

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**4-T-BÜTİL BENZOİK ASİDİN ZEBRA BALIĞI SİNİR SİSTEMİ
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Tarık DİNÇ

Biyoloji Anabilim Dalı

ŞUBAT 2023

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**4-T-BÜTİLBENZOİK ASİDİN ZEBRA BALIĞI SİNİR SİSTEMİ
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Tarık DİNÇ

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ

ŞUBAT 2023

Tarık DİNÇ tarafından hazırlanan “4-t-Bütilbenzoik Asidin Zebra Balığı Sinir Sistemi Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 02.02.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı :	Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN Marmara Üniversitesi	
Jüri Üyesi :	Prof. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ (Danışman)..... Sakarya Üniversitesi	
Jüri Üyesi :	Prof. Dr. Hüseyin AKSOY Sakarya Üniversitesi	
Jüri Üyesi :	Prof. Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK Sakarya Üniversitesi	
Jüri Üyesi :	Doç. Dr. Hafize Sibel ÖZESEN ÇOLAK İstanbul Üniversitesi	



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “4-t-Bütilbenzoik Asidin Zebra Balığı Sinir Sistemi Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, etik kurul onay belgesi, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

02/02/2023

Tarık DİNÇ



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında çalışkanlığı, sabrı, iyi kalpliliği ile bana örnek olması dolayısıyla, değerli danışman hocam Prof. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ'ya, gerek akademik, gerekse diğer konularda bana destek olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hüseyin AKSOY'a, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, çalışma arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Cansu AKBULUT'a, yardımlarını ve desteklerini hiç zaman unutamayacağım Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyeleri ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarına katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi Sucul Omurgalı Canlı Deney Ünitesi çalışanlarına, çalışma materyalleriyle ilgili Sayın Arş. Gör. Dr. Sezen TOKSOY KÖSEOĞLU'na, maddi ve manevi destekleri, düzeltme ve önerileri için sevgili eşim Lamia SARI DİNÇ'e ve değerli vakitlerinden çaldığım değerli aileme teşekkür ederim.

Tarık DİNÇ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ŞİMGELER	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Çevre Kirliliği	5
2.2. Endokrin Bozucular	6
2.2.1. 4-tert-bütilbenzoik asit	9
2.3. Zebra Balığı	13
2.3.1. Zebra balığı sinir sistemi yapısı	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Para-Tert Bütil Benzoik Asit	17
3.2. Zebra Balıklarından Embriyo Toplanması	17
3.3. Zebra Balığı Embriyo ve Larvalarında Ptbba Lc ₅₀ Değerlerinin Tespiti	17
3.4. Doz Uygulanması	18
3.5. Teratolojik Özelliklerin Belirlenmesi	18
3.6. Histolojik Analizler	18
3.6.1. Embriyo histolojisi	18
3.6.2. Fiksasyon	18
3.6.3. Dehidrasyon	19
3.6.4. Şeffaflaştırma ve parafin bloklara gömme	19
3.6.5. Kesit alma	19
3.6.6. Boyama işlemleri	20
3.6.6.1. Hematoksilen-eosin boyaması	20
3.6.6.2. Toluidin mavisi boyaması	20
3.6.7. İstatistik hesaplamalar	21
4. SONUÇLAR	23
4.1. Zebra Balıklarında Ptbba Lc ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	23
4.2. Zebra Balıklarında Ptbba Gelişim Bozukluğu Sonuçları	24
4.2.1. Zebra balığı ptbba uygulaması ölüm oranı	24
4.2.2. Zebra balığı ptbba uygulaması koryondan çıkma oranı	26
4.2.3. Zebra balığı ptbba uygulaması gelişim bozukluğu testi	27
4.2.3.1. Kontrol grubu	28

4.2.3.3. 0,178 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu.....	31
4.2.3.4. 0,356 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu.....	35
4.2.3.5. 0,890 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu.....	40
4.3. Zebra Balıklarında Ptba Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	44
4.3.1. Histopatolojik deneyler	44
4.3.1.1. Hematoksilen & eosin boyaması.....	44
4.3.1.2. Toluidine mavisi boyaması	59
5. TARTIŞMA	65
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	79



KISALTMALAR

AB	: Avrupa Birliği
ADHD	: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (Attention Deficit Hyperactivity Disorder)
ASD	: Otizm Spekturum Bozukluğu (Autism spectrum disorder)
BMHCA	: 3-(4-tert-butilfenil)-2-metilpropanal
BPA	: Bisfenol A
CDR	: Kimyasal Veri Raporlama (Chemical Data Reporting)
CoA	: Koenzim A
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dpf	: Döllenmeden sonra geçen gün
E₂	: 17 β -estradiol
EE₂	: 17 α -etinilestradiol
EBB	: Endokrin Bozucu Bileşikler
ECHA	: Avrupa kimyasallar kurumu (European Chemicals Agency)
EPA	: Çevre Koruma Kurumu (Environment Protection Agency)
ERR α	: Östrojen reseptörü α (Estrogen-Related Receptor Alpha)
ESPA	: Avrupa Stabilizatör Üreticileri Birliği (European Stabiliser Producers Association)
EU RAR	: Avrupa Birliği Risk Deđerlendirme Raporu (European Union Risk Assessment Report)
EU RER	: Avrupa Birliği Düzenli Ekonomik Raporu (European Union Regular Economic Report)
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
hpf	: Döllenmeden sonra geçen saat
IQ	: Zeka Katsayısı (Intelligence Quotient)
LC₅₀	: Ortalama Öldürücü Konsantrasyon
LC-HRMS	: Sıvı Kromatografiye Bağlı Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometrisi
LD₅₀	: Ortalama Öldürücü Doz

LOAEL : Olumsuz Etkinin Gözlemlendiği En Düşük Seviye (Lowest Observed Adverse Effect Level)

MSS : Merkezi Sinir Sistemi

NAD : Nikotinamid Adenin Dinükleotit

PBDE : Polibromlu Difenil Eter

PTBBA : 4-tert butil benzoik asit

PVC : Poli Vinil Klorür

RIFM : Koku Materyelleri Araştırma Enstitüsü (Research Institute for Fragrance Materials)

TBT : Tribütülin

TSCA : Toksik Maddeler Kontrol Yasası (Toxic Substances Control Act)

UV-A : Morötesi A Bandı (UltraViolet A Band (315–400 nm))



SİMGELER

°C	: Santigrad derece [Birim]
µg	: Mikrogram [Birim]
µM	: Mikromolar [Birim]
kg	: Kilogram [Birim]
l	: Litre [Birim]
Lbs	: Libre [Birim]
M	: Molar [Birim]
m ³	: Metreküp [Birim]
mg	: Miligram [Birim]
ml	: Mililitre [Birim]



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Ptbba'nın genel özellikleri	10
Tablo 2.2. Ptbba'in diğer canlılar üzerine etkileri	11
Tablo 3.1. Embriyo histolojisi için fiksatif uygulaması	19
Tablo 3.2. Embriyo histolojisi için dehidrasyon işlemleri	19
Tablo 3.3. Embriyo histolojisi için şeffaflaştırma ve parafine gömme işlemleri	19
Tablo 3.4. Hemotoksilen & eosin boyama işlemi	20
Tablo 3.5. Toluidin mavisi boyaması	21
Tablo 4.1. Zebra balığı embriyo ve larvalarında 120 saate kadar ptbaa uygulamasında lc_{50} değerleri	23
Tablo 4.2. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbaa uygulama dozlarında gözlenen hayatta kalma oranı tablosu (sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir). (n=24)	24
Tablo 4.3. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen ölüm oranları tablosu.	25
Tablo 4.4. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen koryondan çıkma oranı tablosu.	26
Tablo 4.5. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen anomali sayılarını belirten tablo.	27



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Ptba'nın moleköl yapısı	11
Şekil 2.2. Zebra balığı beyninin gelişimi. embriyonik zebra balığı beyninin (30 hpf) şematik gösterimi.	15
Şekil 4.1. Zebra balığı embriyo ve larvalarında ptba uygulamasının lc_{50} değerlerinin belirlenmesi sırasında ölüm oranı.	23
Şekil 4.2. Zebra balıklarında ptba lc_{50} değerlerinin belirlenmesi sırasında koryondan çıkış başarısı (yüzde± standart sapma).	24
Şekil 4.3. Zebra balığı embriyo ve larvalarında 120 saatlik ptba uygulama dozlarında gözlenen ölüm oranları şekli. (sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir).	25
Şekil 4.4. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptba uygulama dozlarında gözlenen ölüm oranları. (sonuçlar yüzde ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir).	26
Şekil 4.5. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptba uygulama dozlarında gözlenen koryondan çıkma oranı. (sonuçlar yüzde ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir).	27
Şekil 4.6. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptba uygulama dozlarında gözlenen anomali oranları.	28
Şekil 4.7. 48 saatlik zebra balığı embriyosu kontrol grubu	28
Şekil 4.8. 72 saatlik zebra balığı larvası kontrol grubu.	29
Şekil 4.9. 48 saatlik zebra balığı embriyosu, çözücü kontrol (%1 dmso) grubu.	30
Şekil 4.10. 120 saatlik zebra balığı larvası, çözücü kontrol grubu	30
Şekil 4.11. 48 saatlik 0,178 mg/l ptba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok).	31
Şekil 4.12. 48 saatlik 0,178 mg/l ptba doz grubu zebra balığı embriyosunda gelişim geriliğine bağlı pigmentasyon azalması.	32
Şekil 4.13. 72 saatlik 0,178 mg/l ptba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok), gelişim geriliği ve koryondan çıkmama.	32
Şekil 4.14. 72 saatlik 0,178 mg/l ptba doz grubu zebra balığı larvasında skolyoz (ok)	33
Şekil 4.15. 96 saatlik 0,178 mg/l ptba doz grubu zebra balığı larvasında sol pektoral yüzgeç gelişmemesi (ok).	33
Şekil 4.16. 96 saatlik 0,178 mg/l ptba doz grubu zebra balığı embriyosunda gelişim geriliği ve koryondan çıkmama.	34
Şekil 4.17. 120 saatlik 0,178 mg/l ptba doz grubu zebra balığı larvasında skolyoz (ok).	34
Şekil 4.18. 48 saatlik 0,356 mg/l ptba doz grubu zebra balığı embriyosunda kranofasiyal ve omurga gelişim anomalisi (ok), ok ucunda perikardial ödemle birlikte azalmış olarak kalp atışı gözlenlenmiştir.	35

Şekil 4.19. 48 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok)	36
Şekil 4.20. 48 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda pigment eksikliği, gelişim geriliği (ok).	36
Şekil 4.21. 48 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda gelişim geriliğine bağlı pigment eksikliği.....	37
Şekil 4.22. 72 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok) ve gelişim geriliği.....	37
Şekil 4.23. 72 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda kranofasiyal anomali (ok).....	38
Şekil 4.24. 72 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda sağ göz anoftalmisi (gözün oluşmaması) (Ok)	38
Şekil 4.25. 72 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda sağ göz anoftalmisi (gözün oluşmaması) (yıldız), perikardiyal ödem (siyah ok) ve hemoralji (beyaz ok).....	39
Şekil 4.26. 120 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok) , gelişim geriliği ve koryondan çıkmama.	39
Şekil 4.27. 120 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok) , gelişim geriliği ve koryondan çıkmama.	40
Şekil 4.28. 48 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok).	41
Şekil 4.29. 72 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok).	41
Şekil 4.30. 72 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok).	42
Şekil 4.31. 96 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok) ve gelişim geriliği.	42
Şekil 4.32. 96 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok), gelişim geriliği.....	43
Şekil 4.33. 120 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok), gelişim geriliği.....	43
Şekil 4.34. 24 saatlik zebra balığı kontrol grubu, vk: vitellüs kesesi, ks: koku soğancığı epiteli, t: opik tektum, tv: tektal ventrikül, d: diensefelon, m: mesensefalon. (40x h&e boyama).....	44
Şekil 4.35. 24 saatlik zebra balığı kontrol grubu, tv: tektal ventrikül, c: serebellum, 4v: 4.ventrikül, mo:medulla oblangata ve rombomerler. (40x h&e boyama). 45	
Şekil 4.36. 24 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu, g: göz, tv: tektal ventrikül, cr: cerebellum, ot: optik tektum, 4v: 4.ventrikül, y: yüzme kesesi t:tegmentum (40x h&e boyama).....	45
Şekil 4.37. 24 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu, ks: koku soğancığı ot: optik tektum, (40x h&e boyama).....	46
Şekil 4.38. 48 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu, g: göz, tv: tektal ventrikül, cr: cerebellum, ot: optik tektum, 4v: 4.ventrikül, ov: otik vesikül t:tegmentum mo:medulla oblangata (40x h&e boyama)	46
Şekil 4.39. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası alt lobda hemoralji (40x h&e boyama)	47
Şekil 4.40. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 7 günlük zebra balığı larvası alt lobda nöronal atrofi (40x h&e boyama).....	47

Şekil 4.41. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 7 günlük zebra balığı larvası işareti alt lobda nöronal nöronal dejenerasyon, (ok) (40x h&e boyama).	48
Şekil 4.42. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi (40x h&e boyama).....	48
Şekil 4.43. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası, telesefanlonda kanama (ok), vakuolizasyon (yıldız) (40x h&e boyama) .	49
Şekil 4.44. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası, alt lobda nöronal atrofi (halka içi), vakuolizasyon (yıldız), piknotik hücre görünümünde artış (40x h&e boyama)	49
Şekil 4.45. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 48 saatlik zebra balığı larvası yıldız işareti telesefanonda kanama (yıldız) (40x h&e boyama).....	50
Şekil 4.46. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 3 günlük zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi (40x h&e boyama).....	50
Şekil 4.47. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 3 günlük zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi (40x h&e boyama).....	51
Şekil 4.48. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası alt lobda nöronal nöronal dejenerasyon, genişleyen hücre gövdesi (ok) (40x h&e boyama).....	51
Şekil 4.49. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası alt lobda nöronal nöronal dejenerasyon, genişleyen hücre gövdesi(ok) (40x h&e boyama).....	52
Şekil 4.50. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası halka içi cerebellumda nöronal atrofi (40x h&e boyama).	52
Şekil 4.51. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası cerebellumda nöronal dejenerasyon (ok) (40x h&e boyama).	53
Şekil 4.52. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası ön lobda piknotik çekirdek (ok) (40x h&e boyama).	53
Şekil 4.53. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası telensefalonda nöronal atrofi, (40x h&e boyama).....	54
Şekil 4.54. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası halka içi telensefalonda nöronal atrofi, (40x h&e boyama).....	54
Şekil 4.55. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası (yıldız) nöronal atrofi (40x h&e boyama).....	55
Şekil 4.56. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası yıldız nöronal atrofi (40x h&e boyama).....	55
Şekil 4.57. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 5 günlük zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi, (40x h&e boyama).....	56
Şekil 4.58. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 5 günlük zebra balığı larvası halka içi telensefalonda nöronal atrofi, (40x h&e boyama).....	56
Şekil 4.59. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 6 günlük zebra balığı larvası halka içi telensefalonda nöronal atrofi, (40x h&e boyama).....	57
Şekil 4.60. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 7 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok), nöronal atrofi (yıldız) (40x h&e boyama).....	57
Şekil 4.61. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 7 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal atrofi (halka içi), (40x h&e boyama)	58
Şekil 4.62. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok), (40x h&e boyama).	58

Şekil 4.63. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok) (40x h&e boyama).....	59
Şekil 4.64. 24 saatlik zebra balığı embriyo, kontrol grubu (40x toludin mavisi boyama) ot: optik tektum, t: tegmentum, cr:serebellum, mo: medulla oblangata....	59
Şekil 4.65. 48 saatlik zebra balığı embriyo, kontrol grubu (40x toludin mavisi boyama) 4v: 4. ventrikül, c:serebellum, mo: medulla oblangata	60
Şekil 4.66. 24 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu (40x toludin mavisi boyama) 4v: 4. ventrikül, cr:serebellum, mo: medulla oblangata, öb: ön beyin, ot: optik tektum, t: tegmentum	60
Şekil 4.67. 72 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu (40x toludin mavisi boyama) cr:serebellum, mo: medulla oblangata, ot: optik tektum, t: tegmentum, ov:otik vesikül	61
Şekil 4.68. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası , alt lobda piknotik çekirdek (ok) (40x toludin mavisi boyama).....	61
Şekil 4.69. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası ok işaretleri alt lobda piknotik çekirdek (ok), nöronal dejenerasyon (yıldız) (40x toludin mavisi boyama).....	62
Şekil 4.70. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi (40x toludin mavisi boyama).....	62
Şekil 4.71. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok) (40x toludin mavisi boyama). 63	
Şekil 4.72. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok), alt lobda nöronal atrofi (halka içi) (40x toludin mavisi boyama).	63
Şekil 4.73. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı telensefalonda piknotik çekirdek (ok) (40x toludin mavisi boyama).....	64

4-T-BÜTİLBENZOİK ASİDİN ZEBRA BALIĞI SINIR SİSTEMİ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Çevre kirliliği günümüzde artan bir sorundur. Kirleticiler toprak, hava ve su ekosistemi üzerinde toksik özellikler göstererek, yaşayan canlılara da zararlı etkiler göstermektedirler. Bu etkileri gösteren zararlı maddeler arasında hormon sistemini bozan endokrin bozucular yer almaktadır. Bu endokrin bozuculardan biri de plastik katkı maddelerinden olan, 4-tert bütıl benzoik asittir (PTBBA). Polimerizasyon durdurucu madde ve PVC ısı stabilizörü olarak sanayide kullanılmaktadır. Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda, PTBBA'nın sığınlarda ve farelerde erkek üreme sisteminde zararlı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. ancak sucul ekosistemdeki zararları konusunda yapılan çalışmalar çok sınırlıdır. sucul ekosistemler için zebra balığı, hızlı gelişimi, embriyoların şeffaf olması, bakımının ucuz olması, çok sayıda embriyo vermesi, embriyonik gelişimi, sinir sistemi gelişimi ve insanlara genetik olarak benzerliği nedeniyle çok kullanılan bir model organizmadır. PTBBA'nın zebra balığı sinir sistemi gelişimi üzerine etkileri bilinmemektedir. Ayrıca teratolojik etkilerinin olabileceğine dair yeterli çalışma bulunmamaktadır.

PTBBA'in zebra balıkları sinir sistemi üzerine etkilerini araştırmak için balıklar İstanbul Üniversitesi Sucul Omurgalı Canlı Deney Ünitesi'nden temin edildi. 120 saatlik LC₅₀ düzeyini belirlemek için logaritmik dozlarda 100-0,01 mg/l 3 tekrarlı denemeler yapıldı. 24 saatlik LC₅₀ 3,900 ± 2,692 mg/l, 120 saatlik LC₅₀ 1,775 ± 0,321 mg/l olarak bulundu. Teratolojik etkilerinin araştırılması için 120 saatlik LC₅₀ dozunun %50'si, %20'si ve %10'u olacak şekilde 3 tekrarlı olarak 120 saat boyunca döllenmiş yumurtaların ölüm, koryondan çıkma ve anomali oranları kaydedildi. Histolojik analizler için 15 gün boyunca örnekler alındı, rutin doku takibi işlemlerinden sonra, Hematoksilen & Eosin ve Toludin mavisi boyamaları yapıldı.

PTBBA'in zebra balıkları gelişimi üzerinde olumsuz etkileri arasında gelişim geriliği, pigmentasyonda azalma, omurga bozukları, kranofasiyel anomaliler ve organ eksikleri gibi teratolojik etkileri görüldü. Histoloji analizlerde, artan dozlarda vakuolleşme, atrofi, piknotik hücreler ve bölgesel atrofiler görüldü.

PTBBA'nın canlılarda erkek üreme sistemine olan olumsuz etkileri ulaşılan literatürler sonucunda bilinmektedir. Ancak bu çalışmada literatürden farklı olarak zebra balıklarında PTBBA'nın teratolojik özellikleri ortaya çıkmış, gelişim aşamasında PTBBA'in nörotoksik etkileri de ortaya konuldu.

Plastiklerde kullanılan PTBBA'nın, sulara ve diğer ortamlarda bulunmasından dolayı canlılarda hormonları etkileyerek üreme sistemini , karaciğer, böbrekler ve sinir sistemleri üzerine zararlı etkileri mevcuttur. bunun yanında farklı kimyasal maddelerin vücut içerisinde metabolize olması ile, yan ya da sonuç ürün olarak PTBBA'nın ortaya çıkmakta ve dolayısı ile PTBBA maruziyeti artmaktadır. Bu maddelerin ve

PTBBA'nın hukuki olarak daha fazla kısıtlanması ve yasaklanması yoluyla düzenlenmesi çevre insan sağığı açısından faydalı olacaktır.



INVESTIGATION OF THE EFFECT OF 4-T-BUTYL BENZOIC ACID ON ZEBRAFISH NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT

SUMMARY

Environmental pollution is a pervasive issue that is rapidly expanding across the globe, threatening the health and well-being of living organisms. Human activities such as industry, agriculture, urbanization, transportation, and tourism are the leading causes of environmental pollution. These activities release a wide range of pollutants into the air, water, and soil ecosystems, resulting in harmful consequences for the environment.

Among the many harmful substances that affect the environment, endocrine disruptor compounds (EDCs) are among the most concerning. EDCs are chemical substances that interfere with the endocrine system by mimicking or blocking natural hormones. This interference causes harmful effects on organisms, leading to reproductive disorders, developmental problems, and other health issues. Recent studies have revealed that EDCs can also function as metabolic disruptors with fetal and pre-adolescent exposure.

Several persistent organic pollutants, phthalates, and BPA have been associated with adiposity, obesity, and hypertension. In addition, dioxins and phthalates may also be associated with hypertension. Among the endocrine disruptors, 4-tert butyl benzoic acid (PTBBA) is one of the plastic additives used in industry as a polymerization inhibitor and Polyvinyl chloride (PVC) heat stabilizer.

PTBBA is particularly problematic as it harms the male reproductive system and disrupts the endocrine system by forming secondary or final metabolites from different chemical substances. Previous studies have shown that it harms the reproductive organs of rats, causing a decrease in sperm count, mobility, and morphological abnormalities. However, the impact of PTBBA on the aquatic ecosystem is relatively unknown.

Zebrafish have become a famous model organism in marine ecosystem research due to their various advantages, such as fast development, transparent embryos, low maintenance, many embryos, and genetic similarity to humans. They have been studied in embryonic and nervous system development, with their physiology and neuroanatomy parallel to those of humans.

The zebrafish nervous system becomes functional within a few days, and all the main components of the brain are present five days after fertilization. The central nervous system of the zebrafish develops from the neural plate, an ectoderm epithelial layer on the embryo's dorsal surface. Brain ventricles form within 48 hours after fertilization, and the embryo begins to respond to touch stimuli. In certain regions of the zebrafish's central nervous system, such as the hypothalamus, optic pathways, olfactory system, spinal cord, and cranial nerves, a structural homology like the corresponding areas of the human brain can be observed.

Despite the extensive studies conducted on zebrafish, the effects of PTBBA on their nervous system development remain unknown. Moreover, there is a lack of sufficient research demonstrating its potential teratological effects. Therefore, further studies are necessary to understand the effects of PTBBA on zebrafish and its potential implications on marine ecosystems. With the help of zebrafish as a model organism, researchers can gain insights into the effects of various environmental factors on the nervous system development of aquatic organisms, providing valuable information for conservation efforts and environmental protection.

To investigate the effects of PTBBA on the nervous system of zebrafish, fish were obtained from Istanbul University Aquatic Vertebrate Live Experiment Unit. After one week of acclimatization, fishes maintained a 12:12 photoperiodic cycle. The lethal concentration of PTBBA in zebrafish is not known. To determine the LC_{50} was performed at logarithmic doses of 100-0.01 mg/l for three repeated trials. However, since PTBBA 100 mg/l dose did not dissolve well enough in the water, all doses were administered after dissolving 1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO), which is not harmful to zebrafish. 90% of the test fluids by volume were changed at approximately the same time each day. The 24-hour LC_{50} was 3.900 ± 2.692 mg/l, and the 120-hour LC_{50} was 1.775 ± 0.321 mg/l. To investigate its teratological effects, mortality, hatching, and anomaly rates were recorded for 120 hours with three repetitions of 50%, 20%, and 10% of the 120-hour LC_{50} dose (0.89, 0.356, and 0.178 mg/l, respectively). The developmental characteristics of the embryos were checked every 24 hours, and their photos and videos were taken with a BAB ST45 brand stereo microscope and a BAB CCD 2 MP camera. Samples were taken for histological analysis for 15 days. Embryo and larvae samples were fixated with Bouine's solution after that, routinely treated with 70-100% alcohol series than xylene—paraffin-embedded samples, sliced with Leica RM2125 RT rotary microtome with 5 μ m thickness. Samples stained with hematoxylin-eosin and toluidine blue and photographed with Leica DM1000 and MC170 HD CCD camera.

Among the adverse effects of PTBBA on zebrafish development, the primary anomaly was unhatched embryos due to a slower development rate. Teratological effects such as growth retardation, decreased pigmentation, spinal disorders, craniofacial anomalies, pericardial edema, and organ deficiencies were observed. The control and solvent control groups had no anomalies whatsoever. Lower and middle dose groups had increased anomalies, respectively. In the 0.890 mg/l dose group, anomaly numbers were decreased, but the seriousness of anomalies increased. Histology analysis showed normal tissue structure in control and solvent control groups. In low doses, hemorrhage and neural atrophy were observed. In medium doses increasing vacuolization, swollen cell bodies, pycnotic cells, and regional atrophies were observed. In high doses, neuronal atrophies were detected in the brain and medulla oblongata area.

The harmful effects of PTBBA on the male reproductive system in living things were known in the literature. However, this study revealed the teratological properties of PTBBA in zebrafish. In addition, the neurotoxic effects of PTBBA were observed during the 15 dpf stage.

PTBBA in plastics harms living things due to its presence in water and other environments. In addition, different chemicals are metabolized in the body, increasing PTBBA exposure. Given the detrimental impact of PTBBA and other EDCs on the

environment, it is crucial to reduce the use and release of such harmful substances. The implementation of regulatory measures, such as the ban on the use of certain chemicals and the enforcement of strict pollution control laws, can help mitigate the effects of EDCs on the environment. Furthermore, greater public awareness and education can help promote sustainable practices and encourage individuals to make environmentally responsible choices.

Environmental pollution is a significant issue that severely threatens living organisms' health and well-being. It is imperative that regulatory measures are put in place and greater public awareness and education are promoted to help reduce the impact of these harmful substances on the environment. By taking responsible action, we can help protect the environment and safeguard the health of living organisms for generations to come.





1. GİRİŞ

Günümüzde birkaç kimyasal madde ile, bazı metaller ve metal türevleri (kurşun, arsenik ve metil cıva) nörotoksik maddeler olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak yeni maddelerin nörotoksik olarak tanımlamak için çalışmalar sınırlıdır. Bu sınırlamalar geleneksel olarak çalışılan *in vivo* modellerin (insan olmayan primatların ve kemirgenlerin) zahmetli, zaman alıcı ve maliyetli olmasından kaynaklanmaktadır (Grandjean vd., 2014). Zebra balığı gelişimsel nörotoksistide *in vivo* çalışmaları için uygun canlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Zebra balığı (*Danio rerio*) erişkinlikte yaklaşık 4-4,5 cm uzunluğunda akvaryumlarda kullanılan küçük bir tatlısu balığıdır. Çeşitli toksikoloji uygulamaları için bir hayvan modeli olarak popülerlik kazanmıştır ve biyolojik çalışmalar ve kimyasal toksisite çalışmaları için en pratik modellerden biri olarak saygınlık kazanmıştır (Powers, 1989; Tsang, 2010).

Zebra balığı gelişimsel toksikoloji alanında farklı avantajlara sahiptir. Son yıllarda, bu hayvan modeli kullanım kolaylığı ve insanla genetik benzerliği (~%70) nedeniyle popülerlik kazanmıştır. Embriyonun şeffaflığı nedeniyle ışık mikroskopu kullanılarak gelişimini izlemek mümkündür (Ton vd., 2006). Diğer modellere (fare, sıçan vb.) kıyasla bu bariz avantaja ek olarak, bakımının ucuz ve kolay olması, haftalık olarak nispeten çok miktarda yumurta bırakılabilmesi ve gelişme hızının yüksek olması nedeniyle kısa sürede büyük miktarda veri toplamayı mümkün kılar. Zebra balığı ile insanlar arasında farklı morfolojik ve fizyolojik farklılıklar olmakla birlikte, yabancı maddelere karşı verilen reaksiyonlar benzerdir (Carvan vd., 2000, 2004). Üreme toksisitesi, davranış bozuklukları, teratojenез, kardiyotoksisite, ototoksisite vb. neden olan kimyasallara verilen tepkiler büyük ölçüde özdeştir. Hayvan modelinin yüksek verimlilikteki doğası ve birlikte alınan toksikolojik yolların korunması, gelişimsel toksikolojik taramada zebra balığının kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır (Blader vd., 2000). Omurgalı yapıları nedeniyle daha küçük modellere (*Caenorhabditis elegans* veya *Drosophila* gibi) kıyasla beklenen insan sonuçlarıyla korelasyon için biyolojik

açından daha uygundurlar. Erken yaşam evreleri omurgalılarda oldukça korunmuştur (Laale, 1977).

