



**GLİFOSATIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
EMBRİYONİK GELİŞİMİNDE ANTİOKSİDAN
SİSTEMLERİ ETKİLERİ**

Ayşegül YILMAZ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı
Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN**

2016

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLİFOSATIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYONİK
GELİŞİMİNDE ANTİOKSİDAN SİSTEMLERE ETKİLERİ

Ayşegül YILMAZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**GLİFOSATIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYONİK GELİŞİMİNDE
ANTİOKSİDAN SİSTEMLERE ETKİLERİ**

Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN danışmanlığında, Ayşegül YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 28/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Elanur AYDIN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 21/07/2016 tarih ve 29/... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GLİFOSATIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYONİK GELİŞİMİNDE ANTIOKSİDAN SİSTEMLERE ETKİLERİ

Ayşegül YILMAZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimler Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

Bu çalışmada, özellikle tarımsal alanlarda bulunan istenmeyen yabancı bitkilerin öldürülmesinde kullanılan glifosatın zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoların antioksidan sistemleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaç için 20 balık embriyosu 96 saat boyunca 1, 5, 10 ve 100 mg/L glifosata maruz bırakılmıştır. Deney aşaması tam şansa bağlı basit deneme planına göre, dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bir kontrol ve dört muamele grubu olarak toplamda beş grup ile çalışma yürütülmüştür. Çalışma sonucunda glifosatın uygulama gruplarındaki SOD ve GSH-Px'e ait mRNA ekspresyonlarını istatistiki olarak önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir.

2016, 50 sayfa

Anahtar Kelimeler: Zebra balığı (*danio rerio*), antioksidan sistem, glifosat

ABSTRACT

MS Thesis

EFFECTS OF GLYPHOSATE ON ZEBRA FISH (*Danio rerio*) EMBRYONIC DEVELOPMENT IN ANTIOXIDANT SYSTEM

Ayşegül YILMAZ

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

In this study, we investigated the effects of glyphosate which is frequently used for killing of undesired wild plant in agricultural areas on antioxidant system of *Danio rerio*'s embryonic stage. For this purpose, 20 fish embryo were exposed to 1, 5, 10 and 100 mg/L of glyphosate for 96 hours. The experiment was designed according to simple experimental design as four replicates. The experiment was completed in totally five groups which are one control and four experiment groups. The results of this study showed that SOD and GSH-Px mRNA expression was significantly decreased in glyphosate treatment group samples compared with control groups.

2016, 50 pages

Keywords: Zebra fish (*Danio rerio*), antioxidant system, glyphosate

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren Sayın danışman hocam Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a, sağladıkları imkânlardan dolayı Sayın Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a değerli zamanlarını ayırarak tezi inceleyen jürideki Sayın hocalarıma ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Ayşegül YILMAZ

Temmuz, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Pestisitler ve sınıflandırılmaları.....	3
1.1.2. Glifosat (N-fosfonometilglisin).....	7
1.1.3. Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>).....	10
1.1.4. Antioksidan sistemler	12
1.1.4.a. Enzimatik antioksidanlar	15
1.1.5. Gen ekspresyonu	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Araştırma yeri.....	24
3.1.2. Deneme ortamı ve kullanılan malzemeler.....	24
3.1.3. Balık materyali	25
3.1.4. Uygulanan kimyasal	26
3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler	27
3.1.5.a. RNA izolasyonu için kullanılan kimyasallar	27
3.1.5.b. Super script TM III reverse transcriptase ile cDNA oluşturulması için gerekli kimyasallar	28
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Deneme planı ve kimyasalın uygulanması	29
3.2.2. Balıklardan doku örneklerinin alınması ve RNA izolasyonu.....	29
3.2.3. Total RNA'nın kantitatif tayini	30

3.2.4. Super script TM III reverse transcriptase ile cDNA oluşturulması.....	30
3.2.5. Primer dizaynının yapılması.....	31
3.2.6. Multipleks Real-Time PCR.....	32
4.ARAşTIRMA BULGULARI	35
4.1. Gen Ekspresyonu Sonuçları	35
5. TARTIşMA ve SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİş	51



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	Aminometilfosfonik
CAT	Katalaz
ddH ₂ O	Steril su
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DTT	Dikloro difenil trikloroethan
GP _x	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSH-P _x	Glutasyon peroksidaz
GSSG-R	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon s transferaz
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
KCl	Potasyum klorür
MOPS	3-(N-Morpholino)
Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat
NaCl	Sodyum klorür
NO	Nitröz oksid
NO ₂	Azot dioksid
O ₂	Oksijen
POEA	Polietilen amin
Tris	Trihidroksimetil amino metan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Glifosatın açık formül yapısı ($C_3H_8NO_5P$).....	7
Şekil 3.1. Zebra balığı tankları.....	24
Şekil 3.2. Dişi (♀)ve erkek (♂) zebra balığı (<i>Danio rerio</i>)	26
Şekil 4.1. Zebra balığı embriyosunda GPx gen ekspresyon Tukey's Multiple Comparison test analizi sonuçları.....	35
Şekil 4.2. Zebra balığı embriyosunda SOD gen ekspresyonu Tukey's Multiple Comparison Test analizi sonuçları	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması	5
Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye’de pestisitlerin ithalat miktarları	10
Çizelge 1.3. Antioksidanların sınıflandırılması	15
Çizelge 3.1. GPx ve SOD primer-prob bilgileri	32
Çizelge 3.2. Real-Time PCR karışımında kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	33
Çizelge 3.2. Real-time PCR programı	33
Çizelge 4.1. Glifosat muamelesi sonucu elde edilen nispi Gpx ve Sod mRNA ekspresyon seviyelerine ait istatistiki sonuçlar.	37
Çizelge 4.2. Glifosat muamelesi sonucu elde edilen nispi GPx mRNA ekspresyon seviyelerine ait çoklu karşılaştırmanın istatistiki sonuçları.....	37
Çizelge 4.3. Glifosat muamelesi sonucu elde edilen nispi SOD mRNA ekspresyon seviyelerine ait çoklu karşılaştırmanın istatistiki sonuçları.....	38

1. GİRİŞ

Beslenme problemi günümüzde ve gelecekte hızla artan dünya nüfusunun önemli problemlerinden biridir. Nüfusun hızlı artmasına karşı tarım alanlarının kısıtlı olmasından dolayı birim alandan en yüksek verimin alınması istenen bir durumdur (Öztürk 1990).

İstenmeyen mikroorganizma, böcek, yabancı ot ve zararlıları öldürmek, çoğalmalarını engellemek ve ortamdan uzaklaştırmak amacıyla kullanılan kimyasal, biyolojik veya fiziksel aktif maddelere pestisit denir. Fare, böcek ve diğer hayvanlar ile istenmeyen mantar ve küfler, bitki ve yabancı otlar, bakteri ve virüs gibi mikroorganizmalara pest denir. Pestleri kontrol altına almak için pestisitler yüzyıllardır kullanılmaktadır. Kükürt, Çinliler tarafından M.Ö. 1000 yıllarında ilk defa pestlerin kontrolünde kullanılan bir fumiganttır (Yurdun 2007).

Hedef organizmalar üzerine pestisitlerin spesifik toksisite göstermesi istenirken, hedef olmayan ve zararsız organizmalara toksik etkilerinin minimum olması istenen bir durumdur. Bunu sağlamak için ilk sentezlenen maddelerin ikinci ve üçüncü nesilleri olarak adlandırılan ve daha güvenilir olduğu düşünülen maddelerin sentezi yapılmıştır. Fakat, her pestisit belli bir toksisiteye sahiptir ve sağlık için tam güvenli pestisit türü yoktur (Vural 2005).

Pestisitlerin Türkiye’de tüketim miktarlarını yüzde olarak kıyaslarsak, %47 ile en fazla intektisitlerin, sonrasında %24 ile herbisitlerin ve %16’lık oranla fungusitlerin kullanıldığı gözlenmiştir (Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Ziraî Araştırma Merkezi 2005).

Tarımsal alanlara uygulanan pestisitler bu alanlardan atmosfer ile, kar ve yağmur sularının oluşturduğu erezyon ile ve drenaj sularıyla ekosisteme dağıldıkları görülmüştür (Egemen 2000).

Pestisitlerin çevreye olan etkileri; uygulama zamanlarına, uygulama şekillerine ve formülasyonlarına bağlı olarak farklılık gösterir. Uygulanan pestisitlerin %0.1'den daha az miktarı hedef organizmaya ulaşırken, geri kalan kısmı ekosisteme karışmaktadır (Yıldız vd 2005).

Tarım alanlarının yüzölçümü azalırken dünya nüfusu hızla artmaktadır. Bu azalmayla beraber birim alandan alınan verimin artırılması zorunlu hale gelmiştir. Zirai alanda mücadele için en çok kullanılan metot pestisit grubundan olan herbisitler ile yapılan kimyasal mücadeledir (Tepe 1997).

Doku ve hücreler, canlı organizmalarda patolojik yolla veya normal metabolizma ile ortaya çıkan radikal ürünleri ve reaksiyonlarını baskılayan güçlü bir savunma sistemine sahiptir. Radikaller ile hızla reaksiyona girerek zararlı etkileri önleyen maddelerin hepsine birden kısaca “antioksidanlar“ veya “antioksidan savunma sistemleri“ denir (Mccord and Fridowich 1969).

Antioksidanlar,

- ✓ Geçiş metal iyonlarını uzaklaştırarak,
- ✓ Reaktif oksijen türlerini temizleyerek veya baskılayarak,
- ✓ Oksijeni uzaklaştırarak veya
- ✓ Başlamış olan reaksiyonları kırarak etkili olurlar (Halliwell 1997).

Bu araştırmaların yapılmasında model organizma olarak zebra balığı (*Danio rerio*) tarafımızdan seçilmiştir. Zebra balığı, laboratuvar koşullarında kolay yetişmesi, şeffaf yapılı olmasından dolayı gözleme uygun olması, haftalık 100-200 yumurta bırakma yeteneği gibi özelliklerinden dolayı son zamanlarda çok tercih edilen bir türdür.

Yaptığım tez çalışmamda, 96 saat süre ile 1, 5, 10 ve 100 mg/L konsantrasyonlarında glifosata maruz bırakılan 20 adet zebra balığı embriyoları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde

gözlenmiş ve deneme sonunda glifosatın antioksidan savunma mekanizmasını oluşturan bazı enzimler üzerine nasıl etki ettiği belirtilmiştir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Pestisitler ve sınıflandırılmaları

Tarım ürünlerine veya hayvansal gıdalara, üretim, hasat, depolama, taşıma ve tüketim sırasında zarar verebilen herhangi bir organizmayı (yabancı otlar da dahil) kontrol altına almak ve bu organizmaların zararlarını önlemek amacıyla uygulanan veya hayvanların vücutlarındaki herhangi bir zararlının kontrolü için kullanılan madde veya karışımlara pestisit denilmektedir (Soyöz ve Özçelik 2003; Çakıroğulları 2006). Pestisit kullanımı, tarım ürününü hastalık ve yabancı otların zararından korumak, kaliteli üretim yapabilmeyi güvence altına almak için kullanılan bir tarımsal mücadele şekli olup ürün kayıplarını büyük oranlarda azaltan en önemli ifadelerden biridir (Damalas *et al.* Eleftherohorinos 2011).

Bulunduğu yerde yetişmesi istenmeyen tüm bitki türlerine yabancı ot denilmektedir. Bu yabancı otlar tarımı yapılan bitkilerle rekabet içinde olurlar. Pestisit, insan yaşamında zararlı olan canlıları öldürmede kullanılan bileşik veya maddeleri ifade eden genel bir terim olarak tanımlanabilir (McEven and Stephenson 1979).

Genellikle içme sularında, nehir, göl ve diğer sucul ortamlarda, pestisitler tek başına veya karışım olarak karşıma çıkabilir (Fernández-Alba *et al.* 2002). Bu sebepten dolayı pestisitlerin olumsuz taraflarına maruz kalan canlı gruplarının belki de en önde geleni sucul ortamlarda yaşayan organizmalardır (Kuhn and Streit 1994; Güven vd 1999; Sornom *et al.* 2010).

Herbisitlerin tarımsal ekosistemlerde kullanılmakta olan pestisitlerin önemli bir bölümünü oluşturduğunu ve genel olarak alglerin tür kompozisyonlarını değiştirerek akuatik toplulukların yapısını ve fonksiyonlarını bozabildiği belirtilmiştir (Ermiş 2006).

Tarım alanlarının dışında da kullanılan pestisitler, depolanmış ürünlerin korunmasında, ormanlara zarar veren organizmalara karşı ve su kanallarında akışı engelleyen yabancı otlara karşı da geniş bir yelpazede kullanılabilmektedir (Rajendran *et al.* 2005; Çakıroğulları 2006).

Farklı açıdan bakıldığında, gereğinden fazla, zamansız ve bilinçsizce kullanılan pestisitler zararlıların daha dayanıklı hale gelmesine, üründe kalitesizleşmenin yaşanmasına, hayvan ve insanların zehirlenmelerine neden olmaktadır (Gürcan 2001).

İdeal bir pestisit özellikleri;

- ✓ İstenmeyen zararlı maddeleri kontrol edebilmeli,
- ✓ Hedef olmayan organizmaya zarar vermemeli,
- ✓ Uygun bir sürede ekolojik olarak çözünür olmalı,
- ✓ Uygulama alanı dışına çıkma eğilimi olmamalı,
- ✓ Çevrede birikme potansiyeli olmamalıdır (Yalvaç 2005).

Fakat günümüzde kullanımı olan hiçbir pestisit yukarıdaki ideal niteliklerin tümüne sahip değildir. Yapılan araştırmalarda, pestisitlerin toprak kirleticisi olduğu, yeraltı sularına ve denizlere de karıştığı gösterilmiştir (Sapota 2004; Yalvaç 2005).

Çok düşük düzeydeki pestisit kalıntıları bile sulardaki canlı organizmalarda birikim göstererek canlı sağlığı ve çevreyi çok ciddi etkileyebilmektedir. Aynı zamanda gıdalarla ve sulardaki kalıntılarla veya hava yolu aracılığıyla insanlara geçebilmektedir (Shukla *et al.* 2006).

