



**KÜRESEL ISINMA VE
GLYPHOSATE TOKSİSİTESİ; BİR
SONRAKİ NESİLİ DE İÇEREN
DAVRANIŞSAL, MOLEKÜLER,
METABOLOMİK VE FİZYOLOJİK
ANALİZLER İLE KAPSAMLI BİR
ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
MODELLEMESİ**

Ekrem SULUKAN

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Doktora Tezi

Su Ürünleri Mühendisliği

Ana Bilim Dalı

2022

(Her hakkı saklıdır)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI

**KÜRESEL ISINMA VE GLYPHOSATE TOKSİSİTESİ;
BİR SONRAKİ NESİLİ DE İÇEREN DAVRANIŞSAL, MOLEKÜLER,
METABOLOMİK VE FİZYOLOJİK ANALİZLER İLE KAPSAMLI BİR ZEBRA
BALIĞI (*Danio rerio*) MODELLEMESİ**

(Global Warming and Glyphosate Toxicity;
A comprehensive zebrafish (*Danio rerio*) modelling with behavioral, molecular, metabolomic
and physiological analyzes including the offspring)

DOKTORA TEZİ

Ekrem SULUKAN

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Erzurum
Aralık, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Ekrem SULUKAN tarafından hazırlanan “*Küresel Isınma ve Glyphosate Toksisitesi; Bir sonraki nesili de içeren davranışsal, moleküler, metabolomik ve fizyolojik analizler ile kapsamlı bir zebra balığı (Danio rerio) modellemesi*” başlıklı çalışması 05/12/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Su Ürünleri Mühendisliği Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Bekir SALİH Hacattepe Üniversitesi	
Danışman:	Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN Atatürk Üniversitesi	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Telat YANIK Atatürk Üniversitesi	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Özlem BARIŞ Atatürk Üniversitesi	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. İlhan ALTINOK Karadeniz Teknik Üniversitesi	

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN danışmanlığında sunulan “Küresel Isınma ve Glyphosate Toksisitesi; Bir sonraki nesili de içeren davranışsal, moleküler, metabolomik ve fizyolojik analizler ile kapsamlı bir zebra balığı (*Danio rerio*) modellemesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	17	30
Kuramsal Temeller	4	30
Materyal ve Yöntem	8	35
Bulgular	4	20
Tartışma	2	20
Tezin Geneli	9	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5’den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Ekrem SULUKAN	Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
5.12.2022	5.12.2022
İmza:	İmza:

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her aşamasında bilimsel vizyonu ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yardım ve ilgilerini esirgemeyen çok kıymetli ve saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a,

Doktora tez değerlendirme komisyonumda olan ve tez yazım aşamasında bana destek olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Telat YANIK ve Sayın Prof. Dr. Özlem BARIŞ'a,

Metabolom analizlerinin laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Onur ŞENOL'a,

Sirkadiyen ve anksiyete analizlerinin yapılmasında ve yorumlanmasındaki yardımlarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hacer AKGÜL CEYHUN'a

Histopatoloji analizlerinin laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Sayın Doç. Dr. Serkan YILDIRIM ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi İsmail BOLAT'a

Tez çalışmamda Histopatoloji ve Metabolom analizleri için dokuların toplanması esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Emine TORAMAN'a

Tez çalışmam boyunca laboratuvarında yapılan çalışmalarıma her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Alper BARAN ve Sayın Yüksek lisans öğrencisi Meryem KANKAYNAR'a

Laboratuvarında yapılan çalışmalarıma yardımcı olan Sayın Doktora öğrencisi Tuba KIZILTAN'a

Tez çalışmam boyunca yanımda olan ve doktora sürecinde her aşamasında beraber ilerlediğimiz Sayın Arş. Gör. Fatih KORKMAZ'a Sayın Şeyda TACER TANAS'a ve Sayın Hilal BAYIR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamda desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan anneme ve babama çok teşekkür ederim.

YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı ile sağladığı maddi destekten dolayı YÖK'e teşekkür ederim.

Ekrem SULUKAN

Aralık, 2022

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KÜRESEL ISINMA VE GLYPHOSATE TOKSİSİTESİ; BİR SONRAKİ NESİLİ DE İÇEREN DAVRANIŞSAL, MOLEKÜLER, METABOLOMİK VE FİZYOLOJİK ANALİZLER İLE KAPSAMLI BİR ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) MODELLEMESİ

Ekrem SULUKAN

Danışman: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Amaç: Bu tez çalışmasında; küresel ısınmadaki sıcaklık artış değerleri dikkate alındığında, 0.5 °C’lik sıcaklık farklılıklarında glyphosate’ın bir model organizma olan zebra balıkları üzerindeki çeşitli biyokimyasal, moleküler ve davranışsal parametrelerle etkilerinin incelenmesi ve bu balıklardan alınan yeni nesil üzerindeki gelişim toksisitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu sıcaklık artışlarının zebra balıklarında doku bazlı metabolik yolları nasıl etkilediği de tespit edilmeye çalışılmıştır.

Yöntem: Bu amaçla; yetişkin zebra balıkları 28.5 – 29.0 – 29.5 – 30.0 °C’lik dört farklı sıcaklıkta 1 ve 5 ppm dozlarında 96 saatlik glyphosate maruziyetine bırakılmıştır. Maruziyet süresinin sonunda yetişkin balıklarda anksiyete ve sirkadiyen ritim davranış analizleri yapılmıştır. Daha sonra balıklardan alınan beyin örneklerinde histopatolojik, immunohistokimyasal ve metabolomik analizler yapılmıştır. Yetişkin balıklardan elde edilen yeni nesil larvalarda meydana gelebilecek morfolojik değişimler incelenmiş ve glyphosate’ın toksisitesi sonraki nesil üzerinde test edilmiştir.

Bulgular: Elde edilen veriler incelendiğinde, doz ve sıcaklık artışına paralel olarak glyphosate’ın zebra balıklarında anksiyete benzeri davranışlar oluşturduğu, sirkadiyen ritimi bozduğu, beyindeki histopatolojik bulguları artırdığı ve 5-HT4R ve GNAT2 immünopozitifliğine sebep olduğu tespit edildi. Metabolom analizi sonucunda, sıcaklık artışı ve glyphosate maruziyetinin sinerjik etkisi nedeniyle otuzdan fazla açıklamalı metabolit belirlenmiştir. Glyphosate maruziyeti olan ebeveynlere uygulanan 0.5 °C’lik sıcaklık artışına paralel olarak yavrularda fizyolojik ve morfolojik anormallikler meydana gelmiştir. Ayrıca, ebeveynlerin maruz kaldığı sıcaklık artışlarının, yavrularda ışık sinyali iletimini ve serotonin yollarını etkilediği, daha fazla karanlık/açık lokomotor aktivite ve artan tigmotaksi ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, daha önceki çalışmalarda toksik etkileri açıkça ortaya konan glyphosate’ın küresel ısınma projeksiyonuna yakın sayılabilecek 0.5 °C’lik sıcaklık artışlarında bile daha toksik olabileceği zebra balığı modelinde gösterilmiştir. Çalışmamız, küresel ısınmaya bağlı olarak çevresel kirleticilerin organizmalar üzerindeki olumsuz etkilerini daha net ortaya koymak için düşük sıcaklık farklılıklarına sahip çalışmaların önemli olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak, zararlı etkilerine ilişkin bilgileri geliştirmek ve glyphosate kullanımını kontrol etmeye yardımcı olmak veya daha az toksik herbisit formülasyonlarının geliştirilmesini teşvik etmek için glyphosate veya glyphosate bazlı herbisitler üzerinde daha fazla toksikolojik çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Küresel ısınma, zebra balığı, anksiyete, sirkadiyen ritim, pestisit toksitesi, metabolom

Aralık 2022, 75 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

GLOBAL WARMING AND GLYPHOSATE TOXICITY; A COMPREHENSIVE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) MODELLING WITH BEHAVIORAL, MOLECULAR, METABOLOMIC AND PHYSIOLOGICAL ANALYZES INCLUDING THE OFFSPRING

Ekrem SULUKAN

Supervisor: Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Purpose: In this thesis, it was aimed to examine the effects of glyphosate with various biochemical, molecular and behavioral parameters on zebrafish, which is a model organism, at temperature differences of 0.5 °C, considering the temperature increase values in global warming, and to investigate the developmental toxicity of these fish on the next generation. It has also been determined how these temperature increases affect tissue-based metabolic pathways in zebrafish.

Method: For this purpose, adult zebrafish were exposed to glyphosate at 1 and 5 ppm doses for 96 hours at four different growth temperatures of 28.5 - 29.0 - 29.5 - 30.0 °C. Anxiety and circadian rhythm behavioral analyzes were performed in adult fish at the end of the exposure period. Then, histopathological and metabolomic analyzes were performed on brain samples taken from these fish. Morphological changes that may occur in new generation larvae obtained from adult fish were examined and the toxicity of glyphosate was tested. Parallel to these, behavioral analyzes were made in the second generation obtained, and the effect of glyphosate exposure was evaluated.

Findings: When the data obtained were examined, it was determined that glyphosate caused anxiety-like behaviors in zebrafish, disrupted the circadian rhythm, increased histopathological findings in the brain, and caused 5-HT4R and GNAT2 immunopositivity in parallel with the increase in dose and temperature. As a result of the metabolome analysis, more than thirty annotated metabolites were identified due to the synergistic effect of temperature rise and glyphosate exposure. Parallel to the 0.5 °C temperature increase applied to the glyphosate exposed parents, physiological and morphological abnormalities occurred in the offspring. It was also observed that temperature increases to which the parents were exposed affected light signal transmission and serotonin pathways in the offspring, resulting in greater dark/light locomotor activity and increased tigmotaxy.

Results: As a result, it has been shown in the zebrafish model that glyphosate, whose toxic effects have been clearly demonstrated in previous studies, can be more toxic even at 0.5 °C temperature increases, which can be considered close to the global warming projection. Our study has revealed that studies with low temperature differences are important in order to more clearly reveal the negative effects of environmental pollutants on organisms due to global warming. In addition, more toxicological studies on glyphosate or glyphosate-based herbicides are needed to improve knowledge of their harmful effects and help control glyphosate use or encourage the development of less toxic herbicide formulations.

Keywords: Global warming, zebrafish, anxiety, circadian rhythm, pesticide toxicity, metabolome

December 2022, 75 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	8
3. MATERYAL ve METOT (BÖLÜM I)	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Deneme Ortamının Oluşturulması.....	14
3.1.2. Balık Materyali	15
3.1.3. Uygulanan Kimyasal	16
3.2. Yöntem	16
3.2.1. Çalışma Kurgusu	16
3.2.2. Yetişkin Davranış Testleri	18
3.2.2.1. Yeni Dalma Tank Testi.....	18
3.2.2.2. Sirkadiyen Ritim Testi.....	19
3.2.3. Histopatolojik İncelemeler	20
3.2.4. İmmunohistokimyasal Analizler.....	20
3.2.5. Metabolom Analizleri.....	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI (BÖLÜM I)	23
4.1. Yetişkin Zebra Balığı Analizleri.....	23
4.1.1. Davranış Analizleri.....	23
4.1.1.1. Sirkadiyen Ritim Testi Analiz Sonuçları	23
4.1.1.2. Yeni Tank Dalış Testi Analiz Sonuçları.....	25
4.1.2. İmmunohistokimyasal İnceleme Sonuçları.....	29
4.1.3. Metabolom Analiz Sonuçları.....	30
5. TARTIŞMA (BÖLÜM I)	33
6. MATERYAL ve METOT (BÖLÜM II).....	38
6.1. Çalışma Kurgusu	38
6.2. Yeni Nesil Analizleri	38

6.2.1. Larvaların Fizyolojik ve Morfolojik Analizlerinin Yapılması.....	39
6.2.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Tespiti	39
6.2.3. Apoptotik Hücrelerin Tayin Edilmesi	39
6.2.4. Vücuttaki Lipit Düzeylerinin Belirlenmesi (Nile-Red (C20-H18-N2-O2)Boyama)	40
6.2.5. Tigmotaksis ve Larva Lokomotor Davranış Testi	40
6.3. Histopatolojik İncelemeler	41
6.4. İmmünohistokimyasal Analizler.....	42
6.5. İstatistiksel Analiz	42
7. ARAŞTIRMA BULGULARI (BÖLÜM II)	43
7.1. Yeni Nesil Analizleri	43
7.1.1. Embriyo/Larvaların Hayatta Kalma ve Kuluçka Oranları.....	43
7.1.2. Embriyo/Larva Malformasyonları.....	44
7.1.3. ROS, AO ve Nil Red Boyama Analizleri	47
7.1.4. Zebra Balığı Larvalarının Kan Akışının ve Kalp Atış Hızının Değerlendirilmesi.	49
7.1.5. Larva Lokomotor Aktivitesi ve Tigmotaksis.....	50
7.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları	52
8. TARTIŞMA (BÖLÜM II)	55
9. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	76

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılacak olan kontrol ve muamele grupları.....	17
Tablo 2. Zebra balığı beyin kesitlerinde 5-HT4R ve GNAT2 immünopozitifliğinin skorlama tablosu.	30
Tablo 3. Zebra balığı larvalarının beyin kesitlerinde 5-HT4R ve GNAT2 immünopozitifliğinin skorlama tablosu	53



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Yıllara bağlı sıcaklık artış grafiği (Gürçam, 2022).....	1
Şekil 2. Çalışmanın yürütüldüğü tank düzeneği	14
Şekil 3. Denemede kullanılan 6 aylık AB genotipli zebra balıkları (<i>Danio rerio</i>).....	15
Şekil 4. Glyphosate'ın kimyasal yapısı (Prasad vd., 2009)	16
Şekil 5. Tez çalışması grup organizasyonu.....	17
Şekil 6. Çalışma kurgusu özeti	18
Şekil 7. Ergin balık anksiyete testinde kullanılan dalma tankı (Egan vd., 2009) ve sirkadiyen ritim test sistemi	20
Şekil 8. Toplam mesafenin aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$)	23
Şekil 9. Ortalama hızın aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$)	24
Şekil 10. Ortalama açısal hızın aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	24
Şekil 11. Kıvrılma parametresinin aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	25
Şekil 12. Yeni tank dalış testi sonrası kat edilen toplam mesafenin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	26
Şekil 13. Yeni tank dalış testi sonrası hızın gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	26
Şekil 14. Yeni tank dalış testi sonrası düzensiz hareket frekansının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	27
Şekil 15. Yeni tank dalış testi sonrası üt kısma geçişin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$)	27

Şekil 16. Yeni tank dalış testi sonrası alt kısımda geçirilen sürenin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	28
Şekil 17. Yeni tank dalış testi sonrası donma frekansının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	28
Şekil 18. Yeni tank dalış testi sonrası üst kısma geçişteki gecikmenin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	29
Şekil 19. Farklı sıcaklık koşullarında glifosata maruz kalan zebra balığının beyin dokularında hematoksilin ve eozin boyamasının (H&E) ve 5-HT4R ve GNAT2 için immüno Floresan reaksiyonlarının mikroskopik görüntüsü. Bu şekilde tasarlanmanın ilk amacı bulguların sıklığının sıcaklık ve dozla değişimini göstermekti. Ayrıca bu tasarım bu bulguların yerlerini de göstermektedir. Sarı noktalar histopatolojik bulguların olduğu bölgeleri, kırmızı noktalar ise immüno Floresan sinyallerin gözlemlendiği bölgeleri göstermektedir	30
Şekil 20. Tespit edilen metabolitlerin farklı sıcaklık ve maruziyet gruplarındaki ortalama intensite değerlerine göre sıcaklık haritası.....	31
Şekil 21. Ortogonal kısmi en küçük kareler diskriminant analiz algoritması ile yapılan sınıflandırmada latent değişkenlerin skor grafiği (a), Tespit edilen metabolitlerin farklı sıcaklık gruplarındaki anlamlılık değerlerine göre venn diagramı (b), Tespit edilen metabolitlerin yer aldığı metabolik yolların p değerine karşılık topografik yolak etki değeri grafiği (c,d,e).....	32
Şekil 22. Çalışma kurgusu özeti	38
Şekil 23. DanioVision ve larva davranış analizlerinin yapıldığı sistem	41
Şekil 24. Zebra balığı larvalarının 96. saatteki hayatta kalma oranı. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	43
Şekil 25. Zebra balığı larvalarının 48. saatteki yumurta çıkışı oranı. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	44
Şekil 26. Zebra balığı larvalarının 96. saatteki toplam malformasyon oranı. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	44

Şekil 27. Zebra balığı embriyolarının 72. saatte dört farklı gelişim sıcaklığındaki mikroskopik görüntüleri. Gözlenen vücut malformasyonlarının dağılımı. YSE: Besin kesesi ödemi; PE: Perikardiyak ödem; BM: Vücut malformasyonları (Kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve baş malformasyonu); CBA: Kavisli gövde eksen	45
Şekil 28. Zebra balığı embriyolarının 96. saatte dört farklı gelişim sıcaklığındaki mikroskopik görüntüleri. Gözlenen vücut malformasyonlarının dağılımı. YSE: Besin kesesi ödemi; PE: Perikardiyak ödem; BM: Vücut malformasyonları (Kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve baş malformasyonu); CBA: Kavisli gövde eksen	45
Şekil 29. Zebra balığı embriyolarında vücut uzunluğu malformasyonlarının belirlenmesi. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$)	45
Şekil 30. Zebra balığı embriyolarında göz çapı malformasyonlarının belirlenmesi. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$)	46
Şekil 31. Zebra balığı embriyolarında perikardiyal alan malformasyonlarının belirlenmesi. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$)	46
Şekil 32. Akridin orange (AO) boyama sonuçlarının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$)	47
Şekil 33. Akridin orange (AO) boyama yöntemi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin floresan olarak belirlenmesi	47
Şekil 34. CMH ₂ DCFDA boyama sonuçlarının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$)	48
Şekil 35. CMH ₂ DCFDA boyama yöntemi kullanılarak hücrelerin ROS miktarının floresan olarak belirlenmesi	48
Şekil 36. Nil red boyama sonuçlarının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$)	49
Şekil 37. Nil Red boyama ile bütün larvaların nispi floresan yoğunluğunun belirlenmesi.	49
Şekil 38. Zebra balığı larvalarında kan akış aktivitesi ve kalp atış hızının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı	

gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	50
Şekil 39. Zebra balığı larvalarının lokomotor aktivite analizlerinden toplam mesafenin aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	51
Şekil 40. Zebra balığı larvalarının lokomotor aktivite analizlerinden ortalama hızın gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	51
Şekil 41. Zebra balığı larvalarının tigmotaksis parametresinin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).....	52
Şekil 42. Zebra balığı larvalarının beyin kesitlerinde hematoxilen ve eozin boyama (H&E) 5-HT4R ve GNAT2 immünopozitifliğinin belirlenmesi.....	53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	Asetilkoloinesteraz
AO	Akridin Orange
BM	Vücut Malformasyonları
CAT	Katalaz
CBA	Eğri Vücut Eksen
CM-H ₂ DCFDA	5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester
C20-H18-N2-O2	9-dietilamino-5H-benzo (a) fenoksazin-5-o
CRF	Kortikotropin Salma Faktörü
DNP	2,4-Dinitrofenol
GBH	Glyphosate Bazlı Herbisit
GNAT2	Guanin Nükleotid Bağlayıcı Protein G (t) Alt Birimi Alfa-2
GPx	Glutasyon Peroksidaz
Gr	Glukokortikoid Reseptörü
HE	Hematoksilen-eozin
5HT4	5-Hydroxytryptamine Receptor 4
LPO	Lipid Peroksidasyonu
OCT	Optimal Cutting Temperature Medium
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PE	Perikardiyal Ödem
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
YSE	Yolk Sac Ödemi
ZIRC	Uluslararası Zebrafish Merkezi

1. GİRİŞ

Atmosferdeki artan sera gazı konsantrasyonları nedeniyle sıcaklıklardaki artışı ifade eden küresel ısınma; buzulların erimesini, deniz seviyesinin yükselmesini, göllerin buharlaşmasını ve okyanus asitliğini artırarak doğal ekosistemleri olumsuz yönde etkilemektedir (Alaa E. Eissa ve Zaki, 2011). Yaygın olarak antropojenik faaliyetler tarafından yönlendirilen küresel iklim değişikliği, geçtiğimiz yüzyılda önemli bir sorun haline gelmiştir ve gelecekte de etkisinin giderek artması beklenmektedir. Ayrıca son araştırmalar, Şekil 1’de görüldüğü üzere önümüzdeki 20 yıl içerisinde ortalama sıcaklığın her on yılda 0.2°C ve 2100 yılına kadar ise $1.8^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$ artacağını öngörmektedir (Assan vd., 2020).



Şekil 1. Yıllara bağlı sıcaklık artış grafiği (Gürçam, 2022)

Paleontolojik kayıtların yanı sıra küresel ısınma tarihi, çevre sıcaklığındaki birkaç $^{\circ}\text{C}$ farklılıkların bile ekosistemlerde büyük değişimlere ve popülasyonların kitlesel yok olmasına neden olduğunu göstermektedir (Assan vd., 2020). Su ekosistemleri küresel ısınmanın etkilerinden en fazla zarar gören canlı gruplarıdır. Bunun nedeni, suda yaşayan türlerin büyük çoğunluğunun ($>95\%$) ektoterm, diğer bir deyişle poikilotermik olmasıdır. Çevresel sıcaklıklardaki farkla beraber vücut sıcaklıklarında meydana gelen değişimler

bu canlıların vücutlarındaki fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonların bozulmasına sebep olmaktadır (Assan vd., 2020).

Balıkların; sudaki biyojeokimyasal süreçlerde ve ekosistem yapılanmasında kilit bileşenler olduğu kabul edilmektedir. İklim değişikliği, balıklarda biyolojik adaptasyonları bozmakta ve nesillerinin tükenmesine sebep olabilmektedir. Bu durum sucul ekosistemlerin ekolojik organizasyonun tüm seviyelerinin etkilenmesine neden olmaktadır. Balıkların somatik büyüme hızı, iklim değişikliğinin neden olduğu su ve hava sıcaklığındaki farklılıklarından dolayı değişmektedir. Bu nedenle gelişimleri sırasında değişen ortamlara nasıl tepki verdiğini anlamak; iklim değişikliğinin popülasyonlar ve ekosistemler üzerindeki etkilerini tahmin etmede önemli ve etkili bir adım olacaktır (Huang vd., 2021). Küresel ısınmanın bir diğer kritik etkisi de; deniz memelileri, balıklar, amfibiler ve su kuşlarının cinsiyet oranlarındaki değişimin artmasına neden olmasıdır. Bu süreç söz konusu türlerin neslinin tükenmesine sebep olabilmektedir (Ospina-Álvarez ve Piferrer, 2008; Göth ve Booth, 2005). Balıkların gelişim aşamasındaki sıcaklık dalgalanmaları ayrıca, iskelet deformitelerine sebep olabilmekte ve hücre ve dokuların farklılaşma süreçlerini de bozabilmektedir (Eissa vd., 2009).

İklim değişikliğinin, sucul canlılarda fizyolojik ve biyokimyasal etkilerinin yanı sıra sirkadiyen ritimler üzerinde de etkileri bulunmaktadır. Bir dizi çevresel maddeye maruz kalmayı takiben çeşitli su organizmalarında özellikle de balıklarda sirkadiyen sistemde bozulmalar olduğu gösterilmiştir. Sirkadiyen ritim; organizmaların 24 saatlik gündüz/gece döngüsü ile davranışsal, fizyolojik ve moleküler olayları geçici olarak düzenlemelerini sağlayan içsel bir zaman tutma mekanizmasıdır (Rey ve Reddy, 2013). Moleküler mekanizması ilk olarak *Drosophila*'da keşfedilmiş ve daha sonra çeşitli türler arasında yüksek oranda korunduğu ortaya çıkmıştır. Birçok organizma, lokomotor ve beslenme aktivitesi dahil olmak üzere günlük veya gece davranışsal ritimler sergilemektedir. Uyku uyanıklık döngüsü hipotalamustaki epifiz bezi tarafından sentezlenen melatonin hormonu ile düzenlenmektedir. Zebra balığı da dahil olmak üzere memeli olmayan omurgalılarda melatonin biyosentezi hem retinada hem de epifiz bezinde gerçekleşmektedir (Vatine vd., 2011). Balık epifiz bezi, fotik sürüklenme ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesi için gerekli tüm unsurları içermektedir (Falcón vd., 2007). Epifiz bezi ayrıca, lokomotor aktivite ritmine ve uyku benzeri durumlara aracılık ederek çeşitli davranışların ve fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesine de katkıda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, balıklara melatonin uygulamasının uyku benzeri

bir davranışa neden olduğu, lokomotor aktiviteyi ve gıda alımını azalttığı tespit edilmiştir. Zebra balıkları lokomotor aktivitenin sirkadiyen düzenlemesinin araştırılması için bir aydınlık-karanlık döngüsünde tutulduğunda, gündüz hareket aktivitesinin arttığı gece ise uyku benzeri davranış gösterdiği bulunmuştur (Ben-Moshe vd., 2014).

Sirkadiyen ritim; hücre bölünmesi, hormon salgılanması, besin metabolizması, uyku/uyanıklık döngüsü, doğurganlık, üreme ve davranış gibi çok sayıda hücresel, biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal süreci yönetmektedir (Chappell, 2005). Bu mekanizmalar, iç sirkadiyen ritimlerin yanı sıra abiyotik çevresel değişiklikler (örneğin ışık, sıcaklık) tarafından da kontrol edilmektedir (Prokko ve Nikinmaa, 2018; Egg vd., 2013). Sıcaklık, sirkadiyen saatin temel özelliklerini etkileyen önemli bir eşzamanlayıcıdır. Yapılan çalışmalar, balıklarda sıcaklık döngüleri arasında sadece 2 °C'lik bir fark olsa bile, saat genlerinin sirkadiyen ekspresyonunu senkronize ettiği gösterilmiştir, bu da balığın sirkadiyen ritim sisteminin küçük sıcaklık değişimlerine bile oldukça hassas olduğunu göstermektedir (Lahiri vd., 2005; Zheng vd., 2021). Önceki araştırmalar bu sistemin temel yönlerini keşfetmeye odaklandığından, kirleticilerin insanlarda ve hayvanlarda sirkadiyen etkileşimler üzerindeki rolü yeterince araştırılmamıştır. Endüstriyel, hastane ve ev/belediye atık sularının deşarjı yoluyla yüzey sularına karışan hem doğal hem de antropojenik kimyasalların suda yaşayan organizmalarda sirkadiyen ritim düzenlemesine müdahale ettiği gösterilmiştir. Bu tür bileşikler sirkadiyen bozucular olarak adlandırılmaktadır (Fang vd., 2017; Zhao vd., 2018). Ekotoksikolojik çalışmalar, endokrin bozulması, üreme, bağışıklık tepkisi, organ işlevi, gelişme, nörotoksisite ve kanserojenite gibi bir dizi fizyolojik olayı açıklamaya çalışmıştır. Fakat sudaki organizmaların gelişimi ve üreme performansında çok önemli bir rol oynamalarına rağmen, sirkadiyen ritimler üzerinde çok fazla çalışma yapılmamıştır (Zheng vd., 2021).

Balıkların sıcaklık değişimine ortak bir tepkisi, daha uygun sıcaklıklara sahip habitatlara göç etmektir. Bununla birlikte, bir balık doğal veya antropojenik faktörler nedeniyle optimal termal koşullara sahip bir habitata ulaşamazsa, bu sıcaklığı kaygı ve stres faktörü olarak deneyimleyebilmektedir (Angiulli vd., 2020). Zebra balığı, kaygıyla ilgili fenotipleri incelemek için oldukça elverişli bir hayvan modelidir. Anksiyetenin nörobiyolojik, fizyolojik ve genetik mekanizmalarını incelemek ve çeşitli anksiyolitik ilaçları taramak için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Yırtıcı hayvana maruz kalma, alarm feromon, anksiyojenik ilaçlar ve ilaç bırakma dahil olmak üzere çeşitli kaygı

uyandıran çevresel stres faktörlerine karşı oldukça hassas olması zebra balığını bu alandaki araştırmalar için uygun bir model haline getirmiştir. Geniş termal toleransı (6.7 ila 41.7 °C) göz önüne alındığında, gelişimsel biyolojiden nörodavranış ve ekotoksikolojiye kadar birçok alanda yapılan araştırmalarda termal değişimin etkilerini incelemek için de rahatlıkla kullanılabileceği görülmektedir (López-Olmeda ve Sánchez-Vázquez, 2011; Angiulli vd., 2020). Stres yanıtı, çevresel değişikliklere (stresörler) karşı organizmaların homeostatik dengelerini koruyabilmelerini sağlayan nöral, endokrin ve otonomik reaksiyonların bir kombinasyonudur. Akut stres tepkisi, bir hayvanın değişen bir çevreye adaptasyonu için çok önemli olmakla birlikte, stres tepkisinin kısa bir süre içinde (kronik stres) tekrarlanan aktivasyonu, büyüme bozukluklarının yanı sıra ruh hali ve anksiyete bozuklukları da dahil olmak üzere çeşitli problemlere sebep olur. Erken yaşamdaki stres, patolojik durumların gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğundan, gelişen beyin ve davranışlar üzerindeki olumsuz etkilerinin altında yatan nörobiyolojik mekanizmaları anlamak son derece önemlidir (Golla vd., 2020). Son yıllardaki iklim değişikliği, termal değişikliklerin su ortamı üzerindeki etkisine olan ilgiyi artırmış ve sıcaklığın tatlı su ve tuzlu su balık türleri üzerindeki etkisini araştıran birçok çalışma yapılmıştır (Wang vd., 2020).

İklim değişikliği nedeniyle sıcaklığın artması toksik kimyasallara maruz kalan tatlı su ekosistemlerinde de çevresel etkiler açısından büyük bir endişe kaynağıdır. Çevresel koşulların bir organizmanın metabolik süreçleri üzerindeki etkilerini incelemek için son yıllarda metabolomik çalışmalar kullanılmaya başlanmıştır. Metabolomik, çeşitli organizmalarda küçük molekülü metabolitlerin (<1000 Da) kapsamlı bir analizi olarak tanımlanmaktadır (Liang vd., 2018). Kirleticilerin birincil olarak dağıldığı ortamlarda model organizmalardaki metabolit seviyelerini analiz ederek, kirleticilerin çevre üzerindeki gerçek etkisini detaylı bir şekilde değerlendirmek mümkündür (Matich vd., 2019). Ek olarak, çevresel stres faktörlerinin model organizmalar üzerindeki etkileri, fenotipler ve değişen metabolik yollar arasındaki ilişkiyi belirlemek için de kullanılabilmektedir. Daha iyi bir sonuç elde etmek için metabolomik çalışmalar, genomik, transkriptomik, proteomik ve epigenomik dahil olmak üzere diğer omik çalışmaları ile birleştirilebilmektedir. Çoklu omik yaklaşımlarla fenotipler ve metabolitler arasındaki ilişki doğrulanabilmektedir. Ayrıca, metabolik yollar ve protein, gen ve transkript verilerinin entegrasyonu, belirli bir deneysel modelde belirli bir toksik maddenin etki mekanizmasının aydınlatılmasında faydalı olabilmektedir (Percival vd.,

2018; Fraga-Corral vd., 2020). Metabolomik çalışmalar, ekotoksikolojide önemli bir rol oynamakta ve canlı organizmalarda ksenobiyotikler gibi çevresel kirleticilerin etkilerini değerlendirmek için de kullanılmaktadır. Bu yaklaşım, metabolit seviyelerindeki bozulmaları belirleme ve elde edilen sonuçlara dayalı olarak ilişkili toksik mekanizmaları netleştirme imkanı sunmaktadır. Son yıllarda farmasötiklerin, pestisitlerin ve nanopartiküllerin model organizmalardaki toksik etkileri ile ilgili çevresel metabolomik çalışmaların sayısında bir artış olmuştur. Çevresel kirleticilerin risk değerlendirmesi de bu konuda farkındalığı artırmıştır (van der Werf vd., 2007; Kim ve Kang, 2021).

Küresel ısınmanın yanı sıra, tatlı su biyoçeşitliliğini tehdit eden diğer bir antropojenik stres etkeni de pestisitlerdir (Beketov vd., 2013). Pestisitler, bitki hastalıklarını, yabancı otları, zararlıları önlemek ve gıda ürünlerinin kalitesini artırmak için kullanılan kimyasallardır (Rajmohan vd., 2020). Pestisitler kullanıldığı yerlere göre insektisitler, herbisitler ve fungusitler olarak isimlendirilmektedirler. Kullanıldıkları bölgelerde toprağı ve suyu kirlenmesine sebep oldukları gibi, bulundukları alanlardan fiziksel ve biyolojik yollarla oldukça bölgelere kadar da taşınabilmektedirler. Herhangi bir pestisit hedefi dışındaki organizmaları tehdit etmesi ve su kaynaklarının kirlenmesi nedeniyle pestisit kalıntılarının incelenmesi ve teşhis edilmesi büyük önem taşımaktadır. Birçok çalışma, yüksek sıcaklıklarda pestisitlerin toksisitesinde bir artış olduğunu bildirmiştir. Fakat bu sinerjik etkinin sucul canlılar üzerinde nasıl bir sonuç oluşturacağını anlamak için detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır (Rohr vd., 2011; Jackson vd., 2016).

N-(fosfonometil) glisin olarak da adlandırılan glyphosate, tarımsal üretim sırasında yabancı ot kontrolünün sağlanması için geliştirilen geniş spektrumlu aktiviteye sahip olan bir herbisittir. Glyphosate, bitkilerin yaprakları tarafından alınarak bitkinin tamamına yayılmakta ve bu da birkaç gün sonra bitkinin ölümüne neden olmaktadır. Karasal ekosistemlerde kullanıldığı zaman toprağı sızan kalıntılar su ekosistemine kolay bir şekilde ulaşabildiğinden dolayı diğer organizmaları olumsuz yönde etkilemektedir. Bu sebeple, çevre kirliliğı meydana getirmekte ve canlıların sağlığını tehdit etmektedir (Kolpin vd., 2006). Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, 400 µg/L'in üzerindeki glyphosate konsantrasyonlarının amfibiler ve balıklar dahil olmak üzere bazı suda yaşayan türler için potansiyel olarak toksik olduğunu göstermiştir (Kolpin vd., 2006; Annett vd., 2014; Braz-Mota vd., 2015). Bunlara ek olarak deniz ekosistemlerinde de glyphosate'ın varlığı tespit edilmiştir ve deniz suyundaki kalıcılığı artık güncel bir araştırma alanı olmuştur. Glyphosate'ın toksisitesi hem doz hem de türe bağlı olarak

değişiklik gösterdiğinden dolayı su sistemlerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir (Tresnakova vd., 2021).

Balıkların çevresel kirleticilere karşı oldukça duyarlı olmaları ve ksenobiyotikleri metabolize edebilmeleri onları sucul ekosistem üzerindeki toksisite çalışmalarında kullanılan önemli bir model organizma haline getirmiştir (Sehonova vd., 2017). Bir çevresel kirletici olan pestisit toksisitesi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde; glyphosate'a dirençli mahsullerin bulunduğu tarım alanlarında son yıllarda önemli bir artış olduğundan dolayı hedefi dışındaki organizmalar üzerinde meydana getirebileceği olumsuz etkilerinin incelenmesinin önemli olduğu görülmektedir (Zanuncio vd., 2018). Bunlara ek olarak, hala bir endişe kaynağı olan bu bileşiğin toksisitesi ve olası zararları hakkında bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bu sebeplerden dolayı, ülkelerin su ortamlarında kullanımına verdiği glyphosate sınırlarının düzenlenmesine ilişkin çalışmaları vardır. Ayrıca, glyphosate kullanımını kontrol altına alabilmek veya daha az toksik herbisit formülasyonlarının geliştirilmesi için bu alanda çalışanları teşvik etmek için glyphosate veya glyphosate bazlı herbisitler (GBH) üzerinde daha fazla toksikolojik çalışmaya ihtiyaç vardır (Rodríguez-Gil vd., 2021). Zebra balığı (*Danio rerio*); biyokimya, sinirbilim ve toksikoloji gibi birçok biyolojik alanda yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir omurgalı model organizmadır (Dai vd., 2014). Tüm genomunun dizilenmiş olması, fizyolojik özellikleri ve laboratuvar çalışmalarında kullanım için uygun olması diğer önemli avantajlarıdır. Son zamanlarda, tarımsal kimyasalların öldürücü ve yarı öldürücü etkilerini zebra balıklarında değerlendirmek amacıyla teknikler ve protokoller geliştirilmiştir. Bunların dışında yapılan diğer çalışmalar glyphosate ve GBH maruziyetine bırakılan balıkların karaciğer, beyin, yumurtalıklar ve testis dahil olmak üzere birçok farklı organın herbisitten etkilendiğini göstermektedir. Bu konu üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, glyphosate ve GBH'nin küresel ısınmaya bağlı sıcaklık stresi altındaki etkilerinin moleküler temeli belirsizliğini korumaktadır (Jaramillo vd., 2018).

Pestisitler son yıllarda, tüm dünyada tarımsal üretimi iyileştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat yapılan çalışmalar düşük konsantrasyonlarda olsa dahi çevrede kalan pestisit kalıntılarının yüzey sularına sızarak sudaki yaşam için ciddi bir tehdit oluşturabileceğini kanıtlamıştır (Zhang vd., 2022). Sucul organizmalar, deri veya solungaçlar yoluyla sudan doğrudan alım ve kontamine gıdaların ve asılı parçacıkların yutulması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla pestisitlerin biyobirikimine

maruz kalabilmektedirler. Yapılan alışmalar pestisit maruziyetinin maruz kalan balıklarda olumsuz değişikliklere neden olabileceğini ve bu değişikliklerin maruziyet sona erdikten sonra bile uzun süre devam edebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, özellikle erken geleişme aşamasında tarım kimyasallarına maruz kalmanın akuatik organizmaların sağlığının uzun vadede etkileyip etkilemediğini belirlemek için geri kazanım belirteçleri kullanarak, pestisitlerin ekotoksikolojik risklerinin değerlendirilmesi konusunda bilimsel araştırmaların yapılması oldukça önemli ve gereklidir (Korkmaz vd., 2018; Eadie vd., 2020). Bir model organizma olan zebra balığı da kimyasal kirleticilerin ve pestisitlerin geri kazanım veya bozulma proseslerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Chang vd., 2020).

Çeşitli balık türlerinde glyphosate'ın etkileri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu çalışmalar, fizyolojik fonksiyonları ve toksik maddelere karşı davranışsal tepkileri etkileyen sıcaklık gibi hayati bir parametreyi gözden kaçırmıştır. 2015 yılında yaptığımız yüksek lisans tez çalışmasında, zebra balığı embriyolarına 1, 5, 10 ve 100 mg/L dozlarında glyphosate uygulanmış ve embriyonik geleişim dönemindeki morfolojik bozukluklar tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre artan glyphosate konsantrasyonuna paralel olarak gözlenen morfolojik bulguların sayısının da arttığı tespit edilmiştir (Sulukan, 2015; Sulukan vd., 2017). Literatürdeki veriler ve önceki çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak bu çalışmamızda, birlikte etki gösteren iki çevresel stresör olan pestisit toksisitesi ve sıcaklığın sinerjistik etkisini incelemeyi amaçladık. Bu kapsamda, zebra balıkları 28.5 – 29.0 – 29.5 – 30.0 C'lik dört farklı geleişme sıcaklığında 1 ve 5 ppm dozlarında 96 saatlik glyphosate maruziyetine bırakıldı. Maruziyet süresinin sonunda yetişkin balıklarda anksiyete ve sirkadiyen ritim davranış analizleri yapıldı. Daha sonra bu balıklardan alınan beyin örneklerinde histopatolojik, immunohistokimyasal ve metabolomik analizler yapıldı. Yetişkin balıklardan elde edilen yeni nesil larvalarda meydana gelen morfolojik değişimler incelendi ve glyphosate'ın toksisitesi test edildi. Bunlara paralel olarak, elde edilen ikinci nesilde davranış analizleri yapılarak glyphosate maruziyetinin oluşturduğu etki bir sonraki nesil üzerinde değerlendirildi. Bu tez çalışmasında bir zebra balığı modelinde ebeveyn sinerjik glyphosatea maruz kalma ve sıcaklık artışının ebeveynlerde ve gelecek nesil üzerindeki morfolojik, fizyolojik, davranışsal ve moleküler etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bir iyileşme sürecine tabi tutularak da oluşan toksisitenin hangi oranda giderildiği test edilmeye çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Sunulan tezin planlanmasında, laboratuvar çalışmaları ve tezin yazım aşamalarında faydalanılan literatürlerin özetleri aşağıda verilmiştir.

Küresel ısınmanın bir sonucu olarak su sıcaklığının artması, su ekosistemi için ciddi bir uyarıdır. Balıklar poikilotermik olduğundan artan su sıcaklığı metabolizma, büyüme, hayatta kalma, bağışıklık ve üreme gibi fizyolojik süreçlerini değiştirmektedir. Ayrıca, sıcaklık değişiklikleri, pestisitlerin oluşturduğu toksisite derecesini de etkilemektedir. Bu nedenle farklı sıcaklık rejimlerine maruz kalan canlılar üzerinde sıcaklığın etkisini belirlemek oldukça önemlidir.

Pestisitler gibi tarım kimyasallarının kullanımı modern tarımda sıkça kullanılan bir uygulama haline gelmiştir. Toprak hazırlama faaliyetleriyle ilişkili yabancı ot kontrolünü artırma çabasıyla, çiftçiler mahsul üretimini ve mahsullerinin verimini önemli ölçüde artırmışlardır. Fakat bu bileşikler, antropojenik aktivitelerde kullanılmaları ve sudaki çözünürlükleri dikkate alınarak suda yaşayan kirletici maddeler haline gelebilirler. Özellikle, herbisitler istilacı yabancı otları kontrol etmek için doğrudan uygulamaların yanı sıra tarımsal akış ve sızdırma süreçleri ile su ortamlarına ulaşabilirler. Bu nedenle herbisitler su ekosistemlerinde, çevresel kaliteyi düşürebilir, temel ekosistem ağlarını etkileyebilir, besin zincirlerini değiştirerek enerji akışı ve besin döngüsü modellerini bozabilir ve ekosistemlerin dinamiğini değiştirebilirler (Davico vd., 2021).

Yaptığımız çalışmada, sıcaklık stresi altında glyphosate uygulamasının davranışsal ve fizyolojik etkilerini ve sonraki nesiller üzerindeki gelişim toksisitesini incelemek amacıyla canlı materyal olarak bilimsel çalışmalarda model olarak tercih edilen zebra balığı kullanılmıştır. Zebra balıklarının anatomik yapısı, fizyolojik, hücresel ve genetik mekanizmaları diğer canlılar ile oldukça benzerlik göstermektedir. Bu nedenle de embriyonik gelişim aşamalarında toksik maddelerin etkilerinin araştırılmasında fazlaca kullanılan bir model haline gelmiştir (Sipes vd., 2011; Truong vd., 2012; Strähle vd., 2012; Binder ve Zon, 2013). Zebra balıklarının embriyonik gelişim süreçleri, kas, iskelet nöral ve kardiyovasküler sistemleri de memelilerle benzerlik göstermektedir (McCollum vd., 2011). Laboratuvar ortamında ucuz ve kolay bir şekilde üretilmektedirler ve şeffaf yumurtaları sayesinde döllenmeden kuluçka dönemine kadar embriyonal gelişimin aşamalarının kolayca araştırılabilmesine imkan vermektedirler. Bu avantajları, zebra

balığın gelişimsel biyoloji ve genetik gibi çeşitli biyolojik disiplinlerde sıkça kullanılan bir model organizma olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Scheil ve Kohler, 2009).

Zebra balıklarının (*Danio rerio*) embriyonik gelişimi üzerine tiyakloprid ve diazinon insektisitleri ile fiziksel bir stres etkeni olan yüksek sıcaklığın (28, 30 ve 33.5 °C) kombinasyonunun etkilerinin incelediği bir çalışmada, tiyaklopridin, kalp hızı dışında erken yaşam evresi parametreleri üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı görülürken, diazinona maruz kalmanın, yüksek sıcaklıkla beraber ölüm oranını önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. Bağımsız değişkenler olarak sıcaklık ve madde konsantrasyonu karışımlarının, kuluçka hızında da doza bağlı bir şekilde sinerjistik olarak etki gösterdiği bulunmuştur (Osterauer, 2008).

İmidakloprid ve klorpirifos pestisitleri ile bir metal tuzu olan nikel klorürün farklı sıcaklıklardaki (26 °C- 33.5 °C) toksik ve gelişimsel etkilerinin incelendiği bir çalışmada, test edilen tüm sıcaklıklarda, pestisitlerin en yüksek test konsantrasyonlarında (imidacloprid, 50 mg / l; chlorpyrifos, 1 mg / l) zebra balıklarının erken gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı görülürken, nikelin tüm sıcaklıklarda kuluçka hızında önemli bir düşüşe yol açtığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, yüksek sıcaklıkların *D. rerio* embriyoları üzerindeki NiCl₂ toksisitesini artırabildiğini ve her iki stresörün sinerjik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Scheil ve Kohler, 2009).

Zebra balıklarında üç sıcaklık rejimine (25 °C, 30 °C ve 35 °C) maruz kaldıktan sonra organofosfatlı bir pestisit olan sumithion'un akut toksisite tepkileri üzerine yüksek sıcaklığın etkilerini değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada, artan sıcaklıkla beraber sumithion'un kan eritrositlerinde mikronükleus sıklığını artırarak genotoksik etkilere sebep olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar, küresel ısınmaya bağlı sıcaklık artışının, sucul ekosistemdeki pestisitlerin ürettiği toksisiteyi büyük ölçüde etkilediğini göstermektedir (Shahjahan vd., 2019a).

Su organizmaları, kirleticiler ve iklim değişikliğinden kaynaklanan artan sıcaklıklar dahil olmak üzere çevrede çok sayıda strese maruz kalmaktadırlar. Balıklarda embriyonik gelişim ve yumurtadan çıkma sırasında artan sıcaklığın kimyasal kaynaklı toksisite ve lipid profilleri üzerindeki etkisini karakterize etmeyi amaçlayan bir çalışmada, zebra balığı embriyoları farklı sıcaklık rejimlerinde (28 °C ve 33 °C) bir mitokondriyal toksik madde olan 2,4-Dinitrofenol'e (DNP) maruz bırakılmıştır. Elde edilen verilerde düşük DNP konsantrasyonlarında sıcaklık ve öldürücülük arasında

pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar, sıcaklık stresinin toksik madde duyarlılığını artırabileceğini düşündürmekte ve toksisitenin altında yatan metabolik yolları karakterize etmek için lipidomiklerin faydasını göstermektedir (Dreier vd., 2021).

Zebra balıklarında bir derecelik sıcaklık artışının (28, 29, 30 °C) ve 100 nm boyutundaki polistiren plastik nanopartiküllerin sinerjik etkisinin araştırıldığı grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, nanoplastik maruziyeti ile birlikte 1°'lik bir sıcaklık artışının, zebra balıklarında sirkadiyen ritmi etkilediği, beyne zarar verdiği ve farklı yollaklarda toplam 18 metabolitin miktarında önemli değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar bir derecelik sıcaklık artışının bazı metabolik yolları bozarak beyinde dejenerasyonun önünü açtığını ve böylece nano-plastiğin davranış üzerindeki olumsuz etkilerini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Sulukan vd., 2022).

