ve insanlar üzerindeki zararlı etkileri gösterilen kuvvetli bir çevresel kirleticidir. BPA maruziyeti canlı yaşamında hormonal, metaboliksel ve gelişimsel sağlık sorunlarına sebebiyet vermiştir (Rochester, 2013).

BPA birçok tüketicinin kullandığı ürünlerde(biberon, diş dolguları, su şişeleri...) bulunan polikarbonat, plastiklerin ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanılan kimyasallardandır. Doğal yaşam alanlarında da bulunan BPA'nın, östrojenik aktivitesi sebebiyle canlılar üzerindeki olumsuz etkileri azaltılmak istenilmiştir (Vanderbeng, Hauser, Marcus, Olea ve Welshons, 2007).

BPA'ya maruz kalmanın birçok farklı yolu bulunmaktadır. Bunlar: Sindirim sistemi (yutma), solunum sistemi (soluma), anne karnı ve örtü sistemi (cilt ve göz teması) olmak üzere sınıflandırılabilir (Şekil 1.1). BPA'nın canlı vücuduna girmesiyle tiroit, yağ dokusu, karaciğer, kalp, dişi ve erkek üreme dokuları gibi birden fazla hedef hücrelerini olumsuz etkileyebilir (Cimmino, Fiory Perruolo, Miele, Beguinot, Formisano ve Orienre, 2020).

BPA'nın zararlı etkileri konusundaki yapılan çalışmalarda elde edilen veriler sonucunda özellikle bebekler ve küçük çocukların temas halinde olduğu plastik ürünlerde kullanılması yasaklanmıştır (Cimmino, Fiory Perruolo, Miele, Beguinot, Formisano ve Orienre, 2020).



Şekil 1.1. BPA'ya maruz kalma yolları (Cimmino ve diğerleri, 2020)

Yapılan alışmalar, BPA'nın çevreye ve insanlara verdiği zararı ortaya koymuştur. BPA'nın imalatı ve kullanımıyla ilgili gerçekleştirilen kısıtlama neticesinde BPA'nın yerine alternatifler geçmeye başlamıştır (Chen ve diğerleri, 2016). BPA'nın alternatifi olan Flourene-9-Bisfenol (BHPF), BPA'nın yerine ticari üretimde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kullanım oranı gittikçe artış gösteren BHPF'nin günlük hayatta sürekli karşımıza çıktığı görülmektedir. Flourene-9-Bisfenol, suya sürekli karışması ve suda yaşayan canlıların gelişim ve davranış üzerindeki etkilerinin belirsizliği ile büyük bir endişe yaratmıştır (Zhang, Ding, Luo ve Li, 2021).

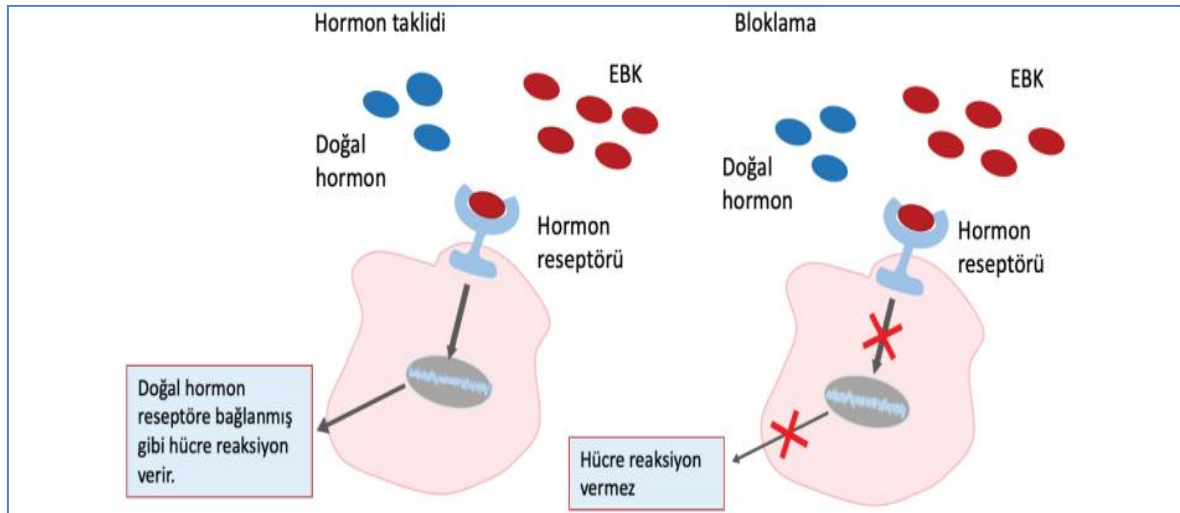
Midyeler, sucul ekosistemlerde biyoindikatör olarak bilinen ve toksikoloji çalışmalarında da etkili bir şekilde kullanılan canlı türlerindendir. Yapılan literatür araştırmasında BHPF'nin tatlı su midyeleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasının amacı tatlı su midyeleri *Unio terminalis* zerinde BHPF'nin akut toksik etkilerinin ortaya çıkarılmasını takiben subletal konsantrasyonlarının fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi olarak belirlenmiştir.



## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

### 2.1. Endokrin Bozucular ve Özellikleri

Endokrin bozucu olarak adlandırılan kimyasal bileşikler, hem antropojenik hem de doğal olarak çevrede bulunur. Endokrin sistem üzerindeki etkileri çeşitli araştırmalar sonucunda rapor edilmiştir. EDC'ler, hormonal sistemleri çeşitli yollarla etkileyebilir. Bir endokrin bozucu kimyasal, vücutta emildiğinde üç farklı şekilde etki gösterebilir. Bunların ilki normal hormon seviyesini azaltabilme ya da artırabilme yeteneğidir. İkinci olarak vücutta doğal olarak bulunan hormon yapılarını taklit edebilme yeteneğidir. Son olarak ise hormonların doğal üretimlerini değiştirme yeteneği olarak gözlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Endokrin Bozucu Kimyasalların Hormon Taklidi ve Hormon Bloke Özellikleri (Tutanç, Cansız, Alturfan ve Alturfan, 2021)

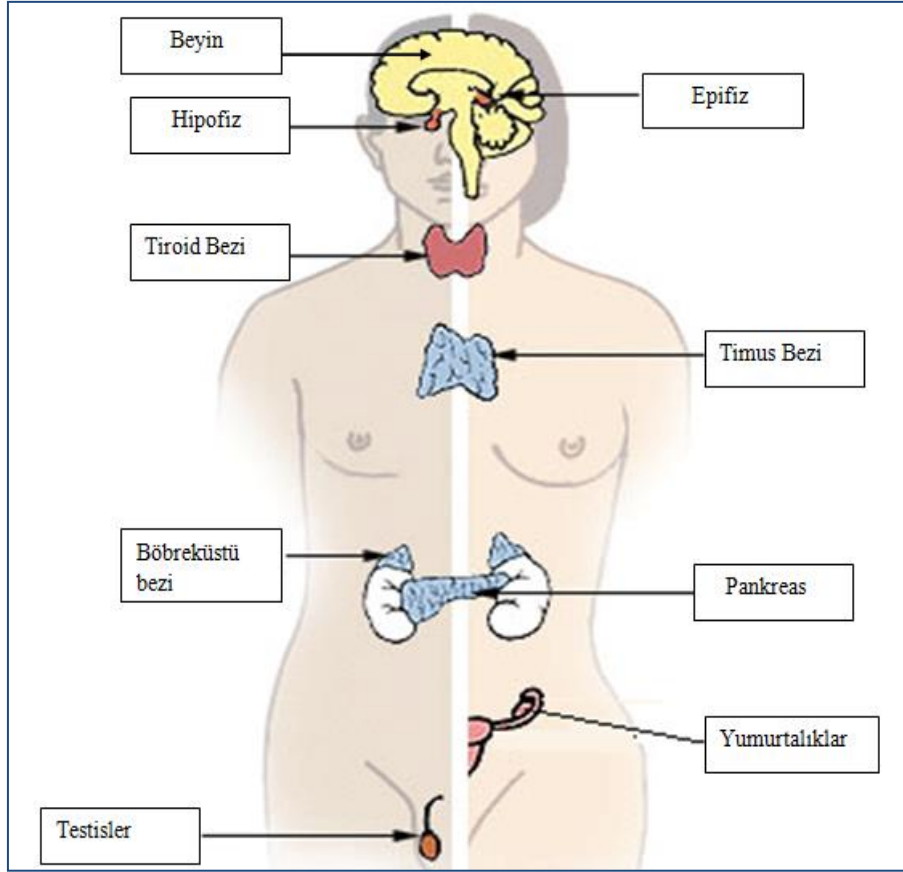
İnsanlar günlük hayatlarında kullandıkları birçok ürünlerden, kozmetiklerden, pestisit uygulamalarından veya tüketilen yiyecek ve içeceklerden endokrin bozucu kimyasallara maruz kalabilirler. Kısaca bu kimyasallara hava, su, deri ve diyet yolları ile temas gerçekleşebilir. Esas maruz kalma ise yutma yolu olarak karşımıza çıkmaktadır (Fendoğlu, Gümüşel ve Erkekoğlu, 2019).

Endokrin bozucular düşük miktarlarda dahi olsa vücudun normal olarak gerçekleşen hormonal işleyişinde değişikliklere sebebiyet verebilmektedir. Bu değişiklikler bile önemli biyolojik ve gelişimsel etkilere sebep olarak hastalıklara yol açabilmektedir. Endokrin

bozucu kimyasalların bazılarının çevrede parçalanma süreleri de oldukça yavaştır. Bu özellikleri sayesinde zaman içinde birikim göstererek potansiyel olarak tehlikeli hale gelirler. Bu tür kimyasallar gelişim, üreme, bağışıklık, beyin fonksiyonları ve diğer sağlık problemleriyle bağlantılı olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.2).

Endokrin bozucu kimyasallar, bazı plastik yapılı şişe ve kaplar, konserve kutular, gıda ürünleri, deterjanlar, böcek ilaçları, oyuncaklar ve kozmetikler dâhil olmak üzere günlük yaşamda kullanılan birçok üründe bulunur. Sık karşılaşılabilen endokrin bozucular:

- Bisfenol A (BPA): Günlük kullanılan birçok plastik ürünün içerisinde bulunan polikarbonat plastikleri ve epoksi reçineleri oluşturmak üzere kullanılan maddelerdir.
- Dioksinler: Herbisit üretiminde ve kâğıt ağartmada yan ürün olarak kullanılırken orman yangınları ve atık yakılmasında ise çevreye salınırlar.
- Fitalatlar: Plastiklerin daha esnek yapıda olması için kullanılır ayrıca tıbbi cihazlarda, gıda ambalajlarında, oyuncaklarda veya kozmetik ürünlerde bulunan maddelerdir.
- Poliklorlubifeniller (PCB): Elektrikli donanımların yapımında, hidrolik sıvılarda ve plastikleştiricilerde kullanılır.
- Fitoöstrojenler: Soya fasulyesinden yararlanılarak elde edilen ürünlerde bulunan daidzein ve genistein gibi doğal hormonların aktivitelerine benzer özelliğe sahip olan ve bitkilerde bulunan maddelerdir (Niehs, 2020).



Şekil 2.2. Endokrin bozucu kimyasalların etkilediği yapı ve organlar (Fendoğlu ve diğerleri, 2019)

Bisfenol A: polyesterler, epoksi reçineler, fenol reçineler ve polikarbonat plastiklerin üretiminde malzeme olarak kullanılan bir endokrin bozucudur. BPA'nın canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri açığa çıkmıştır. BPA, hücre sinyal yollarını etkileyerek üreme sisteminin, bağışıklık sisteminin ve sinir sisteminin gelişimsel bozukluklarına sebep olduğu rapor edilmiştir (Murata ve Kang, 2018).

Çoğu insan BPA'ya hava, toz ve su yolları ile maruz kalmaktadır. Günlük maruziyetin yüksek kısmını ise yiyecek ve içecekler oluşturmaktadır. Bisfenol A, günlük hayatta kullanımı oldukça fazla olan plastik su şişeleri, gıda saklama kapları, biberonlar ve konserve gıdaların kutu kaplamalarından tüketilen gıdalara sızabilir. Termoplastiklerin bir grubu olan polikarbonat kullanılarak yapılan şişelerden BPA'nın sıvıya sızma derecesi, sıvının veya şişenin sıcaklığına bağlıdır. Ayrıca anne sütünde de bulunabilen BPA'ya maruz kalınma olasılığının ne kadar yüksek olduğu gözler önüne serilmektedir. Bu durum BPA hakkında endişenin ne kadar yüksek olduğunu göstermektedir.

"Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC)" tarafından yürütülen 2003-2004 Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi (NHANES III), altı yaş ve üzerindeki insanlardan alınan 2517 idrar örneğinin %93'ünde saptanabilir BPA seviyeleri bulmuştur. Yapılan araştırmalar sonucu ortaya konulan bilgiler ışığında BPA'ya maruz kalma seviyesini en aza indirme isteği oluşmaktadır. Alınabilecek bazı önlemler ise şunlardır:

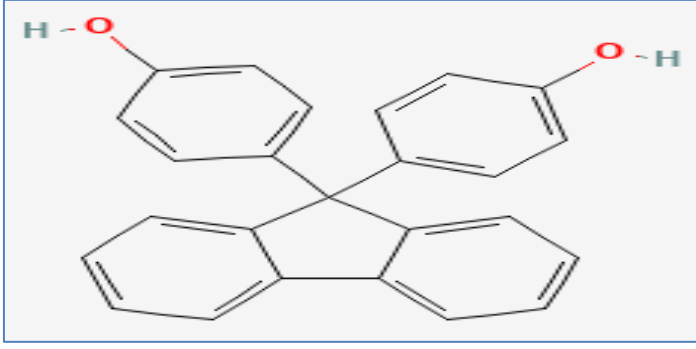
- Polikarbonat plastik gıda kapları mikrodalga içerisine konulmamalıdır.
- Mümkün oldukça sıcaklığı yüksek yiyecekler porselen, cam veya paslanmaz çelik kaplarda saklanmalıdır.
- Konserve gıda kullanımı en aza indirilmelidir.
- İçeriğinde BPA bulunmayan biberon kullanılmalıdır.
- BPA'nın yerine alternatifleri kullanılmalıdır (Niehs, 2020).

## 2.2. Flourene-9-Bisfenol Yapısı ve Özellikleri

Bisfenol A, plastik malzemelerin üretiminde çok sık kullanılan ve östrojenik aktiviteye sahip olan bir endokrin bozucu kimyasaldır. Plastik ambalajlardan yiyeceklere ve içeceklere geçebilen BPA'nın, birçok ülkede kullanımı kısıtlanmış veya yasaklanmıştır. Türkiye'de BPA'nın kullanımını yasaklayan ülkeler arasında bulunmaktadır. Bu nedenle BPA'nın yerine analoglarından olan Flourene-9-Bisfenol (BHPF) geçmektedir (Yang, Guo, Mao, Jia, Zhou, Hu, Sun, Guo, Xiao ve Zhang, 2021).

Flourene-9-Bisfenol (9, 9-bis(4-hidroksifenil)-florene [BHPF]), "BPA içermeyen" plastik malzemelerin üretiminde kullanılmaya başlanan bir Bisfenol A (BPA) ikamesidir. Şekil 2.3'de, BHPF'nin yapısal formülü gösterilmektedir (Wang, Zhuang, Li ve Wei, 2019).

BHPF'nin yapısındaki amid bağlantısı, makromolekül zincirler içeren aromatik yapısı ve hidrojen bağları sayesinde moleküller arası paketlenme sonucunda küçük alanlar kurarak termal ve mekanik dayanma gösterir. Kimyasal yapısının bu özellikleri sonucunda yüksek bozunma sıcaklığı ve organik çözücülerde kısmen çözünme özelliği gösterir (Garcia, J. M., Garcia, F. C., Serna ve Pena, 2010).



Şekil 2.3. BHPF'nin yapısal formülü (PubChem, 2021)

BHPF son yıllarda yapısal bazı yapıştırıcılar, oyuncaklar, polyester polimerlerin sentezi, elektronik ve yalıtım malzemeleri, otomobil ve havacılık gibi birçok sektör olmak üzere çeşitli ürünlerde kullanılmaktadır. Günlük hayatımızda ise biberonlar ve saklama kapları gibi gıda ile teması olabilecek malzemelerde de kullanımı görülmektedir (Şekil 2.4). Yapılan araştırmalar sonucunda BHPF'nin de yaşam için zararlı etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.





Şekil 2.4. BHPF maruziyet kaynakları (Yang ve diğerleri, 2021)

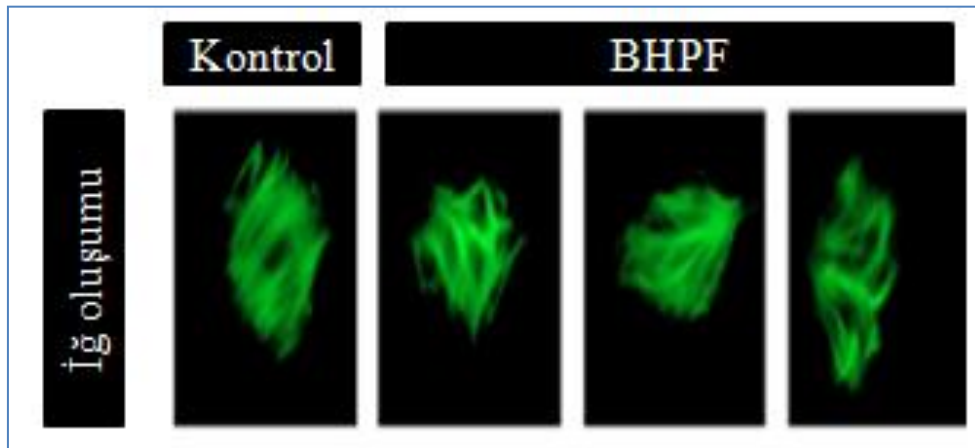
Yakın zamanda yapılan çalışmalar, BHPF'nin bir endokrin bozucu kimyasal olduğunu ve canlılarda BPA maddesinden daha düşük dozlarda bile güçlü anti östrojenik aktivite gösterdiğini ve bu durumla ilgili herhangi bir yan etkinin rapor edilmediğini göstermiştir. Bu durum BHPF'nin ikamesi olduğu BPA'dan daha güçlü toksisite etkileri gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu bilgiler ışığında BHPF'nin alternatif olarak kullanılabilirliğinin uygunluğu değerlendirilmelidir (Yang ve diğerleri, 2021).

