

Japon Balığı (*Carassius auratus*) Gonad ve Viseral Organları Üzerine Bisfenol S'nin Toksik Etkileri

İkbal Demet NANE^{1*}, Öznur ÖZİL¹, Mert MİNAZ¹³, Mevlüt NAZIROĞLU¹,
Öznur DİLER¹, Özlem ÖZMEN²

¹Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta

²Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Burdur

³Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Rize

*Sorumlu Yazar: ikbaldemetnane@gmail.com

Araştırma Makalesi

Geliş 09 Temmuz 2020; Kabul 22 Ekim 2020; Basım 01 Mart 2021.

Alıntılama: Nane, İ. D., Özil, Ö., Minaz, M., Nazıroğlu, M., Diler, Ö., & Özmen, Ö. (2021). Japon Balığı (*Carassius auratus*) gonad ve viseral organları üzerine Bisfenol S'nin toksik etkileri. *Acta Aquatica Turcica*, 17(1), 129-135. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.767061>

Özet

Bisfenol A (BPA), polikarbonat plastiklerin ve epoksi reçinelerinin üretiminde kullanılan çevresel bir kirlenici. Bununla birlikte bisfenol S (BPS), son zamanlarda BPA ürünlerine alternatif olarak kullanılmaya başlanan bir bisfenol analogudur. Bu çalışmada farklı BPS konsantrasyonlarına (0, 100 ve 500 µg/L) 21 gün maruz bırakılan japon balıklarının (*Carassius auratus*) karaciğer, böbrek, gonad ve solungaç dokularındaki bir dizi etki histopatolojik olarak belirlenmiştir. Solungaçlarda BPS'nin hiperemi, ödem, epitel hücrelerinde deskuamasyon ve nekroza neden olduğu dikkat çekmiştir. Böbreklerde nekroz ve melanomakrofaj infiltrasyonları sıklıkla gözlenmiştir. Karaciğerde BPS'nin hiperemi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonlarına neden olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, BPS'nin *Carassius auratus*'un çeşitli viseral organlarında dejeneratif değişikliklere neden olduğu ve histopatolojik değişikliklerin şiddetinin doza bağlı olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Endokrin bozucu, mikroplastik, histopatoloji, ksenoöstrojen

Toxic Effects of Bisphenol S on the Gonad and Visceral Organs of Goldfish (*Carassius auratus*)

Abstract

Bisphenol-A (BPA) is an environmental contaminant used in the manufacturing of polycarbonate plastics and epoxy resins. Whereas bisphenol S (BPS) is a bisphenol analogue which is recently used to replace BPA products. We demonstrated the effects of BPS on liver, kidney, gonad, and gills in goldfish (*Carassius auratus*) by a histopathological examination. Fishes treated with different concentrations (0, 100 and 500 µg/L) of BPS were tested for a duration of 21-days. In gills, BPS caused hyperemia, edema, epithelial desquamation and necrosis. Kidney lesions included necrosis and melanomacrophage infiltrations. BPS stress caused hyperemia and inflammatory cell infiltrations in livers. The present study revealed that BPS causes degenerative changes in various visceral organs of *Carassius auratus* and severity of histopathological changes were dose related.

Keywords: Endocrine disruptor, microplastic, histopathology, xenoestrogen

GİRİŞ

Dünya, kısıtlı su kaynaklarına ilaveten çevresel kirliliğin orantısız etkileriyle mücadele etmektedir. Endüstrileşmenin artmasıyla göl ve nehir gibi sucul ekosistemlere deşarj edilen çevresel kirleniciler, canlılar için önemli sağlık problemlerine neden olmaktadır. Çevresel kirlenicilerin, ökaryotik organizmalarda endokrin fonksiyonların bozulmasına neden olduğu bilinmektedir. Endokrin bozucular; endojen hormonlarını taklit edip hormon sentezini ve hormonal fonksiyonları engelleme, depolanan hormonları serbest bırakma, salgı ve taşınım mekanizmalarını durdurma, doğal hormonları devre dışı bırakma, hormon reseptörlerini antagonize ya da agonize etme gibi etkiler ile vücudun hormonal sistemine etki etmektedir (Cek ve Sarıhan, 2010; Schönfelder vd., 2002). Endokrin bozucular olarak tanımlanan molekül grubu; bisfenol A (BPA), bisfenol S (BPS), 4-nonilfenol (NF), oktilfenol, vinklozolin ve dietilstilbestrol (DES) olarak kullanılan sentetik kimyasalları içermektedir (Molina vd., 2018). BPA; gıda ve içecek ambalajları, yapıştırıcılar, elektronik parçalar gibi endüstriyel