Toksikoloji biliminin temelini pestisitler oluşturur. İster doğal ister sentetik kimyasallar olsun, hem insan hem de diğer organizmalar için toksik etkilere sahip oldukları bilinmektedir. Uzun süreli olarak çevrede kalan pestisitler, mutajen, teratojen ve en önemlisi karsinojen olabilirler (Siemering *et al.* 2004; Güven 2005).

Pestisitlerin çevresel etkilerinde en çok bilinenlerinden birisi de mutasyonların başlatılması durumudur (Epstein and Legator 1971; Yoder *et al.* 1973). Özellikle uygulamalardan sonra ürünlerde pek çok pestisit yüksek dozlarda gözlenmesine rağmen topraktaki bileşiklerin dilüsyonu düşünüldüğünde en az bir test sisteminde mutasyon artışının gözlemlenebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar tavsiye edilen tarım uygulamalarının sonucunda pestisit artıklarını ve genotoksitesini hesaplamak için yapılmıştır (Rodrigues *et al.* 1998).

Çizelge 1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması (Buchel 1983)

İlacın Fiziki Haline Göre	İşlevlerine Göre	Zararlının Biyolojik Dönemine Göre	Bileşimindeki Etkili Maddeye Göre	Yarı Ömürlerine Göre	Hedef Aldığı Organizmaya Göre
Katı formülasyonlar	Yaprak dökücü	Larvaları öldürenler (larvasitler)	Organofosfatlar	Dayanıklı (1-2 hafta)	Böcek öldürenler (intektisitler)
Sıvı formülasyonlar	Kurutucu	Yumurtaları öldürenler (ovisitler)	N-metil Karbamatlar	Orta dayanıklı (1-8 yıl)	Fungusları öldürenler (fungusitler)
	Kısırlaştırıcı	Yumurta ve larvaları öldürenler (Ovalarvasitler)	Organoklorinler	Dayanıklı (2-5 yıl)	Fungusların faaliyetini durduranlar (fungustatikler)
	Çekici	Erginleri öldürenler	Sentetik pyretroidler ve pyretrinler		Yabancı otları öldürenler (herbisitler)
	Kaçırıcı		Arsenikler		Örümcekleri öldürenler (akarisitler)
	Büyüme yönlendirici				Bakterileri öldürenler (bakterisitler)
					Yaprak bitlerini öldürenler (aphisitler)

Palüzar (2013) tarafından bildirildiğine göre, pestisitlerin sınıflandırılması daha genel olarak ele alınırsa, hedef aldığı organizmaya göre yapılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre Dünyada ve Türkiye’de en yaygın kullanılanlar sırasıyla İnsektisidler (böcek öldürücüler), Herbisidler (yabani ot öldürücüler), Fungusidler (fungus öldürücüler) ve Rodentisidlerdir (kemirgen öldürücüler). Pestisitlerin organizmalar üzerindeki zararlı etkilerinin incelenebilmesi için de kimyasal yapılarının bilinmesi gerekir ve bundan dolayı kimyasal yapılarına göre sınıflandırma daha önemlidir ifadeleri öne sürülmüştür.

Pestisitler kimyasal yapılarına göre;

1. Organoklorinler
2. Organofosfatlar
3. Karbamatlar
4. Pretrinler ve Sentetik Pretroitler şeklinde sınıflandırılabilir (Palüzar 2013).

Dünyada ve ülkemizde zararlıları yok ederek daha rahat bir yaşam ve kaliteli ürünler elde etmemizi sağlayan pestisitler, hedef organizmalar gibi hedef olmayan organizmalara da zarar verebilmektedirler (McEven and Stephenson 1989; Amdur Doull and Klassen 1991).

Bu maddeler hedef dışı organizmalara çeşitli yollarla bulaşmakta ve organizmalarda sinir, immün ve endokrin gibi sistemleri; karaciğer, kalp gibi organları etkilemektedir (Guest *et al.* 1991).

Pestisitler, su birikintileri ve havzalara doğal olarak yağmur suyu ile veya sulama yolu aracılığıyla girebilir (Tardiff 1992; Hosokawa *et al.* 1995).

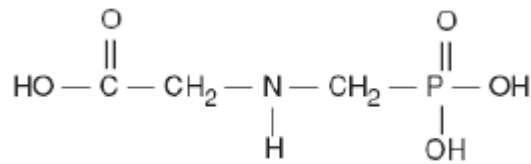
Sucul ortama bulaşan pestisitlerin davranışı pestisit kararlılığına ve çözünürlüğüne bağlıdır. Daha kararlı olan pestisitlerin genellikle sucul ortamdaki etkileri daha fazladır. Eser miktarlarda dahi olsa suda pestisit kalıntılarının bulunması suda yaşayan

organizmaların besin zincirinde oldukça önemli olan fitoplankton ve zooplanktonların gelişimleri durmaktadır (Khan 1977).

Pestisitlerin endişe verici özelliklerinden bir tanesi de sucul ortamda yaşayan organizmalar tarafından biriktirilmesidir. Polarite, çözünürlük, dağılma ve uçuculuk gibi pestisit özellikleri biyolojik birikimi etkilemektedir. Pestisitleri sudan alan planktonlar biriktirirler ve sonrasında omurgasızlara ve balıklara aktarılır, bu canlılar da kuşlar, balıklar, memeliler ya da insanlar tarafından tüketilebilirler (Chau and Afghan 1982).

1.1.2. Glifosat (N-fosfonometilglisin)

Tarım alanları, ormanlık alanlar ve bahçe bakımında istenmeyen bitkilerden kurtulma amacıyla uygulanan ve organofosfatlı bir herbisit olan glifosat, bu bitkilerin kontrolünde büyük başarı sağlamıştır, bu sebepten dolayı yaygın kullanıma sahiptir (Chan and Mahler 1992; Baylis 2000; Woodburn 2000). Glifosat, geniş spektrumlu ve seçici olmayan bir herbisiddir. Tek ve çok yıllık bitkilerde bu herbisid yüksek bir aktiviyeye sahiptir (Franz 1985).



Şekil 1.1. Glifosatın açık formül yapısı (C₃H₈NO₅P) (Journal of Pesticide Reform 2004).

Glifosat, özellikle pirinç, mısır ve soya ekimi yapılan tarımsal alanlarda, bahçe bakımında, ormanlık alanlarda, otlakların ve yeşillik alanların istenmeyen bitkilerinden kurtulmak gibi amaçlardan dolayı sık olarak kullanılmaktadır (Dallegrave *et al.* 2003).

Glifosat tarım alanları ve ormanlık alanlar gibi yerlerde istenmeyen yabancı otların öldürülmesinde kullanılan seçici olmayan bir herbisittir (Chan and Mahler 1992; Baylis 2000; Woodburn 2000).

Glifosatın sudaki çözünürlüğü yüksektir bu sebepten dolayı hem toprak hem de sucul ekosistem sürekli olarak kontamine olmaya açık haldedir. Hedef olmayan organizmaların da etkilenmesinden dolayı bu canlıların gelişimi, fizyolojisi, morfolojisi, biyokimyası ve immünolojisi üzerinde mutasyonlar ortaya çıkabilir (Tate *et al.* 1997).

Glifosat, bir yıllık bitkilerin kontrolünde oldukça büyük başarı sağlamaktadır. Bundan dolayı glifosat dünyada kullanım olarak önde gelen herbisiti olmuş ve hala marketi en fazla büyüme gösteren herbisittir (Baylis 2000).

Pestisitlerin çoğunda olduğu gibi, bitki hücrelerine girişi kolay olması istendiğinden glifosatta da sürfektan madde eklenerek birçok ticari isme sahip (Roundup®, Rodeo®, Accord®, Vision®) ticari formları piyasaya sürülmüştür. ABD’nde 1970’lerin başında kimyasal şirketi olan Monsanto tarafından üretilen Roundup ilk glifosatlı herbisittir (St. Louis, MO, USA) ve Avrupa ülkeleri ile ABD’de sıklıkla kullanılmaktadır (Tominack *et al.* 1991; Lee *et al.* 2000; Bradberry *et al.* 2004). Glifosat, Roundup’ın aktif bileşenidir ve dünya pazarındaki yerini 1995-2001 yılları arasında üç katına çıkarmıştır (Monsanto 2001).

Mitchell *et al.* (1987) göre, glifosatın en fazla tercih edilen ticari formu Roundup, formülasyonunda farklı oranlarda olacak şekilde, bir sürfektan madde olan polioksietilen amin (POEA) içerir ve bu madde glifosatın bitki hücrelerine nüfuz etmesini kolaylaştırır.

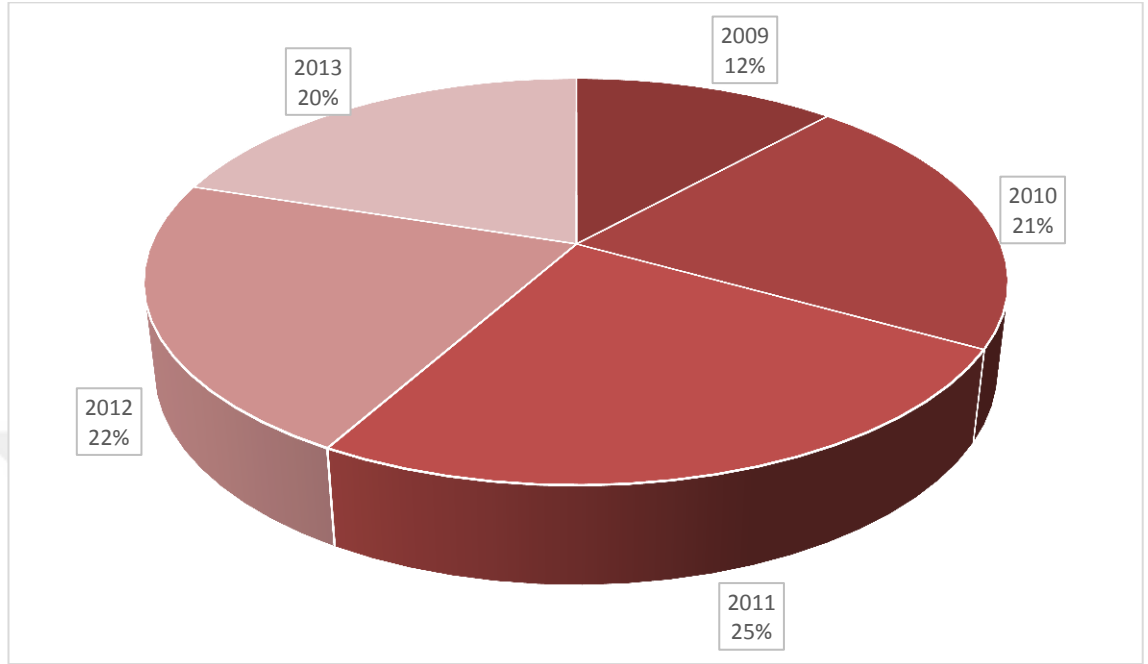
Glifosatın toksik etkisi aktif madde ile beraber kullanılan sürfektan maddeyle alakalıdır. Sürfektan madde tek başına uygulandığında glifosata oranla daha az toksiktir, fakat diğer bileşenlerle beraber Roundup’ın toksisitesini artırmaktadır (Carlisle and Trevors 1988; Cox 1996; Giesy *et al.* 2000).

Roundup'ın glifosata göre toksik etkisinin daha fazla olduğu yapılan bir anafaz-telofaz soğan testinde saptanmıştır (Rank *et al.* 1993). Martinez and Brown (1991) ise yaptığı bir çalışmada farelerin ölümüne neden olan Roundup dozunun, glifosat dozunun 1/3'ü kadar olduğunu görmüşlerdir. Bunlara ek olarak akut toksisite alanında yapılan çalışmalarda da, glifosatın sürfektanla birlikte kullanımında açığa çıkan toksik etkisinin, tek başına glifosatın toksik etkisinden daha güçlü olduğu saptanmıştır (Adam *et al.* 1997; Dallegrove *et al.* 2002).

2010 yılında yapılan bir çalışmaya göre Türkiye'de pestisit kullanımı yaklaşık 33.000 tondur. Bu pestisit miktarının %47'sini intektisitler, %24'ünü herbisitler, %16'sını fungusitler, %13'ünü diğer gruplar oluşturmaktadır. Bu pestisitlerin yıllık satış tutarında yaklaşık 230- 250 milyon dolar olduğu bildirilmiştir (Tiryaki vd 2010).

Çizelge 1.2'de belirtildiği gibi, 2009 yılında 12 bin ton civarı olan ithalat miktarı 2011 yılında 25.776 tona çıkmıştır, 2013 yılında ise 20.637 tona kadar bu sayı düşmüştür. Önceki beş yıllık dönem göz önüne alındığında 2005 yılında 11.000 ton ihracatın 2008 yılında 26.000 tona çıktığı gözlenmiştir. Tüm bu verilere bakarak Türkiye'de pestisit kullanımı sabit olarak değil daha çok dalgalı bir seyir izlemekte şeklinde yorum yapılabilir (Demirci vd 2015).

Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye’de pestisitlerin ithalat miktarları



Glifosatın toprakta parçalanması hızlı bir şekilde olur, suda parçalanması ise minimum seviyededir. Aminometilfosfonik (AMPA) yıkım ürünlerinden biridir. Bu yıkım ürününden ise formaldehit meydana gelir ve bu bileşik toksik bir bileşiktir. Glifosatın biyolojik parçalanması ise C-N arasındaki bağın ayrılması ve AMPA oluşumu şeklindedir. Oksijenli durumlarda parçalanma oksijensize oranla daha hızlı olmaktadır (Brewster *et al.* 1991).

1.1.3. Zebra balığı (*Danio rerio*)

Toksikolojik denemelerde kullanılan canlılar olabildiğince ekosistemi temsil edebilen yerli türler olmalıdır. Seçilecek olan türün ekonomik ve ekolojik öneme sahip olması ayrıca temininin de kolay olması gerekir. Türler arası ve tür içi duyarlılık farklılık gösterdiği için duyarlılık aralığı geniş olan canlıların tercihi büyük avantaj sağlamaktadır. Seçtiğimiz türlerin kültürlerinin yapılabilir olması ve laboratuvar koşullarına dayanıklılığı yüksek olması gerekir.