Zebra balığı yumurtalarında döllenmeden yaklaşık 6 saat sonra başlayan gastrulasyonla vücut planı oluşturulur ve sinir sistemine neden olacak hücreler embriyo içinde farklı konumlara hareket eder (Kimmel vd., 1990). Diğer omurgalılarla olduğu gibi, zebra balığı merkezi sinir sistemi (M.S.S.) embriyonun dorsal yüzünde ektoderm epitel tabakası olan sinir plakasından oluşur. Gastrulasyonun sonunda (döllenmeden 9-10 saat sonra), nöral plaka bir tüp haline gelir. Gelecek 6 saat boyunca sinir tüpü, ayrı beyin bölünmelerine neden olan ayrı bölgelere bölünür. Döllenmeden 24 saat sonra beyin morfogenezini ilerletilir ve nöronların en erken kümeleri aksonlarla birbirine bağlanırken beyin diensefalon ve telensefalon, orta beyin, arka beyin ve omurilik gibi ön beyin bölgelerine bölünür (Hanneman vd., 1989; S. W. Wilson vd., 1990). Döllenmeden 48 saat sonra beyin ventrikülleri oluşur ve embriyo, dokunma uyarılarına yanıt vermeye başlar (Kimmel vd., 1974, 1990; Eisen, 1991; Raible vd., 1992; Odenthal vd., 1996; Kawai vd., 2001). Glial hücre alt türleri, oligodendrositler, Schwann hücreleri ve astrositler döllenmeden 4 gün sonra zebra balığı larvalarında bulunur (Kawai vd., 2001; Brösamle vd., 2002).

Hipotalamus, optik yollar, koku sistemi, omurilik ve kafa sinirleri gibi zebra balığı M.S.S.'nin bazı bölgelerinde, insan beyninin ilgili alanlarına net bir yapısal homoloji bulunur. Gelişmekte olan telesensefalon, örneğin insan karşılığıyla karşılaştırıldığında zebra balığında çarpıcı biçimde farklı bir morfolojidedir. Bununla birlikte, insan temel gangliyonuna benzediğine inanılan alanlar, zebra balığı ön beyinde olduğu gibi memeli striatumunun ve hipokampusün homologu olarak da tanımlanmıştır (Rink vd., 2001, 2004; Wullimann vd., 2002, 2004; Mueller vd., 2009; De Esch vd., 2012).

4-tert-bütilbenzoik asit, (para-tert-bütil benzoik asit, PTBBA) bir benzoik asit türevi olup, organik bir ara maddedir. Renksiz akıcı kristal veya kristal tozdur. Alkid reçine modifikatörü, kesme emülsiyonu (Metal kesimleri için soğutma yağlama sıvısı), yağlama yağı katkı maddesi, polipropilen nükleasyon ajanı, pas önleyici ve stabilizatör üretimi için kullanılır. Sanayi bilgilerine göre, PTBBA AB'de ağırlıklı olarak PVC termal stabilizatörü olarak kullanılmaktadır. PTBBA'nın AB'de ikinci en önemli kullanımı Alkid ve poliester reçineleri üreten polimerler endüstrisinde süreç

regülatörüdür (zincir durdurucu ajan). PTBBA'nın küçük bir kısmı PTBBA esterleri üretmek için kimya endüstrisinde ara madde olarak kullanılır. PTBBA  retimini AB de 2006 yılında durdurulmuŗtır. 2009 yılında AB yıllık arzı 2000-4000 ton arasında olduğu tahmin edilmektedir (EU RAR, 2009).





2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çevre Kirliliği

Çevre kirliliği, sanayi toplumunun gelişmesi, genişlemesiyle ve 20. yüzyıldan itibaren artan nüfus yoğunluğuyla bağlantılı bir sorundur. Çevresel kirlenme, belirli amaçlar için uygun özelliklere sahip antropojenik/ksenobiyotik kimyasalların fazla üretimi ile yoğunlaşmaktadır. Endüstri, tarım, kentleşme, ulaşım, turizm ve günlük yaşam dahil olmak üzere insan faaliyetleri nedeniyle birçok farklı kirletici sınıfı çevreye girer. Başlangıçta hava kirleticileri atmosferik kirleticiler ve katı atıklar karasal kirleticiler iken sıvı atıklar sudaki kirleticilerdir. Hava, toprak, su gibi her bölmedeki kirleticilerle ilgili süreçler, yatay olarak yayılma, difüzyonla ve bozunma ile hem biyotik hem de abiyotik olarak birçok ortamlar arasında atmosferik ve deniz akıntılarında büyük ölçekli taşıma ile alışverişe yol açar. Özellikle su ortamı, antropojenik kirleticilerin ve birikmiş veya askıda kalmış su sedimanları için nihai varış noktası olarak görünmektedir.

Geçtiğimiz 80 yılda sanayi sektöründe imal edilen kimyasalların yıllık üretimi 1 milyon tondan, 400 milyon tona çıkmıştır. Her sene yaklaşık 10 milyona yakın yeni kimyasal sentezlenmektedir. (Vogelgesang, 2002; Bernhardt vd., 2017). 2020 yılında sadece Avrupa Birliğinde sağlığa zararlı kimyasal üretimi 230 milyon ton olmuştur (Eurostat, 2021). Ayrıca günlük hayatta düzenli olarak karşılaştığımız tüketici ürünlerinde, çoğu zaman birçok kimyasal bulunmaktadır. Yaygın sorunun bir yönü, endokrin aktif kimyasalların varlığıdır. Bu tür birçok kimyasal salınır ve su ekosistemlerine girer.

Suda yaşayan organizmalar sürekli olarak farklı kaynaklardan gelen çeşitli su kaynaklı toksik maddelere maruz kalmaktadırlar. Bilinmeyen toksik kimyasalların varlığı, suda yaşayan organizmalarda fizyolojik mekanizmalar üzerindeki etkileri ölçülerek tespit edilebilir (Scott ve ark., 2004). Bu nedenle, geleneksel olarak davranış, duyu, hormonal, nörolojik ve metabolik sistemler, toksisite test stratejilerinin önemli bir bileşeni olarak kabul edilmiştir. Su sistemlerinde, bazıları karasal hayvanlardan belirgin şekilde farklı olan çeşitli potansiyel toksik maddelere maruz kalma kaynakları

ve yolları mevcuttur. Sucul organizmalar, çevredeki kirletici yükler için erken uyarı ve izleme sistemleri olarak önemli bir rol oynamaktadır. Balıklar, 20.000'den fazla türle tarafından temsil edilen ve 400 milyon yılı aşkın evrimi kapsayan geniş bir çeşitlilik sergilemektedir. Sonuç olarak, balıklar oksijen ihtiyaçlarını karşılamak için günlük vücut ağırlıklarının binlerce katı kadar su süzerler. Suda yaşayan organizmaların geçirgenlikleri, türlere göre farklılık gösteren gastrointestinal sistemleri, deri ve solungaçları, kirletici alımının önemli yerleridir (Kumar vd., 2020).

2.2. Endokrin Bozucular

Çevre, endüstriyel tesisler ve yerleşim birimlerinden kaynaklanan yabancı organik bileşiklerle kirletilmektedir. Bu bileşikler arasında endokrin sisteme zarar vererek organizmanın endokrin sistemi başta olmak üzere bir savunma, üreme ve gelişim gibi birçok kritik sisteme zarar veren endokrin bozucu bileşikler (EBB) yer alır. EBB'ler Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından yapılan tanımlamaya göre “vücutta homeostaziyi koruma, üreme, gelişim ve davranıştan sorumlu olan hormonlara sentez, salgı, transport, bağlanma veya eliminasyon yoluyla müdahale eden ajanlardır”. Bu ajanlar özellikle, endüstriyel tesisler ve yerleşim birimlerinden kaynaklanan atık sularla sucul ekosisteme tanıtılmaktadır (Kavlock vd., 1996; USEPA, 1998).

Poliklorlu bifeniller, dioksinler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ftalatlar, bisfenol A, pestisitler, alkilfenoller ve ağır metaller (arsenik, kadmiyum, kurşun ve cıva) gibi çevresel kirleticilerin, endokrin sistem dengesini anlamlı düzeyde değiştirdiği gösterilmiştir. Birçok EBB mutajenik ve yüksek düzeyde karsinojeniktir (Balabanic vd., 2011).

Yapılan son çalışmalarda, E.B.B.'lerin fetal ve ergenlik öncesi maruziyetin, metabolik bozucu olarak da işlev görebildikleri belirlenmiştir. Kalıcı organik kirleticiler, BPA ve ftalatların adipozite (yağlanma) ve obezite ile ilişkili olduğu konusunda çok sayıda çalışma mevcuttur (Kumar vd., 2020). Ayrıca metabolik sendrom, insülin direnci ve tip 2 diyabet ile EBB arasında ilişkilendirilmiştir. (Lee vd., 2014), Birden fazla kalıcı organik kirleticinin, başta BPA olmak üzere, karışımlarının tip 2 diyabeti anlamlı şekilde neden olabildiği gösterilmiştir (Wu vd., 2013). Dioksin ve ftalatların, hipertansiyon ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Christensen vd., 2011).

EBB'ler çevrede her yerde bulunur ve insan vücudunu birçok farklı yollarla maruz kalarak kirletebilir. Maruziyet yolu büyük ölçüde kimyasala bağlıdır, ancak inhalasyon

ve ağızdan alım en yaygın maruz kalma yolludur (De Coster vd., 2012; Gore vd., 2015; Kabir vd., 2015). EBB'ler gıda ürünlerini kontamine edebilir ve insan tüketimine yönelik hayvan dokularında birikebilir (Cosnefroy vd., 2012). İnsanlar ve diğer en büyük yırtıcılar, normal biyolojik süreçlerin zarar görmesine yol açabilecek biyobirikim yoluyla daha yüksek dozlarda EBB'lere maruz kalabilirler. Çoğu EBB, insan ve diğer hayvan türlerinin dokularında kronik biyolojik birikime yol açan yüksek oranda lipofiliktir (Thomas Zoeller vd., 2012). Birden fazla çevresel bileşiğe kronik olarak maruz kalmanın insan fizyopatolojisi üzerinde kümülatif ve/veya sinerjik etkileri olabilir.

Çoğu EBB'nin kimyasal yapısı cinsiyet steroid hormonlarını taklit eder ve endokrin reseptörlerini bağlayabilir, bu da hormonal sinyalleme ile etkileşime yol açabilir ve üreme sistemini zararlı etkilere karşı savunmasız bırakabilir (Monneret, 2017). EPA, eşzamanlı anti-androjenik ve zayıf östrojenik aktiviteye sahip doğurganlık ve üreme sağlığı için özellikle önemli olan beş EBB sınıfını tanımlamıştır:

1. İlaçlar veya sentetik östrojenler (17 β -estradiol ve dietilstilbestrol),
2. Fitoöstrojenler (izoflavonoidler, kumestanlar, lignanlar ve stilbenler),
3. Pestisitler (organofosfatlar, karbamatlar, organoklorinler ve sentetik piretroidler),
4. Endüstriyel maddeler ve yan ürünleri (fenoller, dioksinler, ağır metaller, perflorooktanoik asit, benzoik asit türevleri),
5. Polivinil klorür (PVC), plastikleştiriciler (fitalatlar, BPA ve dioksin) ve türevleri (USEPA, 1998; Harding vd., 2006; Thomas Zoeller vd., 2012).

Araştırmalar, doğum sonrası erken dönemde EBB'lere maruz kalmanın, somatik hücrelerin gen transkripsiyonunda önemli değişikliklere yol açabileceğini, ergenlik için gerekli süreçlerin zamanlamasını değiştirerek gelişimsel gecikmelere yol açabileceğini göstermiştir (Schug vd., 2011). EBB'ler, testiküler hipotrofi, sperm sayısı ve kalitesinde düşüş, polikistik over sendromu yoluyla erkek ve kadın doğurganlığını azaltmakla ilişkilendirilmiştir (Zama vd., 2010; Schug vd., 2011). Endokrin bozucu kimyasalların, bozulmuş spermatogenez, testis kanseri, inmemiş testis ve hipospadias gibi testiküler disgenezi sendromunun başlangıcında önemli rol oynadığı görülmektedir (Schug vd., 2011; Thomas Zoeller vd., 2012; Monneret, 2017). Testiküler disgenezi sendromu, fetal yaşam sırasında embriyonik programlama ve fetal gelişimin kesintiye uğramasının sonucu olduğu düşünülmektedir (Virtanen

vd., 2005; Thomas Zoeller vd., 2012). Fitalatlar, vinklozolin, asetaminofen ve polibromlu difenil eterler (PBDE), testiküler disgenezi sendromunun başlangıcında önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir (Schug vd., 2011; Anawalt, 2013). Kadınlarda, EBB'lere kronik maruz kalma, endometriosis ve yumurtalık patolojisinin başlangıcındaki etyopatogenetik roller aracılığıyla doğurganlığı değiştirebilir (Mínguez-Alarcón vd., 2017; Rattan vd., 2017). EBB'ler, çevredeki yaygın varlıkları onları erkek ve kadın doğurganlığı için bir tehdit haline getirdiği için üzerinde çalışılması önemli olan birçok karmaşık düzenleme mekanizmasına sahiptir (Schug vd., 2011; Anawalt, 2013; Rattan vd., 2017).

Endokrin sistem, cinsel üreme ve gelişimin kontrolü ile sınırlı değildir. Endokrin bozucular tiroidin yanı sıra glukokortikoid ekseni, adrenal ve pankreatik sistemleri, yağ dokusunu ve immün veya nöroendokrin hedeflerini etkileyebilir (Laessig, S. A., McCarthy, M. M., & Silbergeld, 1999; Masuo vd., 2011; Weiss, 2012; León-Olea vd., 2014). Özellikle çeşitli nöromediatör yoluyla bilişsel sistemi olumsuz şekilde etkileyebilirler (Schantz vd., 2001). Özellikle sinir sistemi gelişimini negatif yönde (Grandjean vd., 2014) etkileyen 176 adet farklı EBB tanımlanmıştır. bunlardan 37 tanesi tiroit sistem üzerinden etki gösterirken, %80'lik geri kalan kısmı nöromodülatör olarak farklı mekanizmalar ile MSS gelişimini etkilemektedir (Seralini vd., 2021). Poliklorlanmış bifeniller ve poliklorlanmış dibenzofuranlar beyin gelişiminde davranışsal ve kognitif gerilemelere neden olabilirler (Laessig, S. A., McCarthy, M. M., & Silbergeld, 1999).

Oka ve ark., (2003), BPA'nın *Xenopus laevis* embriyolarının erken gelişimi sırasında özellikle M.S.S.'de anormal gelişim ve apoptoz ürettiğini göstermiş ve bu etkilerin gelişimsel süreçler üzerindeki östrojenik olmayan eylemlerden kaynaklandığını öne sürmüştür. (Zsarnovszky ve ark., (2005), düşük dozda bir BPA'nın sıçan embriyolarının gelişimini etkilediğini ve BPA'nın oldukça güçlü bir psödo-17 β -östradiol gibi davrandığını ve 17 β -östradiolün beyincik gelişimindeki rollerini bozduğunu bildirmiştir. Düşük dozlarda bisfenol-A bu nedenle beyin gelişimini etkileyebilir.

Endokrin bozucu bileşiklere gelişimin erken döneminde maruz kalınca hassas olan sinir sistemi üzerinde bozukluklara yol açabilir. Bu hasarlar arasında zeka katsayısının azalması (IQ), otizm spektrum bozukluğu (ASD), dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (ADHD) yer almaktadır (Bellinger, 2013). Bu hasarların oluşmasında

Merkezi Sinir Sisteminin (MSS) özellikle gelişiminin erken dönemlerinde yüksek duyarlılığın olduğu zaman aralığı birçok çalışmada gösterilmiştir. MSS gelişiminde bu zaman aralığını, doğum öncesi ve sonrasında oluşan bozukluklar, hayatın geri kalanında olumsuz etkisini gösterebilmektedir (Giussani, 2011).

Günümüzde birkaç kimyasal, bazı metaller metal ve metal türevleri (Kurşun, arsenik ve metil cıva) nörotoksik maddeler olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak yeni maddelerin nörotoksik olarak tanımlamak için çalışmalar sınırlıdır. Bu sınırlamalar geleneksel olarak çalışılan *in vivo* modellerin (insan olmayan primatların ve kemirgenlerin) zahmetli, zaman alıcı ve maliyetli olmasıdır (Grandjean vd., 2014). Zebra balığı gelişimsel nörotoksisitede *in vivo* çalışmaları için uygun canlı olarak ortaya çıkmaktadır.

2.2.1. 4-tert-bütilbenzoik asit

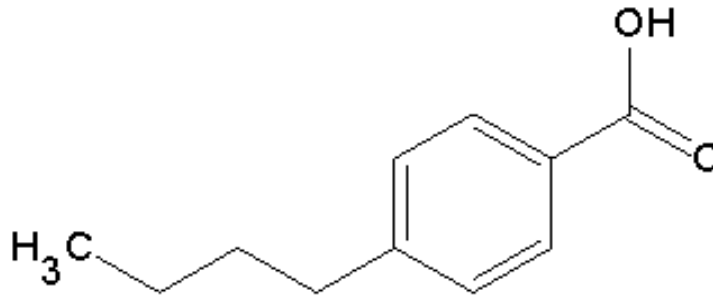
4-tert-bütilbenzoik asit, (para-tert-bütil benzoik asid, PTBBA) bir benzoik asit türevidir olup, organik bir ara maddedir (Şekil 2.1.). Renksiz akıcı kristal veya kristal tozdur (Tablo 2.1). Alkid reçine modifikatörü, kesme emülsiyonu (Metal kesimleri için soğutma yağlama sıvısı), yağlama yağı katkı maddesi, polipropilen nükleasyon ajanı, pas önleyici ve stabilizatör üretimi için kullanılır. Sanayi bilgilerine göre, PTBBA A.B.'de ağırlıklı olarak PVC termal stabilizatörü olarak kullanılmaktadır. Sert PVC de %1,5'a kadar yumuşak plastiklerde %2'ye kadar PTBBA'nın metal tuzları eklenebilmektedir (ESPA, 2006). PTBBA'nın A.B.'de ikinci en önemli kullanımı Alkid ve poliestere reçineleri üreten polimerler endüstrisinde süreç regülatörüdür (zincir durdurucu ajan). PTBBA'nın küçük bir kısmı PTBBA esterleri üretmek için kimya endüstrisinde ara madde olarak kullanılır. PTBBA üretimini A.B.'de 2006 yılında durdurulmuştur. 2009 yılında A.B. yıllık arzı 2000-4000 ton arasında olduğu tahmin edilmektedir. ((E.U. R.A.R., 2009)) 2015 yılı EPA (United States Environment Protection Agency) (A.B.D. Çevre Koruma Ajansı), T.S.C.A. (Toxic Substances Control Act (Toksik Maddeler Kontrol Yasası)) ve C.D.R. (Chemical Data Reporting) (Kimyasal Veri Raporlama) 2016 raporlarına göre A.B.D.'de 500,000- <1,000,000 lbs (~250-500 ton/yıl) yıllık üretimi olduğu tahmin edilmektedir. (E.P.A. C.D.R. 2016).

Doğada sucul ve atık su sızıntılarında PTBBA tespit edilmiştir. 1986 yılında Japon Çevre Bakanlığının 1986 yılında Japonya sahillerinde farklı noktalarda yaptığı ölçümlerde maksimum 0,3 µg/L PTBBA tespit edilmiştir (Yoshioka vd., 1993). Clark ve arkadaşlarının 1991 yılında New Jersey, A.B.D.'de işlem görmemiş sanayi

kanalizasyon atıklarında yaptığı farklı ölçümlerde 0,6-32 µg/L arasında PTBBA tespit etmiştir (Clark vd., 1991). İsveç Örebro şehrinde Haziran 1994’de sızıntı suyunda 27,1 µg/L PTBBA ölçülmüştür (Welander, 1997). Avrupa Stabilizatör Üreticileri Birliği, (European Stabiliser Producers Association, ESPA) tarafından yapılan plastik sanayi atık suyunda, tahmini çevresel konsantrasyonları PTBBA metal tuzları için hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalarda PTBBA miktarının, atık suyunda 1,4 µg/L ve lokal sedimentte kalıntı miktarı 3,96 µg/L olarak hesaplanmıştır (ESPA, 2006).

Tablo 2.1. Ptbba’nın genel özellikleri

Özellik	Değer
CAS no	98-73-7
Kimyasal adı	4-tert-Butylbenzoik asit
Eş anlamlılar	PTBBA; 4-tbba; p-tert-bba; butylbenzoic acid; AKOS BBS-00003714; RAR ECHEM AL BO 0693; p-tert-butylbenzoic; 4-tert-Butylbenzoic; 4-t-butylbenzoic acid; P-T-BUTYLBENZOIC ACID
Moleküler formül	C ₁₁ H ₁₄ O ₂
Moleküler ağırlık	178,23 g/mol
Fiziksel durum	Katı
Erime sıcaklığı	165 - 167 °C
Kaynama sıcaklığı	280 °C
Parlama noktası	180 °C
Yoğunluğu	1.142 20 °C’de
Buhar basıncı	0.057 Pa 20 °C’de
pKa	4.38 (25 °C)
pH	3.9 (H ₂ O, 20 °C) (Doymuş çözelti)
Suda çözünürlüğü	0.07 g/L (20 °C)



Şekil 2.1. Ptba'nın molekül yapısı

Fare ve ratlardan elde edilen LD₅₀ değerlerine dayanarak, 4-tert-bütilbenzoik asit, "zararlı" ve "Yutulması halinde zararlı" etiketlidir. PTBBA tekrarlanan doz toksisitesi için hedef organlar merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrekler, testisler, epididimisler, hemopoietik sistem ve timusdur (Bridié vd., 1979; Lu vd., 1987). Ratlarda oral yolla maruziyet (LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level)(Olumsuz Etkinin Gözlemlendiği En Düşük Seviye) 6-8 mg/kg/gün (Hunter vd., 1965; EU RAR, 2009; ECHA, 2016) ve dermal yoldan maruziyette (LOAEL 60-70 mg/kg/gün) (Cagen vd., 1989; EU RAR, 2009; ECHA, 2016) testislerde atrofi görülmüştür. Diğer canlılarda yapılan bazı çalışmalar Tablo 2.2'de verilmektedir (PubChem, 2022).

Tablo 2.2. Ptba'in diğer canlılar üzerine etkileri.

No	Organizma	Test	Maruz yolu	Doz
1	Rat	LD ₅₀	Oral	473 mg/kg
2	Rat	LC ₅₀	İnhalasyon	>1900 mg/m ³ . saat
3	Rat	LD ₅₀	Deri	300 mg/kg
4	Rat	LD ₅₀	İntravenöz	>200 mg/kg
5	Fare	LD ₅₀	Oral	568 mg/kg
6	Fare	LD ₅₀	İntraperitoneal	242 mg/kg
7	Tavşan	LD ₅₀	Deri	>900 mg/kg

Ayrıca PTBBA'ya yapısal olarak benzer olan para-sübsititude alkil benzoik asit türevlerinin ratlarda üreme organlarını olumsuz yönde etkilediğini, sperm sayısında düşüşe, hareket azlığına ve morfoloji bozukluklarına neden olmuştur (RIFM, 2010; ECHA, 2016). Bu türevlerden *in vivo* ve *in vitro* olarak en çok çalışılan 3-(4-tert-bütilfenil)-2-metilpropanal (BMHCA) rat primer hepatositlerinde, PTBBA'e transformasyona uğramıştır (Laue vd., 2017).

Scherer ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada lysmeral isimli yaygın olarak kullanılan koku maddesinin, 5,26 mg/l oral yolla tek doz olarak 5 adet insana verildiğinde, 48 saat sonra idrarlarında, lysmeral'in ana metabolit olan PTBBA tespit etmişlerdir (Scherer vd., 2017).

McCune ve ark. 1982 yılında PTBBA ile yaptığı çalışmada tek öğün beslenen rat hepatositlerinde 5-10 μ M PTBBA yağ asit sentezinin %50 inhibe ettiği bulunmuştur. 48 saat aç bırakılan ratlarda 20 μ M PTBBA glikoz sentezinin %50 sini inhibe etmektedir. Ayrıca PTBBA keton cisimciklerinin sentezini de engellemektedir. Dolayısıyla yağ asit sentezi ve glukogenez sentezi mekanizmalarını bozduğu için hücre içi enerji yollarında problemlere yol açma ihtimalinin olduğu ratlarda gösterilmiştir (McCune vd., 1982).

Scherer ve ark. 2021 yılında yaptığı çalışmada 2000-2018 yılları arasında 20-29 yaşları arasında 329 kişiden alınan idrar örneklerinde Butilfenil methil propional (Lilial) taraması için, bu kimyasalın metabolitlerinden biri olan PTBBA miktarını idrarda taramıştır. Ortalama olarak 13,73 μ g/24 saat PTBBA tespit edilmiştir. Bulunan rakam kronik maruziyet eşik değerinin üstünde olduğu bildirilmiştir. (Scherer vd., 2021)

Walde ve Scheline'nin 1983 yılında yaptığı çalışmada özellikle parfümeri sanayinde kullanılan p-tert-Bütoltoluenin rat ve kobaylara 100 mg/kg olarak tek doz verildiğinde, kobaylarda idrarda bulunan metabolitlerin %17'nin PTBBA olarak GC-MS yöntemiyle ölçülmüştür. Ratlarda PTBBA metaboliti rastlanmamıştır (Walde vd., 1983).

Chen ve arkadaşlarının 2014 yılında PTBBA'nın mayada sirtuin grubu enzimlerinden *sir2p* enzimini seçici olarak inhibe edebildiği gösterilmiştir. Histon deasetilleyici göreve sahip olan sirtuin enzimi bakterilerden memelilere kadar korunmuş olduğu ve hücre döngülerinde görev aldığı için, hücre ölümü ve kanser önleyici özelliğe sahiptir (Chen vd., 2014).

Tollefsen gökkuşağı alabalıklarda yaptığı çalışmalarda PTBBA'nın plazmada seks hormonu bağlayıcı globülin (Sex Hormone Binding Protein) 17 β -estradiol (E₂) ve testosteronla (T) rekabet edemeyerek bağlanamadığı tespit edilmiştir (Tollefsen, 2007). Aynı balıkları primer hepatosit kültüründe yaptığı östrojenite çalışmalarında, PTBBA Vitellogenin üretiminde değişimine yol açmadığını, 96 saatlik 0,1 nM maruziyette östrojen reseptörlerinde antagonistik etkide bulunduğunu ancak 0,3 nM

konsantrasyonda ise zayıf östrojen gibi davranarak agonistik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Tollefsen, Eikvar, vd., 2008). Hepatik hücrelerde östrojen reseptörüne bağlanabildiği gösterilmiştir (Tollefsen & Julie Nilsen, 2008).

2.3. Zebra Balığı

Zebra balığı (*Danio rerio*) erişkinlikte yaklaşık 4-4,5 cm uzunluğunda akvaryumlarda kullanılan küçük bir tatlısu balığıdır. Çeşitli toksikoloji uygulamaları için bir hayvan modeli olarak popülerlik kazanmıştır ve biyolojik çalışmalar ve kimyasal toksisite çalışmaları için en pratik modellerden biri olarak saygınlık kazanmıştır (Tsang, 2010; Powers, 1989).

Zebra balığı gelişimsel toksikoloji alanında farklı avantajlara sahiptir. Son yıllarda, bu hayvan modeli kullanım kolaylığı ve insanla genetik benzerliği (~%70) nedeniyle popülerlik kazanmıştır. Bununla birlikte, gelişme toksikolojisi açısından yararlılığı, gelişme sırasındaki zebra balığı embriyonu şeffaflığı etrafında toplanmıştır (Ton, 2006). Işık mikroskopu kullanılarak gelişimini izlemek mümkündür. Diğer modellere (fare, sıçan vb.) kıyasla bu bariz avantaja ek olarak, haftalık olarak nispeten çok miktarda yumurta bırakılabilir ve bu hayvanların gelişme hızı, kısa sürede büyük miktarda veri toplamayı mümkün kılar. Zebra balığı ile insanlar arasında farklı morfolojik ve fizyolojik farklılıklar olmakla birlikte, toksikolojik işlemlerin birçoğu korunmaktadır (Carvan ve diğerleri, 2000 ve Carvan ve ark., 2004). Üreme toksisitesi, davranış bozuklukları, teratojenez, kardiyotoksisite, ototoksisite vb. neden olan kimyasallara verilen tepkiler büyük ölçüde özdeştir. Hayvan modelinin yüksek verimlilikteki doğası ve birlikte alınan toksikolojik yolların korunması, gelişimsel toksikolojik taramada zebra balığının kullanışlılığını ortaya koymaktadır (Blader, 2000). Omurgalı yapıları nedeniyle daha küçük modellere (*C. elegans* veya *Drosophila* gibi) kıyasla beklenen insan sonuçlarıyla korelasyon için biyolojik açıdan daha uygundur. Erken yaşam evreleri omurgalılarda oldukça korunmuştur (Laale, 1977).