### 2.2.1. BHPF'nin eşeyssel organlar üzerindeki etkileri

BPA ve ikamelerinin toksik etkilerinin dışı hayvanlarda daha çok etkili olmasının sebebi, oositin bu bileşiklere karşı hassas olmasıdır. Bu durum doğurganlığın azalmasının sebeplerinden biri olarak karşımıza çıkabilmektedir (Jiao, Ding, Meng, Zhang, Wang, Chen, Duan, Wu, Zhang, Miao ve Huo, 2019). Jiao ve arkadaşlarının (2019) yapmış

olduğu çalışmalarda, domuz oosit olgunlaşması üzerine BHPF'nin toksik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda domuz oositlerinde:

- Erken oosit ölümüne sebep olması,
- ATP seviyesinin azalması,
- Kortikal granüllerin (CG'ler) dağılımındaki bozulma ile dişi germ hücresinin niteliğinin düşmesi,
- Kümüls hücrelerindeki genişlemenin durdurulması,
- ROS (Reaktif Oksijen Türleri) seviyesinin artış göstermesiyle oksidatif stres düzeyinin yükselmesi,
- Polar gövde ekstrüzyonunda (PBE) azalma olması ve
- Anormal yapıda iğ ipliklerinin oluşması (Şekil 2.5) gibi toksik etkilerinin olduğu saptanmıştır.

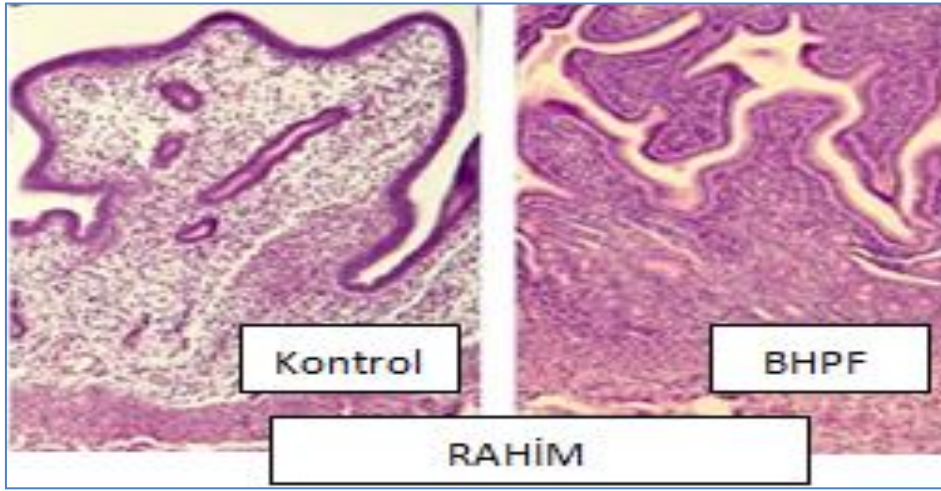


Şekil 2.5. BHPF, domuz oositlerinde anormal iğ oluşumuna neden olur (Jiao ve diğerleri, 2019).

Son yıllarda, BHPF içerikli malzemeler günlük hayatta oldukça sık kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda cinsiyet hormonlarında değişiklik, semen kalitesinde düşüklük, obezite ve erken ergenlik gibi endokrin ile ilgili hastalıklarla bu tür çevresel kirlenici bileşiklere maruziyetin ilişkilendirildiği rapor edilmiştir.

Çevresel kirleneticiler, anti-östrojenik etkileri ile oldukça gündemdedir. Östrojenler, kadın üreme organlarının gelişiminde ve hamileliğin devamlılığında kritik bir rol oynadığından, bu tür anti-östrojenik etkiler fizyolojik olarak önemli olabilir (Zhang ve diğerleri, 2017).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda BHPF'nin anti-östrojenik özellikleri ile üreme sistemi üzerindeki toksik etkilerini belirlemek için deneyde kullanılan farelere dozlamalar yapılmıştır. Gerçekleştirilen histopatolojik incelemelerde farelerin uterusunda ciddi derecede atrofik endometria (rahim iç zarı incilmesi) gerçekleşmiştir (Şekil 2.6). BHPF'ye maruz kalan farelerde kolumnar epitel hücrelerinin ve endometriyal stromal hücrelerinin köreldiği görülmüştür. Ayrıca BHPF'nin corpus lutea sayısında azalmaya sebep olduğu ve foliküler gelişimi geciktirdiği de rapor edilmiştir.



Şekil 2.6. Farelerin rahim iç zarının incilmesi (Zhang ve diğerleri, 2017).

BHPF'ye maruziyet sonucunda fare üreme hücrelerinde doku kaybının ve sitoplazmik büzülmenin olduğu gözlenmiştir. Fare üreme hücrelerinde iç ipliklerini düzenleyen p-MAPK proteini de önemli ölçüde azalmıştır. Bu azalma sonucunda fare üreme hücrelerinde, iç ipliklerinin yapısında ve kromozomların düzgün sıralanmasında anormallik olduğu gözlenmiştir. Yapılan bu araştırmalar dâhilinde BHPF maruziyetinin fare üreme hücrelerinin olgunlaşmasını ve kalitesinin bozulabileceği bildirilmiştir.

Gerçekleştirilen araştırmalara göre BHPF'nin fareler üzerinde:

- Rahim ağırlığının düşmesine,
- Yavruların ağırlık düzeylerinin azalmasına,
- Fare hamileliklerinin kötü bitmesine (Şekil 2.7),
- Hamilelikle ilgili olan kilo artışının azalmasına ve
- Erkeklerde de meni kalitesinin azalmasına neden olduğuna değinilmiştir.



Şekil 2.7. BHPF grubundan bir farenin uterusunda ölü bir fetüs (Zhang ve diğerleri, 2017).

### 2.2.2. BHPF'nin sinir sistemi üzerindeki etkileri

Çevresel kirleticileri, bazı canlıların çevredeki davranışları ve sinir sistemi üzerindeki yan etkileri gözlenmiştir. Yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda BPA'ya maruz kalmanın canlılar üzerinde anksiyete ve depresyon gibi sinirsel davranışlarda önemli değişikliklere sebep olabileceği rapor edilmiştir (Xu, Dong, Yang, Wang, Y., Wang, R. ve S, 2015).

BPA'ya maruz kalmanın sinirsel davranışlar üzerindeki etkiler cinsiyete, maruz kalınan zamana ve canlının gelişim aşamasına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Yetişkinlik döneminde BPA'ya maruz bırakılan erkek yetişkin farelerde kaygı ve depresyon benzeri davranışların arttığı gözlenmiştir. BPA'ya gebelik ve emzirme döneminde maruz kalınması, yetişkinlik dönemindeki farelerde anksiyete ve depresyon benzeri davranışları arttırmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda zebra balıklarında biriken BHPF ise uykusuzluk gibi çeşitli değişik davranışlara sebebiyet vermiştir. Bu bulgular, BHPF'nin de BPA'ya benzer şekilde bireyleri etkileyebileceğine dair kanıt sağlamıştır (Ji, Shi, Yin, Huai, Li, Ren, Fu, Du, Gao, Soong ve Shi, 2019).

Jin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda değişik dozlarda BHPF'ye maruz kalan zebra balığı üzerindeki nörotoksisite etkileri bildirilmiştir. Öncelikle BHPF maruziyeti sonucunda, tiroit salgı bezinin salgıladığı T3 ve T4 hormon düzeylerinin artış gösterdiği bildirilmiştir. Daha sonra BHPF'nin düzeyi artış gösterdikçe larvada, merkezi sinir sisteminde majör bazik proteini artış gösterirken gen ifadesinin ise azalma gösterdiği rapor edilmiştir. Zebra balığının embriyonik dönemin gelişimindeki gen ekspresyonunu araştırmak amacıyla GFP (Yeşil Floresan Protein) parametresi incelenir. Omurilik ve

beyinde, GFP ekspresyonu azalma göstermiştir. Bu sonuçlar BHPF'nin, HPT ekseninin işleyişini etkilemesiyle gen ekspresyonunu ve TH seviyeleri üzerinde nörotoksik özellikler gösterdiği rapor edilmiştir (Jin ve diğerleri, 2021). Ji ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırmada da BHPF'nin sinirsel davranışlar üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu araştırmada normal davranış gösteren fareler kullanılmıştır. Farelerin farklı cinsiyetlerde ve gelişim evrelerinde olması araştırmanın önemli parametreleridir. BHPF'ye maruziyeti farelerin sinirsel davranışları üzerindeki etkileriyle ilgili elde edilen sonuçlar şunlardır:

- BHPF'ye maruz bırakılan yetişkin erkek farelerde depresyon benzeri davranışsal durum incelenmiştir.
- Gebelik esnasında BHPF'ye maruz kalan dişi farelerde ise anksiyete ve depresyon benzeri bir kaygı durumu rapor edilmemiştir (Jin ve diğerleri, 2019).

### **2.2.3. BHPF'nin canlı davranışları üzerindeki etkileri**

Nöroendokrin sistem üzerinde etkisi olabilen BHPF'ye maruz bırakılan larvalarda davranışsal araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Düşük dozlarda uygulanan BHPF'nin zebra balığı larvasında önemli bir değişikliğe sebebiyet vermediği incelenmiştir. Doz oranı yüksek olan BHPF ise, zebra balığı larvalarının hareketlerinde belirgin şekilde bir azalma göstermiştir. Ayrıca uygulanan düşük ve yüksek doz oranlarında ortalama hareket hızı da önemli ölçüde azalma göstermiştir (Mi, Zhang, Zhang, Wang, Zhang, Fang, Gao, Feng, Chen ve Feng, 2019).

Mi ve arkadaşlarının zebra balıklarının üzerinde yaptığı çalışmalar sonucunda BHPF'ye maruz kalan yetişkin zebra balığının üreme ve kur yapma davranışı üzerindeki etkileri rapor edilmiştir. Bu etkiler şöyle sıralanabilir:

- BHPF maruziyetinin kadın ve erkeklerin kur yapma tercihini etkilediğini ve üreme üzerinde zararlı etkilere neden olduğunu belirtilmiştir.
- Erkek ve kadın cinsiyetleri arasında olan kur davranışları azalma göstermiştir.
- BHPF'nin maruziyeti sonucunda dişi balıkların erkek balıklara yönelimi azalma göstermiştir.

- Ayrıca BHPF maruziyeti, oksidatif stresle ilgili genler olan östrojen reseptörü, steroidogenez (steroid yapılı hormon sentezi) ve yukarı regüle (reseptör yoğunluğunda artış) ile ilişkili genlerin ekspresyonunu da azaltmıştır.
- BHPF anksiyete ve depresyon benzeri davranışa neden olmuştur (Mi ve diğerleri, 2019).

#### 2.2.4. BHPF'nin vücut organları üzerindeki etkileri

İnsanların günlük faaliyetlerinin sonucunda EDC'ler çevreye bırakılmaktadır. EDC'ler, endojen hormonları taklit edebilen ve vücut hormonlarının metabolizma sürecini bloke edebilen kimyasallardır. Ayrıca vücut organlarının yapısını ve işleyişini de etkilemektedir (Niehs, 2020).

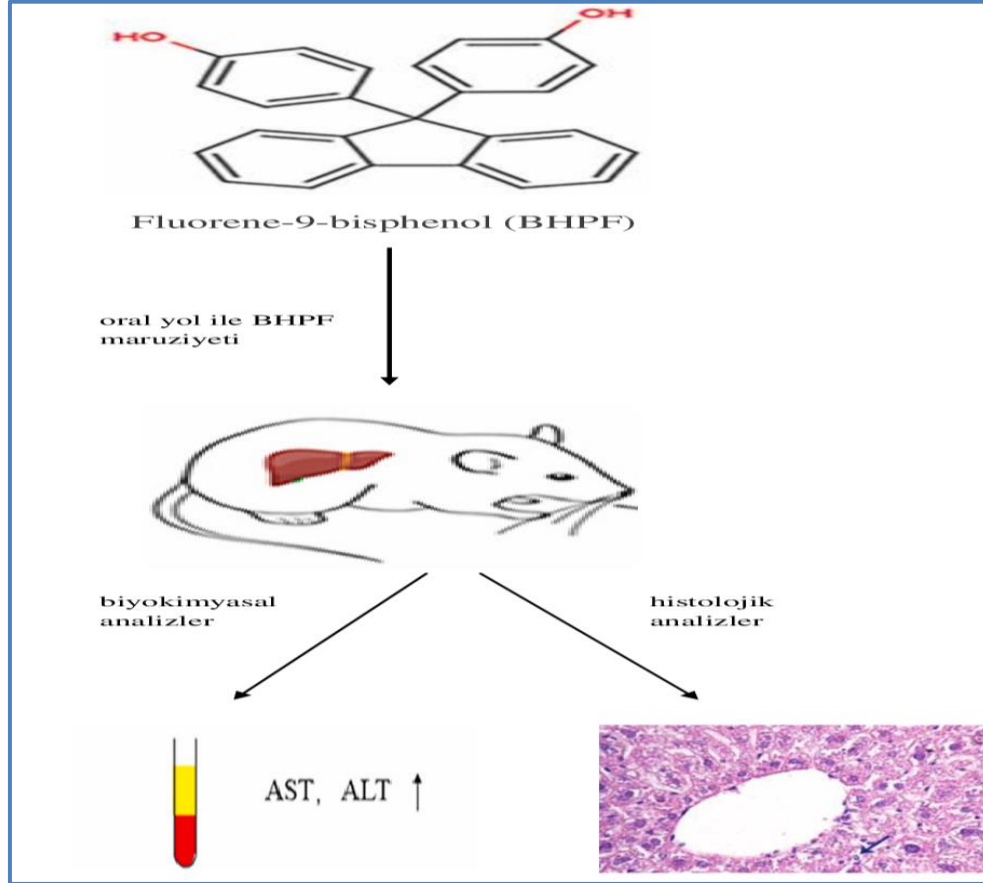
Flourene-9-Bisfenol, üreme organları haricinde vücutta önemli diğer organları da etkilemektedir. Karaciğer, zararlı olan toksik maddelerin temizlenmesini sağlayan bir organ olup birden fazla eksojen kirleticinin biyotransformasyonundan ve depo edilmesinden sorumlu organdır. Ağız yolu ile maruz kalınan kirleticiler bağırsak ve mideden emilerek karaciğere taşınır (Trefts, Gannon ve Wasserman, 2017).

Yang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada fareler ağız yolu ile 10 gün boyunca BHPF'ye maruz kalmıştır. Süre bitiminde farelerin anatomisinde farklı bir ağırlık olmamasına rağmen karaciğer organında önemli değerde değişiklik gözlenmiştir. Bunun sonucunda BHPF'nin karaciğer organını hedef olarak seçebileceğini gösterir. ALT (alanin amino transferaz) ve AST (Aspartat amino transferaz) enzimlerin miktarları, karaciğer işlevlerinin ölçülmesinde ve karaciğerde oluşabilecek hasarın araştırılmasında en çok kullanılan parametrelerdir. Karaciğerde belirgin bir hastalık ya da zararın belirlenmesinde kandaki bu enzimlerin değerleri önemlidir. Serum biyokimyasal tahlilleri için yapılmış olan testte kayıp olmamıştır. BHPF'ye maruz kalan bütün farelerde ise serum ALT ve AST değerlerinin artış gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca doz oranının devamlı artmasıyla BHPF'ye maruz kalan farelerin karaciğer organlarında:

- Merkezi damar yapının genişleme göstermesi,
- Akyuvar hücreleri infiltrasyonu,

- Sitoplazmik vakuolasyon ve
- Sinüzoid yapısının daralması gibi anormallikler rapor edilmiştir (Şekil 2.8).

Sonuçlar, BHPF'nin fareler üzerinde karaciğer hasarına sebep olabileceğini göstermiştir (Yang ve diğerleri, 2021).



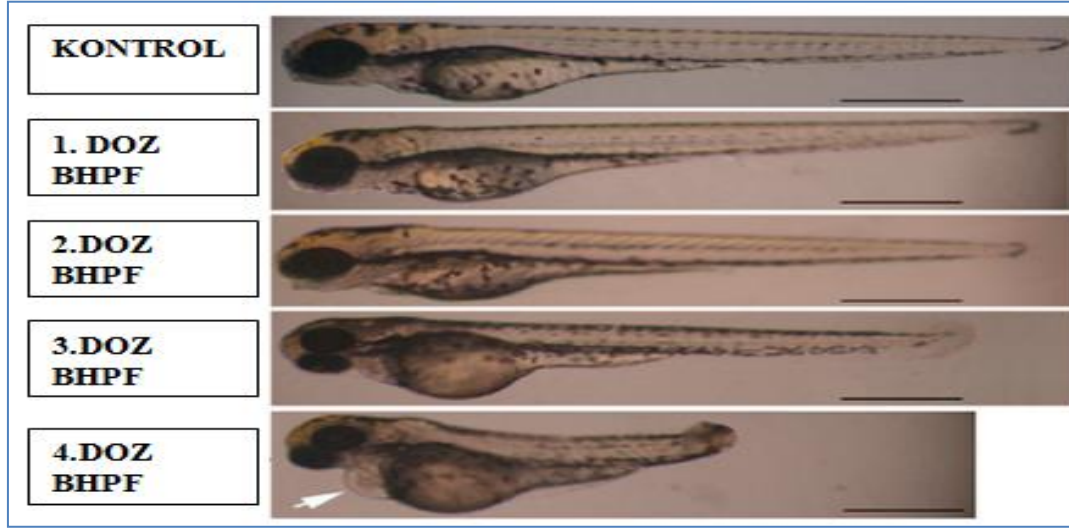
Şekil 2.8. BHPF'nin karaciğer organı üzerindeki etkileri (Yang ve diğerleri, 2021).