Balık gibi sucul omurgalılar çevrelerinden yayılan stres faktörlerine diğer canlılardan daha fazla maruz kaldıkları için balıklarla alakalı yapılan ekotoksikolojik araştırmalar oldukça önemlidir. Son yıllarda yapılan ekotoksikoloji çalışmalarında Zebra balığı (*Danio rerio*) yumurta ve embriyolarının sıklıkla kullanıldığı görülmektedir.

Dayanıklı olmalarının yanında kolay bulunmaları, laboratuvar ortamında kolay beslenip çoğaltılabilmesi, yüksek üreme kapasitesi, yumurta ve embriyolarının saydam olmasından dolayı kolay izlenebilir olması, jenerasyon zamanlarının kısa olması ve toksik ajanlara yumurtalarının duyarlı olması gibi sebeplerden dolayı (Hisaoka and Battle 1958; Kimmel *et al.* 1995; Lele and Krone 1996) günümüzde model organizma olarak daha sık kullanılmaya başlanmıştır.

Sunulan tez çalışmasında deney türü olarak zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları seçilmiştir. Bu türü çalışmamızda tercih etmemizin sebepleri ise;

- ✓ Laboratuvar ortamına uyum kabiliyetinin yüksek olması,
- ✓ Genetik yapısı, genel fizyolojisi ve davranışlarının iyi bilinmesi,
- ✓ Dış döllenme gerçekleştirdiğinden embriyonik tüm safhalarının izlenebilir olması ve değişiklik yapılabilmesi,
- ✓ İnsana ait birçok gelişim ve hastalık genleriyle benzeyen genler bulundurması,
- ✓ Genetik analizlere uygun olması,
- ✓ Birey başına haftada yaklaşık olarak 120-150 yumurta üretebilme kapasitesinin olması ve
- ✓ İnsan genlerine ait karşılaştırmalı haritalamada kullanılması gibi özellikleri bulundurduğu içindir (Greenberg *et al.* 1985; Rand 1995; Atamanalp 2004).

Cyprinidae familyasına ait tropikal olan bir türdür zebra balığı. Zebra balıklarının ana vatanı Güneydoğu Himalayadır ve yaygın olarak Pakistan ile Hindistan'da yaşamaktadırlar (Mayden *et al.* 2007).

Bütün bu özelliklere ek olarak, zebra balıklarının hayat döngüsünü laboratuvar farelerine göre daha erken sürede tamamlaması, fareler ile yapılan deneylerin tamamının zebra balıkları ile de yapılabilmesi ayrıca daha fazla neslin takip edilebilir olması da bu balıkların avantajları arasındadır. Toksikoloji çalışmalarında zebra balığının araştırmacılar tarafından tercih edilmesinin başka bir sebebi de uygulanan testin kısa ve sonuçlarının tartışmasız net oluşudur (Din 2002).

Westerfield (1995) ve Spence (2008)'in görüşlerine göre zebra balıklarının döllenme periyodu yaklaşık 3-4 aydır ve dişi balıkların yumurtlama yetenekleri 2-3 gün aralıklardır. Ovulasyonun olması ve yumurtlamanın gerçekleşebilmesi için aynı ortamda bir de erkek bulunmalıdır. Döllenmiş yumurta ilk andan itibaren şeffaftır ve gelişimi hızlı bir şekilde ilerler. Embriyoların gelişiminde en ideal sıcaklık 28,5°C'dir. Döllenmenin 36. saatinde balığın tüm ana organları taslak olarak ortaya çıkar. Yumurtadan çıkan larvalar birkaç gün sonra daha vitellüs kesesi tükenmeden dış ortamdan yem almaya başlarlar. 90 günlük olmuş ergin bir birey yaklaşık olarak 2 cm uzunluğunda ve üreme fonksiyonlarına sahiptir.

Zebra balıkları zooplankton, böcekler, fitoplankton ve böcek larvaları ile beslenebilirler. Eğer tercih ettikleri beslenme kaynaklarına ulaşamazlarsa farklı besinler ile de beslenebilirler (Spence *et al.* 2008).

Bakımının uygun koşullarda kolay olması, tek seferde fazla sayıda yumurta verebilmesi ve bu yumurtaların şeffaf olması bu balığın gelişim psikolojisi, toksikoloji, onkoloji, embriyoloji, teratoloji, nörobiyoloji, genetik, kök hücre ve çevre bilimleri gibi pek çok çalışma için uygun bir model organizma olmasını sağlamıştır (Fabacher 2000; Nagel 2002).

1.1.4. Antioksidan sistemler

Serbest radikal kaynaklarını ve yapabildiklerini bildiğimiz vakit bu bileşikler nötralize eden antioksidanları daha iyi anlamış oluruz. Yiyecekleri, özellikle de yağları bozulma

ve oksidasyondan koruyan antioksidanlar mikro besin maddeleridir. Adından da anlaşılacağı gibi vücuttaki maddelerin oksijenle birleşmesini engelleyerek canlıdaki bu maddelerin oksidasyonunu engeller. Temel olarak antioksidan sistem, serbest radikallerin nükleik asitlere (DNA), hücre zarına ve hücre bileşenlerine saldırmasını önlemek amacıyla bu radikalleri kendine çeker ve bağlar. Antioksidan özellikte olan birçok madde bulunur. Bu maddelerin bir kısmı vücut tarafından üretilirken, bir kısmı dışarıdan özellikle de bitkiler aracılığıyla alınır. Antioksidanlar başlıca endojen (doğal) ve eksojen kaynaklı olarak iki ana gruba ayrılabilir aynı zamanda serbest radikallerin oluşumunu engelleyenler ve mevcut olan radikalleri etkisiz hale getirenler olarak veya enzim olanlar ile enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırmak mümkündür (Palüzar 2013).

Reaktif oksijen türlerin oluşması ve bu türlerin ortaya çıkardığı hasarların önlenmesi için vücutta çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır. ‘Antioksidan savunma sistemleri’ veya ‘antioksidanlar’ diye adlandırılan bu sınıflar; serbest radikalleri nötralize ederler ve sebep oldukları hasarı tamir etmeye yardımcı olarak, vücudun etkilenmesini en aza indirir veya vücudun yenilenmesini sağlarlar (Ames *et al.* 1993).

Oksidatif stres, serbest radikallerin üretimi ve üretilen bu serbest radikallerin yıkıcı etkilerine karşı hücrelerin karşı koyabilme yetkileri arasındaki sitopatolojik zincirleri ifade eder (Simonian and Coyle 1996).

Herhangi bir sebepten dolayı reaktif oksijen bileşiklerinin aşırı oluşumu veya antioksidan savunma ve onarım sistemlerindeki yetersizliklerden dolayı oksidatif stres gelişir (Kökoğlu 1998).

Serbest radikaller: Az sayıda molekül tek elektronlu olup, çoğu molekül çift elektronludur. Tek, yani eşleşmemiş elektron bulunduran bu moleküller, bulabildikleri herhangi bir molekülle etkileşerek bu molekülden elektron alırlar veya ona bir elektron verirler. Bu şekilde başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girerek yapılarını

bozan bu moleküllere “reaktif oksijen türleri”, “serbest radikaller” veya “oksidan moleküller” adı verilir (Halliwell and Chirico 1993).

Pryor (1982)'un araştırmalarına göre, nitroz oksid (NO) veya azot dioksit (NO₂) gibi moleküllerde de görüldüğü üzere en dış orbitallerinde eşleşmemiş bir elektron barındıran herhangi bir atom grubu ya da atom serbest radikal moleküldür. Biradikaller ise, dış orbitallerinde eşleşmemiş iki adet elektron içeren moleküllerdir ve misal olarak moleküler oksijen (O₂) verilebilir. Bunlara ek olarak radikal iyonlar ise, negatif (O₂⁻) veya pozitif (H₃N⁺) yük taşıyan serbest radikallere örnektir.

Moleküler veya atomik yapıda bulunan ve eşleşmemiş tek elektron bulunduran bu bileşikler komşu moleküllerden kendi orbitallerini tamamlamak amacıyla elektron kopararak bir takım zincir reaksiyonunu başlatırlar (Rabideau 2001).

Serbest elektronunu eşlemek amacıyla başka molekülden elektron alan oksijen radikali diğer molekülü kararsız hale getirmiş olur. Bu ifadede de görüldüğü gibi serbest radikaller organizmalarda önemli moleküllere hasar veren tepkimeler zincirini başlatabilir (Cheeseman and Slater 1993; Halliwell and Chirico 1993).

Pestisit gibi bazı yabancı toksik maddeler ile hücrelerde serbest radikal üretimi büyük oranda artırılabilir. Bu maddeler antioksidan aktiviteyi düşürürler ya da doğrudan serbest radikal üretimini sağlarlar (Cross *et al.* 1987; Oruç ve Üner 2004).

Antioksidan savunma sistemleri, serbest radikal oluşumlar ile ortaya çıkan hasarları önlemek ve detoksifikasyonunu sağlayabilmek amacıyla normal fizyolojik şartlarda gelişen sistemlerdir. “Antioksidanlar” olarak da adlandırılırlar ve bu sistemde bulunan moleküller, serbest radikallerin ortadan kaldırılarak oksidatif hasarın önlenmesinde büyük katkı sağlarlar (Halliwell and Gutteridge 1999,2000; Urso and Clarkson 2003).

Genel olarak antioksidanlar,

- ✓ Geçiş metal iyonlarını uzaklaştırarak,
- ✓ Oksijeni uzaklaştırarak,
- ✓ Reaktif oksijen türleri temizleyerek veya baskılayarak
- ✓ Başlatılmış zincir reaksiyonunu kırarak etkili olabilirler (Halliwell 1997).

Dündar *et al.* (2000) görüşlerine göre, hücre ve doku yıkımı ile sonuçlanma oranı yüksek olan oksidatif hasara karşı antioksidan sistemler her düzeyde aktivite gösterebilir.

Aktif oksijen oluşumunu önleyerek veya oluşan aktif oksijenleri serbest bırakmayarak hücresel düzeyde oksidasyondan kaynaklı zararları engelleyebilen antioksidan maddeler, dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurabilir (Baublis *et al.* 2000).

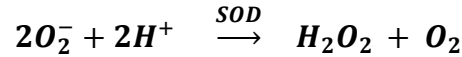
Çizelge 1.3. Antioksidanların sınıflandırılması (Gutteridge 1995)

ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH) Melatonin
Katalaz (CAT)	α -Tokoferol (Vit. E) Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Askorbat (Vit. C) Transferin
Glutasyon peroksidaz (GPx)	β -Karoten (Vit. A) Ferritin
Peroksidaz (PLGPx)	Flonoidler Laktoferrin
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Ürat Albumin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Biluribin Lipoik asid

1.1.4.a. Enzimatik antioksidanlar

Aerobik canlılar başlıca üç enzim yardımıyla oksijen toksisitesinden korunur. Bu enzimler; süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidazdır (Bhagavan 2002).

Süperoksid dismutaz (SOD): Süperoksid dismutaz (SOD) enzimi ilk olarak Mc Cord ve Fridovich tarafından 1969 yılında tanımlandı. Bu enzim, lipid peroksidasyonunu inhibe eden ve O_2^- radikalini katalitik şekilde uzaklaştıran bir metalloenzimdir. O_2^- radikalinin H_2O_2 ve O_2 dönüşümüne katalizini sağlar (McCord and Fridovich 1969).



Denklemden de görüldüğü gibi başlangıçta membranları geçemeyen O_2^- radikali reaksiyon sonucunda membrandan kolayca geçen H_2O_2 molekülüne dönüşmektedir (Rigo *et al.* 1977; Halliwell and Gutteridge 1999).

SOD, süperoksit serbest radikalinin etkisiz hale getirilmesinde glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) enzimleri ile beraber rol alan bir metalloproteindir. SOD enziminin antioksidan özelliği ilk olarak Noumohammadi *et al.* (2001) da belirttiği üzere, Mc Cord ve Fridovich tarafından (1969) yapılan araştırmalar sonucu anlaşılmıştır.

SOD enzimi oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur ve oksijen zehirlenmesine karşı bu hücreleri korumada önemlidir. Aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisinden korumak da SOD'un görevidir. SOD enziminin enzimatik aktivitesi oldukça yüksektir (Fridovich 1973; Lavelle *et al.* 1973; Petkau *et al.* 1975; Sheng *et al.* 2004).

Üç sınıf SOD enzimi vardır, bunlar kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre sınıflandırılır:

(a) **CuZn-SOD:** Mann ve Keilin, 1939 yılında sığır kanından mavi-yeşil renkte ve bakır içeren hemokuprein diye isimlendirilen bir protein izole etmişlerdir. Benzer bir protein 1953 yılında at karaciğerinden izole edilmiş ve hepatokuprein olarak adlandırılmıştır. 1970 yılında ise eritrositlerde keşfedilen bu proteinin bakıra ek olarak

çinko da içerdiği görülmüştür. Bu proteinin başlangıçta hiçbir enzimatik etkinliği tespit edilememiş ve sadece bir metal yığını olduğu ileri sürülmüştür. McCord ve Fridovich adındaki araştırmacılar 1969 yılında bu proteinin bir SOD aktivitesi göstererek eritrositlerde O_2^- i katalitik olarak yıktığını ortaya koymuşlardır (Chance *et al.* 1979; Halliwell and Gutteridge 1999).

CuZn-SOD enzimindeki bakır iyonları, redüksiyon ve oksidasyona uğrayarak dismutasyon reaksiyonunda rol oynarlar. Çinko metalinin ise katalitik bir etkisi bulunmamaktadır, yalnızca enzimi stabil halde tuttuğu bildirilmektedir (Fridovich 1995).

(b) **Mn-SOD:** CuZn-SOD'dan tamamen farklı olduğu ortaya konulan Mn-SOD ilk kez *Escherichia coli*'den izole edilmiştir. Bu enzim pembe renklidir, aktif bölgesinde Mn^{+3} metali bulundurur, kloroform-etanole karşı dayanıksızdır ve moleküler kütlesi 40.000 Da kadardır. Bu farklı özelliklere sahip olmasına rağmen Mn-SOD lar da CuZn-SOD lar gibi aynı reaksiyonları tetiklerler (Fridovich 1995; Halliwell and Gutteridge 1999).