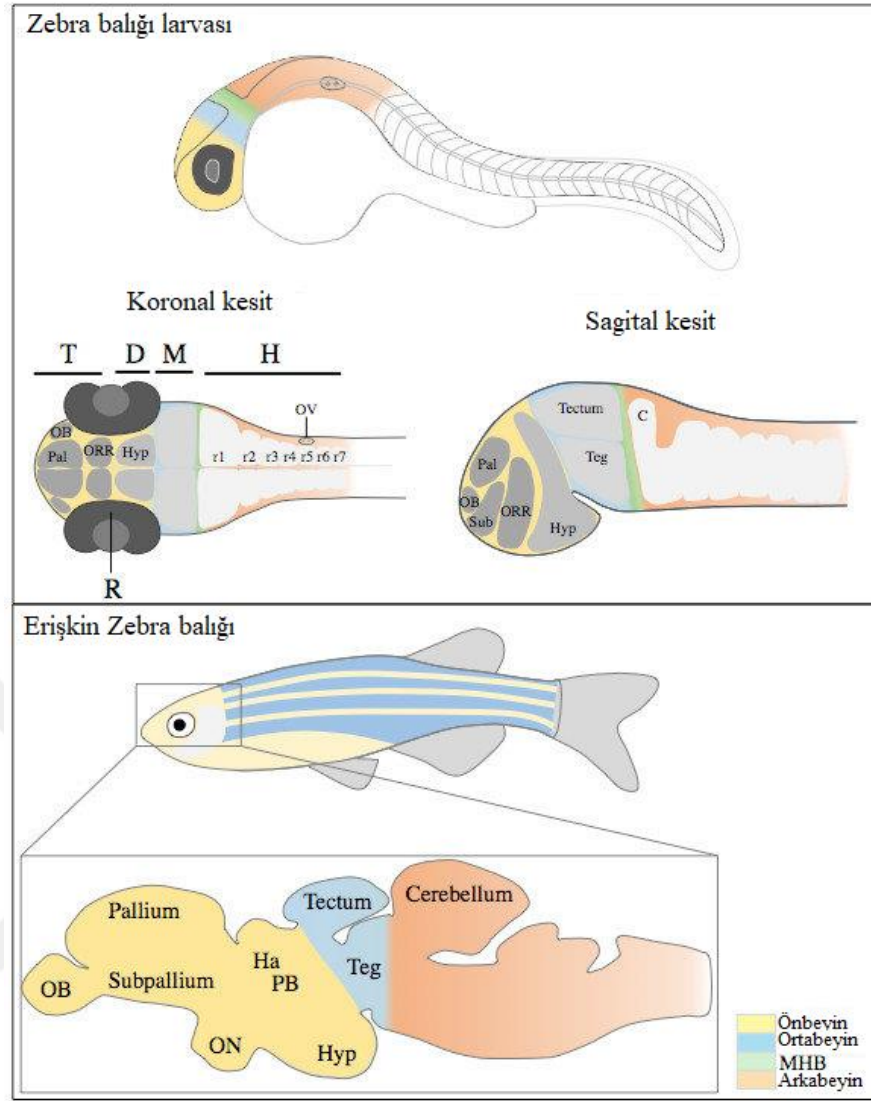
2.3.1. Zebra balığı sinir sistemi yapısı

Zebra balığı fizyolojisi ve nöroanatomi, insanlarınkine paraleldir (Panula ve diğerleri, 2010; Panula ve diğerleri, 2006). Zebra balığı larvalarında (>3 dpf) organların ve lokomotor tepkilerin çoğu gelişmiştir, bu da davranış işlevlerinin yerinde olduğunu düşündürür (Kimmel ve diğerleri, 1995). Zebra balığı sinir sistemi günler

içinde işlevsel hale gelir ve beynin tüm ana bileşenleri 5 dpf'de bulunur (Nusslein-Volhard, 2002). Zebra balıklarında lokomotor aktivitenin ilkel formları erken yaşam evrelerinde gelişmeye başlar. Böylece, zebra balığı, sinir sisteminin gelişimi ve işlevlerini (Strähle & Korhz, 2004) ve hareketin davranışsal, genetik ve biyokimyasal yönlerini incelemek için güçlü bir model olarak ortaya çıkmıştır (Fetcho & McLean, 2010; Fetcho ve diğerleri, 2008; Fetcho, 2007; Guo, 2004; Drapeau ve diğerleri, 2002).

Zebra balığının sinir sistemi yaklaşık döllenmeden yaklaşık 6 saat sonra başlayan gastrulasyonla vücut planı oluşturulur ve sinir sistemine neden olacak hücreler embriyo içinde farklı konumlara hareket eder (Kimmel ve ark., 1990). Diğer omurgalıları olduğu gibi, zebra balığı merkezi sinir sistemi (MSS) embriyonun dorsal yüzünde ektoderm epitel tabakası olan sinir plakasından oluşur. Gastrulasyonun sonunda (döllenmeden 9-10 saat sonra), nöral plaka bir tüp haline gelir. Gelecek 6 saat boyunca sinir tüpü, ayrı beyin bölümlerine neden olan ayrı bölgelere bölünür. Döllenmeden 24 saat sonra beyin morfogenezini ilerletilir ve nöronların en erken kümeleri aksonlarla birbirine bağlanırken beyin diensefalon ve telensefalon, orta beyin, arka beyin ve omurilik gibi ön beyin bölgelerine bölünür (Hanneman ve Westerfield, 1989; Wilson ve ark. , 1990). Döllenmeden 48 saat sonra beyin ventrikülleri oluşur ve embriyo, dokunma uyarılarına yanıt vermeye başlar (Eisen, 1991; Jiang ve diğerleri, 1996; Kawai ve diğerleri, 2001; Kimmel ve diğerleri, 1974; Kimmel ve ark., 1990 Raible ve diğerleri, 1992). Glial hücre alt türleri, oligodendrositler, Schwann hücreleri ve astrositler döllenmeden 4 gün sonra zebra balığı larvalarında bulunur (Brosamle ve Halpern, 2002; Kawai ve diğerleri, 2001).

Hipotalamus, optik yollar, koku sistemi, omurilik ve kafa sinirleri gibi zebra balığı MSS'nin bazı bölgelerinde, insan beyninin ilgili alanlarına net bir yapısal homoloji bulunur. Gelişmekte olan telesensefalon, örneğin insan karşılığıyla karşılaştırıldığında zebra balığında çarpıcı biçimde farklı bir morfolojidedir. Bununla birlikte, insan temel gangliyonuna benzediğine inanılan alanlar, zebra balığı ön beyininde olduğu gibi memeli striatumunun ve hipokampusun homologu olarak da tanımlanmıştır (de Esch, C., 2012, Mueller ve Wullimann, 2009; Rink ve Wullimann, 2001, 2004; Wullimann ve Mueller, 2004 Wullimann ve Rink, 2002).



Şekil 2.2. Zebra balığı beyninin gelişimi. embriyonik zebra balığı beyninin (30 hpf) şematik gösterimi.¹

¹ (A) Ön beyni (sarı), orta beyni (mavi), orta beyin-arka beyin sınırı (MHB) (yeşil) ve arka beyni (turuncu). Koronal ve sagittal kesit şemaları beyin yapılarını gösterir. Ön beyin, telensefalon (koyu gri) ve diensefalon (hipotalamus içeren, açık gri) olarak alt bölümlere ayrılmıştır. (B) Yetişkin beyninin ve ana alanların basitleştirilmiş temsili. Ölçekli olmayan çizimler. Rink, 2002'den uyarlanmıştır; C: beyincik; D: diensefalon; M: orta beyin; MHB: orta beyin-arka beyin sınırı; H: arka beyin; Ha: habenula; Hip: hipotalamus; OB: koku ampulü; AÇIK: optik sinir; ORR: optik girinti bölgesi; OV: otik vezikül; Pal: palyum; PB: epifiz gövdesi; R: retina; r1-r7: rhombomerler 1 ila 7; Alt: alt palyum; T: telensefalon; ve Teg: tegmentum.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Para-Tert Bütıl Benzoik Asit

Çalışmada Sigma Aldrich marka 98-73-7 CAS numarasına sahip 4-tert Bütıl Benzoik Asit (PTBBA) kullanılmıştır.

3.2. Zebra Balıklarından Embriyo Toplanması

Çalışma, İstanbul Üniversitesi Sucul Omurgalı Canlı Deney Ünitesi'nde gerçekleştirildi. 1 yaşında olan zebra balıkları Techniplast ZebTEC Active Blue sisteminde, 8 lt tanklarda, 12:12 saat aydınlık-karanlık foto periyodunda, günde 1 defa TetraPro ve günde 1 defa *Artemia* ile günlük vücut ağırlığının yaklaşık %2'si kadar yem ile beslendi. Yumurta toplanması planlanan tarihten en az 1 hafta önce yumurtlamaya uygun damızlık dişiler ve erkekler izole edildi. Yumurta toplanmasında, 1:2 dişi/erkek olacak şekilde 3,5 lt akvaryumlar, tabanlarına cam misket yerleştirilerek kullanıldı. Aydınlık foto periyodunun ilk dakikalarında gerçekleşen çiftleşme sonucu döllenenen yumurtalar, sifonlama yöntemiyle akvaryumdan, E3 solüsyonu bulunan petri kaplarına alındı. Döllenmemiş ve anormal yumurtalar ayıklanıp, döllenmeden 4 saat sonra doz uygulamalarına başlandı. Doz uygulamasından sonra bütün embriyo ve larvalar Nüve ES 120 soğutmalı inkübatörde $28\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Deney sıvılarının hacimce %90'ı her gün yaklaşık aynı saatlerde değiştirildi.

3.3. Zebra Balığı Embriyo ve Larvalarında Ptbbba LC₅₀ Değerlerinin Tespiti

Zebra balıkları için PTBBA LC₅₀ değerleri literatürde bulunmadığından LC₅₀ değeri tespiti için 24 kuyucuklu, 2 ml hacme sahip polikarbonat, steril mikropate içine alınan zebra balığı embriyolarına, negatif kontrol, çözücü kontrol (%1 DMSO), 100, 10, 1, 0,1 ve 0,01 mg/l logaritmik olarak artan dozlarda PTBBA uygulandı. Ancak PTBBA 100 mg/l dozu, suda yeteri kadar iyi çözünmediği için, bütün dozlar, balıklar için zararlı olmayan, %1'lik Dimetil Sülfoksit (DMSO) çözüldükten sonra uygulama

yapıldı. Uygulamalar 4 kez tekrar edildi. Probit yöntemi ile 24-120 saatlik LC₅₀ hesaplandı.

3.4. Doz Uygulanması

Bölüm 3.3'te hesaplanan 120 saatlik LC₅₀ dozunun, %50'si, %20'si, %10'u, uygulama dozları olarak belirlendi. Negatif kontrol ve çözücü kontrol uygulamaları ile toplam 5 grup halinde 120 saatlik PTBBA uygulaması yapıldı.

3.5. Teratolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Doz uygulamaları sırasında 24 saatte bir embriyoların gelişim özellikler kontrol edilerek BAB ST45 marka stereo mikroskopla ve BAB CCD 2 MP kamerayla fotoğrafları çekildi. Embriyoların gelişimi sırasında oluşan anormallikler kaydedildi. Embriyolarda 24, 48, 96 ve 120 saatlik ölüm oranları, daha sonraki istatistik analizlerinde ve LC₅₀ değerlerinin hesaplamalarında kullanılmak için kaydedildi. Ayrıca zebra balığı embriyolarında ve daha sonra larvalarında koryondan çıkış zamanları, morfolojik bozukluklar, omurga bozuklukları, kranofasial bozuklukları, beyin, göz, somit hasarları, ödemler, hemorajji, kalp ritmi, hareket bozuklukları ve nekroz gibi özellikler günlük olarak kaydedildi.

3.6. Histolojik Analizler

3.6.1. Embriyo histolojisi

Zebra balığı embriyolarında her bir dozdan günlük olarak örnekler alındı. Alınan Zebra balığı embriyoları, fiksatif işleminden sonra, dehidrasyon, şeffaflaştırma ve parafine gömme gibi rutin histolojik aşamalardan geçirildi. Leica mikrotom cihazında yaklaşık 5 µm kalınlığında kesit alma işlemleri uygulandı. Alınan kesitler hematoxilen-eosin ve Toulidin mavisi ile boyandı. Boyama işlemlerinden sonra 1 saat kurutma kâğıdı üzerinde kurutuldu. Daha sonra entellan ile lamel kapatılarak 1 gece kurutmaya bırakıldı. Leica DM1000 ışık mikroskopunda, MC 170 HD kamera ile görüntülenip LAS 4.9 (Leica) programında fotoğraflandı.

3.6.2. Fiksasyon

Embriyolarda kontrol ve uygulama dozlarında alınan örneklerle, 24 saatlik Bouin fiksatif uygulandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Embriyo histolojisi için fiksatif uygulaması

Fiksatif	Süresi	İçerdiği Maddeler	Miktarı
Bouin çözeltisi	24 saat	Saf suda doymuş pikrik asit	75 ml
		%40 formaldehit	25 ml
		Glasiyal asetik asit	5 ml

3.6.3. Dehidrasyon

Fiksasyon işleminden sonra örnekler, alkol serilerinden geçirilerek, içlerindeki su uzaklaştırıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Embriyo histolojisi için dehidrasyon işlemleri

İşlem	Süresi
%70 etanol	1 gün
%90 etanol	30 dakika
%95 etanol	30 dakika
%100 etanol	30 dakika
%100 etanol	30 dakika

3.6.4. Şeffaflaştırma ve parafin bloklara gömme

Suyu uzaklaştırılan örnekler Ksilolde bekletilerek şeffaflaştırıldı. Ardından 58°C etüvde sıvı parafin içerisinde 1 gün bekletildikten sonra, kesit düzlemine göre parafin bloklar içine gömüldü (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Embriyo histolojisi için şeffaflaştırma ve parafine gömme işlemleri

İşlem	Süresi
Ksilol	30 dakika
Ksilol	30 dakika
Parafin	24 saat

3.6.5. Kesit alma

Parafin bloklardan yaklaşık 5 µm kalınlığında Leica RM2125 RT marka döner mikrotomda kesitler alınıp, sıcak su banyosundan sonra lam üzerine yerleştirildi. 1 saat 58°C etüvde kurutulduktan sonra boyama işlemlerine alındı.

3.6.6. Boyama işlemleri

3.6.6.1. Hematoksilen-eosin boyaması

Lam üzerine alınıp kurutulan örnekler, aşağıdaki prosedüre göre rutin Hematoksilen-Eosin boyama işlemi uygulandı (Tablo 3.4). Boyama işlemi sonunda 2 saat kurutulup, entellan uygulandıktan sonra lamel ile kapatıldı.

Tablo 3.4. Hemotoksilen & eosin boyama işlemi

İşlem	Süresi
Ksilol	3 dakika
Ksilol	3 dakika
%100 etanol	3 dakika
%90 etanol	30 saniye
%70 etanol	30 saniye
Akarsu	30 saniye
Hematoksilen	1 dakika
Distile su	4 dakika
%95 etanol	30 saniye
%95 etanol	30 saniye
Eosin	1 dakika
%100 etanol	1,5 dakika
%100 etanol	1,5 dakika
Ksilol	45 saniye
Entellan ile kapatma	

3.6.6.2. Toluidin mavisi boyaması

Lam üzerine alınıp kurutulan örnekler, aşağıdaki prosedüre göre Toluidin Mavisi boyama işlemi uygulandı (Tablo 3.5). Boyama işlemi sonunda 2 saat kurutulup, entellan ile kapatıldı.

Tablo 3.5. Toluidin mavisi boyaması

İşlem	Süresi
Ksilol	5 dakika
%100 etanol	2 dakika
%95 etanol	2 dakika
%70 etanol	2 dakika
Distile su	15 saniye
Toluidin mavisi (0.5 g/L)	5 saniye
Distile su	4 dakika
%70 etanol	2 dakika
%95 etanol	2 dakika
%100 etanol	2 dakika
Ksilol	2 dakika
Entellan ile kapatma	

3.6.7. İstatistik hesaplamalar

Bütün veriler SPSS 23 istatistik paket programı ile normallik testinden geçirildi. Normal olan veriler, kontrol grubu ve diğer doz grupları arasında anlamlı fark bulunup bulunmadığının tespiti için parametrik ANOVA testi ile istatistiksel olarak test edildi. Kontrol grubu ile diğer doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan farkların, ayrıntılı incelenmesi için Tukey HSD post-hoc testi yapıldı. Normal olmayan veriler için non-parametrik testler uygulandı.



4. SONUÇLAR

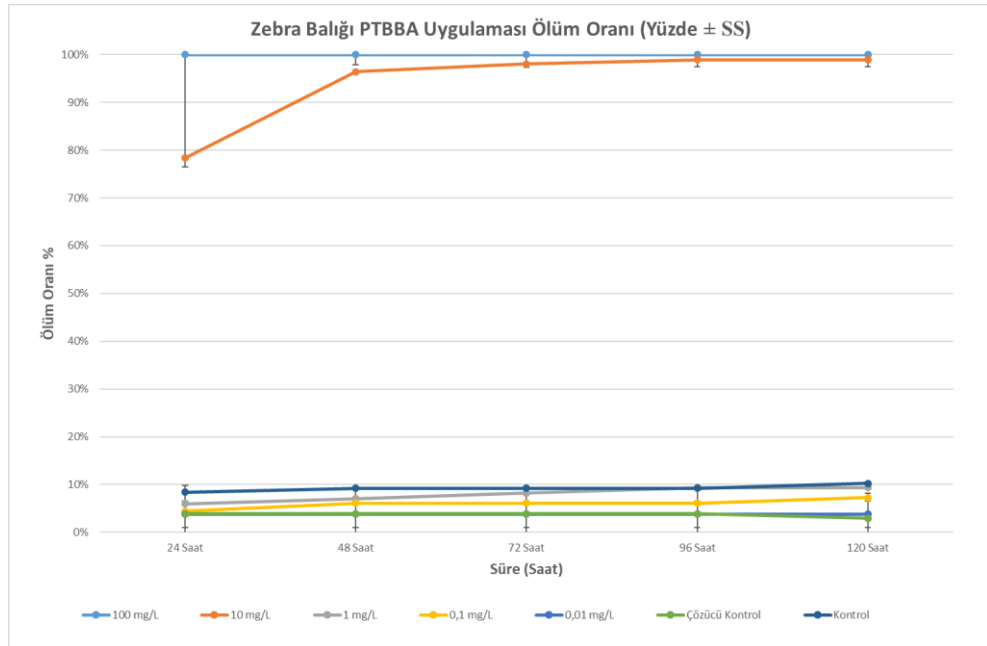
4.1. Zebra Balıklarında Ptbaa LC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Zebra balığı embriyolarında PTBAA uygulamasında 120 saate kadar yapılan LC₅₀ değerlerinin sonucu Tablo 4.1’de ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Tablo 4.1. Zebra balığı embriyo ve larvalarında 120 saate kadar ptbaa uygulamasında lc₅₀ değerleri

	24 Saat	48 Saat	72 Saat	96 Saat	120 Saat
LC ₅₀ Değeri	3,900 $\pm$ 2,692 mg/l	1,957 $\pm$ 0,412 mg/l	1,855 $\pm$ 0,344 mg/l	1,772 $\pm$ 0,343 mg/l	1,775 $\pm$ 0,321 mg/l

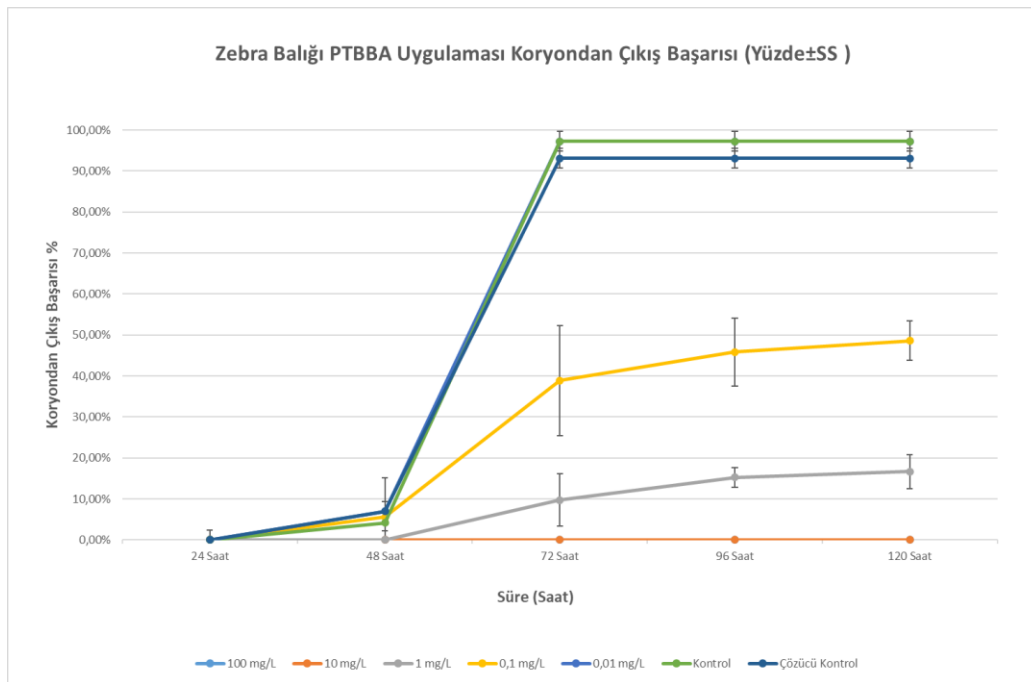
Zebra balıklarında PTBAA’nın LC₅₀ değerlerinin belirlenmesi sırasında 120 saatlik ölüm oranları Tablo 4.2’de ve Şekil 4.1’de yüzde ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Zebra balıklarında PTBAA’nın koryondan çıkış grafikleri Şekil 4.2’de yüzde $\pm$ standart sapma gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Zebra balığı embriyo ve larvalarında ptbaa uygulamasının lc₅₀ değerlerinin belirlenmesi sırasında ölüm oranı.

Tablo 4.2. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbaa uygulama dozlarında gözlenen hayatta kalma oranı tablosu (sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir). (n=24)

	24 Saat	48 Saat	72 Saat	96 Saat	120 Saat
100 mg/l	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
10 mg/l	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
1 mg/l	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	2,333 $\pm$ 1,527	3,667 $\pm$ 0,577	4,000 $\pm$ 1,000
0,1 mg/l	0,000 $\pm$ 0,000	1,333 $\pm$ 2,309	9,333 $\pm$ 3,214	11,000 $\pm$ 2,000	11,667 $\pm$ 1,154
0,01 mg/l	0,000 $\pm$ 0,000	1,667 $\pm$ 0,577	23,333 $\pm$ 0,577	23,333 $\pm$ 0,577	23,333 $\pm$ 0,577
Kontrol	0,000 $\pm$ 0,000	1,000 $\pm$ 0,000	23,333 $\pm$ 0,577	23,333 $\pm$ 0,577	23,333 $\pm$ 0,577
Çözücü Kontrol	0,000 $\pm$ 0,000	1,667 $\pm$ 1,154	22,333 $\pm$ 0,577	22,333 $\pm$ 0,577	22,333 $\pm$ 0,577



Şekil 4.2. Zebra balıklarında ptbaa lc_{50} değerlerinin belirlenmesi sırasında koryondan çıkış başarısı (yüzde $\pm$ standart sapma).

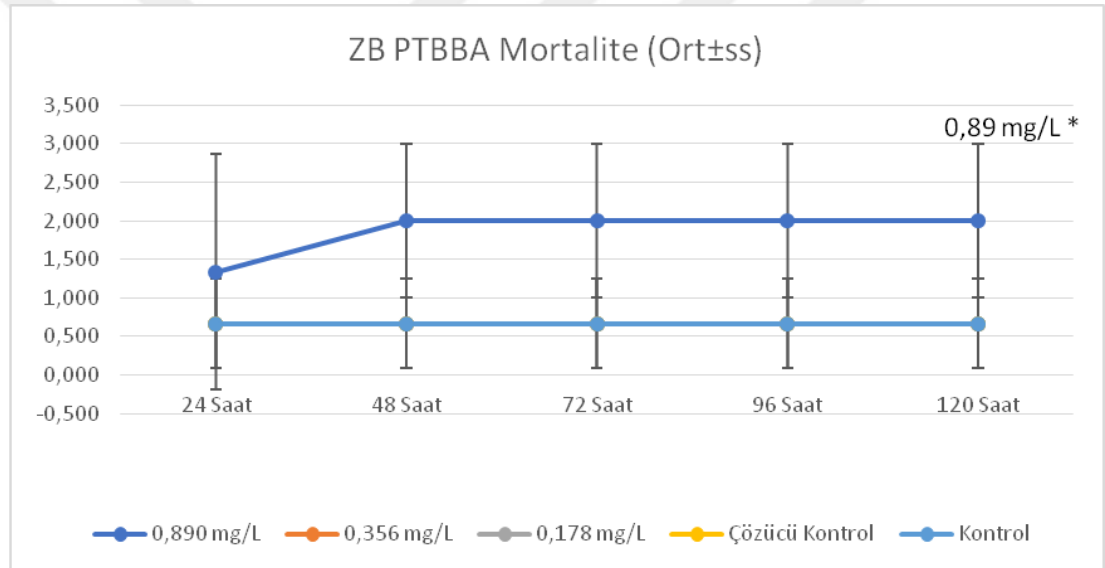
4.2. Zebra Balıklarında Ptbaa Gelişim Bozukluğu Sonuçları

4.2.1. Zebra balığı ptbaa uygulaması ölüm oranı

120 saatlik PTBBA uygulamasının zebra balıklarına uygulandığında ortaya çıkan ölüm oranları Tablo 4.3’de verilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir. Sadece 0,890 mg/l PTBBA dozu kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmuştur ($p>0,05$).

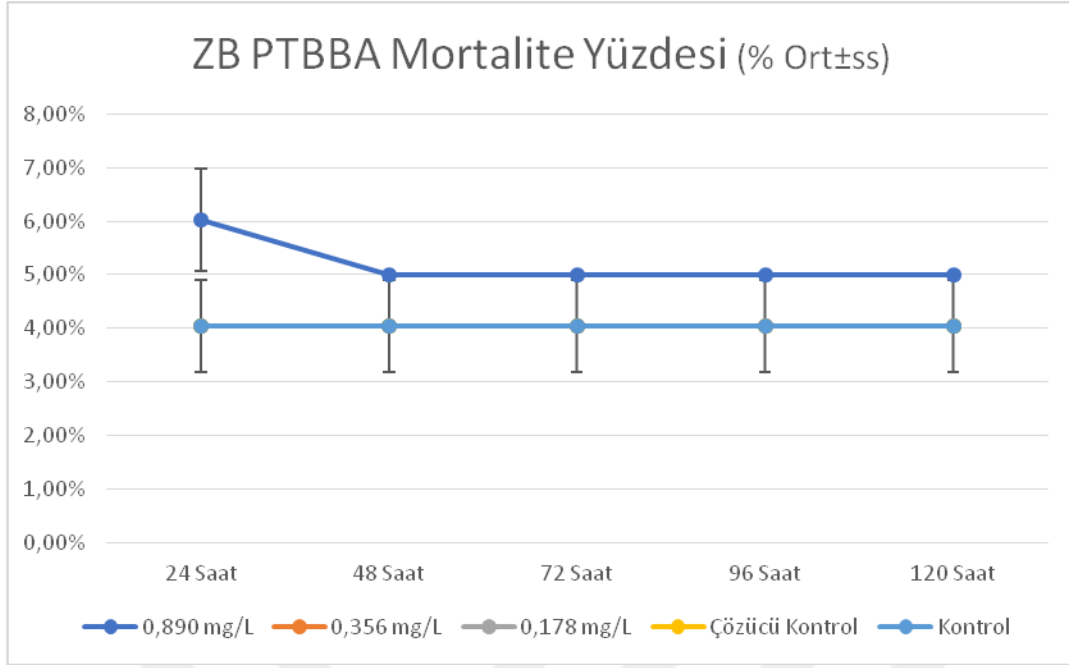
Tablo 4.3. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen ölüm oranları tablosu.²

	24 Saat	48 Saat	72 Saat	96 Saat	120 Saat
0,890 mg/l	1,333±1,527 *	2,000±1,000 *	2,000±1,000 *	2,000±1,000 *	2,000±1,000 *
0,356 mg/l	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577
0,178 mg/l	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577
Çözücü Kontrol	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577
Kontrol	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577	0,667±0,577



Şekil 4.3. Zebra balığı embriyo ve larvalarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen ölüm oranları şekli. (sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir).

² Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. * İstatiksel olarak anlamlı fark (p>0,05)



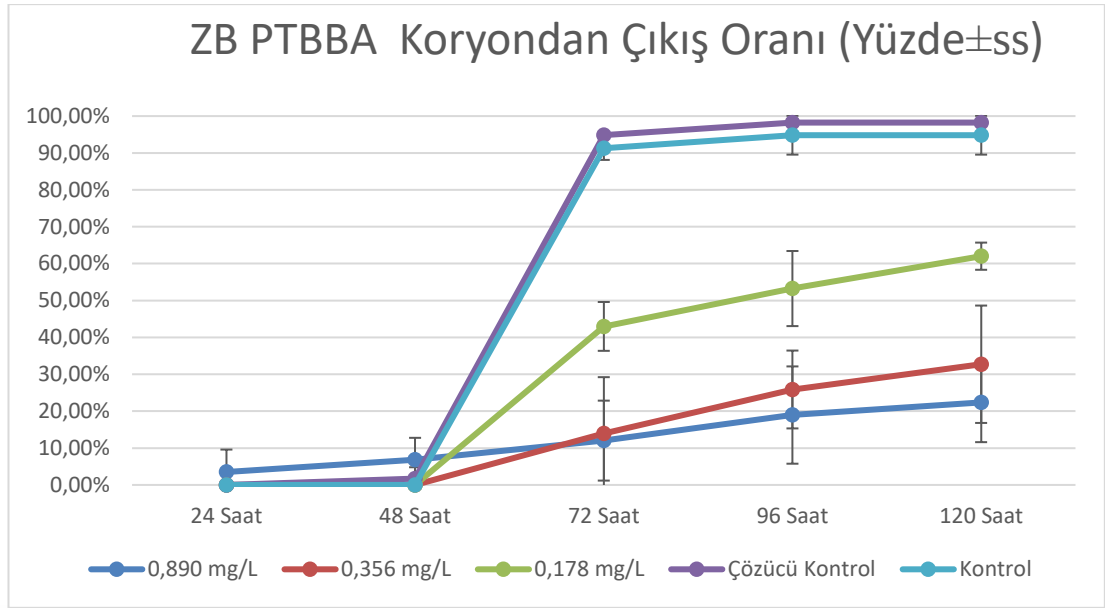
Şekil 4.4. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen ölüm oranları. (sonuçlar yüzde ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir).