Mi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda BHPF maruziyetinin, zebra balığı larva ve embriolarındaki akut toksisite araştırma konusu olmuştur. Yapılan araştırmalar sonucunda BHPF'nin zebra balığı larva ve embriolarındaki kardiyotoksisite, ölüm oranı ve metabolik bozukluklar üzerindeki etkileri bildirilmiştir.

BHPF'nin, zebra balığının embriyonik gelişiminde toksik etki oluşturduğu rapor edilmiştir. BHPF konsantrasyon oranlarına göre embriolarda hatalı biçimlenme sonucunda anormal bir fenotip ve embriolarının gelişiminde gecikme ortaya çıkmıştır (Sun ve diğerleri, 2020). Zebra balığı embriyosunda dış görünüş kusurları incelendiğinde yolk kesesi



malformasyonu, küçük gözler, azalmış vücut uzunluğu, kalp zarında ödem, kuyruk yapısının bozulması, yüzme kesesinin gelişmemesi, baş ve göz kısmında küçülme ve çift kafa rapor edilmiştir (Şekil 2.9) (Mi ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.9. Zebra balığının BHPF maruziyeti sonucu anormal embriyosu (Mi ve diğerleri, 2020).

BHPF'ye maruz bırakılan embriyolarda gastrulasyon esnasındaki hücre hareket ve kuyruk göz gibi gelişimsel düzeylerde gecikme olurken ölü embriyolarda da önemli artış gözlenmiştir. BHPF'ye maruziyetin sonucunda hücre ölümlerinin de olduğu bildirilmiştir. Zebra balıklarında hücre ölümü beyin, kalbi saran zar ve kuyruk ucunda gerçekleşmiştir. BHPF dozunun artması sonucunda hücre ölümü de belirgin bir artış göstermiştir (Bruce, 2015).

Zebra balığı, metabolik bozukluklarının araştırabilmesi için önemli özelliklere sahiptir. Zebra balığının karaciğer yapısında, yağ birikmesinin arttığı gözlenmiştir. BHPF'ye maruziyet sonucunda vücuttaki yağ dengesi bozulma göstermiştir. Beslenmeye bağlı olan nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının (NAFLD) seyri de olumsuz yönde ilerlemiştir (Zhang ve diğerleri, 2022).

BHPF'ye maruziyet sonucunun etkileri zebra balığı larva ve embriyolarındaki kardiyak gelişimini geciktirerek normal olmayan kardiyak morfoloji ile sonuçlanmıştır. Sonuçlar ise şu şekildedir:



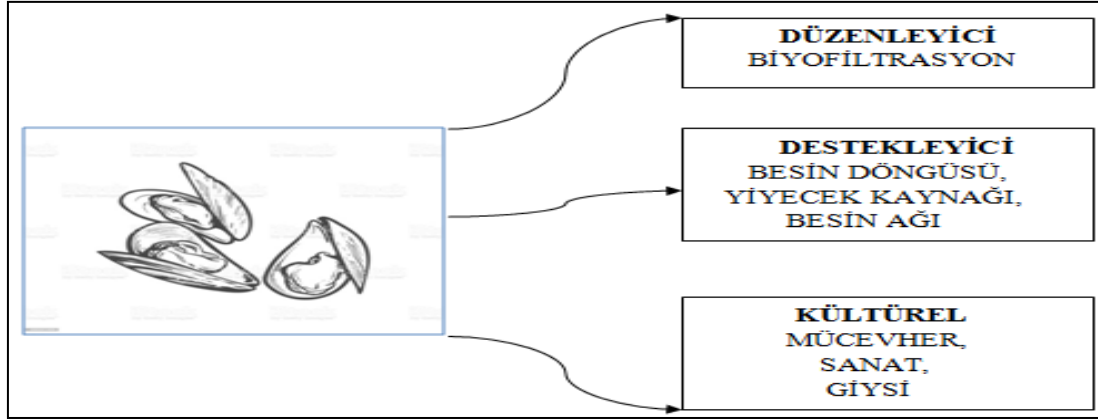
- Kalbi saran zar genişliğinin analizi sonucunda kalbi saran zar alanının arttığı,
- Kalbi saran zar ile ödem oran düzeyinin artış göstermesi,
- Larva kalbinin morfolojik olarak anormal yapıya sahip olması,
- Sinus venosus- bulbus arteriosus (SV-BA) mesafesinin artışı,
- Kalp karıncığı ve kulakçığının doğrusal yapısının bozulduğu,
- BHPF'ye maruziyet süresinin fazlalaşmasıyla kalp ritminin bozulması ve
- Kalbin ise hatalı bir şekilde biçimlendiği rapor edilmiştir (Bruce, 2015).

### 2.3. *Unio terminalis* Midye Türünün Ekolojisi ve Özellikleri

Bivalvia grubu canlıları, sucul ekosistemlerde bentik olarak varlığını sürdüren türlerdir. Birçok canlı türünün (balıklar, su kuşları vb.) besin kaynağı olduğu için besin zincirinde önemli yere sahiptirler. İnsanlar tarafından da tüketimi gerçekleştirilirken bazı türleri süs endüstrisinde de kullanılmaktadır. Ayrıca bazı hayvanların yetiştiriciliğinde (balık, tavuk vb.) yem ürünü olarak kullanılmaktadır. Biyolojik olarak çevresel değişikliklere oldukça duyarlı yapıya sahip oldukları için biyoindikatör organizmalardır (Öktener, 2004).

Midyelerin ömür sürelerinin uzun olması, kozmopolit özelliği, hareket düzeyinin sınırlı olması ve dipten beslenmesi sucul ortamlarda kimyasal kirletici maddelerin etkilerinin araştırılmasında kullanılan biyogöstergelerdir (Uçkun, 2021). Midyelerin katkıda bulunduğu ekosistem hizmetleri şöyledir:

- Çevre kirliliğinin kontrol tekniği olan biyofiltrasyon ile düzenleyici hizmetler,
- Besin geri dönüşümü, yiyecek kaynağı ve gıda ağı modifikasyonu gibi destekleyici hizmetler,
- Mücevher ve sanat dâhil olmak üzere kültürel hizmetler karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Midyelerin Ekosistem Hizmetleri (Vaughn, 2016)

Tatlı su midyeleri (*Bivalvia: Unionidae*), Kuzey Yarımküre ve Afrika'da yaklaşık 700 türün bulunduğu bir familyadır. Ne yazık ki bu tür popülasyonlar, zaman içerisinde önemli ölçüde azalma göstererek nesli tükenmektedir (Lopes-Lima, Gürlek, Kebapçı, Şereflişan, Yanık ve Froufe, 2020).

Çevre kirliliği, canlıların doğal yaşam alanlarının bozulmasına yol açar. Bu durum canlıların hayati aktivitelerini olumsuz yönde etkiler. Havada, toprakta ve suda oluşan bu kirlilik ekolojik dengeyi bozmaktadır (Kocataş, 2014).

Çevresel kirliliğe sebep olan bütün kimyasal maddeler, bulunduğu ortamda kalmayarak biyosfere yayılır ve canlı organizmaların yapısında birikme gösterirler. Tatlı su midyeleri, çevresel değişimin araştırılmasında önemli yer tutmaktadır. Biyoindikatör canlı olarak kullanılan midyeler, toksinleri vücudunda biriktirme özelliğine sahip olduklarından geçmişte ve gelecekteki oluşabilecek değişimleri izleme potansiyeline sahiptir. Bir canlının biyoindikatör olabilmesi için gerekli olan özellikleri şu şekilde sıralayabiliriz:

- Taksonomik sınıflandırılması kolay yapılabilmesi,
- Besin zincirinin birçok halkasında bulunabilmesi,
- Örnekler uygun büyüklükte olmalı ve kolay bir şekilde toplanabilmesi,
- Dünya genelinde yaygın olarak bulunarak farklı ekosistemler arası karşılaştırma yapılabilmesine olanak verebilmesi,
- Laboratuvar çalışmalarına dayanıklı olabilmesi,

- Uzun ömürlü olabilmeli ve biyolojisi iyi bilinmeli gibi birçok özellikler karşımıza çıkmaktadır (Taylan ve Özkoç, 2007).

Midyeler, suyu süzerek beslenirler böylelikle bulundukları ortamdaki suyun doğal yollarla arıtılmasını sağlarlar. Bu sayede ekolojik denge üzerinde belirleyici rol oynarlar. Midyeler, partiküllü besinleri vücudunun bazı kısımlarında (yumuşak doku, kabuk vb.) biriktirirler. Çevrede yaygın olarak bulunurlar ve uzun ömürlüdürler. Ayrıca yapılan araştırmalarda zaman içinde tekrarlanması gereken örnekleme fırsat verirler. Kabuklarının yapısal özelliği, geçmiş fiziksel ve kimyasal koşulları ortaya çıkarabilir şekilde tasarlanmıştır. Midyenin yumuşak dokusu ise daha kısa zaman ölçeklerinde çevresel koşulları değerlendirmek için kullanılabilir. Midye hemolemi, dokularda birikebilen kimyasal maddelerin etkilerinin araştırılmasında kullanılabilir (Vaughn, 2016).

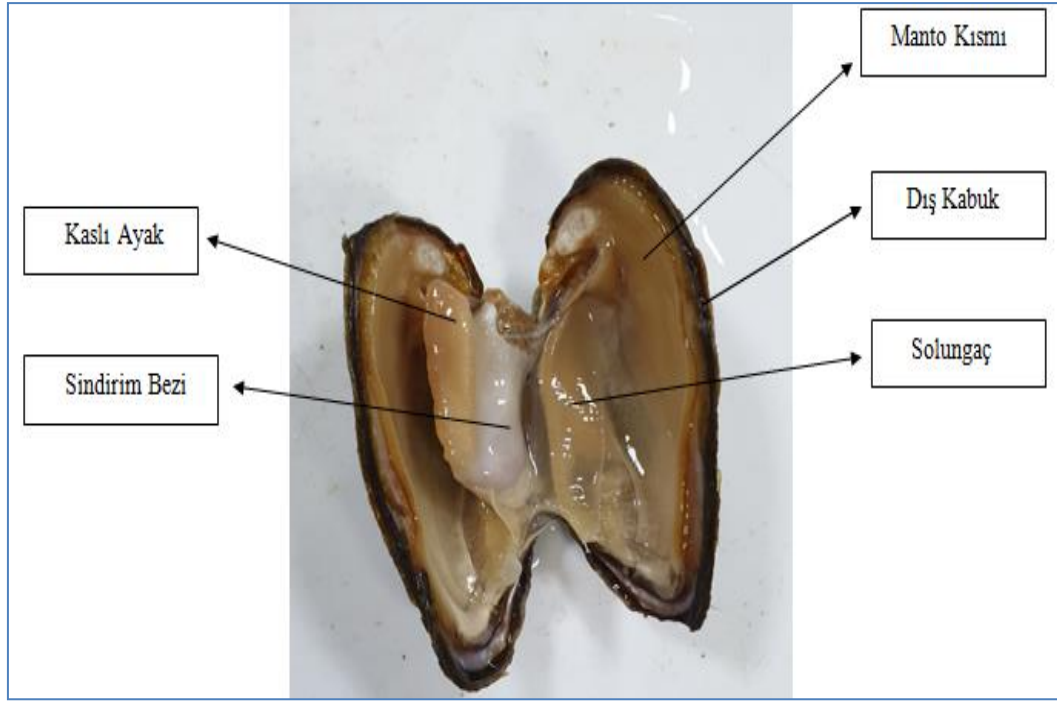
*Unio terminalis* türü genellikle koyu kahverengi veya sarı renkli bir periostrakuma (kabuk dış kısmı) sahiptir. Küçük türler genellikle daha açık renkli olarak karşımıza çıkmaktadır. Kabuk morfolojisine baktığımızda oval bir şekle sahip ve boyutları diğer türlere göre daha uzun yapıya sahiptir. Üzerinde yaş halkaları bulunmaktadır. İç kabuk sedefli, yanardöner beyaz olup ön tarafta daha belirgin olan zayıf bir soluk çizgi vardır (Gürlek, Kara ve Kebapçı, 2014) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Midye kabuğunun dış (A) ve iç (B) görüntüsü

Vücutları 3 ana kısma ayrılmaktadır. Bunlar:

1. Genellikle hareket için kullanılan kaslı ayak,
2. İç organları (sindirim bezi, solungaç) içine alan visseral kitle,
3. Visseral kitleyi örten manto kısmıdır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Midyelerin vücut kısımları

Manto kısmının alt kısmında bulunan beyaz renkten sarı renge kadar olan yumuşak kısımlar visseral kitle olarak adlandırılır. Visseral kitlenin rengi, cinsiyete ve mevsime bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bivalvia üyeleri hem beslenmede hem de gaz alışverişinde kullanılan solungaçları içermektedir (Araujo, Gomez ve Machordom, 2004).

Bivalvia üyeleri dünyada çok geniş alanlara dağılım gösterebilirler. Bugüne kadar bölgesel yürütülen çalışmalara dayanarak tatlı su midye çeşitliliği 840 tür olarak rapor edilmiştir. Tatlı su midyeleri arasında en geniş familya 674 türe sahip olan Unionidae'dir. Bivalvia üyelerinin tür çeşitliliğinin akarsular, göller ve derelerde en yüksek seviyelerde olduğu gözlenmiştir (Graf ve Cummings, 2007).



### 3. MATERİYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Tatlı su midyelerinin laboratuvar ortamına getirilme koşulları

Tez çalışmasında kullanılan model organizma olan tatlı su midyelerinin türü, elde edilme şekli, tarihi ve saklama koşulları aşağıda verilmiştir.

- Midye türü: *Unio terminalis*
- Elde etme tarihi: Ekim 2020
- Elde etme koşulları: Av sezonunda balıkçılardan temin edilmiştir.
- Elde edinilen bölge: Hatay-İskenderun
- Laboratuvara getirme koşulları: Işık almayan kutular içerisinde su dolu poşetler içine konularak getirilmiştir.
- Kullanılan midyelerin ortalama ağırlık ve ölçüleri: Deneyde ortalama 35, 15±5, 53 g ağırlık, 5, 008±0, 48mm uzunluk, 2, 26±0, 38mm yükseklik ve 1, 3±0, 15 mm genişlik ölçümlerine sahip *Unio terminalis* türü tatlı su midyeleri kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Tatlı su midyelerine uygulanan deney ortamı

Temin edilen tatlı su midyeleri serin ve nemli koşullar altında laboratuvara getirilmiştir. Midyeler, deneye başlamadan önce 1 ay boyunca içerisine dinlendirilerek kloru giderilmiş çeşme suyu bulunan ve güneş gören akvaryumlarda adaptasyon süreci geçirmişlerdir (Resim 3.1). Günlük olarak fitoplanktonlar ile beslenmeleri yapılmıştır (Resim 3.2).



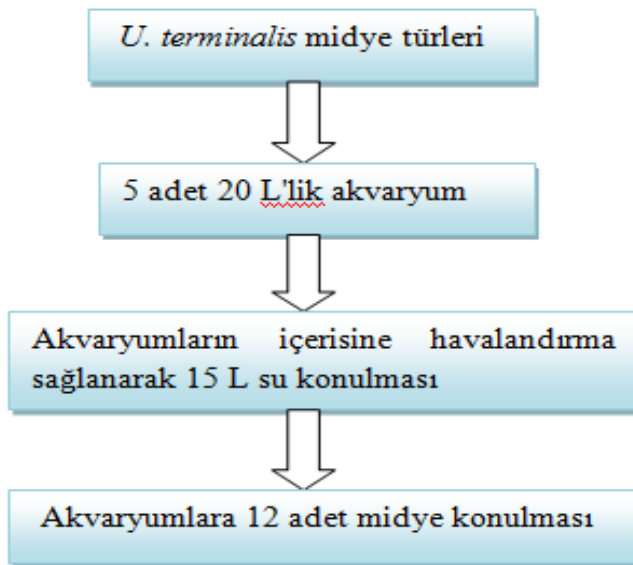
Resim 3.1. Uygulanan biyodeney düzeneği



Resim 3.2. Uygulanan beslenme yöntemi

Akvaryumlar, hava motorları ile devamlı havalandırılarak su sıcaklığı sabitleştirilmiştir. Akvaryum suyunda pH, iletkenlik, su kalitesi, suda çözünmüş oksijen, sertlik ve sıcaklık gibi etkenler adaptasyon sürecinde iki günde bir ölçülmüştür.