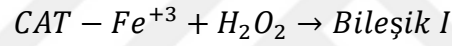
(c) **Fe-SOD:** İlk olarak *E. Coli* bakterisinde saptanan Fe-SOD genellikle iki protein alt ünitesine sahiptir ve her proteinde bir ya da iki demir iyonu bulundurur. Enzim normal durumda iken demir +3 değerlikli, katalitik döngüde ise +3 ve +2 değerlikleri arasında bir dönüşüm görülür. Ginkgo, domates, biloba ve hardal gibi bitkilerde tespit edilmiş olsa dahi henüz hiçbir hayvan organizmasında Fe-SOD'a rastlanmamıştır (Yost and Fridovich 1973).

Katalaz (CAT): 1937 yılında Dounce ve Sumner tarafından sığır karaciğerinden izole edilen bir enzimdir. Yaklaşık olarak 240.000 Da molekül ağırlığına sahiptirler. Aktif bölgesine hem grubu (Fe^{+3} - protoporfirin) bağlı olan CAT'lar dört protein alt ünitesinde oluşurlar. Alt ünitelerin her biri aynı zamanda enzimi H_2O_2 'ye karşı koruyan indirgenmiş NADPH molekülü içerir. Dondurarak kurutma, depolama, alkali ve asite karşı maruz kalma alt ünitelerin ayrılmasına ve enzimin aktivitesinin ortadan

kalkmasına sebep olur (Yost and Fridovich 1973; Halliwell and Gutteridge 1999; Aydın vd 2001).

Özellikle karaciğer ve eritrositler yoğunlaşmak üzere hayvanların tüm organlarında bulunur CAT. Hücre içerisinde ise öncelikli olarak peroksizomlara konumlanmışlardır ve kloroplast, mitokondri ve endoplazmik retikulumda da az oranda bulunurlar (Halliwell and Gutteridge 1999).

SOD enzimine benzeyen bir reaksiyon mekanizması yardımıyla H_2O_2 'i O_2 ve H_2O şeklinde parçalar ve biyolojik sistemlerde zararlı olan H_2O_2 e karşı organizmayı korur (Aebi 1984).



Denklemden (Lardinnois 1995) de görüldüğü gibi hidrojenperoksidi moleküler oksijen ve suya çevirir. Bir dakika gibi oldukça kısa bir zamanda 6 milyon hidrojenperoksidi oksijen ve suya dönüştürecek kadar etkili bir enzimdir (Valko *et al.* 2006).

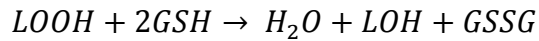
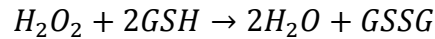
Katalazın aktivitesi, ortamda bulunan hidrojenperoksidin konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artar. Eğer ortamda düşük konsantrasyonda H_2O_2 bileşiği bulunuyor ise, bu bileşiği substrat olarak kullanan glutatyon peroksidaz gibi enzimler devreye girerek zararlı bileşiği ortamdan uzaklaştırırlar (Agar *et al.* 1986).

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px): Bu enzimden bahsetmeden önce substrat olarak kullandığı glutatyon (GSH)'u bilmek gerekir. Glutatyon, glutamik asit, glisin ve sisteinden oluşmaktadır. Hemen hemen bütün canlılarda mevcut, düşük molekül ağırlıklı ve serbest sülfhidril grubuna sahip önemli bir tripeptittir (Meister and Anderson 1983; Meister 1994). Hücre fonksiyonları hariç tutulursa glutatyon, GSH-Px

enziminin katalizörlüğü ile organik peroksit ve hidrojen peroksitleri metabolize ederek antioksidan hücre savunmasında önemli bir yere sahiptir (Meister and Anderson 1983; Deneke and Fanburg 1989; Ambrosia *et al.* 1992).

1957’de Mills tarafından keşfedilen Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi bir antioksidandır (Knapen *et al.* 1999). Hücre membranı, mitokondri ve sitozolde bulunan glutatyon peroksidaz 85000 dalton molekül ağırlığına sahiptir (Akkuş 1995; Deaton and Marlin 2003). Elektron kaynağı olarak glutatyonu kullanan glutatyon peroksidaz, organik hidroperoksit ve hidrojen peroksitlerin redüksiyonunu katalize etmekte ve hücrenin oksidatif strese korunmasına önemli ölçüde yardım etmektedir (Deaton and Marlin 2003).

Selenyum-bağımlı GSH-Px’ler ve selenyum-bağımsız GSH-Px’ler olmak üzere iki gruba ayrılabilirler. Organik hidroperoksit ve H₂O₂’yi indirgeyebilen grup selenyum-bağımlı GSH-Px’lerdir. Selenyum-bağımsız olan GSH-Px’ler ise sadece organik hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayarak H₂O₂ için inaktif durumdadırlar (Cnubben 2001).



Denklemlerde de görüldüğü üzere GSH-Px H₂O₂ molekülünü iki molekül H₂O’ya ve bir molekül membran peroksitlerini (LOOH/ROOH) alkol (LOH/ROH) ve bir molekül H₂O şeklinde indirger (Piner 2005).

Eritrositlerde oksidatif strese karşı oldukça etkili bir antioksidan olan GSH-Px enzimi, fagositik hücrelerdeki solunum patlaması esnasında ortaya çıkan serbest radikal bozunmasından fagositik hücrelerin olumsuz etkilenmesini önlemede önemli işlevlere sahiptir (Mayes 1993).

Sucul canlılardaki antioksidan sistemlerin içeriğindeki temel enzim (SOD, GPx, CAT) gruplarının (Kehrer 1993; Keramati et al. 2010) ROS (reaktif oksijen türleri)'u inhibe edici etkilerinin olduğu ve pestisitlerden kaynaklı olan serbest radikallerin zararlı etkilerine karşılık olarak hücresel sistemi koruyabildikleri (Banerjee *et al.* 1999; Yarsan *et al.* 1999; Banerjee *et al.* 2001) görülmüştür. Kısaca pestisitlerin organizmalardaki antioksidan sistemlerine etki ettiği söylenebilir.

1.1.5. Gen ekspresyonu

Gen ekspresyonu veya gen ifadesi, DNA dizisini oluşturan genlerin, fonksiyonel protein formuna dönüşme süreci olarak tanımlanan bir terimdir. DNA'da var olan genetik bilgilerin bir RNA molekülü olan mRNA'nın sentezi yardımıyla transkripsiyonu (kopyalanması) ve kopyalanan bu genetik kodların translasyon (protein molekülü haline çevrilmesi) işlemlerinin tamamına gen ekspresyonu (ifadesi) denilmektedir.

DNA'nın farklı bölgelerindeki baz dizilimleri farklı genlere karşılık gelir ve o gen tarafından kodlanan proteinin aminoasit dizilişini gösterir. DNA'da bulunan bu baz dizisinin proteinin amino asit dizilimini nasıl kodladığı biyokimyasal ve genetik yöntemlerin beraber kullanılmasıyla ortaya konmuştur (Yauk and Berndt 2007).

Karşılaştırma gen ekspresyonunun en genel ölçüm amacıdır. Bir organda tümör hücresiyle normal hücreyi karşılaştırma, farklı hücrelerdeki genlerin mRNA düzeylerini karşılaştırma, toksik maddeye maruz kalan ya da farklı sürelerle ilaç uygulaması yapılan canlılarda genlerde oluşan ekspresyon değişimlerini karşılaştırma amacıyla da yapılan ölçümlerdir (Suter *et al.* 2004).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Khan (1977)'ın yaptığı çalışmalara göre su ortamında bulunan pestisitlerin davranışı pestisitlerin kararlılığına ve çözünürlüğüne bağlıdır. Genel olarak daha kararlı olan pestisitler su yaşamında daha etkili olmaktadır. Su ekosistemine giren pestisitler su flora ve faunasını olumsuz olarak etkilemektedir. Eser miktarda dahi olsa suda pestisit kalıntılarının bulunması sucul organizmaların beslenmesinde önemli yeri olan fitoplankton ve zooplanktonların gelişmeleri durmaktadır.

Miles and Harris (1971) yaptığı çalışmalarda su ekosisteminde istenmeyen bazı böceklerle veya akvatik bitkilere karşı ilaçların doğrudan suya uygulanması, ilaçlanmış bu bitkilerden toprağa, oradan yer altı sularına, dolayısıyla su ekosisteminde karışmış olması veya ilaç ile bulaşmış olan atmosferdeki partiküllerin yağmur suları ile taşınmasıyla suların ilaçla bulaşmış olacağının görülme ihtimalini belirtmişlerdir.

Glyphosate Facts (1993)'e göre yapılan çalışmalar, glifosatın memeli organizmalar üzerinde farklı etkilere neden olduğunu göstermektedir. Gebe olan sıçanlar ve sıçan fetüsleri ile yapılan toksisite deneylerinde, uygulama yapılan hayvanların vücut ağırlığında eksilme, burun akıntısı, diyare, yavru böbreklerinde ve sindirim sisteminde bozukluklar veya gebe bireylerde ölümler tespit edilmiştir.

Glifosat içeren herbisitlerle çalışmalar yapan Cox (1996) ise glifosatın hedef olmayan bitki organizmalarında akut toksisiteye sebep olduğunu göstermiştir. Sucul bitkiler ve alglerde bu gruba dâhildir. Glifosata maruziyeti, kuşların, yer solucanlarının, bal arıları gibi yararlı böceklerin, bazı küçük memelilerin ve balıkların da içinde olduğu hayvansal organizmaları zararlı yönde etkilediği gösterilmiştir.

Kolpin *et al.* (2006), glifosat bazlı herbisitlerin, sucul organizmalara karşı glifosatın saf halinden daha toksik olduğunu çalışmalarında göstermiştir. Mitchell *et al.* (1987) ise,

balıklardaki toksik etkilerinin balık türlerine göre değişmesine rağmen Roundup®'ın glifosata göre 30 kat fazla toksik olduğunu göstermişlerdir.

Peixoto (2005)'da yaptığı çalışmasında sağlıklı 80-100 g.'lık *Cyprinus carpio*'ları kullanmıştır. Bu balıklar 205 ve 410 mg glifosat/L olmak üzere 2 ayrı Roundup® dozuna maruz bırakılmıştır. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde Roundup® uygulanan balıklarda mitokondrionlarda büyüme ile mitokondrion iç zarının görünmez hale gelmesi ve hepatositlerde miyelin benzeri yapılara rastlamıştır. Bu sonuçlara dayanarak bu balık türünde iki dozun da toksik olduğu gösterilmiştir.

Beuret *et al.* (2005) gebe sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda gebeliğin ilk gününden 21. gününe kadar glifosat uygulanmasının (0,4 mL glifosat/20mL su) karaciğer ağırlığında ve hayvan ağırlığında azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir. Fetüs vücut ve karaciğer ağırlığında ise önemli farklılıklar bulunmamıştır.

Soso *et al.* (2007) dişi bir balık olan *Jundia*'lar ile yaptıkları çalışmada, canlılara glifosat içerikli kimyasal madde uygulanmış ve karaciğer somatik indekslerinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında uygulama gruplarında artış kaydedilmiştir. Yapılan bu çalışmaya göre glifosat içeren herbisitlerin karaciğer metabolizmasında etkili olduğu ve protein ve glikoz sentezi gibi diğer metabolik yolları da etkilediği rapor edilmiştir.

Sinhorin *et al.* (2014) *Pseudoplatystoma* spp. türü balıklara 4.5 ve 7.5 mg/L glifosatın 96 saat uygulanması sonucunda, balıkların dokularında lipid peroksidasyonu görüldüğünü belirtmişlerdir.

İnsan sağlığına herhangi bir zararının olmadığı üretici raporları ile belirtilmiş olsa bile; Sivikova *et al.* (2006) yaptıkları çalışmalarda glifosat ürünleri ile uğraşan kişilerde baş ağrısı, mide bulantısı, göz ve deri tahrişi, kalp basıncında artma gibi farklı klinik belirtiler belirlemişlerdir. Kolpin *et al.* (2006) da çalışmaları ile glifosat uygulanmasından az bir süre sonra çiftçilerin idrarlarında glifosat kalıntılarına rastlamışlardır. Glifosat içerikli herbisitlerin kullanımının bazı tarım işçilerinde üreme

ile ilgili problemlere sebep olduğu ve bazı enzimlerin de aktiviteleri üzerine etki ettiği rapor edilmiştir (Savitz *et al.* 1997; Williams *et al.* 2000; Daruich *et al.* 2001; Acquavella *et al.* 2004).

Favari *et al.* (2002) yaptıkları çalışmalarla, su ekosisteminde, zooplankton, fitoplankton ve balıklarda karbamat ve organofosforlu pestisit birikimiyle karşılaşmışlardır. Pestisitler suya oranla zooplanktonda 10-25 kat, alglerde 2-10 kat ve balıklarda 8-140 kat birikim göstermiştir. Pestisitlerin etkisiyle çevresel strese yanıt olarak balıklarda glutatyon ve lipid peroksidasyonu artmış fakat asetilkolinesteraz aktivitesi azalmıştır. Araştırmacılar bu kirleticilerin insan ve balıklardaki birikiminin tehdit olarak algılandığını belirtmişlerdir.

Herbisitler, bütün canlı organizmaları kalıcılık ve toksisite özelliğine göre etkilemektedir. Doğal olarak bu etkileşim sisteminde insan en hassas hedef durumundadır. Herbisitlerin vücuda solunum, deri veya sindirim yolları aracılığıyla alınması insanlarda zehirlenmelere yol açmaktadır. Delen *et al.* (2005) yaptıkları çalışmalarla herbisit kalıntılarının gıdalar aracılığıyla vücuda alınması ile oluşan kronik zehirlenme sonucu kanser, akciğer hastalıkları, beyinde hasar, böbrek ve karaciğerde nefroz oluşumu gözlemlemişlerdir. Mutajen (genetik bozukluklar), teratojen (bebekte deformasyon) ve alerjen olarak etkileyen herbisit eşitleri de vardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma yeri

Araştırma, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Akvaryum Balıkları Uygulama ve Araştırma Merkezi deneme ünitesinde yapılmıştır.