4.2.2. Zebra balığı ptbba uygulaması koryondan çıkma oranı

Tablo 4.4. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen koryondan çıkma oranı tablosu.³

	24 Saat	48 Saat	72 Saat	96 Saat	120 Saat
0,890 mg/l	0,000±0,000 ^{a*}	0,667±1,075 ^{a*}	1,667±1,236 ^{a*}	3,000±1,316 ^{a*}	3,667±1,236 ^{a*}
0,356 mg/l	0,000±0,000 ^{a*}	0,000±0,000 ^{a*}	2,667±1,699 ^{a*}	5,000±1,414 ^{a*}	6,333±1,748 ^{a*}
0,178 mg/l	0,000±0,000 ^{b*}	0,000±0,000 ^{b*}	8,333±1,236 ^{b*}	10,333±1,52 ^{b*}	12,000±1,000 ^{b*}
Çözücü Kontrol	0,000±0,000 ^c	0,333±0,760 ^c	18,333±0,760 ^c	19,000±1,000 ^c	19,000±1,000 ^c
Kontrol	0,000±0,000 ^c	0,000±0,000 ^c	17,667±1,075 ^c	18,333±1,075 ^c	18,333±1,075 ^c

³ Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. * İstatiksel olarak anlamlı fark, harfler Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturan grupları belirtmektedir. (p>0,05)



Şekil 4.5. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen koryondan çıkma oranı. (sonuçlar yüzde ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir).

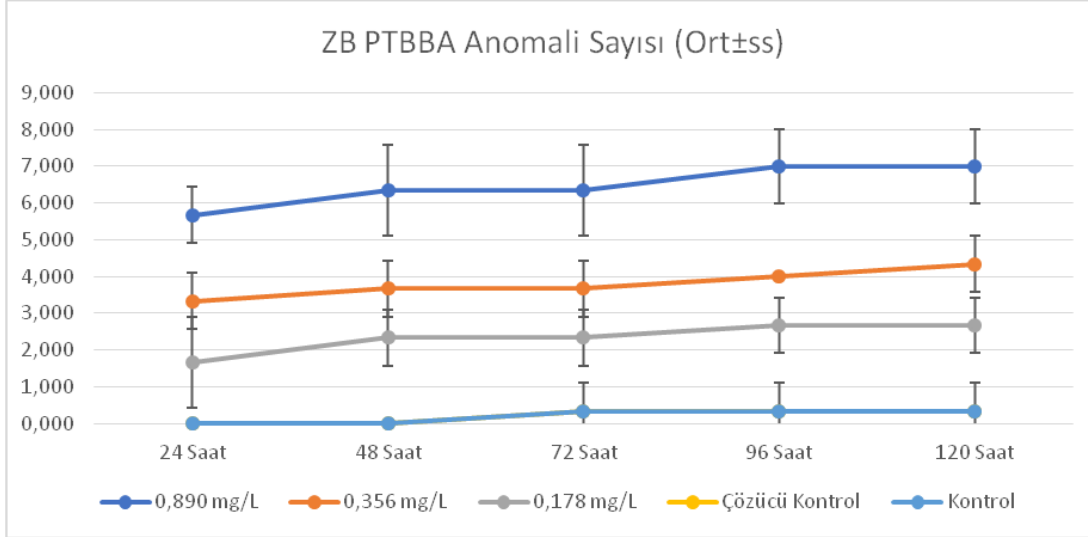
4.2.3. Zebra balığı ptbba uygulaması gelişim bozukluğu testi

120 saatlik zebra balıklarında PTBBA uygulaması testi sırasında embriyo ve /veya larva halindeyken oluşan anomaliler kaydedilmiştir. Gelişim süreci Kimmel ve arkadaşlarının 1995 yılında yaptığı çalışma referans alınmıştır. (Kimmel vd., 1995)

Tablo 4.5. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen anomali sayılarını belirten tablo. ⁴

	24 Saat	48 Saat	72 Saat	96 Saat	120 Saat
0,890 mg/l	5,667±0,577 ^{a*}	6,333±1,528 ^{a*}	6,333±1,528 ^{a*}	7,000±1,000 ^{a*}	7,000±1,000 ^{a*}
0,356 mg/l	3,333±0,577 ^{b*}	3,667±0,577 ^{b*}	3,667±0,577 ^{b*}	4,000±0,000 ^{b*}	4,333±0,577 ^{b*}
0,178 mg/l	1,667±1,528 ^{b*}	2,333±0,577 ^{b*}	2,333±0,577 ^{b*}	2,667±0,577 ^{b*}	2,667±0,577 ^{b*}
Çözücü Kontrol	0,000±0,000 ^c	0,000±0,000 ^c	0,333±0,577 ^c	0,333±0,577 ^c	0,333±0,577 ^c
Kontrol	0,000±0,000 ^c	0,000±0,000 ^c	0,333±0,577 ^c	0,333±0,577 ^c	0,333±0,577 ^c

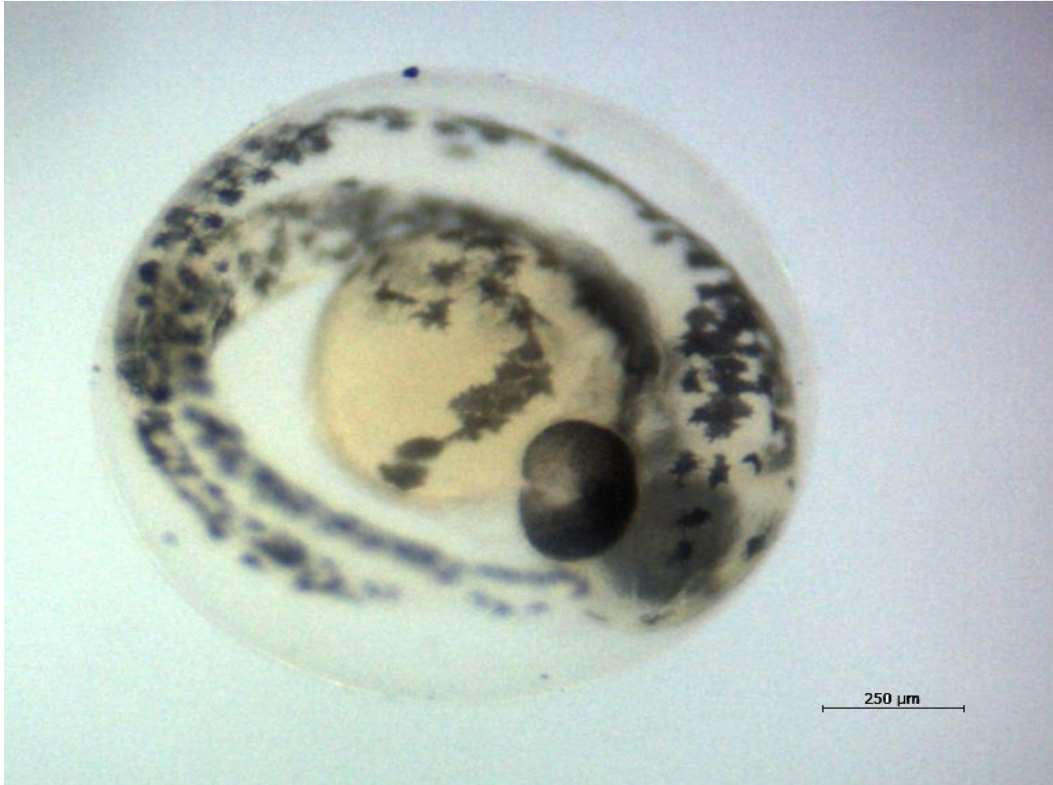
⁴ Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. * İstatiksel olarak anlamlı fark (p>0,05) (n=20)



Şekil 4.6. Zebra balığı embriyolarında 120 saatlik ptbba uygulama dozlarında gözlenen anomali oranları.

4.2.3.1. Kontrol grubu

Zebra balığı embriyo ve larvalarında kontrol grubu normal gelişim gösterdi. 72 saat sonunda 1 deneme grubunda (toplam 3 deneme tekrarı) 1 embriyo hariç koryondan çıkış görüldü (n=20). Pigmentasyon, kalp atış hızı, beyin gelişimi normal olarak gözlemlendi.



Şekil 4.7. 48 saatlik zebra balığı embriyosu kontrol grubu



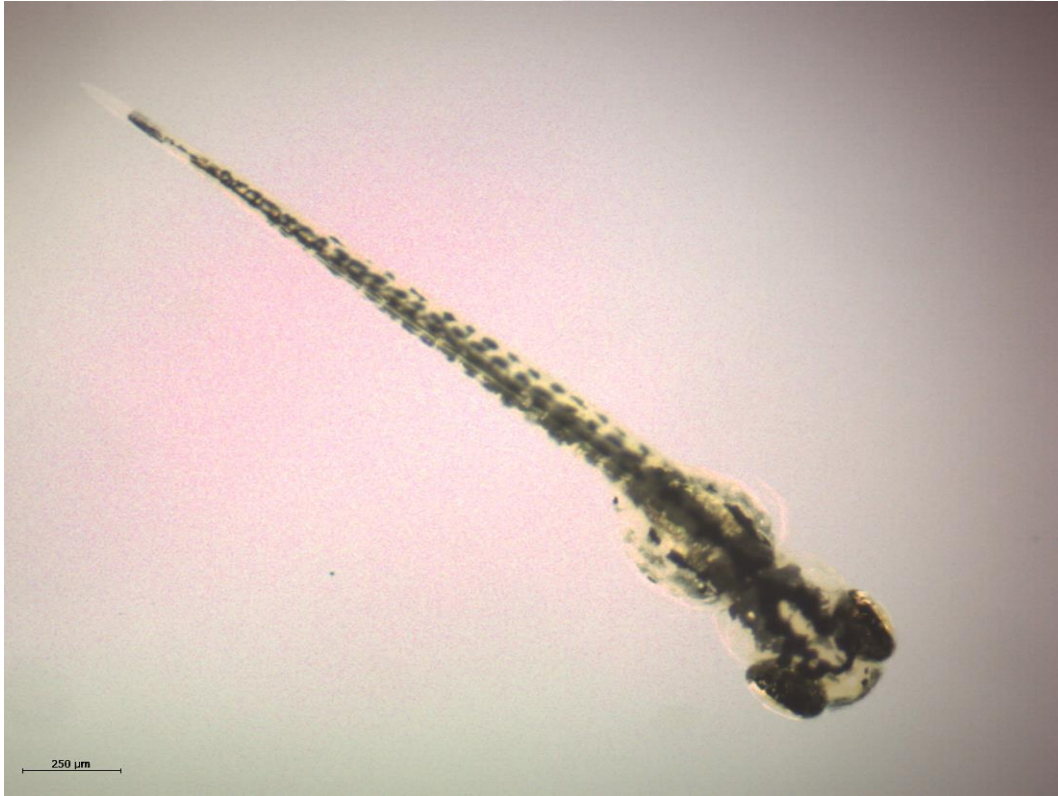
Şekil 4.8. 72 saatlik zebra balığı larvası kontrol grubu.

4.2.3.2. Çözücü kontrol grubu

Uygulama dozlarında kullanılan PTBBA yüksek dozlarında suda çözünürlüğü yüksek olmadığı için bütün uygulama dozlarında çözücü kontrol kullanılmıştır. Çözücü olarak kullanılan DMSO maddesi %1 konsantrasyonda olumsuz bir etkiye sahip olmadığı için kullanılmıştır. (Hutchinson vd., 2006; Hoyberghs vd., 2021) Pigmentasyon, kalp atış hızı, beyin gelişimi normal olarak gözlemlendi.



Şekil 4.9. 48 saatlik zebra balığı embriyosu, çözücü kontrol (%1 dmsö) grubu.



Şekil 4.10. 120 saatlik zebra balığı larvası, çözücü kontrol grubu

4.2.3.3. 0,178 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu

0,178 mg/l PTBBA asit uygulaması yapılan zebra balığı embriyo ve larvalarında gelişim geriliği ve buna bağlı olarak pigmentasyonda azalma, koryondan çıkamama ve yüzgeç gelişmemesi gibi anomaliler görülmüştür. Bunun yanında perikardiyal ödem, skolyoz gibi anomalilerde tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. 48 saatlik 0,178 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok).



Şekil 4.12. 48 saatlik 0,178 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda gelişim geriliğine bağlı pigmentasyon azalması.



Şekil 4.13. 72 saatlik 0,178 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok), gelişim geriliği ve koryondan çıkmama.



Şekil 4.14. 72 saatlik 0,178 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı larvasında skolyoz (ok)



Şekil 4.15. 96 saatlik 0,178 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı larvasında sol pektoral yüzgeç gelişmemesi (ok).



Şekil 4.16. 96 saatlik 0,178 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda gelişim geriliği ve koryondan çıkmama.



Şekil 4.17. 120 saatlik 0,178 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı larvasında skolyoz (ok).

4.2.3.4. 0,356 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu

0,356 mg/l 5 günlük PTBBA doz uygulaması sonunda ortaya çıkan teratojenik anomaliler diğer gruplara göre daha fazla belirgin olduğu görülmüştür. Rombensefalonan itibaren kafa gelişimi olmadığı, anoftalmi (göz gelişimi olmaması) gibi kranofasiyal anomaliler görülmüştür. Bunun yanında perikaldiyal ödemler ve skolyoz gibi omurga anomalileri tespit edilmiştir. Gelişim geriliğine bağlı koryondan çıkmama ve pigment azalması izlenmiştir.



Şekil 4.18. 48 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda kranofasiyal ve omurga gelişim anomalisi (ok), ok ucunda perikardial ödemle birlikte azalmış olarak kalp atışı gözlenlenmiştir.



Şekil 4.19. 48 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok)



Şekil 4.20. 48 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda pigment eksikliği, gelişim geriliği (ok).



Şekil 4.21. 48 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda gelişim geriliğine bağlı pigment eksikliği.



Şekil 4.22. 72 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok) ve gelişim geriliği



Şekil 4.23. 72 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda kranofasiyal anomali (ok).



Şekil 4.24. 72 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda sağ göz anoftalmisi (gözün oluşmaması) (Ok)



Şekil 4.25. 72 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda sağ göz anoftalmisi (gözün oluşmaması) (yıldız), perikardiyal ödem (siyah ok) ve hemorajji (beyaz ok)



Şekil 4.26. 120 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok) , gelişim geriliği ve koryondan çıkmama.



Şekil 4.27. 120 saatlik 0,356 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok) , gelişim geriliği ve koryondan çıkmama.

4.2.3.5. 0,890 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu

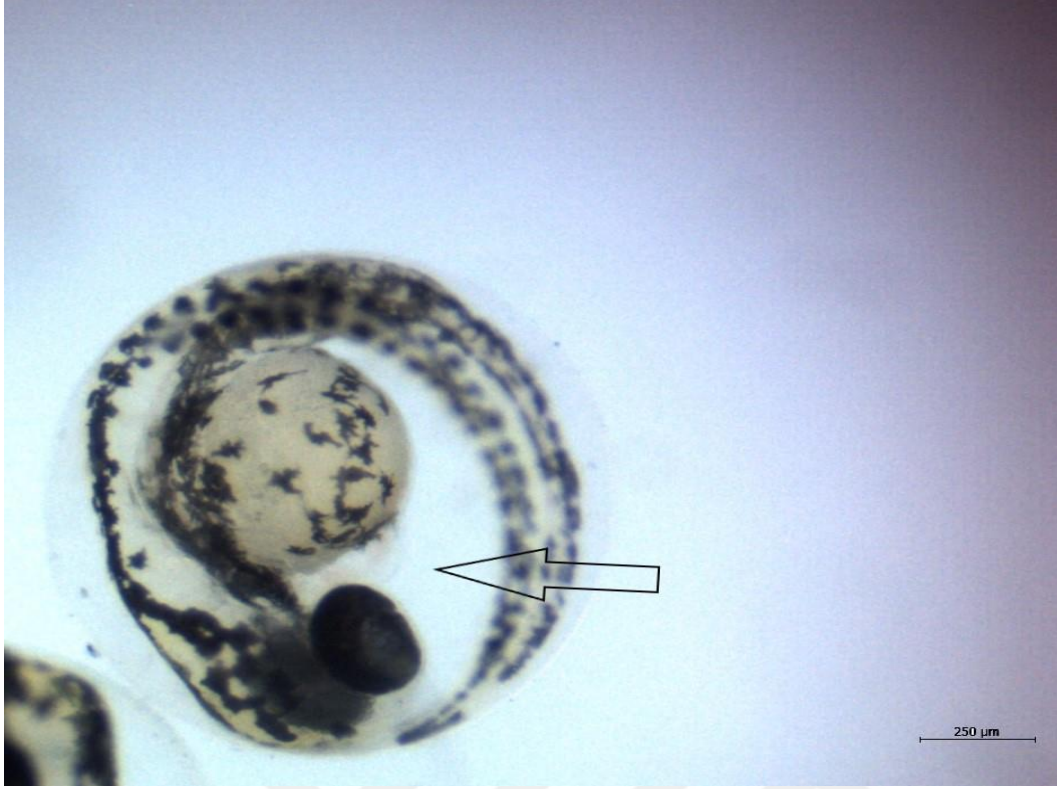
0,890 mg/l PTBBA doz grubunda anomali oranı diğer gruplara daha fazladır, ancak anomalilerin şiddeti 0,356 mg/l kadar fazla değildir. Embriyolarda ve larvalarda perikardiyal ödem ve gelişim geriliği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.28. 48 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok).



Şekil 4.29. 72 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok).



Şekil 4.30. 72 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok).



Şekil 4.31. 96 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok) ve gelişim geriliği.



Şekil 4.32. 96 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok), gelişim geriliği.



Şekil 4.33. 120 saatlik 0,890 mg/l ptbba doz grubu zebra balığı embriyosunda perikardiyal ödem (ok), gelişim geriliği.

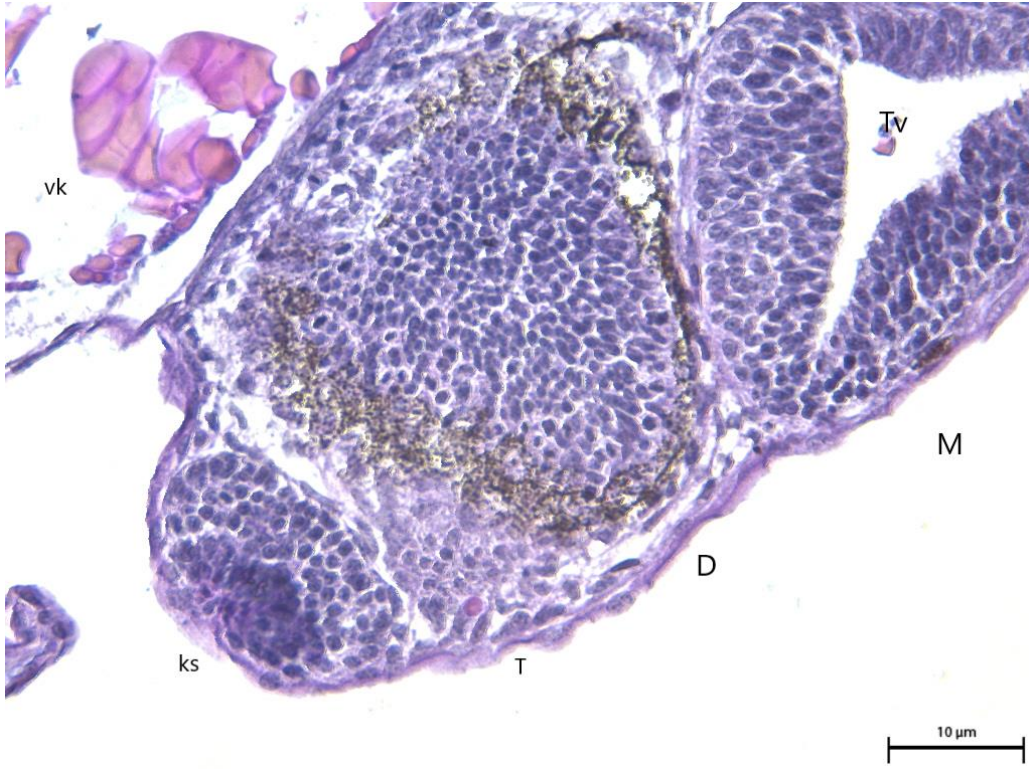
4.3. Zebra Balıklarında Ptbba Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

4.3.1. Histopatolojik deneyler

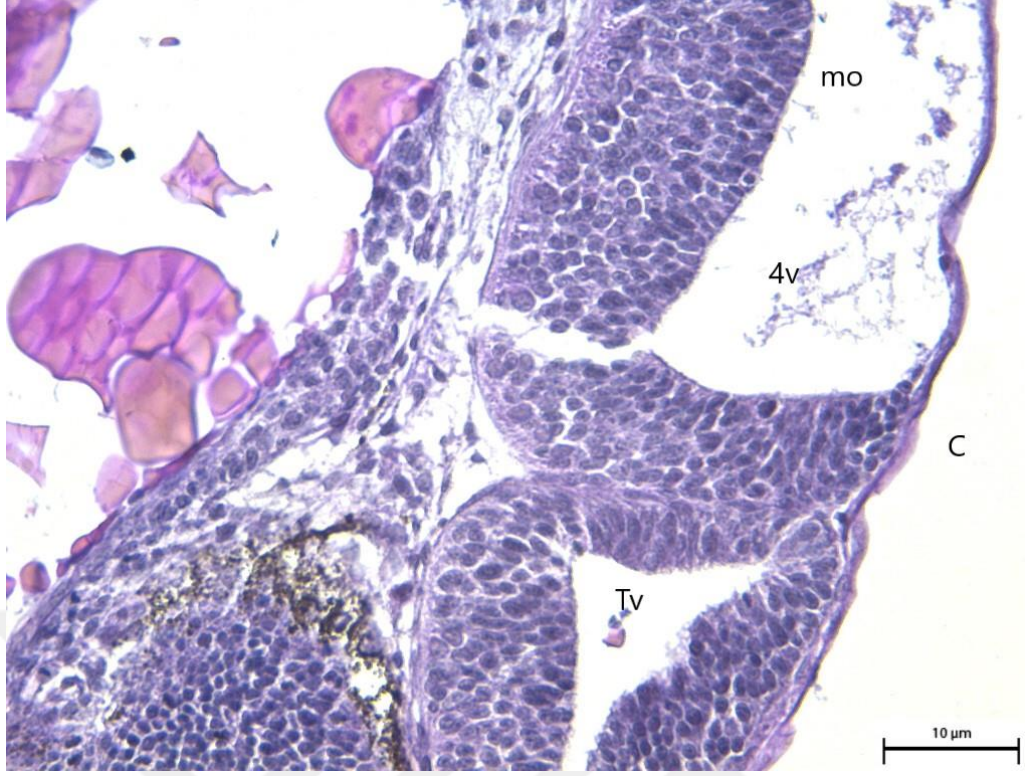
4.3.1.1. Hematoksilen & eosin boyaması

Kontrol grubu

Zebra balıklarında sinir sistemi gelişimi normal olarak gözlemlendi. Koku soğancığı, optik tektum, diensefalon, retina, mesensefalon ve tektal ventrikül gelişimi normal olarak gözlemlendi.



Şekil 4.34. 24 saatlik zebra balığı kontrol grubu, vk: vitellüs kesesi, ks: koku soğancığı epiteli, t: optik tektum, tv: tektal ventrikül, d: diensefalon, m: mesensefalon. (40x h&e boyama)



Şekil 4.35. 24 saatlik zebra balığı kontrol grubu, tv: tektal ventrikül, c: serebellum, 4v: 4.ventrikül, mo:medulla oblangata ve rombomerler. (40x h&e boyama)

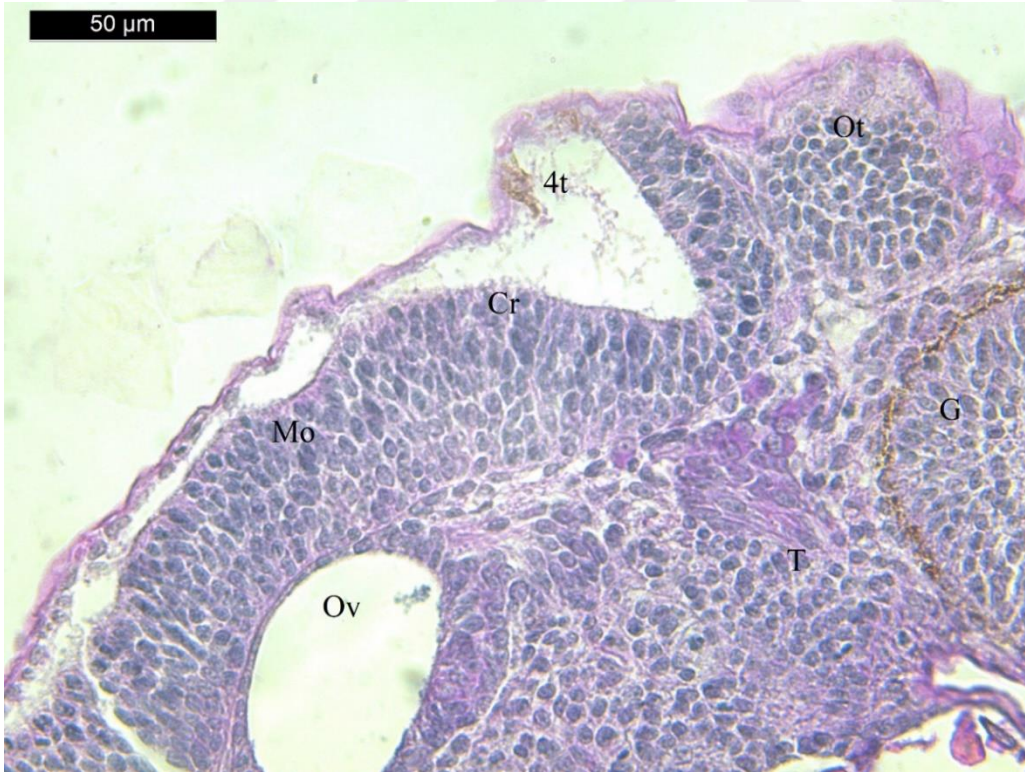
Çözücü kontrol zebra balığı deney grubu



Şekil 4.36. 24 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu, g: göz, tv: tektal ventrikül, cr: cerebellum, ot: optik tektum, 4v: 4.ventrikül, y: yüzme kesesi t:tegmentum (40x h&e boyama)

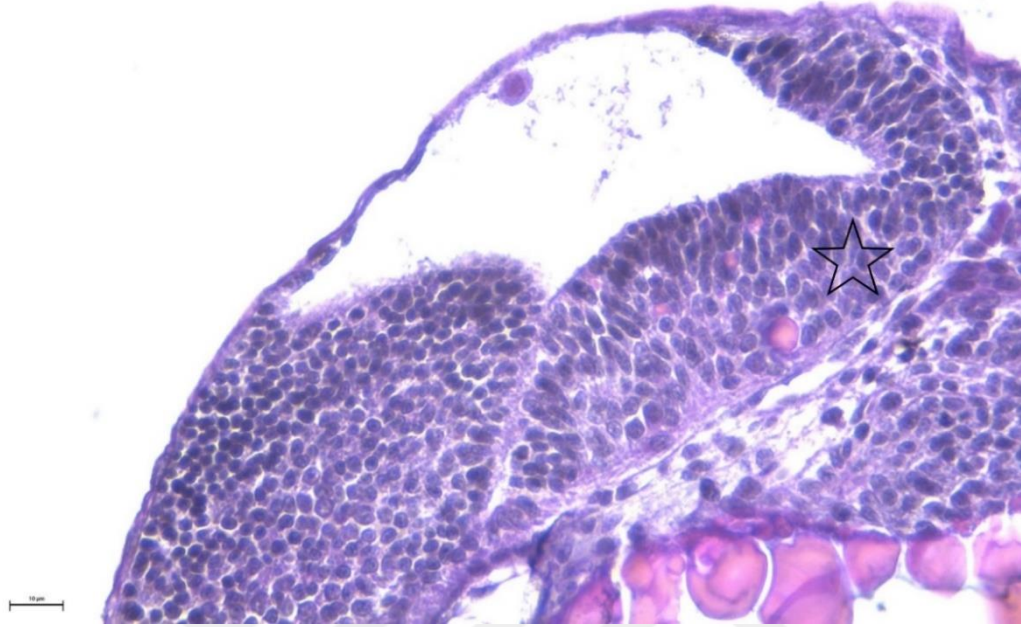


Şekil 4.37. 24 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu, ks: koku soğancığı ot: optik tektum, (40x h&e boyama)



Şekil 4.38. 48 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu, g: göz, tv: tektal ventrikül, cr: cerebellum, ot: optik tektum, 4v: 4.ventrikül, ov: otik vesikül t:tegmentum mo:medulla oblangata (40x h&e boyama)