Bir fungusit olan flutolanil'in zebra balıklarının sirkadiyen ritimlerini ve ilgili mekanizmayı etkileyip etkilemeyeceğini belirlemeyi amaçlayan bir araştırmada, zebra balığı embriyoları 4 gün boyunca flutolanile (0, 0.125, 0.5 ve 2 mg/L) maruz bırakılmıştır. Elde edilen veriler, flutolanilin tüm gruplarda sirkadiyen saat genleri olan clock1a, bmal1a, bmal1b, bmal2 ve aanat2'nin ekspresyon seviyelerini inhibe ederek sirkadiyen ritimde bozulmalara sebep olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, dozdaki artışa paralel olarak larvaların kuluçka hızı ve vücut uzunluğunun flutolanil tarafından önemli ölçüde inhibe edildiği tespit edilmiştir (Yang vd., 2019b).

Piriproksifen (insektisit) maruziyetinin davranışsal parametreleri, hafızayı, kortizol seviyelerini, glukokortikoid reseptörünün (gr) ve kortikotropin salma faktörünün (crf) gen ekspresyonunu nasıl etkilediğinin analiz edildiği bir çalışmada yetişkin zebra balıkları 96 saat boyunca farklı piriproksifen konsantrasyonlarına (0.125, 0.675 ve 1.75 mg/L) maruz bırakılmıştır. Elde edilen veriler, piriproksifenin hareketi (mesafe veya ortalama hız), kaygı benzeri davranışı (tankın üst bölgesine girme gecikmesi veya tankın üst bölgesindeki süre) ve sosyal veya saldırgan davranışı değiştirmediğini göstermiştir. Fakat test edilen tüm piriproksifen konsantrasyonlarında engelleyici kaçınma belleğinde bozulma ve kortizol seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Birlikte ele alındığında bu bulgular, piriproksifenin, hedef olmayan bir tür olan zebra balığında bilişsel bozulmaya ve kortizol düzeylerinin değişmesine neden olabileceğini göstermektedir (Gusso vd., 2020).

Glyphosate bazlı herbisitlerin (GBH) piyasada bulunan ve en az zarar verebilecek pestisitler olduğu düşünülmektedir. Fakat yapılan son çalışmalar, birçok canlı türü üzerinde toksik etkilere sebep olabileceğini ve inanılanın aksine daha fazla zarar gösterebileceğini göstermiştir (Toss vd., 2017). Son yıllarda yapılan bazı araştırmalar, glyphosate'ın asetilkolinesteraz aktivitesini ve antioksidan sistemi etkileyerek sucul canlılar üzerinde nörotoksik etkilere sebebiyet verebileceğini belirtmiştir. Bundan dolayı sucul organizmaların embriyonik gelişimi sürecinde GBH'nin etkilerini tespit etmek git gide daha önemli hale gelmektedir (Fiorino vd., 2018; Bridi vd., 2017).

Glyphosate'ın sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; zebra balığı hücre hattına glyphosate türevli bir herbisit olan Roundup uygulanmış ve 67.7 µg/L dozda kullanıldığında plazma membranında önemli derecede bozulmaya sebep olduğu görülmüştür. Daha yüksek konsantrasyonlarda (135.4 µg/L ve 270.8 µg/L) kullanıldığında ise membran bütünlüğündeki bozulmanın daha da arttığı tespit edilmiştir (T. L. S. Goulart vd., 2015). Roundup ve glyphosate'ın balıkların üreme sistemi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada; zebra balıkları glyphosate (10 mg/L) ve Roundup'a (0.01, 0.5 ve 10 mg/L) maruz bırakılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 10 mg/L glyphosate ve Roundup'ın yumurta üretimini azalttığı, erken dönem embriyo ölümlerini ve yumurtadan erken çıkmayı ise artırdığı görülmüştür (Webster vd., 2014).

Yapılan bir çalışmada, RoundUp® UltraMax'ın zebra balığı embriyo gelişimi ve davranışsal parametreleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve en yüksek konsantrasyon olan 5 mg/L'nin, larvalarda davranışsal değişikliklere sebep olabileceği tespit edilmiştir (Contardo-Jara vd., 2009; Perez vd., 2017). Benzer bir çalışmada, zebra balıkları 10 mg/mL'ye kadar olan dozlarda saf glyphosate'a maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, glyphosate'ın larvalarda nöronal hasara sebep olarak lokomotor aktiviteyi bozabileceğini göstermiştir. Bu sebeple, embriyonik gelişim sürecinde GBH'a maruz kalan zebra balıklarında meydana gelebilecek davranışsal etkilerin mekanizmasını anlayabilmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir (Zhang vd., 2019).

Davranış analizleri genel olarak çeşitli kimyasal ve toksik sayılabilecek ajanlara maruz kalma sonucunda ortaya çıkabilecek kaygı ve korku davranışları gibi değişimleri tespit etmek için kullanılmaktadır. Bu konu üzerine yapılan bir çalışmada, görsel bir uyarının mevcut olduğu bir durumda zebra balıklarında davranışsal tepkilerde önemli değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. En yüksek Roundup konsantrasyonuna maruz

kalmanın 144 hpf larvada anksiyete ve korku tepkilerinde yetersizlikler meydana getirdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, glyphosate'ın merkezi sinir sistemi gelişiminde değişiklikler meydana getirmiş olabileceğini göstermektedir. Bu değişimler, pestisitlerin larvaların tehlikeyi algılama yeteneğini azalttığını ve avlanmaya daha açık hale getirdiğini gözler önüne sermiştir (Bridi vd., 2017).

GBH'ler, retinoik asit sinyal sisteminde bozulmalara sebep olarak omurgalı embriyoları üzerinde teratojenik etkilere sebep olmaktadır. Yapılan bir araştırmada, Roundup'ın *Corbicula fluminea*'da glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini ve lipid peroksidasyonunu (LPO) artırdığı, katalaz (CAT) aktivitesini ise azalttığı görülmüştür. Ayrıca, 10 mg/L glyphosate'a 21 gün boyunca maruz kalan zebra balıklarında da yumurta üretiminin azaldığı ve erken dönem embriyo ölümlerinin arttığı görülmüştür (Bridi vd., 2017).

Yapılan bir diğer araştırmada, dişi catfish *Rhamdia quelen*'in üreme sistemi üzerinde glyphosate'ın olumsuz etkileri olabileceği bildirilmiştir. Fakat dişi balıkların üreme sistemi üzerindeki etkilerine dair bulgular oldukça yetersizdir (Soso vd., 2007). Çevresel kirleticiler genel olarak ilk başta su ekosistemlerine salınmaktadırlar. Bu nedenle, su ekosistemlerindeki canlılar üzerindeki toksikolojik etkilerini araştırmak oldukça önemlidir. Bununla birlikte, bu çalışmalar özellikle yumurtalıklar üzerindeki etkileri değerlendirmek açısından da değerlidir (Hoivik vd., 2010; Armiliato vd., 2014).

Zebra balıklarında glyphosate'ın toksik etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, maruziyet sonrasında oosit olgunlaşmasında önemli ölçüde inhibisyon görülmüştür. Fakat glyphosate'ın oosit olgunlaşması üzerindeki olumsuz etkisinin sebebi net olarak bilinmemektedir bu nedenle etki mekanizmalarını belirlemek için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Maskey vd., 2019). Glyphosate'ın hayvanlardaki üreme sistemi üzerindeki etkilerinin incelendiği başka bir araştırmada, herbisitlerin dişi balıklarda cinsiyet hormonu seviyelerinde değişimler, yumurta üretimi ve hayatta kalma oranında azamalara sebep olduğu, sperm kalitesini de düşürdüğü tespit edilmiştir (Lopes vd., 2014).

Yapılan araştırmalar, herbisitlerin kolinerjik sistem üzerinde de etkilere sebep olarak beyin ve kas asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinde de bir azalma meydana getirdiğini göstermiştir. Herbisitler, AChE üzerindeki doğrudan bir etkiye sahip olmasına ek olarak hücrelerde oksidatif stres oluşturarak serbest radikallerin miktarını da

artırmaktadır. Diğer balık türlerinde yapılan bazı çalışmalar ise GBH'nin AChE aktivitesinde bir inhibisyona sebep olduğunu göstermiştir (Lanzarin vd., 2019). Glyphosate bazlı formülasyonlar, birçok yetişkin balıkta oksidatif stresin indüklenmesi ile de ilişkilendirilmiştir. Yüksek toksisite durumunda, antioksidan savunma mekanizmasında meydana gelen yetersizlikler DNA hasarında bir artışa sebep olabilmektedir (Lanzarin vd., 2019).

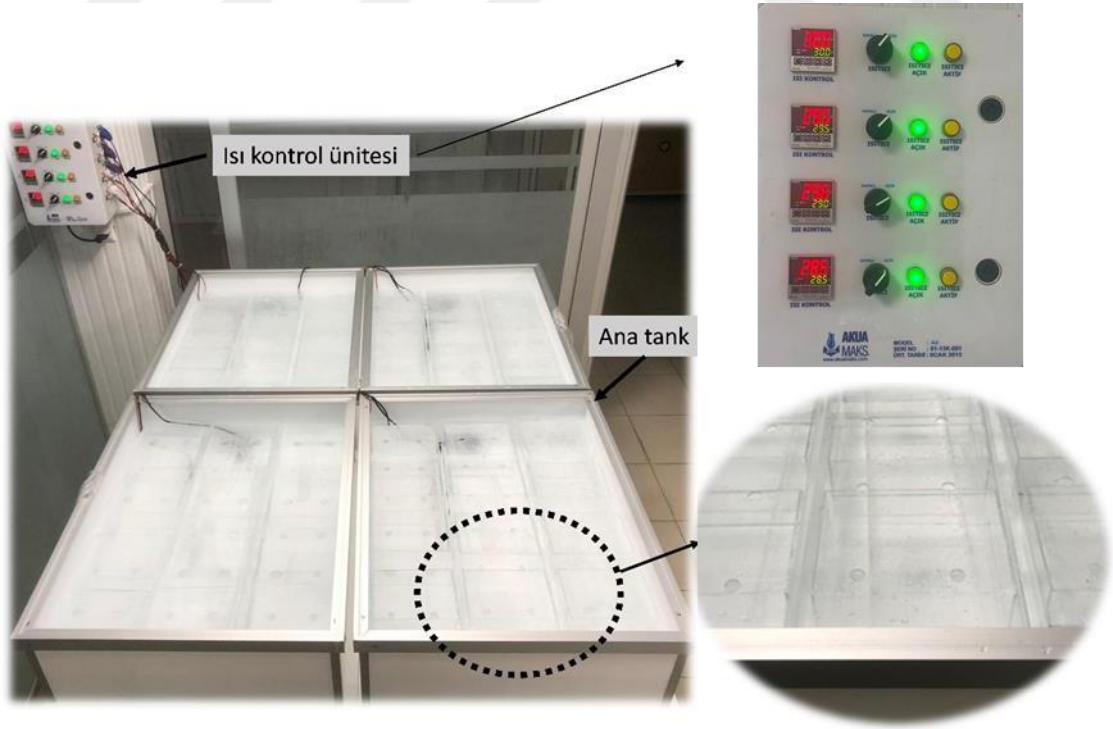
Tarım alanlarında yabancı ot kontrolü için sıklıkla kullanılan GBH'lerin, uygulanmasından uzun zaman sonra bile yakınlarda bulunan su ortamlarında varlığı tespit edilmiştir. Fakat Avrupa Kimyasal Ajansı, glyphosate'ı mutajen, kanserojen veya üreme toksisitesine sebep olabilecek bir kimyasal olarak kabul etmek için yeterli bilimsel kanıtın olmadığını ve bu alanda daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç olduğunu belirtmiştir (Székács ve Darvas, 2018).

3. MATERYAL ve METOT (BÖLÜM I)

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme Ortamının Oluşturulması

Araştırma, Tarım Bakanlığı tarafından onaylı Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Deneysel Araştırma Birimi bünyesinde bulunan zebra balığı deneme ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Kapalı devre zebra balığı ünitesinde üretilen ve 10 saat karanlık 14 saat aydınlık fotoperiyodunda tutulan araştırma balıkları, döllenmeyi takip eden 10. güne kadar paramecium ile 10. günden itibaren günlük canlı (*Artemia salina*) ve pul yem ile beslenmiştir (Westerfield, 2000). Çalışma Şekil 1’de görseli verilen düzenek kullanılarak yürütülmüştür. Düzenekteki ana tankın içerisine 20x12x15 cm (en; boy; yükseklik) ölçülerinde akvaryumlar yerleştirilmiştir. Ana tank, akvaryumların hareket etmeyeceği seviyede su ile doldurularak, ısı kontrol ünitesine bağlı ısıtıcı ve sensör sayesinde her bir ana tanktaki akvaryumlardaki su sıcaklığı sırasıyla 28.5 – 29.0 – 29.5 – 30.0 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Mevcut sistem birimimizde aktif olarak kullanılmakta olup, ana tank içerisindeki su sirkülasyonu sayesinde akvaryumlar için sıcaklık ± 0.5 °C hassasiyetle stabil tutulmuştur.



Şekil 2. Çalışmanın yürütüldüğü tank düzeneği.

3.1.2. Balık Materyali

Yapılan çalışmada, toksikoloji çalışmalarında sıkça kullanılan bir model organizma olan AB genotipli zebra balığı (*Danio rerio*) kullanılmıştır. *Cyprinidae* familyasına ait bir tür olan zebra balığı, sıklıkla Güneydoğu Asya, Pakistan ve Hindistan’da bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, Oregon Üniversitesi (ABD) Uluslararası Zebrafish Merkezi’nden (ZIRC) ticari olarak temin edilen wild-tipe AB genotipli zebra balıkları (*Danio rerio*) kullanılmıştır.



Şekil 3. Denemede kullanılan 6 aylık AB genotipli zebra balıkları (*Danio rerio*)

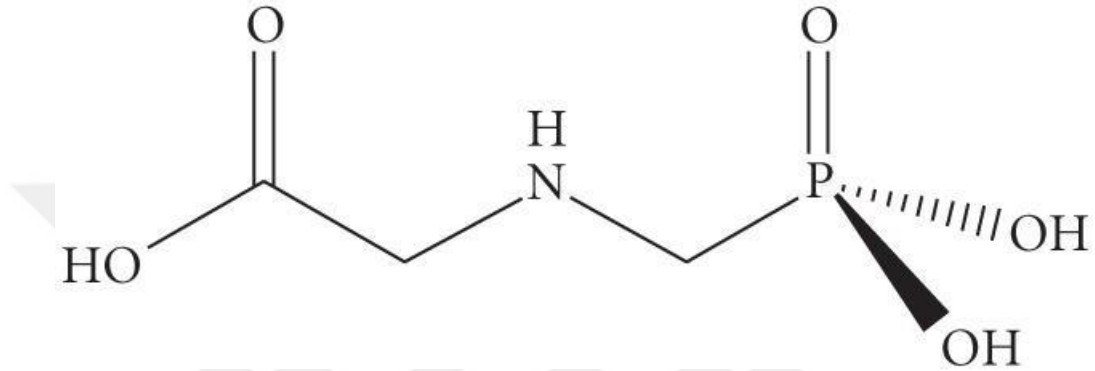
Taksonomik sınıflandırması;

- Familia: Cyprinidae
- Genus: Danio
- Species: *Danio rerio* şeklindedir (Detrich vd., 2016).

Zebra balıklarının AB genotipi daha güzel görünümlü ve sağlıklı yavrular elde etmek amacıyla ilk olarak 70’li yıllarda Oregon Üniversitesi’ndeki araştırmacılar tarafından ıslah edilmiştir. Daha sonra bu genotip, özellikle moleküler biyolojide yeni ve teknolojik yöntemlerin gelişmesi ile birlikte toksikoloji çalışmalarında ideal bir model olarak kullanılmaya devam etmiştir.

3.1.3. Uygulanan Kimyasal

Çalışmada, ticari olarak temin edilen glyphosate kullanılmıştır. Daha önce yapılmış çalışmalar ve laboratuvarımızda yaptığımız ön denemeler dikkate alınarak belirlenen 1 ppm ve 5 ppm olmak üzere iki doz uygulanmıştır. Tez çalışması, doza bağlı bir toksisite analizinden ziyade, düşük sıcaklık değişimlerinin bu dozların toksisiteleri üzerine etkilerinin araştırılması üzerine kurgulanmıştır.



Şekil 4. Glyphosate'ın kimyasal yapısı (Prasad vd., 2009).

3.2. Yöntem

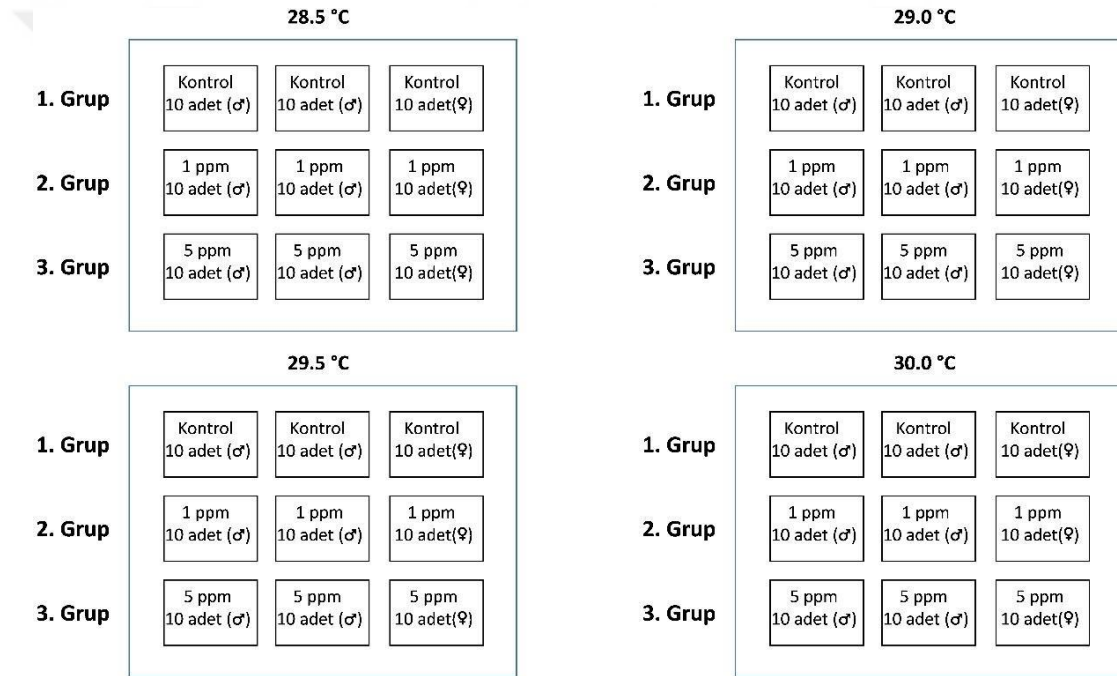
3.2.1. Çalışma Kurgusu

Çalışmada 4 farklı sıcaklık ve her sıcaklık için 3 grup kullanılmıştır. Her grup için 3 tank kullanılmış ve her bir tankta 10 adet olacak şekilde toplam 30 adet (20 erkek: 10 dişi) balık tanklara yerleştirilmiştir (Şekil 5). Deneylere başlamadan önce balıkların, en az 15 gün süreyle ortama alışması sağlanmış ve standart diyet (artemia ve pul yem) ile günde üç kez beslenmiştir. Aklimasyon aşamasında sıcaklıklar kademeli olarak artırılmış ve bu şekilde en son kullanılacak olan sıcaklığa ayarlanmıştır.

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuştur.

Tablo 1. Çalışmada kullanılacak olan kontrol ve muamele grupları

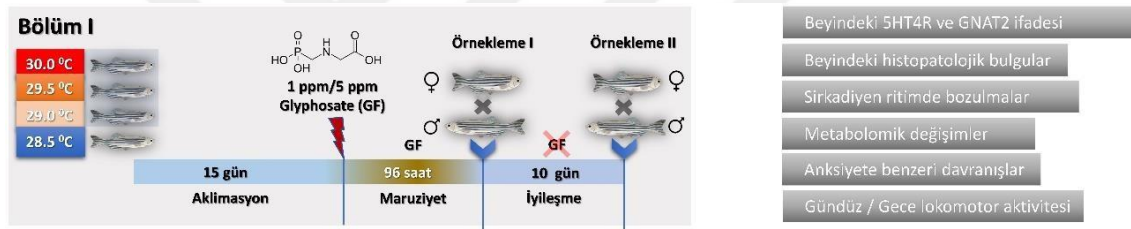
1. Grup (Kontrol)	Bu deney grubunda bulunan balıklara hiçbir uygulama yapılmamıştır.
2. Grup (Muamele 1)	Bu deney grubunda bulunan balıklara son konsantrasyonu 1 ppm olacak şekilde glyphosate uygulanmıştır.
3. Grup (Muamele 2)	Bu grupta bulunan balıklara son konsantrasyonu 5 ppm olacak şekilde glyphosate uygulanmıştır.



Şekil 5. Tez çalışması grup organizasyonu.

Oluşturulan gruplardan kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmazken, muamele gruplarına her sıcaklık için son konsantrasyonu 1 ve 5 ppm olacak şekilde 96 saatlik akut glyphosate maruziyeti gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her bir doz için kullanılacak olan glyphosate dozu çalışmanın başında hesaplanmış ve suda çözülerek balıklara uygulanmıştır. Çalışma süresi boyunca glyphosate içeriğini sabit tutmak için içerik hergün aynı saatte yenilenmiştir. Çalışmada kullanılan dozlar 2015 yılında yaptığımız tez çalışmasından ve literatürlerden elde edilen veriler dikkate alınarak seçilmiştir (Sulukan, 2015; Sulukan vd., 2017). Maruziyet süresinin sonunda; her gruptan 5 erkek ve 4 dişi

olmak üzere toplam 9 balık için yeni tank dalış testi (anksiyete analizleri için) ve 6 balık için de sirkadiyen ritim testi yapılmıştır. Sonrasında balıklar yeni nesil analizler için üremeye bırakılmış ve yumurta alınmıştır. Testler yapıldıktan ve yumurtalar alındıktan sonra her örneklemede her tekrardan rastgele seçilen on balığın beyin dokuları disekte edilip çıkarılarak metabolom analizleri için -80 °C’de muhafaza edilmiştir. Her örneklemede her tekrardan rastgele seçilen on balığın beyin dokuları ise, histopatolojik analizler için %4 lük formaldehit içerisine alınarak +4 °C’de saklanmıştır. Örnekleme sonrasında geriye kalan 15 balık 10 günlük iyileşme (recovery) süreci için pestisit içermeyen koşullara aktarılmış ve kendi sıcaklıklarında muhafaza edilmiştir. 96 saatlik maruziyetin sonrasındaki 10 günlük glyphosate bulunmayan ortamda iyileşme süreci boyunca tüm tank suyunun 2/3’si yeni hazırlanmış aynı sıcaklıktaki su ile günlük olarak yenilenmiştir. İyileşme süreci sonrasında da aynı şekilde tüm analizler yapılarak balıklardan yumurta alınmış ve yeni nesil analizler için kullanılmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Çalışma kurgusu özeti.

3.2.2. Yetişkin Davranış Testleri

96 saatlik maruziyet süresinin sonunda akut glyphosate uygulamasının anksiyete ve sirkadiyen ritim üzerindeki etkisini değerlendirmek için yetişkin zebra balıklarında yeni tank ve sirkadiyen ritim testi yapılmıştır. 96 saatlik maruziyetinin ardından 10 gün boyunca iyileşme sürecinde kalan balıklarda da bu analizler yapılmıştır. Daha sonra balık davranışlarını izlemek için EthoVision XT yazılımı kullanılmıştır (Cachat vd., 2010).

3.2.2.1. Yeni Dalma Tank Testi

Yeni tank aparatı tipik olarak yatay olarak üst ve alt bölgeye bölünmüş dar bir tanktan oluşmaktadır. Ergin balıklar için anksiyete testi, Şekil 7’de ölçüleri verilen dalma tank kullanılarak 10 dakika boyunca balığın hareketlerinin izlenmesi ve balığın lokomotor aktivitesinden gelen anksiyete ilişkili davranışlarının irdelenmesi esasına dayanmaktadır (Egan vd., 2009). Bu amaçla çalışmamızda tüm gruptaki balıklar teker teker bir dalma tankının içerisine yerleştirilerek 10 dk boyunca hareketleri izlenmiş ve

tanktaki balığın hareketi bir kamera yardımıyla bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Daha sonra EthoVision yazılımı üzerinden dalma tankının alt ve üst kısımları zon olarak belirlenerek, hayvanın alt ve üst kısımda geçirdiği toplam süre, alt üst kısımlar arası geçişlerinin sayısı, düzensiz hareketleri (balığın yüzme sırasında yönünün ve hızının ani ve keskin bir şekilde tekrar tekrar değişmesi), durgunluğunun (solungaç ve gözler dışında balığın hareketlerinin bir saniye veya daha fazla süreyle tamamıyla durması) süresi ve sayısı gibi yüzme davranışları aynı yazılım üzerinden analiz edilmiştir (Egan vd., 2009; Hamilton vd., 2017). İncelenen bu hareketlerden alt kısımda fazla zaman geçirilmesi, tankın üst kısmına ulaşması için geçen sürenin uzunluğu veya düzensiz hareketlerin frekansı gibi davranış parametreleri yazılım üzerinden değerlendirilerek balıkların anksiyete seviyeleri hakkında yorumlar yapılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir (Cachat vd., 2011; Stewart vd., 2012; Nguyen vd., 2014).

3.2.2.2. Sirkadiyen Ritim Testi

Sirkadiyen ritimler, günlük çevresel değişiklikleri tahmin etmek için canlı organizmaların fizyolojisini ve davranışını uyarlamada merkezi bir rol oynayan hücre içi zaman izleme sistemlerine dayanmaktadır. Mevcut çalışmada, hem 96 saatlik glyphosate maruziyeti hem de iyileşme süresi sonrasında balıkların uyku/uyanma davranışlarını değerlendirmek için sirkadiyen ritim testi yapılmıştır. Uyku-uyanıklık davranışları, zebra balıkları için özel olarak tasarlanmış bir sirkadiyen ritim odası kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneyler, sıcaklık ve ışık kontrollü bir sistem içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 7). Sistem üzerindeki ışık kontrolü 14 saat aydınlık 10 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Işık ve karanlık döngü için sırasıyla, bir zamanlayıcı tarafından kontrol edilen beyaz renkli LED'ler ve IR LED'ler kullanılmıştır. Kayıt için kullanılan kamera ise gece ve gündüz süresi boyunca hareketleri kaydedip bilgisayar ortamına aktarılabilecek şekilde dizayn edilmiştir. Düzenek hazırlandıktan sonra glyphosate maruziyeti tamamlanan yetişkin balıklar, 21 cm x 12 cm boyutlarındaki tanklara her birinde 3 balık olacak şekilde aktarılmıştır. Tanklar sıcaklık kontrollü bir inkübatörde tutulmuştur (28.5°C, 29.0°C, 29.5°C ve 30.0°C). Daha sonra, yüzen zebra balıklarının lokomotor aktivitelerini yansıtan kat edilen toplam mesafe (cm), toplam ortalama hız (cm/s), balığın açısal yer değiştirmesinin zaman aralığına oranı olarak hesaplanan ortalama açısal hız (0/s) ve sabit bir yön veya yol olmadan yapılan hareket olan kıvrılma (0/m) parametreleri değerlendirilmek için balıkların tüm hareketleri 24 saat

boyunca kayıt altına alınmıştır. Daha sonra kayıtlardan içinde her 60 dakikada 60 saniyelik bölümler EthoVision XT yazılımı ile analiz edilmiştir (Sarasamma vd., 2019).



Şekil 7. Ergin balık anksiyete testinde kullanılan dalma tankı (Egan vd., 2009) ve sirkadiyen ritim test sistemi.

3.2.3. Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik analizler için çalışma sonunda her örneklemede her tekrardan rastgele seçilen beş balığın beyin dokuları %10' luk formaldehit solüsyonunda 48 saat süreyle tespit edilip, rutin doku takip işlemlerinin ardından parafin bloklara gömülmüştür. Daha sonra 4 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksin-eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Olympus BX 51, JAPONYA). İncelenen kesitler histopatolojik özelliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilmiştir (Türkoğlu vd., 2021).

3.2.4. İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal analizlerde anksiyete ile ilişkili olan 5HT4 (5-Hydroxytryptamine receptor 4) ve sirkadiyen ritim ile ilişkili olan GNAT2 (Guanin nükleotid bağlayıcı protein G (t) alt birimi alfa-2) proteinlerine ait antikorlar kullanılmıştır. İmmunohistokimyasal inceleme için histopatolojik analizler için parafin bloklarda gömülmüş olan dokulardan 4 µm kalınlığındaki kesitler adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınarak deparafinize ve dehidre edilmiştir. Ardından % 3'lük H₂O₂'de 10 dk tutularak endojen peroksidaz inaktive edilmiştir. Daha sonra dokular %1' lik antijen retrieval (sitrat buffer (pH⁺6.1) 100X) solüsyonunda kaynatılmıştır. Dokularda nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için kesitler protein blok ile 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından dokulara primer antikorlar (5HT4 Kat No: ab60359, Sulandırma Oranı: 1/100, UK) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edilmiştir. Sekonder işaretleyici olarak immunfloresans sekonder antikor kullanılıp (FITC Cat No: ab6785

Dilüent Oranı: 1/1000) karanlık ortamda 45 dk bekletilmiştir. Ardından dokulara ikinci primer antikorlar (GNAT2 Kat No: bs-11560R, Sulandırma Oranı: 1/100, US) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun bir şekilde inkübe edilmiştir. Sonrasında sekonder antikor ile muamele edilerek (Texas Red Cat No: ab6719 Dilüent Oranı: 1/1000 UK) karanlık ortamda 45 dk süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra kesitlere mounting medium' lu DAPI (Kat no: D1306 Sulandırma Oranı: 1/200 UK) damlatılıp 5 dk karanlık ortamda bekletildikten sonra kesitler lamel ile kapatılmıştır. Boyanan kesitler floresans ataçmanlı mikroskopta (Zeiss AXIO ALMANYA) incelenmiş ve veriler ZEISS Zen Imaging Software programında değerlendirilmiştir (Sokmen vd., 2020)

3.2.5. Metabolom Analizleri

Glyphosate muamelesi yapılmış gruplar ve iyileşme grupları için her örneklemede her tekrardan rastgele seçilen beş balığın beyin dokuları alınmış ve metabolom analizlerinde kullanılmak üzere sıvı azot içerisinde dondurularak kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Metabolom analizlerinde iki balığa ait aynı dokular birleştirilerek (havuz yapılarak) tek numune (her akvaryumdan 5, her gruptan 15 numune) olarak değerlendirilmiştir. Tüm numuneler nazıkçe toplanmış ve deplastize edilmiş bir mikrosantrifüj tüpünde saklanmıştır. İki numune bir araya toplanarak 1 mL metanol içinde Tissulyzer model homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiştir. Havuzlanan numuneler, metanol içinde iki tekerrür olacak şekilde 2 dakikalık parçalanma prosedürüne maruz bırakılmıştır. Daha sonra dokuların içindeki hücrelerin de parçalanması için örnekler -20 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Havuzlanan her numune için 10 dakikalık sonikasyon işlemi yapılmıştır. Son olarak numuneler 12500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant nazıkçe alınmıştır. Ekstraksiyon solüsyonu, vakum altında buharlaştırılmıştır ve mobil faz ile kalıntı yeniden oluşturulmuştur. QC (kalite kontrol) numuneleri, her numuneden 5 µL pipetleme yapılarak elde edilmiştir. Tüm örnekler Q-TOF (Kuadrupol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) analizine kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Metabolomik çalışma, Agilent 6530 Q-TOF spektrometresi ile sürdürülmüştür. Pozitif iyon modunda çift AJS ESI iyon kaynağı tercih edilmiştir. MS absorbans eşiği 250 olarak belirlenmiştir. Toplam çalışma süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir. Metabolitlerin elüsyonu Zorbax Eclipse C18 kolonu ve asetronitril (%0.1 FA) ve su (%0.1 FA) ile gradyan elüsyonu yoluyla sağlanmıştır. Tarama hızı 6 spektrum/sn ve kütle aralığı

50-1500 m/z arasında olacak şekilde düzenlenmiştir. Enjeksiyon hacmi 6 µL olarak belirlenmiştir. Metabolitlerin teyidi için, aynı m/z aralığında QC numunelerinin MS/MS spektrumları da elde edilmiştir. Q-TOF MS/MS analizi için toplam çalışma süresi, her numune ve QC için yaklaşık 15 dakika olarak belirlenmiştir. Akış hızının 400 µl/dak olduğu lineer gradyan elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Koşullar şu şekilde özetlenmiştir: Mobil faz A'nın %95'i (H₂O (%0,1 v/v Formik asit)) 0.5 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır, ardından mobil faz B (CH₃CN (0.1% v/v Formik asit)) için 3.5 dakikada %2'den %20'ye ve sonrasında 4 dakikada %20 ila %95 B'ye bir yükselme yapılmıştır. %95 solvent B'nin koşulları 1 dakika tutulmuştur ve 2.75 dakika tutulan başlangıç koşullarına geri dönmek için 0.25 dakikalık bir gradyan kullanılmıştır. Toplam çalıştırma süresi, her çalıştırma için yaklaşık 15 dakika sürmüştür (Senol vd., 2019; Doğan vd., 2021).

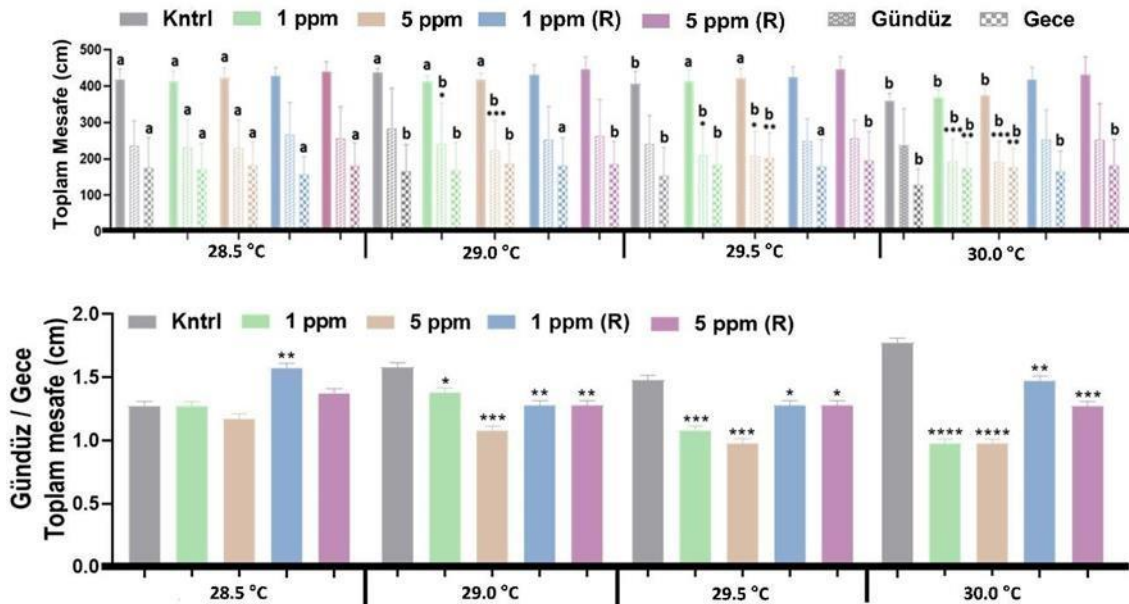
4. ARAŞTIRMA BULGULARI (BÖLÜM I)

4.1. Yetişkin Zebra Balığı Analizleri

4.1.1. Davranış Analizleri

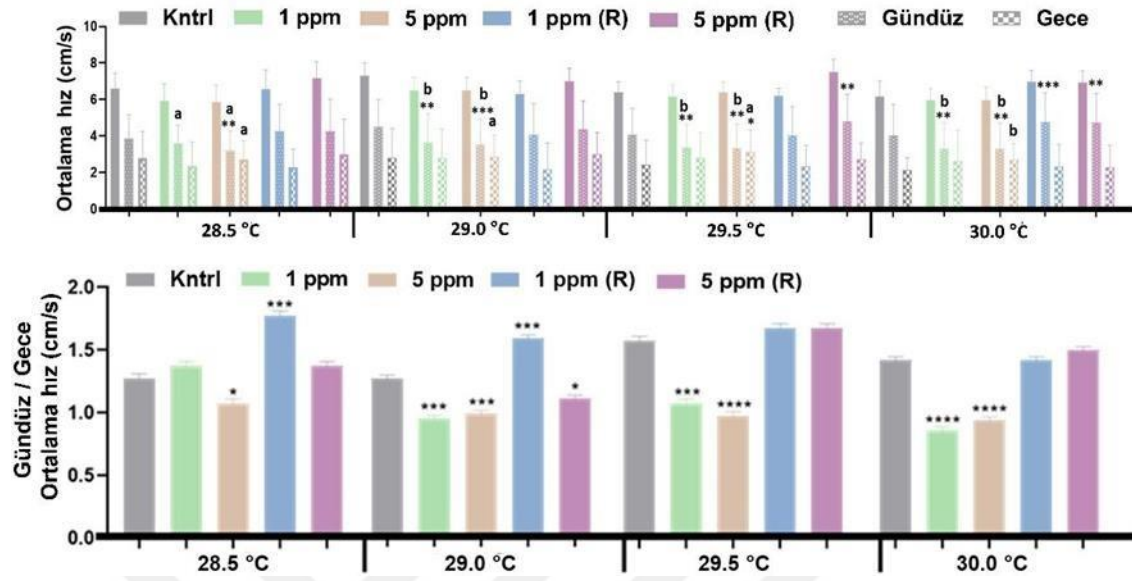
4.1.1.1. Sirkadiyen Ritim Testi Analiz Sonuçları

Zebra balığı, özel saat ve fotoreseptör bölgeleri dahil olmak üzere beyin fonksiyonel gelişiminin moleküler temelli aydınlatılması nedeniyle sirkadiyen ritim araştırmalarında kullanılan bir model haline gelmiştir (Vatin vd, 2011). Bu çalışmada sıcaklık stresi altında glyphosate'a maruz kalan zebra balıklarında dozlara bağlı olarak sirkadiyen ritim hareket aktivitesindeki değişimler incelendiğinde, uyku-uyanıklık döngülerinin doz ve sıcaklık artışına bağlı olarak bozulduğu görülmüştür. Elde edilen veriler her sıcaklık için dozlar arasındaki değişimleri ve sıcaklıklar arasındaki farklılıkları tespit edecek şekilde kıyaslanmıştır. Sirkadiyen ritim analiz sonuçları incelendiğinde balığın genel motor fonksiyonunu gösteren toplam katedilen mesafenin uygulanan doz ve sıcaklık artışına bağlı olarak aydınlık fazda azaldığı, karanlık fazda arttığı belirlendi (Şekil 8).



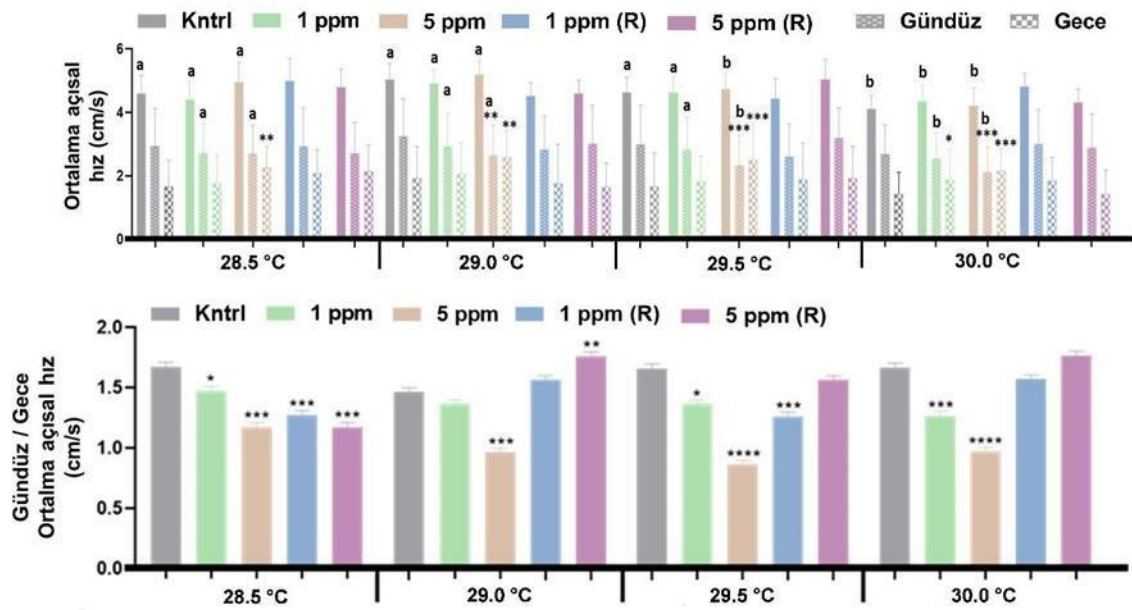
Şekil 8. Toplam mesafenin aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Kat edilen toplam mesafenin toplam zamana bölünmesiyle ölçülen ortalama hız için benzer sonuçlar elde edildi (Şekil 9).



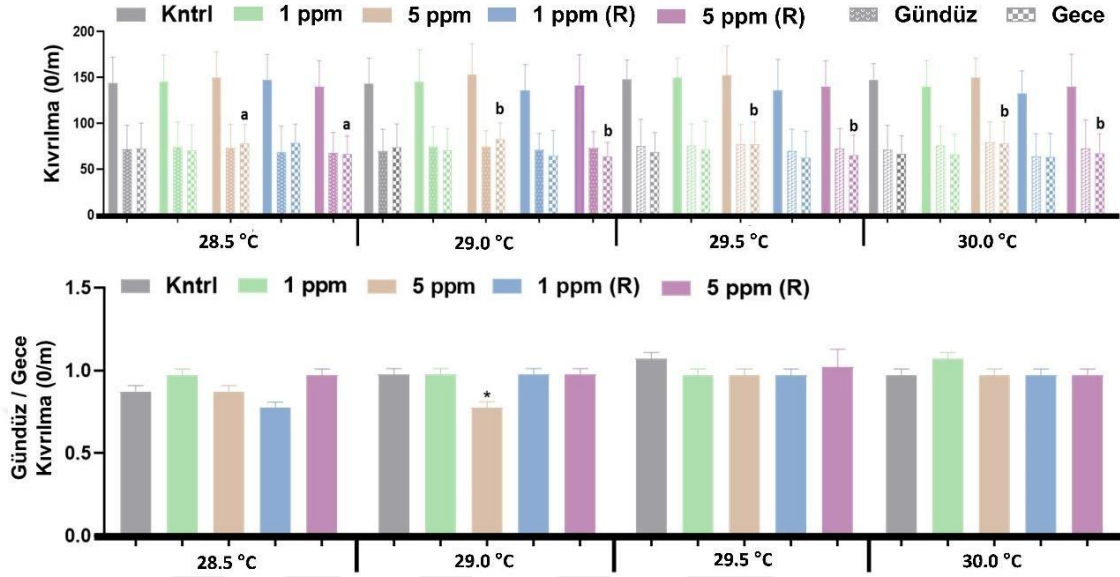
Şekil 9. Ortalama hızın aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Balığın açılma yer değiştirmesinin zaman aralığına oranı olarak hesaplanan ortalama açılma hız incelendiğinde ise dozadaki artışla paralel olarak aydınlık fazda önemli oranda azaldığı gözlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Ortalama açılma hızın aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

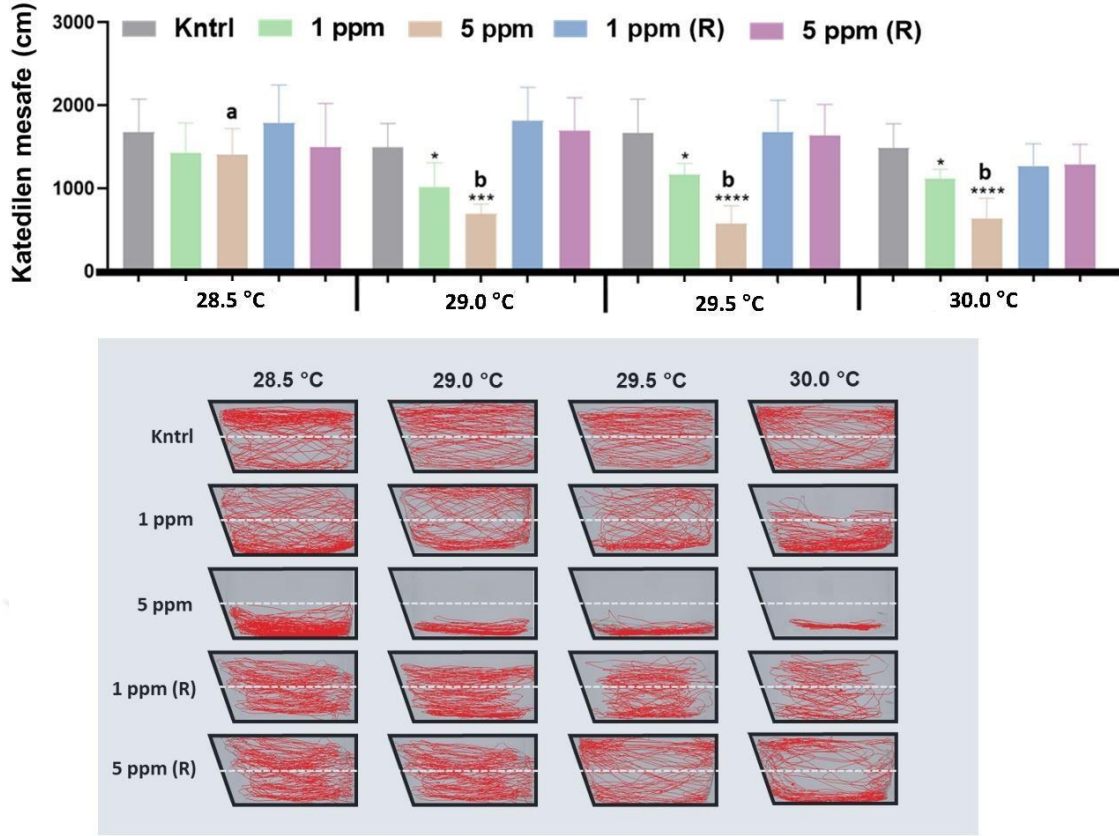
Zebra balığının sergilediği kıvrılma benzeri hareketleri incelendiğinde ise aydınlık fazda 5 ppm glyphosate'ın artan sıcaklıkla beraber kıvrılma hareketinde bir artışa sebep olduğu gözlenirken karanlık fazda herhangi bir değişim görülmemiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Kıvrılma parametresinin aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

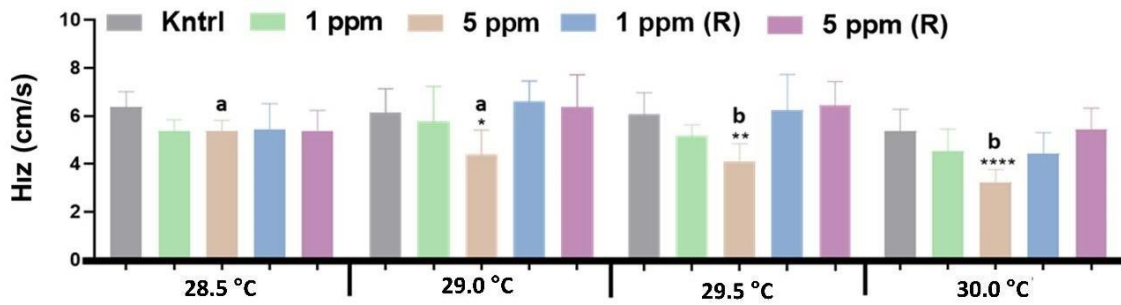
4.1.1.2. Yeni Tank Dalış Testi Analiz Sonuçları

Zebra balıklarında glyphosate maruziyetinin anksiyete üzerindeki etkisi her anksiyete parametresi için ayrı ayrı analiz edilerek incelenmiştir. Katedilen mesafe; zebra balıklarının yeni tank içinde kat ettiği toplam mesafeyi ifade etmekte ve genel motor/nörolojik fenotipleri yansıtmaktadır. Yapılan çalışmada, her sıcaklık için dozlar arasındaki değişim incelendiğinde sıcaklık ve dozdaki artışla beraber katedilen mesafenin önemli derecede azaldığı görülmüştür (Şekil 12).