3.1.2. Deneme ortamı ve kullanılan malzemeler

Kimyasal maddemiz steril olan 100 mL lik cam beher kapların içinde uygulanmıştır. Bu beherlerde her grup için 20 adet yumurta bulunmaktadır ve beherler 28.5°C sıcaklığındaki su banyosuna koyularak deneme boyunca yumurtalar için optimum sıcaklığın korunması amaçlanmıştır. Denememiz için kullanılan karanlık odada 14 saat gece 10 saat gündüz olacak şekilde ayarlanmış fotoperiyot uygulaması yapılmıştır.



Şekil 3.1. Zebra balığı tankları

3.1.3. Balık materyali

Çalışmamızda, başta toksikoloji çalışmaları olmak üzere birçok çalışmada sıkça tercih edilen bir model organizma olan AB genotipli zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları kullanıldı. Zebra balıklarının çalışmalarda kullanılma avantajları vardır. En önemlileri, beslenme ve büyüme araştırmalarında model organizma olarak rahat kullanılabilmesi, son yirmi yılda insan hastalıklarını modelleme ve omurgalı gelişiminde kullanılması da yaygınlaşmıştır.

Zebra balığı Cyprinidae ailesine ait bir tür olup, baskın olarak Pakistan ve Hindistan'da bulunurlar fakat anavatanları Güneydoğu Asyadır. Bu çalışmada, Oregon Üniversitesi (ABD) Uluslararası Zebra Balığı Kaynak Merkezi'nden elde edilmiş AB genotipli zebra balıkları embriyolarında gerçekleştirilmiştir.

Genel olarak özellikleri;

- ✓ Zebra balıkları ismini vücudunun yanlarında bulunan yatay, tek tip ve kuyruk yüzgecinin sonuna dek uzanan 5 tane mavi çizgiden alır. Mavi çizgilerin arası erkek balıklarda altın rengi çizgiler ile doludur, dişilerde ise altın çizgiler yerine gümüş çizgiler bulunur ve erkeklerdeki çizgilere göre daha iridir.
- ✓ Genel olarak 4 cm'ye kadar büyüyebilirler ama 6,4 cm'ye kadar büyüyen zebra balıkları da mevcuttur,
- ✓ Ortalama hayatta kalma süreleri 2-3 yıldır, fakat ideal koşullarda 5 yıla kadar yaşayabilirler (Spence et al. 2008).
- ✓ Dişi bireyleri anal yüzgeçleri erkek bireylere göre daha küçüktür,
- ✓ Dişi bireylerin karın bölgesi erkek bireylere göre daha şişkince bir yapıdadır,
- ✓ Hayat döngüsü 72 saat gibi kısa bir süredir (yumurtadan çıkma süresi) (Din 2002).
- ✓ Üreme periyodu yaklaşık 3-4 ay sürer. Dişiler 2-3 gün aralık
- ✓ Zebra balığının üreme periyodu yaklaşık 3-4 aydır. Dişiler 2-3 gün aralıklı olarak yumurtlama yeteneğine sahiptirler. Tabiki ovulasyonun olması ve yumurtlamanın

meydana gelmesi için aynı ortamda bir erkek bulunmalıdır. Oran olarak genelde tanklara 1 dişiye 2 erkek olacak şekilde ergin bireyler bırakılır.

- ✓ Döllenmiş yumurta anında şeffaflaşır ve hızlı bir gelişim gözlenir.
- ✓ Embriyoların gelişmesi için ideal sıcaklık 28,5°C'dir.
- ✓ Döllenmenin 36.saatinde tüm organlar taslak olarak görünmeye başlar,
- ✓ Embriyonun iç koşulları ve dış sıcaklığa bağlı olarak yumurta, döllenmeden 48-72 saat sonra çıkar ve bu aşamada 3,5 mm boyundadır.
- ✓ Döllenmeden 30 gün sonra yaklaşık olarak 1 cm uzunluğuna erişen balıklarda ergin bir balığın sahip olacağı yüzgeçler şekillenir
- ✓ 90 günlük olan ergin bir birey yaklaşık 2 cm boyundadır ve üreme fonksiyonlarına sahiptir (Westerfield 1995; Spence *et al.* 2008)



Şekil 3.2. Dişi (♀)ve erkek (♂) zebra balığı (*Danio rerio*)

3.1.4. Uygulanan kimyasal

Yapılan denememizde glifosat kaynağı olarak 480 g/L konsantrasyona sahip ve glifosat isopropilamin tuzu içeren, ticari adı Roundup olan herbisit kullanılmıştır.

Glifosat'ın moleküler yapısı ve özellikleri;

1. $C_3H_8NO_5P$ ($HO-COH_2NHCH_2P=O(OH)_2$) formülüne sahip,
2. Renksiz katı kristaller formundadır.
3. Görünümü: Kehribar renkli, berrak ve yapışkandır.
4. Molekül ağırlığı: 169,08 Dalton
5. Erime noktası: $200^{\circ}C$ 'dir (Madsen *et al.* 1978; Knuuttila and Knuuttila 1979).

3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler

I. Tris HCl Tamponu;

- ✓ 25mM Tris
- ✓ 0,1 Na_2SO_4

II. Veronal Tamponu;

- ✓ 0,025 M Sodyum barbatil ($C_8H_{12}N_2O_3$)

III. E3 Medium Çözeltisi;

- ✓ 5mM NaCl
- ✓ 0,17 mM KCl
- ✓ 0,33 mM $CaCl_2$
- ✓ 0,33 mM $MgSO_4$
- ✓ %0,01 Metilen Mavisi

3.1.5.a. RNA izolasyonu için kullanılan kimyasallar

- 1- Kloroform
- 2- Trizol
- 3- %70'lik etanol

4- İzopropilalkol

5-MOPS (3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid) solüsyonu

20x MOPS (500 mL) hazırlanışı;

6.8 g sodium acetate (mw 136,08)

41.9 gr MOPS

2.6 g EDTA (mw 372,24)

400 mL DEPC H₂O erlen içerisine konulmuş ve daha sonra pH NaOH ile 7,0'ye ayarlanmıştır. DEPC'li su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

6- DEPC (Diethylpyrocarbonate) su

7- Formamid

8- Agaroz

9- ddH₂O

10- Etidium bromür

3.1.5.b. Super scriptTM III reverse transcriptase ile cDNA oluşturulması için gerekli kimyasallar

1- dNTP Mix (pH=7,0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP her birinden 10 mM)

2- Oligo dT20

3- ddH₂O

4- DTT

5- 5x First- Strand Solüsyon

6- RNaseOUTTM

7- SuperScriptTM III RT

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme planı ve kimyasalın uygulanması

Deneme çalışmamız tam şansa bağlı basit deneme planına göre, dört tekrarlı olarak ortamı yenilenen toksikoloji deneyleri esasına göre tasarlanmıştır. Deneylerde biri kontrol, dördü muamele olmak üzere toplamda 5 grup bulunmaktadır. Bu muamele gruplarına 1, 5, 10 ve 100 mg/L konsantrasyonlarında glifosat uygulanmıştır. Denemenin birinci gününde alınan yumurtalardan 20 tanesi rastgele olarak seçilmiş ve bu yumurtalar içine 30 mL E3 solüsyonu bulunan beherlere alınmıştır. Döllenmeyi izleyen ilk 4 saat boyunca yumurtalar sürekli olarak izlenmiş ve döllenmeyen yumurtalar alınarak yerlerine döllenmiş yumurtalar ilave edilmiştir. Denememize 20 embriyo ile başladık. 4. saatin sonunda muamele ve kontrol grupları, verilen konsantrasyonlarda E3 ortamı ile hazırlanan kaplara koyularak sıcaklık 28,5°C'ye ayarlı olan su banyosuna yerleştirilmiştir. Bu deneme ortamlarının tümü hergün yenilenmiştir.

3.2.2. Balıklardan doku örneklerinin alınması ve RNA izolasyonu

Deneme başlangıcından itibaren 96. saatin sonunda her gruptan 5 adet larva uygun miktarda Tris-HCl tamponunun içinde homojenizatör (Qiagene marka Tissue Laser model) yardımı aracılığıyla homojenize edilmiştir.

Total RNA izolasyonu, protokolde belirtilen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Total RNA konsantrasyonları ve varlığı, elektroforez ve spektrofotometrik ölçümler kullanılarak gösterilmiştir.

- 1- Her 4 mL Trizol'e 400-750 mg doku örneği alınmış ve örnek Trizol içerisinde homojenize edilmiştir.
- 2- Homojenizasyon işleminin ardından 4°C'de 10 dk 11000 devirde santrifüj işlemi yapılmış ve supernatant kısmı alınmıştır.

- 3- 800 µl kloroform eklenen tüplerin ağızları güvenli bir şekilde kapatılmıştır. 15 sn el ile oldukça güçlü bir şekilde çalkalanarak oda sıcaklığında bu tüpler 2-3 dk inkübe edilmiştir.
- 4- İnkübe edilen örnekler daha sonra 4°C'de 15 dakika 11.000 rpm'de santrifüjlenerek süpernatant kısmı alınmıştır.
- 5- Bu örnekler 2 mL izopropilalkol katılarak oda sıcaklığında 5-10 dakika boyunca inkübasyon için bırakılmıştır.
- 6- Elde edilen örnekler 4°C'de 11.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek üst faz tam olarak uzaklaştırılmıştır.
- 7- Geriye kalan alt faza %70'lik 4 mL etanol ilave edilerek hafif bir şekilde vorteks yapılmıştır. Ardından 4°C, 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
- 8- Son olarak etanol uzaklaştırılmış ve tüpler iyice kurumaları için kurutma kağıdına ters çevrilmiştir. Örnekler 40 µl DEPC su eklenerek -80°C'de depolanmıştır (Erdoğan vd 2008).

3.2.3. Total RNA'nın kantitatif tayini

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometre aracılığıyla 2 tekrarlı şekilde ölçülmüştür. Elde edilen bu değerlerin ortalaması alınmış ve seyrelme faktörü ile çarpılarak RNA yoğunluğu hesaplanmıştır. RNA dilüsyonu 1/50 olacak biçimde hazırlanan örnekler 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrik yöntemle ölçülerek absorbans değerleri belirlendikten sonra yoğunluk değerleri ölçülmüştür. RNA'nın yapısında yer alan ve hücrelerdeki genetik bilgilerin kodlanmasında oldukça önemli rol oynayan pürin ile pürimidin bazıları 260/280 nm dalga boyunda absorbe olduğu için biz de bu dalga boylarında ölçüm gerçekleştirdik.

3.2.4. Super scriptTM III reverse transcriptase ile cDNA oluşturulması

Total RNA'nın izolasyonundan sonra RNA'nın tek zincirli formdan çift zincirli forma dönüştürülmesi gerekir ve bu yapıya komplementer DNA (cDNA) adı verilir. Elde edilen bu verilerin bir canlı organizmasının yaklaşık olarak bütün gen yapısını ihtiva

eden bir kütüphaneye çevrilmesi işlemine ise cDNA kütüphanesi oluşturma denmektedir. Elde edilen total RNA'lardan reverse transkriptaz enzimi aracılığıyla cDNA kütüphanesi oluşturuldu ve çalışılncaya kadar örnekler -20°C 'de saklandı.

cDNA kütüphanesi oluşturma yöntemi şu şekildedir;

1. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne; 1 μL 50 μM Oligo dT20

- a) 10 pg-5 μg total RNA veya 10 pg-500 ng mRNA
- b) 1 μL 10 mM dNTP Mix (pH=7.0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM)
- c) 13 μL 'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.

2. Karışım 65°C 'de 5 dakika kadar ısıtılıp buz üzerinde en az 1 dakika inkübe edilmiştir.

3. Karışım kısa süreli santrifüjlenip üzerine şu kimyasallar eklenmiştir;

4 μL 5xFirst-Strand Buffer, 1 μL 0.1 M DTT, 1 μL RNaseOUTTM Recombinant RNase Inhibitor.

4. Karışım hafif bir pipetleme ile karıştırılmıştır.

5. Karışım 50°C 'de 45 dakika inkübe edilmiş ve gene spesifik primer için reaksiyonsıcaklığı 55°C kadar arttırılmıştır.

6. Karışım 70°C 'de 15 dakika ısıtılarak reaksiyon durdurulmuştur (Erdoğan vd 2008).

3.2.5. Primer dizaynının yapılması

İnternette bulunan gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zebra balığındaki GPx ve SOD genlerine ait mRNA baz dizilimlerini kullanarak internet ortamında bulunan başka bir primer dizayn programında (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/) elimizdeki genlerin maksimum 250 bp'lik bölümüne spesifik problemler ve primerler oluşturulmuştur. Primerlerden daha uzun olan TaqMan problemleri bir oligonükleotiddir (Tm dereceleri

10°C daha fazla ve 20-30 baz uzunluğundadırlar). TaqMan probolar genel olarak 3' ucunda quencher (baskılayıcı; çoğunlukla TAMRA) ve 5' ucunda flouresan işaretleyici kullanılır. Uyarılan bu flouresan işaretleyicinin enerji aktarımı, yakınında bulunan quencher işaretleyicisinden daha fazla olduğu zaman ışınım oluşur (FRET=Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Çizelge 3.1. GPx ve SOD primer-prob bilgileri

Genler	Primer dizilimi (5' → 3')	Gen bankası erişim numarası
GPx Forward	ACCAGCGGCTTCTACGTG	NM_001007281.2
GPx Reverse	TGCACAGTCGGTCTATATCAAAC	
GPx Prob	^{FAM} -AACCGTCCACTGCACATCACATGC- ^{TAMRA}	
SOD Forward	TCTAATGGAAGAGCCGGTTG	NM_131294.1
SOD Reverse	AACAAATAAAAGGTTGCCACACA	
SOD Prob	^{FAM} -ATGCCTCTGAAAGCACTTAGCCCGC- ^{TAMRA}	

3.2.6. Multipleks Real-Time PCR

Daha az bir zamanda daha fazla hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirebildiğinden Multiplex PCR kullanışlı bir inceleme metodudur. Bu avantajına rağmen önemli ölçüde optimizasyon gerektirir. Farklı hedeflerin aynı reaksiyon koşullarında amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanılacak primerler dikkatli seçilmeli, birbirleri ile dimerizasyon oluşturmamaları, bağlanma sıcaklıklarının birbirlerine uygun olması gibi önemli şartları sağlamaları gerekir. Doku hücrelerinden elde edilen RNA'nın revers transkripsiyonu sonrası oluşturulan cDNA'lar üzerindeki istenilen alanlar Real-Time PCR ile çoğaltılır (Anonim 2016).