- Deney sürecinde adaptasyon için uygulanan aşamalar aşağıda verilmiştir:



Şekil 3.1. Adaptasyon için uygulanan aşamalar

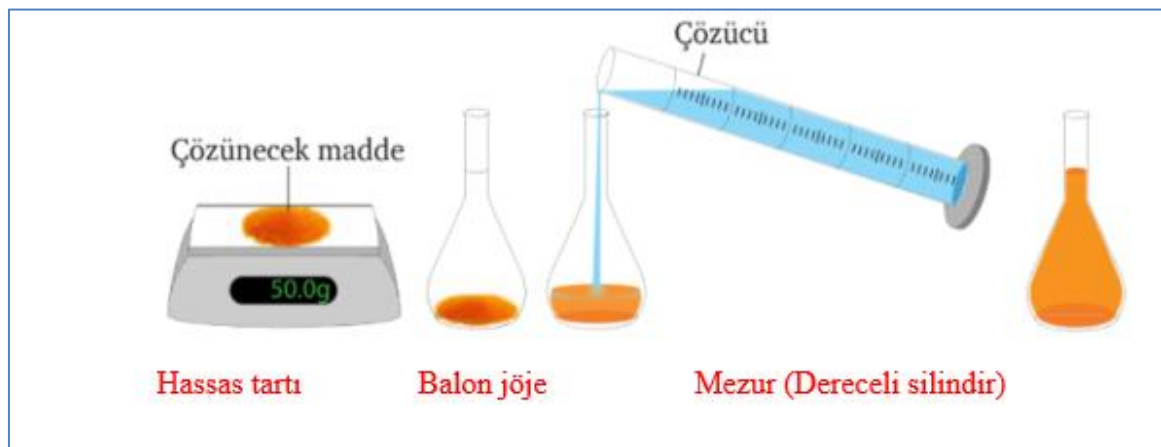
### 3.1.3. BHPF çözeltisinin hazırlanma aşamaları

Deney için stok çözeltinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal bileşiğin ve BHPF çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmış olan çözücünün isimleri, deney esnasında kullanılan malzemeler ve bu malzemeleri saklama koşulları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. BHPF çözeltisinin hazırlanması süreci ve kullanılan malzemeler

| DENEY SÜRECİ                                            | KULLANILAN MALZEMELER                                                 |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Stok çözeltinin hazırlanması için kullanılan madde ismi | Toz haldeki BHPF maddesi                                              |
| BHPF çözeltisini hazırlamak için kullanılan çözücü      | Dimetilsülfoksit (DMSO) (Polar bir çözücüdür)                         |
| BHPF çözeltisinin saklama koşulları                     | Volumetrik cam balon jode hava almayacak şekilde +4 derecede muhafaza |
| Dozlama yapılırken kullanılan aletler                   | Otomatik pipet ve mikro şırınga                                       |

Stok çözeltisi hazırlanırken, öncelikle toz halde bulunan BHPF tartılmıştır. Ardından volumetrik cam balon jode belirlenen hacimce DMSO ile tamamlanarak elde edilmiştir (Resim 3.3). Diğer uygulanacak dozlar ise stok çözeltiden alınan belirli hacimlerin cam kaplarda DMSO ile sulandırılarak elde edilmiştir. Hazırlanan bu çözeltiler kullanılabilece kadar +4°C’de saklanmıştır. Dozlama öncesinde oda sıcaklığına getirilen çözeltiler deney akvaryumlarına uygulanmıştır (dozlama aşaması). Akvaryumlara BHPF maddesinden elde edilen çözeltiler dozlanırken otomatik pipet ve mikro şırıngadan yararlanılmıştır.



Resim 3.3. BHPF çözeltisinin hazırlanması



### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Deneyin yöntemi ve dozlama

Biyodeneyle, ZSF yöntemi TSE, ISO, APHA, OECD ve FAO'nun yöntemlerine göre yapılmıştır (Anonymous, 1975). Yapılan deneyler ön ve ana deneyler olarak iki aşamalı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Ön Deneyler: 24 saat süren bu deneylerde 1, 1/10, 1/100, 1/1000 gibi geniş konsantrasyon değerleri kullanılarak ana deney için konsantrasyon saptamaları gerçekleştirilmiştir. Ölüm oranının en yüksek olduğu ve hiç ölüm görülmeyen konsantrasyon aralığı tespit edilmiştir.

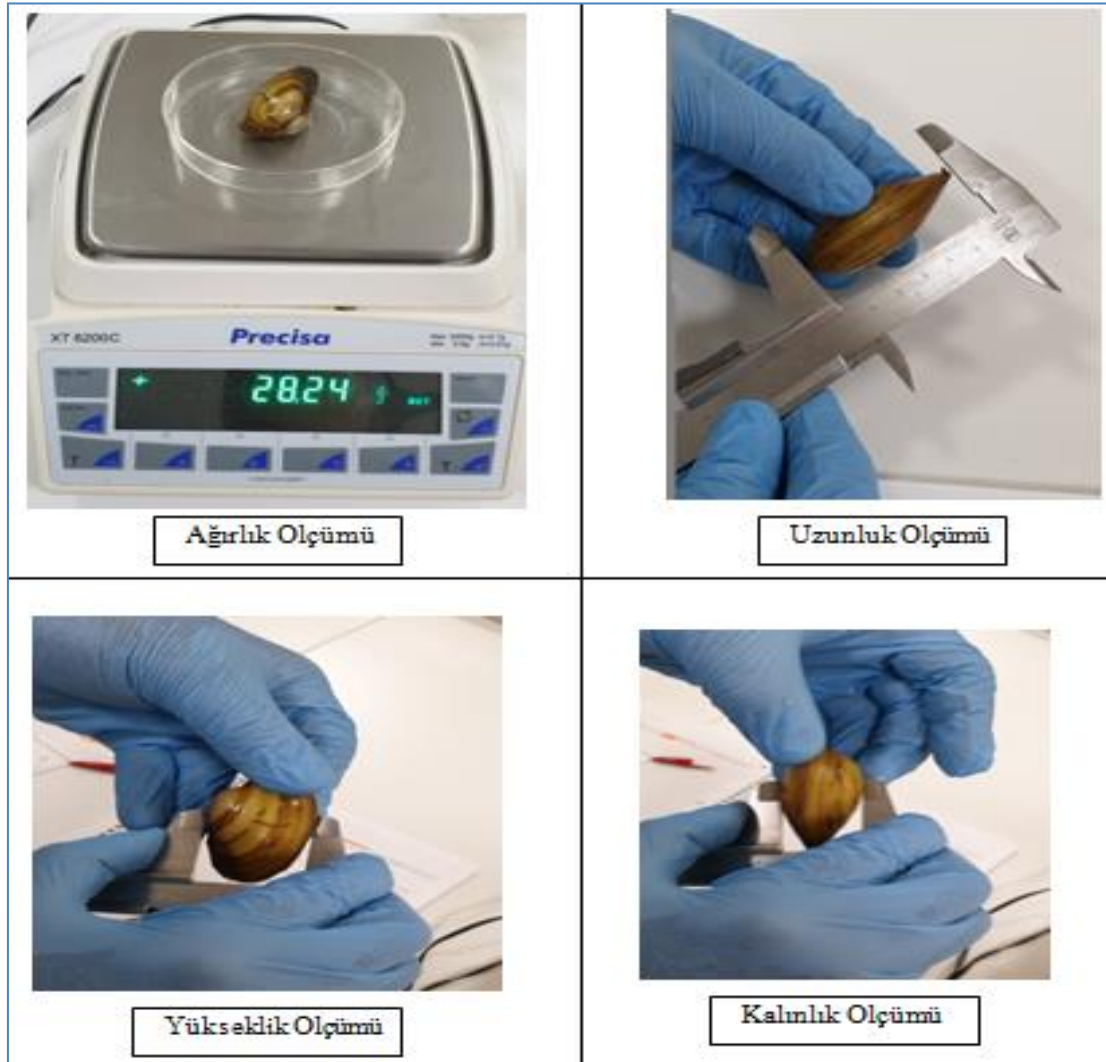
Ana Deneyler: 96 saat süren bu deneyde, elde edilen konsantrasyon aralıkları doğrultusunda geometrik seri hesaplanmıştır. Deney yapım aşamasında çözücü olarak kullanılan DMSO'nun bulunduğu ve kimyasal madde içermeyen iki farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Deney esnasında %95'lik güven sınırının ayarlanmasında her konsantrasyon yenilenerek yapılmış ve akvaryumlara 12 adet tatlı su midyesi konulmuştur. BHPF'nin akvaryumlara konulması sırasında havalandırma durdurulmuş, çözelti akvaryumlara otomatik pipetler yardımıyla aktarılmış ve cam bagetlerle karıştırılarak suda dağıtılmıştır.

#### 3.2.2. Deney esnasında yapılan uygulamalar

Tatlı su midyeleri, 2 ve 7 gün süre ile 8.5 µg/L, 85 µg/L, 170 µg/L konsantrasyonlarındaki subletal Flourene-9-Bisfenol'a maruz bırakılmışlardır. İlk önce laboratuvar eleği ile midyeler akvaryum ortamından uzaklaştırılarak canlılık tayini gerçekleştirilmiştir (Resim 3.4). Midyelerin kabuklarına dokunulduğunda açılma gözlenirse ölü olarak kabul edilmektedir. Eğer açılma gözlenmez ise midyelerin canlı oldukları tespit edilerek sıradaki işlemler uygulanır. Canlı olan midyeler için yapılacak ilk işlem, midyelerin ağırlıklarının hassas terazi ile ölçülmesi ve daha sonra ise kumpas aleti ile midyelerin uzunluk, yükseklik ve kalınlık parametrelerinin ölçülmesidir (Resim 3.5).



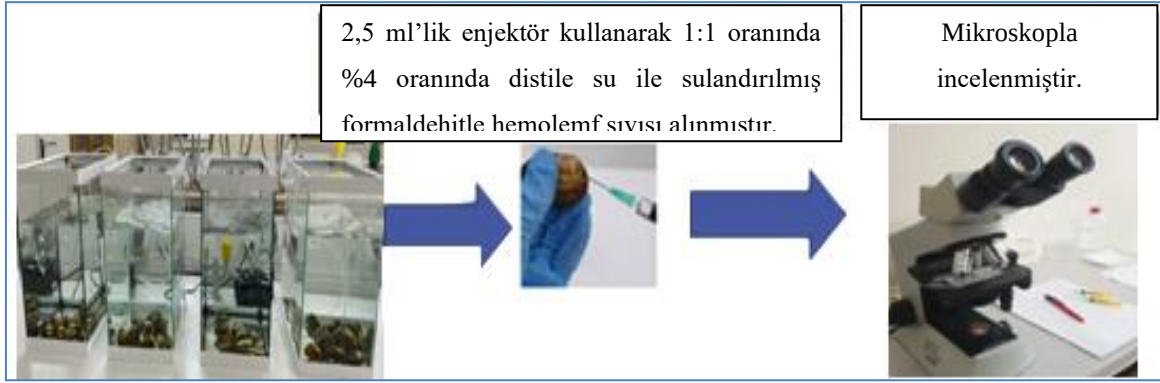
Resim 3.4. Midyelerin canlılık tespiti ve ölü örnekler



Resim 3.5. *U. terminalis*'in ağırlık (g), uzunluk (mm), yükseklik (mm) ve kalınlık (mm) ölçüm aşamaları

### 3.2.3. Hemolemf alınma işlemi ve hemosit değerlerinin ölçülmesi

Midye kabuklarının büyürken ilk oluşan umbo kısmındaki adductor kasından 2,5 ml'lik enjektör kullanarak 1:1 oranında %4 oranında distile su ile sulandırılmış formaldehitte hemolemf sıvısı alınıp iyice karıştırılması sağlanmıştır. Bu durum hem hemositlerin parçalanmasını hem de hücre sayımını engelleyebilecek olan pıhtılaşmayı önlemiştir. Hemolemf sıvıları mikroskopta incelenmiş ve hemosit sayımı gerçekleştirilmiştir. Hemolemfte THS/ml hemosit sayımı için hemositometrede tüm hücreler sayılmış ve (Dinçel ve diğerleri, 2013) metodunun modifikasyonu ile hesaplanmıştır. Şekil 3.2'de aşamalar belirtilmiştir.

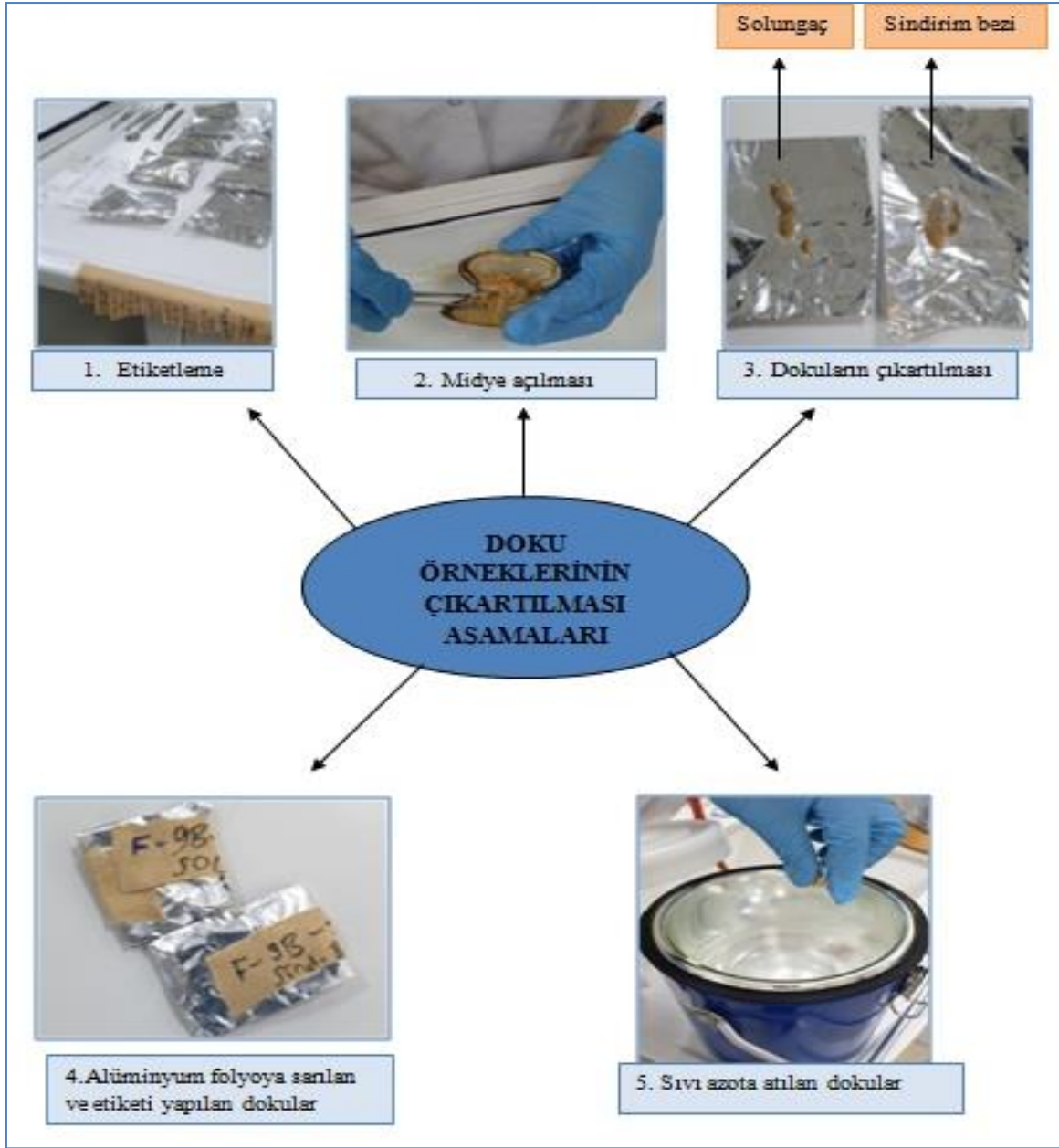


Şekil 3.2. Hemolemf alınması ve incelenmesi için uygulanan işlemler

### 3.2.4. Canlı modelinden doku örneklerinin çıkartılması

Yapılan bu deneyde kimyasal madde olan BHPF'nin enzim düzeylerine etkilerini belirlemek amacıyla tatlı su midyelerinin hemolemleri alındıktan sonraki aşama diseksiyon işlemidir. Diseksiyon işleminin aşamaları sırasıyla verilmiştir:

- Diseksiyona başlamadan önce etiketleme yapılmıştır.
- *U. terminalis*'in kabukları açılarak solungaç ve sindirim bezi alınmıştır.
- Doku örnekleri kare şeklinde kesilen alüminyum folyoya sarılmıştır.
- Etiketli yapıştırıldıktan sonra şoklama için sıvı azota konulmuştur.
- Örnekler, kullanılacak parametre ölçümlerinin gerçekleştirileceği zaman gelene kadar -80°C'de saklanmak üzere kaldırılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *U. terminalis*'in doku örneklerinin çıkartılması

### 3.2.5. Doku analizlerinin yapılması

*U. terminalis*'in  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış dokularının analizleri için MDA, AOPP ve GSH parametreleri kullanılmıştır. Parametreleri uygulamaya başlamadan önce yapılan ilk iş solüsyonların hazırlanması olmuştur (Çizelge 3.2).





Santrifüj işleminden sonra pelet kısmına dokunmadan süpernatantlar mikropipetler ile (her örnekten sonra uç değiştirilmiştir) alınarak başka ependorflara aktarılmıştır. Geriye kalan pelet kısmı ise atılmıştır. İşlemi bitmiş ve daha sonra okuması yapılacak olan ependorflar etiketleme yapılarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır (Resim 3.8).



Resim 3.8. Homojenizasyon, Santrifüj ve Süpernatant alınması işlemleri

MDA parametresinin spektrofotometre cihazı ile yapılacak olan değer okuması için sırasıyla uygulanan işlemler aşağıda verilmiştir:

Örnekler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılıp çözüldükten sonra vorteks işlemi uygulanmıştır.

Her numunedan 500  $\mu\text{l}$  cam tüplere konulmuştur.

Üzerine 3 ml fosforik asit (%1) ve 1 ml tiyobarbütirik asit eklenmiştir.

Cam tüplere tekrar vorteks işlemi uygulanmıştır.

Alüminyum folyo ile ağız kısmı kapatılan tüpler 1 saat boyunca kaynar su banyosunda bekletilmiştir (Resim 3.9).