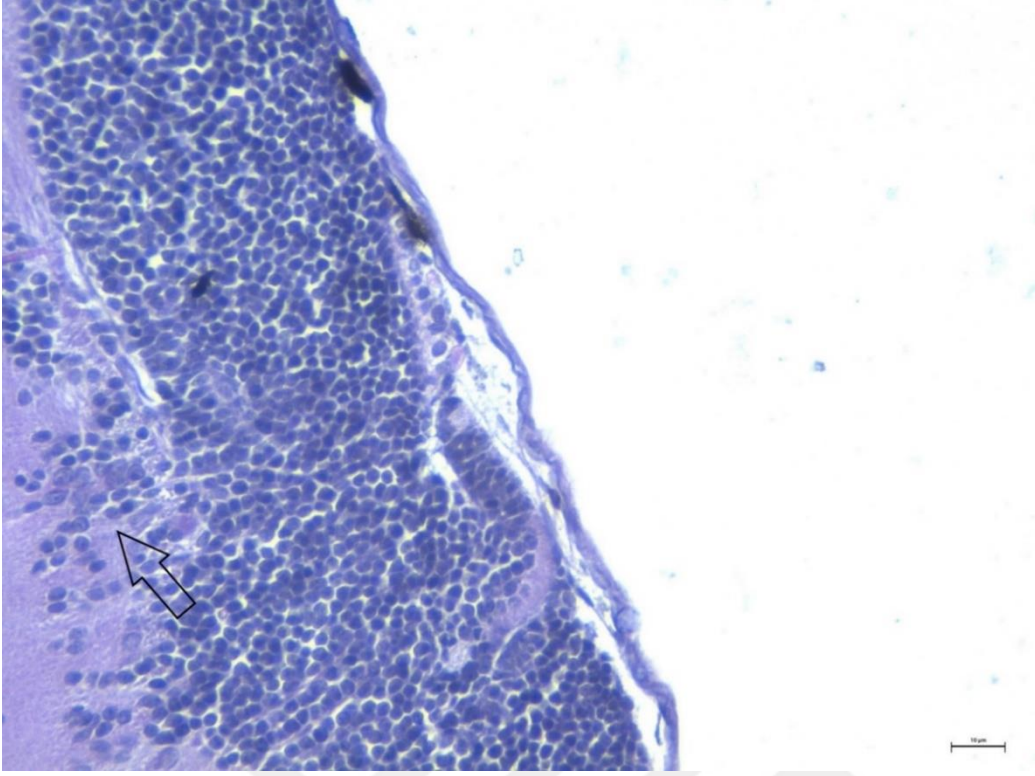
0,178 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu



Şekil 4.39. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası alt lobda hemorralji (40x h&e boyama)

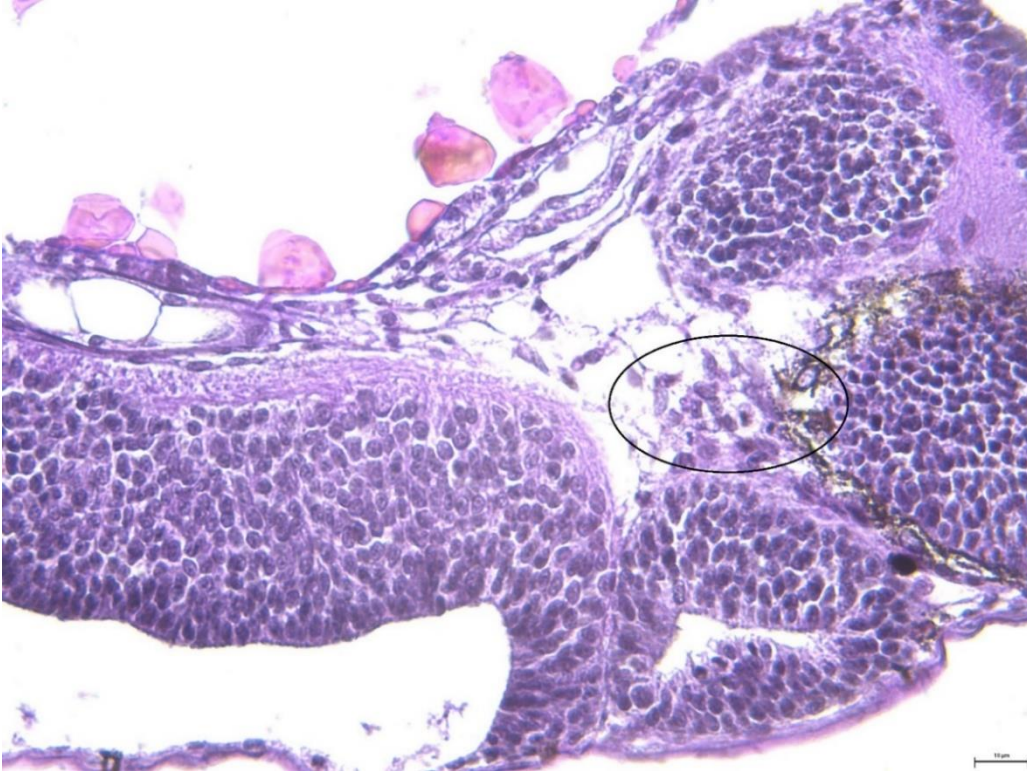


Şekil 4.40. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 7 günlük zebra balığı larvası alt lobda nöronal atrofi (40x h&e boyama)

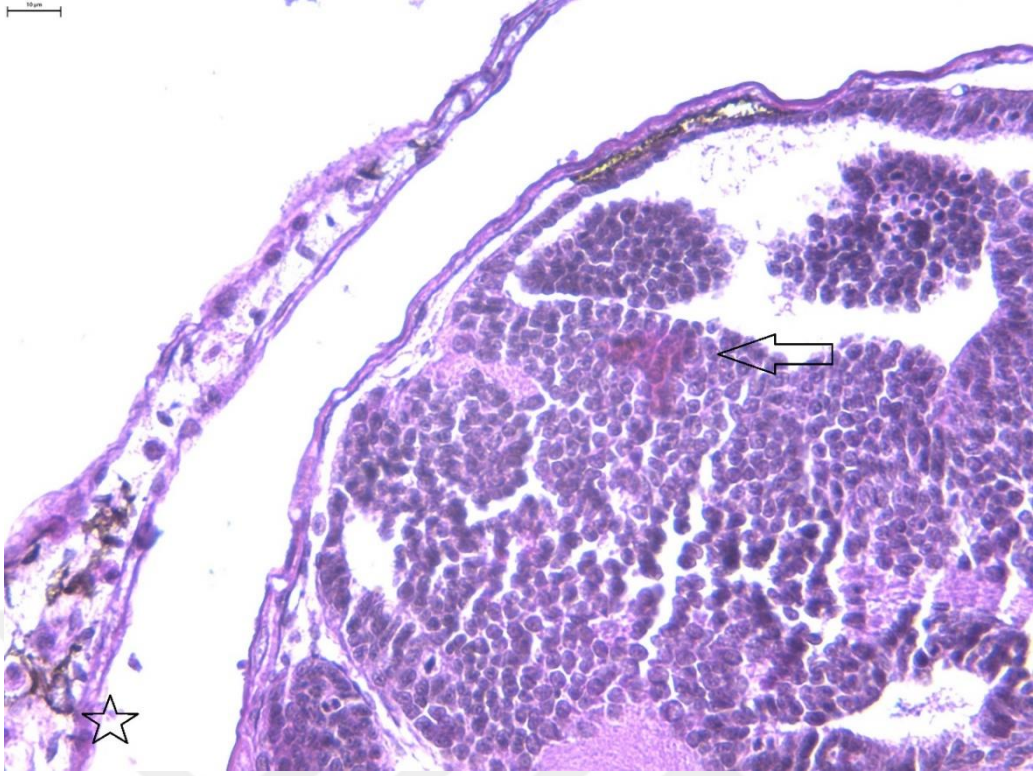


Şekil 4.41. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 7 günlük zebra balığı larvası işareti alt lobda nöronal nöronal dejenerasyon, (ok) (40x h&e boyama).

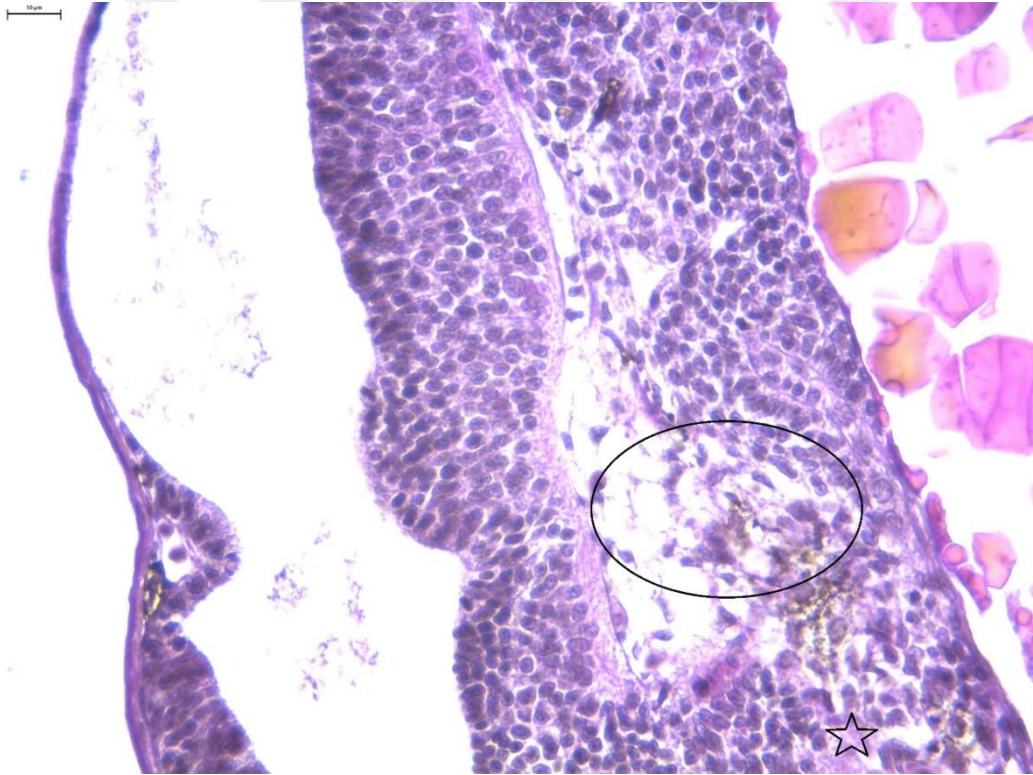
0,356 mg/l doz grubu ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu



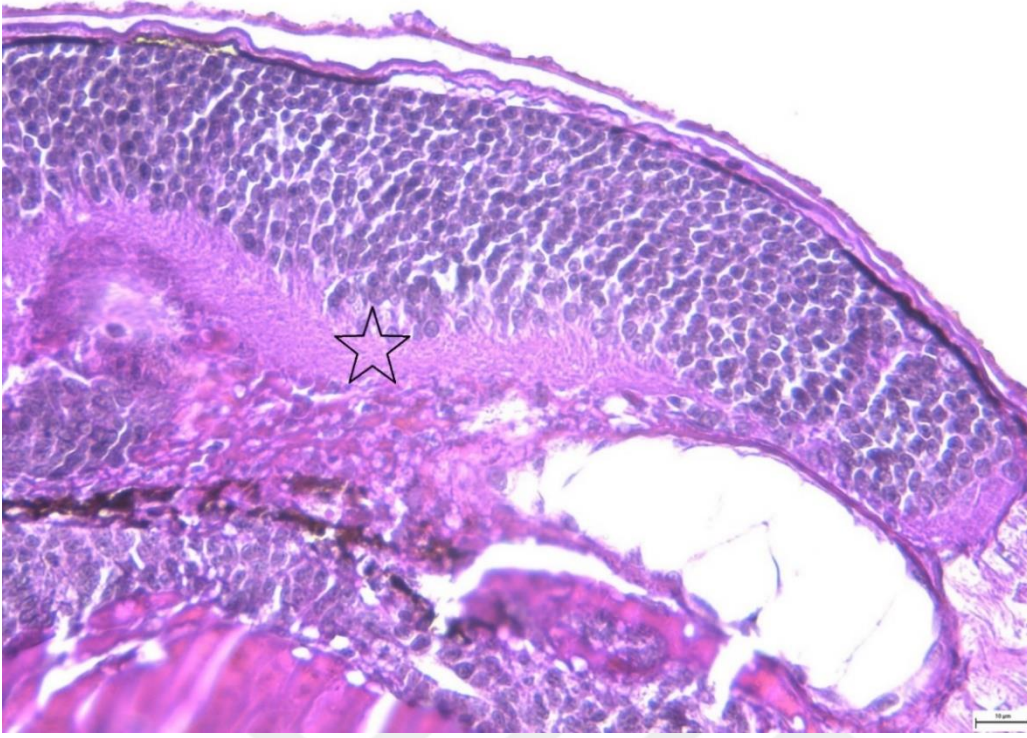
Şekil 4.42. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi (40x h&e boyama).



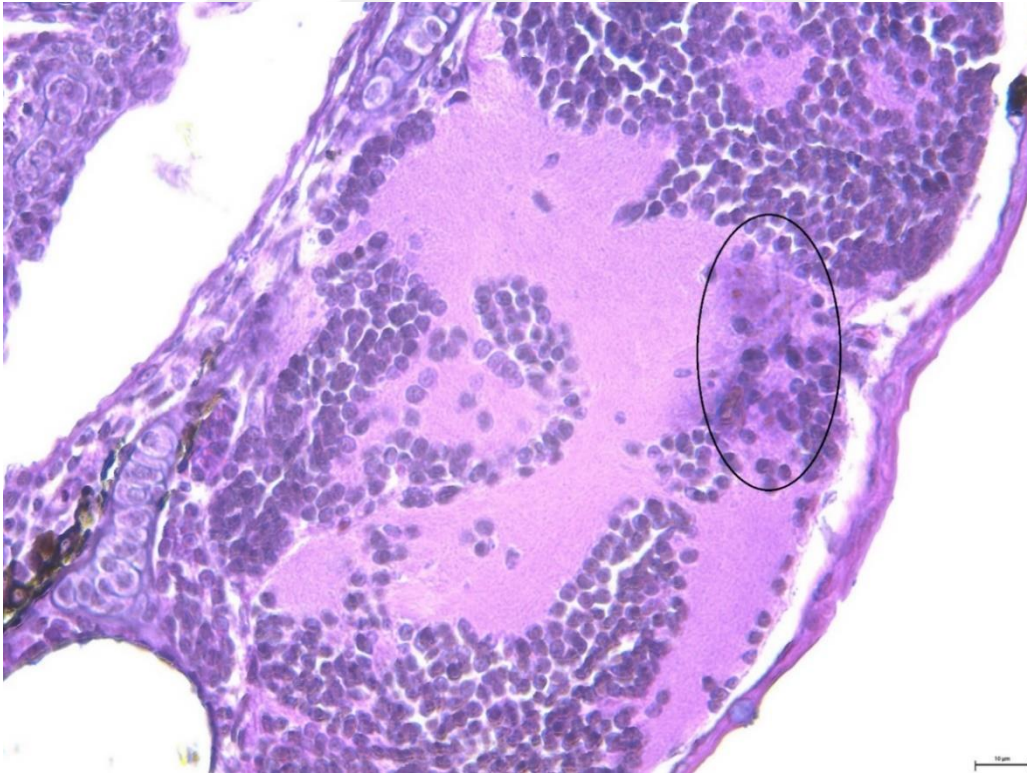
Şekil 4.43. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası, telesefanlonda kanama (ok), vakuolizasyon (yıldız) (40x h&e boyama) .



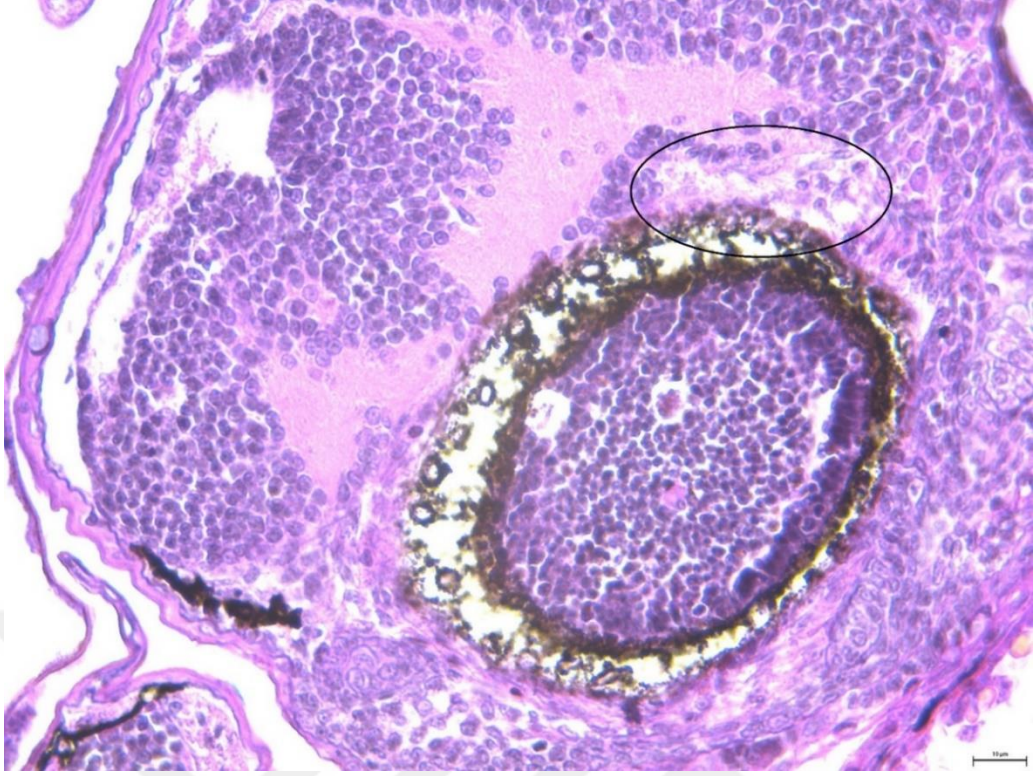
Şekil 4.44. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası, alt lobda nöronal atrofi (halka içi), vakuolizasyon (yıldız), piknotik hücre görünümünde artış (40x h&e boyama).



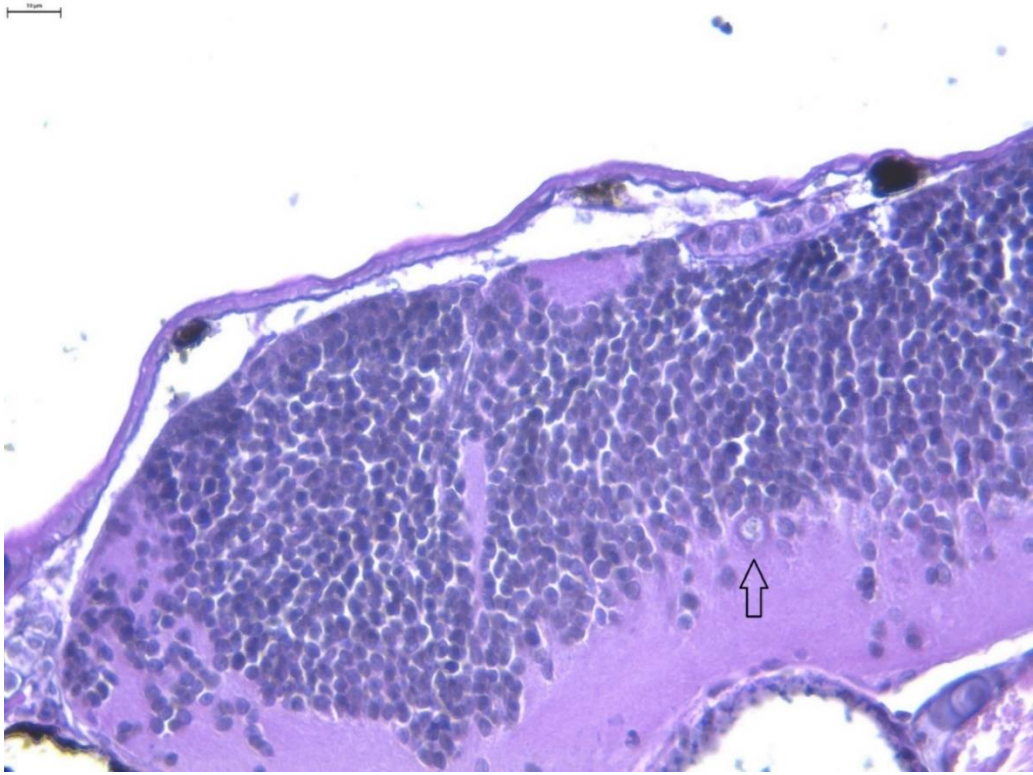
Şekil 4.45. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 48 saatlik zebra balığı larvası yıldız işareti telesefanonda kanama (yıldız) (40x h&e boyama).



Şekil 4.46. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 3 günlük zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi (40x h&e boyama)



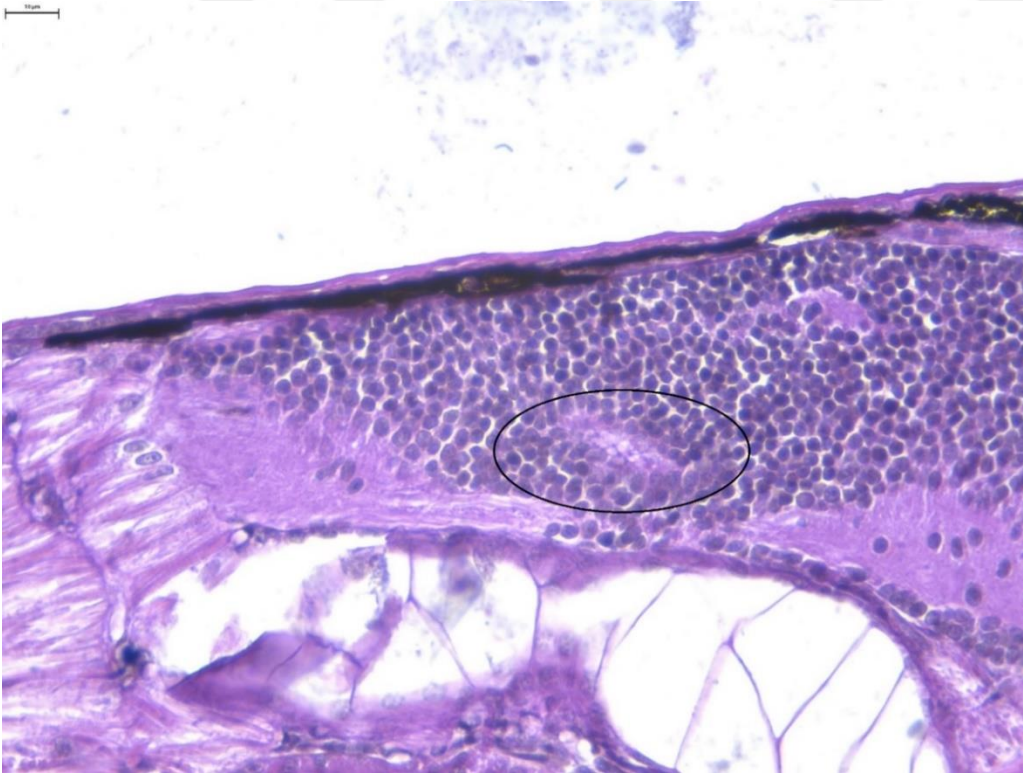
Şekil 4.47. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 3 günlük zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi (40x h&e boyama)



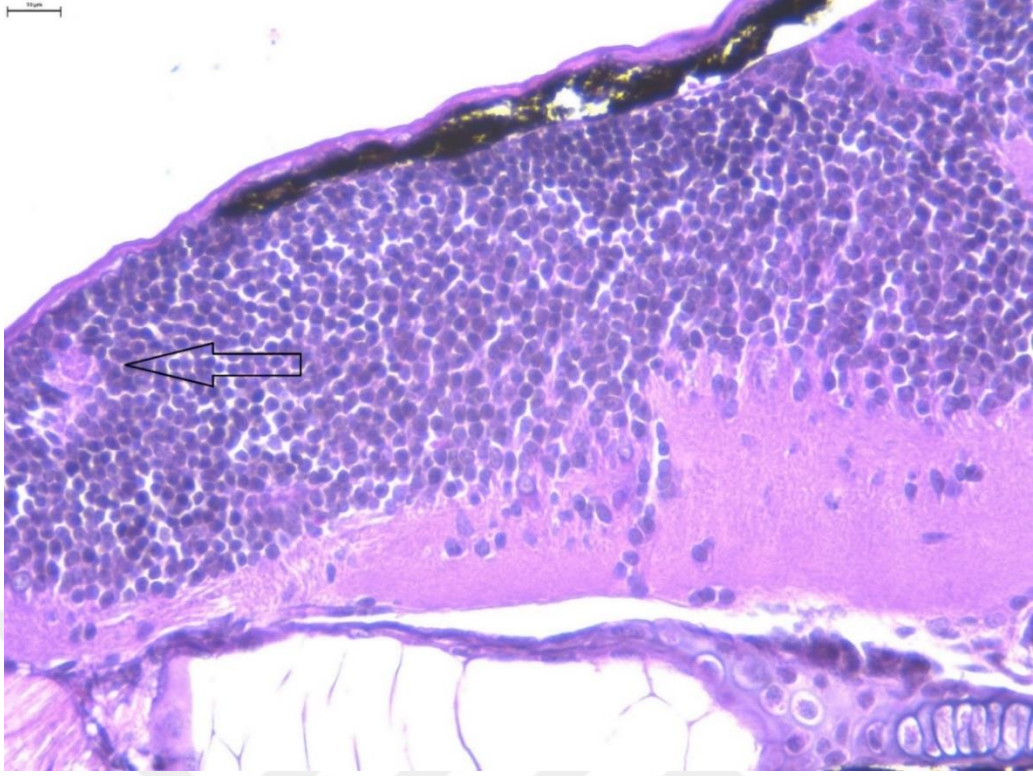
Şekil 4.48. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası alt lobda nöronal nöronal dejenerasyon, genişleyen hücre gövdesi (ok) (40x h&e boyama).



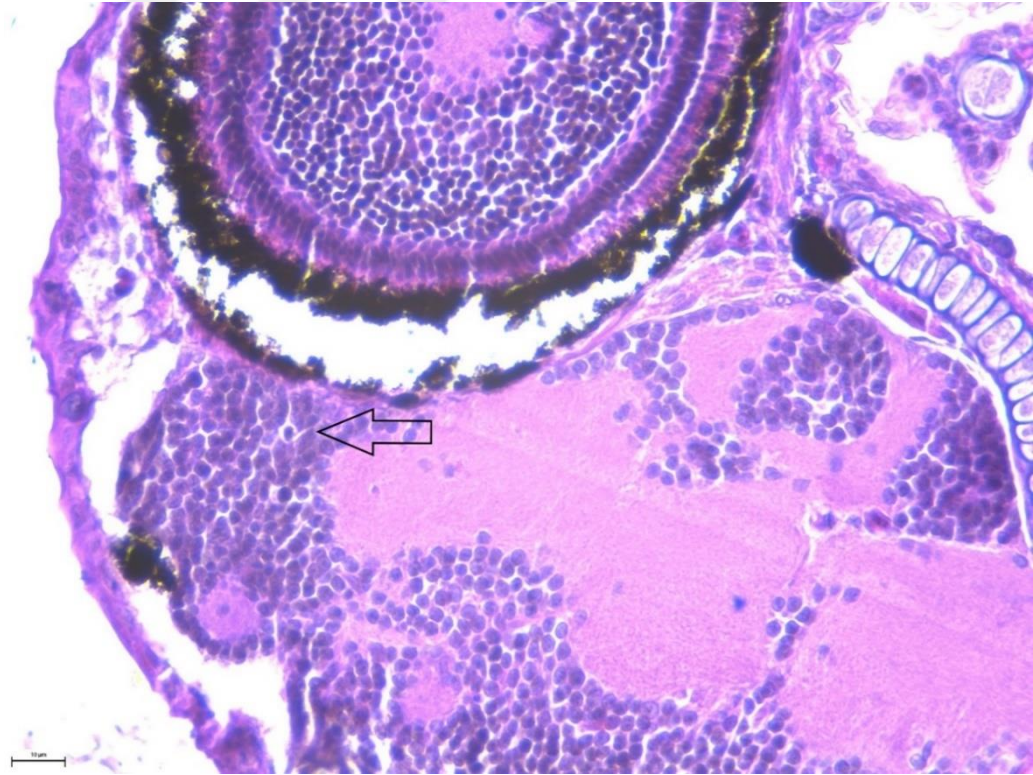
Şekil 4.49. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası alt lobda nöronal nöronal dejenerasyon, genişleyen hücre gövdesi(ok) (40x h&e boyama).



Şekil 4.50. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası halka içi cerebellumda nöronal atrofi (40x h&e boyama).