ürünlerin üretiminde kullanılmakta ve toplam üretim kapasitesiyle dünyanın en çok üretim hacmine sahip olan kimyasallardan biri haline gelmiştir (Wright-Walters, 2011; Liao vd., 2012a; Li vd., 2010; Flint vd., 2012).

Dünyada BPA ile ilgili kaygıların artması ve bazı ülkelerde yasaklanması endüstriyel olarak üretilen ürünlerde BPA'nın yapısal bir analogu olan BPS'nin kullanımını arttırmaya başlamıştır. Bununla birlikte, yapılan çalışmalar BPS'nin BPA ile benzer endokrin bozucu etkilere sahip olduğunu ve ortamdaki varlığının benzer şekilde ekosistemler ve insan sağlığı üzerine önemli riskler oluşturabileceğini göstermektedir (Qiu vd., 2018). Düşük doz BPS maruziyetinin zebra balığının embriyonik evresinde beyin gelişimine etki ettiği, balık larvalarında erken hipotalamik nörojenez ve eşlik eden hiperaktif davranışı arttırdığını bildirmişlerdir (Grignard vd., 2012; Qui vd., 2016).

Bisfenol grubu bileşiklerin farklı canlı türleri için dokular üzerindeki histopatolojik etkileri ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada sığanlara içme suyu ile verilen BPA'nın üreme, testis patolojisi ve spermatogenezis üzerinde olumsuzluklar meydana getirdiği belirlenmiştir (Buckiova vd., 2001). Bir başka çalışmada, 1 mg/L BPA'ya maruz bırakılmış tilapia (*Oreochromis mossambicus*) balıklarının karaciğerlerindeki parankimatöz dokuda lezyon, ödem bulgular, vakuolizasyon, belirgin dejenerasyon ve sinüzoidlerin daralması gibi dejenerasyonlar görülmüştür. Ayrıca hepatositlerde şişme ve nekrozun şekillendiği bildirilmiştir (Vasu vd., 2019). Yapılan bir diğer araştırmada, 2 farklı konsantrasyonda (1 ve 50 µg/kg vücut ağırlığı/gün) BPS'ye maruz bırakılan sığanların spermatogenezisi üzerinde kısıtlayıcı bir etkiye sebep olduğu belirlenmiştir (Ullah vd., 2016).

Bisfenol bileşiklerinin çevrede ve iç sularda bulunduğu ve besin zinciri içinde insanlara ulaşmasının olağan olduğu bilinmektedir. Japonya'da yapılan araştırmalarda BPS'nin; sedimentte bisfenol grubu bileşiklerden en fazla bulunan kimyasal olduğu bildirilmiştir (Liao vd., 2012b). Yüzeysel ve atık sularda en yüksek BPS konsantrasyonu 3 µg/L olarak rapor edilmiştir (Kienhuis ve Geerdink, 2000). BPS, ileride yaratabileceği problemler sebebiyle incelenmesi yararlı olacak maddeler listesine alınmıştır (OEHHA 2012). Bu nedenle de bu maddelerin canlılarda birikiminin değerlendirilmesi ve deney hayvanlarında çeşitli dozlarda deneysel çalışmalar yapılarak etkilerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Balık dokularının histopatolojisi, çevresel stres etkilerinin değerlendirilmesini sağlayan güvenilir bir izleme aracı olup suda yaşayan organizmadaki insan kaynaklı stresörlerin neden olduğu sağlık bozukluğunun da en güvenilir göstergelerinden biridir.