Çizelge 3.2. Real-Time PCR karışımında kullanılan kimyasallar ve miktarları

Bileşenler	Final Konsantrasyonu	Miktar (µL)
FastStart TaqMan® Probe Master	—	25
Hydrolysis Probe	5 µM	1
cDNA	—	10
Forward Primer	10 pmol	2
Reverse Primer	10 pmol	2
ddH ₂ O (Steril)	—	10
Toplam Hacim	—	50

Çizelge 3.2. Real-time PCR programı

Döngü	Döngü süresi	Sıcaklık
1	2 dakika	50°C
1	10 dakika	95°C
45	15 dakika	95°C
1	1 dakika	60°C

Real time PCR’da Livak matematiksel modeli göreceli (karşılaştırmalı) ölçüm için kullanılmıştır (Livak and Schmittgen 2001).

$$HEDEF\ GEN\ ORANI = \frac{(E_{hedef\ gen})^{\Delta CT\ hedef\ (kontrol-örnek)}}{(E_{referans\ gen})^{\Delta CT\ referans\ (kontrol-referans)}}$$

Hedef gen oranı: Relatif ekspresyon seviyesi ($\Delta\Delta C_T$ değeri)

E_{hedef gen}: Hedef geni çoğaltan primer etkinlik oranı

E_{referans gen}: Referans (housekeeping) geni çoğaltan primer etkinlik oranı

E değerleri kendi değerlerinin slope değerleri ile ilişkilidir ve $E=10^{-1/slope}$ şeklindedir.

ΔCT : PCR reaksiyonu sırasında ürünün miktar olarak anlamlı bir şekilde artışının gerçekleştiği C_T değeridir.

$\Delta CT_{\text{hedef (kontrol-örnek)}}$: Hedef genin ortalama C_T değeridir (kontrol grubu hedef genin C_T değeri- uygulamaya ait hedef genin C_T değeri).

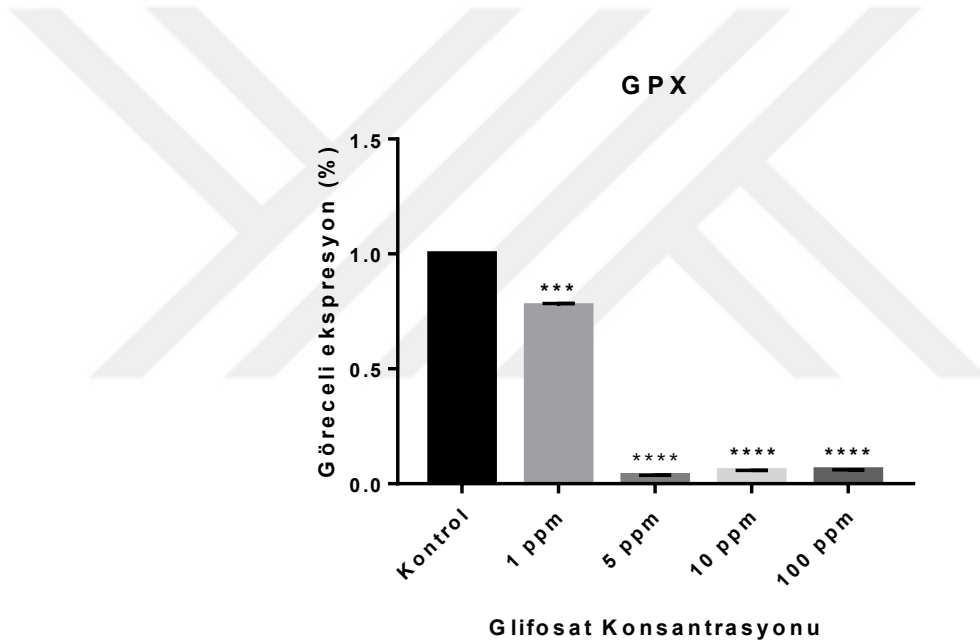
$\Delta CT_{\text{referans (kontrol-örnek)}}$: Referans genin ortalama C_T değeridir (kontrol grubu referans genin C_T değeri- uygulamaya ait referans genin C_T değeri).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Gen Ekspresyonu Sonuçları

Glifosat herbisitinin farklı dozlarına maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında GPx gen ekspresyonu istatistiksel olarak 1ppm, 5ppm, 10ppm ve 100ppm uygulama gruplarında kontrole göre mRNA seviyesi 5, 10 ve 100 ppm de daha anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. Zebra balığı embriyosunda GPx gen ekspresyon Tukey's Multiple Comparison test analizi sonuçları

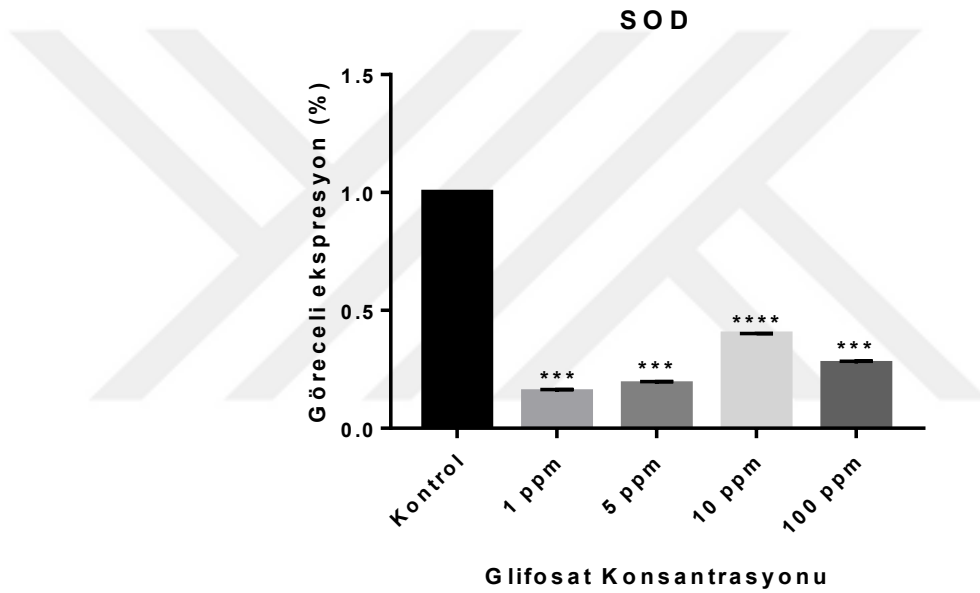
p<0,05=, p<0,01=**, p<0,001=***, p<0.0001=****

Zebra balığı embriyosunda GPx gen ekspresyonu seviyeleri yıldız ile gösterilmiştir. Bu değerler Tukey's Multiple Comparison Test analizi sonucu elde edilen verileri göstermektedir. Önemlilik derecesi yıldız sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır (1 ile 4 arasında).

Glifosatın farklı dozlarına maruz kalmış zebra balığı embriyolarında GPx mRNA seviyesi arasında istatistiksel farklılıklar bulunmuştur. Kontrol ile karşılaştırılmalarında

1ppm, $p<0,001=***$, 5ppm, 10ppm ve 100 ppm kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0,0001=****$ bulunanlar anlamlı kabul edilmiştir.

Glifosat herbisitinin farklı dozlarına maruz kalan zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında SOD gen ekspresyonu istatistiksel olarak 1ppm, 5ppm, 10ppm ve 100ppm uygulama gruplarında kontrole göre mRNA seviyesi 5, 10 ve 100 ppm de daha anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.2. Zebra balığı embriyosunda SOD gen ekspresyonu Tukey's Multiple Comparison Test analizi sonuçları

* $p<0,05=*$, $p<0,01=**$, $p<0,001=***$, $p<0,0001=****$

Zebra balığı SOD gen ekspresyonunun kontrole göre karşılaştırmalarında Tukey's Multiple Comparison Test analizi sonucu elde edilen $p<0,001=***$ ve $p<0,0001=****$ değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Zebra balığı embriyosunda SOD gen ekspresyonu seviyeleri yıldız ile gösterilmiştir. Bu değerler Tukey's Multiple Comparison Test analizi sonucu elde edilen verileri göstermektedir. Önemlilik derecesi yıldız sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır (1 ile 4 arasında).

Glifosatın farklı dozlarına maruz kalmış zebra balığı embriyolarında SOD mRNA seviyesi arasında istatistiksel farklılıklar bulunmuştur. Kontrol ile karşılaştırılmalarında 1ppm, 5ppm ve 100 ppm $p < 0,001 = ***$, 10ppm kontrol ile karşılaştırıldığında $p < 0,0001 = ****$ şeklindeki sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 4.1. Glifosat muamelesi sonucu elde edilen nispi Gpx ve Sod mRNA ekspresyon seviyelerine ait istatistiki sonuçlar.

Gen	Kontrol	1 ppm	5 ppm	10 ppm	100 ppm
Gpx	1,000 $\pm$ 0.0	0,2 $\pm$ 0,0058	0,97 $\pm$ 0,00058	0,9 $\pm$ 0,00058	0,9 $\pm$ 0,00058
Sod	1,000 $\pm$ 0.0	0,8 $\pm$ 0,0058	0,8 $\pm$ 0,0058	0,6 $\pm$ 0,0016	0,7 $\pm$ 0,0058

Gösterilen veriler SEM (Standard Error of the Difference Between the Means of Two Samples) değerleridir. İstatistiki önem dereceleri $p > 0.05$ (önemli değil, ns), $*p < 0.05$ (önemli), $**p < 0.01$ (çok önemli), $***p < 0.001$ (aşırı önemli) şeklindedir.

Çizelge 4.2. Glifosat muamelesi sonucu elde edilen nispi GPx mRNA ekspresyon seviyelerine ait çoklu karşılaştırmanın istatistiki sonuçları

Gruplar arası	Güven Aralığı*	Önemlilik	Derecesi	P değeri
Kontrol - 1 ppm	0,1807 - 0,2695	Var	***	0,0005
Kontrol - 5 ppm	0,9595 - 0,9684	Var	****	<0,0001
Kontrol - 10 ppm	0,9387 - 0,9476	Var	****	<0,0001
Kontrol - 100 ppm	0,9354 - 0,9443	Var	****	<0,0001
1 ppm - 5 ppm	0,6988 - 0,7788	Var	****	<0,0001
1 ppm - 10 ppm	0,678 - 0,758	Var	****	<0,0001
1 ppm - 100 ppm	0,6748 - 0,7547	Var	****	<0,0001
5 ppm - 10 ppm	-	-	-	
5 ppm - 100 ppm	-	-	-	
10 ppm - 100 ppm	-0,003255 - -0,003255	Var	****	<0,0001

Çizelge 4.3. Glifosat muamelesi sonucu elde edilen nispi SOD mRNA ekspresyon seviyelerine ait çoklu karşılaştırmanın istatistikî sonuçları

Grup	Güven Aralığı*	Önemlilik	Derecesi	P değeri
Kontrol - 1 ppm	0,8013 - 0,8902	Var	****	<0,0001
Kontrol - 5 ppm	0,7674 - 0,8562	Var	****	<0,0001
Kontrol - 10 ppm	0,5893 - 0,6128	Var	****	<0,0001
Kontrol - 100 ppm	0,6816 - 0,7705	Var	****	<0,0001
1 ppm - 5 ppm	-0,03396 - -0,03396	Var	****	<0,0001
1 ppm - 10 ppm	-0,2782 - -0,2111	Var	****	<0,0001
1 ppm - 100 ppm	-	-	-	-
5 ppm - 10 ppm	-0,2443 - -0,1772	Var	****	<0,0001
5 ppm - 100 ppm	-0,08574 - -0,08574	Var	****	<0,0001
10 ppm - 100 ppm	0,09145 - 0,1585	Var	**	0,0030

Çizelge 4.2'ye göre glifosatın farklı dozlarına maruz kalmış zebra balığı embriyolarında GPx mRNA seviyeleri arasında istatistiksel farklılıklar bulunmuştur. Bu çizelgede muameleler hem kontrol ile hem de kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalara göre ise kontrol ile tüm muamale grupları arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür ($p < 0,001 = ****$ ve $p < 0,0001 = ****$).

Çizelge 4.3'e göre glifosatın farklı dozlarına maruz kalmış zebra balığı embriyolarında SOD mRNA seviyeleri arasında istatistiksel farklılıklar bulunmuştur. Bu farklılıklara göre kontrol ile muameleler ayrı ayrı karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p < 0,0001 = ****$). Kontrol grupları ise kendi aralarında karşılaştırıldığında 10ppm-100ppm karşılaştırması hariç genel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p < 0,0001 = ****$)

Çizelge 4.1 ile Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'den yola çıkarak genel manada sonuçlarımızın tüm dozlar için anlamlı olduğu sonucuna varabiliriz.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ceyhun vd (2015), karaciğer doku hasarını tespit etmek için gökkuşağı alabalıklarını 2.5, 5 ve 10 mg/L glifosat miktarına maruz bırakmışlardır. Pestisit uygulamasını takiben her bir örnek için 10 balık 6, 12, 24, 48 ve 96 saat kısa süreli ve 21 günde uzun süreli olmak üzere çalışılmıştır. Kısa süreli çalışmaya 2.5, 5 ve 10 mg/L glifosat dozları uygulanırken uzun süreli çalışmaya 2.5 ve 5 mg/L dozlarında glifosat uygulanmıştır. Uzun süreli uygulamada 5 mg/L glifosat uygulanmasından sonra GPx aktivitesi hariç diğer enzimlerin aktivitesinin kontrol grubu ile aynı seviyede kaldığı gözlenmiştir. Bu enzimlerin gen ekspresyon seviyelerinin birbirleriyle kıyaslanamayacağı sonucuna varılmıştır. Deneylere her bir akvaryumda 60 balık ile başlanmış, pestisit uygulamasından sonra her bir akvaryumdan rastgele 10 balık seçilmiştir.