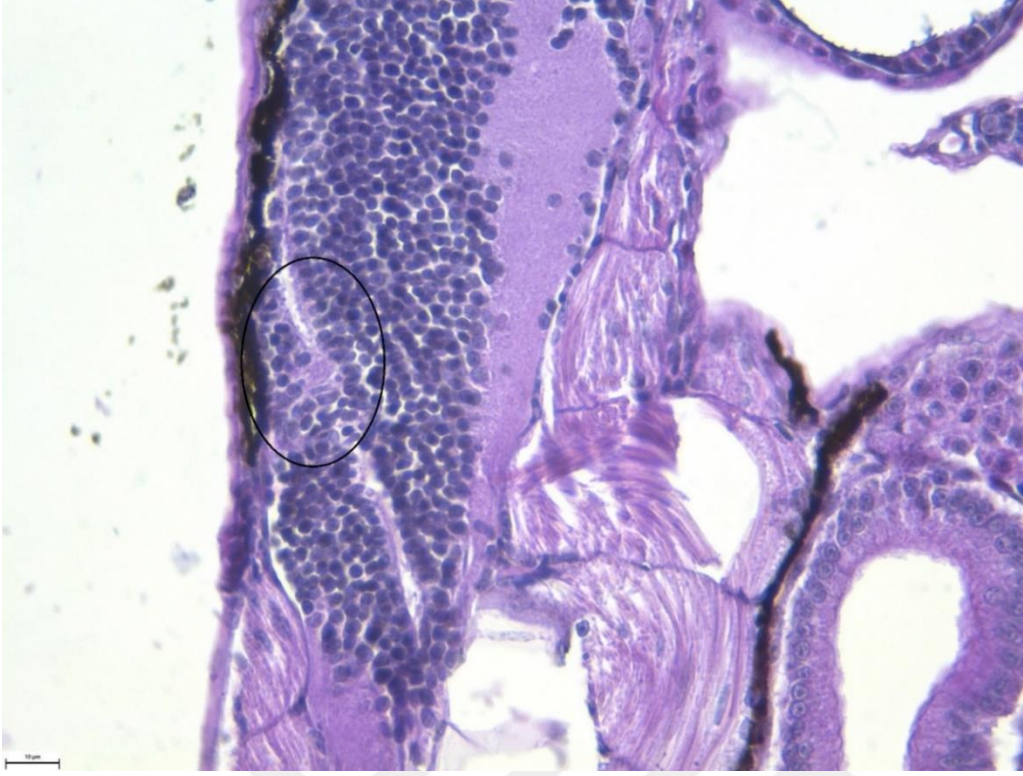


Şekil 4.51. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası cerebellumda nöronal dejenerasyon (ok) (40x h&e boyama).

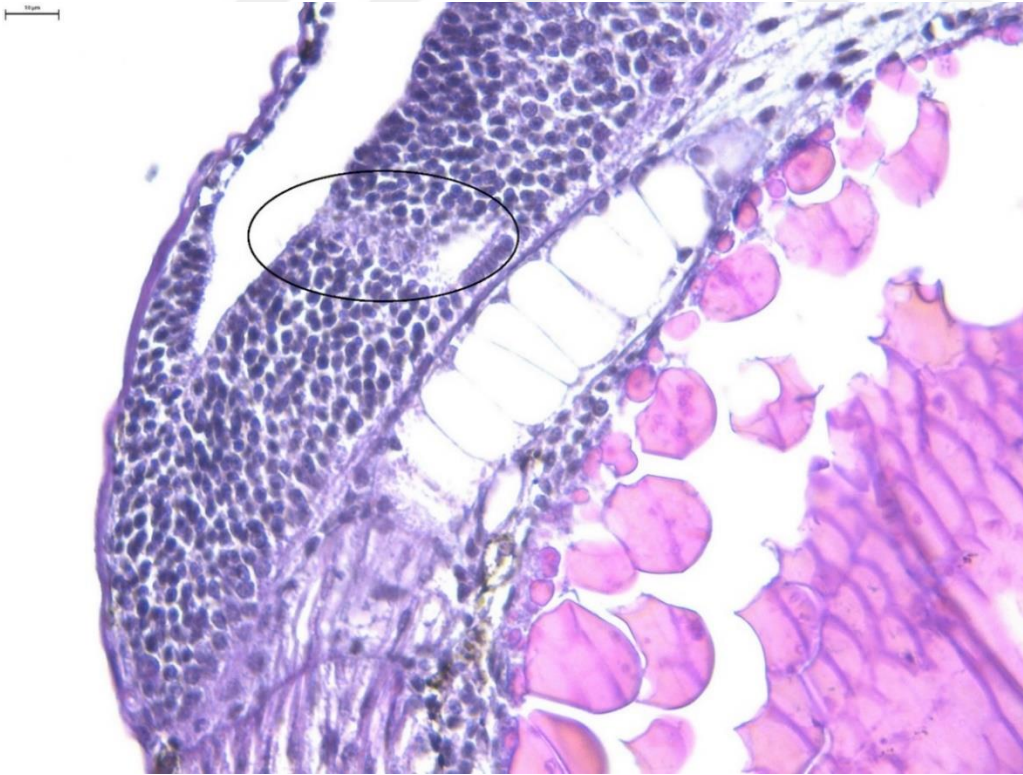


Şekil 4.52. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası ön lobda piknotik çekirdek (ok) (40x h&e boyama).

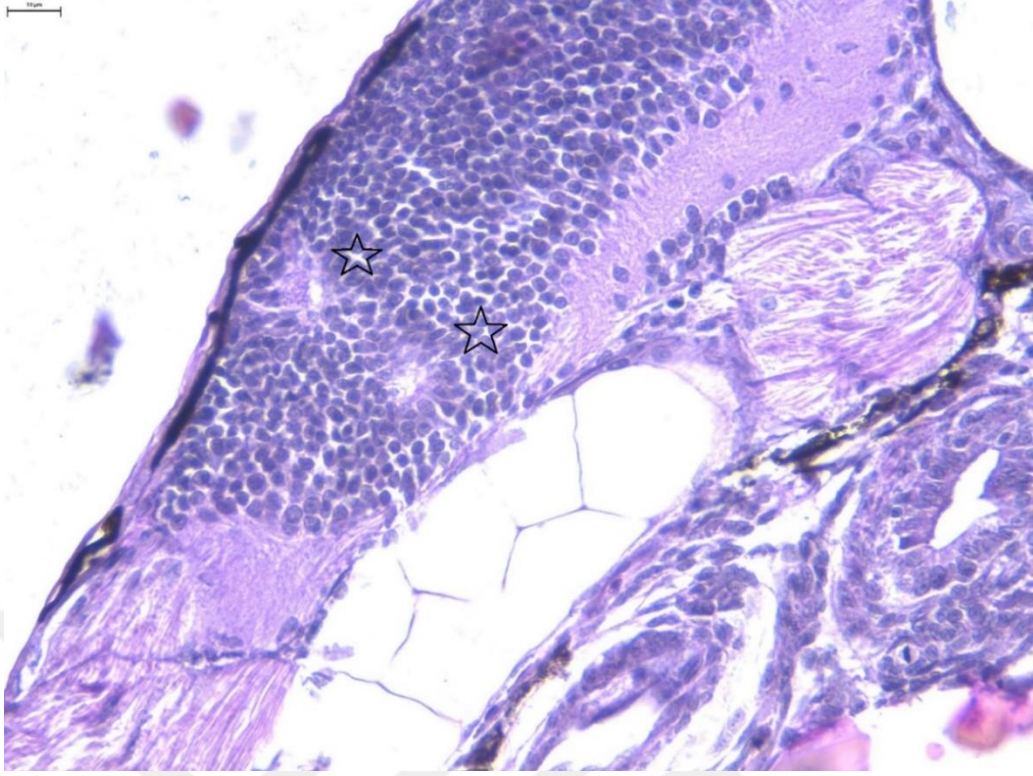
0,890 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu



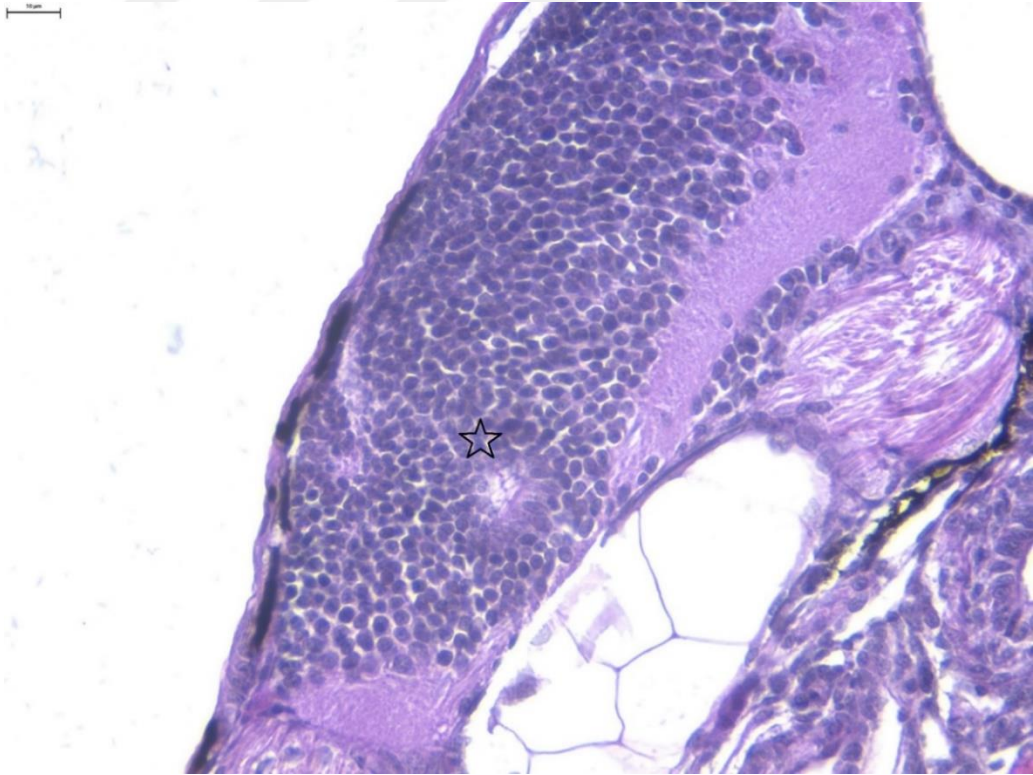
Şekil 4.53. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası telensefalonda nöronal atrofi, (40x h&e boyama).



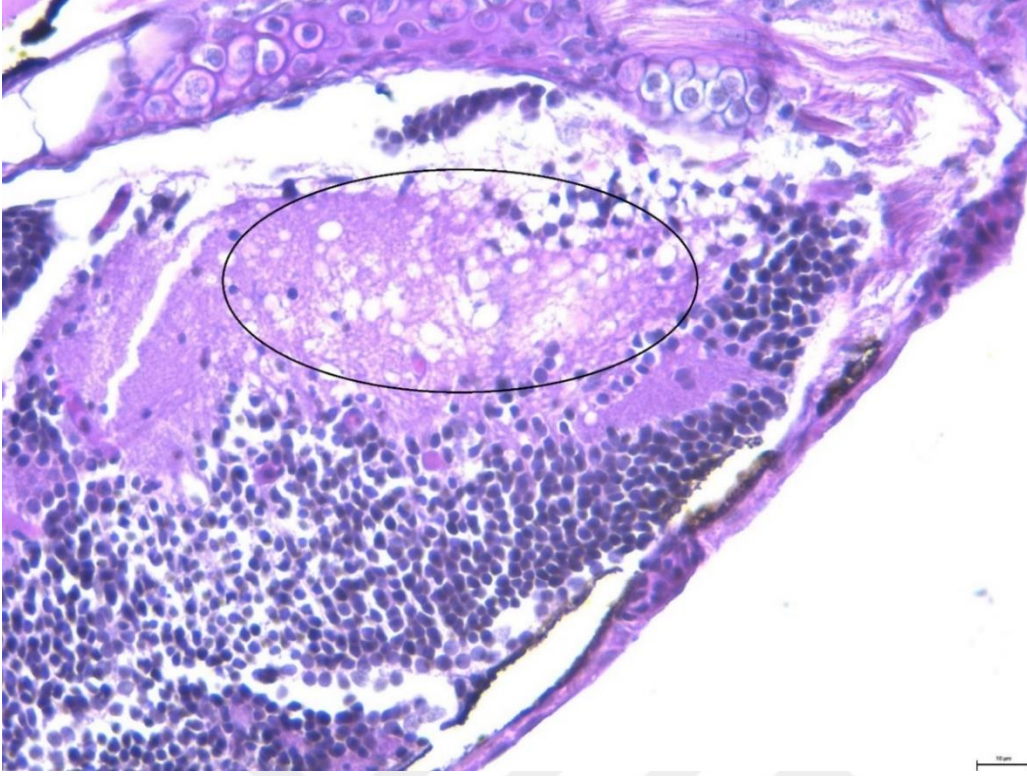
Şekil 4.54. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası halka içi telensefalonda nöronal atrofi, (40x h&e boyama)



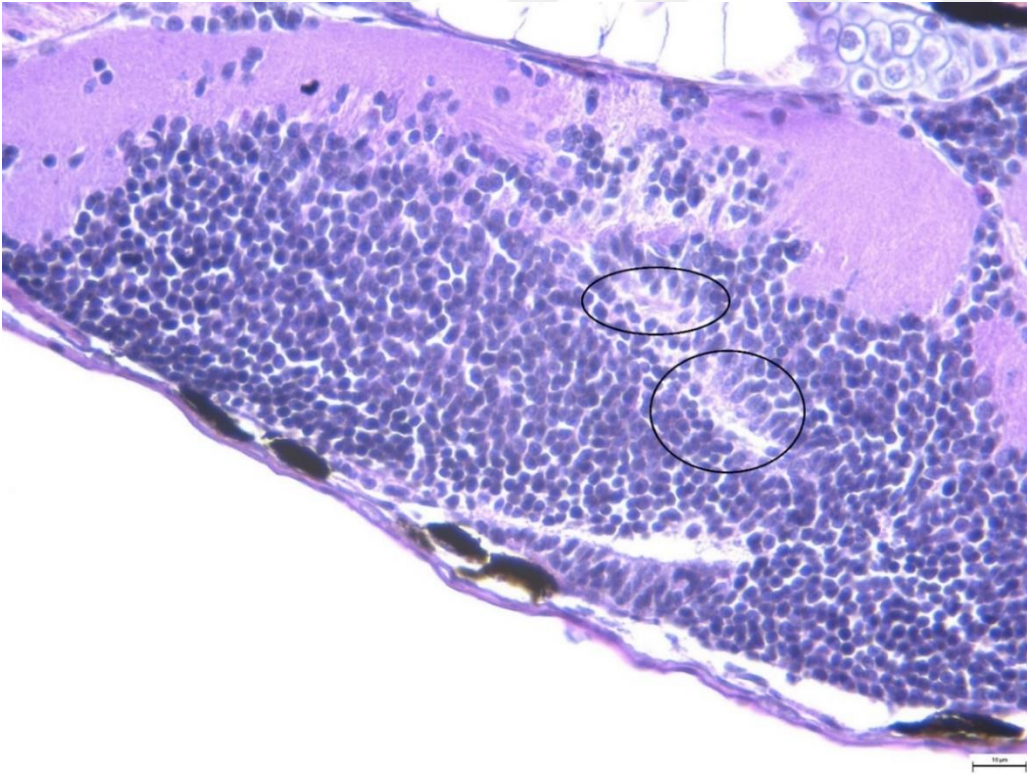
Şekil 4.55. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası (yıldız) nöronal atrofi (40x h&e boyama)



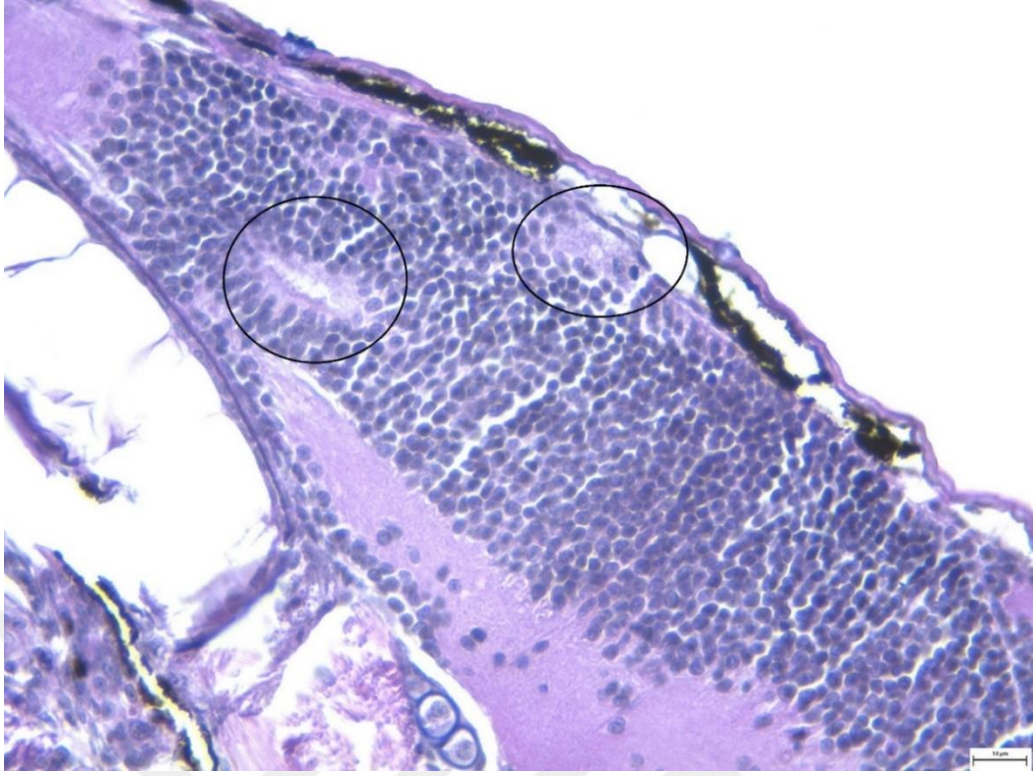
Şekil 4.56. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası yıldız nöronal atrofi (40x h&e boyama).



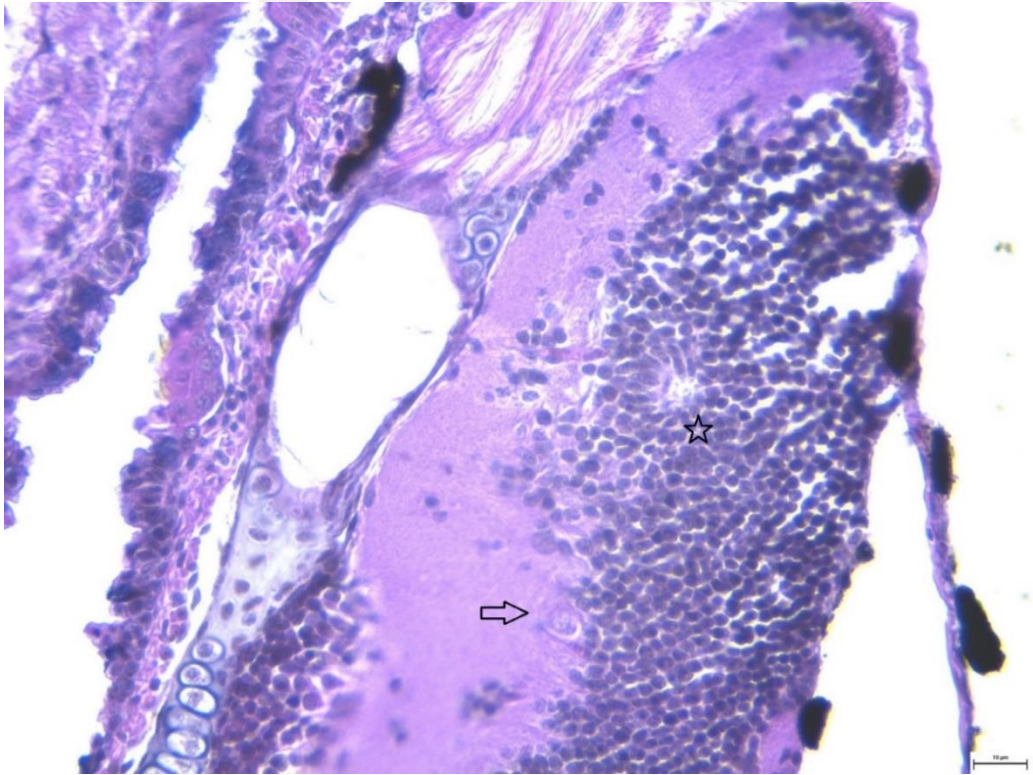
Şekil 4.57. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 5 günlük zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi, (40x h&e boyama).



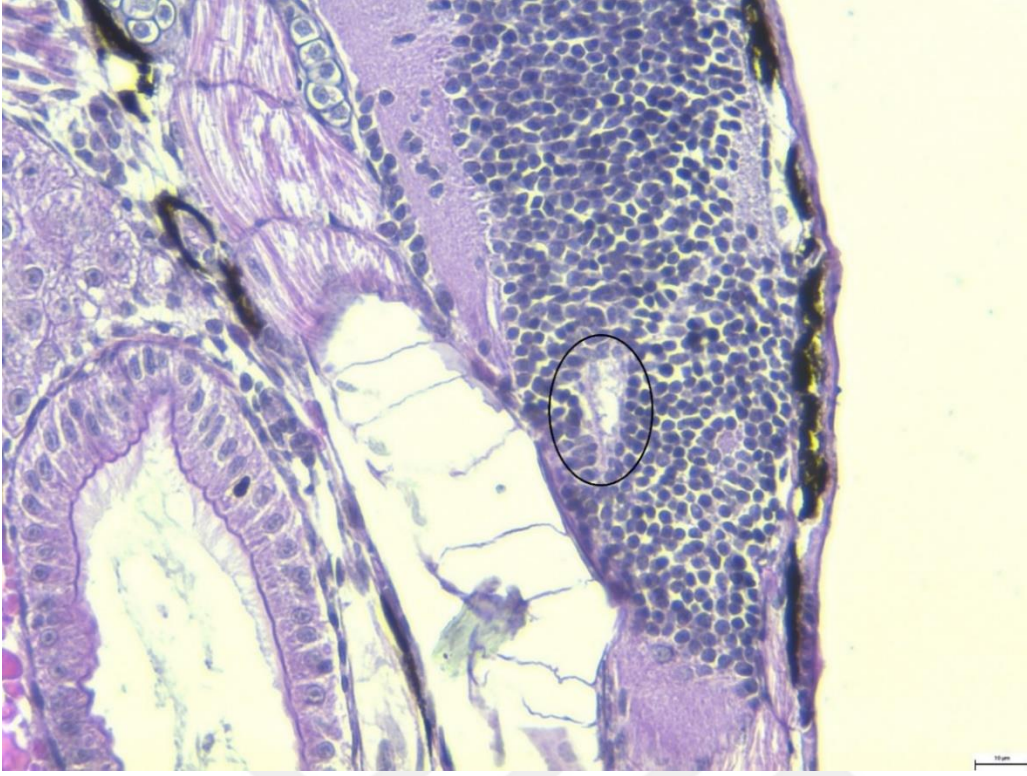
Şekil 4.58. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 5 günlük zebra balığı larvası halka içi telensefalonda nöronal atrofi, (40x h&e boyama)



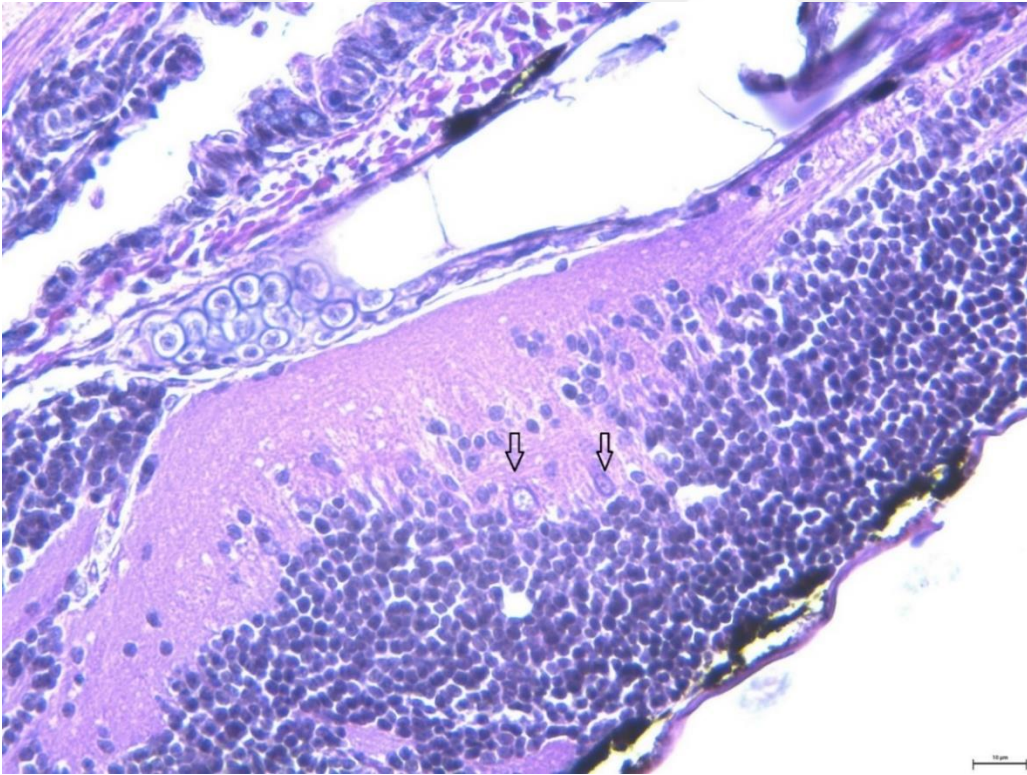
Şekil 4.59 .0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 6 günlük zebra balığı larvası halka içi telensefalonda nöronal atrofi, (40x h&e boyama).



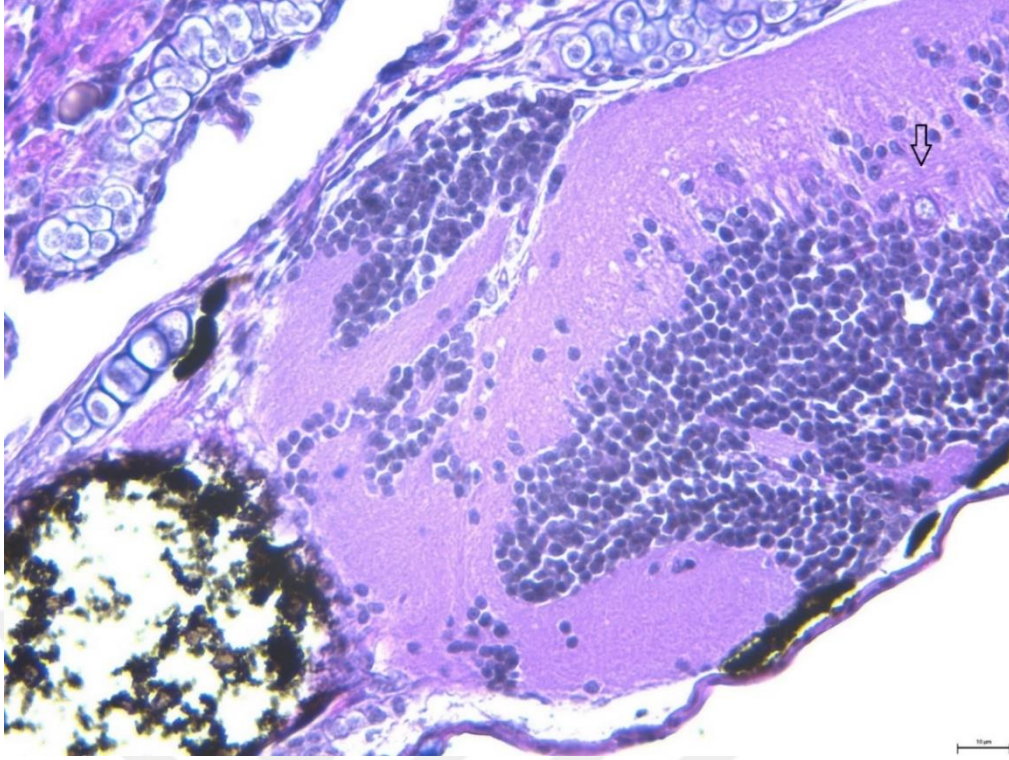
Şekil 4.60. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 7 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok), nöronal atrofi (yıldız) (40x h&e boyama).



Şekil 4.61. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 7 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal atrofi (halka içi), (40x h&e boyama).



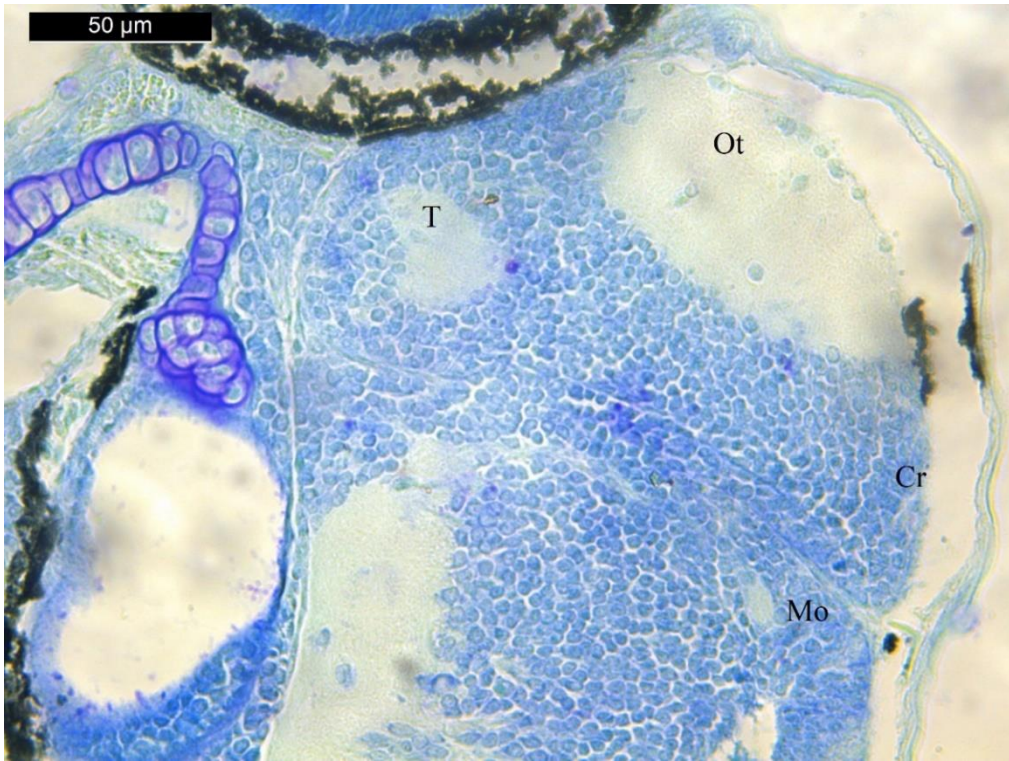
Şekil 4.62. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok), (40x h&e boyama).