Süre sonunda kaynar su banyosundan çıkarılan örnekler soğumaya bırakılmıştır.

Üzerlerine 4 ml n-butanol eklenmiştir.

Cam tüplere tekrar vorteks işlemi uygulanmıştır.

3000 rpm ve  $5^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Küvetlere aktarılan örnekler, üst faz spektrofotometrede sırayla 535 ve 520 nm'de okunmuştur.



Resim 3.9. MDA parametresi için su banyosu işlemleri

AOPP parametresinin spektrofotometre cihazı ile yapılacak olan değer okuması için sırasıyla uygulanan işlemler aşağıda verilmiştir:

Örnekler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılıp çözüldükten sonra vorteks işlemi uygulanmıştır.

Her numuneden 200  $\mu\text{l}$  ependorflara konulmuştur.

Üzerine sırayla 800  $\mu\text{l}$  fosfat tamponu, 10  $\mu\text{l}$  potasyum iyodür ve 20  $\mu\text{l}$  asetik asit eklenmiştir.

Ependorfları vorteksleyerek karışması sağlanmıştır.

Spektrofotometre okuma küvetlerine aktarılan örnekler 340 nm'de okutulmuştur (Spektrofotometre de mavi kör noktaya fosfat tamponu konulmuştur).

Protein okuması için numuneden 100  $\mu\text{l}$  alınmıştır.

Üzerine 400  $\mu\text{l}$  Bradford boyası eklenmiştir.

Ependorfları vorteksleyerek karışması sağlanmıştır.

Küvetlere aktarılan örnekler, spektrofotometre de 595 nm'de okunmuştur (Resim 3.10).



Resim 3.10. AOPP parametresinin uygulanması ve spektrofotometre cihazında okuma

Glutasyon parametresinin spektrofotometre cihazı ile yapılacak olan değer okuması için sırasıyla uygulanan işlemler aşağıda verilmiştir:

Örnekler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılıp çözüldükten sonra vorteks işlemi uygulanmıştır.

Kimyasal hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için DTNB ve Tampon ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  karışımı, pH: 8) hazırlanmıştır.

Spektrofotometrenin kr noktası için küvete 300  $\mu\text{l}$  distile su, 300  $\mu\text{l}$  tampon ve 2400 $\mu\text{l}$  DTNB eklenmiştir.

Diğer küvetlere ise 100  $\mu\text{l}$  distile su, 300  $\mu\text{l}$  tampon ve 2400  $\mu\text{l}$  DTNB eklenmiştir.

İlk olarak numune konulmadan 410 nm'de okuma yapılmıştır.

Daha sonra içine 200  $\mu\text{l}$  numune eklenerek pipetaj yapılmıştır. Bu aşamada her numuneden sonra pipet uçları değiştirilmiştir.

420 nm'de okuması yapılan örneklerin verileri kayıt edilmiştir.

Protein okuması için numuneden 100  $\mu\text{l}$  alınmıştır.

zerine 400  $\mu\text{l}$  Bradford boyası eklenmiştir.

Ependorfları vorteksleyerek karışması sağlanmıştır.

Küvetlere aktarılan örnekler, spektrofotometre de 595 nm'de okunmuştur (şekil 3.4).





Şekil 3.4. Glutasyon metodu aşamaları

### 3.2.6. İstatistiksel değerlendirme

Ortalama letal konsantrasyonların belirlenmesinde EPA Probit Analiz Yöntemi kullanılmış,  $LC_{50}$  ve %95 güven aralığında hesaplanmıştır. Toplam hemosit sayısı, GSH, AOPP ve MDA tayininin sonuçları Graphpad istatistik programıyla belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. BHPF'nin *U.terminalis* Üzerindeki Etkileri

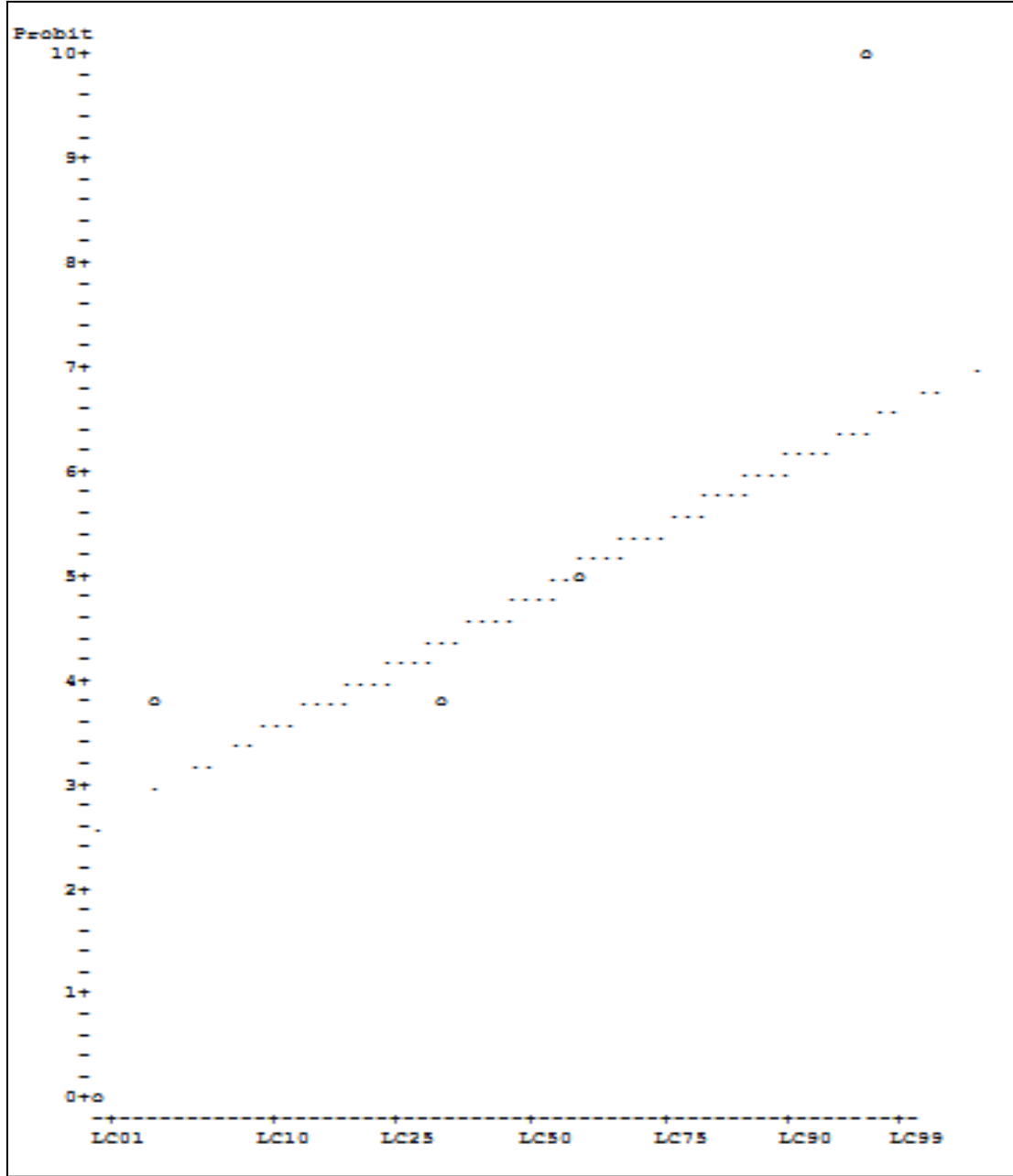
Bu çalışmada BHPF'nin akut ve subletal konsantrasyonlardaki etkileri saptanmıştır. 24, 48, 72 ve 96 saatlik ortalama öldürücü konsantrasyonları belirlenmiştir. Subletal etki, toksik özelliği olan kimyasal maddenin öldürücü olmayan dozlarına maruz kalıp hayatta kalan türlerde gözlenen davranışsal ve fizyolojik etki olarak açıklanabilir (De França ve diğerleri, 2017). *U.terminalis* türü sucul ekosistemde biyoindikatör olarak kullanılan bir türdür. Bu canlı türü kullanılarak yapılan araştırmada BHPF'nin subletal etkilerinin neler olabileceği rapor edilmiştir. Morfolojik farklılıklar, toplam hemosit sayısı, MDA, GSH ve AOPP'nin biyobelirteç olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

#### 4.1.1. BHPF'nin 24 saatlik akut toksisite bulguları

Gerçekleştirilen deneyler sonucunda BHPF'nin 24 saatlik akut LC<sub>50</sub> değeri (%95 güven aralığı), *U.terminalis* türünde 9.54 mg/L (5.37-18.89 mg/L) olmak üzere belirlenmiştir. Çizelge 4.1'de 24 saatlik tahmini LC<sub>50</sub> değerleri ve %95'lik güven aralığı ve Şekil 4.1'de *U.terminalis*'in 24 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. 24 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri ve % 95'lik güven aralığı

| Nokta değerleri | Konsantrasyon (mg/L) | % 95 Güven aralığı |
|-----------------|----------------------|--------------------|
| LC 1.00         | 0.7462               | 0.0583-1.8648      |
| LC 5.00         | 1.5742               | 0.2513-3.2079      |
| LC10.00         | 2.3438               | 0.5381-4.3598      |
| LC15.00         | 3.0661               | 0.8877-5.4342      |
| LC50.00         | 9.5437               | 5.3738-18.8937     |
| LC85.00         | 29.7066              | 15.8072-135.1976   |
| LC90.00         | 38.8618              | 19.4502-225.9218   |
| LC95.00         | 57.8611              | 26.1270-489.3685   |
| LC99.00         | 122.0697             | 44.4644-2131.5171  |



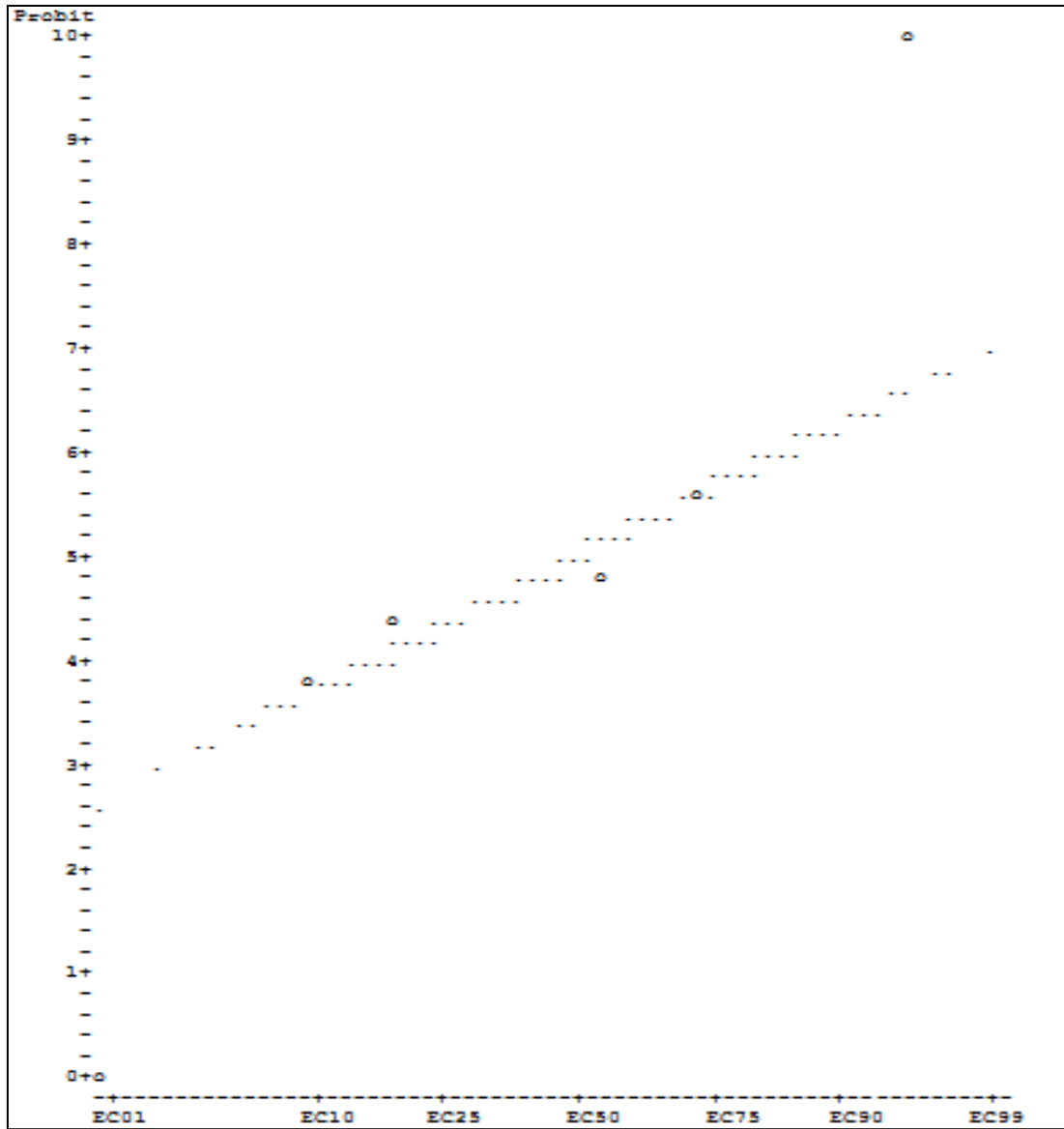
Şekil 4.1. *U.terminalis*'in 24 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği

#### 4.1.2. BHPF'nin 48 saatlik akut toksisite bulguları

Gerçekleştirilen deneylerin sonunda BHPF'nin 48 saatlik akut LC<sub>50</sub> değeri (%95 güven aralığı), *U.terminalis* türünde 3.95 mg/L (2.0-8.32 mg/L) olmak üzere belirlenmiştir. Çizelge 4.2'de 48 saatlik tahmini LC<sub>50</sub> değerleri ve %95'lik güven aralığı ve Şekil 4.2'de *U.terminalis*'in 48 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. 48 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri ve % 95'lik güven aralığı

| Nokta değerleri | Konsantrasyon (mg/L) | % 95 Güven aralığı |
|-----------------|----------------------|--------------------|
| LC 1.00         | 0.1027               | 0.0068-0.3331      |
| LC 5.00         | 0.2993               | 0.0414-0.7434      |
| LC10.00         | 0.5293               | 0.1065-1.1623      |
| LC15.00         | 0.7777               | 0.1985-1.5934      |
| LC50.00         | 3.9549               | 2.0054-8.3296      |
| LC85.00         | 20.1121              | 9.3118 -94.7499    |
| LC90.00         | 29.5505              | 12.6442-178.3639   |
| LC95.00         | 52.2587              | 19.5958-462.3145   |
| LC99.00         | 152.2452             | 43.3760-2834.7991  |

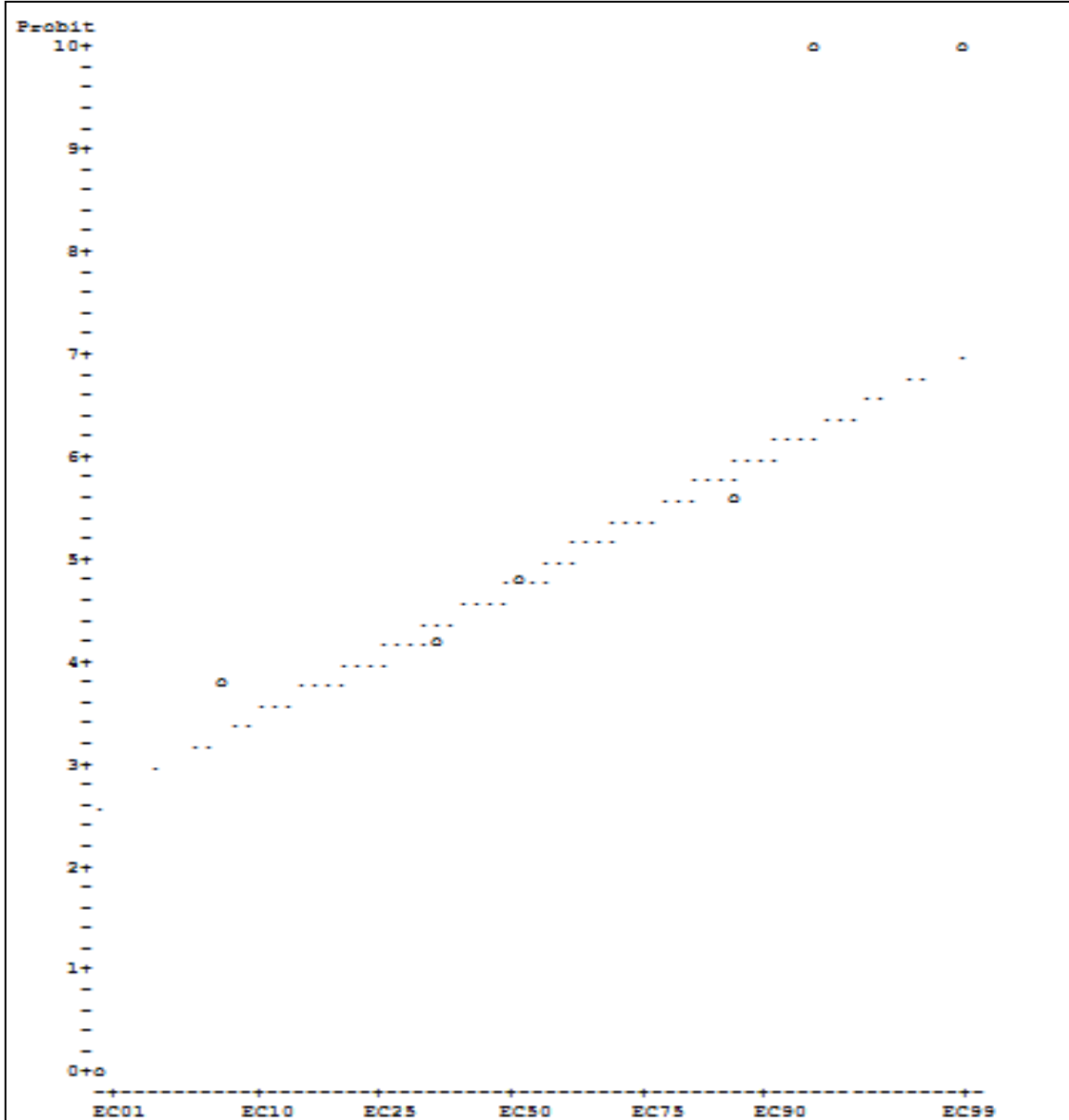
Şekil 4.2. *U.terminalis*'in 48 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği

#### 4.1.3. BHPF'nin 72 saatlik akut toksisite bulguları

Gerçekleştirilen deneyler sonunda BHPF'nin 72 saatlik akut LC<sub>50</sub> değeri (%95 güven aralığı), *U.terminalis* türünde 1.33 mg/L (0.65-2.6 mg/L) olmak üzere belirlenmiştir. Çizelge 4.3'de 72 saatlik tahmini LC<sub>50</sub> değerleri ve %95'lik güven aralığı ve Şekil 4.3'de *U.terminalis*'in 72 saatlik BHPF için hesaplaması gerçekleştirilen probit değerleri ve regresyon grafiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. 72 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri ve % 95'lik güven aralığı

| Nokta değerleri | Konsantrasyon (mg/L) | % 95 Güven aralığı |
|-----------------|----------------------|--------------------|
| LC 1.00         | 0.0390               | 0.0026-0.1288      |
| LC 5.00         | 0.1099               | 0.0145-0.2797      |
| LC10.00         | 0.1908               | 0.0360-0.4292      |
| LC15.00         | 0.2768               | 0.0656-0.5791      |
| LC50.00         | 1.3356               | 0.6552-2.6069      |
| LC85.00         | 6.4444               | 3.1914-24.0662     |
| LC90.00         | 9.3518               | 4.3345-43.6029     |
| LC95.00         | 16.2363              | 6.6932-107.2079    |
| LC99.00         | 45.6950              | 14.6214-599.2413   |



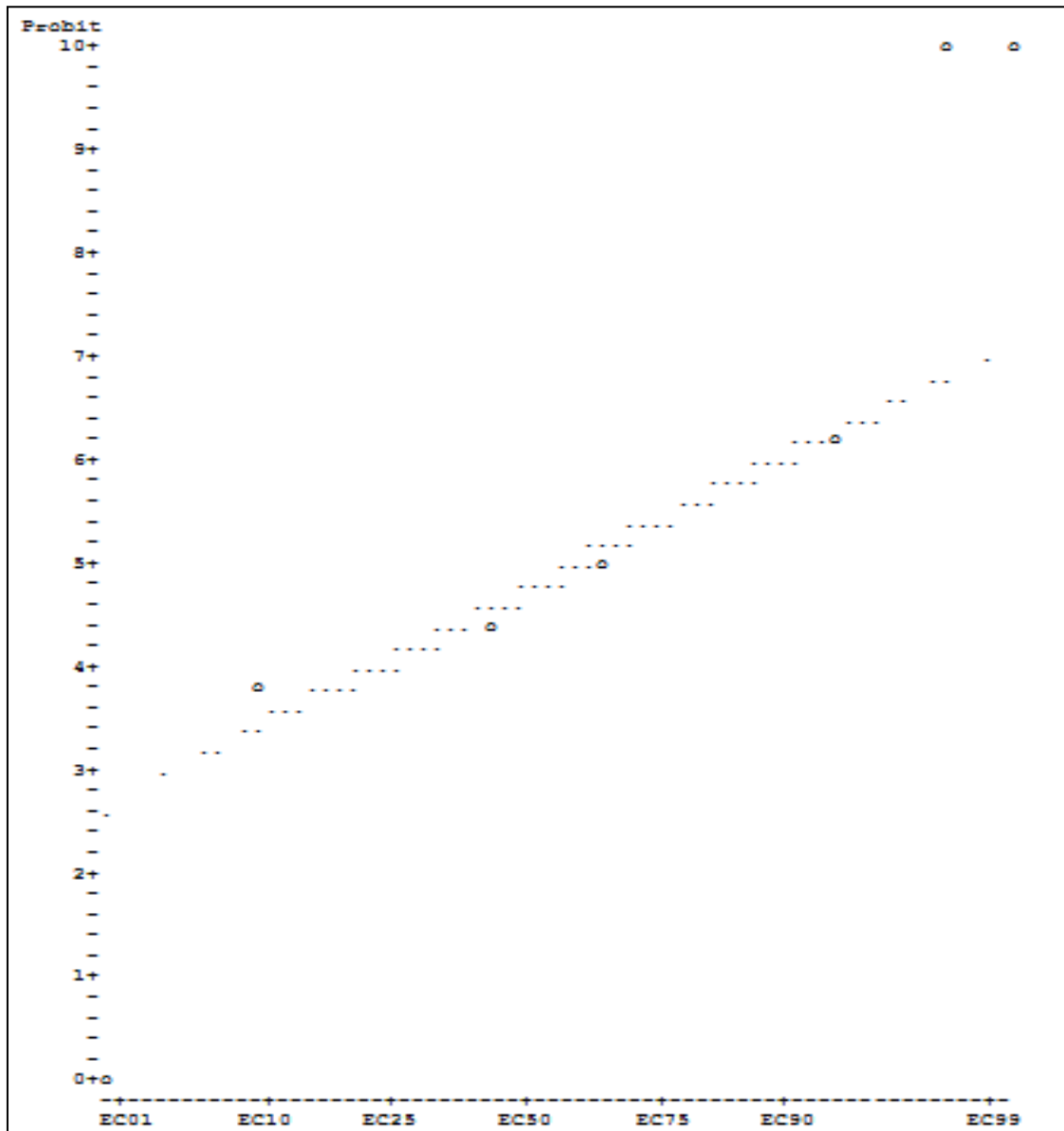
Şekil 4.3. *U.terminalis*'in 72 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği

#### 4.1.4. BHPF'nin 96 saatlik akut toksisite bulguları

Gerçekleştirilen deney sonucunda BHPF'nin 96 saatlik akut LC<sub>50</sub> değeri (%95 güven aralığı), *U.terminalis* türünde 0.84 mg/L (0.42-1.57 mg/L) olmak üzere belirlenmiştir. Çizelge 4.4'de 96 saatlik tahmini LC<sub>50</sub> değerleri ve %95'lik güven aralığı ve Şekil 4.4'de *U.terminalis*'in 96 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. 96 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri ve % 95'lik güven aralığı

| Nokta değerleri | Konsantrasyon (mg/L) | % 95 Güven aralığı |
|-----------------|----------------------|--------------------|
| LC 1.00         | 0.0377               | 0.0027-0.1144      |
| LC 5.00         | 0.0938               | 0.0130-0.2246      |
| LC 10.00        | 0.1525               | 0.0296-0.3262      |
| LC 15.00        | 0.2116               | 0.0513-0.4234      |
| LC 50.00        | 0.8455               | 0.4223-1.5767      |
| LC 85.00        | 3.3780               | 1.7770-11.4868     |
| LC 90.00        | 4.6878               | 2.3314-19.6781     |
| LC 95.00        | 7.6179               | 3.4188-44.5456     |
| LC 99.00        | 18.9375              | 6.7759-213.3287    |

Şekil 4.4. *U.terminalis*'in 96 saatlik BHPF için hesaplanmış olan probit değerleri ve regresyon grafiği

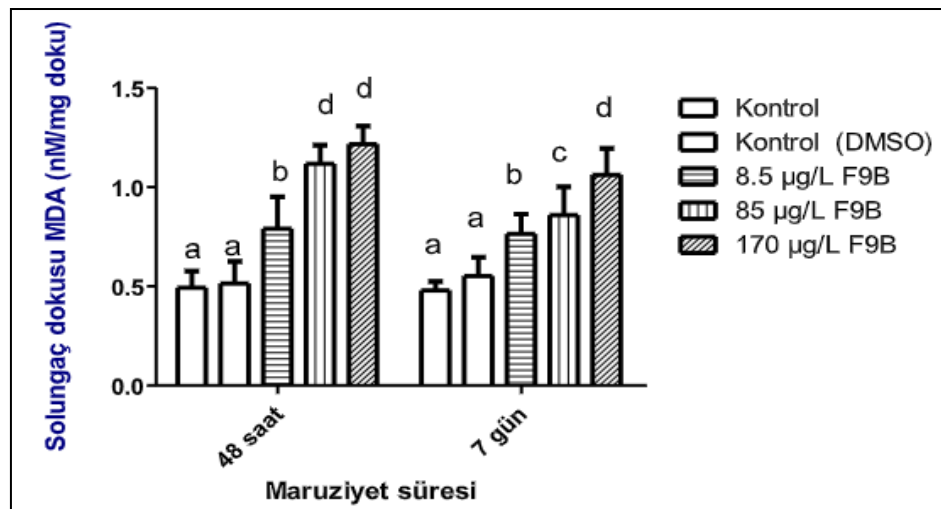
#### 4.1.5. *U.terminalis*'in MDA biyobelirteç değerleri

*U.terminalis*'in, BHPF'ye 2 ve 7 gün maruziyet süreleri sonucu biyobelirteç olarak uygulanan MDA verilerinin solungaç dokunun üzerindeki istatistiksel değerleri Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Elde edilen bu istatistikler sonucunda MDA biyobelirteç değerleri grafiklendirilmiştir (Şekil 4.5). Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5'de görüldüğü üzere, solungaç dokusundaki MDA değerleri 2 ve 7 gün boyunca kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak artmıştır ( $p<0.05$ ). 2 gün süre ile 8.5 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyeler ile 7 gün süre ile 8.5 µg/L'ye maruz kalanlar arasında istatistik olarak önemli bir fark saptanmazken ( $p>0.05$ ), 2 gün süre ile 85 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyeler ile 7 gün süre ile 85 µg/L'ye maruz kalanlar arasında istatistik olarak önemli bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). 170µg/L'ye 2 gün boyunca maruz kalan midyeler ile 7 gün boyunca maruz kalan midyeler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

Çizelge 4.5. MDA verilerinin solungaç dokunun üzerindeki değerleri (nM/mg doku)

| Solungaç Dokusu (nM/mg doku) | Süre(gün)     |               |
|------------------------------|---------------|---------------|
| Deney Grubu                  | 2 gün         | 7 gün         |
| Kontrol                      | 0.493±0.084a  | 0.480±0.045a  |
| Kontrol DMSO                 | 0.515±0.110 a | 0.552±0.095 a |
| 8.5 µg/L                     | 0.791±0.161 b | 0.764±0.100 b |
| 85 µg/L                      | 1.118±0.094d  | 0.859±0.143 c |
| 170 µg/L                     | 1.217±0.091 d | 1.062±0.134 d |

\*Aynı satır ve sütundaki harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).



\*Harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).

Şekil 4.5. Maruziyet sürelerine göre solungaç dokusu MDA değerleri (nM/mg doku)

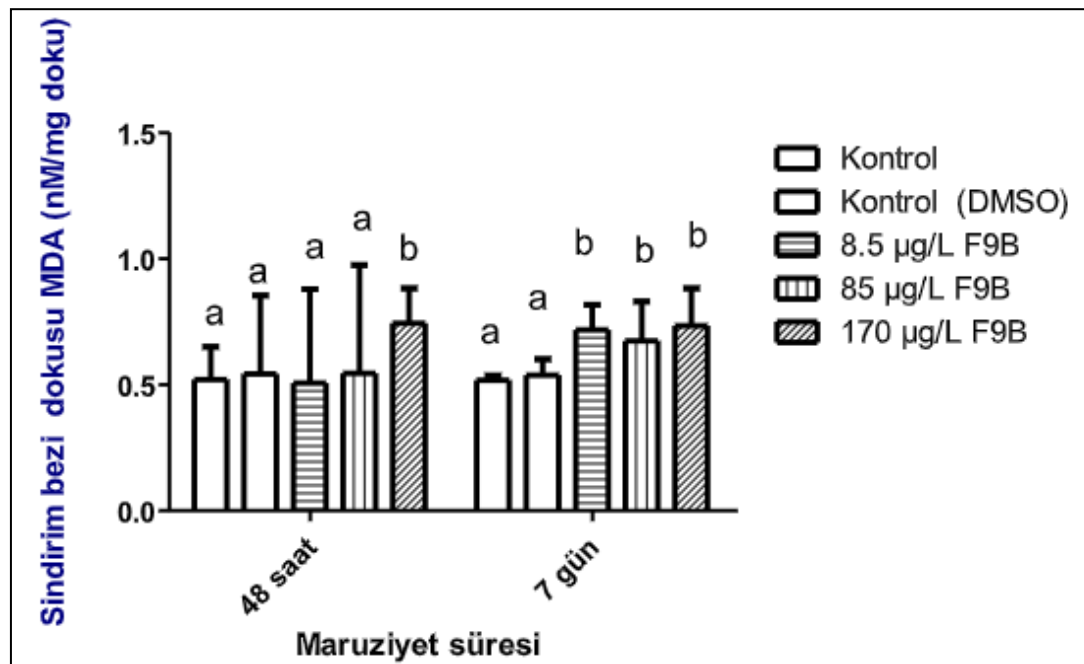


*U.terminalis*'in, BHPF'ye 2 ve 7 gün maruziyet süreleri sonucu biyobelirteç olarak uygulanan MDA verilerinin sindirim bezi dokusunun üzerindeki istatistiksel değerleri ise Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Elde edilen bu istatistikler sonucunda MDA biyobelirteç değerleri grafiklendirilmiştir (Şekil 4.6). Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'da görüldüğü üzere, sindirim bezi dokusundaki MDA değerlerinin 2 gün boyunca kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ). 2 gün süre ile 8.5 µg/L ve 85 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyeler ile 7 gün süre ile 8.5 µg/L ve 85 µg/L'ye maruz kalanlar arasında istatistiksel olarak bir artış gözlenirken ( $p<0.05$ ), 2 gün süre ile 170 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyeler ile 7 gün süre ile 170 µg/L'ye maruz kalanlar arasında istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmemiştir ( $p<0.05$ ).

Çizelge 4.6. MDA verilerinin sindirim bezi dokusunun üzerindeki değerleri (nM/mg doku)

| Sindirim Bezi Dokusu(nM/mg doku) | Süre(gün)     |               |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| Deney Grubu                      | 2 gün         | 7 gün         |
| Kontrol                          | 0.521±0.129a  | 0.518±0.019a  |
| Kontrol DMSO                     | 0.543±0.811 a | 0.538±0.064 a |
| 8.5 µg/L                         | 0.507±0.373 a | 0.718±0.100 b |
| 85 µg/L                          | 0.546±0.429 a | 0.674±0.157 b |
| 170 µg/L                         | 0.744±0.139 b | 1.734±0.149 b |

\*Aynı satır ve sütundaki harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).



\*Harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ )

Şekil 4.6. Maruziyet sürelerine göre sindirim bezi dokusu MDA değerleri (nM/mg doku)

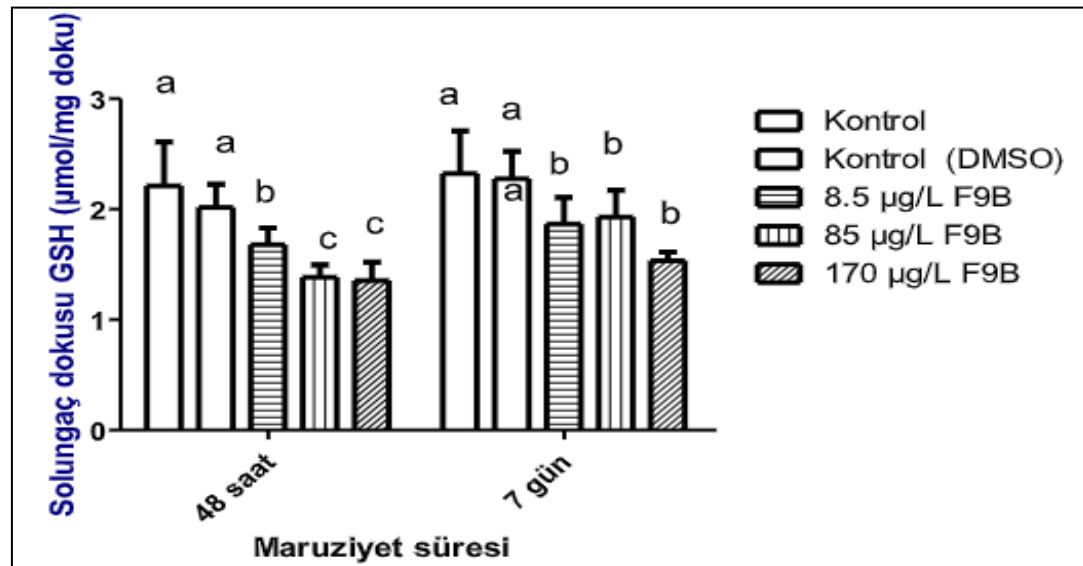
#### 4.1.6. *U.terminalis*'in GSH biyobelirteç değerleri

*U.terminalis*'in, BHPF'ye 2 ve 7 gün maruziyet süreleri sonucu biyobelirteç olarak uygulanan GSH verilerinin solungaç dokunun üzerindeki istatistiksel değerleri Çizelge 4.7' de gösterilmiştir. Elde edilen bu istatistikler sonucunda GSH biyobelirteç değerleri grafiklendirilmiştir (Şekil 4.7). Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7'de görüldüğü üzere, solungaç dokusundaki GSH değerlerinin kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı saptanmıştır ( $p<0.05$ ). 2 gün süre ile 8.5 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyeler ile 7 gün süre ile 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L'ye maruz kalanlar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmazken ( $p>0.05$ ), bu gruplar ile 2 gün süreyle 85 ve 170 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyelerin solungaç GSH değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmıştır ( $p<0.05$ ).