Enzim aktivite sonuçlarına göre GPx aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında 2.5 mg/L glifosat uygulanmasının 12.saatinde GPx aktivitesinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Bu artışın benzeri CAT aktivitesinde de görülmüş fakat SOD aktivitesinde aynı durum gözlenmemiştir. SOD aktivitesinin sadece 2.5 ve 5 mg/L glifosat uygulamasının 6. saatinde önemli artış gösterdiği gözlenmiştir. Enzim aktivitesi ve gen ekspresyonu düzeyinde bakılan bu çalışmada her iki sonucun birbiriyle çeliştiği gözlenmiştir. Örneğin enzim olarak CAT ve GPx'e bakıldığında, 10 mg/L glifosat uygulamasından sonra 24. ve 48. saatler ile karşılaştırılan 96.saatde gen ekspresyon seviyesinde önemli bir artış gözlenmiştir, fakat enzim aktivitesinde benzer sonuç görülmemiştir.

Tersi olarak, enzim aktivite seviyesinde yükselme gözlenirken gen ekspresyon seviyesinde düşüş gözlenen durumlar tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar dikkate alındığında glifosatın antioksidan sistem üzerinde bozucu veya engelleyici etkilere sebep olduğu görülmektedir.

Daruich *et al.* (2001) da belirttiği gibi organofosfat yapılı olan glifosat herbisiti, glisin ve fosfonometil içerikli zayıf bir organik asittir. Farklı alanlar da dahil olmak üzere özellikle tarımsal alanda yabancı otlara karşı kullanım olarak yaygın bir alana sahip olan herbisittir.

Glifosatların etki mekanizmaları hakkında kısıtlı sayıda literatür olmasından dolayı farklı organofosfat veya herbisit türleri ile de karşılaştırma yaparak sonuçlarımızı yorumlamaya çalıştık.

Rastogi *et al.* (2001) ile *et al.* (2007) yaptıkları çalışmalarda organofosfatlar aracılığıyla indüklenen toksikolojik etkilerin antioksidan dengenin bozulması ve reaktif oksijen türlerinin artması ile alakalı olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. $\frac{1}{4}$ LD₅₀ tek doz chlorpyrifos-ethyl (intektisit) uygulanan sıçanlarda çalışmalar yapılmış ve eritrositlerde SOD aktivitesinin değişmediği, GSH-Px aktivitesinin ise önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. GSH-Px aktivitesinin böbreklerde ise aktivitesinin değişmediği, SOD aktivitesinin ise önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ile çalışmamız karşılaştırıldığında benzer şekilde konsantrasyon değişikliği olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara bakarak glifosatın SOD ve GPx ekspresyonlarını inhibe edici özelliği olduğu söylenebilir.

Abarikwu *et al.* (2009) yaptıkları çalışmada 20 adet wistar sıçanına 7-16 gün boyunca atrazine herbisiti uygulamışlar ve bu herbisitin testis dokusundaki sperm kalitesi ile oksidatif strese etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda testis dokusunda SOD ve GPx seviyelerinin belirli bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki benzer sonuçlardan da yola çıkarak bazı herbisit türlerinin oksidatif stresi artırarak doku hasarına yol açtığı söylenebilir.

Jiang and Yang (2009) buğdaya uyguladıkları prometryn herbisitinin GPx aktivitesini kök ve yapraklarda, yüksek konsantrasyonlarda azaltmasına rağmen düşük konsantrasyonlarda arttırdığını gözlemlemişlerdir. Uygulanan model organizmanın bitki kökenli olmasından dolayı böyle bir farklılık görüldüğü söylenebilir. Fakat bu farklılığa

rağmen GPx aktivitesindeki azalmanın bitki hasarının göstergesi olduğu, aktivite artışının ise stresin sebebi olduğu şeklinde bir yorum yapılabilir.

Atmaca (2010) yapmış olduğu çalışmada, trifluralin herbisitine maruz bırakılan sıçanların karaciğerlerinde SOD ve GPx aktivitelerine bakılmıştır. Çalışmanın sonucunda karaciğer dokusunda SOD ve GPx aktivitesinin anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Çalışmamızla benzer sonuçları içeren bu çalışmadan da yola çıkarak herbisit türlerinin dokulardaki antioksidan savunma mekanizmasını bozduğu söylenebilir.

Berntssen *et al.* (2000) somon alabalığı (*Salmo salar L.*) ile yaptıkları çalışmada yüksek düzeyde toksik bir metal olan kadmiyum ve besinsel bakır uygulanmıştır. Uygulanma sonrasında GPH-Px (glutasyon peroksidaz) aktivitesi ölçülmüştür. Yapılan denemeler sonucunda antioksidan savunma sistemini hasara uğratan kadmiyumun GSH-Px enzim aktivitesini azalttığı rapor edilmiştir. Toksisite açısından sonuçlara bakıldığında glifosatın ile kadmiyumun antioksidan sistem üzerine benzer etkiler yaptığı söylenebilir.

Heise *et al.* (2006) *Zoarcetes viviparus* türü balıkları 1-5°C sıcaklıklarda strese maruz bırakarak 12°C sıcaklıkta bulunan balıklara oranla oksidatif stres oranlarındaki değişimi incelemişlerdir. Yüksek sıcaklık stresi (18, 22, 26°C) uygulanan aynı balıkların oksidatif hasar değerlerindeki artışın SOD enzimindeki aktivite azalması ile beraber gerçekleştiği kaydedilmiştir.

Gerek yaptığımız literatür araştırmaları, gerek elde ettiğimiz deney sonuçları ve tartışma kısmında kıyasladığımız çalışmalar olsun hepsinde glifosatın organizmalar üzerindeki toksik etkileri gözlenmiştir. Antioksidan savunma sistemine yapmış olduğu baskılama bunun örneklerinden biridir. Model organizmalar üzerinde yapılan deneylerde vücut morfolojilerini etkilediği de görülen diğer sonuçlardandır.

Söz konusu pestisitın yaygın kullanılması, araştırmalar sonucu elde edilen bulgular, suda kolaylıkla çözünebilmesi ve uygulanan düşük dozlılık göz önüne alındığı zaman şu sonuçlara ulaşabiliriz;

- I- Özellikle anne adayları olan hamilelerin sakınması gereken bir üründür,
- II- İlaçlama yapılırken su kaynaklarına bu maddenin bulaşması engellenmelidir,
- III- Tarım alanlarında kontrollü olarak glifosat uygulanması yapılmalıdır,
- IV- İlaçlama işlemlerinin havadan ziyade yakın mesafeli olarak hedef organizmaya yapılmasına dikkat edilmelidir,
- V- Bu herbisitın insanların sofralarına kadar taşınmasını önlemek için tarımsal ürünlerin pazara ulaşmasından önce gerekli tedbirler alınmalıdır,
- VI- Rüzgarlı havalarda taşınma ihtimalinin yüksek olacağı düşünülerek atmosfer koşulları dikkate alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Acquavella J.F, Bruce, H., Alexander, B.H., Mandel, J.S., Gustin, C., Baker, B., 2004. Glifosat biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. *Environ Health Perspect* 112, 321–326.
- Adam, A., Marzuki, A., Rahman, H.A., Aziz, M.A., 1997. The oral and intratracheal toxicities of Roundup and its components to rats. *Veterinary Human Toxicology* 39 (3), 147-151.
- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Method Enzymol*, 105: 121-126.
- Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. 1986. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest* .77; 319-321
- Akkuş, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Basım, Yayın ve Dağıtım A.Ş.,Konya.
- Ambrosia, G., Santora, G., Tritto, I. 1992. Effects of is Chemia and Reperfusion on Cardiac Tolerance to Oxidative Stress, *Am J., Physiol* 262, 23-30.
- Amdur MO, Doull J and Klassen CD, 1991. Casarett and Doull's Toxikology: The basic science of poisons, Pergamon Pres, New York 1033, 563-623.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K, Hagen, T.M., 1993. Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging, *Proc Natl Acad Sci*, 90:7915-7922.
- Anonim, 2016. Multiplex PCR. <http://www.iontek.com.tr>. (28.04.2016).
- Anonyoous, 2016. http://www.monsanto.com/monsanto/content/media/pubs/2001/2001-Monsanto_Annual_Report.pdf
- Atamanalp, M., 2004. Akuatik Toksikoloji Ders Notları, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Erzurum, 8 s.
- Atmaca S. 2010. Trifluralinin sıçan karaciğer ve duodenumu üzerine etkisinin biyokimyasal ve histolojik incelenmesi. Yüksek lisans tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İzmir.
- Aydın A, Sayal A, Isimer A., 2001. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S., 2001. Pesticide-Induced Oxidative Stress: Perspectives and Trends. *Rev Environ Health*, 16(1):1-40
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pahsa, S.T., Chakraborty, A.K., 1999. Biochemical Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Free-Radical Scavengers. *Toxicology Letters*, 107: 33–47
- Baublis, A.J., Clydesdale, F.M., Decker, E.A., 2000. "Antioxidants in wheat-based breakfast cereals", *Cereals Foods World* 45: 71-74.
- Baylis, A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strenghts, weakness and prospects. *Pest Manag Sci* 56, 299-308.
- Beuret, C.J., Zirulnik, F., Gimenez, M.S., 2005. Effect of the Herbicide Glifosat on Liver Lipoperoxidation in Pregnant Rats and Their Fetuses. *Reproductive Toxicology* 19, 501-504.
- Bhagavan N.V., 2002. "Medical biochemistry", Harcourt Acedemic Press, Kanada.
- Bradberry, S.M., Proudfoot A.T., Vale, J.A., 2004. Glyphosate poisoning. *Toxicol Rev*. 23:159-67.

- Brewster, D.W, Warren, J., Hopkins, W.E. II., 1991. Metabolism of glifosat in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glifosat-derived materials following a single oral dose. *Fundam Appl Toxicol.* 17, 43–51.
- Buchel K. H., 1983. *Chemistry of Pesticides*, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
- Carlisle, S.M. and Trevors, J.T., 1988. Glyphosate in the environment. *Water Air Soil Pollut.* 39, 409-420.
- Ceyhun, S. B., Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E. M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kılınç, N., Erdoğan, O., 2015. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 206- 214.
- Chan, P.O. and Mahler, J.F., 1992. NTP technical report on toxicity studies of glyphosate (CAS no.1071-83-6) administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. *National Toxicology Program Toxicity Report Series no.16*, 92-3135.
- Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
- Chau, A.S.Y and Afghan, B.K. 1982. *Analysis of pesticides in water*, Vol I, II, III, CRC Pres Inc., Boca Raton, Florida.
- Cheeseman, K H., Slater, T F., 1993. An introduction to free radical biochemistry, *Free Radicals in Medicine*, 481- 493
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., van Zanden, J. and van Bladeren, P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141-152.
- Cox, C., 1996, Glyphosate, Part 2: Human Exposure and Ecological Effects.
- Cox, C., 1995. Glyphosate, Part 2: Human Exposure and Ecological Effects. *J. Pesticide Reform* 15 (4), 14-20.
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E., Pryor, W., Ames, B N., Saul, R., Mc Cord, J M., Harman, D., 1987. Oxygen radicals and human disease, *Annals of Internal Medicine*, 107, 526- 545
- Çakıroğulları G.Ç. 2006. “İzmit Körfezi’nde su, sediment, mezgıt (*Gadus merlangus* L.1758) ve istavrit (*Trachurus mediterraneus* S.1868) balıklarında poliklorlu bifeniller ile DDT’nin saptanması, Ankara Üniversitesi, Fen Bil. Ens.Doktora Tezi, 496 s.
- Dallegrave, E., Mantase, F.D., Coelho, R.S., Pereira, J.D., Dalsanter, P.R., Langeloh, A., 2003. The Teratogenic Potential Of The Herbicide Glifosat-Roundup In Wistar Rats. *Toxicology Letters* 142, 45-52.
- Dallegrave, E., Mantese, F.D.G., Dalsenter, P.R., Langeloh, A., 2002, Acute oral toxicity of glyphosate in Wistar rats. *Online Journal of Veterinary Research* 1, 29-36.
- Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G. 2011. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal Environmental Research and Public Health*, 8(5): 1402–1419.
- Daruich, J., Zirulnik, F., Gimenez, M.S., 2001. Effect of the herbicide glifosat on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res.* 85, 226–231.

- Deaton, C.M. and Marlin, D.J. 2003. Exercise-Associated Oxidative Stress, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 278-291.
- Delen, N., Durmuoğlu, E., Gncan, A., Gngr, N., Turgut, C. and Burak, A. 2005. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalış sorunları. TMMOB, Ziraat Mühendisleri Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005. Cilt-2, s: 629-648
- Demirci F, Dursun HY. 2015. Türkiye’de Tarım İlaçları retim ve Kullanımı. Türkiye Ziraat Mühendisliği. 8. Teknik Kongre.; 1069–79.
- Deneke, S.M., Fanburg, B.L. 1989. Regulation of Cellular Glutathione. *Am J., Physiol*, 257, 163-173.
- Din, 2002. “Basisvalidierung genormter Verfahren zur wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung- Validierungsdokument (38415- T6), 27.
- Dündar Y., Aslan R., 2000. “Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar”, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Afyon.
- Egemen, . 2000.evre ve Su Kirliliği. E.. Su rnleri F. yay. No:42, İzmir.
- Epstein, S.S., Legator, M.S., 1971. The Mutagenicity of Pesticides: Concepts and Evaluation, The MIT Press, Cambridge, MA, 220 pp
- Erdoğan, O., Küfrevioğlu, .İ. ve ankaya, M., 2008. Balık Dokusundan RNA Saflaştırılması. Su rnlerinde uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları. Erzurum, Türkiye. No:237, 90-93.
- Ermif U.B.S. 2006. Herbisitlerden glifosat ve etoksisulfuronun *Scenedemus* sp. zerine toksik etkileri.
- Eurostat. 2007. The use of plant protection products in the European Union. European Commission: Luxembourg.
- Fabacher, D.L.; Little, E.E. 2000. “Diversity of fish, early observations and descriptions, fish in experimentation”, Editor, OSTRANDER. G.K., The laboratory fish, Academic Press, 678.
- Favari., L.; Lopez, E.; Martinez-Tabche, L.; Diaz-Pardo, E. 2002. “Effect of Insecticides on Plankton and Fish of Ignacio Ramirez Reservoir (Mexico); A Biochemical and Biomagnification Study”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51 177-186.
- Fernández-Alba, A.R., Hernando, M.D., Díaz López, G., and Chisti, Y. 2002. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Analytica Chimica Acta* 451, 195–202.
- Franz, J.E., 1985. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: Grossbard, E., Atkinson, D. (Eds.), *The herbicide glyphosate*. Butterworth, London, pp. 3e17.
- Fridovich I., 1973.Superoxide Radical and Superoxide Dismutase, *Biochem. Soc. Trans.*, 1: 48.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*; 64: 97-112.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35-120.
- Glyphosate Facts:, 1993. US-EPA R.E.D.
- Greenberg, A.E., Trussell, R.R. and Clesceri, L.S., 1985. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition, 541 p.