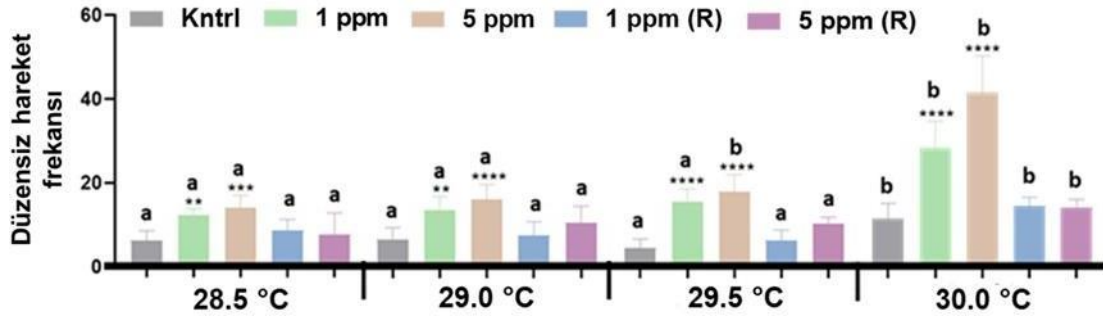
Şekil 12. Yeni tank dalış testi sonrası kat edilen toplam mesafenin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Zebra balığı yüzme hızını ifade eden hız parametresinde de benzer sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 13). İyileşme gruplarında ise hem doz hem sıcaklık yönünden karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir.



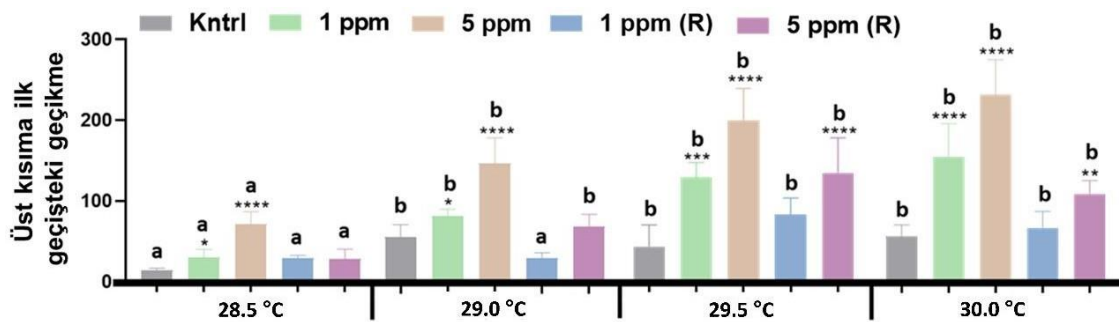
Şekil 13. Yeni tank dalış testi sonrası hızın gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Düzensiz hareket frekansı, hareket yönünde keskin veya ani değişiklikleri ifade etmektedir. Artan korku/endişeyi gösterir ve genellikle stresli zebra balıklarında daha yüksektir (Kalueff vd., 2013). Yapılan çalışmada, sıcaklık ve doz arttıkça düzensiz hareketlerin de arttığı görülmüştür (Şekil 14).



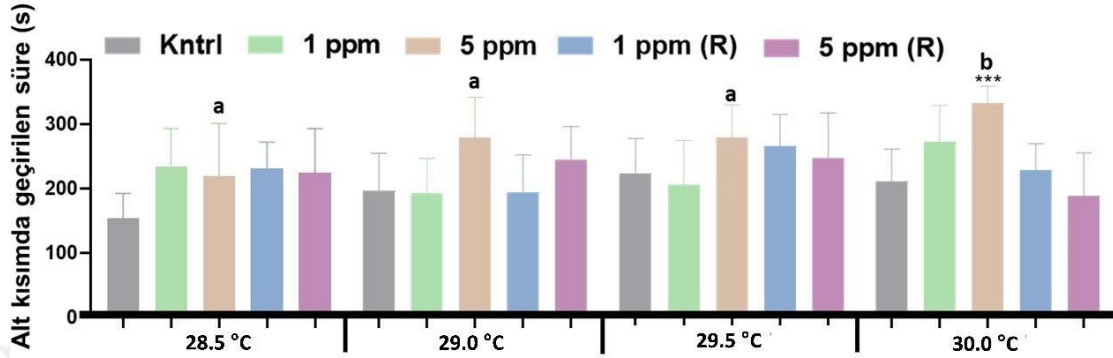
Şekil 14. Yeni tank dalış testi sonrası düzensiz hareket frekansının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Üst kısma geçişteki gecikme; yeni tankın tanımlanan alt kısmından üst kısmına (gövdenin kütle merkezine göre) ilk geçiş için geçen süreyi ifade etmektedir. Yeni bir ortamla tanıştırıldığında, zebra balığı doğal olarak tankın dibine dalar ve test ortamına alıştıkça yavaş yavaş araştırır ve yukarılara çıkmaya başlar. Daha uzun gecikme, daha yüksek kaygı düzeylerini gösterir (Stewart vd., 2012). Sonuçlar incelendiğinde artan sıcaklıkla beraber hem glyphosate uygulanan gruplarda hem de iyileşme gruplarında üst kısma geçişteki gecikmenin anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir (Şekil 15).



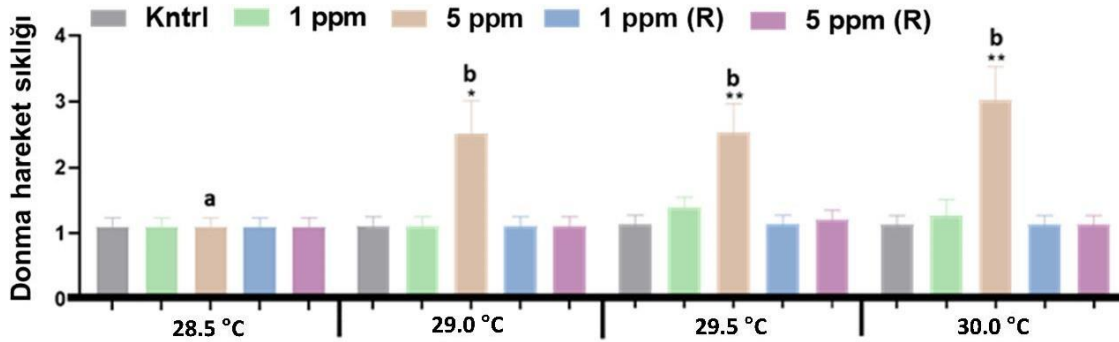
Şekil 15. Yeni tank dalış testi sonrası üst kısma geçişin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Alt kısımda geçirilen süre; yeni tankın alt kısmında harcanan toplam süreyi ifade etmektedir. Tankın alt kısmında geçirilen daha uzun süre, daha yüksek kaygı seviyelerini gösterir. Yapılan çalışmada, özellikle 5 ppm glyphosate'ın sıcaklık artışıyla beraber alt kısımda geçirilen süreyi artırdığı görülmüştür (Şekil 16).



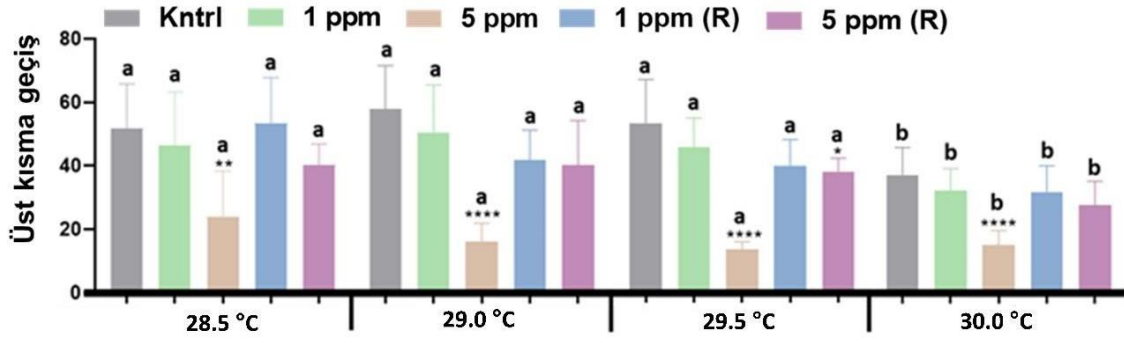
Şekil 16. Yeni tank dalış testi sonrası alt kısımda geçirilen sürenin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruptaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Benzer sonuçlar, tüm donma nöbetlerinin toplam süresini belirten donma (Freezing) parametresinde de gözlenmiştir (Şekil 17). Donma süresi, artan kaygıyı gösterir ve genellikle stresli zebra balıklarında daha yüksektir.



Şekil 17. Yeni tank dalış testi sonrası donma frekansının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruptaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

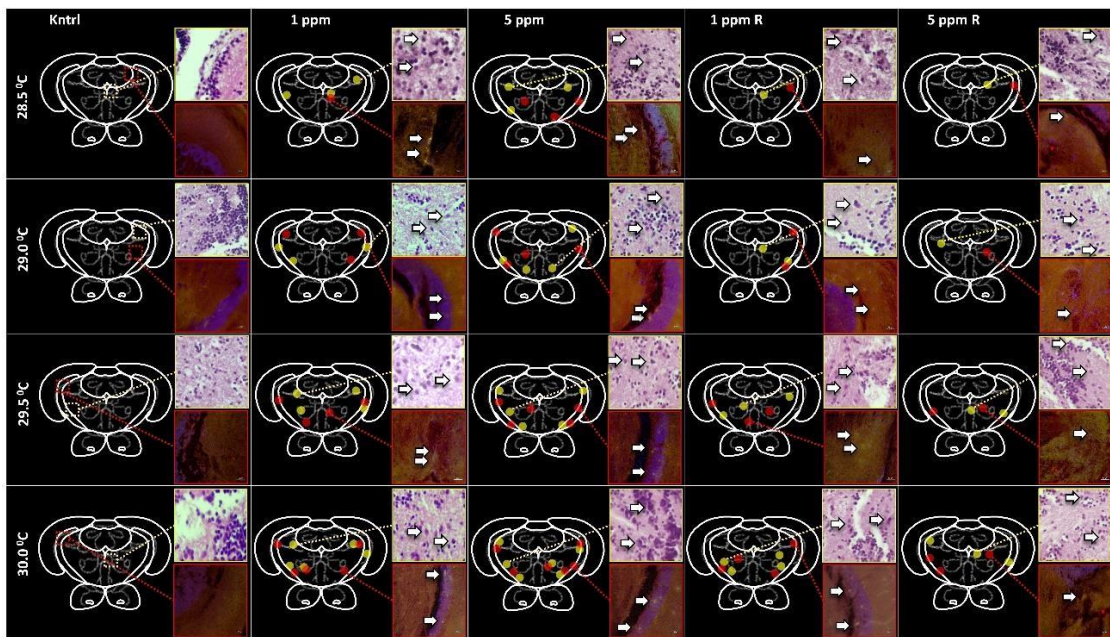
Üst kısma geçiş sayısı; yeni tankın tanımlanan alt kısmından üst kısmına geçiş sayısını ifade etmektedir. Daha fazla üst giriş, daha düşük kaygı seviyelerini gösterir. Mevcut çalışmada, yüksek dozlardaki glyphosate'ın sıcaklık stresi altında zebra balıklarının üst kısma geçiş sayısını azaltarak kaygı benzeri davranışlara sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Yeni tank dalış testi sonrası üst kısma geçişteki gecikmenin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruptaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

4.1.2. İmmünohistokimyasal İnceleme Sonuçları

Sıcaklık stresi altında glyphosate'a maruz bırakılan yetişkin zebra balıklarının beyin doku kesitlerindeki doku hasarını tespit etmek için histopatolojik analizler yapılmıştır. Elde edilen bulgular dört farklı sıcaklıkta 0.5 derecelik farkla glyphosate'a maruz bırakmanın zebra balıklarının beyinlerinde artan sıcaklığa ve doza bağlı olarak nörofillerde hasar/dejenerasyon ve nekroza sebep olduğunu göstermiştir (Şekil 19). İyileşme gruplarında da glyphosate'nin sebep olduğu hasarın devam ediyor olması artan sıcaklığın bu hasarların telafisini olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. Sirkadiyen ritim ve anksiyete ile ilgili biyobelirteçlerin kullanıldığı immünohistokimyasal analiz sonuçları incelendiğinde ise sıcaklık ve doz artışına bağlı olarak GNAT2 ve 5HT4 protein ekspresyonlarında artış tespit edilmiştir (Şekil 19/ Tablo 2).



Şekil 19. Farklı sıcaklık koşullarında glifosata maruz kalan zebra balığının beyin dokularında hematoksilin ve eozin boyamasının (H&E) ve 5-HT4R ve GNAT2 için immüno Floresan reaksiyonlarının mikroskopik görüntüsü. Bu şekilde tasarlanmanın ilk amacı bulguların sıklığının sıcaklık ve dozla değişimini göstermektir. Ayrıca bu tasarım bu bulguların yerlerini de göstermektedir. Sarı noktalar histopatolojik bulguların olduğu bölgeleri, kırmızı noktalar ise immüno Floresan sinyallerin gözlemlendiği bölgeleri göstermektedir.

Tablo 2. Zebra balığı beyin kesitlerinde 5-HT4R ve GNAT2 immüno pozitifliğinin skorlama tablosu.

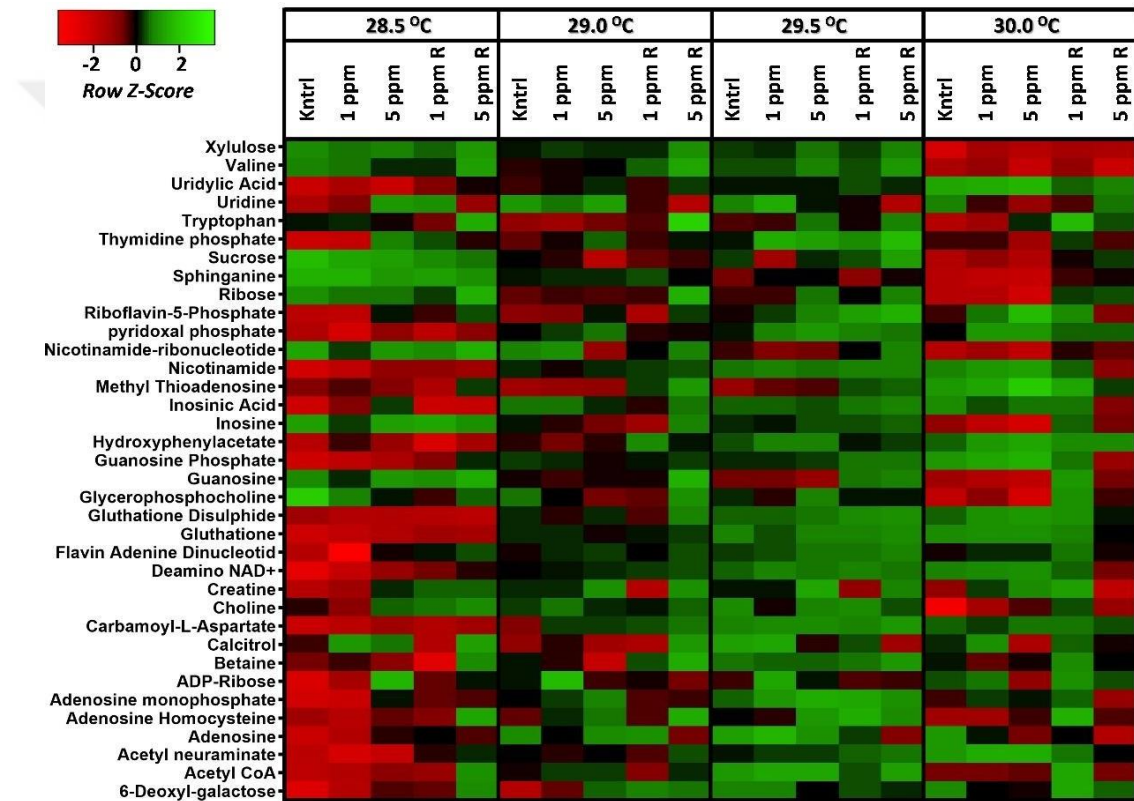
Puanlama	Sıcaklık	Kntrl	1 ppm	5 ppm	1 ppm (R)	5 ppm (R)
Dejenerasyon ve Nekroz	28.5 °C	-	++	+++	+	++
	29.0 °C	-	++	++++	+	++
	29.5 °C	-	+++	++++	++	++
	30.0 °C	+	+++	++++	++	++
5HT4'ün immüno Floresans yoğunluğu	28.5 °C	29.74 ± 6.18 ^a	58.74 ± 5.89 ^b	76.16 ± 6.67 ^c	36.43 ± 5.46 ^a	50.13 ± 4.63 ^b
	29.0 °C	28.34 ± 6.43 ^a	55.28 ± 6.83 ^b	79.39 ± 4.70 ^c	38.67 ± 5.37 ^a	51.37 ± 5.60 ^b
	29.5 °C	33.60 ± 6.43 ^a	60.39 ± 6.92 ^b	80.64 ± 4.70 ^c	40.17 ± 7.54 ^a	56.06 ± 3.98 ^b
	30.0 °C	38.48 ± 5.39 ^a	67.67 ± 6.92 ^b	93.86 ± 5.32 ^c	57.06 ± 7.54 ^b	78.74 ± 6.49 ^{bd}
GNAT2'nin immüno Floresans yoğunluğu	28.5 °C	23.46 ± 5.44 ^a	54.43 ± 4.19 ^b	72.64 ± 5.89 ^c	34.18 ± 7.19 ^a	47.64 ± 5.58 ^b
	29.0 °C	23.34 ± 6.87 ^a	51.26 ± 5.35 ^b	74.59 ± 6.64 ^c	35.44 ± 6.89 ^a	48.51 ± 5.39 ^b
	29.5 °C	31.14 ± 6.54 ^a	58.43 ± 6.49 ^b	77.69 ± 6.57 ^c	38.38 ± 5.13 ^a	53.37 ± 4.46 ^b
	30.0 °C	35.67 ± 6.21 ^a	65.88 ± 6.49 ^b	82.38 ± 6.29 ^c	54.38 ± 6.13 ^b	75.87 ± 5.36 ^{bd}

Skorlama tablosu histopatolojik sonuçlardaki dejenerasyon ve nekroz bulgularının önemini puanlanmasını gösterir (yok (-), hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++), çok şiddetli (++++)) ve 5-HT4R ve GNAT2'nin immüno Floresan yoğunluğu ($p < 0.05$). (Puanlama, her analiz için kullanılan tüm bölümlerin ortalamasını temsil eder).

4.1.3. Metabolom Analiz Sonuçları

Glyphosate maruziyetinin sıcaklık etkisiyle beraber metabolom içeriğinde meydana getirdiği değişimi incelemek için zebra balığı beyin dokularının metabolom profilleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, heat map grafiğinde de görüldüğü üzere özellikle yüksek dozda (5 ppm) glyphosate maruziyetinin dikkate değer değişikliklere sebep olduğu tespit edilmiştir. Analiz neticesinde 37 anlamlı metabolit tespit edilmiş ve beklendiği gibi, bu metabolit seviyelerindeki değişiklik yüksek konsantrasyonda ve artan sıcaklığın etkisi ile daha da çarpıcı olmuştur (Şekil 20). Gruplar arasındaki farkları açıklamak için orhogonal kısmi en küçük kare diskriminant (OPLS-DA) analiz sonuç grafiği oluşturulmuştur. Küme analizini gerçekleştirmek için Agilent Mass Hunter 8.1'den her grubun TOF-MS spektrumu elde edilmiştir. Daha sonra tüm dosyaları mzxml dosyası oluşturmak için proteowizard gui'ye aktarılmıştır. Bundan sonra veriler, pik tespiti, pik hizalaması ve alıkonma süresi düzeltilmesi için METLIN çevrimiçi

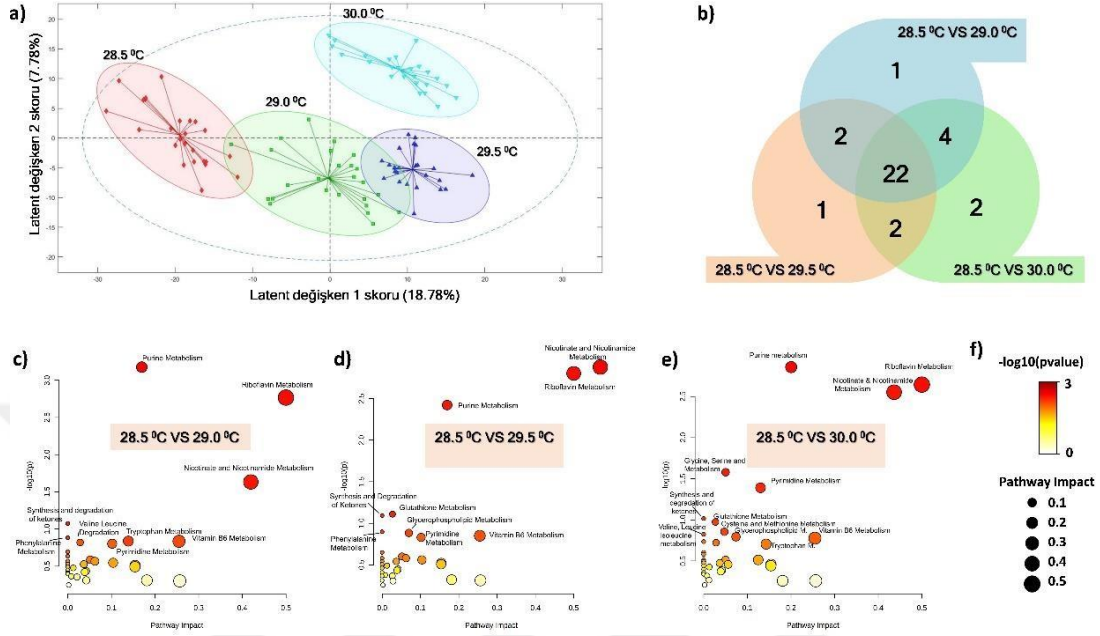
yazılımına yüklenmiştir. Son olarak excel formatında m/z değerleri, alıkonma süresi ve yoğunlukları içeren bir özellik listesi oluşturulmuştur. Bu veri dosyası, kemometrik analiz yapmak için MATLAB 2021a'ya aktarılmıştır. OPLS-DA analizi, PLS araç kutusu aracılığıyla yapılmıştır. Hem test hem de çapraz doğrulama setlerinin duyarlılık ve özgüllük değeri, her grup arasındaki bir değişikliği açıklamak için yeterli olmuştur (duyarlılık 0.880'den daha iyi ve özgüllük 0.813'ten daha iyi). Her grup için ROC eğrileri de çizilmiş ve çapraz doğrulama seti ve eğri altındaki alan (AUC) değerleri (test seti 0.9323'ten daha iyi ve çapraz doğrulama veri seti 0.9040'tan daha iyi), modelin doğru gruba ilişkin her bir örneği tahmin etme yeteneğine sahip olduğuna işaret edilmiştir.



Şekil 20. Tespit edilen metabolitlerin farklı sıcaklık ve maruziyet gruplarındaki ortalama intensite değerlerine göre sıcaklık haritası.

Açıklamalı metabolitlerle ilgili olarak yol analizi de yapılmıştır. Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) veri tabanı aracılığıyla m/z değerlerine ve alıkonma süresine göre 10 ppm tolerans aralığında 36 metabolit için açıklama yapılmıştır. 28.5 °C kontrol grubuna ($0.66 \leq x \leq 1.5$) karşı kat analizine göre açıklamalı her metabolitin önem düzeyine göre bir Venn diyagramı da çizilmiştir. Önemli metabolitler Şekil 21'de bir Venn şeması olarak izlenmiştir. Önemli açıklamalı metabolitlere göre yolak analizi Metaboanalyst 5.0 tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 21). Sıcaklık değişimine bağlı

olarak Riboflavin, Purin, Nikotinat & Nikotinamid, Triptofan, Vitamin B6, Pirimidin, Valine & Lösin Degradasyonu, Fenilalanin ve Glutatyon metabolizma yollarının önemli ölçüde etkilendiği gözlemlenmiştir.



Şekil 21. Ortogonal kısmi en küçük kareler diskriminant analiz algoritması ile yapılan sınıflandırmada latent değişkenlerin skor grafiği (a), Tespit edilen metabolitlerin farklı sıcaklık gruplarındaki anlamlılık değerlerine göre venn diagramı (b), Tespit edilen metabolitlerin yer aldığı metabolik yolların p değerine karşılık topografik yolak etki değeri grafiği (c,d,e).

5. TARTIŞMA (BÖLÜM I)

Küresel ısınmaya bağlı sıcaklık artışı, sucul ekosistemdeki pestisitlerin ürettiği toksisiteyi büyük ölçüde etkilemektedir. Çeşitli balık türlerinde glyphosate'ın etkileri üzerine araştırmalar yapılmıştır fakat bu çalışmalar, fizyolojik fonksiyonları ve toksik maddelere karşı davranışsal tepkileri etkileyen sıcaklık gibi hayati bir parametreyi gözden kaçırmıştır. Bu nedenle, yaptığımız çalışmada zebra balıklarında 0.5 °C'lik bir sıcaklık değişiminin glyphosate'ın toksisitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Organizmalarda günlük ışık döngüsüne adaptasyona yanıt olarak gelişen sirkadiyen ritim, bazı endojen ve/veya eksojen faktörlerin etkisiyle bozulabilir (Zakharov ve Khivintseva, 2020). Abiyotik çevre koşullarındaki değişiklikler (sıcaklık, çevresel kirleticiler, oksijen eksikliği vb.) ve sinerjik etkileşimlerin neden olabileceği sirkadiyen ritim bozuklukları organizmalar için önemli bir stres kaynağıdır (Prokkola ve Nikinmaa, 2018). Bu faktörlerin tek başına etkileri üzerine birçok çalışma olmasına rağmen, çoklu faktörlerin sinerjistik etkilerini inceleyen araştırmalar sınırlıdır. Bu bağlamda, yaptığımız çalışmada, sirkadiyen saat fonksiyonu araştırmaları için ideal bir omurgalı olduğu düşünülen zebra balığı modeli kullanılarak ikili çevre koşullarının (sıcaklık ve pestisit) sirkadiyen ritim üzerindeki sinerjik etkileri incelenmiştir (Lahiri vd., 2005). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde doz ve sıcaklıktaki artışa paralel olarak, glyphosate'ın aydınlık evrede katedilen toplam mesafeyi, ortalama hızı ve ortalama açılma hızı azaltarak gündüz uyku benzeri davranışlara, karanlık evrede ise bu parametreleri artırarak hiperaktiviteye sebep olduğu görülmüştür. Aydınlık fazda daha düşük hızlanma değeri anormal motor ve nörolojik işlevi göstermektedir (Yang vd., 2019b). İyileşme gruplarında da benzer sonuçların gözlenmesi, sıcaklık stresi altında uygulanan glyphosate'ın olumsuz etkilerinin uygulama kesildikten sonra belirli bir süre daha devam ediyor olabileceğini göstermiştir. Bilindiği gibi sıcaklık değişimi, belirli saat genlerinin bazal ekspresyonundaki değişiklikleri genlere özgü bir şekilde yönlendirir ve böylece sirkadiyen ritimleri manipüle edebilir (Lahiri vd., 2005). Bu bağlamda mevcut çalışmada glyphosate maruziyeti ile sıcaklık artışının birleştirici etkisinin sirkadiyen ritmin bozulmasında daha belirleyici bir faktör olduğu tespit edilmiştir. Bir fungusit olan flutolanilin'in zebra balıkları üzerindeki toksik etkisinin araştırıldığı benzer bir çalışmada da, kirleticiye maruz kalmanın pozitif ve negatif saat genlerinin ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde değiştirerek sirkadiyen ritminde bir bozulmaya sebep olduğu

gösterilmiştir. Bu duruma, sirkadiyen sistemin regülasyonundan sorumlu olan melatonin seviyelerindeki düzensizliklerin sebep olabileceği belirtilmiştir (Yang vd., 2019b). Bizim çalışmamızda da sıcaklık stresi altında glyphosate'ın toksisitesinin artmasıyla beraber balığın motor aktivitelerinin bozulmasının sirkadiyen ritimde düzensizliklere sebep olduğu düşünülmektedir (Sulukun vd., 2022).

Çevre kirliliğinden kaynaklanan sirkadiyen bozulma, artan fizyolojik ve psikolojik hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (Yang vd., 2019a). Yaptığımız çalışmada sirkadiyen ritime ek olarak glyphosate'ın anksiyete üzerindeki etkisini değerlendirmek için yeni tank dalış testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar sıcaklık ve dozadaki artışa bağlı olarak glyphosate'ın kaygı benzeri davranışların meydana gelmesinde de önemli ölçüde etkili olduğu görülmektedir. İyileşme gruplarında da özellikle 5 ppm uygulamasının bu etkileri devam ettirmesi anksiyojenik etkilerin maruziyet kesildikten sonra dahi devam edebileceğini göstermiştir. Yetişkin zebra balıkları üzerinde glyphosate ve roundup'ın etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, 0.5 mg/L glyphosate ve 0.065 ve 0.5 mg/L Roundup® konsantrasyonlarına maruz kalan balıkların kat edilen mesafe, ortalama hız ve hat geçişleri parametrelerinde azalmalar olduğu tespit edilmiştir (Bridi vd., 2017). Yapılan bir diğer çalışma, bir pestisit olan parakuatın zebra balığı erişkinlerinde hareket ve kat edilen mesafenin azalmasına neden olduğunu göstermiştir (Bortolotto vd., 2014). Benzer bir çalışmada geniş spektrumlu bir organoklorlu pestisit olan endosulfan maruziyetinin, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında yetişkin zebra balıklarında hat geçişleri, kat edilen mesafe, ortalama hız ve vücut dönüş açısını azalttığı tespit edilmiştir (Pereira vd., 2012). Bu veriler bir arada değerlendirildiğinde bizim çalışmamızda, 1 ve 5 ppm glyphosate'ın kaygı benzeri davranışlara sebep olarak anksiyojenik etkiler oluşturabileceği tespit edilmiştir. Bağımsız değişkenler olarak sıcaklık ve madde konsantrasyonu etkisini bir arada değerlendirdiğimiz bu çalışma küresel ısınma ile beraber artan sıcaklıkların pestisit toksisitesinde ciddi oranda artışlara sebep olabileceğini çarpıcı bir şekilde gözler önüne sermektedir.

Pestisitler, organizmalarda davranışsal değişikliklere ek olarak doku hasarına da sebebiyet verebilmektedirler. Çalışmamızda, çevresel bir stres etkeni olan sıcaklık ile beraber glyphosate uygulamasının zebra balığı yetişkin beyinde oluşturduğu doku hasarını gözlemlemek için histopatolojik analizler yapılmıştır. Bunlara ek olarak sirkadiyen ritim ve anksiyete ile ilişkili proteinler olan GNAT2 ve 5HT4 proteinlerinin seviyeleri de immunofloresan analizlerle değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız, glyphosate

maruziyetinin doku hasarına sebebiyet verdiğini göstermiştir. Hasarın şiddetinin doz ve sıcaklık artışıyla beraber daha da şiddetli hale geldiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, organofosfatlı pestisitler olan klorpirifos, metil parathion ve malathion'nun uygulandığı sıçanların karaciğer, beyin ve böbreklerinde önemli ölçüde doku ve DNA hasarı meydana geldiği belirlenmiştir (Ojha vd., 2013). Benzer bir çalışmada, bir herbisit olan pendimetalin'in zebra balıklarının gelişimi üzerindeki etkisi incelenmiş ve 0,5 mg/L konsantrasyonda uygulandığında kas dokusu üzerinde ciddi bir şekilde dejenerasyona sebep olduğu gözlenmiştir (Merola vd., 2022). Mevcut çalışmadaki GNAT ve 5HT4 proteinlerinin beyindeki seviyeleri incelendiğinde de yine aynı şekilde sıcaklık arttıkça glyphosate uygulanan gruplarda ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir. İyileşme gruplarında da benzer sonuçlar görülmüştür. GNAT2 proteini retinal koni hücrelerinde ışık sinyali yolunda önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca zebra balığı, xenopus, fare ve insan gibi birçok omurgalı canlıda sirkadiyen ritmin senkronizasyonu ile ilişkilidir (Eydipour vd., 2020). 5HT4 reseptörleri ise hipokampusta ifade edilmekte ve öğrenme-hafıza süreçlerinde rol almaktadır. Ayrıca bazı çalışmalar bu reseptörlerin ana sirkadiyen osilatör olan suprakiazmatik çekirdekdeki saat genlerinin ekspresyonunda kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Aoki vd., 2014; Rebholz vd., 2018). Bizim çalışmamızda da sirkadiyen ritimdeki bozulmalar ve aksiyete benzeri davranışların oluşmasının GNAT2 ve 5HT4R proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişim ile ilişkili olabileceği görülmektedir. Bu bağlamda, mevcut çalışmada, glyphosate'a maruz kalmanın ve sıcaklık artışının sinerjik etkisinin, sirkadiyen ritmin bozulmasında ve aksiyete benzeri davranış sergilemesinde daha belirleyici bir faktör olduğu sonucuna varılabilir. Çalışmamızda histopatolojik ve immünohistokimyasal sonuçların verildiği Şekil 19 incelendiğinde superior retiküler formasyonun (SRF) özellikle artan sıcaklığa bağlı olarak histopatolojik bulguların ve immünopozitifliğin yoğunlaştığı beyin bölgesi olduğu görülmektedir. Retiküler oluşum bölgesinin sirkadiyen ritim, uyku-uyanıklık döngüleri, uyarılma ve bilinç gibi işlevlerden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Mangold, 2021).

Zebra balığı davranışındaki serotonerjik modülasyonun mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da serotoninin önemli reseptörlerinden biri olan 5-HT4R'nin depresyon ve anksiyete tepkilerini modüle ettiği bilinmektedir (Maximino vd., 2013; Ślifirski vd., 2021). Çalışmamızda kaygı davranışındaki artışın, 5-HT4R'nin immünopozitifliğindeki artışla ilişkili olduğu görülmüştür. Farmakolojik çalışmalar, majör depresif ataklarda ve antidepresan ilaçlara yanıtta 5-HT4R'nin rolüne ilişkin değerli

bilgiler sağlamıştır. Klinik öncesi depresyon modelleri, 5-HT4 reseptörlerinin ekspresyonunun ventral hipokampus veya striatumda arttığını göstermiştir. 5-HT4 reseptörünün sinyalleşmesinin, nörojenezi ve nörotrofik faktörlerin ekspresyonunu artırarak serotonerjik iletimi artıran ilaçların antidepresan etkilerine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Ślifirski vd., 2021). İyileşme süreci ile ilgili olarak, bu işlem sonucunda balığın kontrole daha yakın davranmasına rağmen özellikle artan sıcaklık nedeniyle oluşan histopatolojik ve immünhistokimyasal bulgular nedeniyle tam bir iyileşme olduğunu söylemek mümkün değildir.

Çevresel koşulların değişimiyle beraber pestisit toksisitesinin zebra balığının metabolomik profilini nasıl etkilediğini incelemek için metabolom analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde özellikle 30 °C’de uygulanan 5 ppm glyphosate’ın tespit edilen 37 metabolit içerisinde deamino NAD⁺, nikotinamid, asetil nöraminat, inosinik asit, guanozin fosfat, flavin adenin dinükleotid, hidroksifenilasetat, üridilik asit seviyelerinin dikkate değer bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Kanser hücreleri, artan metabolik gereksinimleri için nispeten daha fazla NAD⁺ ve nikotinamide ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle oksidatif stres ve diğer toksik maruziyetlerin varlığında dahi hayatta kalabilmektedirler (Hong vd., 2019). Yüksek nikotinamid, NAD⁺ ve göğüs kolon kanseri arasında güçlü bir ilişki olduğuna dair birkaç araştırma bulunmaktadır. Nikotinamid ayrıca beyinde oksidatif stres kaynaklı apoptozda nöroprotektif ajan olarak çok önemli bir rol oynamaktadır (Fricker vd., 2018). Yaptığımız çalışmada, kontrollere kıyasla maruziyet gruplarında nikotinamid ve NAD⁺ düzeylerinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Bu, sıcaklık değişikliği ve ilaca maruz kalma nedeniyle tümöral aktivitenin veya oksidatif stresin bir işareti olabilir. Bunlara ek olarak glyphosate gruplarında inosinik asitin yükseldiği ve inosinin daha düşük seviyede kaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun, zebra balığının metabolizması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Zhou vd., 2021). Yükselmiş inosinik asit seviyesi ayrıca glyphosate’ın güçlü kanserojen kirleticisi ve yüksek seviyede oksidatif stres tetikleyicisi olabileceğini göstermektedir (Chen vd., 2021). Maruz kalan grupta, kanserojen bir duruma veya oksidatif strese neden olabilecek enerji metabolizmasında önemli bir artış olduğu gözlenmektedir. Organizma bu duruma NAD⁺ seviyelerini yükselterek, inozin ve diğer enerji kaynaklarını kullanarak tepki vermektedir. Böylece inozin seviyeleri düşerken inosinik asit seviyeleri yükselmektedir (Wang vd., 2020). Oksidatif stresin bir diğer önemli göstergesi ise organizmayı oksidanlara karşı koruyan antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olan

glutasyon ve türevlerindeki artıştır. Çalışmamızda özellikle sıcaklık artışına paralel olarak glutasyon ve türevlerindeki artış (4.85 kat daha yüksek glutasyon sülfid ve 2.05 kat daha yüksek glutasyon) 0.5 °C'lık sıcaklık artışlarında bile oksidatif strese karşı savunma mekanizmalarının harekete geçtiğinin bir göstergesi olarak yorumlanmaktadır.

Piridoksinin (Vitamin B6) aktif katalitik formu olan ve birçok metabolik yolda esansiyel bir kofaktör olan Piridoksal fosfat (PLP) seviyesinin de glyphosate'ın sinerjistik etkisi ve sıcaklık artışı ile arttığı belirlenmiştir. PLP, özellikle kaslarda ve enerji metabolizmasının katabolizmasında (aminoşeker deoksijenasyonu) birçok radikal aracılı reaksiyon üretir (Mukherjee vd., 2011). Bu, artan sıcaklıkla azalan guanozin, riboz ve sakkaroz seviyelerini açıklayabilir. Ayrıca enerji metabolizmasındaki anormalliklerin bir göstergesi olarak kabul edilen ve nörolojik bozuklukları tetikleyebilen (Glinton vd., 2018) gliserofosfokolin düzeylerinin glyphosate'a maruz kalan gruplarda düşük bulunması da bu hipotezi desteklemektedir. Çalışmamızda miktarı önemli ölçüde değişen bir diğer metabolit ise asetil nöraminattır (AN). Sinirsel yapılarda ve sinaptik bağlantılarda çok önemli rol oynayan AN seviyesinin (Wang, 2012) artan sıcaklıkla arttığı belirlenmiştir. Bu yüksek AN konsantrasyonları, artan sıcaklıkla bozulan davranıştan kaynaklanan artan enerji metabolizması ve nöral aktivite ile ilişkilendirilebilir. OPLS-DA sınıflandırma modeline göre, açıklamalı metabolitler açısından sıcaklık grupları arasında net bir ayrım olduğunu söyleyebiliriz. Bu farkın 30 °C grubunda daha fazla olması, artan sıcaklığın bariz etkisini daha net bir şekilde ortaya koymaktadır.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Global warming and glyphosate toxicity (I): Adult zebrafish modelling with behavioural, immunohistochemical and metabolomic approaches☆



Ekrem Sulukan ^{a,b,c}, Alper Baran ^{a,d}, Onur Şenol ^e, Meryem Kankaynar ^{a,f}, Serkan Yıldırım ^g, İsmail Bolat ^g, Hacer Akgül Ceyhun ^h, Emine Toraman ⁱ, Saltuk Buğrahan Ceyhun ^{a,b,c,f}

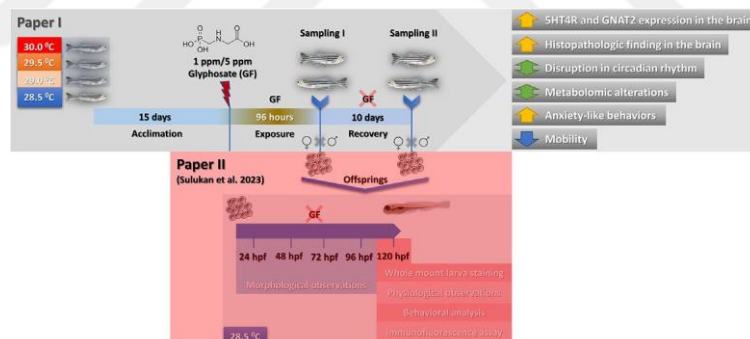
^a Aquatic Biotechnology Laboratory, Fisheries Faculty, Atatürk University, Erzurum, Turkey^b Aquaculture Department, Fisheries Faculty, Atatürk University, Erzurum, Turkey^c Department of Aquaculture Engineering, Graduate School of Natural and Applied Science, Atatürk University, Erzurum, Turkey^d Department of Food Quality Control and Analysis, Technical Vocational School, Atatürk University, Erzurum, Turkey^e Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Atatürk University, Erzurum, Turkey^f Department of Nanoscience and Nanoengineering, Graduate School of Natural and Applied Science, Atatürk University, Erzurum, Turkey^g Department of Pathology, Faculty of Veterinary, Atatürk University, Erzurum, Turkey^h Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, Turkeyⁱ Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Atatürk University, Erzurum, Turkey

HIGHLIGHTS

- A 0.5-degree temperature increase makes glyphosate toxicity more dramatic in zebrafish.
- Temperature increase and exposure to glyphosate cause behavioral problems in zebrafish.
- Temperature increase and exposure to glyphosate affect metabolic pathways in zebrafish.

GRAPHICAL ABSTRACT

Paper II is under the heading "Global warming and glyphosate toxicity (II): Offspring zebrafish modelling with behavioral, morphological and immunohistochemical approaches".



ARTICLE INFO

Editor: Henner Hollert

Keywords:

Global warming
Brain
Anxiety
Circadian rhythm

ABSTRACT

Global warming further increases the toxic threat of environmental pollutants on organisms. In order to reveal the dimensions of this threat more clearly, it is of great importance that the studies be carried out with temperature differences as close as possible to the temperature values that will represent the global climate projection. In our study, how the toxicity of glyphosate, which is widely used around the world, on zebrafish changes with temperature increases of 0.5° was investigated on behavioral and molecular basis. For this purpose, adult zebrafish were exposed to glyphosate at concentrations of 1 ppm and 5 ppm for 96 h in four environments with a temperature difference of 0.5° (28.5; 29.0; 29.5; 30.0 °C). At the end of the exposure, half of the zebrafish were sampled and remaining half were left for a 10-day recovery process. At the end of the trials, zebrafish were subjected to circadian rhythm and anxiety tests. In addition, histopathological, immunohistochemical and metabolome analyses were performed on brain tissues. As a result, it has been detected that anxiety and circadian rhythm were disrupted in parallel with the increased temperature and

☆ This paper includes first part of PhD thesis of Ekrem SULUKAN. (The second part is under the heading "Global warming and glyphosate toxicity (II): Offspring zebrafish modelling with behavioral, morphological and immunohistochemical approaches").

^{*} Corresponding author at: Atatürk University, Fisheries Faculty, Aquaculture Department, 25240 Erzurum, Turkey.

E-mail address: saltukceyhun@hotmail.com (S.B. Ceyhun).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160086>

Received 18 July 2022; Received in revised form 24 October 2022; Accepted 5 November 2022

Available online 8 November 2022

0048-9697/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

glyphosate concentration, and increased histopathological findings and 5-HT4R and GNAT2 immunopositivity in the brain. As a result of metabolome analysis, more than thirty annotated metabolites have been determined due to the synergistic effect of temperature increase and glyphosate exposure. As a conclusion, it was concluded that even a temperature increase of 0.5° caused an increasing effect of glyphosate toxicity in the zebrafish model.

1. Introduction

Global warming and environmental pollution are among the most important problems facing our world. The increasing world population has brought with it the necessity of increasing food production. This need has in turn increased agricultural activities and the environmental risks caused by these activities (Özkara et al., 2016). It is clearly known that the biggest risk factor threatening the environment in agricultural activities is the use of pesticides. Pesticides are substances that repel, destroy or control pests. Although pesticide application serves several important purposes, including protection against crop loss and vector-borne diseases, there are significant concerns about the potentially toxic effects of pesticides on non-target organisms (Goulart et al., 2015; Richardson et al., 2019). Glyphosate, the most widely used pesticide worldwide, blocks aromatic amino acid biosynthesis pathways and inhibits growth in unwanted plants (Maggi et al., 2020). Although the specific action mechanism of glyphosate in animals is unclear, a number of adverse effects have been reported during embryonic development, including epiboly delays, changes in morphology, central nervous system development and cardiogenesis (Díaz-Martín et al., 2021; Sulukan et al., 2017). Depending on the matrix surrounding it, the half-life of glyphosate is estimated to be between 4.2 and 14 days for freshwater, around 60 days in agricultural soils, and 47 to 315 days in seawater (Schweizer et al., 2019). This has made the potential impact of glyphosate, one of the most widely used pesticides worldwide, on non-target organisms a fundamental scientific issue that needs to be investigated in detail (Schweizer et al., 2019).