BPS'nin sucul ortamdaki canlılar üzerinde olumsuz etkisine dair bilgi eksikliği dikkate alınarak, bu çalışmada söz konusu kimyasalın kademeli konsantrasyonlarına (100 ve 500 µg/L) maruz bırakılan japon balıklarındaki (*Carassius auratus*) karaciğer, böbrek, solungaç ve gonad dokularının histopatolojik bulguları incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Etken Maddenin Hazırlanması

Çalışmada seçilen tüm kimyasallar (saflık \geq %99) Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)'dan temin edilmiştir. BPS, hassas terazi ile tartılmış ve metanol:su (%10 (h/h)) ikili karışımlarında stok çözelti hazırlanmış, 4 °C'de cam şişede muhafaza edilmiştir. Stok solüsyonları akvaryum suyu ile seyreltilerek istenilen konsantrasyonlar elde edilmiştir (Chen vd., 2017).

Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar

Bu çalışmada akvaryum balıkları satış ofisinden 180 adet japon balığı (*Carassius auratus*) (ortalama 3 aylık, 5-10 g ağırlığında, 5,5-7 cm uzunluğunda) temin edilmiştir. Araştırmada balıklar içerisinde 100 L su bulunan cam akvaryumlara her bir gruptan 3 paralel ve her paralelde 20 balık olacak şekilde dağıtılmış ve 2 hafta süreyle adaptasyona tabi tutulmuştur. Adaptasyon sonrasında balıklar 100 ve 500 µg/L olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda BPS'ye 21 gün boyunca maruz bırakılarak 12 saat aydınlık:12 saat karanlık fotoperiyot uygulaması yapılmıştır (Lindholst vd., 2001). Maruziyet için hazırlanan çözeltiler daha önceki bir çalışmadan uyarlanmıştır (Wang vd., 2019). Deneme süresince su sıcaklığı 24±2 °C olarak ayarlanmış ve japon balıkları için kullanılan pelet yemle günde iki kez doyuncaya kadar beslenmiştir. Tanklardaki yem artıkları su kalitesinin bozulmaması için sifon yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

Histopatolojik İncelemeler

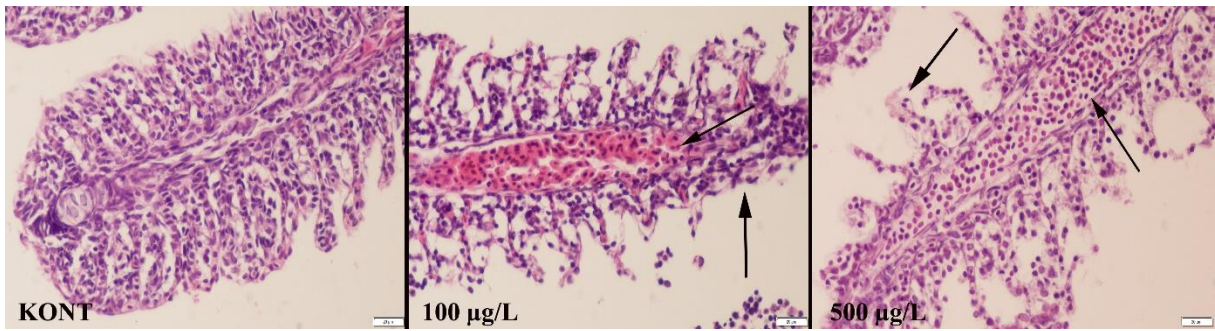
Araştırma süresi sonunda her gruptan 9 adet balık fenoksietanol (0,1-0,5 ml/L) ile anestezi edildikten sonra disekte edilmiş ve karaciğer, böbrek, solungaç ve gonad dokuları alınarak %10'luk

formaldehit solüsyonu içerisinde tespit edilmiştir. Ardından doku örnekleri Leica ASP300S otomatik doku takip cihazı (Leica Mikrosistem, Nussloch, Almanya) tarafından rutin doku takip işleminden geçirilerek parafine gömülmüştür. Tam otomatik mikrotom ile 5 µm'lik kesitler alınmıştır (Leica RM 2155, Leica Mikrosistem, Nussloch, Almanya). Daha sonra alınan kesitler hematoksilin ve eozin (HE) ile boyanmış ve ışık mikroskobu (Olympus CX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) altında incelenmiştir. Morfometrik değerlendirme ve mikrofotografi işlemleri; Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanılarak yapılmıştır (Bancroft ve Stevens, 1977).