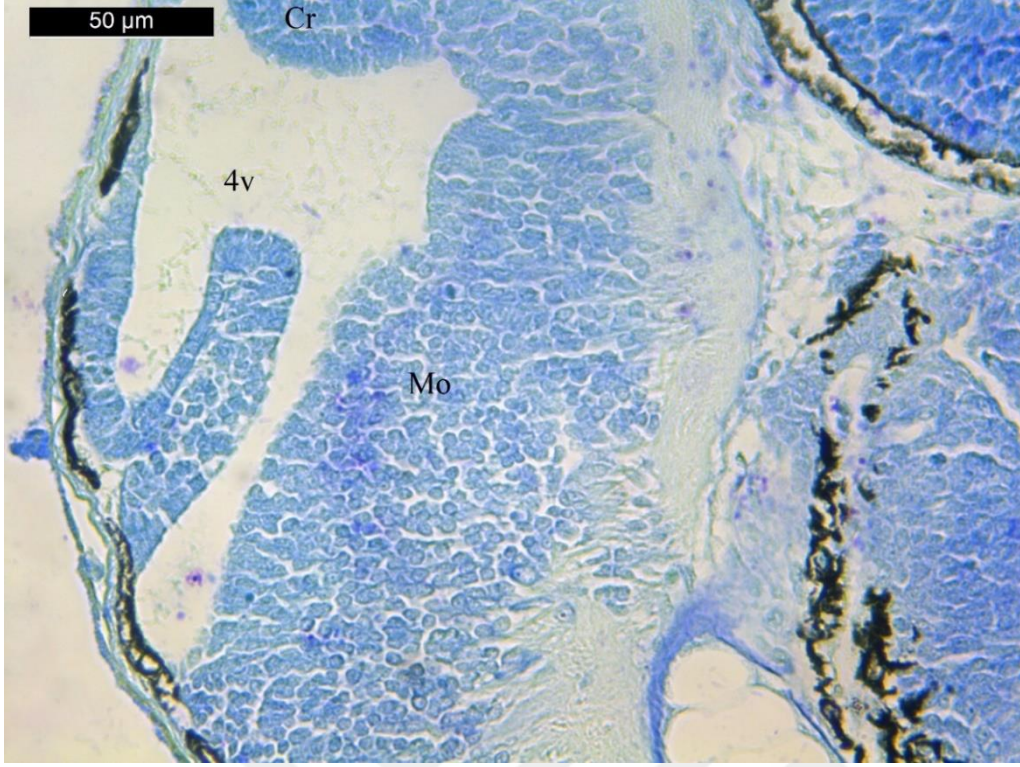
Şekil 4.63. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok) (40x h&e boyama).

4.3.1.2. Toludine mavisi boyaması

Kontrol grubu zebra balığı deney grubu

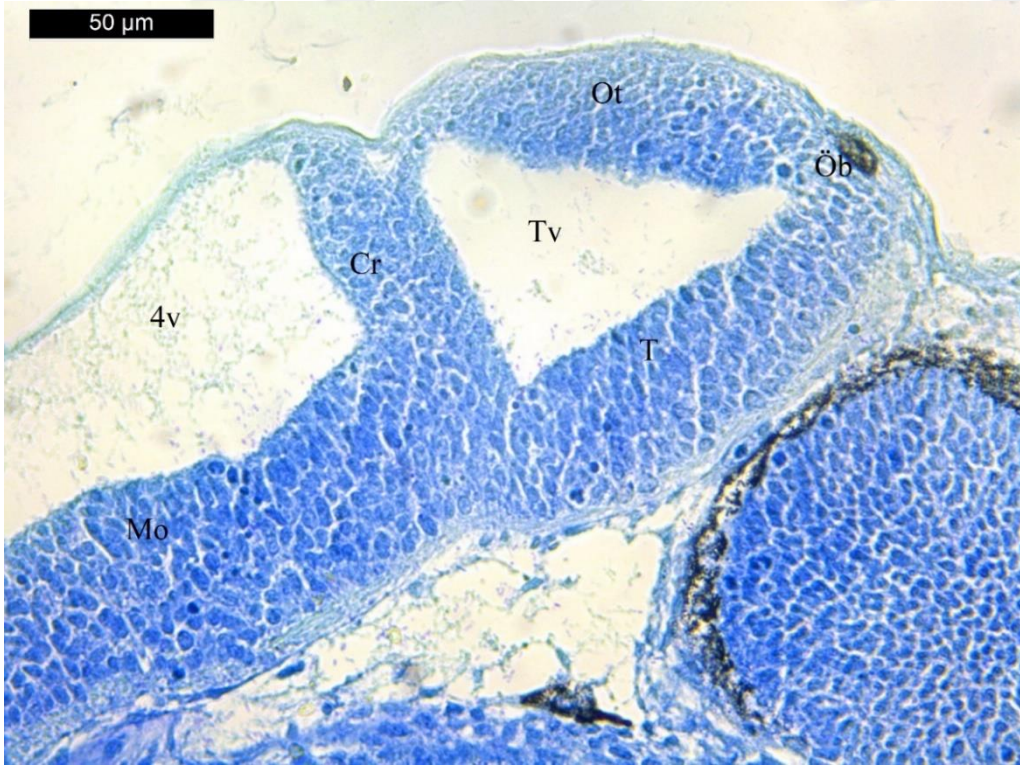


Şekil 4.64. 24 saatlik zebra balığı embriyo, kontrol grubu (40x toludin mavisi boyama)
ot: optik tektum, t: tegmentum, cr:serebellum, mo: medulla oblangata.

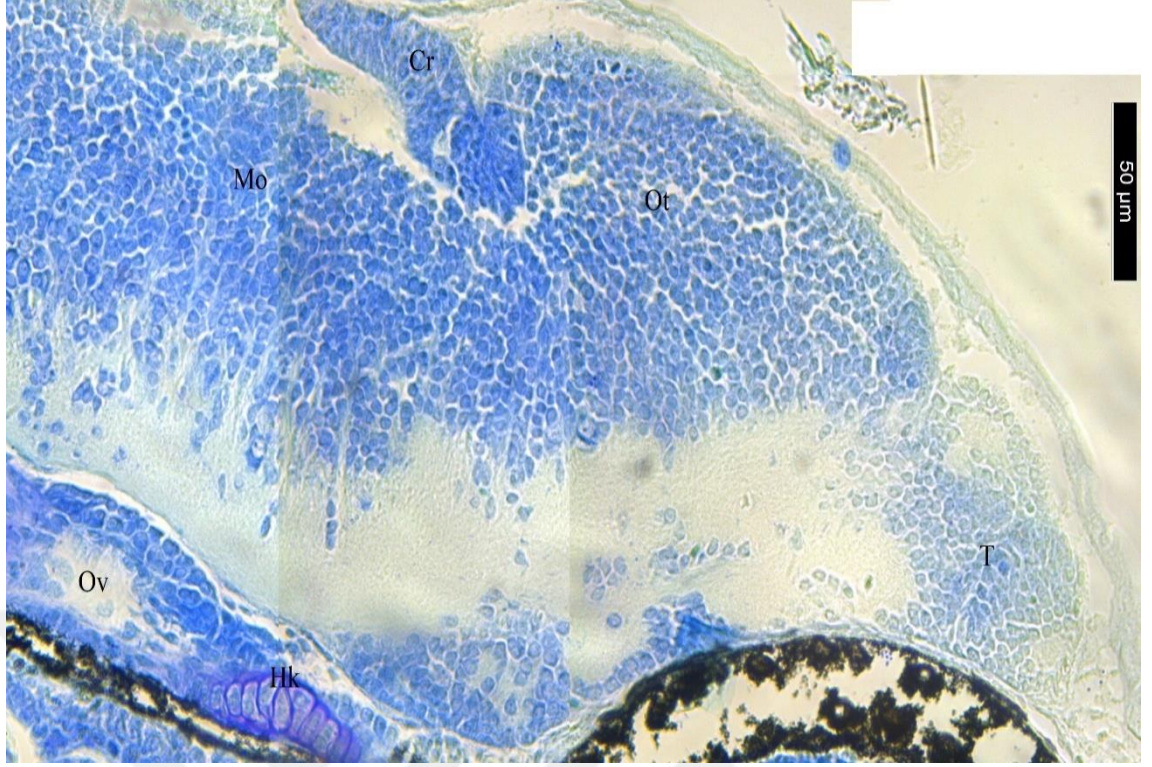


Şekil 4.65. 48 saatlik zebra balığı embriyo, kontrol grubu (40x toludin mavisi boyama)
4v: 4. ventrikül, c:serebellum, mo: medulla oblangata.

Çözücü kontrol grubu zebra balığı deney grubu

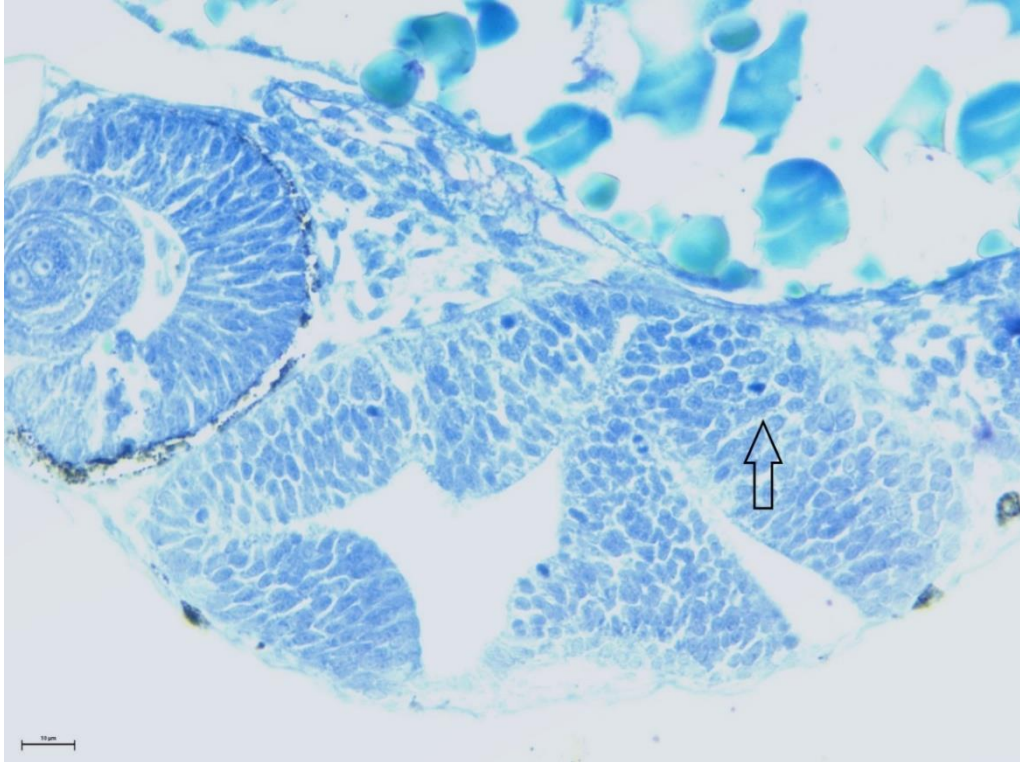


Şekil 4.66. 24 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu (40x toludin mavisi boyama)
4v: 4. ventrikül, cr:serebellum, mo: medulla oblangata, öb: ön beyin, ot: optik tektum, t: tegmentum.

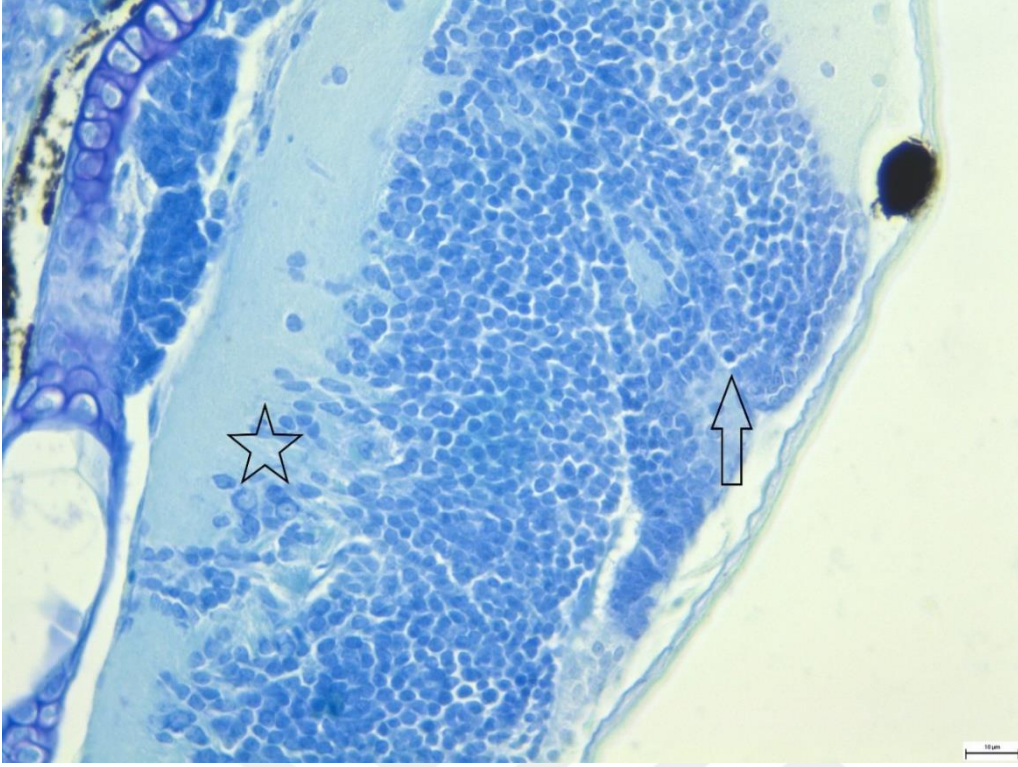


Şekil 4.67. 72 saatlik zebra balığı çözücü kontrol grubu (40x toludin mavisi boyama)
cr:serebellum, mo: medulla oblangata, ot: optik tektum, t: tegmentum,
ov:otik vesikül.

0,178 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu

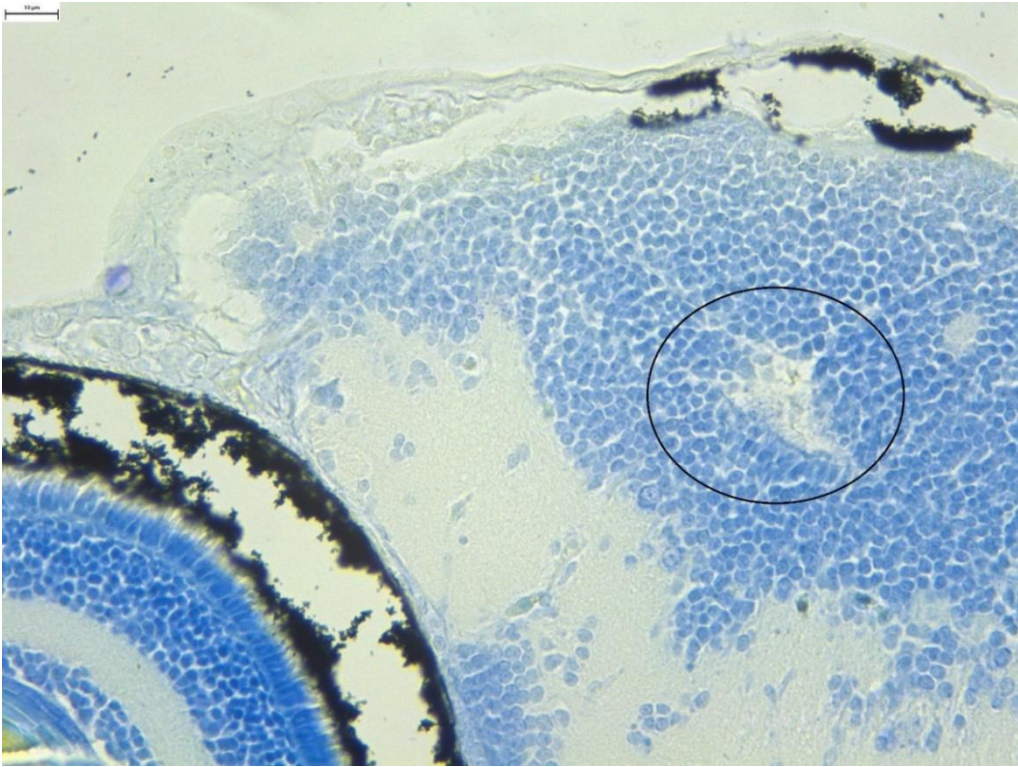


Şekil 4.68. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 24 saatlik zebra balığı larvası , alt
lobda piknotik çekirdek (ok) (40x toludin mavisi boyama).



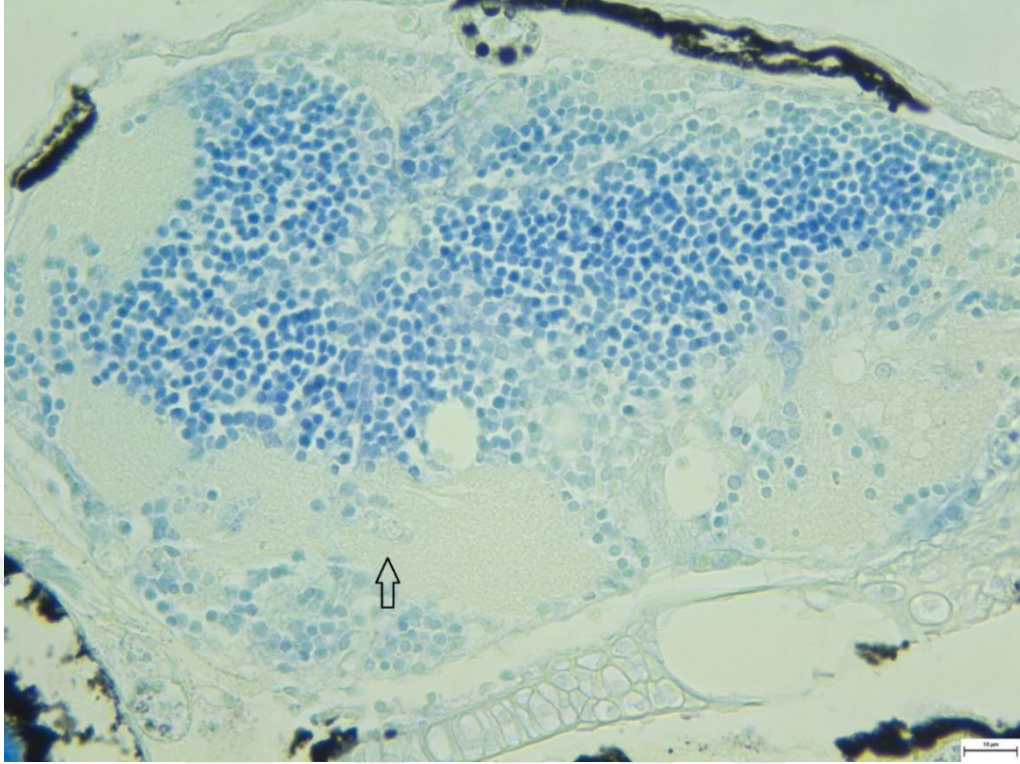
Şekil 4.69. 0,178 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 4 günlük zebra balığı larvası ok işaretleri alt lobda piknotik çekirdek (ok), nöronal dejenerasyon (yıldız) (40x toludin mavisi boyama).

0,356 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu

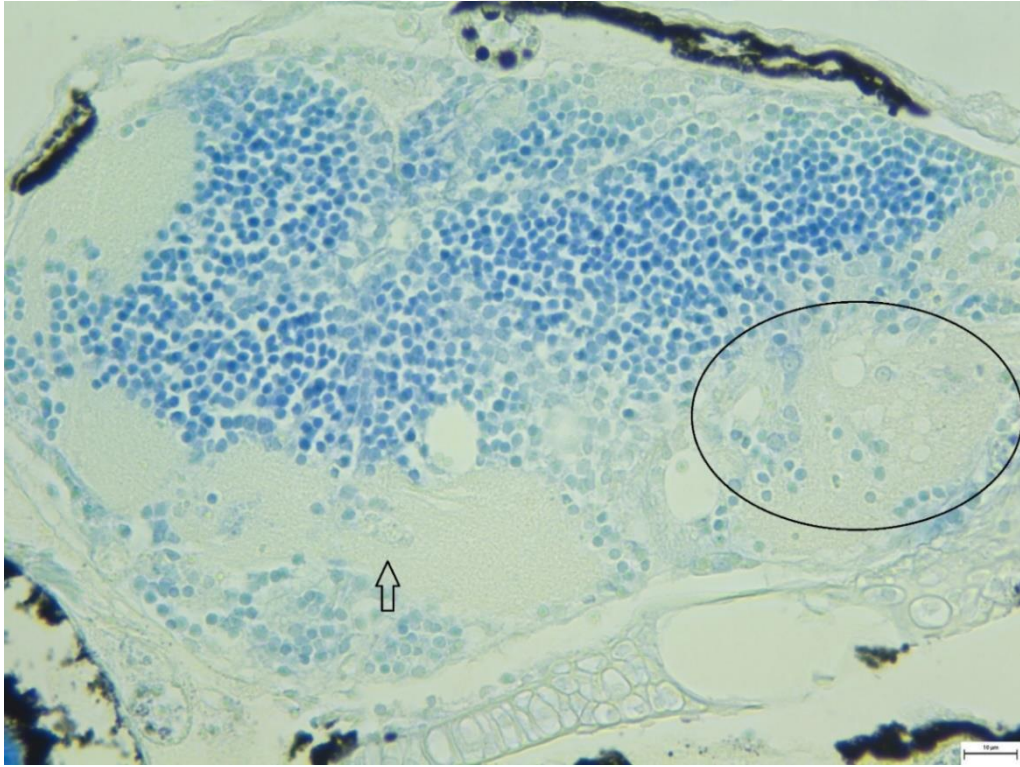


Şekil 4.70. 0,356 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası halka içi alt lobda nöronal atrofi (40x toludin mavisi boyama).

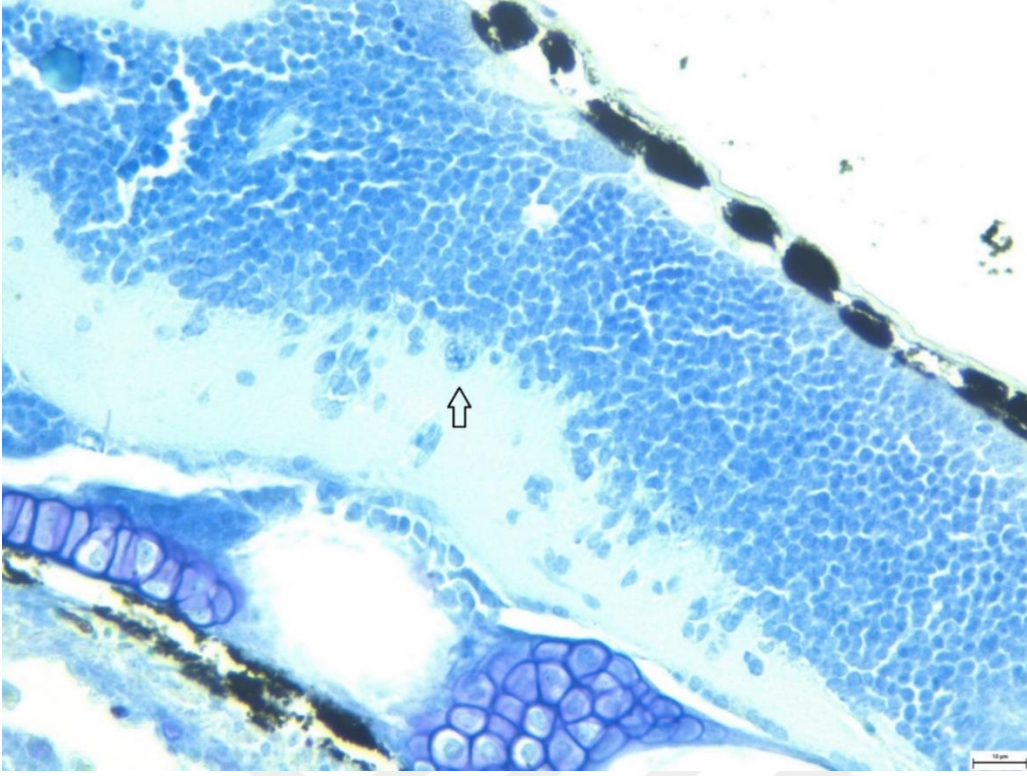
0,890 mg/l ptbba doz uygulanan zebra balığı deney grubu



Şekil 4.71. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok) (40x toludin mavisi boyama).



Şekil 4.72. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı larvası telensefalonda nöronal dejenerasyon (ok), alt lobda nöronal atrofi (halka içi) (40x toludin mavisi boyama).



Şekil 4.73. 0,890 mg/l ptbba'ya maruz bırakılan 8 günlük zebra balığı telensefalonda piknotik çekirdek (ok) (40x toludin mavisi boyama).

5. TARTIŞMA

Günümüzde artan plastik kullanımı ve polimerlerin hayatımızın birçok noktasında yer etmesi, PVC kullanılması nedeniyle doğada PTBBA miktarı sürekli artmaktadır. Doğrudan PTBBA PVC gibi plastik ve polimerlerden değil Lysmeral gibi deterjan ve kozmetik sektöründeki kimyasal maddeleri vücutta metabolize olması ile PTBBA maruziyeti oluşmaktadır. Bunun yanında BMHCA, 4-tert bütıl benzoat, tert-bütıl tolüen ve siklamen aldehit gibi diğer kimyasalların ve Parsol (avobenzon) benzeri güneş kremi gibi kozmetik ürünlerin metabolizasyonu sonucu PTBBA maruziyet oluşmaktadır (Walde vd., 1983; Roscher vd., 1994; Laue vd., 2017; Scherer vd., 2017). Ayrıca avobenzon'nin (1-4-(Tert-butyl phenyl)-3-(4-methoxyphenyl) propane-1,3-Dione) fotodekompozisyonu sonucunda da PTBBA oluşabilmektedir (Gholap vd., 2023). Almanya'da 40 gönüllünün katıldığı bir çalışmada günde yaklaşık 346 µg PTBBA maruziyeti idrardan hesaplanmıştır (Scherer vd., 2017). Her ne kadar PTBBA kullanımı Avrupa Birliği'nde yasaklanmış olsa bile, ithalat yoluyla üretiminin ucuz olması ve alternatif maliyetlerinin çok pahalı olması nedeniyle Çin kaynaklı ürünlerde kullanımı devam etmektedir. Doğrudan maruziyet tehlikeli olmakla birlikte ve diğer kimyasal maddelerin metabolitleri yoluyla daha da fazla maruz kalınmaktadır. PTBBA maruz kalma üreme toksisitesi, özellikle insanlarda erkek üreme sisteminde sperm sayısı ve kalitesinde düşüklük, kadınlarda yumurta rezervinde ve kalitesinde azalma dolayısıyla infertilite problemleri, karaciğer hepatosite toksisitesi, yağlanma, glukogenez ve lipid metabolizmasında azalma, Asetil CoA bağlanarak, enerji metabolizmasında azalmaya, bu çalışmada gösterildiği gibi sinir sisteminde nörotoksik etkiler ve gelişim bozucu teratolojik etkilere neden olmaktadır. Sularda, çöp suyunda ve sanayi atık sularında yüksek oranda PTBBA bulunmaya başlamış olması tehlikeyi daha da arttırmaktadır. PTBBA kullanımı Avrupa ve metabolitleri yoluyla PTBBA oluşturan diğer kimyasalların denetimim artırılması gerekmektedir. Örneğin PTBBA metaboliti oluşturan Lysmeral Mart 2022 yılında AB'de infertiliteye neden olduğu için yasaklanmıştır.

Yapılan çalışmada PTBBA'nın zebra balıklarında yapılan bir çalışma olmadığı için, 120 saatlik PTBBA'nın LC₅₀ dozu 1,775 mg/l olarak bulunmuştur. Sadece Bridie ve arkadaşlarının 1979 yılında japon balıklarında pH 5,0 ve 7,0 değerlerinde 24 ve 48 saatlik LC₅₀ değerini, pH 5 için 4 mg/l, pH 7 için 33 mg/l bulmuştur. (Bridié vd., 1979). Bizim çalışmamızda, pH 8,12 civarındaki akvaryum suyunda yapıldığı ve dönem şartları göz önüne alındığında LC₅₀ değerleri uyumlu sayılabilir.