On the other hand, there are studies that indicate that pesticide-induced toxicity will increase, especially in the aquatic environment, depending on the increasing temperature (Parlapiano et al., 2021). However, the difference between the temperature values used in most of these studies is quite large and it is insufficient to objectively evaluate the effects of global warming. Records show that the temperature rise between 2006 and 2015 was 0.87 °C, higher than observed between 1850 and 1900 (Kaka et al., 2021). And if the rise continues with this trend, it is estimated that the temperature increase between 2030 and 2052 will reach 1.5 °C (Kaka et al., 2021). We know that many measures have been taken/trying to be taken in order to prevent/reduce global warming. We will see together in time whether these measures can reverse this bad trend. In order for these measures, which are planned in the light of scientific studies, to produce more reliable and sustainable results, it is crucial that the studies carried out are sensitive and in the range of values that can reflect the temperature increase more realistically. Therefore, in this study, we used a temperature increase (0.5 °C) as close to the global climate projection as possible in order to evaluate the effect of global warming on glyphosate toxicity more objectively.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

In the study, 6-month-old zebrafish with AB strain zebrafish (*Danio rerio*), whose ancestors were supplied from Zebrafish International Resource Center (ZIRC), University of Oregon (USA), were used. The experimental setup consists of 24 × 20 × 15 (h) cm aquariums placed in a 90 × 70 cm four independent main tank. The aquariums were filled with 1800 ml of system water. The water temperature in the aquariums was achieved as 28.5, 29.0, 29.5 and 30.0 °C (±0.05-degree) thanks to the heater and temperature sensor connected to the heat control unit and the water circulation in the main tank. 5 cm high and perforated platforms

are placed under the aquariums to achieve optimum water circulation and temperature control in the main tank. The zebrafish that were allowed to adapt for 15 days at four different temperatures were exposed to glyphosate at 1 ppm and 5 ppm concentrations for 96 h duration. In our previous study, which was completed by the project team with a temperature difference of 1 °C in our laboratory, it was determined that a temperature difference of 1 °C caused significant metabolite changes in the laboratory environment, even in the control groups (Sulkan et al., 2022a). In this study, we aimed to determine the effect of gradual temperature increases of 0.5 °C based on the results of our previous research. The doses used in the study were determined by considering the previous studies and the results obtained from the pre-experiments we conducted in our laboratory (Sulkan et al., 2017; Liu et al., 2022; Faria et al., 2021). During the exposure, 2/3 of the aquariums' water was renewed with water of the same temperature and content every 24 h. During the whole experiment, all fish were fed a standard diet. In the experimental setup, three independent aquariums with 30 zebrafish in total were used for each temperature and group. At the end of the 96 h exposure period, half of the fish (15 fish) were taken from each aquarium, and the remaining half were left to breed for the offspring experiments (results given in Paper II) (Sulkan et al., 2023) and then they were left to recover period for 10 days in a glyphosate-free environment and at the same temperature as used for treatment. Fish sampled from each group, randomly selected 3 fish were used for the circadian rhythm test and 9 fish for the anxiety-like behavior test. After the behavioral tests, a total of 10 fish from each group were used for metabolome analysis and 5 fish for histochemical and immunofluorescence analysis. There were no significant differences in subsequent analysis between fish subjected to behavioral testing and those not. All of the sampled zebrafish were anesthetized and their brain tissues were sampled for further analysis. The experimental schedule is given in Fig. 1. All procedures were performed as accordance with the approved Institutional Ethical Rules of Atatürk University (147–10/2020), and followed related OECD guidelines.

2.2. Behavioral tests

2.2.1. Circadian rhythm test

The circadian rhythm test of zebrafish exposed to glyphosate was performed with a custom-made system (Fig. 2), the details of which were given in our previously study (Sulkan et al., 2022a). The circadian rhythm analysis was performed by evaluating the locomotor activities of the fish placed in the system for a total of 24 h, with 14 h of light and 10 h of dark. During the test, the movement of the fish was recorded by an IR-sensitive CCD camera capable of recording at 30 frames per second (fps). Motion activities were analyzed with open access IdTracker software from a 1-min recording every hour for 24 h (Audira et al., 2019). For the IdTracker-based method, the X and Y coordinates of the fish followed were extracted frame by frame from the videos and the following formulas were used for each parameter examined:

$$\text{Total distance traveled } \delta \text{ cm} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sqrt{(X_i - X_{i-1})^2 + (Y_i - Y_{i-1})^2}$$

$$\text{Avg:swimming speed } \frac{\text{cm}}{\text{s}} = \frac{\text{Total distance } \delta \text{ cm}}{\text{Total Time } \delta \text{ s}}$$

$$\text{Turning Angle } ^\circ = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \tan^{-1} \left(\frac{\Delta Y}{\Delta X} \right) \times 180/\pi$$

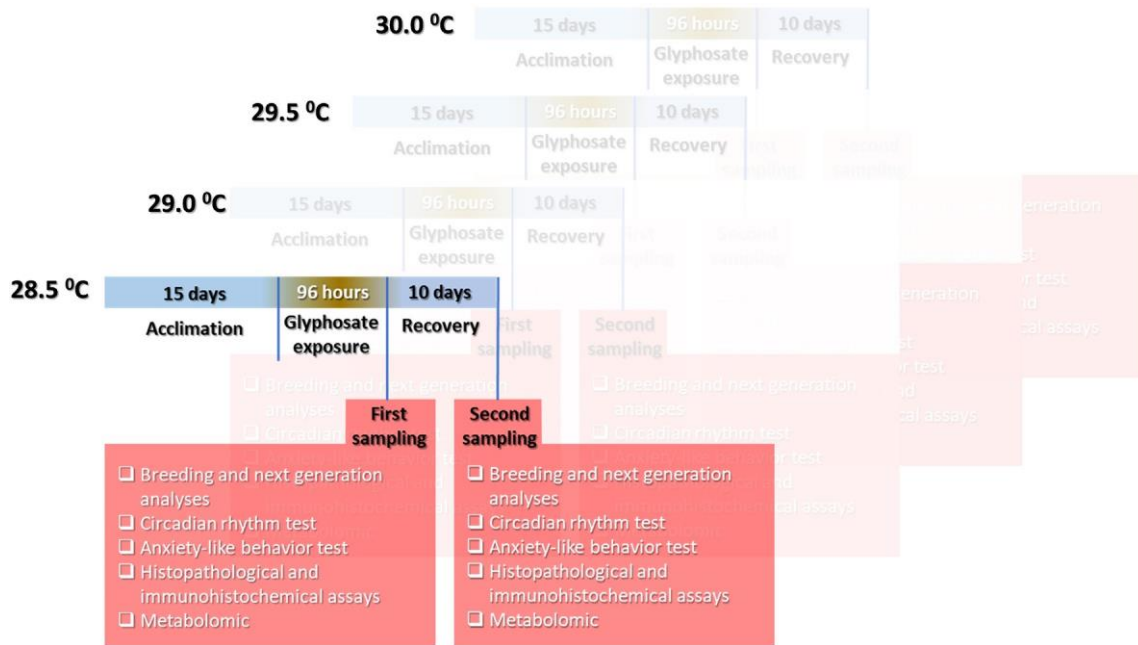


Fig. 1. The experimental schedule for each temperature.

$$\text{Angular Velocity} = \frac{\text{Turning Angle}}{\text{ms}} \times \frac{\text{Video duration } \delta \text{ms}}{\text{Frame per second}}$$

$$\text{Meandering} = \frac{\text{Absolute turn angle } \delta^\circ}{\text{Total distance } \delta \text{cm}} \times 10$$

The letters represent coordinates.

2.2.2. Anxiety like behavior test (Novel diving tank test)

Anxiety like behavior testing of adult fish was performed in the system obtained with minor modification of the novel diving tank described by Cachat and colleagues (Cachat et al., 2010). The modification made consists of placing the system in a cabinet that completely disconnects the system from its surroundings to avoid variation from possible unexpected visual stimuli between experimental groups. In order to minimize the possible vibration, 5 cm thick styrofoam was placed under the cabinet (Fig. 2). In each sampling, 5 randomly selected fish from each replicate (3 replications, 15 fish from each group) were placed in the novel diving tank, details of which are given in Fig. 2, and their movements were recorded with a camera for 6 min. The recordings were analyzed for total distance, average velocity, latency to upper half, time in upper half, zone

transmissions and number of erratic movement and freezing bouts of each fish via EthoVision XT software (Türkoğlu et al., 2022).

2.3. Histopathological and immunohistochemical assays

Brain tissues of five randomly selected fish from each replicate in each sampling were taken and fixed in 4 % paraformaldehyde solution for 48 h. After the routine tissue process, the brain tissues of which fixation was completed were embedded in paraffin blocks and 4 µm thick serial sections were taken. An average of 20 serial sections taken from each brain tissue were used, one for histopathological analysis and one for immunofluorescence analysis, respectively. Half of serial sections were treated with hematoxylin-eosin for histopathological analysis and examined under a light microscope for histopathological evaluations. Other half of serial sections were treated with G Protein Subunit Alpha Transducin 2 (GNAT2) and Serotonin type 4 receptor (5-HT4R) antibodies for immunohistochemical analysis. Antibodies used for immunohistochemical evaluation were treated in accordance with the company's protocol and applied FITC for 5-HT4R and Texas Red for GNAT2 as secondary antibodies. Finally, after adding DAPI for 5 min in the dark, the slides were washed with distilled water and examined under a fluorescent microscope (Çomaklı et al., 2018; Sulukan et al., 2022b).

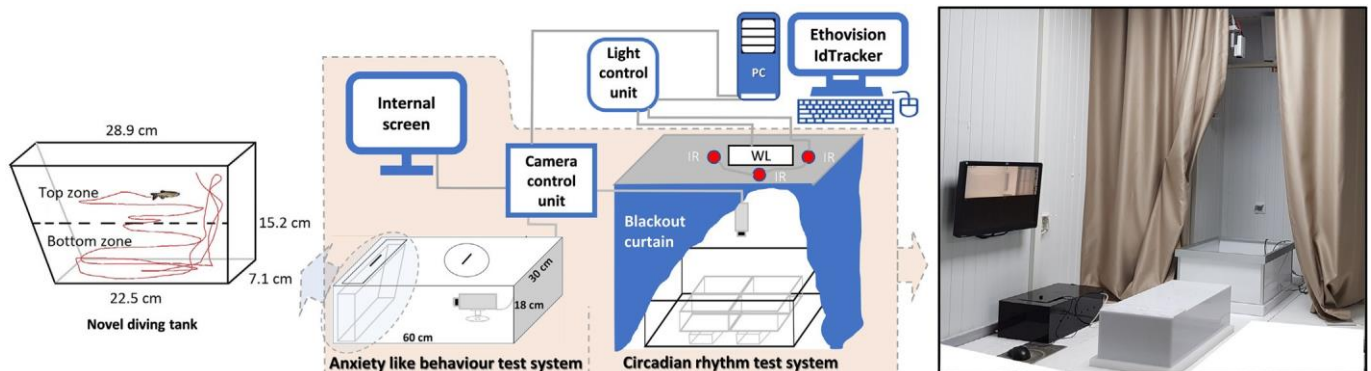


Fig. 2. Details of custom-made anxiety like behavior and circadian rhythm test systems for zebrafish.

2.4. Metabolomics

Brain tissues of ten randomly selected fish from each group in each sampling were taken and gently collected in a deplastisized microcentrifuge tube. Every two samples were pooled together and homogenized via Tissulyzer in 1 ml of methanol. Pooled samples were exposed two times for 2 min of the grinding procedure in methanol (Li et al., 2019). After that samples were incubated at -20°C for 15 min for lysis of cells inside the tissues. 10 min of sonication were performed for each pooled sample. Finally, samples were centrifuged at 12500 rpm for 15 min and the supernatant was gently taken. The extraction solution was evaporated under a vacuum and the residue was reconstituted by the mobile phase. QC samples were obtained by pipetting 5 μL of each sample. All samples were stored at -80°C until the TOF analysis.

Metabolomics studies were maintained via Agilent 6530 Q-TOF spectrometer. Dual AJS ESI ion sources were preferred in positive ion mode. MS absorbance threshold was set as 250. The total run time was determined to be 15 min. Elution of metabolites was provided via Zorbax Eclipse C18 column and gradient elution with acetonitrile (%0.1 FA) and water (%0.1 FA). The scan rate was 6 spectra/s and the Mass range was arranged between 50 and 1500 m/z . The injection volume was 6 μL . Other parameters were optimized regarding the previous article of our research lab (Kiziltan et al., 2022). For confirmation of metabolites, MS/MS spectra of QC samples were also obtained between the same m/z range.

An orthogonal partial least square discriminant (OPLS-DA) method has been created to explain the differences between each group. In order to perform cluster analysis, TOF-MS spectrum of each group was obtained from Agilent Mass Hunter 8.1. Then, all .d files were transferred into proteowizard gui to generate mzxml file. After that data were uploaded into METLIN online software for peak detection, peak alignment and retention time correction. Finally, a feature list including m/z values, retention time and intensities were created in excel format. This data file was transferred into MATLAB 2021a to carry out chemometric analysis. OPLS-DA analysis were made via PLS toolbox. Pathway analysis was also performed regarding the annotated metabolites.

2.5. Statistical analysis

All data in this study were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism software version 8.0.2 (GraphPad Software, Inc.) by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test (TukeyHSD). Statistical p -value are represented as $*(p \leq 0.05)$, $** (p \leq 0.01)$, $*** (p \leq 0.001)$ and $**** (p \leq 0.0001)$.

3. Results

3.1. Behavioral tests

3.1.1. Circadian rhythm test

Circadian rhythms rely on intracellular time tracking systems that play a central role in adapting the physiology and behavior of living organisms to predict daily environmental changes. In the current study, circadian rhythm testing was performed to evaluate the sleep/wake behavior of fish after 96 h of exposure to glyphosate at different temperatures and doses and after recovery. When the circadian rhythm analysis results were examined, it was determined that the total distance traveled, which shows the general motor function of the fish, decreased in the light phase and increased in the dark phase depending on the exposed dose and temperature increase. Similar results were obtained for the average speed measured by dividing the total distance traveled by the total time (Fig. 3). According to these results, it can be said that sleep-wake cycles are disrupted depending on the dose of glyphosate and the increase in temperature. When the average angular velocity, which is calculated as the ratio of the angular displacement of the fish to the time interval, was examined, it was observed that it decreased significantly in the light phase in parallel

with the increase in the dose. The light/dark ratios in each parameter reveal the effect of elevated temperature regimes on the circadian rhythm more clearly (Fig. 3). The meandering observed in the 5 ppm exposure group only in the dark phase and increasing in parallel with the increasing temperature value can be considered as another indicator of disruption of sleep-wake cycles. However, it should not be ignored that the increase observed only in the dark period in the 29.0-degree group also may be due to a factor outside our control.

Considering all the data together, more swimming activity during the dark cycle while less during the light cycle (sleep-like behavior) was detected for the zebrafish exposed to glyphosate. These results show that exposure to 5 ppm glyphosate causes serious disruptions and irregularities in the circadian rhythm in zebrafish due to the increased temperature.

3.1.2. Anxiety like behavior test (Novel diving tank test)

The novel diving tank test was carried out to examine the anxiety-related behaviors resulting from the locomotor activity of adult fish exposed to increasing temperatures and doses of glyphosate for 96 h and then subjected to a recovery period. According to the results of the anxiety like behavior test evaluated in a total of seven parameters, we can say that gradual temperature increases of 0.5° causes an increase in anxiety like behaviors similarly in the circadian rhythm in zebrafish exposed to glyphosate (Fig. 4). It was observed that the recovery process brought the parameters close to the control group in all temperature values (Fig. 4). The time spent in the upper half and the latency to the first transition to the upper half parameters in the control groups show that the gradual temperature increases of 0.5° alone causes an anxiolytic effect in zebrafish (Fig. 4). In addition, the decrease in total distance and speed with the increase in temperature, while the time spent at the bottom of the tank and the increase in freezing time indicate that glyphosate may cause anxiety like behaviors at increasing doses (Fig. 4).

3.2. Histopathological and immunohistochemical findings

Histopathological and immunohistochemical analyzes were performed to examine the histopathological changes and immunohistochemical changes of 5HT4 and GNAT2 proteins in the brain tissues of adult fish exposed to glyphosate at increasing temperatures and doses for 96 h. According to the histopathological analysis findings, damage/degeneration in neuropils and necrosis were detected that increased depending on temperature and dose in zebrafish brains treated with glyphosate at four different temperatures with difference of 0.5° . It can be said that the increased temperature has a negative effect on the compensation of these damages during the recovery process. Immunohistochemical analysis results using biomarkers related to circadian rhythm and anxiety were also observed to be in parallel with the histochemical results (Fig. 5).

3.3. Metabolomics

Metabolomic analyzes were performed to examine metabolomic changes in brain tissues of adult fish exposed to increasing temperatures and doses of glyphosate for 96 h. Sensitivity and specificity value of both test and cross validation sets were sufficient to explain an alteration between each group (sensitivity is better than 0.880 and specificity is better than 0.813). ROC curves were also plotted for each group and cross validation set and its Area under curve (AUC) values (test set is better than 0.9323 and cross validation data set is better than 0.9040) were pointed that the model has an ability to predict each sample regarding to the correct group.

There are 36 metabolites that were annotated in 10 ppm tolerance range in accordance with m/z values and retention time via Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database (Fig. 6). A Venn diagram was also plotted by significance level of each annotated metabolite in accordance with fold analysis against 28.5°C control group ($0.66 \leq x \leq 1.5$). Significant metabolites were monitored in Fig. 7 as a Venn diagram. Pathway analyses for the significantly altered metabolites were carried out by

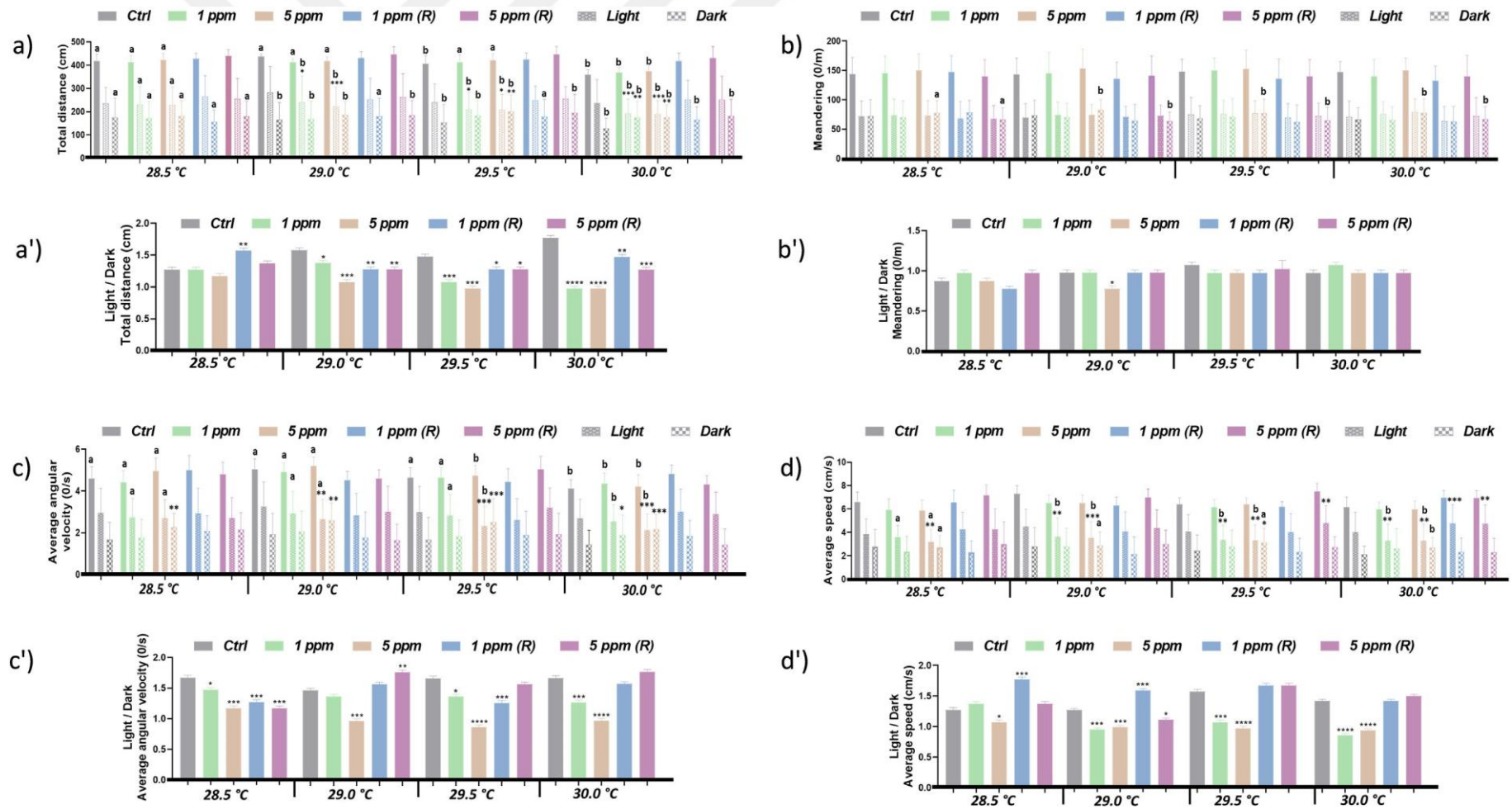


Fig. 3. Circadian rhythm analysis parameters; (a) Total distance and (a') light/dark ratio, (b) meandering and (b') light/dark ratio, (c) average angular velocity and (c') light/dark ratio, (d) average speed and (d') light/dark ratio. Post-hoc pairwise comparisons of significant interactions were made using Tukey contrasts with the TukeyHSD function ($p < 0.05$). All parameters for which posthoc test were carried out had normal and homoscedastic residual distributions. The significant differences between the groups with the same temperature value are indicated as * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$. The significant differences between different temperatures in the same groups are shown with lowercase letters in dark and capital letters in light ($p < 0.05$).

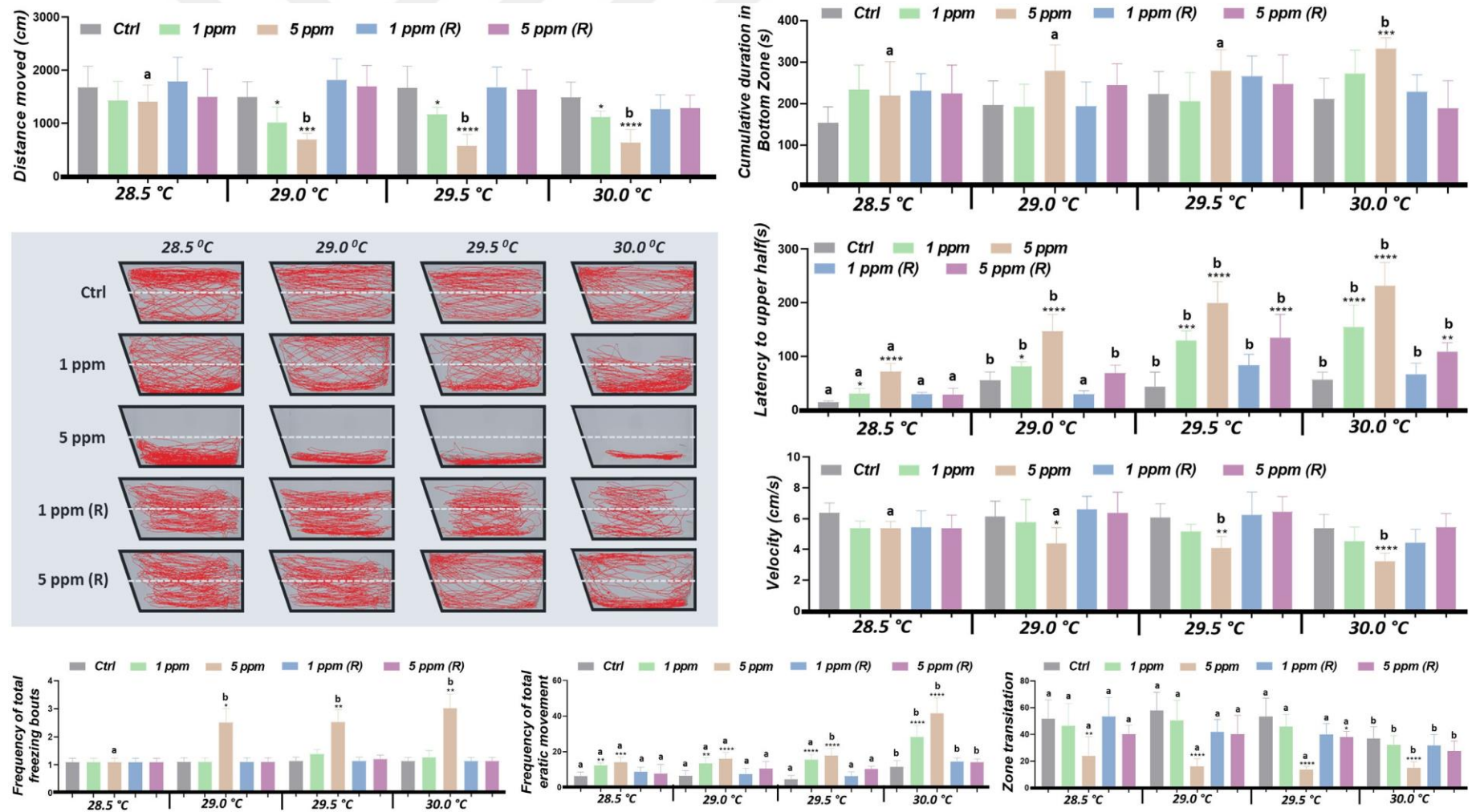


Fig. 4. Anxiety-like behavior analysis results. The novel diving tank images in the middle show the position of the total movements of a selected fish in the tank during the test period, representing total anxiety-like behavior in each group and temperature. The significant differences between the groups with the same temperature value are indicated as * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$. The significant differences between different temperatures in the same groups are shown with lowercase letters ($p < 0.05$).

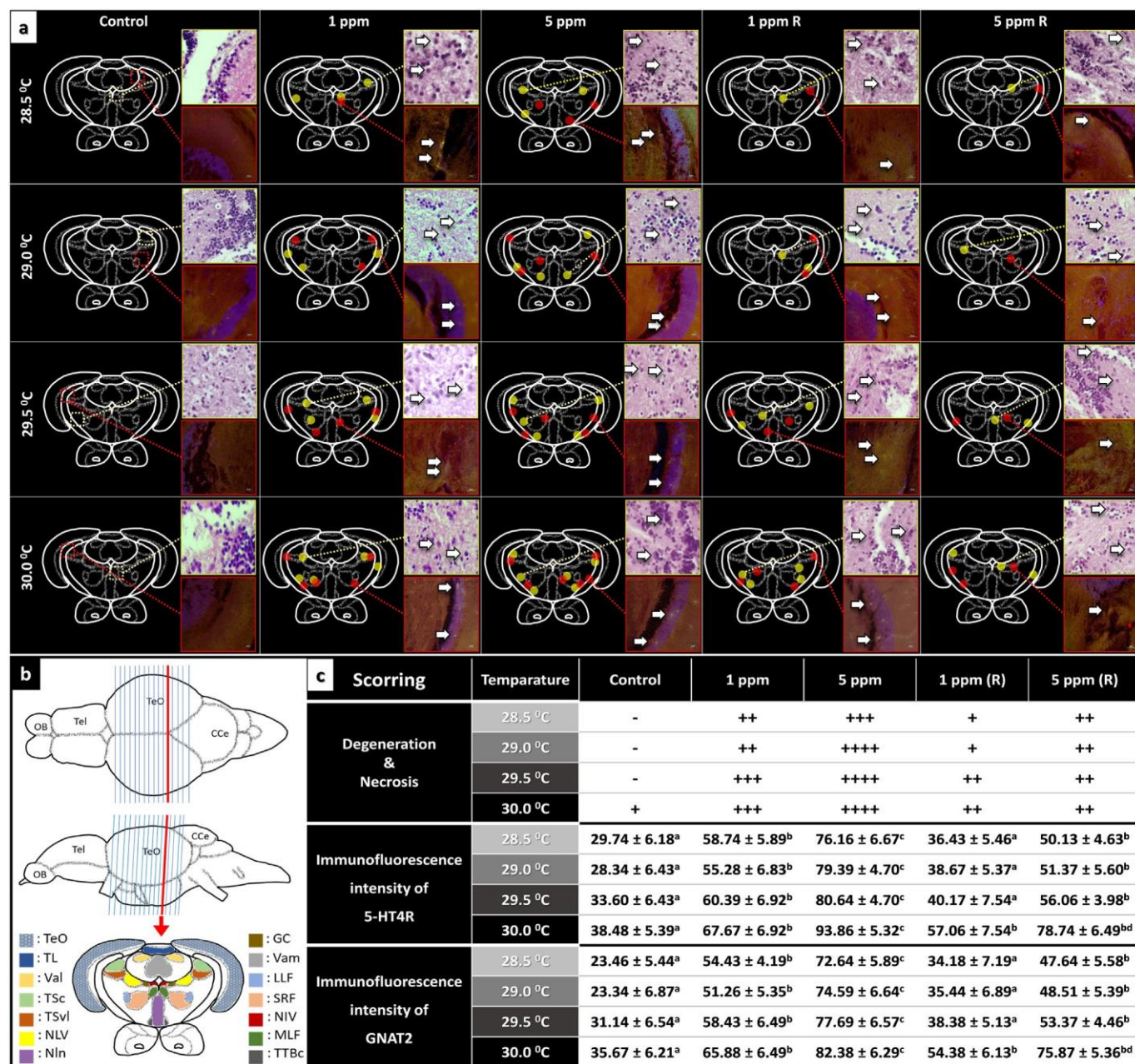


Fig. 5. (a) Microscopic image of hematoxylin and eosin staining (H&E) and immunofluorescence reactions for 5-HT4R and GNAT2 in brain tissues of zebrafish exposed to glyphosate in different temperature condition. (An average of 20 serial sections taken from each brain tissue were used, one for histopathological analysis and one for immunofluorescence analysis, respectively). The first purpose of designing in this way was to show the variation of the frequency of findings with temperature and dose. In addition, this design also shows the locations of these findings. Yellow dots show the regions where histopathological findings and red dots show the regions where immunofluorescent signals are observed. The yellow framed (in upper) image in each group belongs to H&E staining, while the red framed (in lower) image belongs to the merged FITC (5-HT4R) and Texas Red (GNAT2) double immunofluorescence reaction (and DAPI). Arrows in H&E staining indicate necrosis or degeneration. Almost all (over 98 %) overlapping of the immunopositive signals from 5-HT4R and GNAT2 observed in all sections (see detail in Supplementary File). Therefore, the arrows in the immunofluorescent images indicate the merged signals from both biomarkers). (b) Serial brain sections used in histopathological and immunohistochemical analyses and the section in representative in panel a (red) and brain regions of section. (CCe; corpus cerebelli, GC; Central gray, LLF; Lateral longitudinal fascicle/lateral lemniscus, MLF; Medial longitudinal fascicle, NIn; Interpeduncular nucleus, NIV; Trochlear nucleus, NLV; Lateral valvula nucleus, SRF; Superior reticular formation, TeO; Tectum opticum, Tel; telencephalon, TL; Longitudinal torus, TSc; Central nucleus of semicircular torus, TSvl; Ventrolateral nucleus of semicircular torus, TTBC; Crossed tectobulbar tract, OB; olfactory bulb, Val; Lateral division of valvula cerebelli, Vam; Medial division of valvula cerebelli). (c) The scoring table indicates the scoring the severity of the degeneration and necrosis findings in the histopathological results (none (–), mild (+), moderate (++), severe (+++), very severe (+++)) and immunofluorescence intensity of 5-HT4R and GNAT2 ($p < 0.05$). (The scoring represents the mean of all sections used for each analysis).

Metaboanalyst 5.0 (Fig. 7). It is observed that Riboflavin, Purine, Nicotinate & Nicotinamide, Tryptophan, Vitamin B6, Pyrimidine, Valine & Leucine Degradation, Phenylalanine and Glutathione metabolism pathways were significantly affected due to the temperature change.

4. Discussion

The circadian rhythm, which develops in response to adaptation to the daily light cycle in organisms, may be disrupted by the influence of some

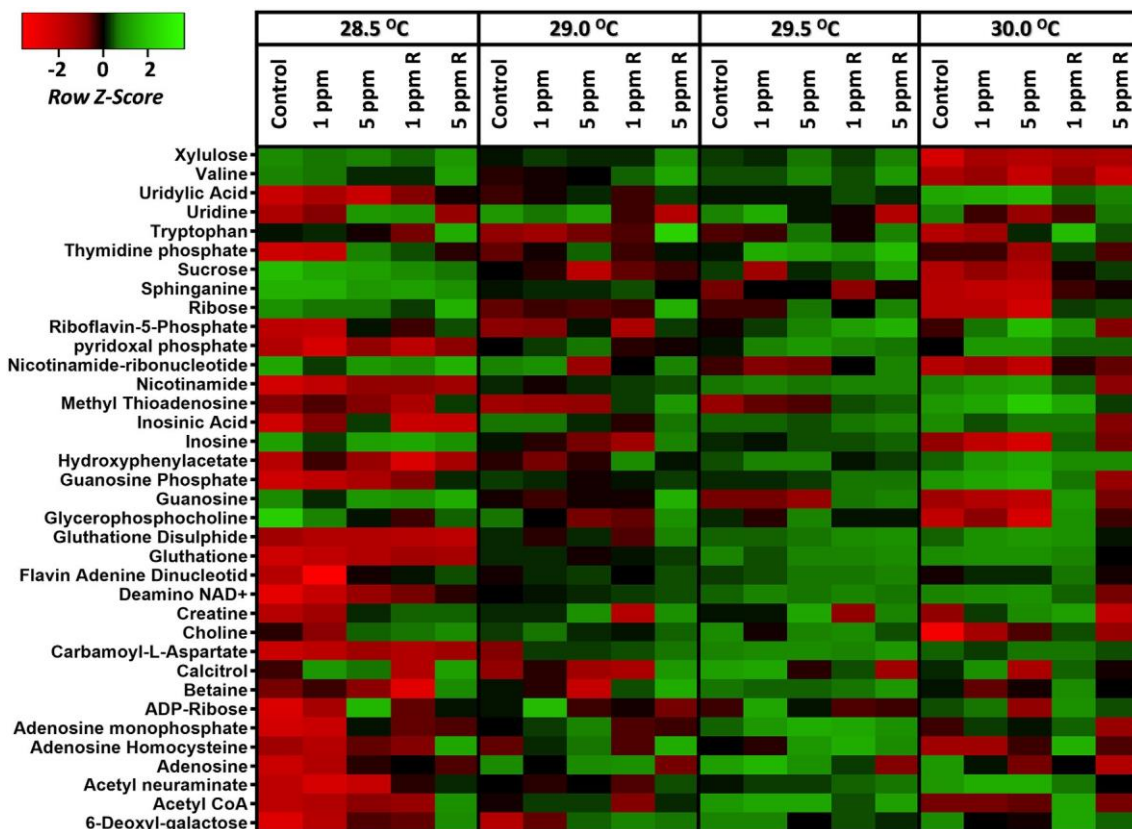


Fig. 6. Heatmap diagram of annotated metabolites for the z scores of each experimental group elucidating the intensity alterations of TOF-MS measurement. Z score is a scaling method for data visualization in heatmaps that monitor the pattern of trends in clusters of annotated metabolites between samples. Z-Score is calculated by: (Intensity of annotated metabolite) – (Mean expression across all samples) / Standard Deviation). This normalization method keeps all the intensity values at a narrow range between +2 and (–2) and easy to interpret the general trends between the groups.

endogenous and/or exogenous factors (Zakharov and Khivintseva, 2020). Disruptions in circadian rhythm, which may occur as a result of single or synergistic interactions of these factors, are accepted as an important source of stress for organisms (Prokkola and Nikinmaa, 2018). Although there are studies showing that temperature increase is effective on rhythms including circadian rhythm in fish, the mechanism of action is not fully elucidated. Therefore, it is reported that more studies are needed to predict how circadian rhythms and related systems in aquatic organisms will be affected as a result of global warming in the real World (Prokkola and Nikinmaa, 2018). The zebrafish has become a model used in circadian rhythm research due to its molecular-based elucidation of the functional development of the brain, including specific clock and photoreceptor regions (Krylov et al., 2021). In this study, it was determined that gradual temperature increases of 0.5° in zebrafish exposed to glyphosate was effective in disrupting the circadian rhythm. Especially dark/light graphics clearly reveal this effect (Fig. 3). On the other hand, an increase in temperature of 0.5° with the increase in the dose of glyphosate (Sulukan et al., 2017) seems to be significantly effective in anxiety like behaviors (Fig. 4). As it is known, the basic principle in the analysis of the novel diving tank is that the adaptation to the environment and some special behaviors it exhibits vary depending on the anxiety level of the organism placed in a new environment (Egan et al., 2009; Türkoğlu et al., 2022). Accordingly, zebrafish with low anxiety levels start to explore the environment quickly by behaving more comfortably when placed in the novel diving tank, while those with high anxiety levels spend more time on the bottom and exhibit more erratic movements when they are first placed in the environment (Faria et al., 2021). The most interesting and important part of our study was that a 0.5-degree temperature increase had a very clear effect on these behaviors. Considering the behavioral results of the recovery process, we can say that anxiety like behaviors is relatively recovered. On the other hand, we can say that the recovery

process has a positive effect on the circadian rhythm, but it is not enough for a full recovery.

In our study, we performed histopathological and immunohistochemical analyses in zebrafish brains to both elucidate the mechanisms of action underlying these behaviors and to investigate whether the recovery process is reversible at the molecular level. In general, obtained histopathology and immunohistochemical results support the circadian rhythm and anxiety like behaviors of zebrafish exposed to glyphosate. It is reported that temperature change directs changes in basal expression of certain clock genes in a gene-specific manner and thus can manipulate circadian rhythms (Lahiri et al., 2005). The GNAT family responsible for light signal transduction in the circadian rhythm cycle has also been identified in zebrafish (Abalo et al., 2020; Laranjeiro and Whitmore, 2014). In our study, it is thought that the GNAT2 immunopositivity detected in the brain is due to the disrupted circadian rhythm caused by the synergistic effect of glyphosate exposure and temperature. In a study investigating the toxic effect of flutolanil, a fungicide, on zebrafish, it was shown that exposure to the pollutant caused a disruption in the circadian rhythm by significantly changing the expression levels of positive and negative clock genes (Yang et al., 2019b). In another study investigating the effect of tiflusal, a fungicide, on the circadian rhythms of zebrafish, it was determined that exposure to tiflusal caused changes in the embryo brain melatonin and mRNA levels of genes related to circadian rhythms (Yang et al., 2019a, 2019b). In a similar study, it was observed that sodium propionate, which is used as a preservative in foods, when used at doses of 60 mg/L and 100 mg/L, caused disruptions in circadian rhythm by significantly affecting the expression of some genes including GNAT2 in zebrafish larvae (Xu et al., 2022). In a study investigating the toxic effects of glyphosate on adult and larval zebrafish were exposed to glyphosate and Roundup (0.01, 0.065 and 0.5 mg/L) for 96 h. Data have shown that exposure to glyphosate at a

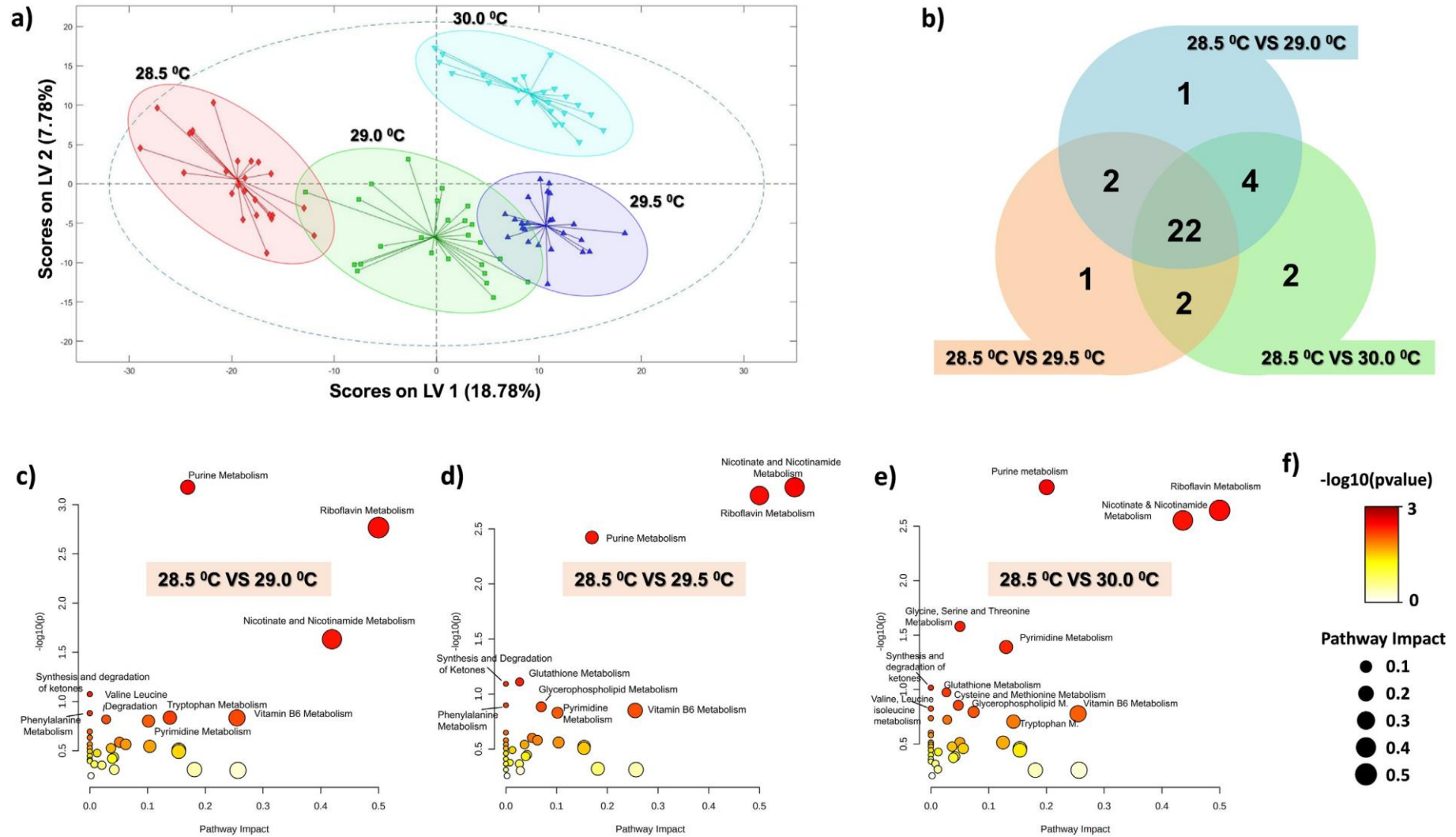


Fig. 7. (a) Score plot of latent variables in OPLS-DA classification model. (b) Venn Diagram for the annotated metabolites regarding to the fold analysis. Pathway impact vs $-\log(p)$ value graph for the significantly altered metabolites of (c) 28.5 °C vs 29.0 °C, (d) 28.5 °C vs 29.5 °C and (e) 28.5 °C vs 30.0 °C. (f) Keys for c, d and e.

concentration of 0.5 mg/L and Roundup® at 0.065 or 0.5 mg/L reduces total distance, average speed, and zone transitions in adult zebrafish and causes irregularities in locomotor activity in larvae (Bridi et al., 2017). In another study in which zebrafish were chronically exposed to paraquat (Pq), a toxic herbicide, it was shown that paraquat caused deterioration in the motor activities and memory of zebrafish (Bortolotto et al., 2014). In a similar study, it was determined that endosulfan, an organochlorine pesticide, changed the swimming activity of zebrafish and caused harmful effects on the nervous system (Pereira et al., 2012). In this context, in the current study, it can be concluded that the synergic effect of glyphosate exposure and temperature increase was more decisive factor in the disruption of the circadian rhythm and exhibition of anxiety like behavior. When Fig. 5, in which histopathological and immunohistochemical results are given in our study, is examined, it is seen that the superior reticular formation (SRF) is the brain region in which histopathological findings and immunopositivity are concentrated especially due to increasing temperature. It is reported that reticular formation region is responsible for functions such as circadian rhythm, sleep-wake cycles, arousal, and consciousness (Mangold and Das, 2021). Although the main circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus synchronizes rhythms throughout the brain and body, the genes that control circadian rhythms are expressed in almost every cell. In recent years, it has emerged that these genes serve important functions in certain brain regions, including the control of circadian rhythms in neuronal activity and the response to environmental stimuli (Chen et al., 2016). In addition, evidence from preclinical and clinical studies has shown that sleep and circadian rhythm disturbances are associated with the activation of the prefrontal cortex (Wu et al., 2021). In our study, it was determined that histopathological findings and immunopositivity were concentrated in the SRF, which is the brain region associated with circadian rhythm and sleep-wake cycles, depending on the increased temperature.

One of the important components of the relationship between anxiety and circadian rhythm is serotonin (Casey et al., 2009). It is suggested that serotonin is important for generating wakefulness and inhibiting REM sleep (Baghdoyan and Lydic, 2012). Although the mechanism of serotonergic modulation in zebrafish behavior has not been fully clarified, it is known that 5-HT₄R, one of the important receptors of serotonin, modulates depression and anxiety responses (Maximino et al., 2013; Ślifirski et al., 2021). In our study, the increase in anxiety behavior correlated with the increase in immunopositivity of 5-HT₄R. Pharmacological studies have yielded valuable insights into the role of the 5-HT₄R in major depressive episodes and response to antidepressant drugs. Preclinical models of depression have shown that expression of 5-HT₄ receptors is increased in the ventral hippocampus or striatum. It has been shown that signaling of the 5-HT₄ receptor can contribute to the antidepressant effects of drugs that increase serotonergic transmission by increasing neurogenesis and the expression of neurotrophic factors (Ślifirski et al., 2021). On the other hand, almost all (over 98 %) overlapping of the immunopositive signals from 5-HT₄R and GNAT2 observed in our study (see detail in Supplementary File) can be interpreted as an indicator of the tight relationship between anxiety and circadian. Regarding the recovery process, despite the fact that the fish behaved more closely to the control as a result of this process, it is not possible to say that there is a complete recovery due to the histopathological and immunohistochemical findings, especially caused by the increasing temperature.

Omics techniques have become a very important tool used to illuminate and explain the complex mechanisms underlying the biological response of organisms to exogenous changes and their consequences (Eshell et al., 2018). Metabolomics, on the other hand, provides important contributions to the explanation of these mechanisms on a molecular basis, by enabling the systematic identification of small molecules that arise as a result of metabolic processes in biological systems and the determination of their amounts up to the phenogram level (Yang et al., 2019a). In other words, metabolomics, which analyses metabolites involved in different metabolic pathways in the organism with the help of bioinformatics and machine learning-based algorithms; examines the relationship of metabolites with

physiological and pathological responses. In this respect, metabolomics has been a promising approach to examining the relationships between exogenous exchange and the health of the organism.