Çizelge 4.7. GSH verilerinin solungaç dokunun üzerindeki değerleri (µmol/mg doku)

| Solungaç Doku(µmol/mg doku) | Süre(gün)     |               |
|-----------------------------|---------------|---------------|
| Deney Grubu                 | 2 gün         | 7 gün         |
| Kontrol                     | 2.211±0.399a  | 2.324±0.385 a |
| Kontrol DMSO                | 2.017±0.210 a | 2.277±0.246 a |
| 8.5 µg/L                    | 1.678±0.153 b | 1.867±0.239 b |
| 85 µg/L                     | 1.384±0.112 c | 1.929±0.242 b |
| 170 µg/L                    | 1.353±0.168 c | 1.523±0.078 b |

\*Aynı satır ve sütundaki harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).



\*Harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).

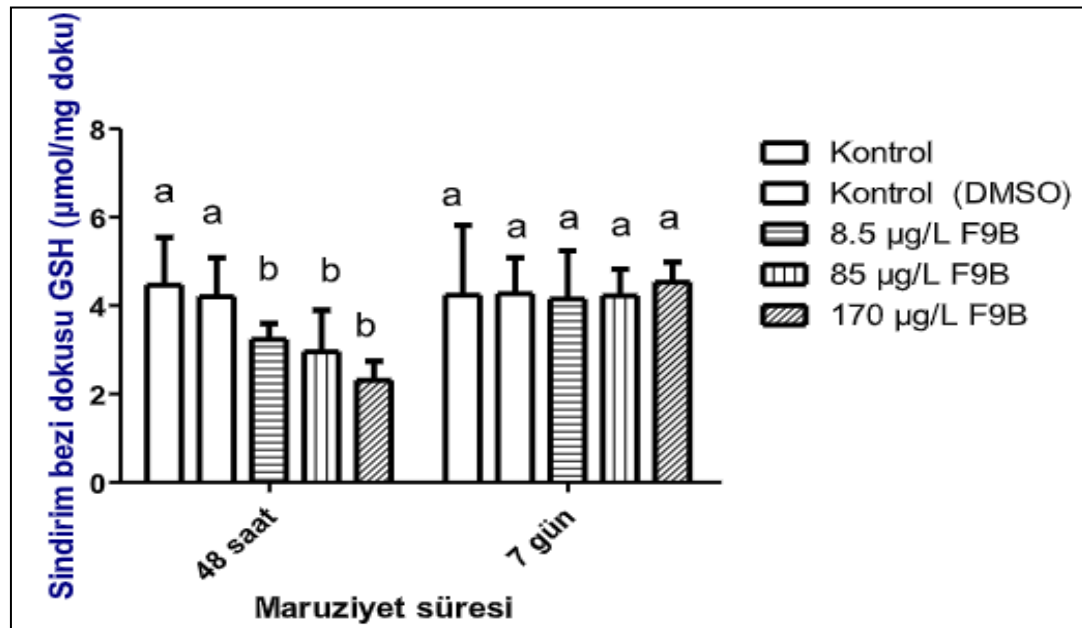
Şekil 4.7. Maruziyet sürelerine göre solungaç dokusu GSH değerleri (µmol/mg doku)

*U.terminalis*'in, BHPF'ye 2 ve 7 gün maruziyet süreleri sonucu biyobelirteç olarak uygulanan GSH verilerinin sindirim bezi dokusunun üzerindeki istatistiksel değerleri Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Elde edilen bu istatistikler sonucunda GSH biyobelirteç değerleri grafiklendirilmiştir (Şekil 4.8). Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8'de görüldüğü üzere, sindirim bezi dokusundaki GSH değerlerinin 2 gün süre ile kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak azaldığı saptanmışken ( $p<0.05$ ), 7 gün süre boyunca istatistiksel olarak önemli bir değişiklik olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ). 2 gün süre ile 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyeler ile 7 gün süre ile 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L'ye maruz kalanlar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gözlenmiştir ( $p<0.05$ ).

Çizelge 4.8. GSH verilerinin sindirim bezi dokusunun üzerindeki değerleri (µmol/mg doku)

| Sindirim Bezi Dokusu (µmol/mg doku) | Süre(gün)     |               |
|-------------------------------------|---------------|---------------|
| Deney Grubu                         | 2 gün         | 7 gün         |
| Kontrol                             | 4.466±1.076 a | 4.239±1.576 a |
| Kontrol DMSO                        | 4.201±0.885 a | 4.272±0.814 a |
| 8.5 µg/L                            | 3.237±0.361 b | 4.148±1.098 a |
| 85 µg/L                             | 2.958±0.939 b | 4.223±0.599 a |
| 170 µg/L                            | 2.313±0.432 b | 4.533±0.448 a |

\*Aynı satır ve sütundaki harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).



\*Harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).

Şekil 4.8. Maruziyet sürelerine göre sindirim bezi dokusu GSH değerleri (µmol/mg doku)

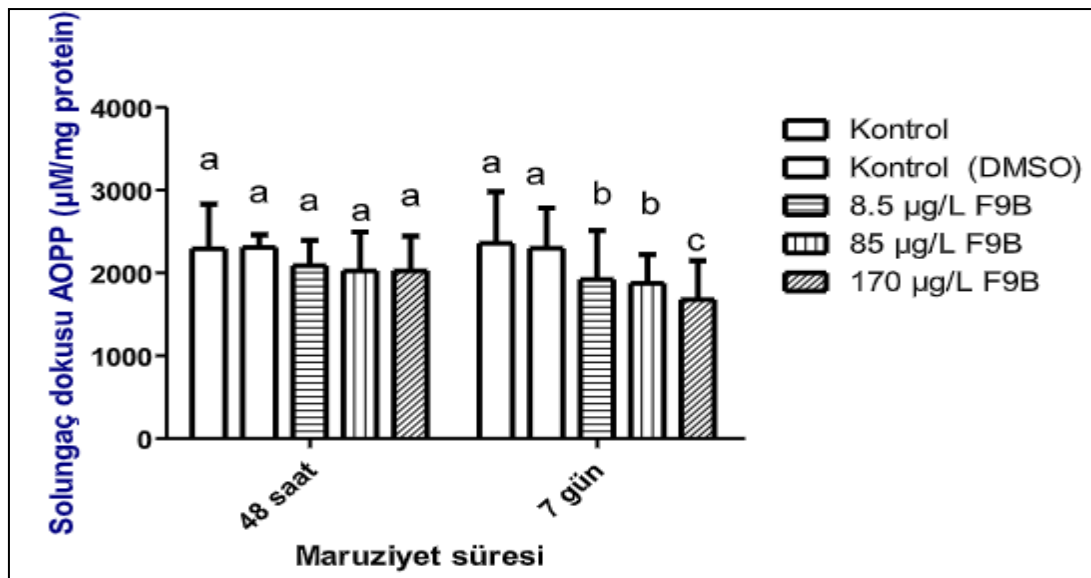
#### 4.1.7. *U.terminalis*'in AOPP biyobelirteç değerleri

*U.terminalis*'in, BHPF'ye 2 ve 7 gün maruziyet süreleri sonucu biyobelirteç olarak uygulanan AOPP verilerinin solungaç dokunun üzerindeki istatistiksel değerleri Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. Elde edilen bu istatistikler sonucunda AOPP biyobelirteç değerleri grafiklendirilmiştir (Şekil 4.9). Çizelge 4.9 ve Şekil 4.9'da görüldüğü üzere, solungaç dokusundaki AOPP değerlerinin 2 gün süre ile kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamışken ( $p < 0.05$ ), 7 gün boyunca istatistiksel olarak bir azalma gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). 2 gün süre ile 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyeler ile 7 gün süre ile 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L'ye maruz kalanlar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ).

Çizelge 4.9. AOPP verilerinin solungaç dokunun üzerindeki değerleri (µM/mg protein)

| Solungaç Doku<br>(µM/mg protein) | Süre (gün)         |                   |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|
|                                  | 2 gün              | 7 gün             |
| Deney Grubu                      |                    |                   |
| Kontrol                          | 2291.050±541.08 a  | 2356.990±624.80 a |
| Kontrol DMSO                     | 2307.015±153.63 a  | 2298.742±486.09 a |
| 8.5 µg/L                         | 2089.990±306.54 a  | 1920.772±589.96 b |
| 85 µg/L                          | 2025.828±471.58 a  | 1874.058±348.50 b |
| 170 µg/L                         | 2024.0727±419.56 a | 1677.473±470.05 c |

\*Aynı satır ve sütundaki harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).



\*Harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

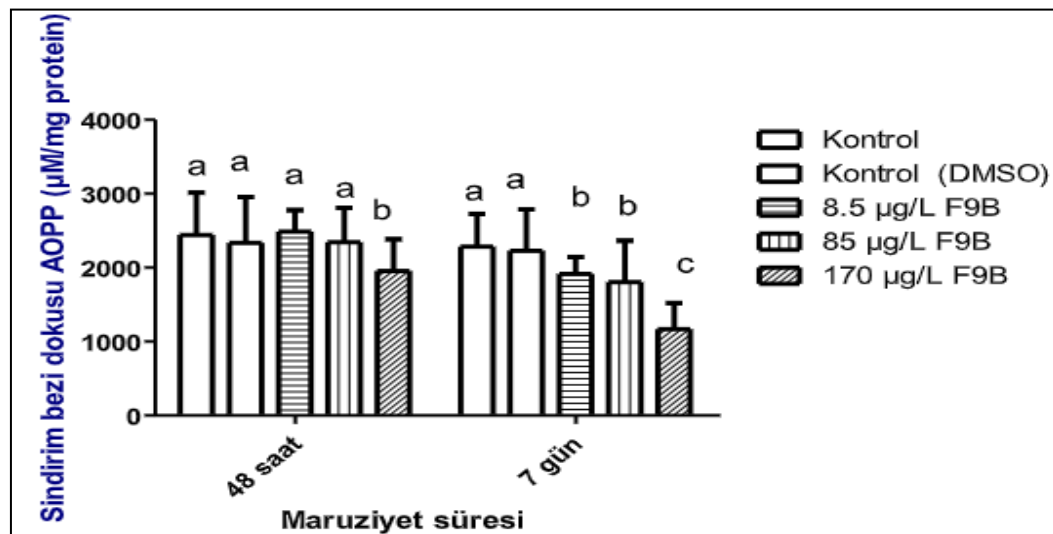
Şekil 4.9. Maruziyet sürelerine göre solungaç dokusu AOPP değerleri (µM/mg protein)

*U.terminalis*'in, BHPF'ye 2 ve 7 gün maruziyet süreleri sonucu biyobelirteç olarak uygulanan AOPP verilerinin sindirim bezi dokusunun üzerindeki istatistiksel değerleri Çizelge 5'de gösterilmiştir. Elde edilen bu istatistikler sonucunda AOPP biyobelirteç değerleri grafiklendirilmiştir (Şekil 5). Çizelge 4.10 ve Şekil 4.10'da görüldüğü üzere, sindirim bezi dokusundaki AOPP değerlerinin 2 gün süre ile kontrol gruplarına göre 8.5 µg/L ve 85 µg/L BHPF'ye maruz kalanlarda istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamışken ( $p<0.05$ ), 170 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyelerde istatistiksel olarak bir azalma saptanmıştır ( $p<0.05$ ). 7 gün boyunca 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L BHPF'ye maruz kalanlarda ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). 2 gün süre ile 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L BHPF'ye maruz kalan midyeler ile 7 gün süre ile 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L'ye maruz kalanlar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ).

Çizelge 4.10. AOPP verilerinin sindirim bezi dokusunun üzerindeki değerleri(µM/mg protein)

| Sindirim Bezi Dokusu<br>(µM/mg protein) | Süre (gün)        |                   |
|-----------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                         | 2 gün             | 7 gün             |
| Deney Grubu                             |                   |                   |
| Kontrol                                 | 2440.899±574.48 a | 2285.930±443.12 a |
| Kontrol DMSO                            | 2335.887±618.03 a | 2227.73±561.93 a  |
| 8.5 µg/L                                | 2487.312±289.79 a | 1914.899±228.63 b |
| 85 µg/L                                 | 2345.659±463.34 a | 1804.009±599.90 b |
| 170 µg/L                                | 1955.821±428.97 b | 1168.81±352.88 c  |

\*Aynı satır ve sütundaki harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).



\*Harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).

Şekil 4.10. Maruziyet sürelerine göre sindirim bezi dokusu AOPP değerleri (µM/mg protein)

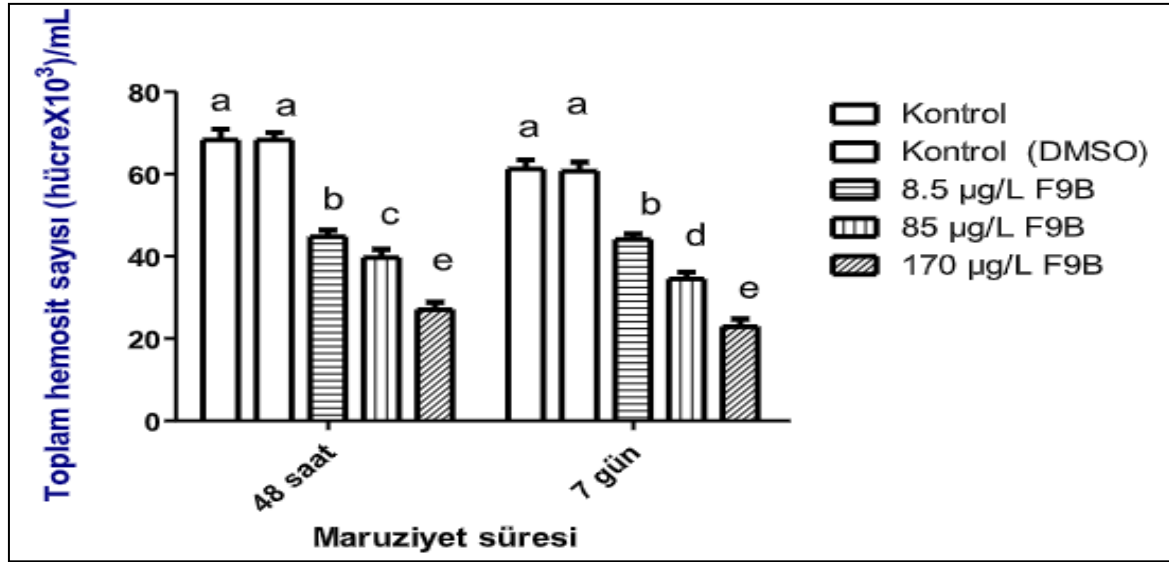
#### 4.2. BHPF'nin *U.terminalis* Hemosit Sayısının Üzerindeki Etkileri

Midye hemolemflerindeki hücre sayısı hemositometre adı verilen Thoma lamı sayesinde ışık mikroskobunda incelenmiştir. 2 ve 7 gün boyunca 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L BHPF dozlarına maruz kalan *U. terminalis*'lerin hemosit değerlerinin ortalamaları sırasıyla 44.8±1.60 ve 44.13±1.28 THS/ml, 39.67±2.01 ve 34.53±1.68 THS/ml, 27.00±1.86 ve 22.93±1.86 THS/ml olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda ise bu değer 68.33±2.59 ve 61.20±2.23 THS/ml'dir. Toplam hemosit miktar değerleri (THS/ml) Çizelge 5.1'de gösterilmiştir. Elde edilen istatistikler sonucu maruziyet sürelerine (2 ve 7 gün) göre toplam hemosit sayıları grafiklendirilmiştir (Şekil 5.1). Çizelge 5.1 ve Şekil 5.1'de görüldüğü üzere hemosit değerleri 2 ve 7 gün süre ile kontrol gruplarına göre 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170µg/L BHPF'ye maruz kalanlarda istatistiksel olarak önemli bir azalma saptanmıştır ( $p<0.05$ ). 2 gün boyunca 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L BHPF'ye maruz kalanlar 7 gün süre ile 8.5 µg/L, 85 µg/L ve 170 µg/L'ye maruz kalanlar arasında ise istatistiksel olarak önemli düzeyde bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ).

Çizelge 4.11. Toplam hemosit değerleri (hücreX10<sup>3</sup>)/ml

| Hemosit değerleri<br>(hücreX10 <sup>3</sup> )/ml | Süre(gün)     |              |
|--------------------------------------------------|---------------|--------------|
|                                                  | 2 gün         | 7 gün        |
| Deney Grubu                                      |               |              |
| Kontrol                                          | 68.33±2.59 a* | 61.20±2.23 a |
| Kontrol DMSO                                     | 68.27±1.81 a  | 60.73±2.20 a |
| 8.5 µg/L                                         | 44.8±1.60 b   | 44.13±1.28 b |
| 85 µg/L                                          | 39.67±2.01 c  | 34.53±1.68 d |
| 170 µg/L                                         | 27.00±1.86 e  | 22.93±1.86 e |

\*Aynı satır ve sütundaki harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p<0.05$ ).