BULGULAR

Solungaçlar

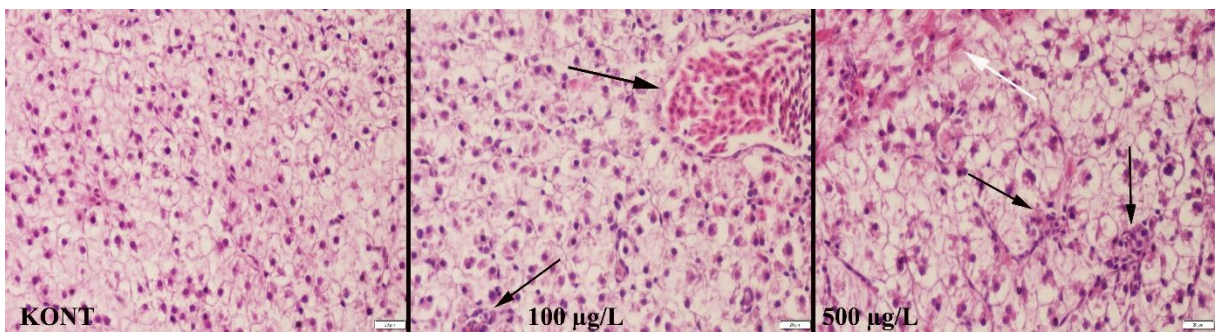
Solungaçların histopatolojik değerlendirilmesi sonucunda kontrol grubunda normal doku yapısı gözlenmiştir. Bununla birlikte, BPS uygulaması şiddetli hiperemi, ödem ve epitel hücrelerinde deskuamasyon ve nekroza neden olmuştur. Söz konusu bulgular 500 µg/L uygulanan grupta 100 µg/L'ye maruz kalan gruptan daha fazla gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrol, 100 µg/L ve 500 µg/L BPS konsantrasyonlarının solungaç dokularındaki histopatolojik bulgular: Kontrol grubunda normal doku histolojisi, BPS'ye maruz bırakılan balıkların solungaçlarında belirgin hiperemi (ince oklar) ve solungaç lamellerinde deskuamasyon ve nekrozlar (kalın oklar), HE, Barlar = 20 µm.

Karaciğer

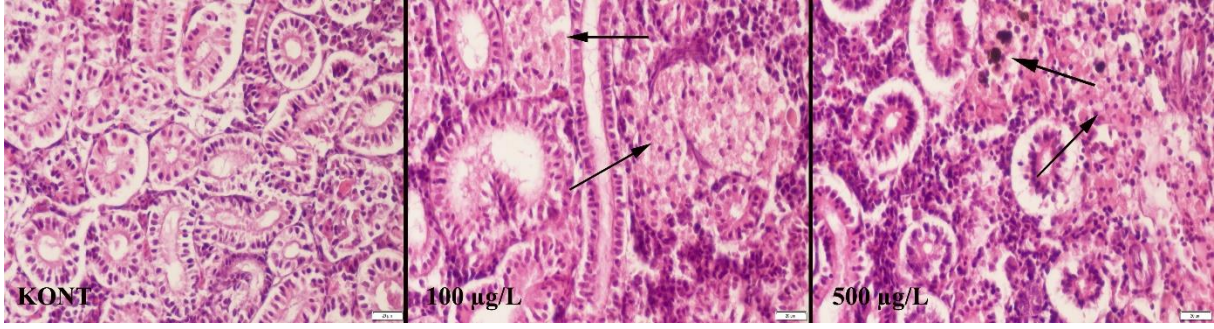
Karaciğerin mikroskopik incelenmesi sonucunda kontrol grubunda normal doku histolojisi görülürken BPS uygulanan her iki grupta da hiperemi, küçük kanamalar, hepatositlerde dejenerasyonlar ve inflamatuvar hücre infiltrasyonları görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Kontrol, 100 µg/L ve 500 µg/L BPS konsantrasyonlarının karaciğer dokularındaki histopatolojik bulgular: Kontrol grubunda normal doku histolojisi, BPS uygulanan gruplarda belirgin hiperemi (kalın ok), inflamatuvar hücre infiltrasyonları (ince oklar) ve küçük kanama alanları (beyaz ok), HE, Barlar = 20 µm.