In our study, the significant increase in nicotinamide and NAD⁺ levels, which are a requirement of increased metabolic reactions and are generally associated with inflammation and oxidative stress (Fricker et al., 2018; Hong et al., 2019), in the exposure groups compared to the control group may be a sign of oxidative stress in the brain. The observed high inosinic acid level versus low inosine level supports this idea. As is known, a high inosinic acid level is indicated as a sign of a strong carcinogenic pollutant and/or high level of oxidative stress (Chen et al., 2019). Organisms may respond to this condition by raising NAD⁺ levels due to increased energy metabolism and by using other energy sources such as using inosine (Wang et al., 2020). This may explain the discrepancy in inosine and inosinic acid levels. On the other hand, another important indicator of oxidative stress is the increase in glutathione and its derivatives, which is an important component of the antioxidant defense system that protects the organism against oxidants. In our study, the increase in glutathione and its derivatives (4.85-fold higher glutathione sulphide and 2.05-fold higher glutathione), especially in parallel with the increase in temperature, is interpreted as an indicator of a significant increase in oxidants even with an increase in temperature of 0.5°. All this data has shown that oxidative stress is getting higher in glyphosate exposed groups and this toxic effect gets more dramatic with increased temperature.

It has been determined that the level of Pyridoxal phosphate (PLP), which is the active catalytic form of pyridoxine (Vitamin B6) and is an essential cofactor in many metabolic pathways, increases with the synergistic effect of glyphosate and temperature increase. PLP generates several radical-mediated reactions, particularly in muscles and in the catabolism of energy metabolism (aminosugar deoxygenation) (Mukherjee et al., 2011). This can be explained by the decreased levels of guanosine, ribose and sucrose to meet the increased energy requirement depending on increasing temperature. Moreover, the fact that glycerophosphocholine levels, which are accepted as an indicator of abnormalities in energy metabolism and can trigger neurological disorders (Glinton et al., 2018), were found to be low in glyphosate exposure groups supports this hypothesis. This may be associated with the increased anxiety levels observed in the exposure groups.

Another metabolite, the amount of which was altered significantly in our study, is acetyl neuraminic acid (AN). It was determined that the level of AN, which plays a very important role in neural structures and synaptic connections (Wang, 2012), increases with increasing temperature. These high concentrations of AN could be associated with increased both energy metabolism and neural activity resulting from disrupted behavior with increased temperature. Finally, increasing creatine level with increasing temperature is an indication that exposure to glyphosate also causes renal dysfunctions. It is known that regular energy metabolism is critical for the normal functioning of the kidney (Liu et al., 2022). Therefore, increased creatine levels as a result of renal dysfunction can be considered another indicator of deterioration in energy metabolism (Liu et al., 2022).

According to the OPLS-DA classification model, we can say that there is a clear distinction between temperature groups in terms of annotated metabolites. The fact that this difference is higher in the 30-degree group reveals the obvious effect of increasing temperature more clearly. According to the pathway analysis, the affected pathways overlap to a large extent, but the difference in the effect levels clearly reveals the effect of the 0.5-degree increase. Moreover, glycine, serine, and threonine (Gly-Ser-Thr) metabolism appear to be affected only in the 30-degree group. Heat stress can cause oxidative stress and increase apoptosis, mostly by affecting amino acid metabolism, even in acute treatments (Sammad et al., 2022; Zhao et al., 2022). The observation that Gly-Ser-Thr metabolism, which is associated with oxidative stress (Fitzpatrick et al., 2014), was affected in the 30-degree group, strengthens the hypothesis that the mechanism underlying the increased toxicity observed depending on the increasing temperature in our study may be based on oxidative stress.

As a conclusion, it has been shown in the zebrafish model that glyphosate, whose toxic effects have been clearly demonstrated in previous

studies, can be more toxic even at 0.5-degree temperature increases, which can be considered as close to global warming projection. On the other hand, we can say that the increased dose makes the situation more dramatic with the increase in temperature. This was also observed in the recovery groups. Depending on the temperature increase, an improvement was observed in almost all parameters in the 1 ppm group of the recovery groups, while 5 ppm glyphosate did not show a sufficient improvement. Therefore, sensitivity to the conscious use of pesticides has become more critical with global warming. Our study has shown that studies with low-temperature differences are important in order to more clearly reveal the negative effects of environmental pollutants on organisms due to global warming. In addition, more toxicological studies on glyphosate or glyphosate-based herbicides are needed to improve knowledge of its harmful effects and help control glyphosate use or encourage the development of formulations of less toxic herbicides.

Data availability

Data will be made available on request.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to thank YÖK (Council of Higher Education, Turkey) for the scholarship support given to Ekrem SULUKAN within the scope of the 100/2000 PhD program. We would like to thank Dr. Ahmet MAVİ and Dr. Hasan EFEÖĞLÜ for their assistance in the setup of the circadian analysis system. We would like to thank Atatürk University-DAYTAM (Eastern Anatolian High Technology Application Center) for their support in metabolome analysis.

CRedit authorship contribution statement

E.S.; conceived, designed, and wrote the paper. A.B. and M.K.; Contributed to the processing of behavioral analyzes. O.Ş. contributed the metabolome analyzes. İ.B. and S.Y.; contributed histopathological and immunofluorescence analyzes. H.A.C.; contributed to the interpretation and discussion of behavior analysis. S.B.C. supervised, designed the study, establish of behavior system, wrote the paper and proofread the final article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160086>.

References

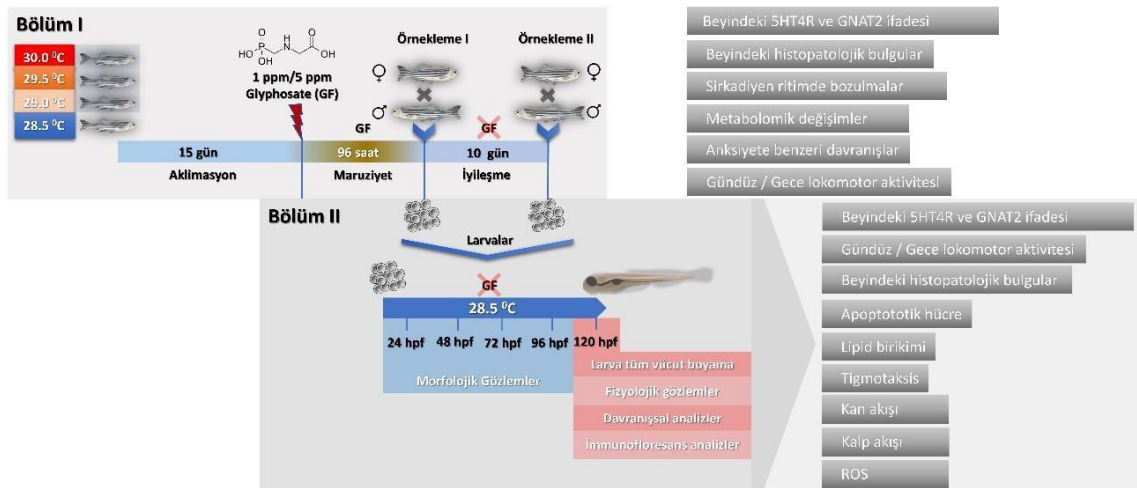
- Abalo, X.M., Lagman, D., Heras, G., del Pozo, A., Eggert, J., Larhammar, D., 2020. Circadian regulation of phosphodiesterase 6 genes in zebrafish differs between cones and rods: implications for photopic and scotopic vision. *Vis. Res.* 166, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2019.11.001>.
- Audira, G., Sampurna, B.P., Juniardi, S., Liang, S.T., Lai, Y.H., Han, L., der Hsiao, C., 2019. Establishing simple image-based methods and a cost-effective instrument for toxicity assessment on circadian rhythm dysregulation in fish. *Biol. Open* 8. <https://doi.org/10.1242/BIO.041871>.
- Baghdoyan, H.A., Lydic, R., 2012. The neurochemistry of sleep and wakefulness. *Basic Neurochemistry*. 982–999. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00057-2>.
- Bortolotto, J.W., Cognato, G.P., Christoff, R.R., Roesler, L.N., Leite, C.E., et al., 2014. Long-term exposure to paraquat alters behavioral parameters and dopamine levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 11 (2). <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0923>.
- Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J.B., Reolon, G.K., Bonan, C.D., 2017. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology* 392, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007>.
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K.M., Wu, N., Wong, K., Roy, S., Suciu, C., Goodspeed, J., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Tan, J., Denmark, A., Gilder, T., Kyzar, E., Dileo, J., Frank, K., Chang, K., Utterback, E., Hart, P., Kalueff, A.v., 2010. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat. Protoc.* 5, 1786–1799. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2010.140>.
- Casey, T., Patel, O., Dykema, K., Dover, H., Furge, K., Plaut, K., 2009. Molecular signatures reveal circadian clocks may orchestrate the homeorhetic response to lactation. *PLoS One* 4, e7395. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0007395>.
- Chen, C.Y., Logan, R.W., Ma, T., Lewis, D.A., Tseng, G.C., Sibille, E., McClung, C.A., 2016. Effects of aging on circadian patterns of gene expression in the human prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (1), 206–211.
- Chen, C.H.S., Kuo, T.C., Kuo, H.C., Tseng, Y.J., Kuo, C.H., Yuan, T.H., Chan, C.C., 2019. Metabolomics of children and adolescents exposed to industrial carcinogenic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 53, 5454–5465. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.9B00392/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2019-00392S_0004.PEG.
- Çomaklı, S., Köktürk, M., Topal, A., Özkaraca, M., Ceyhan, S.B., 2018. Immunofluorescence/fluorescence assessment of brain-derived neurotrophic factor, c-Fos activation, and apoptosis in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) larvae exposed to glufosinate. *Neurotoxicology* 69, 60–67. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2018.09.003>.
- Díaz-Martín, R.D., Valencia-Hernández, J.D., Betancourt-Lozano, M., Yáñez-Rivera, B., 2021. Changes in microtubule stability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after glyphosate exposure. *Heliyon* 7, e06027. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E06027>.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.v., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2009.06.022>.
- Eshelli, M., Qader, M.M., Jambi, E.J., Hursthouse, A.S., Rateb, M.E., 2018. Current status and future opportunities of omics tools in mycotoxin research. *Toxins* 10. <https://doi.org/10.3390/TOXINS10110433> (Basel).
- Faria, M., Bedrossiantz, J., Ramírez, J.R.R., Mayol, M., García, G.H., Bellot, M., Raldúa, D., 2021. Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. *Environ. Int.* 146, 106253.
- Fitzpatrick, A.M., Park, Y., Brown, L.A.S., Jones, D.P., 2014. Children with severe asthma have unique oxidative stress-associated metabolomic profiles. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 258–261.e8. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2013.10.012>.
- Fricker, R.A., Green, E.L., Jenkins, S.I., Griffin, S.M., 2018. The influence of nicotinamide on health and disease in the central nervous system. *Int. J. Tryptophan Res.* 11. <https://doi.org/10.1177/1178646918776658>.
- Glinton, K.E., Benke, P.J., Lines, M.A., Geraghty, M.T., Chakraborty, P., Al-Dibashi, O.Y., Jiang, Y., Kennedy, A.D., Grotewiel, M.S., Sutton, V.R., Elsea, S.H., El-Hattab, A.W., 2018. Disturbed phospholipid metabolism in serine biosynthesis defects revealed by metabolomic profiling. *Mol. Genet. Metab.* 123, 309–316. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2017.12.009>.
- Goulart, T.L.S., Boyle, R.T., Souza, M.M., 2015. Cytotoxicity of the association of pesticides roundup Transorb® and Furadan 350 SC® on the zebrafish cell line, ZF-L. *Toxicol. In Vitro* 29, 1377–1384. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2015.06.007>.
- Hong, S.M., Hwang, S.W., Wang, T., Park, C.W., Ryu, Y.M., Jung, J.H., Shin, J.H., Kim, S.Y., Lee, J.L., Kim, C.W., Yoon, G., Kim, K.H., Myung, S.J., Choi, K.Y., 2019. Increased nicotinamide adenine dinucleotide pool promotes colon cancer progression by suppressing reactive oxygen species level. *Cancer Sci.* 110, 629–638. <https://doi.org/10.1111/CAS.13886>.
- Kaka, H., Opute, P.A., Maboeta, M.S., 2021. Potential impacts of climate change on the toxicity of pesticides towards earthworms. *J. Toxicol.* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8527991>.
- Kiziltan, T., Baran, A., Kankaynar, M., Şenol, O., Sulukan, E., Yildirim, S., Ceyhan, S.B., 2022. Effects of the food colorant carmoisine on zebrafish embryos at a wide range of concentrations. *Arch. Toxicol.* 96, 1089–1099. <https://doi.org/10.1007/S00204-022-03240-2/FIGURES/5>.
- Krylov, V.v., Izvekov, E.I., Pavlova, V.v., Pankova, N.A., Osipova, E.A., 2021. Circadian rhythms in zebrafish (*Danio rerio*) behaviour and the sources of their variability. *Biol. Rev.* 96, 785–797. <https://doi.org/10.1111/BRV.12678>.
- Lahiri, K., Vallone, D., Gondi, S.B., Santoriello, C., Dickmeis, T., Foulkes, N.S., 2005. Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *PLoS Biol.* 3, e351. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030351>.
- Laranjeiro, R., Whitmore, D., 2014. Transcription factors involved in retinogenesis are co-opted by the circadian clock following photoreceptor differentiation. *Development* 141, 2644–2656. <https://doi.org/10.1242/DEV.104380/-/DC1> (Cambridge).
- Li, X., Zhang, X., Ye, L., Kang, Z., Jia, D., Yang, L., Zhang, B., 2019. LC-MS-Based metabolomic approach revealed the significantly different metabolic profiles of five commercial truffle species. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02227>.
- Liu, X., Du, H., Sun, Y., Shao, L., 2022. Role of abnormal energy metabolism in the progression of chronic kidney disease and drug intervention. *Ren. Fail.* 44, 790. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2072743>.
- Maggi, F., la Cecilia, D., Tang, F.H.M., McBratney, A., 2020. The global environmental hazard of glyphosate use. *Sci. Total Environ.* 717, 137167. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.137167>.
- Mangold, S.A., Das, J.M., 2021. *Neuroanatomy, Reticular Formation*. StatPearls.
- Maximino, C., Puty, B., Benzecry, R., Araújo, J., Lima, M.G., de Jesus Oliveira Batista, E., Renata De Matos Oliveira, K., Crespo-Lopez, M.E., Herculano, A.M., 2013. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. *Neuropharmacology* 71, 83–97. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2013.03.006>.

- Mukherjee, T., Hanes, J., Tews, I., Ealick, S.E., Begley, T.P., 2011. Pyridoxal phosphate: biosynthesis and catabolism. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1814, 1585–1596. <https://doi.org/10.1016/j.BBAPAP.2011.06.018>.
- Özkara, A., Akyıl, D., Konuk, M., 2016. Pesticides, environmental pollution, and health. *Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species*. <https://doi.org/10.5772/63094>.
- Parlapiano, I., Biandolino, F., Grattagliano, A., Ruscito, A., Libralato, G., Prato, E., 2021. Effects of commercial formulations of glyphosate on marine crustaceans and implications for risk assessment under temperature changes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 213, 112068. <https://doi.org/10.1016/j.ECOENV.2021.112068>.
- Pereira, V.M., Bortolotto, J.W., Kist, L.W., de Azevedo, M.B., Fritsch, R.S., et al., 2012. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology* 33 (3). <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.03.005>.
- Prokko, J.M., Nikinmaa, M., 2018. Circadian rhythms and environmental disturbances – underexplored interactions. *J. Exp. Biol.* 221. <https://doi.org/10.1242/jeb.179267>.
- Richardson, J.R., Fitsanakis, V., Westerink, R.H.S., Kanthasamy, A.G., 2019. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol.* 138, 343–362. <https://doi.org/10.1007/S00401-019-02033-9>.
- Sammad, A., Hu, L., Luo, H., Abbas, Z., Umer, S., Zhao, S., Xu, Q., Khan, A., Wang, Yajing, Zhu, H., Wang, Yachun, 2022. Investigation of metabolome underlying the biological mechanisms of acute heat stressed granulosa cells. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 2146. <https://doi.org/10.3390/IJMS23042146>.
- Schweizer, M., Brilisauer, K., Triebskorn, R., Forchhammer, K., Köhler, H.R., 2019. How glyphosate and its associated acidity affect early development in zebrafish (*Danio rerio*). *PeerJ* 7. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.7094>.
- Ślifirski, G., Król, M., Turło, J., 2021. 5-HT receptors and the development of new antidepressants. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/IJMS22169015>.
- Sulkan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Işık, M., Atamanalp, M., Ceyhan, S.B., 2017. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 180. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.018>.
- Sulkan, E., Baran, A., Şenol, O., Yildirim, S., Mavi, A., Ceyhan, H.A., Toraman, E., Ceyhan, S.B., 2022a. The synergic toxicity of temperature increases and nanoplastics on zebrafish brain implies that global warming may worsen the current risk based on plastic debris. *Sci. Total Environ.* 808, 152092. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.152092>.
- Sulkan, E., Şenol, O., Baran, A., Kankaynar, M., Yildirim, S., Kiziltan, T., Bolat, İ., Ceyhan, S.B., 2022b. Nano-sized polystyrene plastic particles affect many cancer-related biological processes even in the next generations; zebrafish modeling. *Sci. Total Environ.* 156391. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.156391>.
- Sulkan, E., Baran, A., Kankaynar, M., Kızıltan, T., Bolat, İ., Yildirim, S., Ceyhan, H.A., Ceyhan, S.B., 2023. Global warming and glyphosate toxicity (II): offspring zebrafish modelling with behavioral, morphological and immunohistochemical approaches. *Sci. Total Environ.* 856. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158903>.
- Türkoğlu, M., Baran, A., Sulukan, E., Ghosigharehagaji, A., Yildirim, S., Ceyhan, H.A., Bolat, İ., Arslan, M., Ceyhan, S.B., 2022. The potential effect mechanism of high-fat and high-carbohydrate diet-induced obesity on anxiety and offspring of zebrafish. *Eat. Weight Disord.* 27, 163–177. <https://doi.org/10.1007/S40519-021-01140-5>.
- Wang, B., 2012. Molecular mechanism underlying sialic acid as an essential nutrient for brain development and cognition. *Adv. Nutr.* 3. <https://doi.org/10.3945/AN.112.001875>.
- Wang, T., Gnanaprakasam, J.N.R., Chen, X., Kang, S., Xu, X., Sun, H., Liu, L., Rodgers, H., Miller, E., Cassel, T.A., Sun, Q., Vicente-Muñoz, S., Warmoes, M.O., Lin, P., Piedra-Quintero, Z.L., Guerau-de-Arellano, M., Cassidy, K.A., Zheng, S.G., Yang, J., Lane, A.N., Song, X., Fan, T.W.M., Wang, R., 2020. Inosine is an alternative carbon source for CD8+ T-cell function under glucose restriction. *Nat. Metab.* 2, 635–647. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0219-4>.
- Wu, X., Bai, F., Wang, Y., Zhang, L., Liu, L., Chen, Y., Zhang, T., 2021. Circadian rhythm disorders and corresponding functional brain abnormalities in young female nurses: a preliminary study. *Front. Neurol.* 670.
- Xu, Y.X., Zhang, S.H., Yang, M.Y., Zhao, X., et al., 2022. Exposure of zebrafish embryos to sodium propionate disrupts circadian behavior and glucose metabolism-related development. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 241, 113791. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113791>.
- Yang, Q., Zhang, A.H., Miao, J.H., Sun, H., Han, Y., Yan, G.L., Wu, F.F., Wang, X.J., 2019. Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review. *RSC Adv.* 9, 37245–37257. <https://doi.org/10.1039/C9RA06697G>.
- Yang, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Wu, X., Zheng, Y., 2019. Flutolanil affects circadian rhythm in zebrafish (*Danio rerio*) by disrupting the positive regulators. *Chemosphere* 228, 649–655. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.04.207>.
- Zakharov, A., Khivintseva, E., 2020. Clinical use of melatonin in the treatment of sleep disorders. *Melatonin - The Hormone of Darkness And Its Therapeutic Potential And Perspectives*. IntechOpen <https://doi.org/10.5772/intechopen.92656>.
- Zhao, H., Ke, H., Zhang, L., Zhao, Z., Lai, J., Zhou, J., Huang, Z., Li, H., Du, J., Li, Q., 2022. Integrated analysis about the effects of heat stress on physiological responses and energy metabolism in *Gymnocypris chilianensis*. *Sci. Total Environ.* 806. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.151252>.

6. MATERYAL ve METOT (BÖLÜM II)

6.1. Çalışma Kurgusu

Yetişkin balıklara, konsantrasyonu 1 ve 5 ppm olacak şekilde 96 saatlik akut glyphosate maruziyeti gerçekleştirildikten sonra ve 10 günlük iyileşme (recovery) sürecinin sonunda balıklar yeni nesil analizler için üremeye bırakılmış ve yumurta alınmıştır. Elde edilen yumurtalar yeni nesil analizler için kullanılmıştır (Şekil 22).



Şekil 22. Çalışma kurgusu özeti.

6.2. Yeni Nesil Analizleri

Tüm davranış testleri tamamlandıktan sonra iyileşme'ye tabi tutulmadan önce ve sonra her gruptan rastgele seçilen 5 çift (1 dişi: 1 erkek) yeni nesil için üreme tanklarına yerleştirilmiştir. Balıklar araya engel konulan yumurtlama tanklarında bir gece bekletilmiştir. Ertesi sabah ışıkların açılması ile engel kaldırılmış ve yaklaşık 45 dakika yine bekletilmiştir. Sonrasında yumurtalar alınmıştır. Alınan yumurtalar 96.saatlerine kadar petri kaplarında 40 ml E3 (5mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, %0.01 metilen mavisi) olarak bilinen ortama aktarılıp kendi sıcaklıklarında inkübatörün içine konulmuştur. Yavruların yumurtadan çıkış, sağ kalım ve anomalileri 24 saat aralıklarla tek tek not edilmiştir. Ölü embriyolar kaydedilerek gözlemler sırasında solüsyondan çıkarılmıştır.

6.2.1. Larvaların Fizyolojik ve Morfolojik Analizlerinin Yapılması

Alınan yumurtaların fizyolojik ve morfolojik özellikleri Danio-Vision cihazı Danioscope yazılımı ile analiz edilmiştir. Her gruptan en az 50 yavru larvanın vücut uzunluğu, perikardiyal alan ve göz boyutu 48, 72 ve 96. saatlerde Danio Scope (Noldus) yazılımı ile ölçülmüştür. Kalp atışı ve kan akış hızı analizi için her gruptan rastgele seçilen 10 larva (üç biyolojik tekerrür, toplam 30 larva) mikroskop altında kalp bölgesi ve kaudal vene odaklanılarak 3 dakika süreyle bir Axiocam kamera (Discovery V12, Zeiss) ile 26 fps kare hızında ve 6,3× zoom büyütmede video kaydına alınmıştır. Kaydedilen videolar, Danio Scope (Noldus) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (Sulukan vd., 2021; Sulukan vd., 2023).

6.2.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Tespiti

Hücresel oksidan seviyelerini ve reaktif oksijen türlerini (ROS) değerlendirmek için CM-H₂DCFDA (5-krometil-2',7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü kullanılmıştır. CM-H₂DCFDA, hücrelerdeki reaktif oksijen türleri (ROS)'nin varlığında 520 nm'de yeşil floresan ışığa veren bir klorometil türevidir. Bu çalışmada ROS seviyelerini belirlemek için 96 saat süreyle glyphosate'a maruz bırakılan ebeveyn zebra balıklarından elde edilen 96 hpf larvalar yeşil floresan ışığa veren CM-H₂DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) kullanılarak boyanmış ve floresan görüntü elde edilmiştir. 24'lük hücre kültürü plağının her kuyucuğuna her gruptan 5 adet (3 tekerrürlü toplam 15 larva) larva yerleştirilmiştir. Konulan larvalar öncelikle 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Son yıkamayı yaparken tüm su uzaklaştırılarak 2 µg/ml indikatör eklenmiştir. Daha sonra 2 saat süreyle etüvde (herbir sıcaklık grubu için sırasıyla 28.5, 29, 29.5 ve 30 °C), karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından larvalar 3 kez saf su ile tekrardan yıkanmıştır. Ardından larvalar %3' lük metil selüloz ile lama sabitlenmiş ve flüoresan mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Germany) ile görüntü alınmıştır (Baran vd., 2018).

6.2.3. Apoptotik Hücrelerin Tayin Edilmesi

Canlı organizmalardaki programlanmış hücre ölümlerini belirlemek amacıyla Akridin Orange (AO) kullanılmaktadır. Hücre zarlarına kolayca nüfuz eden ve düşük moleküler ağırlıklı zayıf bazik bir boya olan AO DNA'ya bağlandığı zaman, 525 nm' de (yeşil) renkli bir ışığa gösterirken, RNA ile bağlandığında 460 nm' de (mavi) ışığa

vermektedir. RNA ve DNA moleküllerinin benzersiz spektral ayrımlarına ve farklı boyamalarına dayanarak, AO, apoptoz ve nekroptoz aşamalarını ayırt etmek için kullanılmaktadır (Byvaltsev vd., 2019). Bu amaçla, yaptığımız çalışmada tüm gruplarda bulunan 96 hpf larvalardan 5 adet (3 tekerrürlü toplam 15 larva) seçilerek PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Sonrasında larvalar 24'lük hücre kültürü plağının her kuyucuğuna konulmuştur. Son yıkamada tüm PBS çekilmiş ve kuyucuklara 5 µg/ml AO boyası eklenerek boyanmıştır. Boyama sonrasında plate 30 dk süreyle etüvde (herbir sıcaklık grubu için sırasıyla 28.5, 29, 29.5 ve 30 °C) karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından PBS ile tekrar yıkama yapılarak %3' lük metil selüloz ile lama sabitlenen larvalardan floresan mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Germany) ile görüntü alınmıştır (Sulukan vd., 2017).

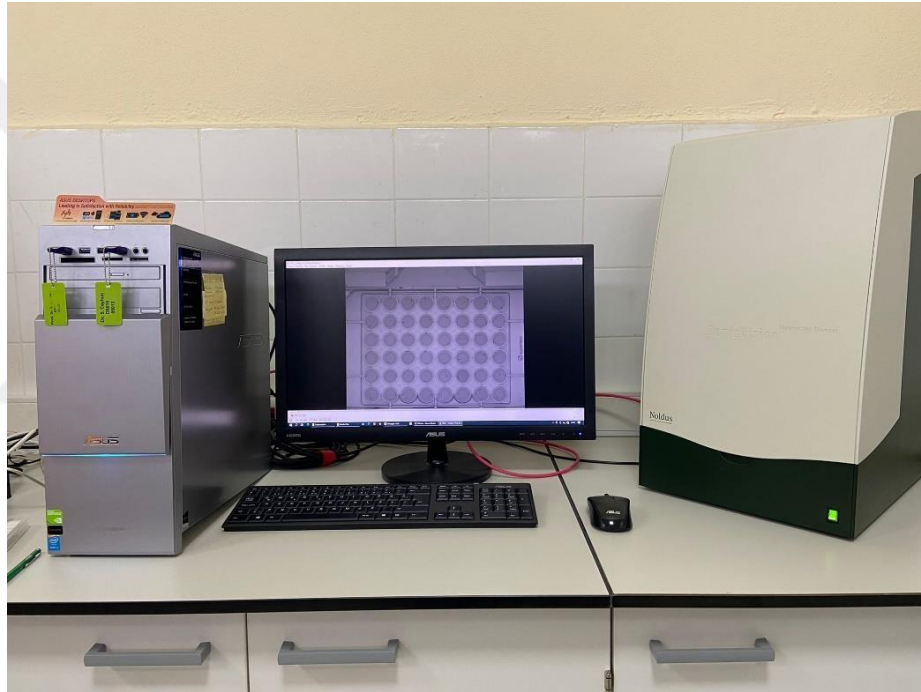
6.2.4. Vücuttaki Lipit Düzeylerinin Belirlenmesi (Nile-Red (C20-H18-N2-O2) Boyama)

Nil kırmızısı C20-H18-N2-O2 (9-dietilamino-5H-benzo (a) fenoksazin-5-o) organik bir heterotetrasiklik bileşiktir. Nil kırmızısı, genellikle kırmızı floresan proteini ile paylaşılan uyarma ve emisyon dalga boylarına sahip bir floresans mikroskop kullanılarak kolayca görüntülenebilen bir boyadır. Hücre içi lipit damlacıklarını boyayarak tespit edilmesini sağlamaktadır. Mevcut çalışmada, uygulamanın 120. saatinde tüm gruplardan 5 tane larva (3 tekerrürlü toplam 15 larva) alınmış ve 10 ng/ml C20-H18-N2-O2 ile bir gece gece etüvde (herbir sıcaklık grubu için sırasıyla 28.5, 29, 29.5 ve 30 °C) karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından %3' lük metil selüloz ile lama konulan larvalardan floresan mikroskobu (Zeiss, Discovery V12, Germany) ile görüntü alınmıştır (Sulukan vd., 2023).

6.2.5. Tigmotaksis ve Larva Lokomotor Davranış Testi

Larvaların lokomotor aktivite analizini yapmak için, her gruptan rastgele seçilen 32 adet (3 tekrarlı) 120 hpf larva kullanılmıştır. Larvalar, kuyucuk başına bir larva olacak şekilde 1 ml damıtılmış su ile 48 oyuklu hücre kültürü plağına yerleştirilmiştir. Plak hazırlandıktan sonra, sıcaklık kontrol ünitesi ile sıcaklığı 28.5 °C'ye ayarlanan DanioVision (Noldus) gözlem odasına yerleştirilerek larvaların hareketi 50 dakika süre boyunca (10 dakika karanlık ve aydınlık periyotlarda) kaydedilmiştir (Şekil 8). Tüm larva hareketleri kaydedildikten sonra karanlık ve/veya aydınlık periyoda ait veriler

değerlendirilmiştir. Sonrasında her bir larvanın 50 dakikalık kayıt süresi boyunca kat ettiği toplam mesafe ve ortalama hızları EthoVision (Noldus) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (Kiziltan vd., 2022). Larva zebra balıklarında kaygı indeksinin bir göstergesi olan tigmotaksis, küçük değişikliklerle Schnörr tarafından açıklanan yöntemle göre belirlenmiştir (Schnörr vd., 2012). Bu amaçla, 48 kuyucuklu hücre kültür plağının her bir kuyusu, larvaların vücut uzunluğuna eşit olacak şekilde iki bölüme (dışta 2.25 mm) ayrılmış ve larvalar kuyucuklara birer birer yerleştirilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Tigmotaksis, dış bölgede kat edilen toplam mesafenin tüm test alanına oranı alınarak ölçülmüştür. Zebra balığı larvalarının davranışlarının izlenmesi sonucunda elde edilen veriler EthoVision yazılımı (Noldus) ile analiz edilmiştir (Baran vd., 2020).



Şekil 23. DanioVision ve larva davranış analizlerinin yapıldığı sistem.

6.3. Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik analizler için çalışma sonunda her örneklemede her tekrardan rastgele seçilen on adet larva örneği %10' luk formaldehit solüsyonunda 48 saat süreyle tespit edilip, rutin doku takip işlemlerinin ardından parafin bloklara gömülmüştür. Daha sonra 4 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin-eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Olympus BX 51, JAPONYA). İncelene kesitler histopatolojik özelliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilmiştir (Türkoğlu vd., 2021).

6.4. İmmunohistokimyasal Analizler

İmmunohistokimyasal analizlerde anksiyete ile ilişkili olan 5HT4 (5-Hydroxytryptamine receptor 4) ve sirkadiyen ritim ile ilişkili olan GNAT2 (Guanin nükleotid bağlayıcı protein G (t) alt birimi alfa-2) proteinlerine ait antikorlar kullanılmıştır. İmmunohistokimyasal inceleme için histopatolojik analizler için parafin bloklarda gömülmüş olan dokulardan 4 µm kalınlığındaki kesitler adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınarak deparafinize ve dehidre edilmiştir. Ardından % 3'lük H₂O₂'de 10 dk tutularak endojen peroksidaz inaktive edilmiştir. Daha sonra dokular %1' lik antijen retrieval (sitrat buffer (pH⁺6.1) 100X) solüsyonunda kaynatılmıştır. Dokularda nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için kesitler protein blok ile 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından dokulara primer antikorlar (5HT4 Kat No: ab60359, Sulandırma Oranı: 1/100, UK) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun inkübe edilmiştir. Sekonder işaretleyici olarak immunfloresans sekonder antikor kullanılıp (FITC Cat No: ab6785 Dilüent Oranı: 1/1000) karanlık ortamda 45 dk bekletilmiştir. Ardından dokulara ikinci primer antikorlar (GNAT2 Kat No: bs-11560R, Sulandırma Oranı: 1/100, US) damlatılıp kullanım talimatlarına uygun bir şekilde inkübe edilmiştir. Sonrasında sekonder antikor ile muamele edilerek (Texas Red Cat No: ab6719 Dilüent Oranı: 1/1000 UK) karanlık ortamda 45 dk süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra kesitlere mounting medium' lu DAPI (Kat no: D1306 Sulandırma Oranı: 1/200 UK) damlatılıp 5 dk karanlık ortamda bekletildikten sonra kesitler lamel ile kapatılmıştır. Boyanan kesitler floresans ataçmanlı mikroskopta (Zeiss AXIO ALMANYA) incelenmiş ve veriler ZEISS Zen Imaging Software programında değerlendirilmiştir (Sokmen vd., 2020).

6.5. İstatistiksel Analiz

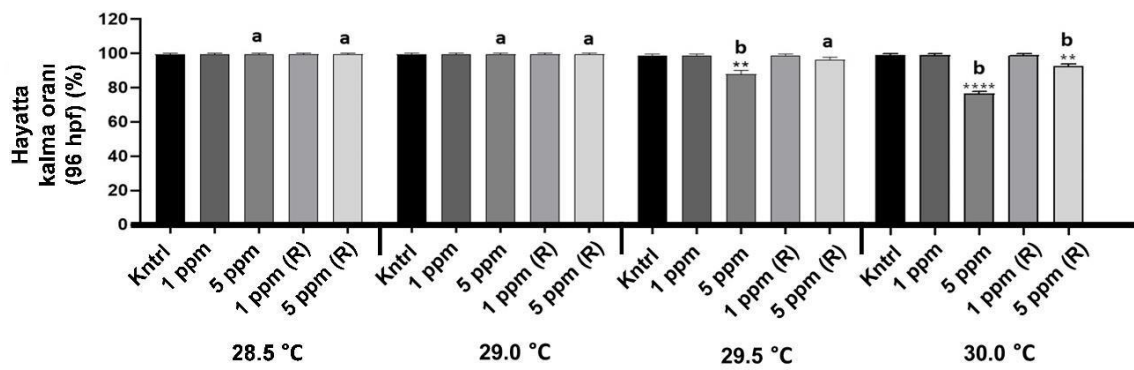
Tüm ölçümler, her bir hayvan ve numune için üç kopya halinde yapıldı. Sonuçların istatistiksel karşılaştırması, Prism yazılımı (GraphPad Software, San Diego, CA) kullanılarak tek yönlü ANOVA ve Tukey'nin post-hoc testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar şu şekilde sunulmuştur: ns $p > 0.05$ (anlamlı değil); * $p < 0.05$ (anlamlı); ** $p < 0.01$ (çok anlamlı); *** veya **** $p < 0.001$ veya 0001 (son derece önemli).

7. ARAŞTIRMA BULGULARI (BÖLÜM II)

7.1. Yeni Nesil Analizleri

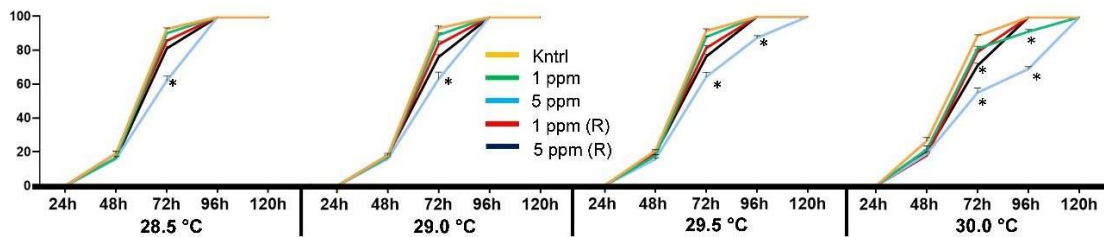
7.1.1. Embriyo/Larvaların Hayatta Kalma ve Kuluçka Oranları

Mevcut çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde, farklı sıcaklıklarda glyphosate'a maruz kalan yetişkin zebra balıklarının yavrularında; 5 ppm glyphosate maruziyetinin artan sıcaklıkla beraber 24 ve 48. saatlerde hiçbir grupta ölüme sebep olmazken, 72 ve 96. saatlerde zebra balığı larvalarında ölüm oranını önemli oranda artırdığı görülmüştür (Şekil 24).



Şekil 24. Zebra balığı larvalarının 96. saatteki hayatta kalma oranı. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

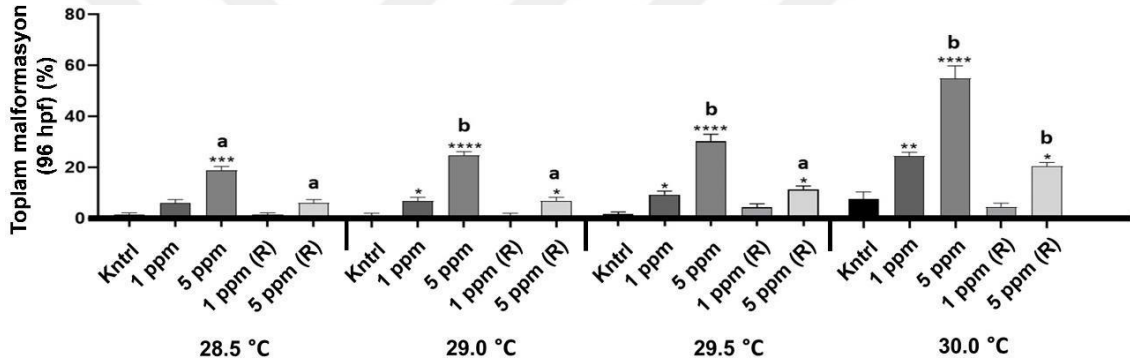
Benzer sonuçlar 5 ppm iyileşme grubunda da tespit edilmiştir. Yumurta çıkışı üzerindeki etkileri incelendiğinde de glyphosate'a maruz kalmanın 48, 72 ve 96. saatlerdeki kuluçkadan çıkmayı doz ve sıcaklıktaki artışa bağlı olarak önemli ölçüde geciktirdiği gözlemlenmiştir. Kontrol grubu larvalarının tamamı 96. saatte çıkışını tamamlarken, glyphosate uygulanan gruplarda ve iyileşme gruplarında yumurta çıkışı önemli oranda ertelenmiştir (Şekil 25).



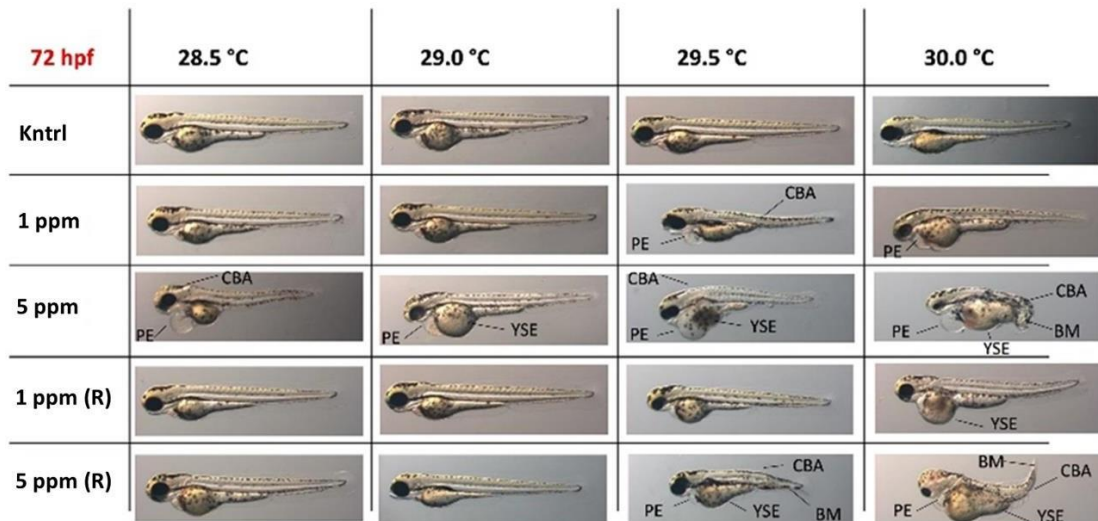
Şekil 25. Zebra balığı larvalarının 48. saatteki yumurta çıkışı oranı. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruptaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

7.1.2. Embriyo/Larva Malformasyonları

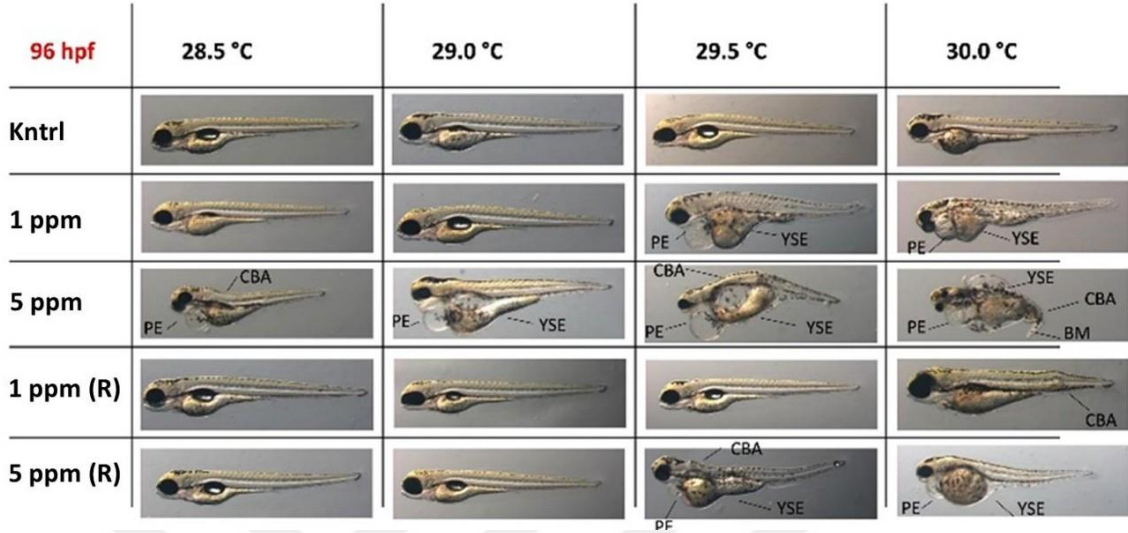
Bu çalışma, çevresel bir stresör olan sıcaklık değişimlerinin glyphosate'a maruz kalan yetişkin zebra balıklarından elde edilen yeni nesil yavruların farklı gelişim evrelerinde morfolojik değişikliklere sebep olduğunu göstermiştir. Perikardiyal ödem (PE), yolk sac ödemi (YSE), vücut malformasyonları (BM) (kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve baş malformasyonu dahil) ve eğri vücut eksenini (CBA) gibi tipik malformasyonlar incelendiğinde; 24, 48 ve 72. saatlerde doz ve sıcaklık artışına bağlı olarak toplam malformasyon oranında anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Ağırlıklı olarak perikardiyal ödem, yolk sac ödemi ve kuyruk anomalisi tespit edilmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. Zebra balığı larvalarının 96. saatteki toplam malformasyon oranı. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruptaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

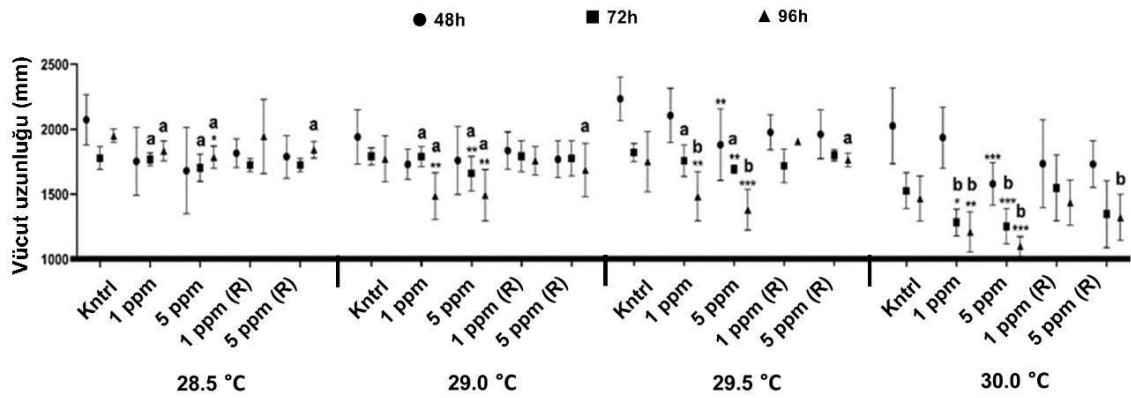


Şekil 27. Zebra balığı embriyolarının 72. saatte dört farklı gelişim sıcaklığındaki mikroskopik görüntüleri. Gözlenen vücut malformasyonlarının dağılımı. YSE: Besin kesesi ödemi; PE: Perikardiak ödem; BM: Vücut malformasyonları (Kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve baş malformasyonu); CBA: Kavisli gövde eksen.



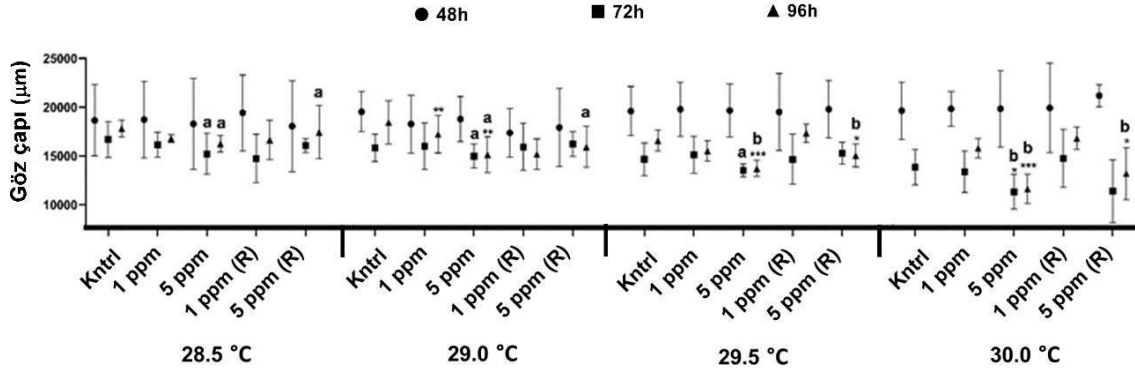
Şekil 28. Zebra balığı embriyolarının 96. saatte dört farklı gelişim sıcaklığındaki mikroskopik görüntüleri. Gözlenen vücut malformasyonlarının dağılımı. YSE: Besin kesesi ödemi; PE: Perikardiak ödem; BM: Vücut malformasyonları (Kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve baş malformasyonu); CBA: Kavisli gövde eksen.

Vücut uzunluğu üzerindeki etkisine bakıldığında ise özellikle 72 ve 96 hpf'de 1 ve 5 ppm glyphosate maruziyetinin vücut uzunluğunu anlamlı derecede azalttığı görülmüştür (Şekil 29).