- Guest JA, Copley MP and Hormenic KL 1991. Carcinogenic effects of pesticides. *Pathol., Pharmacol.*, 71(3): 387-390.
- Gutteridge J.M.C., 1995. "Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage", *Clin Chem* 41(12): 1819-1828.
- Gutteridge JM, Halliwell B. 2000 Free radicals and antioxidants in the year. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 899: 136-147.
- Gürçan, T. 2001. "Tarımsal ilaç kalıntıları ve önemi", *Dünya Gıda Dergisi*, 67-72,.
- Güven, K., Özbay C., Ünlü, E., Satar, A. 1999. Acute Lethal Toxicity and Accumulation of Copper in *Gammarus pulex* (L.) (Amphipoda). *Turk J Biol* 23 513-521.
- Güven, K.C., 2005. Deniz kirliliği. Türk Deniz Araştırma Vakfı, İstanbul.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York: Oxford.
- Halliwell B. 1997. Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutr Rev* 55: 44-49.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance, *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 715S-725S
- Hisaoka K. K. and Battle H. I., 1958. The normal developmental stages of the zebrafish, *brachydanio rerio* (hamilton-buchanan). *Journal of Morphology* 102, 311-327
- Hosokawa, M., Endo, G. and Kuroda, K. 1995. Acute toxic effect of river yodo water (Japan) on *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 55; 419-425.
- Jiang, L. and Yang, H., 2009. Prometryne-induced Oxidative Stress and Impact on Antioxidant Enzymes in Wheat. *Ecotoxicology and Environ. Safety*, 72, 1687-1693.
- Journal of Pesticide Reform*, Winter 2004. Vol. 24, No.4.
- Kehrer JP.1993 Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*; 23: 21-48.
- Keramati, V., Jamili, S., Ramin, M., 2010. Effect of Diazinon on Catalase Antioxidant Enzyme Activity in Liver Tissue of *Rutilus rutilus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*
- Khan, M.A.Q. 1977. *Pesticides in aquatic environment*, Plenum Pres, NewYork.
- Kimmel, C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F., 1995. Stages of Embryonic Development of Zebrafish, *Developmental Dynamics*, 203: 253-310.
- Knapen, M.F.C.M, Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M., Steegers, E.A.P. 1999. Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82, 171-184.
- Knuuttila, P. and Knuuttila, H. 1979. The crystal and molecular structure of N-Phosphonomethyl glycine (Glifosat). *Acta Chemica Scandinavia B33*, 623-626.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E.A., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Glassmeyer, S.T., 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of The Total Environment* 354, 191-197.
- Kökoğlu, E., 1998. Oksidatif stres ve yaşlanma, Yaşlanmaya Biokimyasal Yaklaşım Uluslararası Sempozyumu, Ankara
- Kuhn, K., Streit, B. 1994. Detecting sublethal effects of organophosphates by measuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* 53: 398-404

- Lardinnois OM. 1995. Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. *Free Radic Res*; 22: 251-274.
- Lavelle, F., Michelson A., Dimitrijevic L., 1973. Biological Protection by Superoxide Dismutase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55,350,
- Lee, H.L., Chen, K.W., Chi, C.H., Huang, J.J., Tsai, L.M., 2000. Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant herbicide intoxication: a review of 131 cases. *Acad Emerg Med*, 7:906-10.
- Lele, Z. and Krone, P.H. 1996. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotech. Adv.*, 14:57-72
- Livak, K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ Method. *Methods*, 25, 402–408.
- Madsen, H. E. L. Christensen, H. H. and Gottlieb-Petersen, C. 1978. Stability constants of copper (II) zinc manganese (II), calcium and manganese complexes of N-(phosphonomethyl) Glycine (Glifosat). *Acta Chemica Scandinavia*, A23,79-83.
- Mann, T., Keilin, D. 1939. Carbonic Anhydrase. *Nature*, 144, 442-443.
- Martinez, T.T., and Brown, K., 1991. Oral and pulmonary toxicology of the surfactant used in Roundup herbicide. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34, 43–46.
- Mayden, R. L.; Tang, K. L.; Conway, K. W.; Freyhof, J.; Chamberlain, S.; Haskins, M.; Schneider, L.; Sudkamp, M.; Wood, R. M.; Agnew, M.; Bufalino, A.; Sulaiman, Z.; Miya, M.; Saitoh, K.; He, S. 2007. "Phylogenetic relationships of Danio within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species". *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 308B (5): () 642–654.
- Mayes, P.A. 1993. Structure and Function of the Water-soluble vitamins. In: Murray, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., Harper's Biochemistry, Lange Medical Publication, London, 573-587
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The J Biol Chem*; 244: 6049-6055.
- McEven FL and Stephenson GL 1989. The use and significance of pesticides in the environment. John Wiley & Sons Pub. New York.
- McEven, F.L. and Stephenson, G.L., 1979. The use and significance of pesticides in the environment, John Wiley & Sons Pub., New York, pp.538.
- Meister, A. 1994. Glutathione, Ascorbate and Cellular Protection, *Cancer Res. Suppl.* 954, 1969-1975.
- Meister, A. ve Anderson, M.E. 1983. Glutathione, *Ann Rev. Biochem* 52, 711-760.
- Miles, J.R.W and Harris, C.R. 1971. Insecticide residues in a controlled drainage system in agricultural areas of South-Western Ontario, 1970. *Pestic. Monit. J.*, 5;289-294.
- Mills, G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.*, 229(1), 189-97.
- Mitchell, D.G., Chapman, P.M., Long, T.J., 1987. Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bull Environ Contam Toxicol.* 39 (6), 1028–1035.
- Monsanto Annual Report, 2001.

- Nagel, R., 2002. "The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology", ALTEX: Alternatives to Animal Experiments, 19, 38-48.
- Noumohammadi I., Gohari L., Moddares M., Ghayoumi A., 2001. "Evaluation of erythrocyte glutathione peroxidase, superoxide dismutase and total antioxidants in cataract patients", Arch Irn Med 4: 123-126.
- Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Üner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 137(1), 43-51.
- Öztürk, S. 1990. Tarım ilaçları. Hasat Ofset Hazırlık ve Baskı Organizasyonu, s.532, İstanbul.
- Palüzar, H. 2013. Pestisitlerin vücut savunma sistemi üzerine etkilerinin in vitro incelenmesi. Doktora tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. Chemosphere 61, 1115-1122.
- Petkau A., W. Chelack, S. Pleskach, B. Meeker, C. Brady, 1975. Radioprotection of Mice by Superoxide Dismutase, Biochem Biophys. Res. Commun. 65, 886.
- Piner, P., 2005. Fenthion içeren ortamda BSO ve NAC'nin *Oreochromis niloticus*'da beyin dokusunda glutatyon metabolizması, lipid peroksidasyonu ve asetilkolinesteraz aktivitesine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Pryor, W.A., 1982. Free radical biology: Xenobiotics, cancer and aging, Annals New York Academy of Sciences, 1-22
- Rabideau, C.L., 2001. Pesticide Mixtures Induce Immunotoxicity: Potentiation of Apoptosis and Oxidative Stress, Blacksburg, 185, Virginia
- Rajendran, R. B., Imagawa, T., Tao, H., Ramesh, R., 2005. "Distribution of PCBs, HCHs and DDTs, and their ecotoxicological implications in Bay of Bengal, India", Environment International, Vol. 31: 503–512.
- Rand, G.M., 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology, Second Edition, ISBN 1-56032-090-7, 1148 p.
- Rank, J., Jensen, A.G., Skov, B., Pedersen, L. H., and Jensen, K., 1993. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and allium anaphase-telophase test. Mutat. Res. 300, 29-36.
- Rastogi R, Srivastava AK, Rastogi AK. 2001. Long term effect of aflatoxin B(1) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: effect of picroliv and silymarin. Phytother Res; 15(4): 307-10.
- Rigo A, Stevanato R, Finazzi-Agro A, Rotilio G. 1977. An attempt to evaluate the rate of the Haber-Weiss reaction by using OH radical scavengers. FEBS Lett; 80: 130-132.
- Rodrigues, G.S., Pimentel, D., Weinstein, L.H., 1998. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I-Tradescantia micronucleus assay Mutation Research 412, 235-244.
- Sapota, G., 2004. "Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in seawater of the southern Baltic Sea", Desalination, Dec., 162: 153–157.

- Savitz, D.A., Arbuckle, T., Kaczor, D., Curtis K.M., 1997. Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol.* 146, 1025–1036.
- Sheng L., X. Zheng, H. Tong, S. Liu, J. Du, Q. Liu, 2004. Purification and Characterization of Cytosolic Isoenzyme III of Cu, Zn- Superoxide Dismutase from Tobacco Leaves, *Plant Science*, 167 (6): 1235-1241,
- Shukla, G., Kumar, A., Bhanti, M., Joseph, P. E., Taneja, A., 2006. “Organochlorine pesticide contamination of ground water in the city of Hyderabad”, *Environment International*, Semp., 32: 244–247.
- Siemering, G., David N., Hay worth J. and Franz A., 2004. Aquatic pesticides monitoring program literature review. San Francisco Estuary Institute, California, 1–150.
- Simonian, N. A., Coyle, J. T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative disease, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 83-106
- Sinhorin, V.D.G., Sinhorin, A.P., dos Santos Teixeira, J.M., Miléski, K.M.L., Hansen, P.C. and Moreira, L., 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp), *Ecotox. Envir. Safe.*, 106: 181–187.
- Sivanesan D, Begum VH. 2007. Preventive role of *Gynandropsis gynandra* L., against aflatoxin B1 induced lipid peroxidation and antioxidant defense mechanism in rat. *Indian J Exp Biol*; 45(3): 299-303.
- Sivikova, K., Dianovsky, J., 2006. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209, 15-20.
- Sornom, P., Felvent, V., Medoc, V., Sroda, S., Rousselle, P., Beisel, J.N., 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environmental Pollution*, 158, 1288–1295
- Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzai-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., Silva, L.B., Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23, 308-313.
- Soyöz, M., Özçelik, N., 2003. “Zirai mücadelede kullanılan pestisitlerin sitogenetik etkileri”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 10: 6–9.
- Spence, R.; Gerlach, G.; Lawrence, C., Smith, C., 2008. "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*". *Biological Reviews* 83 (1): 13–34.
- Sunny O. Abarikwu, Adebukola C. Adesiyun, Titilola O. Oyeloja, Matthew O. Oyeyemi Ebenezer O. Farombi., 2009. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, Atrazine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Suter, L., Babiss, L.E. and Wheeldon, E.B., 2004. Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. *Chemistry & Biology*, 11, 161-171. DOI: 10.1016/j.chembiol.2004.02.003
- Tardiff, R. G. 1992. Methods to assess adverse effects of pesticides. Published by John Wiley and Sons Ltd. England
- Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Zirai Araştırma Merkezi (2005).

- Tate, T.M., Spurlock, J.O., Christian, F.A., 1997. Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. *Arch Environ Contam Toxicol.* 33:286-9.
- Tepe, I., 1997. Türkiye’ de Tarım ve Tarım Dışı Alanlarda Sorun Olan Yabancı Otlar ve Mücadelesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Ders Kitabı, 18, 237 s.
- Tiryaki O, Canhilal R, Horuz S. 2010. Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi; 26(2): 154–69
- Tominack, R.L., Yang, G.Y., Tsai, W.J., Chung, H.M., Deng, J.F., 1991. Taiwan National Poison Center survey of glyphosate-surfactant herbicide ingestions. *J. Toxicol. Clin Toxicol.* 29:91-109.
- Urso ML, Clarkson PM. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*; 189: 41-54.
- Valko M, Rhodes CJ, Mancol J, Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 160;1-40
- Vural, N. (2005). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, s. 344-379.
- Westerfield, M., , 1995. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press, Eugene.
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C., 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glifosat, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31, 117-165.
- Woodburn, A., 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Manag Sci.* 56:309-12.
- Yalvaç M., 2005. “Göksu Deltası Sucul Ekosisteminde Endosülfan ve Methamidophos Pestisitlerinin Kalıntı Düzeyinin Araştırılması”, Doktora tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 187 s.
- Yarsan, E., Tanyüksel, M., Celik, S., Aydın, A., 1999. Effects of Aldicarb and Malathion on Lipid Peroxidation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63:575-581
- Yauk, C.L. and Berndt, M.L., 2007. Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48, 380-394. DOI: 10.1002/em.20290
- Yıldız, M., Gürkan, M. O., Turgut, C., Kaya, Ü. ve Ünal, G. 2005. Tarımsal savaşmada kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, s. 649-666, Ankara.
- Yoder, J., Watson, M., Benson, W.W., 1973. Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides, *Mutation Res.* 21, 335-340.
- Yost, FJ, Fridovich I. 1973. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; 248: 4905-4908.
- Yurdun, T. 2007. Hasta bina sendromu etkeni uçucu organik bileşikler ve diğer solunan kimyasallar. İçinde: Hasta bina sendromu. Ed: Özyaral O, Keskin Y. Türkiye Tekstil Sanayi İşverenleri Sendikası. Tıglat Matbaacılık İstanbul, s.283-320.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Erzurum Merkez’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Fakültesinden 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında Atatürk Üniveritesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Tezli Yüksek Lisans eğitimine başladı ve hala devam etmektedir.