\*Harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

Şekil 4.11. Maruziyet sürelerine göre toplam hemosit sayısı (hücreX10<sup>3</sup>)/ml

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda endokrin bozucu kimyasalların erkek ve dişi üreme sistemleri üzerinde etkileri bulunmuştur. Bisfenol A'nın kullanımının kısıtlandırılması ile ortaya çıkan BHPF bileşiği de benzer olumsuzluklara yol açmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda, BHPF'nin *U.terminalis* türü üzerindeki toksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Laboratuvar çalışmamızda kullanılan BHPF'nin sucul canlı türü olan midyeler üzerindeki etkileri açığa çıkarılmak istenmiştir. Bu çalışmada BHPF'nin tatlı su midyelerindeki (*U.terminalis*) 24, 48, 72 ve 96 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri ve deney boyunca etken maddenin canlı üzerindeki davranışları gözlenmiştir. Deneylerde, BHPF'nin 24, 48, 72 ve 96 saatlik akut LC<sub>50</sub> değerleri (%95 güven aralığı), 9.54 mg/L, 3.95 mg/L, 1.33 mg/L, 0.84 mg/L olarak hesaplanmıştır. Çalışma bulgularımıza benzer olarak sucul canlılardan zebra balıklarında 24, 48, 72 ve 96 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri (%95 güven aralığı) ise 1.28, 0.59, 0.32 ve 0.25 mg/L olarak saptanmıştır (Kotiloğlu ve diğerleri, 2022).

Mi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada zebra balıkları embriyoları için LC<sub>50</sub> değerlerinin döllenme gerçekleşikten 24 saat sonra hpf 4.395 µM (1.54 mg/L), 48 saat sonra hpf'de 4.170 µM (1.46 mg/L), 72 hpf'de 3.834 µM (1.34 mg/L) ve 96 hpf'de 2.88 µM (1.01 mg/L) olarak saptamışlardır (Mi ve diğerleri, 2020). Bu sonuçlar mg düzeyde toksik olarak saptadığımız bulgular ile benzerlik taşımaktadır.

Lynch ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise tatlı su salyangoz türü olan *Biomphalaria glabrata* kullanılmıştır. Yaygın su kirletici özelliği gösteren Bisfenol A ve Diklorodifenildikloroetilen (DDE)'e tatlı su salyangozları maruz bırakılmıştır. 200 ng/L Bisfenol A ve 500 ng/L DDE'ye maruz kalan gruplarda kontrol grubuna göre hemosit sayılarının önemli oranda azaldığı rapor edilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini de değiştirdiği saptanmıştır (Lynch ve diğerleri, 2022).

Bu çalışmada BHPF'nin 8.5 µg/L, 85 µg/L, 170 µg/L'lik dozları uygulanmıştır. Deneyde kullanılan biyobelirteçlerin (MDA, GSH ve AOPP) ve hemosit değerlerinin dozlama grubu ve kontrol grubuna göre kıyaslaması yapılmıştır.



*U. terminalis* ile yapılan subletal çalışma sonucunda, BHPF'ye 2 ve 7 gün süresince maruz bırakılan midyelerin, maruziyet sürelerine göre toplam hemosit sayısı (hücreX10<sup>3</sup>)/ml önemli oranda azalma göstermiştir ( $p<0.05$ ). 2 ve 7 günlük 8.5 µg/L, 85 µg/L, 170 µg/L'lik değerler kıyaslandığında ise önemli bir fark görülmemiştir ( $p<0.05$ ).

MDA, yağ peroksidasyonunun son parçalanma ürünüdür. 2 ve 7 gün sonunda BHPF'ye maruz bırakılan *U. terminalis*'in solungaç dokusu ve sindirim bezi dokusundaki MDA oranları ölçülmüştür. Solungaç dokularındaki ve sindirim bezi dokularındaki MDA düzeyleri kontrol grubundaki canlıların MDA düzeylerine göre arttığı gözlenmiştir.

GSH, nükleofilik temizleyici olduğu için doku hasarı olduğunda enzim katalizleyen bir antioksidan görevi görür. Bu nedenle ROT'ların sebep olduğu oksidatif hasar sonucunda biyolojik yapıların ve fonksiyonlarının savunmasında önemli bir role sahiptir (Ruffmann ve diğerleri, 1991).

Çalışmamızda, *U. terminalis* BHPF'ye 2 ve 7 gün süre boyunca maruz bırakılması sonucunda sindirim bezi ve solungaç dokularında oluşan GSH düzeyleri tespit edilmiştir. Dokulardaki GSH düzeyleri, süre sonunda kontrol grubunun dokularındaki GSH düzeylerine göre azalmıştır. GSH molekülleri, hücrelerde savunma yapmakla görevlidirler. Midyelerin BHPF'ye maruz kalıp GSH moleküllerinin tüketilmesiyle hücredeki seviyeleri azalma göstermiştir. AOPP, oksidatif stresin değerlendirilmesi için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Selmece ve diğerleri, 2005). Çalışmamızda *U. terminalis*'in BHPF'ye 2 ve 7 gün süre boyunca maruz bırakılması sonucunda sindirim bezi ve solungaç dokularındaki oluşan AOPP düzeyleri tespit edilmiştir. Dokulardaki AOPP düzeyleri, sürenin sonunda kontrol grubuna göre fazla bir değişikliğe uğramadığı gözlemlenmiştir.

Ay ve diğerleri'nin (2014) yapmış oldukları çalışmada ortalama 5.5±0.7 cm boy ve 19.88±4.85 gr ağırlığa sahip tatlı su midyesi *Unio terminalis* kullanılmıştır. 24, 48, 72 ve 96 saat sürelerle 0.7 ppm, 1.0 ppm, 2.0 ppm, 4.0 ppm, 8.0 ppm ve 16.0 ppm derişime sahip bakır çözeltisi eklenerek, 96 saatlik LC<sub>50</sub> değeri 4.65 ppm (% 95'lik güven aralığı) olmak üzere saptanmıştır. 96 saat süre sonunda *U. terminalis*'te bakır birikimi, kontrol grubundaki midyelere göre artmıştır ( $p<0.05$ ).

Doyotte ve diğerkleri'nin (1997) *Unio tumidus* tür midye ile yaptığı bir çalışmada ise iki kimyasal madde kullanılmıştır. 100 µg/L thiram ve 30 µg/L bakır kimyasal maddelerine 3 gün süre ile maruz bırakılmıştır. Thiram ve bakıra temas ettirilen midyelerde GSH düzeyi azalma göstermiştir. MDA oranında ise kontrol grubuna göre artış gösterdiği saptanmıştır. Yapılan örnek çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler farklılık gösterse de midyelerin göstermiş oldukları tepkilerde benzerlik bulunmaktadır.

Deney sonuçlarına ve yapılan literatür çalışmalarına bakıldığı zaman BHPF bileşiğinin tatlı su midyeler üzerindeki etkilerinin ilk defa incelendiği gözlenmektedir. Bu durum ise yapılan bu tez çalışmasını özgün hale getirmiştir.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma dünyada endokrin bozucu kimyasal olarak en çok kullanılan Bisfenol A'nın ikamesi olan BHPF'nin, tatlı su midyelerin üzerindeki etkisini araştırarak literatüre katkı sağlamaktadır. BHPF'nin, yapılan araştırmalar sonucunda seçenek olarak kullanılmak istenmesine rağmen toksisitesinin BPA bileşiğinden daha fazla olduğu görülmüştür. BHPF bileşiği de diğerk kimyasallar gibi endokrin bozucu özelliği göstermiştir.

Çevreye bulaşması birbirinden farklı yollarla olduğu için canlılarla teması sürekli haldedir. Günlük olarak kullanılan birçok eşyada bulunan BHPF ile ilgili yapılan araştırmaların sayısı artış göstermektedir. BHPF'nin sucul ekosistem üzerindeki etkilerinin düşük dozlarda bile gözlenebileceği yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır.

Canlı vücudunun en önemli silahı olan antioksidanlar, hücre hasarını engelleyebilen ve hücre metabolizmasının toksik yan ürünü olan serbest radikalleri temizleyebilen maddelerdir. Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan olarak sınıflandırılabilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında glutatyon, malondialdehit ve ileri oksidasyon protein ürünleri bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GPx) ve Glutatyon redüktaz (GR) ise enzimatik antioksidanlardır (Karabulut ve Gülay, 2016).

Kirletici kimyasalların, suda yaşayan canlılar ve çevre üzerine olan etkilerinin daha iyi anlaşılır hale getirilmesini sağlamak için yapılan çalışmaların artırılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında enzimatik olmayan parametreler kullanılarak BHPF toksisitesi

değerlendirilmiştir. Enzimatik olmayan parametrelerin farklı dozlamaları ile tatlı su midyeleri üzerinde daha fazla çalışmalar yapılacağı gibi enzimatik parametreler de kullanılarak yapılacak olan çalışmaların çeşitliliği arttırılabilir.

## KAYNAKLAR

- Anonymous, (1975). *Standard methods for the examination of water and waste water* (14th edition). Washington: APHA, 14.
- Araujo, R., Gomez, I. and Machordom, A. (2004) The Identity and Biology of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (*U. elongatulus*) (Bivalvia: Unionidae) in the Iberian Peninsula. *Journal of Molluscan Studies*, 71(1), 25-31.
- Ay, Ö., Korkmaz, C., A, M.H. (2014). Tatlı su midyesi *Unio terminalis*'te bakırın 96 saatlik LC<sub>50</sub> değeri ile birikim düzeylerinin belirlenmesi. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 10(2), 29-34.
- Bruce, A. E. E. (2015) Zebrafish epiboly: Spreading thin over the yolk, *Developmental Dynamics*, 245, 244-258.
- 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, *Environmental Science&Technology*, 50, 5438–5453.
- Cimmino, I., Fiory, F., Perruolo, G., Miele, C., Beguinot, F., Formisano, P., Orienre, F. (2020). Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5761.
- De França, S.M., Breda, M.O., Barbosa, D.R.S., Araujo, A.M.N., and Guedes, C.A. (2017). The sublethal effects of insecticides in insects. In: V.D.C. Shields (Ed.), *Biological Control of Pest and Vector Insects*, London: Intech Open, 23-39.
- Dinçel, S. A., Alparslan, N. Z., Benli, A. Ç. K., Selvi, M., Sarıkaya, R., Özkul, İ. A., ve Erkoç, F. (2013). Hemolymph biochemical parameters reference intervals and total hemocyte counts of narrow clawed crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Ecological Indicators*, 24, 305-309.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M. and Vasseur, P. (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the fresh water bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*, 39(2), 93-110.
- Fendoğlu, B.Y., Gümüşel, B.K., Erkekoğlu, P. (2019). A general overview on endocrine disrupting chemicals and their mechanism of action. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 39, 30-43.
- Garcia, J. M., Garcia, F. C., Serna, F., and Pena, J. L. (2010) High-performance aromatic polyamides, *Progress in Polymer Science*, 35, 623-686.
- Graf, D.L., and Cummings, K.S. (2007) Review of the systematics and global diversity of fresh water mussel species (Bivalvia: Unionoida), *Journal of Molluscan Studies*, 73(3), 291-314.
- Gürlek, M. E., Kara, C., and Kebapçı, Ü. (2014). Adıyaman Azaplı gölü'nde yaşayan *Unio terminalis* (Bourguignat, 1852)'in bazı konkolojik özellikleri, *Yunus Araştırma Bülteni*, (3), 23-28.

- Internet: PubChem (2021). BHPF 2D Structure. web: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9\\_9-Bis\\_4-hydroxyphenyl\\_fluorene#section=Structures](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9_9-Bis_4-hydroxyphenyl_fluorene#section=Structures), Son Erişim Tarihi: 12.06.2021
- Ji, X., Shi, L., Yin, X., Huai, Z., Li, Y., Ren, J., Fu, Y., Du, Y., Gao, Y., Soong, L., and Shi, H. (2019) Sex- and developmental stage-dependent effects of fluorene-9-bisphenol exposure on emotional behaviors in mice, *Chemosphere*, 225, 890-896.
- Jiao, X., Ding, Z., Meng, F., Zhang, X., Wang, Y., Chen, F., Duan, Z., Wu, D., Zhang, S., Miao, Y., and Huo, L. (2019) The toxic effects of Fluorene-9-bisphenol on porcine oocyte in vitro maturation, *Environmental Toxicology*, 35, 152-158.
- Jin, M., Dang, J., Paudel, Y. N., Wang, X., Wang, B., Wang, L., Li, P., Sun, C., and Liu, K. (2021) The possible hormetic effects of fluorene-9-bisphenol on regulating hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish, *Science of The Total Environment*, 776, 145963.
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., Rahman, I. (2015) A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, 241-258.
- Kahn, L.G., Philippat, C., Nakayama, S.F., Slama, R., and Trasande, L. (2020) Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health, *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8, 703-718.
- Karabulut, H., and Gülay, M.Ş. (2016) Antioksidanlar, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2016, 1 (1), 65-76.
- Kocataş, A. (2014). *Ekoloji-çevre biyolojisi*. İstanbul: Dora Basımevi, 597.
- Kotiloğlu, S., Arslan, P., Akça, G., Günal, A.Ç. (2022) Are BPA-free plastics safe for aquatic life? - Fluorene-9-bisphenol induced thyroid-disrupting effects and histopathological alterations in adult zebrafish (*Danio rerio*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 260, 109419.
- Lauretta, R., Sansone, A., Sansone, M., Romanelli, F., and Appetecchia, M. (2019). Endocrine disrupting chemicals: effects on endocrine glands, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 21(10), 178.
- Lopes-Lima, M., Gürlek, M.E., Kebapçı, Ü., Şereflişan, H., Yanık, T. and Froufe, E. (2021) Diversity, biogeography, evolutionary relationships, and conservation of Eastern Mediterranean freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 163, 107261.
- Lynch, A.E., Noble, L.R., Jones, C. S., and Routledge, E.J. (2022) Common aquatic pollutants modify hemocyte immune responses in *Biomphalaria glabrata*. *Frontiers in Immunology*, 13, 839746.
- Mi, P., Zhang, Q.P., Zhang, S. H., Wang, C., Zhang, S. Z., Fang, Y. C., Gao, J. Z., Feng, D. F., Chen, D. Y. and Feng, X. Z. (2019) The effects of fluorene-9-bisphenol on female zebrafish (*Danio rerio*) reproductive and exploratory behaviors, *Chemosphere*, 228, 398-411.

- 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*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110922.
- Murata, M., and Kang, J.H. (2018) Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways, *Biotechnology Advances*, 36(1), 311-327.
- İnternet: National Institute of Environmental Health Sciences (2020). *Endocrine Disruptors and Your Health*. web: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/index.cfm>. Son Erişim tarihi: 06.06.2022.
- Öktener, A. (2004). A preliminary research on mollusca species of some freshwaters of Sinop and Bafra, *Gazi University Journal of Science*, 17(2), 21-30.
- Rochester, J. R. (2013) Bisphenol A and human health: A review of the literature, *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155.
- Ruffmann, R., and Wendel, A. (1991) GSH rescue by N-acetylcysteine, *Klin Wochenschr*, 69(18), 857-62.
- Selmeci, L., Seres, L.İ Antal, M., and Lukacs, J. (2005) Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 43(3), 294-7.
- Sun, L., Ling, Y., Jiang, J., Wang, D., Wang, J., Li, J., Wang, X., and Wang, H. (2020) Differential mechanisms regarding triclosan vs. bisphenol A and fluorene-9-bisphenol induced zebrafish lipid-metabolism disorders by RNA-Seq, *Chemosphere*, 251, 126318.
- Tang, Z.R., Xu, X.L., Deng, S.L., Lian, Z. X., and Yu, K. (2020) Oestrogenic Endocrine Disruptors in the Placenta and the Fetus, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1519.
- Taylan, Z. S., and Özkoç, H. B., (2007). Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği, *Balıkesir üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9 (2), 17-33.
- Trefts, E., Gannon, M., and Wasserman, D. H. (2017) The liver, *Current Biology*, 27, 1141-1155.
- Tutanç, L., Cansız, D., Alturfan, E., Alturfan, A. (2021) Endocrine Disrupting Chemicals and Their Use in Textile Industry, *Experimed*, 11(2), 130-9.
- Uçkun, M., and Uçkun, A.A. (2021) Tatlı Su Midyelerine (Unionidae) imidakloprit uygulanmasının solungaç ATPaz aktiviteleri üzerine etkisi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 37, 1.
- Vanderbong, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., and Welshons, W. V. (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA), *Reproductive Toxicology*, 24, 139-177.

- Vaughn, C.C. (2016) Ecosystem services provided by freshwater mussels, *Hydrobiologia*, 810, 15-27.
- Wang, L., Zhuang, T., Li, F., and Wei, W. (2019) Fluorene-9-bisphenol inhibits epithelial-mesenchymal transition of human endometrial cancer Ishikawa cells by repressing TGF- $\beta$  signaling pathway, *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 27407-27413.
- Xu, X., Dong, F., Yang, Y., Wang, Y., Wang, R., and S., x. (2015) Sex-specific effects of long-term exposure to bisphenol-A on anxiety- and depression-like behaviors in adult mice, *Chemosphere*, 120, 258-266
- Yang, L., Guo, X., Mao, X., Jia, X., Zhou, Y., Hu, Y., Sun, L., Guo, J., Xiao, H., and Zhang, Z. (2021) Hepatotoxicity of Fluorene-9-Bisphenol (BHPF) on CD-1 mice, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 219, 112298.
- Zhang, H., Ding, T., Luo, X., Li, J. (2021) Toxic effect of fluorene-9-bisphenol to green algae *Chlorella vulgaris* and its metabolic fate, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 216, 112158.
- Zhang, S., Xu, Y., Zhang, S., Zhao, C., Feng, D., and Feng, X. (2022) Fluorene-9-bisphenol exposure decreases locomotor activity and induces lipid-metabolism disorders by impairing fatty acid oxidation in zebrafish, *Life Sciences*, 294, 120379.
- Zhang, Z., Hu, Y., Guo, J., Yu, T., Sun, L., Xiao, X., Zhu, D., Nakanishi, T., Hiromori, Y., Li, J., Fan, X., Wan, Y., Cheng, S., Li, J., Guo, X., and Hu, J. (2017) Fluorene-9-Bisphenol is anti-oestrogenic and may cause adverse pregnancy outcomes in mice, *Nature Communications*, 8, 14585.







*Gazili olmak ayrıcalıktır...*