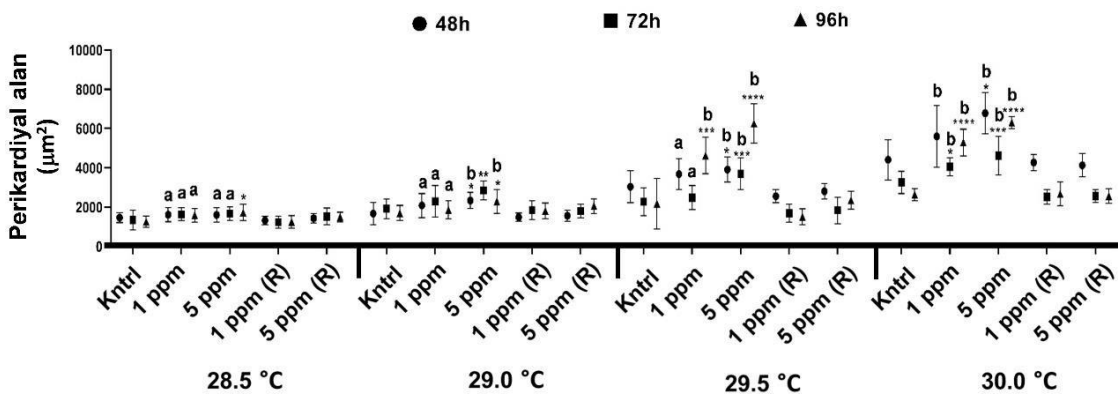
Şekil 29. Zebra balığı embriyolarında vücut uzunluğu malformasyonlarının belirlenmesi. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Göz çapındaki değişim incelendiğinde 5 ppm glyphosate uygulanan grupta 72 hpf'de 30 °C sıcaklık uygulamasında 96 hpf'de ise tüm sıcaklık değerlerinde göz çapının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 30).



Şekil 30. Zebra balığı embriyolarında göz çapı malformasyonlarının belirlenmesi. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

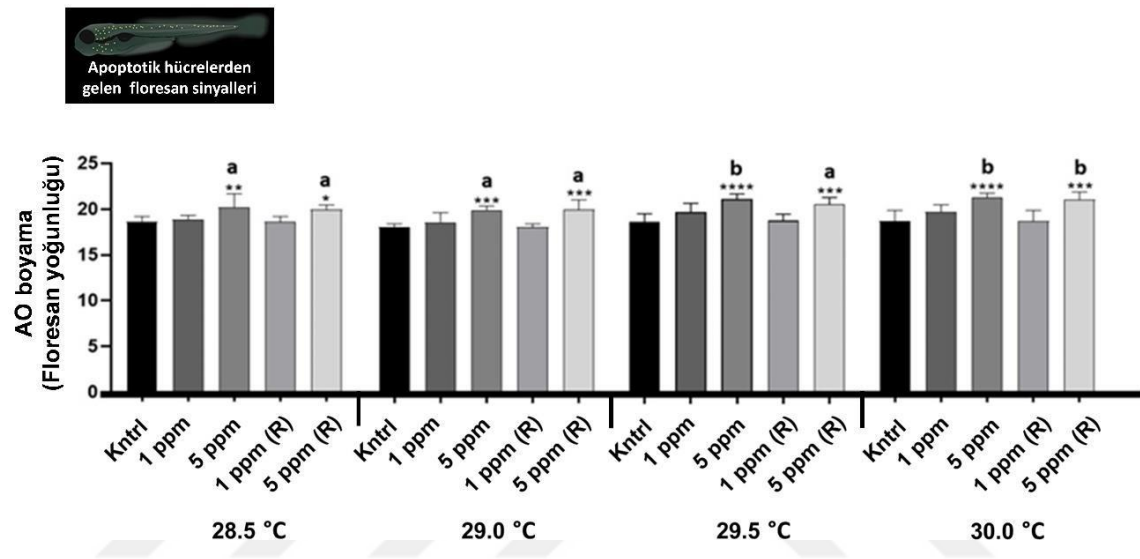
Perikardiyal alandaki malformasyonlar değerlendirildiğinde de 48, 72 ve 96 hpf'de glyphosate muamelesinin sıcaklık stresi altında perikardiyal alanda önemli bir artış olduğu bulunmuştur (Şekil 31). Elde ettiğimiz bulgular, 96 saat boyunca farklı glyphosate konsantrasyonlarına maruz kalan ebeveyn zebra balıklarından elde edilen yeni nesil larvalarda sıcaklık ve dozadaki artışa bağlı olarak vücut malformasyonlarında ciddi bir artış meydana geldiğini göstermiştir. İyileşme gruplarında da bu artışın devam ettiği belirlenmiştir.



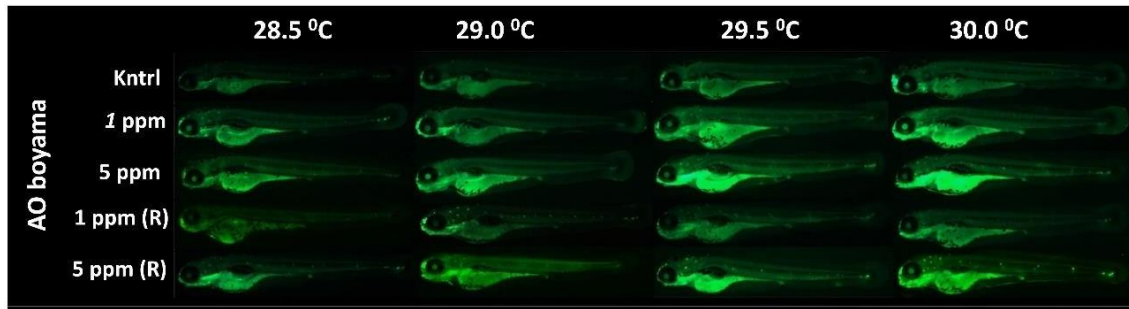
Şekil 31. Zebra balığı embriyolarında perikardiyal alan malformasyonlarının belirlenmesi. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

7.1.3. ROS, AO ve Nil Red Boyama Analizleri

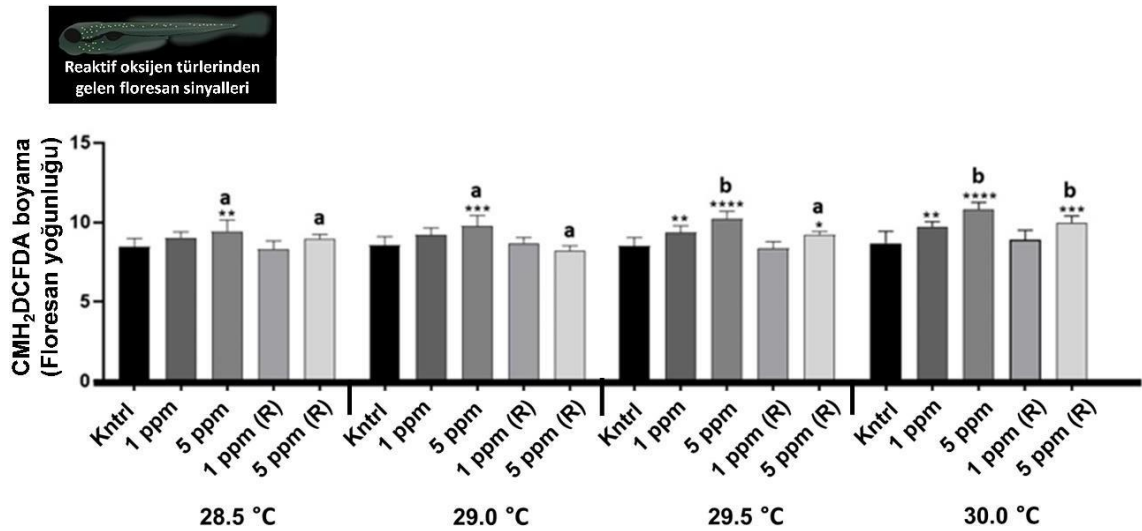
Yaptığımız çalışmada, 28.5 °C, 29.0 °C, 29.5 °C ve 30.0 °C gibi üç sıcaklık rejiminde glyphosate'a maruz bırakılan yetişkin zebra balıklarından elde edilen yeni nesillerde yüksek sıcaklığın akut glyphosate toksisitesinin yavrular üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler 29.5 ve 30.0 °C'de özellikle 5 ppm glyphosate'ın hücre ölümü ve serbest oksijen radikallerinin miktarında artışa sebep olduğu ve toksisiteyi daha da artırdığı gözlenmiştir (Şekil 32 ve 34).



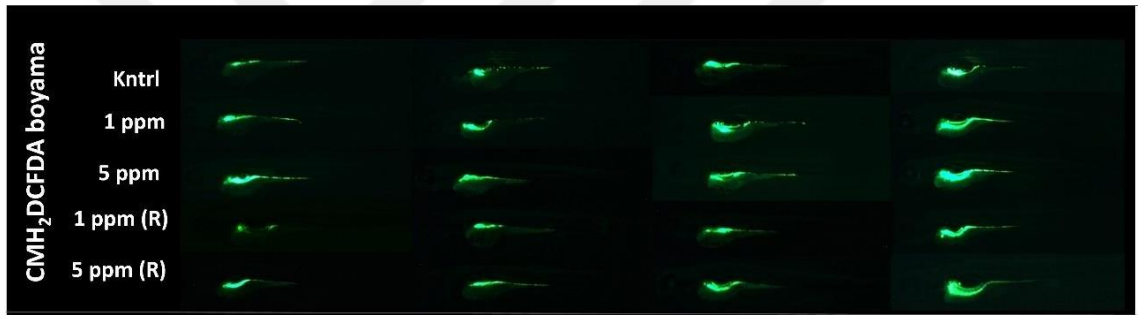
Şekil 32. Akridin orange (AO) boyama sonuçlarının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 33. Akridin orange (AO) boyama yöntemi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin floresan olarak belirlenmesi.

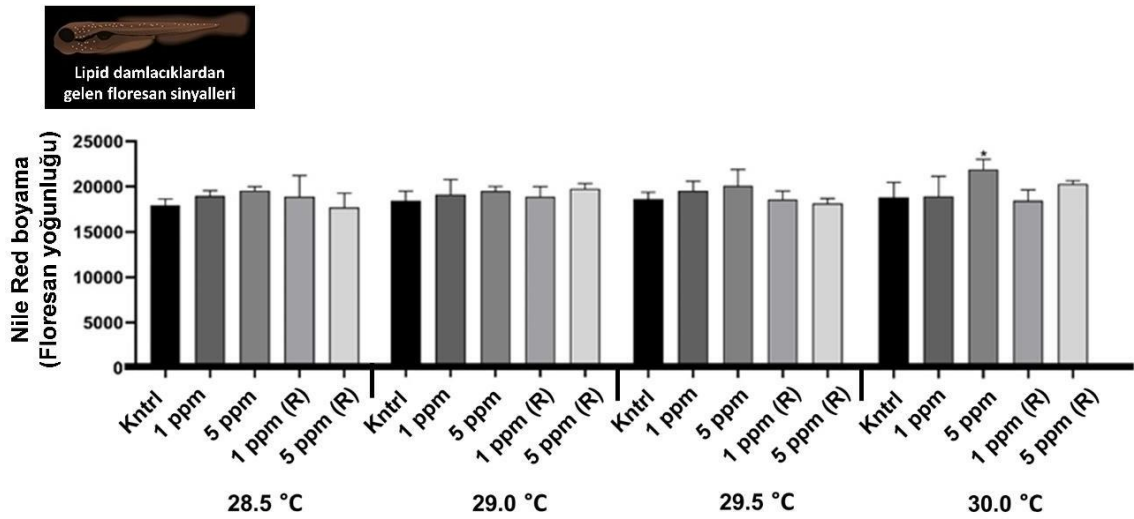


Şekil 34. CMH₂DCFDA boyama sonuçlarının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

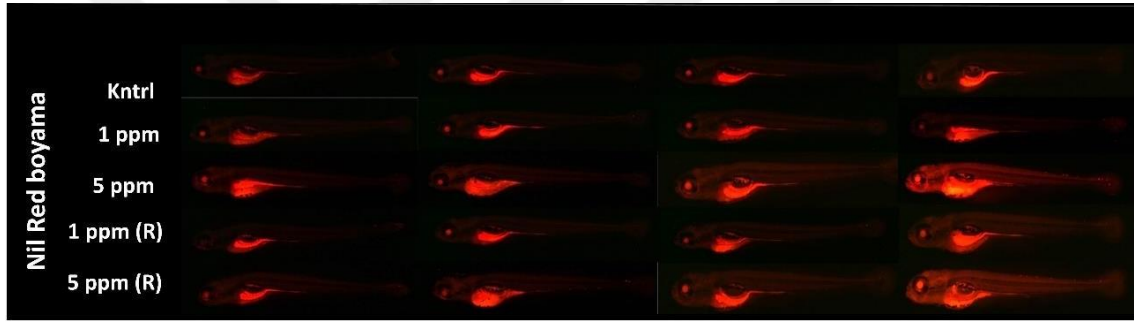


Şekil 35. CMH₂DCFDA boyama yöntemi kullanılarak hücrelerin ROS miktarının floresan olarak belirlenmesi.

Nil red boyama sonuçları incelendiğinde ise 30.0 °C’de yüksek dozdaki grupta önemli oranda bir yükselme meydana geldiği görülürken sıcaklık artışının herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 36). İyileşme gruplarında ise AO ve ROS parametrelerinde hemen hemen bütün sıcaklık değerlerinde 1 ppm glyphosate gruplarında iyileşme gözlenirken 5 ppm glyphosate’ın toksik etkilerinin devam ettiği görülmüştür.



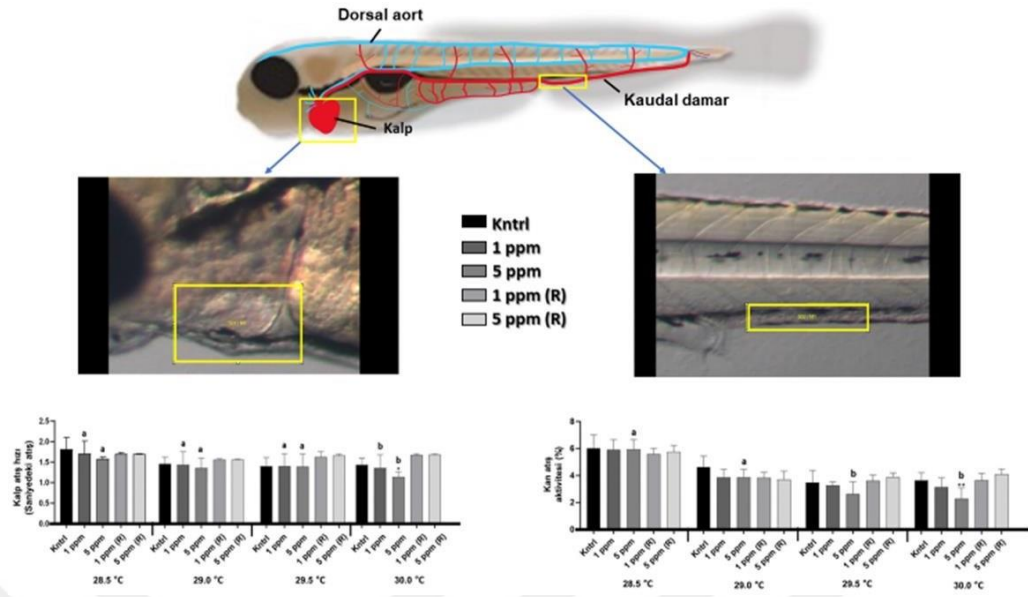
Şekil 36. Nil red boyama sonuçlarının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 37. Nil Red boyama ile bütün larvaların nispi floresan yoğunluğunun belirlenmesi.

7.1.4. Zebra Balığı Larvalarının Kan Akışının ve Kalp Atış Hızının Değerlendirilmesi

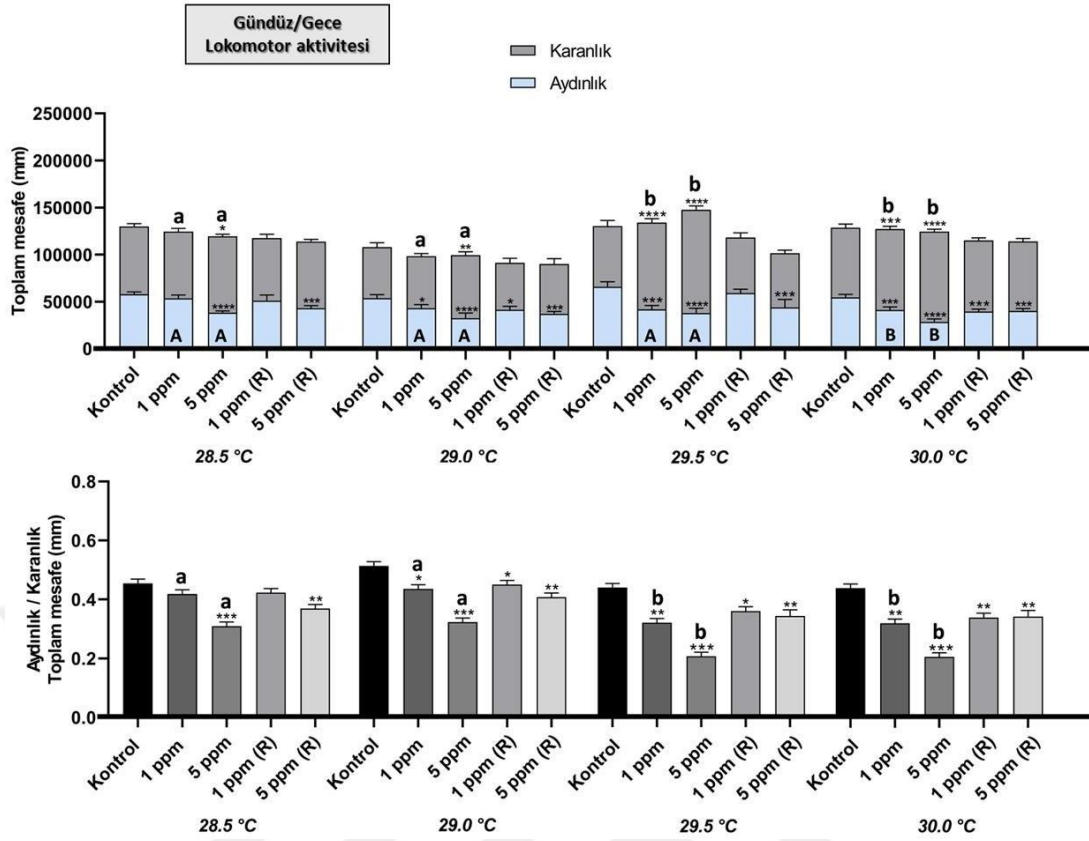
Optimum gelişme sıcaklıklarının üzerindeki değerlerde yetişkin zebra balıklarına uygulanan glyphosate'ın bu balıklardan alınan embriyoların kalp atışı ve kan akışı üzerindeki etkileri incelendiğinde doza ve sıcaklık değişimine bağlı olarak kan akış aktivitesinde ve kalp atış hızında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 38). Özellikle 30.0 °C'de 5 ppm glyphosate'ın bu etkileri daha dramatik bir hale getirdiği belirlenmiştir.



Şekil 38. Zebra balığı larvalarında kan akış aktivitesi ve kalp atış hızının gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

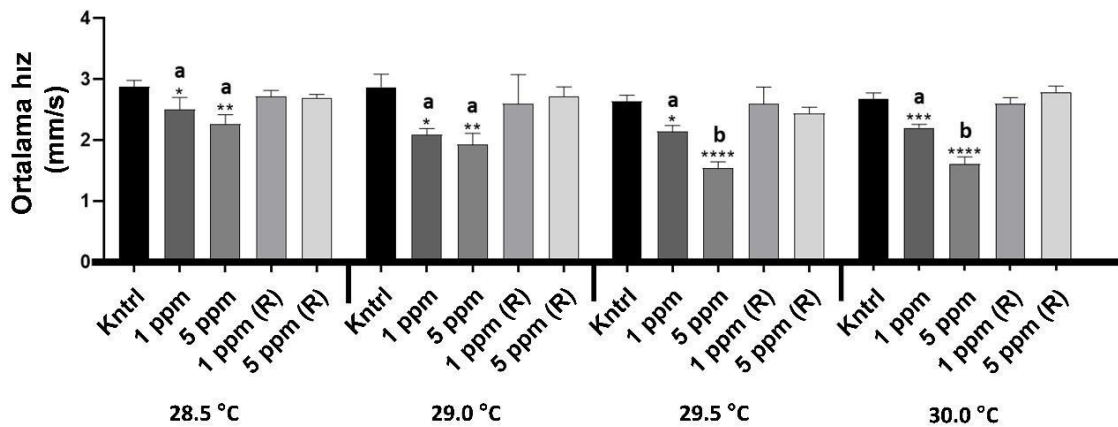
7.1.5. Larva Lokomotor Aktivitesi ve Tigmotaksis

Çalışmamız boyunca tüm gruplardan alınan larvalar Etho-Vision yazılımı ile davranış testine tabi tutulmuştur. Zebra balığı larvalarının aydınlık ve karanlık ortamda toplam sürede aldığı yol ve ortalama hız analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, aydınlık fazda sıcaklık ve dozdaki artışa bağlı olarak toplam mesafede azalma olurken karanlık fazda toplam mesafenin arttığı görülmüştür (Şekil 39).



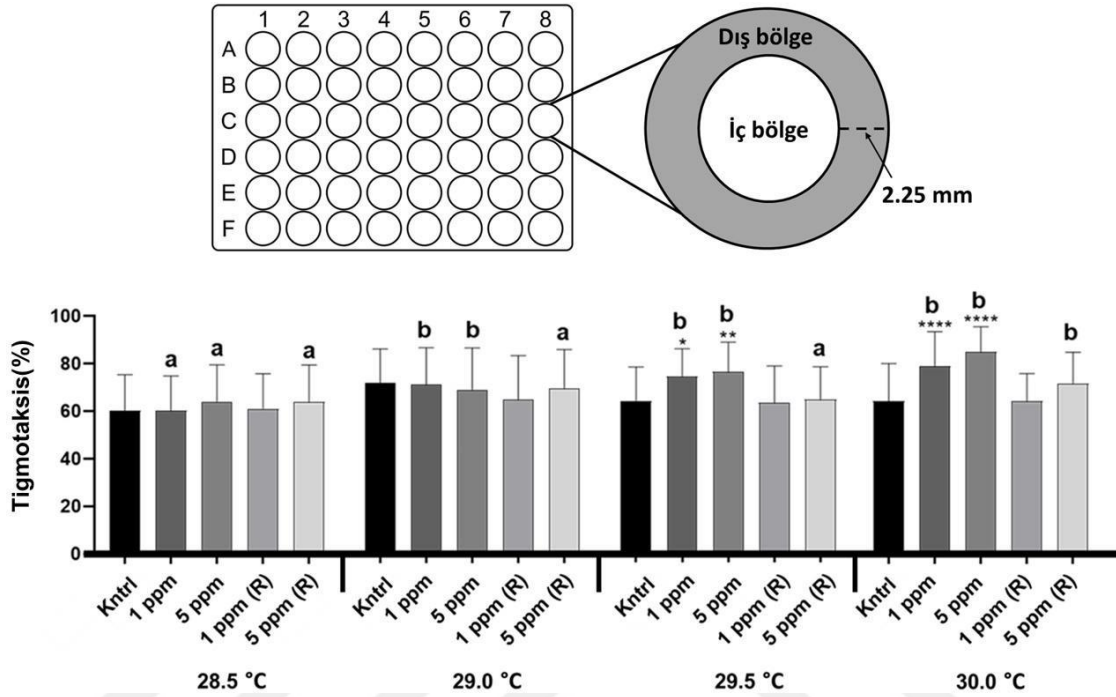
Şekil 39. Zebra balığı larvalarının lokomotor aktivite analizlerinden toplam mesafenin aydınlık ve karanlık fazda gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Ortalama hızdaki değişim incelendiğinde de benzer şekilde sıcaklık artışının hızda azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 40).



Şekil 40. Zebra balığı larvalarının lokomotor aktivite analizlerinden ortalama hızın gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

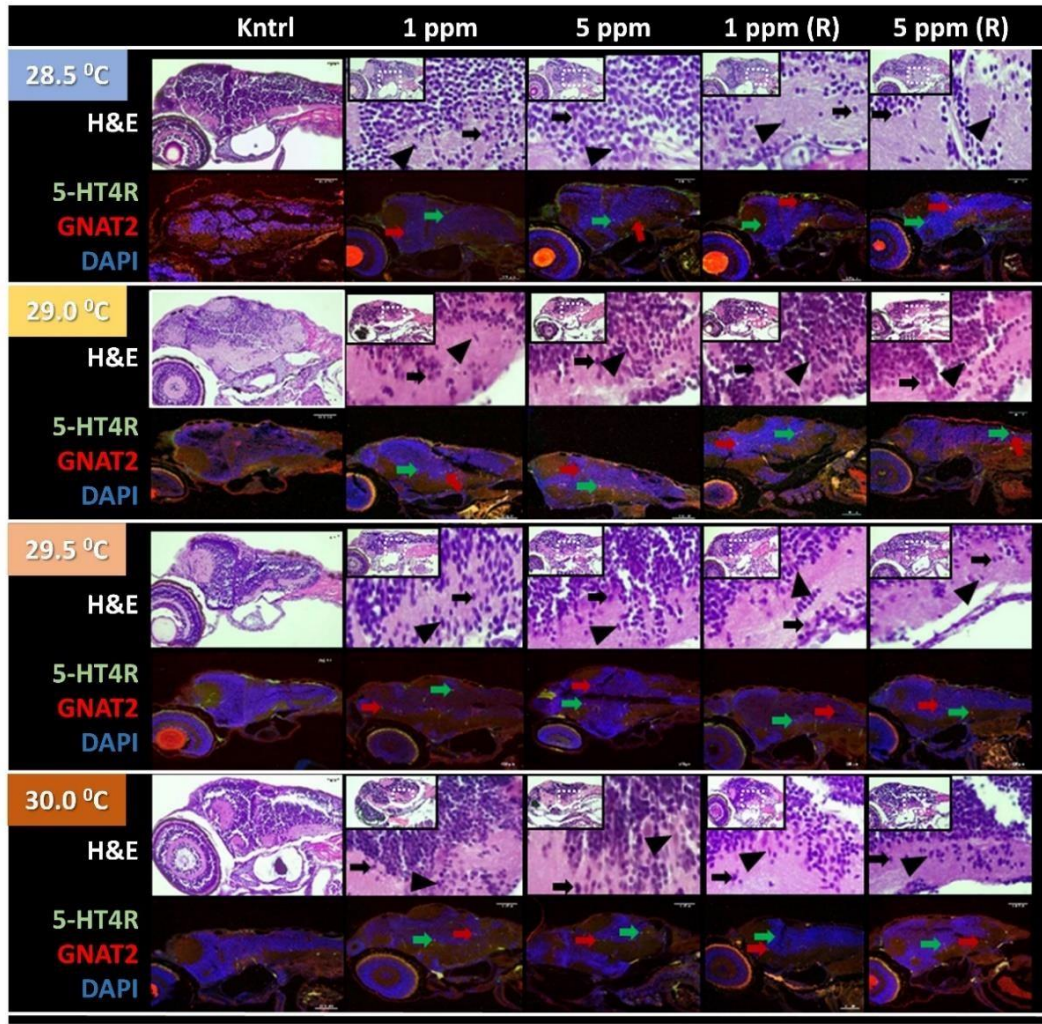
Tigmotaksis ve aydınlık/karanlık lokomotor aktivite sonuçlarına göre, glyphosate'a maruz kalan ebeveynler gibi yavruları da optimum sıcaklıkta tutulmalarına rağmen karanlık dönemde artan sıcaklığa paralel olarak anksiyete benzeri davranışlarda artış olduğu görülmüştür (Şekil 41).



Şekil 41. Zebra balığı larvalarının tigmotaksis parametresinin gruplar arasındaki karşılaştırması. Grupların kendi içerisindeki farklılıklar (*) ile, aynı gruplardaki farklı sıcaklıklar arasındaki önemli farklar ise harflerle gösterilmiştir ($p < 0.05$).

7.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları

Histopatoloji sonuçları analiz edildiğinde, ebeveynlerin glyphosatea maruz kalmasının, yavruların beyinde nekroz ve dejenerasyon bulgularına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 41). Ebeveynlerin maruz kaldığı sıcaklık artışının bu histopatolojik bulgular üzerinde fazla bir etkisi olmadığı söylenebilir. Ancak iyileşme sürecinde düşük dozlarda artan sıcaklığın iyileşmeyi geciktirdiği görülmektedir (Şekil 42). Histopatolojik bulguların aksine, ebeveynlerin glyphosate'a maruz kalmasının yavru beyinlerinde 5-HT4R ve GNAT2 immünopozitifliğinin, sıcaklık artışına paralel olarak artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 42/ Tablo 3).



Şekil 42. Zebra balığı larvalarının beyin kesitlerinde hematoksilin ve eozin boyama (H&E) 5-HT4R ve GNAT2 immüno pozitifliğinin belirlenmesi.

Tablo 3. Zebra balığı larvalarının beyin kesitlerinde 5-HT4R ve GNAT2 immüno pozitifliğinin skrolama tablosu

Puanlama	Sıcaklık	Kntrl	1 ppm	5 ppm	1 ppm (R)	5 ppm (R)
Dejenerasyon Ve Nekroz	28.5 °C	-	+++	++++	+	+++
	29.0 °C	-	+++	++++	++	+++
	29.5 °C	+	+++	++++	+++	+++
	30.0 °C	+	++++	++++	+++	+++
5HT4'ün immüno floresan yoğunluğu	28.5 °C	34.65±6.38 ^a	73.84±5.43 ^b	95.63±5.38 ^c	46.19±7.64 ^a	65.42±6.18 ^b
	29.0 °C	35.43±6.28 ^a	74.38±5.57 ^b	96.29±4.28 ^c	45.1±6.89 ^a	68.39±7.6 ^b
	29.5 °C	37.26±6.69 ^a	77.29±6.53 ^b	101.19±3.39 ^c	65.28±6.63 ^b	80.13±6.86 ^{bd}
	30.0 °C	39.68±5.27 ^a	83.86±5.44 ^b	108.49±5.33 ^c	73.37±4.09 ^b	93.38±8.37 ^c
GNAT2'nin immüno floresan yoğunluğu	28.5 °C	28.34±6.43 ^a	68.73±8.12 ^b	92.14±4.45 ^c	39.74±6.72 ^a	59.34±5.37 ^b
	29.0 °C	31.53±5.89 ^a	69.63±7.18 ^b	92.48±5.39 ^c	41.39±6.37 ^a	61.27±5.63 ^b
	29.5 °C	33.03±5.97 ^a	70.26±6.88 ^b	94.26±5.73 ^c	63.37±6.74 ^b	76.38±5.43 ^{bd}
	30.0 °C	35.61±4.3 ^a	76.14±7.06 ^b	101.75±6.08 ^c	71.5±5.83 ^b	91.44±6.05 ^c

Skorlama tablosu histopatolojik sonuçlardaki dejenerasyon ve nekroz bulgularının öneminin puanlanmasını gösterir (yok (-), hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++), çok şiddetli (++++) ve 5-HT4R ve GNAT2'nin immünofloresan yoğunluğu ($p < 0.05$). (Puanlama, her analiz için kullanılan tüm bölümlerin ortalamasını temsil eder).



8. TARTIŞMA (BÖLÜM II)

Küresel ısınmaya bağlı sıcaklık artışı su ekosisteminde pestisitlerin ürettiği toksisiteyi büyük ölçüde etkilemektedir (Op de Beeck vd., 2017; Yanik ve Aslan, 2018). Küresel ısınmanın neden olduğu sıcaklık artışının diğer çevre kirleticileri ile birlikte sinerjistik etkisini ortaya çıkarmak için mümkün olduğunca küresel ısınmayı temsil eden sıcaklık artış değerlerine sahip çalışmalar önemlidir. Yapılan incelemeler, glyphosate'ın yüzey sularındaki varlığının, uygulanmasından 60 gün sonra bile hala devam ettiğini ve uygulanan çevrede uzun süreler kalabileceğini göstermektedir (Roy vd., 2016). Ayrıca, kentsel akıntı ve atık su arıtma tesislerinin yakınındaki nehirlerde yaklaşık 0,04 mg/L'ye kadar glyphosate'ın bulunduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, hedef olmayan organizmaların maruz kalması kaçınılmazdır (Roy vd., 2016). Bu çalışmada küresel ısınmaya bağlı sıcaklık artışının zebra balıklarında glyphosate'ın toksisitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 96 saat boyunca glyphosate'a maruz kalan yetişkin zebra balıklarından alınan yeni nesil larvalarda perikardiyal ödem (PE), yolk sac ödemi (YSE), vücut malformasyonları (BM) (kuyruk malformasyonu, kısa kuyruk ve baş malformasyonu dahil) ve eğri vücut eksen (CBA) gibi tipik malformasyonlar incelenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, glyphosate'ın sıcaklık ve dozdaki artışa bağlı olarak göz çapı ve vücut uzunluğunda azalmalara, toplam malformasyon oranında ve perikardiyal alan anormalliklerinde ise ciddi bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca iyileşme gruplarında da bu artışın devam ettiği görülmüştür. Zebra balığı embriyolarında deformitelerin veya büyük yumurta sarısı kesesi oluşumunun gecikmiş besin kesesi (yumurta sarısı) rezorpsiyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Kiziltan vd., 2022). Vücut uzunluğundaki azalmanın bir sebebi sirkadiyen ritim genlerindeki ve melatonin seviyesindeki düzensizliklerin büyüme hormonları üzerindeki inhibe edici etkileri olabilir (Osterauer, 2008). Vücut uzunluğundaki ve göz çapındaki azalma, vücut anormallikleri ile açıklanabileceği gibi enerji metabolizmasındaki düzensizliklerle de desteklenebilir (Song vd., 2012). Yapılan bir çalışmada, glyphosate veya Roundup® maruziyetinin zebra balıklarının farklı gelişim evrelerinde davranışsal ve morfolojik değişiklikleri indüklediği gösterilmiştir. En yüksek konsantrasyona (0,5 mg/L) maruz kalmanın, oküler mesafede azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Roundup®'ın tüm konsantrasyonlarına maruz kalmanın (0.01, 0.065 ve 0.5 mg/L) ise gelişimin erken evrelerinde vücut uzunluğunu azalttığı tespit edilmiştir (Bridi et al. 2017). Benzer bir çalışmada, zebra balığı larvaları 100 ila 400 mg/L glyphosate'a maruz

bırakılmış, özellikle 400 mg/L'de vücut uzunluklarının kısaldığı, göz ve kafa çapının küçüldüğü görülmüştür (Zhang vd., 2017). Çalışmalar ayrıca diğer nörotoksik ajanların zebra balığı larvalarında çok sayıda morfolojik değişikliğe neden olabileceğini göstermiştir. Bir fungusit olan tebuconazole 4 mg/L konsantrasyonda 120 saat boyunca maruz kalmanın zebra balığı larvalarında oküler mesafeyi artırabildiği görülmüştür (Altenhofen vd., 2017). Benzer bir çalışma, zebra balığı larvalarının gelişimi sırasında bir herbisit olan atrazine 10 ppm dozunda maruz kalmanın, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kafa uzunluğunda önemli bir artışa sebep olduğunu göstermiştir (Weber vd., 2013). Bir diğer araştırmada 48 ve 72 saat 50 ve 100µg/mL glyphosate ile muamele edilen zebra balığı embriyolarında perikardiyal ödem, yolk kesesi ödemi ve kuyruk bükülmesi gibi anormallikler görülmüştür. 72 saatlik maruziyetten sonra ise 100µg/mL glyphosate'ın gözün ön ve arka uzunluğunda önemli bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Gaur ve Bhargava, 2019). Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz bulguların zebra balığının optimum gelişme sıcaklığının üzerindeki yüksek derecelerde tespit edilmiş olması çalışmamızı literatürdeki diğer çalışmalardan ayırmaktadır. Son birkaç yılda, glyphosate bazlı herbisitlerin hedef olmayan organizmalar üzerindeki etkilerine ilişkin ciddi bir endişe vardır (Schweizer vd., 2019). Yaptığımız araştırmanın neticesinde zebra balığının 28 °C civarındaki sıcaklıkları kolayca tolere edebildiği görülmüştür. Fakat 0.5 °C'lik sıcaklık farkının glyphosate'ın vücut malformasyonları üzerindeki etkilerini daha dramatik hale getirdiği gözlenmiştir.

Küresel ısınmanın bir sonucu olarak su sıcaklığının artması, su ekosistemi için ciddi bir uyarıdır. Balıklar poikilotermik olduğundan artan su sıcaklığı; metabolizma, büyüme, hayatta kalma, bağışıklık ve üreme gibi fizyolojik süreçlerini etkilemektedir. Ayrıca, sıcaklık değişiklikleri, toksik maddelerin oluşturduğu toksisite derecesini de etkilemektedir (Shahjahan vd., 2019b). Davranış ve morfolojik etkilerine ek olarak glyphosate'ın embriyonik gelişim sırasında epibol gecikmeleri, morfolojik, merkezi sinir sistemi gelişimi ve kardiyogenezdeki değişiklikler dahil olmak üzere birtakım olumsuz etkileri de bildirilmiştir (Diaz-Martin vd., 2021). Mevcut çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde; parental maruziyet sonrası alınan larvlarda, 1 ve 5 ppm glyphosate maruziyetinin 24 ve 48. saatlerde hiçbir grupta ölüme sebep olmadığı görülmüştür. Fakat 72 ve 96. saatlerde sıcaklık artışına paralel olarak ölüm oranının önemli derecede arttığı görülmüştür. İyileşme gruplarında da benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Yumurta çıkışı üzerindeki etkileri incelendiğinde de glyphosate'a maruz kalmanın 48, 72 ve 96.

saatlerdeki kuluçkadan çıkmayı doz ve sıcaklıktaki artışa bağlı olarak önemli ölçüde geciktirdiği gözlemlenmiştir. Kontrol grubu larvalarının tamamı 96. saatte çıkışını tamamlarken, glyphosate uygulanan gruplarda ve iyileşme gruplarında yumurta çıkışı önemli oranda ertelenmiştir. Yumurta çıkışının gecikmesi, kirleticinin neden olduğu bir savunma mekanizması olabilir, çünkü koryon bir bariyer görevi görür ve balıkları kirleticilerin etkisine karşı koruyabilir (Osterauer, 2008). Kuluçka gecikmesinin diğer bir açıklaması, bazı yumurtalarda gözlenen embriyoların koryonu kıramaması veya yumurta çıkış sürecinde yer alan enzimlerin pestisit tarafından inhibisyonunun tetiklenmesi olabilir. Yumurtadan çıkma zorluğunun bir başka sebebinin de spontan kas hareketlerinin zayıflamasına neden olan nöromusküler yetersizliklerin olduğu düşünülmektedir (Kiziltan vd., 2022; Rahman vd., 2020; Yang vd., 2019b). Elde edilen sonuçlar, sıcaklık stresinin toksik duyarlılığı ciddi oranda artırabileceğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada da, saf glyphosate'a veya onun ticari formülasyonlarına maruz kalan zebra balıklarının yumurtalıklarında ve sperm kalitesinde değişiklikler meydana gelerek üreme hasarına sebebiyet verilebileceği tespit edilmiştir (Richardson vd., 2019). Endokrin bozucu olarak glyphosate bazlı herbisitlerin potansiyel rolünün araştırıldığı bir diğer çalışmada, zebra balıkları 0.065, 0.65 ve 6.5 mg/L konsantrasyonlarda Roundup'a maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar 0.065 ve 6.5 mg/L Roundup'ın gonad olgunlaşmasını olumsuz etkilediğini ve bu değişikliklerin popülasyon dinamiklerini tehlikeye atarak üreme toksisitesine yol açabileceğini göstermiştir (Davico vd., 2020). Benzer bir çalışma, 10 mg/L glyphosate muamelesinin zebra balıklarında yumurta üretimini düşürdüğünü, erken dönem embriyo ölümlerini ve yumurtadan erken çıkışı da artırdığını göstermiştir. Bununla birlikte, embriyogenez sırasında maruziyet tek başına embriyo ölüm oranını artırmamıştır, bu da bu etkinin esas olarak gametogenez sırasındaki maruziyetten kaynaklandığını düşündürmüştür (Webster vd., 2014).

Oksidatif stres, prooksidanlar ve antioksidanların, prooksidanlar lehine, bir redoks hücre sinyal bozukluğuna ve ardından oksidatif hasara yol açan bir dengesizliği olarak tanımlanır (Baran vd., 2021). Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi, redoks durumunun korunmasında ve hücreleri ve organizmaları oksidatif hasara karşı savunmada esastır. Farklı çevresel parametreler arasında sıcaklık, herhangi bir kimyasalın toksisitesini büyük ölçüde etkilemektedir (Shahjahan vd., 2019b). Zebra balığı 28 °C civarındaki sıcaklıkları kolayca tolere etse de, artmış sıcaklık farkları daha yüksek metabolik hıza neden olabilir. Bu nedenle, maddelerin etkileri daha

hızlı ortaya çıkar ve daha şiddetli olabilir (Schweizer vd., 2019). Yaptığımız çalışmada, yetişkin zebra balıklarında 28.5 °C, 29.0 °C, 29.5 °C ve 30.0 °C gibi üç sıcaklık rejiminde yüksek sıcaklığın akut glyphosate toksisitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler 29.5 ve 30.0 °C’de özellikle 5 ppm glyphosate’ın AO ve ROS’da artışa sebep olduğu ve toksisiteyi daha da artırdığı görülmüştür. Nil red boyama sonuçları incelendiğinde 30 °C’de yüksek dozdaki grupta önemli oranda bir yükselme meydana geldiği tespit edilmiştir. İyileşme gruplarında ise AO ve ROS parametrelerinde hemen hemen bütün sıcaklık değerlerinde 1 ppm glyphosate gruplarında iyileşme gözlenirken 5 ppm glyphosate’ın toksik etkilerinin devam ettiği görülmüştür. Önceki çalışmalar Roundup ve glyphosate’ın ROS oluşumunu ve ardından lipid peroksidasyonu artırarak oksidatif hasarı tetikleyebileceğini göstermiştir (Velasques vd., 2016). Balıklarda, Roundup ve glyphosate’ın oksidatif stres üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışmada, 20 mg/L roundup’ın 6 günlük maruziyetinin ROS üretimini artırarak oksidatif stresin indüksiyonuna yol açtığı bulunmuştur (Webster vd., 2014). Benzer bir çalışmada, 10 ve 100 µg/mL glyphosate’a maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında perikardiyal ödem, spinal eğrilikler ve vücut malformasyonları görülmüştür. Bunlara ek olarak uygulanan dozlar reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve hücrel apoptoz üretiminde de artışlara sebep olmuştur (Sulukan vd., 2017).

Kalp, zebra balığı embriyolarının gelişiminde hayati rol oynayan bir organdır. Kalp hızı, kalp fonksiyonunun önemli bir göstergesidir ve hız değişiklikleri, zehirli bir ortamdaki embriyoların ve larvaların gelişimsel sağlığı hakkında bilgi verebilir (Zhang vd., 2021). Glyphosate’ın yaygın kullanımları ve maruziyeti göz önüne alındığında, fizyolojik etkileri üzerine çalışmalara ihtiyaç vardır. Mevcut çalışmada, optimum gelişme sıcaklıklarının üzerindeki değerlerde (28.5 °C, 29.0 °C, 29.5 °C, 30.0 °C) uygulanan glyphosate’ın zebra balığı embriyolarının kalp atışı ve kan akışı üzerindeki etkileri incelendiğinde doza ve sıcaklık değişimine bağlı olarak kan akış aktivitesinde ve kalp hızında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Özellikle 30 °C’de 5 ppm glyphosate’ın bu etkileri daha dramatik bir hale getirdiği tespit edilmiştir. İklim değişikliği ve küresel olarak artan sıcaklıklar göz önüne alındığında optimal gelişim sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda daha yüksek glyphosate konsantrasyonlarının etkisini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Kalp hızında meydana gelen düşüş, muhtemelen yüksek konsantrasyonlarda organizmanın toksik maddeyi ortadan kaldıramadığında meydana gelen patolojik etkilerin metabolizmayı ve bununla

birlikte kalp atış hızını azaltmış olmasından kaynaklanmaktadır (Osterauer, 2008). Öte yandan, kan akış hızında gözlenen önemli azalma, düşük kan oksijen seviyeleri ile ilişkili olabilir (Ma vd., 2019). Zebra balığı embriyolarında glyphosate toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada 25 ve 50 mg/L glyphosate konsantrasyonlarına maruz kalmanın endokard tabakasının kalınlaşmasına ve kardiyak ödem oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir (Schweizer vd., 2019). Yapılan başka bir çalışmada zebra balığı embriyolarının 28.5 °C’de 72 saat boyunca 10, 100 ve 700 ng/mL glyphosatea maruz bırakılmasının embriyo kuluçka inhibisyonu, spinal eğrilik, yolk kesesi hematomu, yolk kesesi ödemi, perikardiyal ödem, anormal kan dolaşımı ve anormal kalp şekli ve işlevi dahil olmak üzere bir dizi gelişimsel anormalliğe neden olduğu bulunmuştur (Zhang vd., 2021). Glyphosate kaynaklı kardiyotoksisiteyi değerlendirmek için yapılan bir araştırmada, 48 saat ve 72 saat’lik 50 ve 100µg/mL glyphosate maruziyetinin zebra balığı embriyolarının kalplerinde herhangi bir büyük yapısal anormallik oluşturmadığı fakat embriyoların kalp atışlarında konsantrasyon ve zamana bağlı olarak önemli bir azalmaya sebebiyet verdiği gözlemlenmiştir (Gaur ve Bhargava 2019).

Pestisitler; teratojenik ve toksikolojik etkilerin yanında zebra balığı larvalarındaki keşif parametreleri üzerinde de değişikliklere sebep olabilmektedir. Mevcut çalışmada sıcaklık stresi altında uygulanan parental glyphosate uygulamasının yavru balıkların hareketi üzerindeki etkisini incelemek için larva lokomotor aktivite analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, aydınlık fazda sıcaklık ve dozdaki artışla birlikte toplam mesafenin azalırken karanlık fazda arttığı ve glyphosate’ın hiperaktiviteye sebep olduğu tespit edilmiştir. Ortalama hızdaki değişim incelendiğinde de hem doz hem de sıcaklıktaki artışa bağlı olarak ortalama hızın önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, sıcaklık stresi altında glyphosate’ın organizma davranışlarını değiştirebileceğini ve spontan hareketi azaltabileceğini göstermektedir. Zebra balıklarının hareket kabiliyeti üzerindeki ksenobiyotik kirleticilerin etkisinin, büyük olasılıkla sinir sistemindeki gelişme gecikmesinden veya bozulmadan kaynaklandığı düşünülmektedir (Ma vd., 2019; Stehr vd., 2006). Yapılan bir çalışmada, bir fungusit olan carbendazim’in 120 hpf’de zebra balığı larvalarının lokomotor aktivitesinde değişikliklere neden olduğu ve ışık periyodu sırasında 0.8 g/L’nin üzerindeki konsantrasyonlarda kat edilen toplam mesafede önemli bir düşüş meydana getirdiği gözlenmiştir (Andrade vd., 2016). Benzer bir çalışmada, zebra balığı larvaları, 120 saat sonra boyunca geniş bir konsantrasyon aralığında (0.05-10.000 µg/L) glyphosate’a maruz bırakılmıştır. Davranış analizleri 1000 µg/L

glyphosate'a veya daha fazlasına maruz kalmanın ardından lokomotor aktivitede önemli bir düşüş olduğunu ortaya koymuştur (Forner-Piquer vd., 2021). Bu sonuçlardan farklı olarak yapılan başka bir araştırmada, 48 saatlik bir hareket testi, embriyonik dönemde 10 mg/mL glyphosate'a maruz kalmanın, muhtemelen motonöronal hasara atfedilen lokomotor aktiviteleri önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Benzer bir çalışmadan elde edilen davranış testi sonuçları, 0.01 ve 0.5 mg/L glyphosate'ın gün içerisinde zebra balığı lokomotor aktivitelerini artırabileceğini göstermiştir (Zhang vd., 2017). Locomotor aktivitesinde görülen bu değişikliklerin, test edilen kimyasalların kimyasal yapısı ve işlevlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca araştırmalar, spesifik pestisitlerin etki mekanizmalarının test edilen hedef hayvanlarda farklı olabileceğini öne sürmüştür (Hussain vd., 2020).