Böbrek

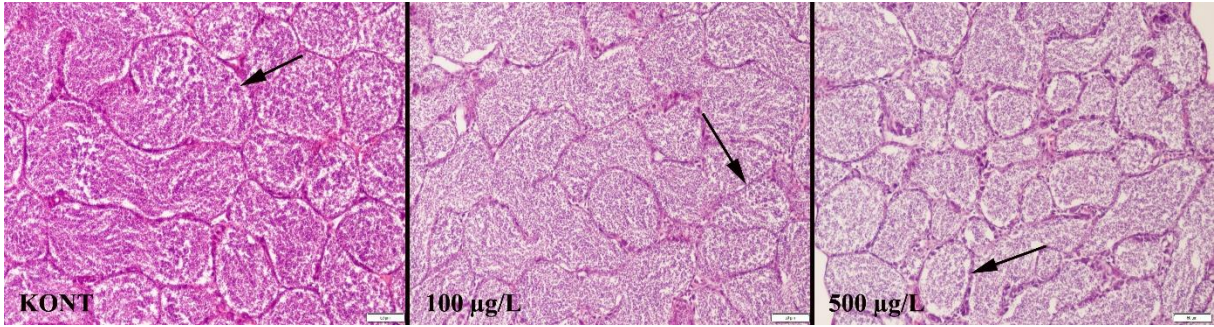
Böbrek dokusu için yapılan incelemelerde kontrol grubunda, normal böbrek histolojisi gözlenirken, BPS'ye maruz bırakılan düşük konsantrasyon grubunda nekroz, yüksek konsantrasyonda ise nekroz ve melanomakrofaj infiltrasyonu dikkati çekmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Kontrol, 100 µg/L ve 500 µg/L BPS konsantrasyonlarının böbrek dokularındaki histopatolojik bulgular: kontrol grubunda normal böbrek histolojisi, BPS'ye maruz kalan gruplarda nekroz (ince oklar), melanomakrofaj infiltrasyonları (kalın oklar), HE, Barlar = 20µm.

Testisler

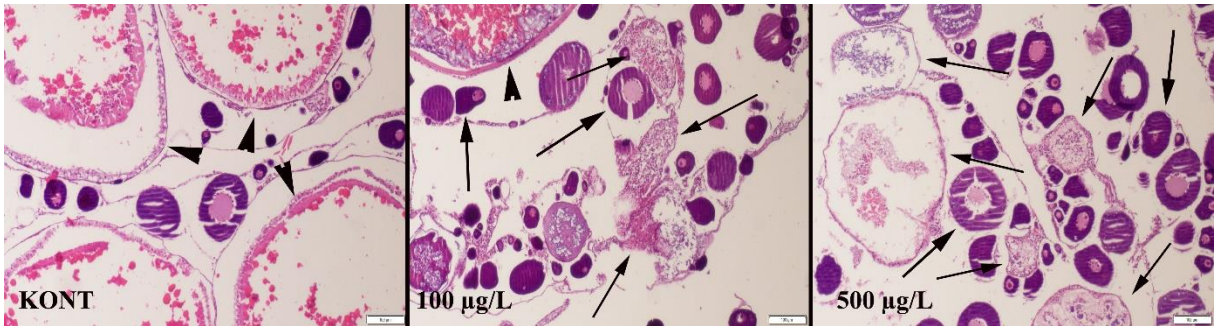
Testislerin histopatolojik incelemesi sonucunda, BPS maruziyeti olan gruplardaki spermatidlerde kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalma şekillendiği ve testis fonksiyonunun bozulduğu saptanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. Kontrol grubunda normal testiküler histoloji, BPS maruziyetli gruplarda seminifer tubuller içerisindeki spermatidlerde belirgin azalma (oklar), HE, Barlar=50µm.