PTBBA'nın zebra balığı üzerindeki teratolojik etkileri ise gelişim geriliği, omurga bozuklukları, perikardiyal ödem, kranofasiyal anomaliler ve yüzgeç gelişmemesi bulunmaktadır. Anomali sayısı doza bağlı olarak artmaktadır. Ancak 0,356 mg/l dozunda görülen anomaliler 0,89 mg/l dozunda görülen anomalilerden daha ciddidir. 0,89 mg/l dozu LC₅₀ değerlerine daha yakın olduğu için ciddi teratolojik anomalilerin mortaliteye uğramış olabilir.

Scherer ve arkadaşlarının 2017 yılında koku maddesi Isymeral'le insanlar üzerinde denemiştir. 5,26 mg Isymeral içirilen 5 kişinin 48 saat boyunca idrarları toplanmış ve yapılan analizlerde lysmeral metabolitlerinden, lysmerol, lysmerilik asit ve PTBBA tespit edilmiştir. PTBBA hızlı metabolize edildiğinde idrarda 2-5 saat sonrasında maksimuma ulaşmış oluşan metabolitlerin %14,3 PTBBA (230 µg/gün) olmuştur. Ayrıca yapılan 40 kişiye çıkan genişletilmiş denemelerde normalden daha fazla PTBBA idrarda tespit edilmiştir (346 µg/gün). Bunun sebebinin dış kaynaklı PTBBA olabileceği belirtilmiştir.

Hareng ve arkadaşlarının 2022 yılında 3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylpro-panal (p-tert-butyl-alpha-methylhydro-cinnamic aldehyde (BMHCA) adlı koku maddesinin ratlarda spermatoksisite mekanizmasını anlamak için bir çalışma yapmıştır (Hareng vd., 2022). BMHCA'nın temel metaboliti olan PTBBA'nın, sıçan hepatositleri *in vitro* olarak maruz kaldığında, koenzim A'ya (CoA) bağımlı metabolik yolları (glukoneogenez ve lipogenez gibi) etkileyerek CoA ve asetil-CoA düzeylerinde düşüşe neden olduğu daha önce bilinmektedir (McCune vd., 1982). Ayrıca, p-BMHCA ve PTBBA'nın hepatositler ile inkübasyonda, PTBBA-CoA'ya hızlı bir dönüşüm sıvı kromatografiye bağlı yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (LC-HRMS) ile gözlemlendi (Laue vd., 2017). *In vitro* sıçan hepatositlerinde stabil TBBA-CoA seviyelerinde kalıcı bir birikim tespit edildi. Bu birikim, erkek sıçan üreme toksisitesi ile iyi bir korelasyon göstermiştir (Laue vd., 2020). Hareng ve arkadaşlarının bu çalışması sonucunda p-TBBA-CoA konjugatlarının oluşumu, lipid

sentezinin bozulması ve testis toksisitesi arasındaki güçlü bir korelasyon, ve enerji üretimine ve redoks sistemine katkıda bulunan CoA'ya bağımlı başka yolların olumsuz etkilendiği bulunmuştur. Benzoik asit metabolitlerinin ve CoA konjugasyonunun oluşumu, CoA tükenmesinin belirli bir eşiğinin veya bu konjugatların konsantrasyonlarının hücrenin metabolik ve lipid profillerini etkilediği bir biyokimyasal etki modu olarak görülebilir. Bu birikim sonuçta, bozulmuş karaciğer işlevselliği ve bozulmuş spermatogenez gibi organ veya dokuya özgü olumsuz etkilere yol açar (Hareng vd., 2022). Tez çalışması sonucunda tespit edilen özellikle gelişim geriliği gibi baz teratolojik gelişim bozuklukları görülmüştür. Enerji ve lipid metabolizmasında meydana gelen bu zararlı etkileri PTBBA'nın artan dozlarda oluşturduğu etkileri açıklayabilir. Özellikle lipid açısından zengin sinir sistemi dokusunda, gelişim evresinde çok sayıda pinostaik hücre görülmesini açıklayabilir.

Köktürk ve ark. 2021 yaptığı çalışmada n-butanol'un zebra balığı gelişimdeki etkisi araştırılmıştır. Embriyo ve larvalarda skolyoz, lordoz, baş gelişiminde anormallik, yumurta kesesinde ödem oluşumu, kuyrukta anormallik, kardiyak ödem gibi teratolojik bulgular gözlenmiştir. Doz artışına bağlı olarak yüksek dozda beyin dokusunda vakuol oluşumu, karaciğer ise nekroz oluşumu gibi histopatolojik etkiler tespit edilmiştir (Köktürk vd., 2021). Bu çalışmada sinir sistemi üzerinde n-butanol benzer etki göstermiştir. Ancak Köktürk ve ark. 50-1000 mg/l arasında çok yüksek dozda n-butanol kullanarak zebra balığı embriyo larvalarında sonuçlara ulaşmışlardır. n-butanol, etil alkole benzer özellik gösteren dolayısıyla toksik özellikleri daha az olan organik maddedir. PTBBA ise 96 saatlik LC₅₀ değeri 1,772 mg/l olan, 0,178 mg/l dozunda bile teratolojik ve nörotoksik etkiler gösterebilen bir toksik maddedir.

Li ve arkadaşlarının 2020 yaptıkları çalışmada (Li vd., 2020) kadmiyum ve tribütülin'in (TBT) zebra balığında üç kuşak boyunca meydana getirdiği toksikolojik etkilerini incelemişlerdir. Bu iki maddenin tek başına birlikte maruziyeti sonucunda F1 ve F2 nesillerinde gelişimsel nörotoksiteyi indüklediği, embriyoların kalp hızlarının, larvalarda ise vücut uzunluklarının azaldığı belirtilmiştir. Zebra balığı beyinde hipokampal nöronların gelişimini teşvik eden dopamin ile nörodavranışsal tepkilerde rol oynayan serotonin seviyelerinin yeni nesillerde belirgin biçimde azaldığı açıklanmıştır. Bu çalışmada ulaşılan sonuçlar, TPBBA'nın TBT'nin hidrokarbon halkaları ile lipofilik özellik göstermesi, doğada kalıcı olması, yağ metabolizması üzerinde olumsuz etkiler göstermesi açısından benzer kimyasallardır. Nörotoksik

açından gösterdiği olumsuz özellikler de benzetmektedir. Li ve arkadaşlarının yaptığı 3 nesil boyunca maruziyet sonuçları, PTBBA'din de gelecek nesillerde tehlikeli olabileceğine dair deliller içermektedir.

Yi-Pei Chen ve arkadaşlarının 2014 yılında genetik olarak modifiye edilmiş mayalarla çalışmaları sırasında, sirtuin grubu genlerinin inhibe edici maddeleri etkinliklerini teorik olarak hesaplamışlardır(Chen vd., 2014). Sirtuinler NAD⁺ bağımlı deasetilaz olarak adlandırılan metabolik regüle edici sinyal proteinleridir. Özellikle yaşlanma, transkripsiyon, apoptoz, inflamasyon ve enerji metabolizması fonksiyonlarını düzenler. Son derece korunmuş insanlarda da bulunan, iyi tanımlanmış 7 adet (SIRT1-7) genden oluşur. PTBBA, SIRT1 aktivitesini zayıf ama seçici olarak inhibe edebildiğini Yi-Pei Chen çalışmasında gösterilmiştir. SIRT1 geni insanlarda insulin sensitivitesi oluşumunda sorumlu olabileceği belirtilmektedir (Nemoto vd., 2005). Dolayısıyla PTBBA birden fazla sistemde enerji metabolizmasında olumsuz etkilere yol açabilme ihtimali vardır. Ayrıca Wilson ve arkadaşlarının (B. J. Wilson vd., 2010) fare hepatositleri üzerinde yaptığı çalışmada SIRT1 geni ile östrojen reseptörü α 'nın (ERR α) ekspresyonu arasında doğrudan ilişki olduğunu ve SIRT1 geninin ekspresyonunun azalması durumunda ERR α azaldığını bildirmişlerdir. ERR α ise özellikle üreme sistemini düzenleyen temel reseptörlerden biri olması dışında mitokondriyal biyogenez, glukogenez, oksidatif fosforilasyon ve yağ asidi metabolizması ile doğrudan ilgilidir. PTBBA enerji metabolizması ilgili farklı nedenlerle sorunlara neden olabilir.

Natsch ve arkadaşlarının 2021 yılında siklamen aldehitte ratlarda erkek üreme toksisitesi konusunda yaptığı çalışmada, siklamen aldehitin ana metaboliti olan PTBBA ratlarda erkek üreme toksisitesine, hepatotoksik olabileceğini, CoA vasıtasıyla enerji metabolizmasını bozarak üreme toksisitesine yol açabileceğini ancak farklı türlerle yapılan denemede farklı toksisite dozlarının oluşabileceğini, örneğin tavşanlarda zarar verme düzeyinin azaldığını belirtmişlerdir (Natsch vd., 2021).

Stewart ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptığı çalışmada 17 α -etinilestradiol'ün (EE2) zebra balığı embriyo ve larvalarında çevresel dozlarda (1 μ M) kemik ve kıkırdak gelişimini bozarak kranofasiyal anomalilere neden olduğu belirtilmektedir. PTBBA ve EE2 EBB olduğu ve benzer mekanizmalarla, benzer şekilde kranofasiyal anomaliler gibi zararlı etkileri gösterdiği için PTBBA çevresel konsantrasyonlarda da etki gösterebilir. (Stewart vd., 2023).

PTBBA'nın zebra balığına ve sinir sistemine olan etkilerinin yüksek olması, maddenin Avrupa Birliği'nde yasaklanmış olmasına rağmen, dünyanın birçok bölgesinde kullanılmaya devam edilmesi, gündelik kullanılan ürünlerde bulunması nedeniyle oluşturduğu riskler artmaktadır. Su, atık suyu ve kanalizasyon atıkları PTBBA tespit edilmesi, bu risklerin daha da arttığının belirtileridir. BMHCA, 4-tert bütıl benzoat, tert-bütıl tolüen ve siklamen aldehit gibi diğer kimyasalların da metabolizasyonu sonucu vücutta PTBBA oluşması, maddenin oluşturabileceği zararları daha da arttırmaktadır. Sadece sinir sistemi, teratolojik etkileri dışında literatürde çok rastlanan, erkek üreme sistemine verebileceği hasarlardan dolayı PTBBA kullanımının düzenlemesi, plastik katkı maddesi olarak kullanımının durdurulması ve daha zararsız uygun alternatiflerinin kullanılmaya başlaması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Anawalt, B. D. (2013). The silent spermatozoon: are man-made endocrine disruptors killing male fertility? *Asian Journal of Andrology*, 15(2), 165. <https://doi.org/10.1038/AJA.2012.148>
- Balabanič, D., Rupnik, M., & Klemenčič, A. K. (2011). Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. İçinde *Reproduction, Fertility and Development* (C. 23, Sayı 3, ss. 403–416). <https://doi.org/10.1071/RD09300>
- Bellinger, D. C. (2013). Prenatal Exposures to Environmental Chemicals and Children's Neurodevelopment: An Update. *Safety and Health at Work*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.5491/SHAW.2013.4.1.1>
- Bernhardt, E. S., Rosi, E. J., & Gessner, M. O. (2017). Synthetic chemicals as agents of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15(2), 84–90. <https://doi.org/10.1002/fee.1450>
- Blader, P., & Strähle, U. (2000). Zebrafish developmental genetics and central nervous system development. *Human molecular genetics*, 9(6), 945–951. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.6.945>
- Bridié, A. L., Wolff, C. J. M., & Winter, M. (1979). The acute toxicity of some petrochemicals to goldfish. *Water Research*, 13(7), 623–626. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(79\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(79)90010-1)
- Brösamle, C., & Halpern, M. E. (2002). Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia*, 39(1), 47–57. <https://doi.org/10.1080/09639489.2015.1014896>
- Cagen, S. Z., Patterson, D. R., Wimberly, H. C., Lu, C. C., & Gardiner, T. H. (1989). Toxicity Induced by Subchronic Dermal Exposure to Paratertiary Butyl Benzoic Acid (pt BBA) in Fischer 344 Rats. *Journal of the American College of Toxicology*, 8(5), 1027–1038. <https://doi.org/10.3109/10915818909018063>
- Carvan, M. J., Dalton, T. P., Stuart, G. W., & Nebert, D. W. (2000). Transgenic Zebrafish as Sentinels for Aquatic Pollution. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 919(1), 133–147. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06875.x>
- Carvan, M. J., Loucks, E., Weber, D. N., & Williams, F. E. (2004). Ethanol effects on the developing zebrafish: Neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(6 SPEC. ISS.), 757–768. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.016>
- Chen, Y. P., Catbagan, C. C., Bowler, J. T., Gokey, T., Goodwin, N. D. M., Guliaev, A. B., Wu, W., & Amagata, T. (2014). Evaluation of benzoic acid derivatives as sirtuin inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), 349–352. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.004>
- Christensen, K. L. Y., & White, P. (2011). A methodological approach to assessing

- the health impact of environmental chemical mixtures: PCBs and hypertension in the National Health and Nutrition Examination Survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(11), 4220–4237. <https://doi.org/10.3390/ijerph8114220>
- Clark, L. B., Rosen, R. T., Hartman, T. G., Alaimo, L. H., Louis, J. B., Hertz, C., Ho, C. T., & Rosen, J. D. (1991). Determination of nonregulated pollutants in three New Jersey publicly owned treatment works (POTWs). *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 63(2), 104–113.
- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J. M., Pakdel, F., Balaguer, P., & Aït-Aïssa, S. (2012). Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicological Sciences*, 125(2), 439–449. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr297>
- De Coster, S., & Van Larebeke, N. (2012). Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/713696>
- De Esch, C., Slieker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., & de Groot, D. (2012). Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini review. *Neurotoxicology and Teratology*, 34(6), 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.08.006>
- ECHA. (2016). *European Chemicals Agency: REACH registration dossier, 4-tert-butylbenzoic acid*. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/12153>
- Eisen, J. S. (1991). Developmental neurobiology of the zebrafish. *J Neurosci.*, 11(2), 311–317. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90048-9)
- ESPA. (2006). *Process descriptions for Production of PTBBA Metal salts and Use as Additive in PVC*.
- EU RAR. (2009). *European Union Risk Assessment Report - 4-TERT-BUTYLBENZOIC ACID* (Sayı July).
- Eurostat. (2021). *Chemicals production and consumption statistics - Statistics Explained*. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Chemicals_production_and_consumption_statistics
- Gholap, A. D., Sayyad, S. F., Hatvate, N. T., Dhumal, V. V., Pardeshi, S. R., Chavda, V. P., & Vora, L. K. (2023). *Drug Delivery Strategies for Avobenzone : A Case Study of Photostabilization*.
- Giussani, D. A. (2011). The vulnerable developing brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2641–2642. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019726108>
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), E1–E150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>
- Grandjean, P., & Landrigan, P. J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology*, 13(3), 330–338. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70278-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70278-3)

- Hanneman, E., & Westerfield, M. (1989). Early expression of acetylcholinesterase activity in functionally distinct neurons of the zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*, 284(3), 350–361. <https://doi.org/10.1002/cne.902840303>
- Harding, A. K., Daston, G. P., Boyd, G. R., Lucier, G. W., Safe, S. H., Stewart, J., Tillitt, D. E., & Van Der Kraak, G. (2006). Endocrine Disrupting Chemicals Research Program of the U.S. Environmental Protection Agency: Summary of a Peer-Review Report. *Environmental Health Perspectives*, 114(8), 1276. <https://doi.org/10.1289/EHP.8875>
- Hareng, L., Schuster, P., Haake, V., Walk, T., Herold, M., Laue, H., & Natsch, A. (2022). Towards the mechanism of spermatotoxicity of p-tert-butyl-alpha-methylhydrocinnamic aldehyde: inhibition of late stage ex-vivo spermatogenesis in rat seminiferous tubule cultures by para-tert-butyl- benzoic acid. *Archives of Toxicology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03379-y>
- Hoyberghs, J., Bars, C., Ayuso, M., Van Ginneken, C., Foubert, K., & Van Cruchten, S. (2021). DMSO Concentrations up to 1% are Safe to be Used in the Zebrafish Embryo Developmental Toxicity Assay. *Frontiers in Toxicology*, 3(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.804033>
- Hunter, C. G., Chambers, P. L., & Stevenson, D. E. (1965). Studies on the oral toxicity of p-tert-butyl benzoic acid in rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 3(3), 289–298. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(65\)80087-6](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(65)80087-6)
- Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., & Pickford, D. B. (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquatic Toxicology*, 76(1), 69–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.008>
- 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(1), 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., & Tilson, H. A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104(Suppl 4), 715–740. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s4715>
- Kawai, H., Arata, N., & Nakayasu, H. (2001). Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord. *Glia*, 36(3), 406–413. <https://doi.org/10.1002/glia.1126>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kimmel, C. B., Patterson, J., & Kimmel, R. O. (1974). The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. *Developmental Psychobiology*, 7(1), 47–60. <https://doi.org/10.1002/dev.420070109>
- Kimmel, C. B., Warga, R. M., & Schilling, T. F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development (Cambridge, England)*, 108(4), 581–594. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2387237>
- Köktürk, M., Çomaklı, S., Özkaraca, M., Alak, G., & Atamanalp, M. (2021).

- Teratogenic and Neurotoxic Effects of n-Butanol on Zebrafish Development. *Journal of Aquatic Animal Health*, 33(2), 94–106. <https://doi.org/10.1002/aah.10123>
- Kumar, M., Sarma, D. K., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Prakash, A., & Tiwari, R. (2020). Environmental Endocrine-Disrupting Chemical Exposure: Role in Non-Communicable Diseases. *Frontiers in Public Health*, 8(September), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.553850>
- Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10(2), 121–173. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04049.x>
- Laessig, S. A., McCarthy, M. M., & Silbergeld, E. K. (1999). *Neurotoxic effects of endocrine disruptors* (ss. 745-751.). Current opinion in neurology.
- Laue, H., Badertscher, R. P., Hostettler, L., Weiner-Sekiya, Y., Haupt, T., Nordone, A., Adamson, G. M., & Natsch, A. (2020). Benzoyl-CoA conjugate accumulation as an initiating event for male reprotoxic effects in the rat? Structure–activity analysis, species specificity, and in vivo relevance. *Archives of Toxicology*, 94(12), 4115–4129. <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02918-9>
- Laue, H., Kern, S., Badertscher, R. P., Ellis, G., & Natsch, A. (2017). p-Alkyl-Benzoyl-CoA Conjugates as Relevant Metabolites of Aromatic Aldehydes With Rat Testicular Toxicity—Studies Leading to the Design of a Safer New Fragrance Chemical. *Toxicological Sciences*, 160(2), 244–255. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx178>
- Lee, D.-H., Porta, M., Jacobs, D. R., & Vandenberg, L. N. (2014). Chlorinated Persistent Organic Pollutants, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*, 35(4), 557–601. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1084>
- León-Olea, M., Martyniuk, C. J., Orlando, E. F., Ottinger, M. A., Rosenfeld, C. S., Wolstenholme, J. T., & Trudeau, V. L. (2014). Current concepts in neuroendocrine disruption. *General and Comparative Endocrinology*, 203, 158–173. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2014.02.005>
- Li, P., & Li, Z. H. (2020). Environmental co-exposure to TBT and Cd caused neurotoxicity and thyroid endocrine disruption in zebrafish, a three-generation study in a simulated environment. *Environmental Pollution*, 259, 113868. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113868>
- Lu, C. C., Cagen, S. Z., Darmer, K. I., & Patterson, D. R. (1987). Testicular Effects Induced by Dermal or Inhalation Exposure to Para-tertiary Butyl Benzoic Acid (ptBBA) in Fischer 344 Rats. *International Journal of Toxicology*, 6(2), 233–243. <https://doi.org/10.3109/10915818709075138>
- Masuo, Y., & Ishido, M. (2011). Neurotoxicity of Endocrine Disruptors: Possible Involvement in Brain Development and Neurodegeneration. <https://doi.org/10.1080/10937404.2011.578557>, 14(5–7), 346–369. <https://doi.org/10.1080/10937404.2011.578557>
- McCune, S. A., Durant, P. J., Flanders, L. E., & Harris, R. A. (1982). Inhibition of hepatic gluconeogenesis and lipogenesis by benzoic acid, p-tert.-butylbenzoic acid, and a structurally related hypolipidemic agent SC-33459. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 214(1), 124–133. <https://doi.org/10.1016/0003->

- Mínguez-Alarcón, L., & Gaskins, A. J. (2017). Female exposure to endocrine disrupting chemicals and fecundity: a review. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 29(4), 202. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000373>
- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies*, 340(9–10), 403–405. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>
- Mueller, T., & Wullimann, M. F. (2009). An Evolutionary Interpretation of Teleostean Forebrain Anatomy. *Brain, Behavior and Evolution*, 74(1), 30–42. <https://doi.org/10.1159/000229011>
- Natsch, A., Nordone, A., Adamson, G. M., & Laue, H. (2021). A species specific metabolism leading to male rat reprotoxicity of Cyclamen aldehyde: in vivo and in vitro evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, 153(March), 112243. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112243>
- Nemoto, S., Fergusson, M. M., & Finkel, T. (2005). SIRT1 Functionally Interacts with the Metabolic Regulator and Transcriptional Coactivator PGC-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16456–16460. <https://doi.org/10.1074/JBC.M501485200>
- Odenthal, J., Rossnagel, K., Haffter, P., Kelsh, R. N., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Kane, D. A., Mullins, M. C., & Nüsslein-Volhard, C. (1996). Mutations affecting xanthophore pigmentation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development (Cambridge, England)*, 123, 391–398. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007257>
- Oka, T., Adati, N., Shinkai, T., Sakuma, K., Nishimura, T., & Kurose, K. (2003). Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4), 877–882. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2003.10.199>
- Powers, D. A. (1989). Fish as Model Systems. *Science*, 246(4928), 352–358. <https://doi.org/10.1126/science.2678474>
- Pubchem. (2022). <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/sid/0000098737>
- Raible, D. W., Wood, A., Hodsdon, W., Henion, P. D., Weston, J. A., & Eisen, J. S. (1992). Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish. *Developmental Dynamics*, 195(1), 29–42. <https://doi.org/10.1002/aja.1001950104>
- Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E., & Flaws, J. A. (2017). Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *Journal of Endocrinology*, 233(3), R109–R129. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0023>
- RIFM. (2010). *Table 1: Preliminary Findings for the 14-Day Reproductive Toxicity Studies*. [http://www.rifm.org/doc/Table1 Prelim Findings14-Day ReproTox Studies.pdf](http://www.rifm.org/doc/Table1_Prelim_Findings14-Day_ReproTox_Studies.pdf)
- Rink, E., & Wullimann, M. F. (2001). The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Research*, 889(1–2), 316–330. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03174-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03174-7)

- Rink, E., & Wullimann, M. F. (2004). Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Research*, 1011(2), 206–220. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.027>
- Roscher, N. M., Lindemann, M. K. O., Bin Kong, S., Cho, C. G., & Jiang, P. (1994). Photodecomposition of several compounds commonly used as sunscreen agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 80(1–3), 417–421. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(94\)01043-9](https://doi.org/10.1016/1010-6030(94)01043-9)
- Schantz, S. L., & Widholm, J. J. (2001). Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environmental Health Perspectives*, 109(12), 1197–1206. <https://doi.org/10.1289/EHP.011091197>
- Scherer, M., Koch, H. M., Schütze, A., Pluym, N., Krnac, D., Gilch, G., Leibold, E., & Scherer, G. (2017). Human metabolism and excretion kinetics of the fragrance lysmeral after a single oral dosage. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(2), 123–129. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2016.09.005>
- Scherer, M., Petreanu, W., Weber, T., Scherer, G., Pluym, N., & Kolossa-Gehring, M. (2021). Human biomonitoring in urine samples from the Environmental Specimen Bank reveals a decreasing trend over time in the exposure to the fragrance chemical lysmeral from 2000 to 2018. *Chemosphere*, 265. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.128955>
- Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., & Heindel, J. J. (2011). Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(3–5), 204. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2011.08.007>
- Scott, G. R., & Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68(4), 369–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>
- Seralini, G. E., & Jungers, G. (2021). Endocrine disruptors also function as nervous disruptors and can be renamed endocrine and nervous disruptors (ENDs). *Toxicology Reports*, 8, 1538–1557. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2021.07.014>
- Stewart, M. K., Hoehne, L., Dudczig, S., Mattiske, D. M., Pask, A. J., & Jusuf, P. R. (2023). Ecotoxicology and Environmental Safety Exposure to an environmentally relevant concentration of 17 α -ethinylestradiol disrupts craniofacial development of juvenile zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 251(October 2022), 114541. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114541>
- Thomas Zoeller, R., Brown, T. R., Doan, L. L., Gore, A. C., Skakkebaek, N. E., Soto, A. M., Woodruff, T. J., & Vom Saal, F. S. (2012). Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153(9), 4097. <https://doi.org/10.1210/EN.2012-1422>
- Tollefsen, K. E. (2007). Binding of alkylphenols and alkylated non-phenolics to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma sex steroid-binding protein. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.07.002>

- Tollefsen, K. E., Eikvar, S., Finne, E. F., Fogelberg, O., & Gregersen, I. K. (2008). Estrogenicity of alkylphenols and alkylated non-phenolics in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 370–383. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.006>
- Tollefsen, K. E., & Julie Nilsen, A. (2008). Binding of alkylphenols and alkylated non-phenolics to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic estrogen receptors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(2), 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.04.010>
- Ton, C., Lin, Y., & Willett, C. (2006). Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 76(7), 553–567. <https://doi.org/10.1002/bdra.20281>
- Tsang, M. (2010). Zebrafish: A tool for chemical screens. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 90(3), 185–192. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20183>
- USEPA. (1998). *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report* | US EPA. <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-and-testing-advisory-committee-edstac-final>
- Virtanen, H., Rajpertdemeyts, E., Main, K., Skakkebaek, N., & Toppari, J. (2005). Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 501–505. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.058>
- Vogelgesang, J. (2002). The EC White Paper on a Strategy for a Future Chemicals Policy. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 30(SUPPL. 2), 211–212. <https://doi.org/10.1177/026119290203002s34>
- Walde, A., & Scheline, R. R. (1983). Metabolism of p-tert.-Butyltoluene in the Rat and Guinea Pig. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 53(1), 57–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1983.tb01868.x>
- Weiss, B. (2012). The intersection of neurotoxicology and endocrine disruption. *NeuroToxicology*, 33(6), 1410–1419. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2012.05.014>
- Welander, U. (1997). Identification by gas chromatography of organic constituents in leachates from sanitary landfills. *Resource and environmental biotechnology*, 1(4), 283–296. https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/791104
- Wilson, B. J., Tremblay, A. M., Deblois, G., Sylvain-Drolet, G., & Giguère, V. (2010). An Acetylation Switch Modulates the Transcriptional Activity of Estrogen-Related Receptor α . *Molecular Endocrinology*, 24(7), 1349. <https://doi.org/10.1210/ME.2009-0441>
- Wilson, S. W., Ross, L. S., Parrett, T., & Easter, S. S. (1990). The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Development (Cambridge, England)*, 108(1), 121–145. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2351059>
- Wu, H., Bertrand, K. A., Choi, A. L., Hu, F. B., Laden, F., Grandjean, P., & Sun, Q. (2013). Persistent organic pollutants and type 2 diabetes: A prospective analysis

- in the nurses' health study and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 121(2), 153–161. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205248>
- Wullimann, M. F., & Mueller, T. (2004). Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. *The Journal of Comparative Neurology*, 478(4), 427–428. <https://doi.org/10.1002/cne.20291>
- Wullimann, M. F., & Rink, E. (2002). The teleostean forebrain: A comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Research Bulletin*, 57(3–4), 363–370. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00666-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00666-9)
- Yoshioka, Y., & Ose, Y. (1993). A quantitative structure—activity relationship study and ecotoxicological risk quotient for the protection from chemical pollution. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8(1), 87–101. <https://doi.org/10.1002/tox.2530080109>
- Zama, A. M., & Uzumcu, M. (2010). Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: An ovarian perspective. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(4), 420. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2010.06.003>
- Zsarnovszky, A., Le, H. H., Wang, H. S., & Belcher, S. M. (2005). Ontogeny of Rapid Estrogen-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in the Rat Cerebellar Cortex: Potent Nongenomic Agonist and Endocrine Disrupting Activity of the Xenoestrogen Bisphenol A. *Endocrinology*, 146(12), 5388–5396. <https://doi.org/10.1210/EN.2005-0565>

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Tarık Dinç

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2004, Fatih Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2014, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2005-2008 yılları arasında özel dershanede öğretmen olarak çalıştı.
- 2009-2010 yılları arasında Kocaeli Büyükşehir Belediyesi'nde eğitim danışmanı olarak çalıştı.
- 2011 yılından beri Sakarya Üniversitesi'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

DİĞER ESERLER:

- Dinç T., Yön N. D., Akbulut C. (2021). Effects Of Ethylene-Bis-Dithiocarbamate (Mancozeb) on Zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. Annales de Limnologie - International Journal of Limnology, 57(22), Doi: 10.1051/limn/2021017
- Arman, S., Akbulut C., Dinc T., Fidan B., Isel Z., Yön, N. D. (2020). Acute Effects of Endothall on Gill, Intestine and Liver Tissues of Zebrafish (*Danio rerio*). Biology and Environment-Proceedings of the Royal Irish Academy, 120(3), 209-218., Doi: 10.3318/bioe.2020.18
- Akbulut C., Dinç T., Genç H., Zengin M., Yön N. D. (2018). Effects of Thiourea Dioxide on Follicle Development of Zebrafish (*Danio rerio*). Biology and Environment-Proceedings of the Royal Irish Academy, 118(3), 121-128., Doi: 10.3318/bioe.2018.13