Mevcut çalışmada, bu davranışsal sonuçların altında yatan mekanizmayı aydınlatmak için zebra balığı yavrularının beyinde histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler de yapılmıştır. Histopatolojik analiz sonuçları incelendiğinde, ebeveynlerin glyphosate'a maruz kalmasının, yavruların beyinde nekroz ve dejenerasyon bulgularına neden olduğu görülmüştür (Şekil 42). Ebeveynlerin maruz kaldığı sıcaklık artışının bu histopatolojik bulgular üzerinde fazla bir etkisi olmadığını söyleyebiliriz (Şekil 42). Ancak iyileşme sürecinde düşük dozlarda artan sıcaklığın iyileşmeyi engellediği görülmektedir (Şekil 42). Birçok çalışmada zebra balığı larvalarında kimyasal/toksik maruziyet ve ısı stresi gibi çeşitli dış stres kaynaklarının neden olduğu histopatolojik beyin hasarının larva davranışını etkilediği gösterilmiştir (Baran vd., 2020; Kiziltan vd., 2022). Çalışmamızda yavru larvaların beyinlerinin çeşitli bölgelerinde tespit edilen bu histopatolojik bulguların larvaların davranış bozukluklarında etkili olabileceği düşünülmektedir.

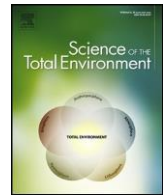
Histopatolojik bulguların aksine, ebeveyn glyphosate maruziyetinin neden olduğu yavru beyinlerinde 5-HT4R ve GNAT2 immünopozitifliğinin, ebeveynlerin maruz kaldığı sıcaklık artışına paralel olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 42). Duygudurum, kaygı ve bilişin düzenlenmesinde önemli rol oynayan Serotonin reseptörü 4 (5-HT4R) aktivasyonunun anksiyolitik etkiye neden olduğu bildirilmektedir (Karayol vd., 2021; Villas-Boas vd., 2021). Kemirgenlerde, 5-HT4'ün prefrontal kortekste veya çekirdekte bölgesel aşırı ekspresyonunun, ruh hali ve depresyon benzeri fenotipleri, gıda alımını ve hipofajiyi etkilediği gösterilmiştir (Rebholz vd., 2018). Ayrıca lokomotor aktivitelerin dolaylı kontrolünün, çoklu beyin merkezlerini uyaran rostral beyin sapındaki 5-HT

reseptörlerinin artan ekspresyonlarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Flaive vd., 2020). Öte yandan retina koni hücrelerinde ışık sinyali iletiminden sorumlu olan GNAT2'nin zebra balıklarında görsel sistem fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Li, 2019). Zebra balığı, ksenopus, fare ve insanlar gibi birçok omurgalıda sirkadiyen ritmin senkronizasyonu ile de ilişkilidir (Eydipour vd., 2020). GNAT2'nin sirkadiyen ritim ve lokomotor aktivitedeki rolünü araştırmak için yapılan bir çalışmada transgenik bir zebra balığı hattı oluşturuldu. Elde edilen veriler retinanın fotoreseptör hücrelerin, çevresel uyaranlara yanıt vererek sirkadiyen ritimleri ve motor aktiviteleri düzenlediğini göstermektedir (Li vd., 2012). Dolayısıyla bu sonuçlara göre yavru larvalarda gözlenen davranış değişikliklerinin beyinde tespit edilen patolojik bulgulardan ziyade serotonin ve ışık sinyali iletim yollarının aktivasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Global warming and glyphosate toxicity (II): Offspring zebrafish modelling with behavioral, morphological and immunohistochemical approaches☆

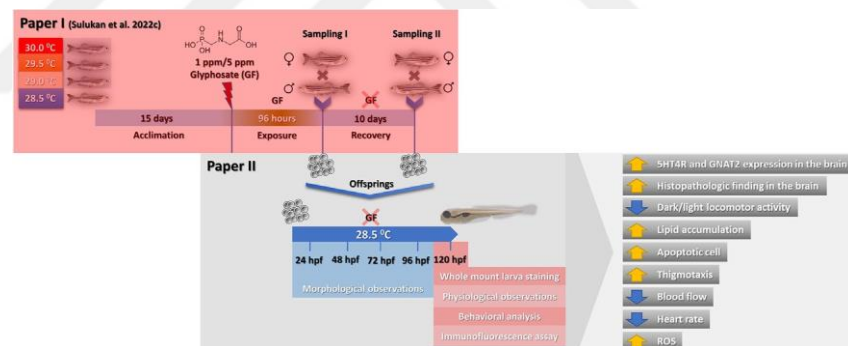
Ekrem Sulukan ^{a,b,c}, Alper Baran ^{a,d}, Meryem Kankaynar ^{a,e}, Tuğba Kızıltan ^{a,e}, İsmail Bolat ^f, Serkan Yıldırım ^f, Hacer Akgül Ceyhun ^g, Saltuk Buğrahan Ceyhun ^{a,b,c}^a Aquatic Biotechnology Laboratory, Fisheries Faculty, Atatürk University, Erzurum, Turkey^b Aquaculture Department, Fisheries Faculty, Atatürk University, Erzurum, Turkey^c Department of Aquaculture Engineering, Graduate School of Natural and Applied Science, Atatürk University, Erzurum, Turkey^d Department of Food Quality Control and Analysis, Technical Vocational School, Atatürk University, Erzurum, Turkey^e Department of Nanoscience and Nanoengineering, Graduate School of Natural and Applied Science, Atatürk University, Erzurum, Turkey^f Department of Pathology, Faculty of Veterinary, Atatürk University, Erzurum, Turkey^g Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, Turkey

HIGHLIGHTS

- Temperature increase makes glyphosate toxicity more dramatic in the offspring.
- Temperature increase and glyphosate cause behavioral problems in the offspring of zebrafish.
- Temperature increase and glyphosate affect apoptosis and ROS formation in the offspring of zebrafish.

GRAPHICAL ABSTRACT

Paper I is under the heading "Global warming and glyphosate toxicity (I): adult zebrafish modeling with behavioral, immunohistochemical and metabolomic approaches".



ARTICLE INFO

Editor: Henner Hollert

Keywords:

Global warming
Pesticide toxicity
Brain
Thigmotaxis

ABSTRACT

The increase in temperature due to global warming greatly affects the toxicity produced by pesticides in the aquatic ecosystem. Studies investigating the effects of such environmental stress factors on next generations are important in terms of the sustainability of ecosystems. In this study, the effects of parental synergistic exposure to glyphosate and temperature increase on the next generation were investigated in a zebrafish model. For this purpose, adult zebrafish were exposed to 1 ppm and 5 ppm glyphosate for 96 h at four different temperatures (28.5, 29.0, 29.5, 30.0 °C). At the end of this period, some of the fish were subjected to the recovery process for 10 days. At the end of both treatments, a new generation was taken from the fish and morphological, physiological, molecular and behavioral analysis were performed on the offspring. According to the results, in parallel with the 0.5-degree temperature increase applied to the parents with glyphosate exposure, lower survival rate, delay in hatching, increased body malformations and lower blood flow and heart rate were detected in the offspring. In addition, according to the results of whole mouth larva staining, increased apoptosis, free oxygen radical formation and lipid accumulation were detected in the offspring. Moreover, it has been observed that the temperature increases to which the parents are exposed affects

☆ This paper includes second part of PhD thesis of Ekrem SULUKAN. (The first part is under the heading "Global warming and glyphosate toxicity (I): adult zebrafish modeling with behavioral, immunohistochemical and metabolomic approaches").

^{*} Corresponding author at: Atatürk University, Fisheries Faculty, Aquaculture Department, 25240 Erzurum, Turkey.

E-mail address: saltukceyhun@hotmail.com (S.B. Ceyhun).

the light signal transmission and serotonin pathways in the offspring, resulting in more dark/light locomotor activity and increased thigmotaxis.

1. Introduction

Global warming, which expresses the increase in temperatures due to increasing greenhouse gas concentrations in the atmosphere, negatively affects natural ecosystems by increasing the melting of glaciers, rising sea level, evaporation of lakes and ocean acidity (Eissa and Zaki, 2011). Recent studies predict that the average temperature will increase by 0.2 °C per decade over the next 20 years, and by 1.8 °C – 4 °C up to 2100 (Assan et al., 2020). Due to the fact that the majority of aquatic species are poikilothermic, aquatic ecosystems have been the living groups most damaged by the effects of global warming. Changes in body temperatures due to the changes in environmental temperatures can cause the physiological and biochemical reactions of these organisms to deteriorate (Assan et al., 2020). For example, the somatic growth rate of fish also changes due to differences in water and air temperature caused by climate change. Temperature fluctuations during the developmental stage of fish can also cause skeletal deformities and disrupt the differentiation processes of cells and tissues (Eissa et al., 2009). Changes in environmental temperature not only affect growth, reproduction, spontaneous activity and metabolism, but also affect fish biology by changing neurochemical parameters and behaviors. A common response of fish to temperature change is to migrate to habitats with more favorable temperatures. However, if a fish cannot reach a habitat with optimal thermal conditions due to natural or anthropogenic factors, it will experience this temperature as a factor of anxiety and stress (Angiulli et al., 2020).

Moreover, the temperature changes are affecting even the next generations of aquatic organisms (Donelson et al., 2016; Donelson and Munday, 2015). Therefore, understanding how they respond to low-temperature increases will be an essential and effective step in predicting the effects of global warming on populations including offspring (Huang et al., 2021).

In addition to global warming, pesticides are another anthropogenic stressor that threatens aquatic biodiversity (Beketov et al., 2013). Pesticides are physical, chemical or biological warfare agents used to destroy pests and microorganisms, which degrade the nutritional value and destroy nutrients during the production, consumption and storage. They pollute the soil and water in the places where they are used, and they can also be transported from their places to distant regions by biological and physical means. Especially those that are durable in the environment and those that dissolve in lipids accumulate in ecosystems and become harmful to all living things. Glyphosate, the most widely used pesticide worldwide, blocks aromatic amino acid biosynthesis pathways and inhibits growth in unwanted plants (Maggi et al., 2020). Studies show that the presence of glyphosate in surface waters still persists 60 days after its application and can remain in the applied environment for long periods (Roy et al., 2016). In addition, the presence of glyphosate has been reported in rivers near urban runoff and wastewater treatment plants. In the last few years, there has been serious concern about the effects of glyphosate-based herbicides on non-target organisms (Schweizer et al., 2019).

Although studies on this subject are capable of evaluating the toxic effects of glyphosate on non-target organisms, the number of studies that consider multiple factors such as low-temperature increases that may represent global warming is quite limited. Many studies have reported an increase in the toxicity of pesticides at high temperatures. However, detailed studies are needed to understand how this synergistic effect will be on organisms at lower temperature increases (Rohr et al., 2011; Jackson et al., 2016). Therefore, the aim of this study, which belongs to a doctoral thesis, is to investigate how the temperature increase, which can represent global warming as much as possible, affects glyphosate toxicity on zebrafish and offspring. For this purpose, the effects on circadian rhythm and anxiety in adult zebrafish exposed to glyphosate in environments with a temperature

difference of 0.5 degrees were examined with behavioral, molecular and metabolomic approaches and presented as a separate article (Sulukan et al., 2022a, 2022b). In this article, the findings of the effects of this synergistic effect on their offspring are presented. In this study, thigmotaxis test representing anxiety-like behaviors and dark/light locomotor activity test representing circadian rhythm were performed as in their parents. In addition, in order to comment on the mechanism underlying these behavioral changes, the brain expressions of GNAT2, which is associated with circadian rhythm, and 5HT4R, which is associated with anxiety, were analyzed by immunofluorescence assays.

2. Material and method

2.1. Experimental setup

Wild type 6 months old AB genotype zebrafish (*Danio rerio*), whose ancestors were from Oregon State University (USA), were obtained from Atatürk University Fisheries Faculty Fisheries Experimental Research Unit. Fish kept in a photoperiod of 10 h dark and 14 h light were fed with paramecium until the 10th day following hatching and daily live (*Artemia salina*) and flake food from the 10th day (Westerfield, 2000). The experimental setup was prepared by placing 20 × 12 × 15 cm (width, length, height) aquariums inside the main tanks. The main tank was filled with water at a level that the aquariums would not move, and the water temperature in the aquariums in each main tank was adjusted to 28.5–29.0 - 29.5 - 30.0 °C with 0.05-degree precision thanks to the heater and temperature sensor connected to the heat control unit and the water circulation in the main tank. Perforated and 5 cm high platforms are placed under the aquariums to ensure optimum water circulation and temperature control in the main tank (Sulukan et al., 2022a). By adding 2.5 l of system water (approximately 2/3 of the aquarium volume) to each aquarium, the water temperature of the aquariums in each main tank was determined with an accuracy of 0.5 °C. After the temperatures were adjusted to the desired levels, the fish were taken to the experimental setup and subjected to a 15-day adaptation period. At the end of the adaptation period, 1 ppm and 5 ppm glyphosate were exposed to the treatment groups for 96 h. Doses were determined based on the results of previous studies (Sulukan et al., 2017a, 2017b). In the experimental setup, three independent aquariums with 30 zebrafish in total were used for each temperature and each group. At the end of the 96 h exposure period, randomly selected 15 fish were left to breed for the offspring experiments and then they were left to recover period for 10 days in a glyphosate-free environment and at the same temperature as used for treatment. At the end of the recovery period, the same fish were left to breed again. During the time the fish were in the experimental setup, 2/3 of the aquarium water was renewed daily (at the same time every day) with the same content. The experimental setup given in Fig. 1.

At least 300 embryos were obtained from each group in each replicate. Offspring embryos were taken E3 medium and kept at 28.5° up to 120 hpf. In this process, every 24 h, their mediums were renewed and the survival rate, hatching rate and body abnormalities of all offspring zebrafish were recorded. All procedures were performed in accordance with the approved Institutional Ethical Rules of Atatürk University (147-10/2020), and followed related OECD guidelines.

2.2. Morphological and physiological measurements (Body length, eye size, blood flow and heart rate)

Body length, pericardial area and eye size of at least 50 offspring larvae from each group were measured with Danio Scope (Noldus) software at 48,

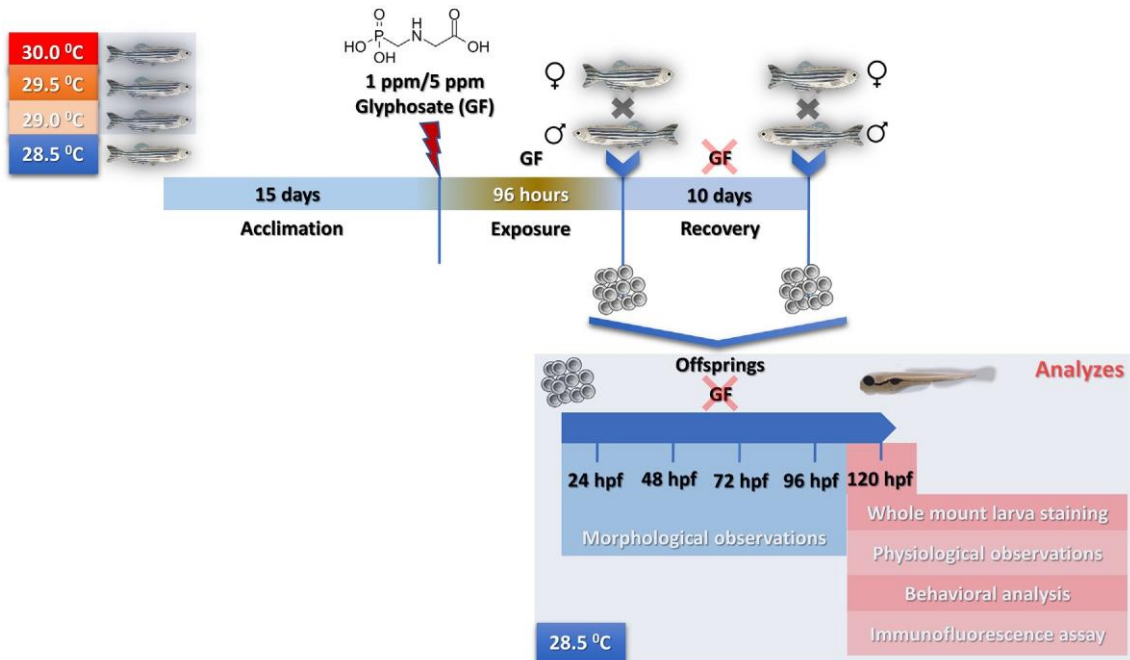


Fig. 1. The experimental setup.

72 and 96 h. For heartbeat and blood flow rate analysis, 10 randomly selected larvae from each group (with three biological replicates, a total of 30 larvae) were video recorded for 3 min by focusing on the heart region and caudal vein under the microscope (Discovery V12, Zeiss) at a frame rate of 26 fps and a 6.3× zoom magnification with an Axiocam camera. Video recordings were analyzed with Danio Scope (Noldus) software (Sulukan et al., 2021).

2.3. Thigmotaxis and dark/light locomotor activity

Larval locomotor activity analysis was performed with 32 (with 3 replicates) randomly selected 120 hpf larvae from each group. Larvae were placed in 48-well plate with 1 ml of distilled water as one larva per cell. The prepared plate was placed in the DanioVision (Noldus) observation chamber, the temperature of which was set to 28.5° thanks to the temperature control unit, and the movement of the larvae was recorded for 50 min (in 10-min dark and light periods). At the end of the recording, the data of each period (dark and/or light) were evaluated separately, and the total distance and average speed of each larva in a 50-minute period were analyzed via EthoVision (Noldus) software (Kiziltan et al., 2022). Thigmotaxis, an indicator of the anxiety index in larval zebrafish, was determined according to the method described by Schnörr with minor modification (Schnörr et al., 2012). For this purpose, each well of the 48-well plate containing the larvae, triggered by a sudden change in illumination (i.e., a sudden change from light to dark), was divided into two sections (2.25 mm on the outside) to be equal to the body length of the larvae. Thigmotaxis was measured by taking the ratio between the total distance traveled in the outer region and the entire test area. Monitoring and evaluation of the behavior of zebrafish larvae were performed using EthoVision software (Noldus) (Baran et al., 2020).

2.4. Whole mount larva staining (apoptosis, reactive oxygen species and lipid droplets detection)

In whole-mount larva staining analysis, 10 randomly selected 120-hour larvae (with three biological replicates, a total of 30 larvae) from each group were used for each staining. Molecular markers acridine orange for the detection of apoptotic cells, CM-H₂DCFDA for the detection of free oxygen species and Nile red for the detection of oil droplets were used in

the staining in accordance with the protocol previously described (Kiziltan et al., 2022). Labeled larvae were examined under fluorescence microscopy (Zeiss, Discovery V12). The fluorescence intensity of the larvae was quantified by measuring using the ZenBlue software (Zeiss) (Sokmen et al., 2020).

2.5. Histopathological and immunofluorescence analyzes

Larval samples taken at the end of the trial for histopathological analysis were fixed in 10 % formaldehyde solution for 48 h and embedded in paraffin blocks at the end of routine tissue follow-up procedures. Then, sections of 4 µm thickness were taken, stained with hematoxylin-eosin (HE) and examined with a light microscope (Olympus BX 51, JAPAN). The examined sections were evaluated as absent (–), mild (+), moderate (++) and severe (+++) according to their histopathological findings (Zodrow et al., 2004).

Antibodies belonging to 5-HT4R (5-Hydroxytryptamine 4 receptor), which is associated with anxiety, and GNAT2 (Guanine nucleotide binding protein G (t) subunit alpha-2 protein), which are associated with light signal transduction and circadian rhythm, were used in immunofluorescence analyzes. Tissue sections taken on the adhesive (poly-L-Lysin) slides for immunofluorescence examination were deparaffinized and dehydrated. Then, endogenous peroxidase was inactivated by keeping it in 3 % H₂O₂ for 10 min. Then the tissues were boiled in 1 % antigen retrieval (citrate buffer (pH + 6.1) 100×) solution. Sections were incubated with protein block for 5 min to prevent nonspecific background staining in tissues. Then, primary antibody (5HT4 Cat No: ab60359, Dilution Ratio: 1/100, UK) were dripped onto the tissues and incubated in accordance with the instructions for use. Immunofluorescence secondary antibody was used as a secondary marker (FITC Cat No: ab6785 Diluent Ratio: 1/1000) and kept in the dark for 45 min. Then, second primary antibody (GNAT2 Cat No: bs-11560R, Dilution Ratio: 1/100, US) were dripped onto the tissues and incubated in accordance with the instructions for use. Immunofluorescence secondary antibody was used as a secondary marker (Texas Red Cat No: ab6719 Diluent Ratio: 1/1000 UK) and kept in the dark for 45 min. Then, DAPI with mounting medium (Cat no: D1306 Dilution Ratio: 1/200 UK) was dripped onto the sections and kept in the dark for 5 min, then the sections were covered with a coverslip. The stained sections were examined under a

fluorescent microscope (Zeiss) and the data were evaluated in the ZEISS Zen Imaging Software (Sulkan et al., 2022b).

2.6. Statistical analysis

Data from all experiments were statistically compared using GraphPad Prism Software version 8.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Analysis of the results of the control and experimental groups was made with Dunnett's multiple comparison tests and one-way ANOVA. All data are presented as mean $\pm$ standard mean error (SEM). P values < 0.05 were considered significant. Statistically significant changes are indicated with a symbol (*). Symbol expressions are as follows: * $p < 0.05$ (significant); ** $p < 0.01$ (very significant); *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ (highly significant).

3. Results and discussion

It is reported that the increase in temperature due to global warming has the potential to greatly affect the toxicity produced by pesticides in the aquatic ecosystem (op de Beeck et al., 2017; Yanik and Aslan, 2018). Studies with temperature increase values that represent global warming as much as possible are important in order to reveal the synergistic effect of the temperature increase caused by global warming together with other environmental pollutants. Therefore, in our study, the effect of a temperature change of 0.5 °C on the toxicity of glyphosate exposure parentally was investigated in zebrafish offspring. According to results, it was observed that parental exposure to glyphosate, together with the effect of increasing temperature, causes significant body abnormalities including pericardial edema (PE), yolk sac edema (YSE), curved body axis (CBA) and other

typical body malformations (BM) (tail malformation, short tail and head malformation) during the embryological development in offspring zebrafish (Fig. 2).

It is one of the most important findings of the study that although the offspring spend their hatching period at their optimum temperature (28.5 °C), the 0.5-degree temperature increase to which their parents are exposed causes significant body malformations. It is seen that the recovery in the "recovery period" is interrupted as the temperature to which the parents have been exposed increases. Similar findings were observed during the survival and hatching rates. It has been determined that especially parental exposure to high temperatures causes a significant decrease in the survival rate of the offspring. Similarly, it is observed that hatching is delayed in parallel with the increasing temperature increase. Delay in hatching is associated with inhibition of hatching enzymes, hypoxia and/or insufficient mobility of the embryo (Chen et al., 2016). On the other hand, it has been also reported that delay in hatching may occur as a contaminant-induced defense mechanism since the chorion acts as a barrier and can protect fish against the effects of pollutants (Osterauer, 2008). Another reason for the difficulty in hatching is thought to be neuromuscular deficiencies that cause weakening of spontaneous muscle movements (Haendel et al., 2004; Kiziltan et al., 2022; Rahman et al., 2020; Tal et al., 2012; Yang et al., 2019). In our study, it is thought that this delay in hatching may be caused by increasing malformations. Although it can be said that zebrafish offspring can easily tolerate these deformities after the recovery period in near-optimum temperatures (28.5–29.0 °C), it has been observed that a temperature increases of 0.5 °C make the effects of parental glyphosate exposure on body malformations in the offspring more dramatic. A similar study examined the effects of parental exposure to a pesticide, flutolanil, on the next generation. For this purpose, adult zebrafish

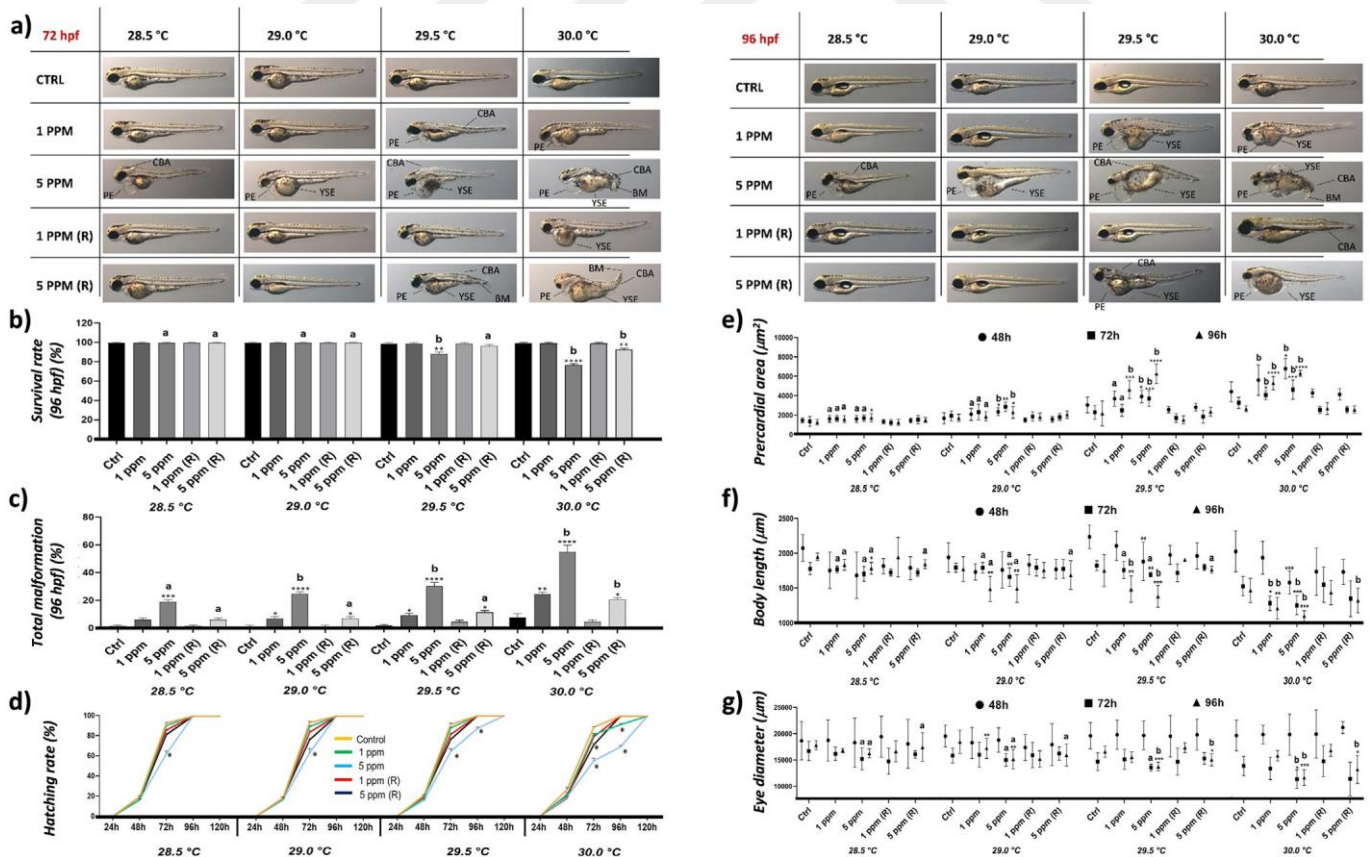


Fig. 2. Microscopic observation of body abnormalities (a), survival rate (b), total malformations (c), hatching rate (d), pericardial area (e), body length and eye diameter (g) of offspring zebrafish parentally exposed to the glyphosate and increased temperature. PE; pericardial edema, YSE; yolk sac edema, CBA; curved body axis, BM; typical body malformations including tail malformation, short tail and head malformation. The significant differences between the groups with the same temperature value are shown with "*" while the significant differences between different temperatures in the same groups are shown with lowercase letters ($p < 0.05$).

were exposed to environmentally relevant flutolanil concentrations for 60 days. Results showed that exposure to flutolanil caused gonadal endocrine disruption, decreased reproduction, and developmental toxicity in F1 (Teng et al., 2020). Another study examined the effects of parental exposure to perfluorobutane sulfonate (PFBS), one of the aquatic pollutants, on the embryonic development of offspring. Adult zebrafish were exposed to 0, 10, and 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS for 28 days. The results showed that the development of the offspring embryos was delayed, the mortality rate increased, hatching was delayed, the heart rate slowed down, and neurobehavioral disorders appeared (Tang et al., 2020). As a result of these body abnormalities observed in the offspring, growing pericardial area and shortening body length were observed with increasing temperature (Fig. 2e and f). And eye size, which is the last morphological observation parameter and associated with brain development during embryonic development (Chen et al., 2010; Tseng-Ayush et al., 2005; Wu et al., 2006), was found to decrease with increasing temperature (Fig. 2g). Bridi and colleagues found that 0.5 ppm a glyphosate-based herbicides exposure to zebrafish during the embryonic development period caused a decrease in the ocular distance (Bridi et al., 2017). In another study conducted in our laboratory, it was determined that exposure to carmoisine, a widely used food dye, caused a reduction in eye size and body size in zebrafish during embryonic development (Kiziltan et al., 2022). In a study, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ glyphosate exposure for 48 and 72 h to zebrafish embryos resulted in abnormalities such as pericardial edema, yolk sac edema and tail twisting (Gaur and Bhargava, 2019). In addition to this, 72 h of exposure to 100 $\mu\text{g/mL}$ of glyphosate was found to cause a significant reduction in the eye size (Gaur and Bhargava, 2019). In terms of eye size and body length parameters, we can also say that the recovery period does not work very well at high temperatures. To investigate the effects of maternal exposure to Tris (2-butoxyethyl) phosphate (TBOEP), an environmental pollutant in zebrafish, on the progeny, zebrafish were exposed to TBOEP at concentrations of 0, 0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$ for 120 days. When the results were examined, TBOEP residues were detected in F1 larvae after parental exposure. It was also observed that the survival rate decreased, the body length decreased and the heart rate increased (Huang et al., 2019). In a similar study, adult zebrafish were exposed to an endocrine disrupting chemical, bisphenol A (BPA), at a concentration of 1.0 μM for 7 days. When the results were examined, it was determined that parental BPA exposure delayed the hatching time of the F1 strain and affected heart rates (Huang et al., 2020). In our study, we did not examine any parameter for the evaluation of energy metabolism, but it is reported that the reduction in eye size may be caused by

the irregularity in this metabolism as well as central nervous system damage (Kim et al., 2013; Song et al., 2012).

The heart is an organ that plays a vital role in the development of zebrafish embryos. Heart rate is an important indicator of heart function, and rate changes can inform the developmental health of embryos and larvae in a toxic environment (Zhang et al., 2021). On the other hand, blood flow rate, which is an important indicator of both the cardiovascular system and physiological condition in the organism, is a parameter where clear responses can be obtained against toxic exposure and heat stress, which can directly affect the dissolved oxygen level in the water. In the current study, it was observed that parental exposure to glyphosate together with increasing temperature caused a decrease in heart rate and blood flow rate in offspring (Fig. 3). It has been determined that 5 ppm glyphosate exposure, especially at 30 °C, makes these effects more dramatic. It is suggested that the decrease in heart rate is due to the pathological effects that occur when the organism is unable to eliminate the toxic substance, reducing metabolism and heart rate with it (Osterauer, 2008). On the other hand, the observed significant decrease in blood flow velocity may also be associated with insufficient blood oxygen levels (Ma et al., 2019). In their study, Li et al. showed that the decrease in blood flow caused by toxic exposure may have effects resulting in insufficient blood supply to the heart and subsequent hypoxia (Li et al., 2022). In a study investigating glyphosate toxicity in zebrafish embryos, it was found that exposure to 25 and 50 mg/L glyphosate concentrations caused cardiac edema formation (Schweizer et al., 2019). In another study, exposure of zebrafish embryos to glyphosate for 72 h at 28.5 °C resulted in embryo hatching inhibition, yolk sac edema, pericardial edema, abnormal blood circulation and cardiac defects (Zhang et al., 2021). In a similar study, zebrafish embryos were exposed to 0.7, 7 and 35 mg/L glyphosate for 120 h. Results showed that glyphosate caused early hatching of fish, decreased heart rate and body length, and formation of pericardial and yolk sac edema (Liu et al., 2022).

In our study, whole-mount fluorescent staining analysis was performed in offspring to determine the effects of the synergistic effect of parental glyphosate exposure and temperature increase on reactive oxygen species (ROS) formation, apoptosis and lipid accumulation during the embryonic development period of the offspring. Results showed that exposure of parents to a 0.5 °C temperature increase triggered the glyphosate-induced increase in all these three parameters in offspring (Fig. 4). Apoptosis, which is a fundamental component of organism development (Meier et al., 2000), especially tissue formation, is an important parameter in the evaluation of toxic stress exposure in zebrafish larvae. Various external factors,

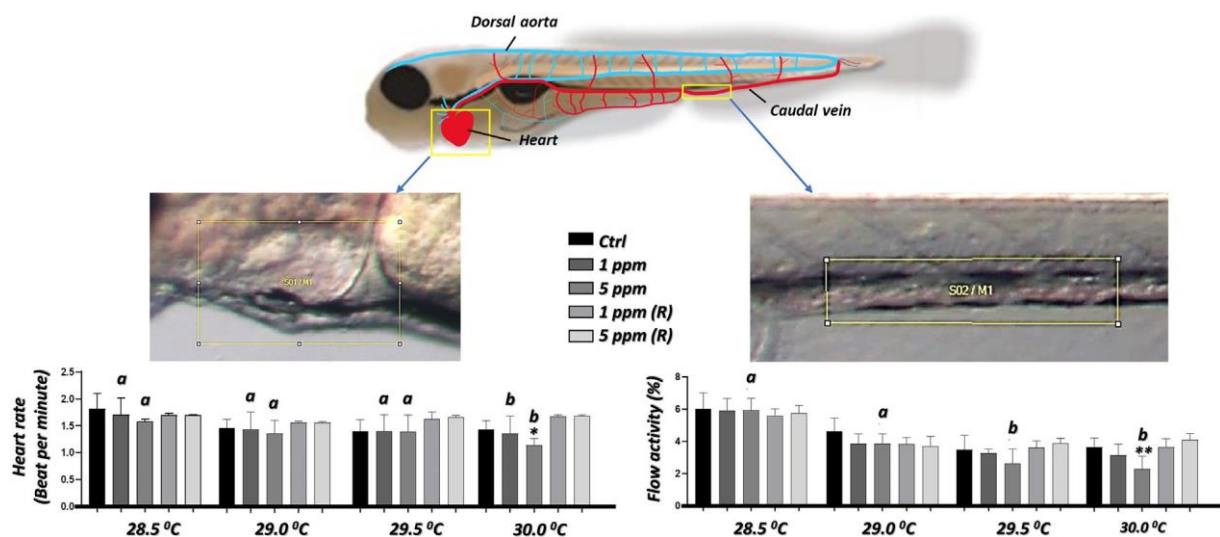


Fig. 3. Heart rate (left) and blood flow activity (right). Schematic picture of the representative cardiovascular system of the zebrafish larva (120 hpf) (top). The significant differences between the groups with the same temperature value are shown with "*" while the significant differences between different temperatures in the same groups are shown with lowercase letters ($p < 0.05$).

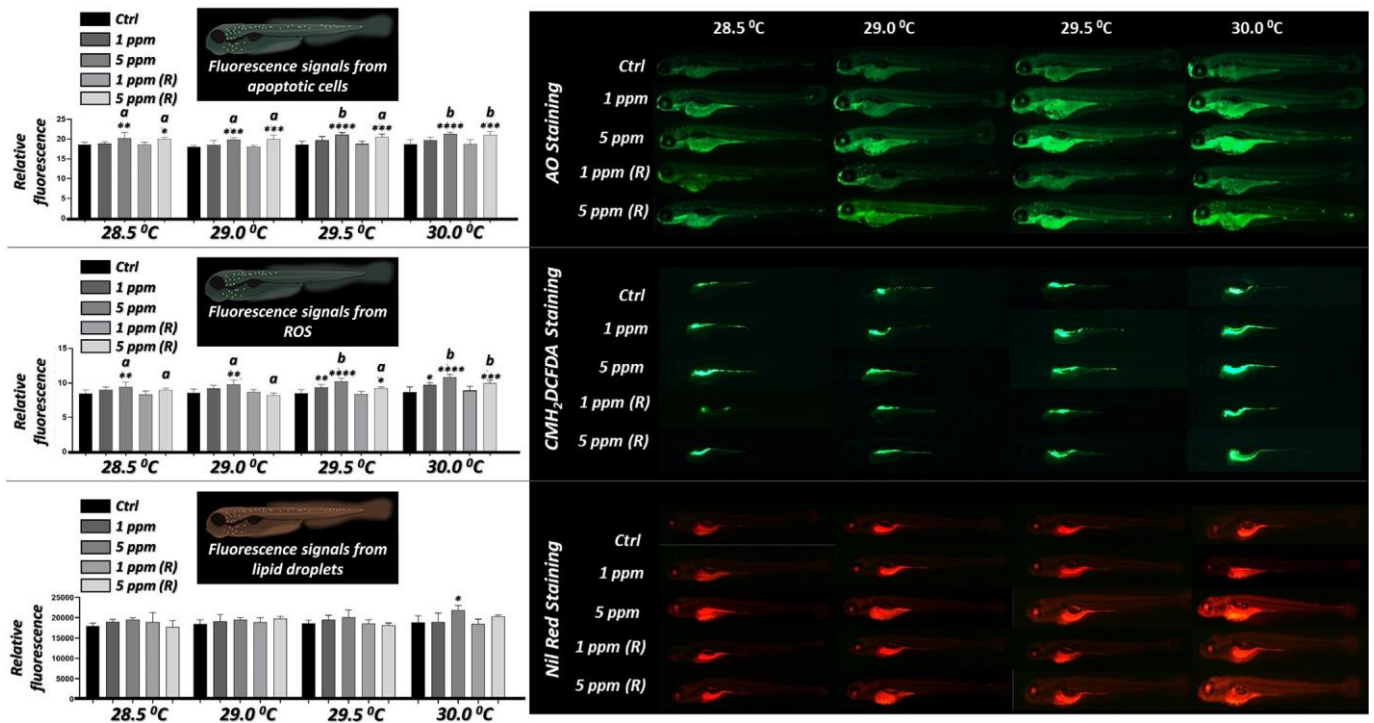


Fig. 4. Apoptotic cells were determined using acridine orange (AO) staining in 120 hpf larvae (Top). CMH₂DCFDA staining in vivo of produced ROS in 120 hpf larvae and relative fluorescence graph of the signals (Middle). Lipid accumulation were determined Nil Red staining in 120 hpf larvae (Bottom). The significant differences between the groups with the same temperature value are shown with “*” while the significant differences between different temperatures in the same groups are shown with lowercase letters ($p < 0.05$).

including toxic exposure and heat stress, contribute to the non-hemostasis apoptosis (Baran et al., 2018; Comakli et al., 2018; Park et al., 2020). Oxidative stress is one of the leading triggering mechanisms of non-hemostasis apoptosis (Wang et al., 2019). Oxidative stress is defined as an imbalance of prooxidants and antioxidants in favor of prooxidants, leading to a redox cell signaling disorder and subsequent oxidative damage (Baran et al., 2021). The antioxidant defense system, both enzymatic and non-enzymatic, is essential in maintaining the redox state and defending cells and organisms against oxidative damage. Among different environmental parameters, temperature greatly affects the toxicity of any chemical (Shahjahan et al., 2019). Although zebrafish easily tolerate temperatures around 28 °C, increased temperature differences can result in a higher metabolic rate. Therefore, the effects of toxic substances occur faster and may be more severe (Schweizer et al., 2019). In our study, the data obtained showed that especially 5 ppm glyphosate at 29.5 and 30.0 °C caused an increase in apoptosis and ROS and further increased the toxicity.

When the Nil red staining results were examined, it was determined that there was a significant increase in the high dose group at 30 °C (Fig. 4). This may have resulted from the deterioration of energy metabolism as a result of the increase in temperature to which the parents were exposed. In the recovery groups, while an improvement was observed in the 1 ppm glyphosate groups at almost all temperature values in all three parameters, the toxic effects of 5 ppm glyphosate continued. Previous studies have shown that Roundup and glyphosate can trigger oxidative damage by increasing ROS generation and subsequent lipid peroxidation (Velasques et al., 2016). In a study evaluating the effects of Roundup and glyphosate on oxidative stress in fish, it was found that 6-day exposure of 20 mg/L roundup increased ROS production, leading to the induction of oxidative stress (Uren Webster et al., 2014). In a similar study, zebrafish embryos exposed to 10 and 100 µg/mL glyphosate showed an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and cellular apoptosis (Sulkan et al., 2017a, 2017b).

As mentioned in the introduction, in this article, which includes the second part of a doctoral study, anxiety and circadian rhythm tests which

applied to their parents in first part were applied to the offspring. According to the thigmotaxis and dark/light locomotor activity results, just like parents exposed to glyphosate, their offspring also showed increased anxiety-like behaviors and increased locomotor activity in dark period parallel with the increased temperature, although they were kept at their optimum temperature (28.5 °C) (Fig. 5a). As a result of this synergistic stress exposure to their parents, dark/light locomotor activity differed significantly in their offspring, just as the circadian rhythm was disrupted in their parents (Fig. 5b). According to results locomotor activity, which decreased in the light period, increased in the dark period, especially due to the increasing temperature. It has been reported that in zebrafish larvae, the light-dark transition increases the locomotor activity, while the dark-light transition decreases the locomotor activity (Basnet et al., 2019). Increased levels of locomotor activity are linked to the integrity of brain function, nervous system development and visual pathways and it has been associated with increased stress/anxiety in zebrafish larvae (Basnet et al., 2019).

In our study, histopathological and immunohistochemical analyzes were performed in the offspring's brain in order to shed light on the mechanism underlying these behavioral results. Histopathology results show that parental exposure to glyphosate causes the findings of necrosis and degeneration in the offspring's brain (Fig. 5c). We can say that the temperature increase that the parents are exposed to does not have much effect on these histopathological findings (Fig. 5d). However, during the recovery process, it is seen that increasing temperature at low doses interferes with recovery (Fig. 5d). In many studies have shown that histopathological brain damage caused by various external stress resources such as chemical/toxic exposure and heat stress in zebrafish larvae affects larval behavior (Baran et al., 2020; Kiziltan et al., 2022). In our study, it is thought that these histopathological findings detected in various regions of the brains of the offspring larvae may be effective in the behavioral disorders of the larvae.

Contrary to the histopathological findings, the immunopositivity of 5-HT4R and GNAT2 in the offspring brains caused by parental glyphosate exposure increased in parallel with the increase in temperature which exposed their parents (Fig. 5d). It is reported that the activation of Serotonin receptor

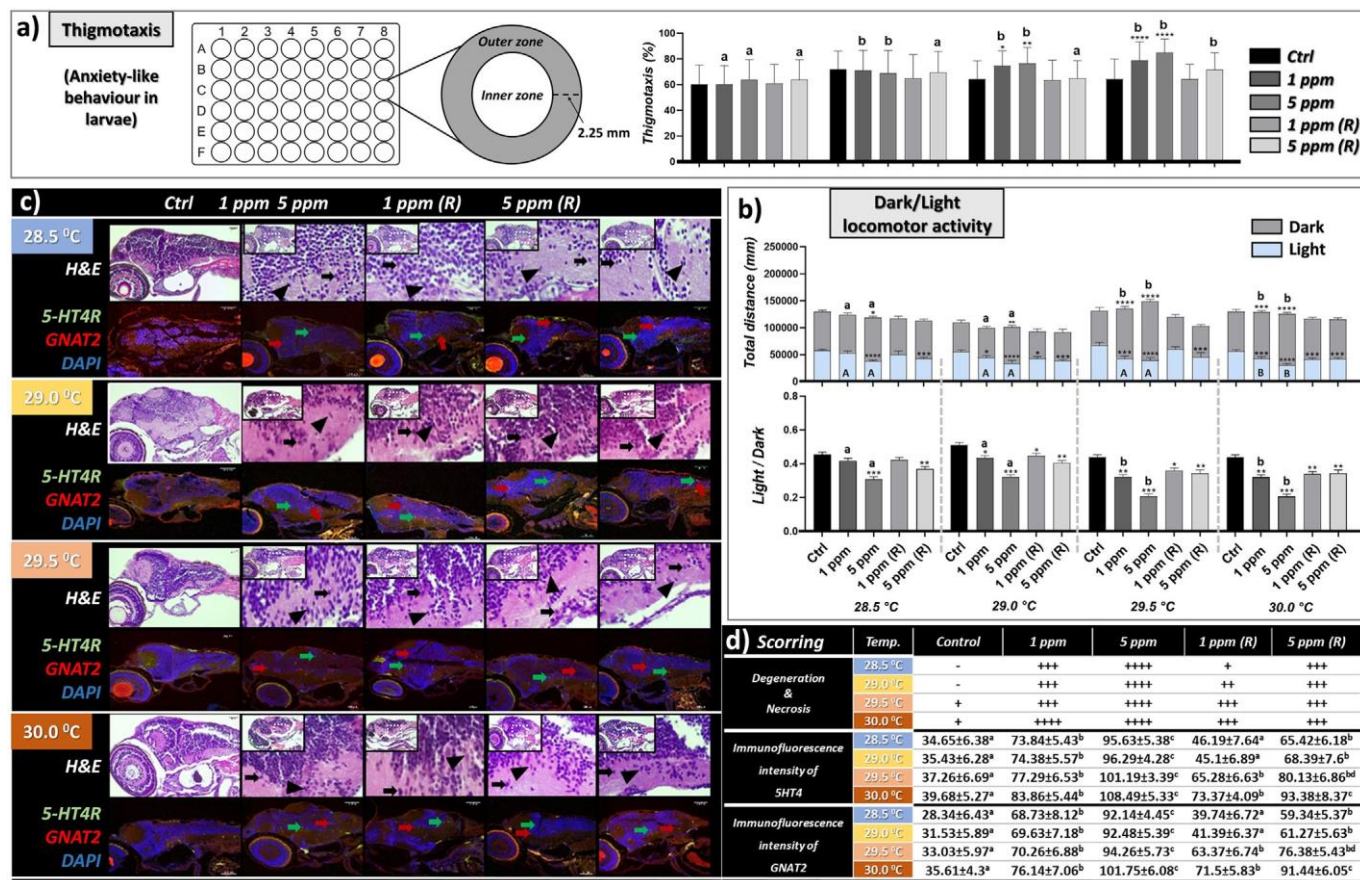


Fig. 5. Anxiety like behavior (thigmotaxis) (a) and dark/light locomotor activity of offspring 120 hpf larvae (b). Hematoxylin and eosin staining (H&E) and immunofluorescence reactions for 5-HT4R (FITC) and GNAT2 (Texas red) in brain tissues of 120 hpf offspring zebrafish larvae (c) and their scores (d). The significant differences between the groups with the same temperature value are shown with “*” while the significant differences between different temperatures in the same groups are shown with lowercase letters ($p < 0.05$).