Ovaryumlar

Ovaryumların histopatolojik incelemesi sonucunda, kontrol grubunda mikroskopik olarak normal histoloji gözlenmiştir. BPS uygulaması, olgun oosit sayısında belirgin azalmaya ve dejeneratif veya akretik oosit sayısında belirgin artışa neden olduğu ve ovaryum fonksiyonlarında bozulmaya sebep olduğu saptanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Kontrol grubunda çok sayıda olgun oositler (ok başları), BPS uygulanan grupta olgunlaşmış oositslerde belirgin azalma (ok başı) ile olgunlaşmamış oositlerde (kalın oklar) ve dejeneratif veya atretik oositlerde (ince oklar) belirgin artış, HE, Barlar = 100µm.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yirminci yüzyıl başlarında cam ve çeliğin yerine geçebilecek bir malzeme olarak üretilen BPA, yapılan çalışmalarda etki mekanizmasından, östrojenik hasara; immunotoksik etkilerden, doku hasarına kadar pek çok alanda üzerinde çalışılmış bir kimyasal maddedir (Qiu vd., 2016; Lindholst vd., 2001; Vasu vd., 2019). Faheem vd., (2016) tarafından yapılan bir çalışmada *Catla catla* balıkları 15 gün boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (1, 2, 3 ve 4 mg/L) BPA'ya maruz bırakılmıştır. Solungaç dokularındaki inceleme sonucunda, mukoza hücrelerinde hiperplazi, sekonder lamellalarda dejenerasyon ve nekroz gözlemlendiği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada *Oreochromis mossambicus* balıkları 1 mg/L konsantrasyonunda BPA'ya farklı temas süreleriyle (10 ve 20 gün) maruz bırakılmıştır (Chitra ve Sajitha, 2014). Balıkların solungaç dokularındaki lamellalarda birleşme ve hipertrofi gözlemlenmiştir. Elshaer vd. (2013)'ne göre *Gambusia affinis* ve *Poecilia reticulata* balıkları 15 ve 30 gün süreyle 50 mg/L konsantrasyonunda BPA'ya maruz bırakılmış ve solungaç dokularının histopatolojik değişimleri incelenmiştir. Sekonder lamellaların epitelyumunda dejenerasyon ya da deskuamasyon ve nekrozis, lamellalarda birleşme, ödem ve kopma, epitel hücrelerde ise hiperplazi görülmüştür. Mevcut çalışmada, farklı konsantrasyonlarda BPS'ye maruz bırakılan japon balıklarının solungaçları incelenmiş, BPS'nin solungaçlarda dejeneratif değişikliklere neden olduğu gözlemlenmiştir. BPS'ye maruz kalan balıkların solungaç anomalileri hiperemi, ödem, deskuamasyon ve nekroz içermektedir. Ayrıca çalışmada 100 ve 500 µg/L BPS konsantrasyonları karşılaştırıldığında artan konsantrasyon miktarı ile histopatolojik değişimlerin arttığı belirlenmiştir.

Balıklarda karaciğer, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu için temel organdır. Karaciğer histolojisinin incelenmesi herhangi bir kirleticinin balıklar üzerindeki etkisini değerlendirmek için etkili bir yöntemdir. Ksenoöstrojenler üzerine yapılan bir çalışmada tilapia (*Oreochromis mossambicus*) balıkları 28 gün boyunca BPA'ya maruz bırakılmış ve 7, 14, 21 ve 28. günlerde kas, karaciğer, beyin ve böbrek dokuları incelenmiştir. BPA'ya maruz kalan balıkların karaciğerlerinde parankimatöz dokuda lezyonlar, ödem, vakuolizasyon, belirgin dejenerasyon ve sinüzoidlerde daralma gibi lezyonlar bildirilmiştir (Vasu vd., 2019). Başka bir çalışmada ise *Catla catla* balıklarında BPA maruziyetinin karaciğerde, vena sentraliste tromboz, iltihaplanma, ödem, dejenerasyon ve hepatositlerin nekrozuna neden olduğu bildirilmiştir (Faheem vd., 2016). Bu çalışmada, farklı BPS konsantrasyonlarına maruz kalan japon balıklarının karaciğeri incelenmiş, hiperemi, dejenerasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonları gözlemlenmiştir.

Böbrekler balıklarda hematopoezis ve osmoregülasyondan sorumlu organlardır. Solunum ile kullanılan kanın büyük bir kısmı böbreklere gittiği için çevresel kirliliğin böbrek dokusu üzerindeki etkisi balık sağlığı ve refahı için önem teşkil etmektedir. Faheem vd., (2016)'ya göre subletal konsantrasyonda (1-4 mg/L) 15 gün boyunca BPA'ya maruz kalan *Catla catla* balıklarının böbrek dokusundaki histolojik değişikliklerin nekroz, glomerulusta hipertrofi, böbrek tübüllerinde dejenerasyon ve glomerulus atrofisi olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde böbrek dokuları etkilenmiş ve farklı BPS konsantrasyonlarına maruz kalan japon balıklarının böbrek dokularında belirgin nekroz ve melanomakrofaj infiltrasyonu gözlemlenmiştir.

Balıkların üreme sağlığı ve gelişim aşamalarında gonad histolojisi önemli bir parametredir. Bu çalışmada gonad dokusu; testisler ve ovaryumlar olarak ayrı ayrı incelenmiştir. Testislerdeki spermatidlerde belirgin azalma; ovaryumlarda ise olgun oositlerde azalma ve dejeneratif veya atretik oosit sayısında artma BPS konsantrasyonlarının kademeli artışı ile daha da belirginleşmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada sazan (*Cyprinus carpio*) balıkları 14 gün boyunca farklı BPA (1, 10, 100 ve 1000 µg/L) konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve gonadların histolojik değişimleri incelenmiştir. Erkek sazanlarda BPA, 1 µg/L'den başlayarak testis yapısında ciddi değişikliklere neden olmuştur. Ayrıca, bazı örneklerde tipik lobüler yapı kaybolmuş ve sıklıkla lümen içinde dejener serbest spermatozoa ile birbirine karışan spermatojenik kistlerle karşılaşmıştır. Dişi sazanlarda; oosit atrezisi, 1 µg/L BPA konsantrasyonunda gözlenmeye başlanmıştır ve en yüksek konsantrasyon olan 1000 µg/L'de dişilerin yaklaşık %57,1'inde gözlenmiştir (Mandich vd., 2007). Bir başka çalışmada BPS'nin üreme potansiyeli ve endokrin sistem üzerindeki etkileri zebra balığında (*Danio rerio*) incelenmiştir. Çalışmada olgun erkek ve dişi zebra balıkları iki hafta boyunca temiz suda beslenmiş, fertilizasyonlarının ardından oluşan embriyolar iki hafta sonra alınmış, 75 gün boyunca kademeli olarak (0; 0,1; 1; 10 ve 100 µg/L) BPS'ye maruz bırakılmışlardır. Maruziyet süresinin sonunda dişi ve erkek balıklar ayrı ayrı on dört gün boyunca temiz suya bırakılmıştır. Çalışma sonunda, düşük BPS konsantrasyonlarına maruz bırakılan zebra balığının gonad büyümesinde, yumurta üretimi ve sperm

sayılarındaki azalmalar endokrin sistemin farklı bölümleri üzerinde olumsuz etkileri olduğu belirlenmiştir (Naderi vd., 2014).

Endokrin bozucu kimyasallar günlük yaşantımızda neredeyse her alanda, fark ettiğimiz veya etmediğimiz birçok şekilde bize ulaşıp etki gösterebilen, dünya genelinde büyük ölçüde üretilen ve üretilmesine de devam edileceği düşünülen kimyasallardır. Kimyasallara maruziyet böylece kaçınılmaz iken; maruziyetin sonucundaki etkilerinin incelenmesi de bir o kadar önemli ve gerekli hale gelmiştir. BPS ve metabolitlerinin; BPA'ya alternatif olarak kullanıldığı malzemelere uygulanmasına artan ilgi dikkate alındığında; akut toksisite, genotoksisite ve östrojenik aktivite açısından daha fazla çalışma yapılması ve yapısal olarak aydınlatılması gerekmektedir.

BPS'nin balık dokuları üzerindeki histopatolojik etkileri hakkında literatürde bir bilgi eksikliği mevcuttur. Bu nedenle, bu çalışmada elde edilen sonuçlar, endokrin bozucu kimyasal olan BPS'nin japon balıkları üzerindeki ilk bulguları olup ileride yapılacak çalışmalar için BPS'nin ayrıntılı etkilerinin açıklanmasında faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Bancroft J.D., Stevens A. (1977). *Theory and practice of histological techniques*. Longman Inc., 240p. New York.
- Buckiova, D., Kyselova, V., Pknicová, J., & Boubelik, M. (2001). Low doses of bisphenol A (BPA) affect fertility in CD mice. *Reproductive Toxicology*, 15, 459.
- Cek, S., & Sarihan, F. (2010). Endokrin sistemi bozan kimyasallardan cinsiyet steroidlerinin balıklardaki etkileri. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 27(1), 41-46.
- Chitra, K.C., & Sajitha, R. (2014). Effect of bisphenol-A on the antioxidant defense system and its impact on the activity of succinate dehydrogenase in the gill of freshwater fish., *Journal of Cell and Tissue Research*, 14(2), 4219.
- Elshaer, F., Abu-Shaer, W., & Bakry, S. (2013). Histopathological changes in the Kidney of mosquito fish, and guppy fish, exposed to Bisphenol A. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 17(4), 83-93.
- Faheem, M., Jahan, N., & Lone, K. P. (2016). Histopathological effects of bisphenol-A on liver, kidneys and gills of Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton, 1822). *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 26(2), 514-522.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., & Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *Journal of environmental management*, 104, 1-34.
- Grignard, E., Lapenna, S., & Bremer, S. (2012). Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicology in vitro*, 26(5), 727-731.
- Ji, K., Hong, S., Kho, Y., & Choi, K. (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental Science and Technology*, 47(15), 8793-8800.
- Kienhuis, P. G., & Geerdink, R. B. (2000). Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis of surface and waste water with atmospheric pressure chemical ionisation: II. Applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(7), 460-474.
- Li, D., Zhou, Z., Qing, D., He, Y., Wu, T., Miao, M., Wang, J., Weng, X., Ferber, J.R., Herrinton, L.J., Zhu, Q., Gao, E., Checkoway, E., & Yuan, W., (2010). Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Human reproduction*, 25(2), 519-527.
- Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V. D., Mohd, M. A., Moon, H. B., Nakata, H., & Kannan, K. (2012a). Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environmental science and technology*, 46(12), 6860-6866.
- Liao, C., Liu, F., & Kannan, K. (2012b). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental science and technology*, 46(12), 6515-6522.
- Lindholst, C., Pedersen, S. N., & Bjerregaard, P. (2001). Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 55(1-2), 75-84.
- Liu, Y., Zhang, S., Song, N., Guo, R., Chen, M., Mai, D., Yan, Z., Han, Z., & Chen, J. (2017). Occurrence, distribution and sources of bisphenol analogues in a shallow Chinese freshwater lake (Taihu Lake): Implications for ecological and human health risk. *Science of the Total Environment*, 599, 1090-1098.
- Mandich, A., Bottero, S., Benfenati, E., Cevasco, A., Erratico, C., Maggioni, S., Massari, A., Pedemonte, F., & Vigano, L. (2007). In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. *General and comparative endocrinology*, 153(1-3), 15-24.
- Molina, A. M., Abril, N., Morales-Prieto, N., Monterde, J. G., Lora, A. J., Ayala, N., & Moyano, R. (2018). Evaluation of toxicological endpoints in female zebrafish after bisphenol A exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 19-25.

- Naderi, M., Wong, M. Y., & Gholami, F. (2014). Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic toxicology*, 148, 195-203.
- Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). 2012. Preliminary Screen for Possible Future Consideration as Potential Designated Chemicals for Biomonitoring California 1 Some Bisphenol A Substitutes and Structurally Related Compounds. Qiu, W., Yang, M., Liu, S., Lei, P., Hu, L., Chen, B., Wu, M., & Wang, K. J. (2018). Toxic effects of bisphenol S showing immunomodulation in fish macrophages. *Environmental science and technology*, 52(2), 831-838.
- Qiu, W., Zhao, Y., Yang, M., Farajzadeh, M., Pan, C., & Wayne, N. L. (2016). Actions of bisphenol A and bisphenol S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish. *Endocrinology*, 157(2), 636-647.
- Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., & Talsness, C. E., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental health perspectives*, 110(11), A703-A707.
- Ullah, H., Jahan, S., Ain, Q. U., Shaheen, G., & Ahsan, N. (2016). Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study. *Chemosphere*, 152, 383-391.
- Vasu, G., Sujatha, L. B., & Manju Bashini, J., (2019). Histological Changes in Tilapia Exposed to Bisphenol A (BPA) Compound. *International Journal of Advanced Scientific Research and Management*, 4(4): 267-282.
- Wright-Walters, M., Volz, C., Talbott, E., & Davis, D. (2011). An updated weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of bisphenol A and the derivation a new predicted no effect concentration (Pnec) using a non-parametric methodology. *Science of the Total Environment*, 409(4), 676-685.