4 (5-HT4R), which plays an important role in the regulation of mood, anxiety and cognition, causes anxiolytic effect (Karayol et al., 2021; Villas-Boas et al., 2021). In rodents, regional overexpression of 5-HT4 in the prefrontal cortex or nucleus has been shown to affect mood and depression-like phenotypes, food intake, and hypophagia (Rebholz et al., 2018). Furthermore, indirect control of locomotor activities has been reported to result from increased expressions of 5-HT receptors in the rostral brainstem that stimulate multiple brain centers (Flaive et al., 2020). On the other hand, it is known that GNAT2, which is responsible for light signal transmission in retinal cone cells, plays an important role in the regulation of visual system functions in zebrafish (Li, 2019). It is also associated with the synchronization of the circadian rhythm in many vertebrates such as zebrafish, Xenopus, mouse and humans (Eydipour et al., 2020). A transgenic zebrafish line was created in a study to investigate the role of GNAT2 in circadian rhythm and locomotor activity. The obtained data show that retinal photoreceptor cells regulate circadian rhythms and motor activities by responding to environmental stimuli (Li et al., 2012). Therefore, according to these results, it is thought that the behavioral changes observed in the offspring larvae are caused by the activation of serotonin and light signal transmission pathways rather than the pathological findings detected in the brain.

4. Conclusion

Although there are studies on the effects of different pollutants on their offspring as a result of parental exposure (Cao et al., 2019; Ding et al., 2020; Xu et al., 2019), to our knowledge, this is the first study to examine the effects of the synergistic effect of temperature increase and toxic exposure on the next generation. Temperature, which is one of the important

environmental factors, plays a vital role in the different physiological functions of aquatic organisms. The increase in water temperature as a result of global warming is a serious warning for the aquatic ecosystem. Since fish are poikilothermic, increased water temperature affects their physiological processes such as metabolism, growth, survival, immunity and reproduction. On the other hand, temperature changes also affect the toxicity of pesticides. In the light of the results obtained from the study, when global warming and increasing pesticide use are evaluated together, it is clearly seen that future generations are also under threat. Therefore, in terms of the sustainability of the aquatic ecosystem, it is thought that more toxicological studies on glyphosate and/or glyphosate-based herbicides are needed to improve knowledge of its harmful effects and help control glyphosate use or encourage the development of formulations of less toxic herbicides.

CRediT authorship contribution statement

E.S.; conceived, designed, and wrote the paper. A.B.; Contributed to the processing of behavioral analyzes. M.K. and T.K.; contributed whole mount larva staining analyzes. İ.B. and S.Y.; contributed histopathological and immunofluorescence analyzes. H.A.C.; contributed to the interpretation and discussion of behavior analysis. S.B.C. supervised, designed the study, wrote the paper and proofread the final article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data availability

Data will be made available on request.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to thank YÖK (Council of Higher Education, Turkey) for the scholarship support given to Ekrem SULUKAN within the scope of the 100/2000 PhD program.

References

- Angiulli, E., Pagliara, V., Cioni, C., Frabetti, F., Pizzetti, F., Allea, E., Toni, M., 2020. Increase in environmental temperature affects exploratory behaviour, anxiety and social preference in *Danio rerio*. *Sci. Rep.*, 5385. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62331-1>.
- Assan, D., Kuebutornye, F.K.A., Mustapha, U.F., Chen, H., Li, G., 2020. Effects of climate change on marine organisms. *Am. J. Clim. Chang.* 09, 204–216. <https://doi.org/10.4236/ajcc.2020.93013>.
- Baran, A., Köktürk, M., Atamanalp, M., Ceyhan, S.B., 2018. Determination of developmental toxicity of zebrafish exposed to propyl gallate dosed lower than ADI (Acceptable daily intake). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 94, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.027>.
- Baran, A., Sulukan, E., Türkoglu, M., Ghosigharehagaji, A., Yildirim, S., Kankaynar, M., Bolat, I., Kaya, M., Topal, A., Ceyhan, S.B., 2020. Is sodium carboxymethyl cellulose (CMC) really completely innocent? It may be triggering obesity. *Int. J. Biol. Macromol.* 163. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.169>.
- Baran, A., Yildirim, S., Ghosigharehagaji, A., Bolat, I., Sulukan, E., Ceyhan, S., 2021. An approach to evaluating the potential teratogenic and neurotoxic mechanism of BHA based on apoptosis induced by oxidative stress in zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Hum. Exp. Toxicol.* 40, 425–438. <https://doi.org/10.1177/0960327120952140>.
- Basnet, R.M., Zizioli, D., Taweedit, S., Finazzi, D., Memo, M., 2019. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicines* 7, 23. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023> 2019, Vol. 7, Page 23.
- Beketov, M.A., Kefford, B.J., Schäfer, R.B., Liess, M., 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11039–11043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305618110>.
- Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J.B., Reolon, G.K., Bonan, C.D., 2017. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology* 392, 32e39.
- Cao, F., Li, H., Zhao, F., Wu, P., Qian, L., Huang, L., Pang, S., Martyniuk, C.J., Qiu, L., 2019. Parental exposure to azoxystrobin causes developmental effects and disrupts gene expression in F1 embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 646, 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.331>.
- Chen, H.L., Yuh, C.H., Wu, K.K., 2010. Nestin is essential for zebrafish brain and eye development through control of progenitor cell apoptosis. *PLoS One* 5, e9318. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009318>.
- Chen, Y., Hu, X., Sun, J., Zhou, Q., 2016. Specific nanotoxicity of graphene oxide during zebrafish embryogenesis. *Nanotoxicology* 10, 42–52. https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1005032/SUPPL_FILE/INAN_A_1005032_SM1530.PDF.
- Çomaklı, S., Köktürk, M., Topal, A., Özkaraca, M., Ceyhan, S.B., 2018. Immunofluorescence/fluorescence assessment of brain-derived neurotrophic factor, c-fos activation, and apoptosis in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) larvae exposed to glufosinate. *Neurotoxicology* 69, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.09.003>.
- Ding, X., Sun, W., Dai, L., Liu, C., Sun, Q., Wang, J., Zhang, P., Li, K., Yu, L., 2020. Parental exposure to environmental concentrations of tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate induces abnormal DNA methylation and behavioral changes in F1 zebrafish larvae. *Environ. Pollut.* 267, 115305. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115305>.
- Donelson, J.M., Munday, P.L., 2015. Transgenerational plasticity mitigates the impact of global warming to offspring sex ratios. *Glob. Chang. Biol.* 21, 2954–2962. <https://doi.org/10.1111/GCB.12912>.
- Donelson, J.M., Wong, M., Booth, D.J., Munday, P.L., 2016. Transgenerational plasticity of reproduction depends on rate of warming across generations. *Evol. Appl.* 9, 1072–1081. <https://doi.org/10.1111/EVA.12386>.
- Eissa, A.E., Zaki, M.M., 2011. The impact of global climatic changes on the aquatic environment. *Procedia Environ. Sci.* 4, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.03.030>.
- Eissa, A.E., Moustafa, M., El-Husseiny, I.N., Saied, S., Saleh, O., Borhan, T., 2009. Identification of some skeletal deformities in freshwater teleosts raised in Egyptian aquaculture. *Chemosphere* 77, 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.050>.
- Eyidipour, Z., Nasehi, M., Vaseghi, S., Jamalini, S.H., Zarrindast, M.-R., 2020. The role of 5-HT₄ serotonin receptors in the CA1 hippocampal region on memory acquisition impairment induced by total (TSD) and REM sleep deprivation (RSD). *Physiol. Behav.* 215, 112788. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112788>.
- Flaive, A., Fougère, M., van der Zouwen, C.I., Ryczko, D., 2020. Serotonergic modulation of locomotor activity from basal vertebrates to mammals. *Front. Neural Cir.* 14. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.590299>.
- Gaur, H., Bhargava, A., 2019. Glyphosate induces toxicity and modulates calcium and NO signaling in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513, 1070–1075. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.074>.
- Haendel, M.A., Tilton, F., Bailey, G.S., Tanguay, R.L., 2004. Developmental toxicity of the di-thiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish. *Toxicol. Sci.* 81, 390–400. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFH202>.
- Huang, M., Ding, L., Wang, J., Ding, C., Tao, J., 2021. The impacts of climate change on fish growth: a summary of conducted studies and current knowledge. *Ecol. Indic.* 121, 106976. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106976>.
- Huang, Y., Jue, L., Liqi, Y., Chunsheng, L., Jianghu, W., 2019. Gonadal impairment and parental transfer of tris (2-butoxyethyl) phosphate in zebrafish after long-term exposure to environmentally relevant concentrations. *Chemo.* 218, 448–457. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.139>.
- Huang, W., Zheng, S., Wang, X., Cai, Z., Xiao, J., et al., 2020. A transcriptomics-based analysis of toxicity mechanisms of zebrafish embryos and larvae following parental Bisphenol A exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 205, 111165. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111165>.
- Jackson, M.C., Loewen, C.J.G., Vinebrooke, R.D., Chimimba, C.T., 2016. Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Glob. Chang. Biol.* 22, 180–189. <https://doi.org/10.1111/gcb.13028>.
- Karayol, R., Medrihan, L., Warner-Schmidt, J.L., Fait, B.W., Rao, M.N., Holzner, E.B., Greengard, P., Heintz, N., Schmidt, E.F., 2021. Serotonin receptor 4 in the hippocampus modulates mood and anxiety. *Mol. Psychiatry* 26, 2334–2349. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00994-y> 2021 26:6.
- Kim, K.T., Zaikova, T., Hutchison, J.E., Tanguay, R.L., 2013. Gold nanoparticles disrupt zebrafish eye development and pigmentation. *Toxicol. Sci.* 133, 275–288. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFT081>.
- Kiziltan, T., Baran, A., Kankaynar, M., Şenol, O., Sulukan, E., Yildirim, S., Ceyhan, S.B., 2022. Effects of the food colorant carmoisine on zebrafish embryos at a wide range of concentrations. *Arch. Toxicol.* 96, 1089–1099. <https://doi.org/10.1007/S00204-022-03240-2/FIGURES/5>.
- Li, X., Montgomery, J., Cheng, W., Noh, J.H., Hyde, D.R., Li, L., 2012. Pineal photoreceptor cells are required for maintaining the circadian rhythms of behavioral visual sensitivity in zebrafish. *Plos One*, 0040508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040508>.
- Li, J.-T., Zhang, Y.-D., Song, X.-R., Li, R.-J., Yang, W.-L., Tian, M., Zhang, S.-F., Cao, Guang-Hai, Song, Lu.-Lu., Chen, Y.-M., Liu, Cui-Hua, Liu, C., 2022. The mechanism and effects of remdesivir-induced developmental toxicity in zebrafish: blood flow dysfunction and behavioral alterations. *J. Appl. Toxicol.* <https://doi.org/10.1002/JAT.4336>.
- Li, L., 2019. Circadian vision in zebrafish: from molecule to cell and from neural network to behavior. *J. Biol. Rhythm.* 34, 451–462. <https://doi.org/10.1177/0748730419863917>.
- Liu, Z., Shangguan, Y., Zhu, P., et al., 2022. Developmental toxicity of glyphosate on embryonic larval zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 236. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113493>.
- Ma, X., Li, H., Xiong, J., Mehler, W.T., You, J., 2019. Developmental toxicity of a neonicotinoid insecticide, acetamiprid to zebrafish embryos. *J. Agric. Food Chem.* 67, 2429–2436. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05373>.
- Maggi, F., la Cecilia, D., Tang, F.H.M., McBratney, A., 2020. The global environmental hazard of glyphosate use. *Sci. Total Environ.* 717, 137167. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137167>.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G., 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407, 796–801. <https://doi.org/10.1038/35037734> 2000 407:6805.
- op de Beek, L., Verheyen, J., Olsen, K., Stoks, R., 2017. Negative effects of pesticides under global warming can be counteracted by a higher degradation rate and thermal adaptation. *J. Appl. Ecol.* 54, 1847–1855. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12919>.
- Osterauer, R., 2008. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 86, 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.013>.
- Park, K., Han, E.J., Ahn, G., Kwak, I.S., 2020. Effects of thermal stress-induced lead (Pb) toxicity on apoptotic cell death, inflammatory response, oxidative defense, and DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 224. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105479>.
- Rahman, M.S., Islam, S.M.M., Haque, A., Shahjahan, M., 2020. Toxicity of the organophosphate insecticide sumithion to embryo and larvae of zebrafish. *Toxicol. Rep.* 7, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.004>.
- Rebholz, H., Friedman, E., Castello, J., 2018. Alterations of Expression of the Serotonin 5-HT₄ Receptor in Brain Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (11), 3581. <https://doi.org/10.3390/ijms19113581>.
- Rohr, J.R., Sesterhenn, T.M., Stieha, C., 2011. Will climate change reduce the effects of a pesticide on amphibians? partitioning effects on exposure and susceptibility to contaminants. *Glob. Chang. Biol.* 17, 657–666. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02301.x>.
- Roy, N.M., Ochs, J., Zambrycka, E., Anderson, A., 2016. Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 46, 292–300.
- Schnörr, S.J., Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., Champagne, D.L., 2012. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behav. Brain Res.* 228 (2), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.016>.
- Schweizer, M., Brilisaue, K., Triebkorn, R., Forchhammer, K., Köhler, H.R., 2019. How glyphosate and its associated acidity affect early development in zebrafish (*Danio rerio*). *PeerJ* 7, e7094.
- Shahjahan, M., Rahman, M.S., Islam, S.M.M., Uddin, M.H., Al-Emran, M., 2019. Increase in water temperature increases acute toxicity of sumithion causing nuclear and cellular abnormalities in peripheral erythrocytes of zebrafish *Danio rerio*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 36903–36912. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06886-1>.
- Sokmen, T.O., Sulukan, E., Turkoglu, M., Baran, A., Ozkaraca, M., Ceyhan, S.B., 2020. Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Neurotoxicology* 77, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.12.010>.
- Song, J.-W., Lim, S.-J., Lee, K.-J., 2012. Effects of dietary supplementation of inosine monophosphate on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish. Shellfish Immunol.* 33, 1050–1054. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.07.011>.
- Sulkan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Işık, M., Atamanalp, M., Ceyhan, S.B., 2017. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations

- during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 180. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.018>.
- Sulukan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Işık, M., Atamanalp, M., Ceyhun, S.B., 2017. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 180, 77–85.
- Sulukan, E., Baran, A., Şenol, O., Yıldırım, S., Mavi, A., Ceyhun, H.A., Ceyhun, S.B., 2021. The synergic toxicity of temperature increases and nanopolystyrene on zebrafish brain implies that global warming may worsen the current risk based on plastic debris. *Sci. Total Environ.* 152092.
- Sulukan, E., Baran, A., Şenol, O., Yıldırım, S., Mavi, A., Ceyhun, H.A., Toraman, E., Ceyhun, S.B., 2022a. The synergic toxicity of temperature increases and nanopolystyrene on zebrafish brain implies that global warming may worsen the current risk based on plastic debris. *Sci. Total Environ.* 808, 152092. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152092>.
- Sulukan, E., Şenol, O., Baran, A., Kankaynar, M., Yıldırım, S., Kızıltan, T., Bolat, İ., Ceyhun, S.B., 2022b. Nano-sized polystyrene plastic particles affect many cancer-related biological processes even in the next generations; zebrafish modeling. *Sci. Total Environ.* 838, 156391. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156391>.
- Tal, T.L., Franzosa, J.A., Tilton, S.C., Philbrick, K.A., Iwaniec, U.T., Turner, R.T., Waters, K.M., Tanguay, R.L., 2012. MicroRNAs control neurobehavioral development and function in zebrafish. *FASEB J.* 26, 1452–1461. <https://doi.org/10.1096/FJ.11-194464>.
- Tang, L., Song, S., Hu, C., Liu, M., Lam, P.K.S., Zhou, B., Lam, J.C.W., Chen, L., 2020. Parental exposure to perfluorobutane sulfonate disturbs the transfer of maternal transcripts and offspring embryonic development in zebrafish. *Chemosphere* 256, 127169. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127169>.
- Teng, M., Wang, Chen, Song, M., Chen, X., Zhang, J., Wang, Chengju, 2020. Chronic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to flutolanil leads to endocrine disruption and reproductive disorders. *Environ. Res.* 184, 109310. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109310>.
- Tsend-Ayush, E., O'Sullivan, L.A., Grützner, F.S., Onnebo, S.M.N., Lewis, R.S., Delbridge, M.L., Graves, J.A.M., Ward, A.C., 2005. RBMX gene is essential for brain development in zebrafish. *Dev. Dyn.* 234, 682–688. <https://doi.org/10.1002/DVDY.20432>.
- Uren Webster, T.M., Laing, L.V., Florance, H., Santos, E.M., 2014. Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48, 1271–1279. <https://doi.org/10.1021/es404258h>.
- Velasques, R.R., Sandrini, J.Z., da Rosa, C.E., 2016. Roundup® in zebrafish: effects on oxidative status and gene expression. *Zebrafish* 13 (5), 432–441.
- Villas-Boas, G.R., Lavorato, S.N., Paes, M.M., de Carvalho, P.M.G., Rescia, V.C., Cunha, M.S., de Magalhães-Filho, M.F., Ponsoni, L.F., Augustto, A., de Carvalho, V., de Lacerda, R.B., Da, L., Leite, S., Da, M., Tavares-Henriques, S., Lopes, L.A.F., Oliveira, L.G.R., Silva-Filho, S.E., da Silva, A.P.S., Cuman, R.K.N., De, F.M., Silva-Comar, S., Comar, J.F., Do, L., Brasileiro, A., dos Santos, J.N., de Freitas, W.R., da Silva, J.G., Klein, R.C., Klein, M.H.F., Leão, K.v, Da, B.H., Ramos, S., Fernandes, C.K.C., De, D.G., Ribas, L., Oesterreich, S.A., Br, A.A.V.D.C., 2021. Pharmaceuticals modulation of the serotonergic receptosome in the treatment of anxiety and depression: a narrative review of the experimental evidence. *Pharmaceuticals* 14, 148. <https://doi.org/10.3390/ph14020148>.
- Wang, X., Wei, L., Wang, Y., He, B., Kong, B., Zhu, J., Jin, Y., Fu, Z., 2019. Evaluation of development, locomotor behavior, oxidative stress, immune responses and apoptosis in developing zebrafish (*Danio rerio*) exposed to TBEC (tetrabromoethylcyclohexane). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 217, 106–113. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2018.12.004>.
- Westerfield, M., 2000. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish. <http://zfinfo.zfin.org/zfbook/zfbk.html>.
- Wu, S., Page, L., Sherwood, N.M., 2006. A role for GnRH in early brain regionalization and eye development in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 257–258, 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.06.010>.
- Xu, C., Niu, L., Liu, J., Sun, X., Zhang, C., Ye, J., Liu, W., 2019. Maternal exposure to fipronil results in sulfone metabolite enrichment and transgenerational toxicity in zebrafish offspring: indication for an overlooked risk in maternal transfer? *Environ. Pollut.* 246, 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.096>.
- Yang, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Wu, X., Zheng, Y., 2019. Flutolanil affects circadian rhythm in zebrafish (*Danio rerio*) by disrupting the positive regulators. *Chemosphere* 228, 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.207>.
- Yanik, T., Aslan, I., 2018. Impact of global warming on aquatic animals. *Pak. J. Zool.* 50, 353–363. <https://doi.org/10.17582/JOURNAL.PJZ/2018.50.1.353.363>.
- Zhang, W.D., Wang, J.C., Song, J.S., Feng, Y.R., Zhang, S.J., Wang, N., Liu, S.F., Song, Z.X., Lian, K.Q., Kang, W.J., 2021. Effects of low-concentration glyphosate and aminomethyl phosphonic acid on zebrafish embryo development. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 226, 112854. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112854>.
- Zodrow, J.M., Stegeman, J.J., Tanguay, R.L., 2004. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 66, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.07.002>.

9. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Atmosferdeki artan sera gazı konsantrasyonlarına bağlı olarak sıcaklıklardaki artışı ifade eden küresel ısınma, buzulların erimesini, deniz seviyesinin yükselmesini, göllerin buharlaşmasını ve okyanus asitliğini artırarak doğal ekosistemleri olumsuz etkilemektedir (Eissa ve Zaki, 2011). Son araştırmalar, ortalama sıcaklığın önümüzdeki 20 yılda her on yılda 0,2 °C ve 2100'e kadar 1,8 °C - 4 °C artacağını tahmin etmektedir (Assan vd., 2020). Sucul türlerin çoğunluğunun poikilotermik olması nedeniyle, sucul ekosistemler küresel ısınmanın etkilerinden en çok zarar gören canlı grupları olmuştur.

Öte yandan artan sıcaklığa bağlı olarak özellikle sucul ortamda pestisit kaynaklı toksisitenin artacağını gösteren çalışmalar mevcuttur (Parlapiano vd., 2021). Ancak bu çalışmaların çoğunda kullanılan sıcaklık değerleri arasındaki fark oldukça fazladır ve küresel ısınmanın etkilerini objektif olarak değerlendirmek için yetersizdir. Kayıtlar, 2006 ile 2015 arasındaki sıcaklık artışının 0,87 °C olduğunu ve 1850 ile 1900 arasında gözlemlenenden daha yüksek olduğunu gösteriyor (Kaka vd., 2021). Ve yükseliş bu trendle devam ederse 2030 ile 2052 arasındaki sıcaklık artışının 1,5 °C'ye ulaşacağı tahmin edilmektedir (Kaka vd., 2021). Küresel ısınma ve çevre kirliliği dünyamızın karşı karşıya olduğu en önemli sorunların başında gelmektedir. Artan dünya nüfusu, gıda üretiminin artırılması gerekliliğini beraberinde getirmiştir. Bu ihtiyaç da tarımsal faaliyetleri ve bu faaliyetlerin neden olduğu çevresel riskleri artırmıştır (Özkara vd., 2016). Tarımsal faaliyetlerde çevreyi tehdit eden en büyük risk faktörünün pestisit kullanımı olduğu açıkça bilinmektedir. Pestisitler, zararlıları uzaklaştıran, yok eden veya kontrol eden maddelerdir. Pestisit uygulaması, mahsul kaybına ve vektör kaynaklı hastalıklara karşı koruma da dahil olmak üzere birçok önemli amaca hizmet etse de, pestisitlerin hedef olmayan organizmalar üzerindeki potansiyel olarak toksik etkileri hakkında önemli endişeler vardır (Goulart vd., 2015; Richardson vd., 2019).

Dünya çapında en yaygın kullanılan pestisit olan glyphosate, aromatik amino asit biyosentez yollarını bloke eder ve istenmeyen bitkilerde büyümeyi engeller. Glyphosate'ın hayvanlardaki spesifik etki mekanizması net olmamakla birlikte, embriyonik gelişim sırasında epibol gecikmeleri, morfolojideki değişiklikler, merkezi sinir sistemi gelişimi ve kardiyojenez dahil olmak üzere bir dizi yan etki bildirilmiştir (Diaz-Martin vd., 2021; Sulukan vd., 2017). Glyphosate'ın yarı ömrünün, onu çevreleyen matrisle ilgili olarak tatlı suda 4,2 ila 14 gün, tarım topraklarında yaklaşık 60 gün ve deniz

suyunda 47 ila 315 gün olduğu tahmin edilmektedir (Schweizer vd., 2019). Bu durum, dünya çapında en yaygın kullanılan pestisitlerden biri olan glyphosate'ın hedef olmayan organizmalar üzerindeki potansiyel etkisini, detaylı olarak araştırılması gereken temel bir bilimsel konu haline getirmiştir (Schweizer vd., 2019). Öte yandan artan sıcaklığa bağlı olarak özellikle sucul ortamda pestisit kaynaklı toksisitenin artacağını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Parlapiano vd., 2021). Ancak bu çalışmaların çoğunda kullanılan sıcaklık değerleri arasındaki fark oldukça fazladır ve küresel ısınmanın etkilerini objektif olarak değerlendirmek için yetersizdir.

Küresel ısınmayı önlemek/azaltmak için birçok önlemin alındığını/alınmaya çalışıldığını biliyoruz. Bu önlemlerin bu kötü gidişatı tersine çevirip çeviremeyeceğini zaman içinde hep birlikte göreceğiz. Bilimsel alışmalar ışığında planlanan bu önlemlerin daha güvenilir ve sürdürülebilir sonuçlar üretebilmesi için yapılan çalışmaların hassas ve sıcaklık artışını daha gerçekçi yansıtabilecek değerler aralığında olması büyük önem taşımaktadır. Daha önce laboratuvarımızda yaptığımız bir çalışmada, nanoplastik maruziyeti ile birlikte 1°C 'lik bir sıcaklık artışının, zebra balıklarında sirkadiyen ritmi etkilediği, beyne zarar verdiği ve farklı yolaklarda toplam 18 metabolitin yoğunluğunda önemli değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca beyin homojenatında polistirenin Raman sinyalleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, bir derecelik sıcaklık artışının bazı metabolik yolları bozarak beyinde dejenerasyonun önünü açtığı ve böylece nano-plastikğin davranış üzerindeki olumsuz etkilerini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür (Sulukan vd., 2022). Önceki çalışmamızdan ve literatürlerden elde ettiğimiz verilerden yola çıkarak bu çalışmada, küresel ısınmanın glifosat toksisitesi üzerindeki etkisini daha objektif olarak değerlendirmek için küresel iklim projeksiyonuna mümkün olduğunca yakın bir sıcaklık artışı (0,5 °C) kullandık. Verilen bu literatür bilgisinin ışığında yaptığımız çalışmanın uygulanacak sıcaklıklar yönünden literatürdeki ender çalışmalardan birisi olduğunu söyleyebiliriz. Yapılan araştırmada, 0.5 °C'lik sıcaklık farklarıyla metabolom düzeyinde yapılan çalışmaya rastlanmamış olması ve sıcaklık stresi altında glyphosate'ın sirkadiyen ritim ve anksiyete üzerine etkisinin incelendiği detaylı araştırmaların olmaması tez çalışmamıza ayrıca özgünlük katmaktadır.

Yaptığımız tez çalışmasında, daha önceki çalışmalarda toksik etkileri açıkça ortaya konulan glyphosate'ın küresel ısınma projeksiyonuna yakın sayılabilecek 0,5 derecelik sıcaklık artışlarında bile daha toksik olabileceği zebra balığı modelinde gösterilmiştir. Öte yandan, artan doz ve sıcaklığın artmasıyla durumun daha dramatik hale

geldiğini söyleyebiliriz. Benzer etkiler iyileşme gruplarında da gözlenmiştir. Sıcaklık artışına bağlı olarak iyileşme gruplarından 1 ppm grubunda hemen hemen tüm parametrelerde iyileşme gözlenirken, 5 ppm glyphosate yeterli bir iyileşme göstermedi. Çalışmamız, küresel ısınmaya bağlı olarak çevresel kirleticilerin organizmalar üzerindeki olumsuz etkilerinin daha net ortaya konabilmesi için düşük sıcaklık farkları ile yapılan çalışmaların önemli olduğunu göstermiştir. Ek olarak, glyphosate veya glyphosate bazlı herbisitler hakkında daha fazla toksikolojik araştırmaya, bunların zararlı etkilerine ilişkin bilgileri geliştirmek ve glyphosate kullanımının kontrol altına alınmasına yardımcı olmak veya daha az toksik herbisitlerin formülasyonlarının geliştirilmesini teşvik etmek için ihtiyaç vardır.

Sıcaklık değişimleri su organizmalarının gelecek nesillerini de etkilemektedir (Donelson vd., 2016; Donelson ve Munday, 2015). Bu nedenle, düşük sıcaklık artışlarına nasıl tepki verdiklerini anlamak, küresel ısınmanın yavrular da dahil olmak üzere popülasyonlar üzerindeki etkilerini tahmin etmede önemli ve etkili bir adım olacaktır (Huang vd., 2021). Ebeveyn maruziyetinin bir sonucu olarak farklı kirleticilerin yavruları üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar olmasına rağmen (Cao vd., 2019; Ding vd., 2020; Xu vd., 2019), bildiğimiz kadarıyla bu, sıcaklık artışının ve toksik maruziyetin sinerjistik etkisinin gelecek nesil üzerindeki etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Önemli çevresel faktörlerden biri olan sıcaklık, sucul organizmaların farklı fizyolojik fonksiyonlarında hayati bir rol oynamaktadır. Küresel ısınmanın bir sonucu olarak su sıcaklığındaki artış, su ekosistemi için ciddi bir uyarıdır. Balıklar poikilotermik olduğundan, artan su sıcaklığı metabolizma, büyüme, hayatta kalma, bağışıklık ve üreme gibi fizyolojik süreçlerini etkiler. Öte yandan, sıcaklık değişimleri de pestisitlerin toksisitesini etkiler. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ışığında küresel ısınma ve artan pestisit kullanımı birlikte değerlendirildiğinde gelecek nesillerin de tehdit altında olduğu açıkça görülmektedir. Sucul ekosistemin sürdürülebilirliği için, glyphosate ve/veya glyphosate bazlı herbisitler hakkında daha fazla toksikolojik çalışmanın, zararlı etkileri hakkındaki bilgileri geliştirmek ve glyphosate kullanımını kontrol etmeye yardımcı olmak veya daha az toksik herbisitlerin formülasyonlarının geliştirilmesini teşvik etmek için gerekli olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler dikkate alındığında; glyphosate'a dirençli mahsullerin bulunduğu tarım alanlarındaki artış, hedeflenmeyen organizmalar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır. Bununla birlikte,

özölmemiş bir endişe olan bu bileşimin toksisitesi hakkında bir fikir birliği yoktur. Bu nedenlerden dolayı, ölkelerin su ortamlarında izin verilen glyphosate sınırlarının düzenlenmesine ilişkin çalışmaları vardır. Sıcaklık değişikliklerinin pestisitlerin oluşturduğu toksisite derecesini de etkilediği göz önüne alındığında, farklı sıcaklık rejimlerine maruz kalan canlılar üzerinde sıcaklığın etkisini belirlemek oldukça önemlidir. Literatürdeki bu eksiklik göz önüne alındığında yaptığımız bu çalışmadan elde ettiğimiz verilerin benzer konularda araştırma yapacak olan bilim insanlarına kaynak olabileceği ve pestisitlerin kullanımı konusunda toplumsal bilinci ve duyarlılığı artıracakı düşünölmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre dünyada su ürünleri sektörü diğer hayvansal ve bitkisel üretim sektörlerine göre çok daha hızlı büyümeaktadır. Bu büyümeye paralel olarak iklim değişikliği ve küresel ısınmadan kaynaklı risk faktörleri ve tehditler de artmaktadır. Özellikle küresel ısınma kaynaklı bu risk faktörleri karşısında daha etkin ve sürdürülebilir önlemler alabilmek ve çözüm önerileri üretebilmek adına, düşük sıcaklık değerlerinin etkilerinin hassas ve güvenilir yöntemlerle ortaya konulması büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda yaptığımız tez çalışmasından elde edilen sonuçların bu açıdan da değerli olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Altenhofen, S., Nabinger, D. D., Wiprich, M. T., Pereira, T. C. B., Bogo, M. R., Bonan, C. D. 2017. "Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*)". *Chemosphere*, 180, 483–490.
- Andrade, T. S., Henriques, J. F., Almeida, A. R., Machado, A. L., Koba, O., Giang, P. T., ... Domingues, I. 2016. "Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos". *Aquatic Toxicology*, 170, 390–399.
- Angiulli, E., Pagliara, V., Cioni, C., Frabetti, F., Pizzetti, F., Alleva, E., Toni, M. 2020. "Increase in environmental temperature affects exploratory behaviour, anxiety and social preference in *Danio rerio*". *Scientific Reports*, 10(1), 5385.
- Annett, R., Habibi, H. R., Hontela, A. 2014. "Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment". *Journal of Applied Toxicology*, 34(5), 458–479.
- Aoki, N., Watanabe, H., Okada, K., Aoki, K., Imanishi, T., Yoshida, D., ... Shibata, S. 2014. "Involvement of 5-HT₃ and 5-HT₄ Receptors in the Regulation of Circadian Clock Gene Expression in Mouse Small Intestine". *Journal of Pharmacological Sciences*, 124(2), 267–275.
- Armiliato, N., Ammar, D., Nezzi, L., Stralio, M., Muller, Y. M., Nazari, E. M. 2014. "Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate". *J Toxicol Environ Health A*, 77(7), 405–414.
- Assan, D., Kuebutornye, F. K. A., Mustapha, U. F., Chen, H., Li, G. 2020. "Effects of Climate Change on Marine Organisms". *American Journal of Climate Change*, 09(03), 204–216.
- Baran, A., Kokturk, M., Atamanalp, M., Ceyhun, S. B. 2018. "Determination of developmental toxicity of zebrafish exposed to propyl gallate dosed lower than ADI (Acceptable Daily Intake)". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 94, 16–21.
- Baran, A., Yildirim, S., Ghosigharehaghaji, A., Bolat, İ., Sulukan, E., Ceyhun, S. 2021. "An approach to evaluating the potential teratogenic and neurotoxic mechanism of BHA based on apoptosis induced by oxidative stress in zebrafish embryo (*Danio rerio*)". *Human & Experimental Toxicology*, 40(3), 425–438.
- Baran, Alper, Sulukan, E., Türkoğlu, M., Ghosigharehaghaji, A., Yildirim, S., Kankaynar, M., ... Ceyhun, S. B. 2020. "Is sodium carboxymethyl cellulose (CMC) really completely innocent? It may be triggering obesity". *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 2465–2473.
- Beketov, M. A., Kefford, B. J., Schäfer, R. B., Liess, M. 2013. "Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27), 11039–11043.
- Ben-Moshe, Z., Foulkes, N. S., Gothilf, Y. 2014. "Functional Development of the Circadian Clock in the Zebrafish Pineal Gland". *BioMed Research International*, 2014, 1–8.
- Binder, V., Zon, L. I. 2013. "High throughput in vivo phenotyping: The zebrafish as tool for drug discovery for hematopoietic stem cells and cancer". *Drug Discovery Today: Disease Models*, 10(1), e17–e22.
- Bortolotto, J. W., Cognato, G. P., Christoff, R. R., Roesler, L. N., Leite, C. E., Kist, L. W., ... Bonan, C. D. 2014. "Long-Term Exposure to Paraquat Alters Behavioral

- Parameters and Dopamine Levels in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*)". *Zebrafish*, 11(2), 142–153.
- Braz-Mota, S., Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R. M., Val, A. L., Almeida-Val, V. M. 2015. "Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*". *Chemosphere*, 135, 53–60.
- Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J. B., Reolon, G. K., Bonan, C. D. 2017. "Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish". *Toxicology*, 392, 32e39.
- Byvaltsev, V. A., Bardanova, L. A., Onaka, N. R., Polkin, R. A., Ochkal, S. V., Shepelev, V. V., ... Potapov, A. A. 2019. "Acridine Orange: A Review of Novel Applications for Surgical Cancer Imaging and Therapy". *Frontiers in Oncology*, 9.
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K. M., Kalueff, A. V. 2010. "Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish". *Nature protocols*, 5(11), 1786–1799.
- Cachat, J., Stewart, A., Utterback, E., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., ... Kalueff, A. V. 2011. "Three-Dimensional Neurophenotyping of Adult Zebrafish Behavior". *Plos One*, 6(3).
- Cao, F., Li, H., Zhao, F., Wu, P., Qian, L., Huang, L., ... Qiu, L. 2019. "Parental exposure to azoxystrobin causes developmental effects and disrupts gene expression in F1 embryonic zebrafish (*Danio rerio*)". *Science of The Total Environment*, 646, 595–605.
- Chang, W., Nie, J., Geng, Y., Zhang, D., Wang, Q., Farooq, S. 2020. "Etoxazole stereoselective determination, bioaccumulation, and resulting oxidative stress in *Danio rerio* (zebrafish)". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110287.
- Chappell, P. E. 2005. "Clocks and the Black Box: Circadian Influences on Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion". *Journal of Neuroendocrinology*, 17(2), 119–130.
- Chen, C.-H. S., Kuo, T.-C., Kuo, H.-C., Tseng, Y. J., Kuo, C.-H., Yuan, T.-H., Chan, C.-C. 2021. "Lipidomics of children and adolescents exposed to multiple industrial pollutants". *Environmental Research*, 201, 111448.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., Wiegand, C. 2009. "Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes". *Environ Pollut*, 157(1), 57–63.
- Dai, Y. J., Jia, Y. F., Chen, N., Bian, W. P., Li, Q. K., Ma, Y. B., Pei, D. S. 2014. "Zebrafish as a model system to study toxicology". *Environmental toxicology and chemistry*, 33(1), 11–17.
- Davico, C. E., Pereira, A. G., Nezzi, L., Jaramillo, M. L., de Melo, M. S., Muller, Y. M. R., Nazari, E. M. 2020. "Reproductive toxicity of Roundup WG(R) herbicide: impairments in ovarian follicles of model organism *Danio rerio*". *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Davico, C. E., Pereira, A. G., Nezzi, L., Jaramillo, M. L., de Melo, M. S., Müller, Y. M. R., Nazari, E. M. 2021. "Reproductive toxicity of Roundup WG® herbicide: impairments in ovarian follicles of model organism *Danio rerio*". *Environmental Science and Pollution Research*, 28(12), 15147–15159.
- Detrich, H., Westerfield, M., Zon, L. 2016. "The Zebrafish: Cellular and Developmental Biology, Part B Developmental Biology", (9780128052068).
- Diaz-Martin, R. D., Valencia-Hernandez, J. D., Betancourt-Lozano, M., Yanez-Rivera, B. 2021. "Changes in microtubule stability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after glyphosate exposure". *Heliyon*, 7(1), e06027.
- Ding, X., Sun, W., Dai, L., Liu, C., Sun, Q., Wang, J., ... Yu, L. 2020. "Parental exposure

- to environmental concentrations of tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate induces abnormal DNA methylation and behavioral changes in F1 zebrafish larvae". *Environmental Pollution*, 267, 115305.
- Doğan, H. O., Şenol, O., Bolat, S., Yıldız, Ş. N., Büyüktuna, S. A., Sariismailoğlu, R., Hekim, S. N. 2021. "Understanding the pathophysiological changes via untargeted metabolomics in COVID-19 patients". *Journal of medical virology*, 93(4), 2340–2349.
- Donelson, J. M., Munday, P. L. 2015. "Transgenerational plasticity mitigates the impact of global warming to offspring sex ratios". *Global Change Biology*, 21(8), 2954–2962.
- Donelson, J. M., Wong, M., Booth, D. J., Munday, P. L. 2016. "Transgenerational plasticity of reproduction depends on rate of warming across generations". *Evolutionary Applications*, 9(9), 1072–1081.
- Dreier, D. A., Nouri, M.-Z., Denslow, N. D., Martyniuk, C. J. 2021. "Lipidomics reveals multiple stressor effects (temperature × mitochondrial toxicant) in the zebrafish embryo toxicity test". *Chemosphere*, 264, 128472.
- Eadie, A., Vasquez, I. C., Liang, X., Wang, X., Souders, C. L., El Chehouri, J., ... Martyniuk, C. J. 2020. "Residual molecular and behavioral effects of the phenylpyrazole pesticide fipronil in larval zebrafish (*Danio rerio*) following a pulse embryonic exposure". *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 36, 100743.
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., ... Kalueff, A. V. 2009. "Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish". *Behavioural Brain Research*, 205(1), 38–44.
- Egg, M., Köblitz, L., Hirayama, J., Schwerte, T., Folterbauer, C., Kurz, A., ... Pelster, B. 2013. "Linking Oxygen to Time: The Bidirectional Interaction Between the Hypoxic Signaling Pathway and the Circadian Clock". *Chronobiology International*, 30(4), 510–529.
- Eissa, A.E., Moustafa, M., El-Husseiny, I. N., Saeid, S., Saleh, O., Borhan, T. 2009. "Identification of some skeletal deformities in freshwater teleosts raised in Egyptian aquaculture". *Chemosphere*, 77(3), 419–425.
- Eissa, Alaa E., Zaki, M. M. 2011. "The impact of global climatic changes on the aquatic environment". *Procedia Environmental Sciences*, 4, 251–259.
- Eyadipour, Z., Nasehi, M., Vaseghi, S., Jamaldini, S. H., Zarrindast, M.-R. 2020. "The role of 5-HT₄ serotonin receptors in the CA1 hippocampal region on memory acquisition impairment induced by total (TSD) and REM sleep deprivation (RSD)". *Physiology & Behavior*, 215, 112788.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S., Boeuf, G. 2007. "Melatonin effects on the hypothalamo–pituitary axis in fish". *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(2), 81–88.
- Fang, M., Kang, H.-G., Park, Y., Estrella, B., Zarbl, H. 2017. "In Vitro Bioluminescence Assay to Characterize Circadian Rhythm in Mammary Epithelial Cells". *Journal of Visualized Experiments*, (127).
- Fiorino, E., Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Svobodova, Z., Faggio, C. 2018. "Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25, 8542e8549.
- Flaive, A., Fougère, M., van der Zouwen, C. I., Ryczko, D. 2020. "Serotonergic Modulation of Locomotor Activity From Basal Vertebrates to Mammals". *Frontiers in Neural Circuits*, 14.
- Forner-Piquer, I., Faucherre, A., Byram, J., Blaquiere, M., de Bock, F., Gamet-Payrastre,

- L., ... Marchi, N. 2021. "Differential impact of dose-range glyphosate on locomotor behavior, neuronal activity, glyo-cerebrovascular structures, and transcript regulations in zebrafish larvae". *Chemosphere*, 267, 128986.
- Fraga-Corral, M., Carpena, M., Garcia-Oliveira, P., Pereira, A. G., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J. 2020. "Analytical Metabolomics and Applications in Health, Environmental and Food Science". *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1–23.
- Fricker, R. A., Green, E. L., Jenkins, S. I., Griffin, S. M. 2018. "The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System". *International Journal of Tryptophan Research*, 11, 117864691877665.
- Gaur, H., Bhargava, A. 2019. "Glyphosate induces toxicity and modulates calcium and NO signaling in zebrafish embryos". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(4), 1070–1075.
- Glinton, K. E., Benke, P. J., Lines, M. A., Geraghty, M. T., Chakraborty, P., Al-Dirbashi, O. Y., ... El-Hattab, A. W. 2018. "Disturbed phospholipid metabolism in serine biosynthesis defects revealed by metabolomic profiling". *Molecular Genetics and Metabolism*, 123(3), 309–316.
- Golla, A., Østby, H., Kermen, F. 2020. "Chronic unpredictable stress induces anxiety-like behaviors in young zebrafish". *Scientific Reports*, 10(1), 10339.
- Göth, A., Booth, D. T. 2005. "Temperature-dependent sex ratio in a bird". *Biology Letters*, 1(1), 31–33.
- Goulart, T. L., Boyle, R. T., Souza, M. M. 2015. "Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup Transorb(R) and Furadan 350 SC(R) on the zebrafish cell line, ZF-L". *Toxicol In Vitro*, 29(7), 1377–1384.
- Goulart, T. L. S., Boyle, R. T., Souza, M. M. 2015. "Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup Transorb® and Furadan 350 SC® on the zebrafish cell line, ZF-L". *Toxicology in Vitro*, 29(7), 1377–1384.
- Gürçam, S. 2022. "Analysing the Global Fight Against Climate Change". *Dergipark*, 6, 39–54.
- Gusso, D., Reolon, G. K., Gonzalez, J. B., Altenhofen, S., Kist, L. W., Bogo, M. R., Bonan, C. D. 2020. "Pyriproxyfen Exposure Impairs Cognitive Parameters and Alters Cortisol Levels in Zebrafish". *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14.
- Hamilton, T. J., Morrill, A., Lucas, K., Gallup, J., Harris, M., Healey, M., ... Tresguerres, M. 2017. "Establishing zebrafish as a model to study the anxiolytic effects of scopolamine". *Scientific Reports*, 7.
- Hoivik, E. A., Lewis, A. E., Aumo, L., Bakke, M. 2010. "Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1)". *Mol Cell Endocrinol*, 315(1–2), 27–39.
- Hong, S. M., Hwang, S. W., Wang, T., Park, C. W., Ryu, Y., Jung, J., ... Choi, K. Y. 2019. "Increased nicotinamide adenine dinucleotide pool promotes colon cancer progression by suppressing reactive oxygen species level". *Cancer Science*, 110(2), 629–638.
- Huang, M., Ding, L., Wang, J., Ding, C., Tao, J. 2021. "The impacts of climate change on fish growth: A summary of conducted studies and current knowledge". *Ecological Indicators*, 121, 106976.
- Hussain, A., Audira, G., Malhotra, N., Uapipatanakul, B., Chen, J.-R., Lai, Y.-H., ... Hsiao, C.-D. 2020. "Multiple Screening of Pesticides Toxicity in Zebrafish and Daphnia Based on Locomotor Activity Alterations". *Biomolecules*, 10(9), 1224.
- Jackson, M. C., Loewen, C. J. G., Vinebrooke, R. D., Chimimba, C. T. 2016. "Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis". *Global Change Biology*, 22(1), 180–189.
- Jaramillo, M. L., Pereira, A. G., Davico, C. E., Nezzi, L., Ammar, D., Müller, Y. M. R.,

- Nazari, E. M. 2018. "Evaluation of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR assays in organs of zebrafish exposed to glyphosate-based herbicide, Roundup. ". *Animal*, 12(7), 1424–1434.
- Kaka, H., Opute, P. A., Maboeta, M. S. 2021. "Potential Impacts of Climate Change on the Toxicity of Pesticides towards Earthworms". *Journal of Toxicology*, 2021, 1–14.
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., ... Schneider, and the Zebrafish Neuros, H. 2013. "Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond". *Zebrafish*, 10(1), 70–86.
- Karayol, R., Medrihan, L., Warner-Schmidt, J. L., Fait, B. W., Rao, M. N., Holzner, E. B., ... Schmidt, E. F. 2021. "Serotonin receptor 4 in the hippocampus modulates mood and anxiety". *Molecular Psychiatry*, 26(6), 2334–2349.
- Kim, H. M., Kang, J. S. 2021. "Metabolomic Studies for the Evaluation of Toxicity Induced by Environmental Toxicants on Model Organisms". *Metabolites*, 11(8), 485.
- Kiziltan, T., Baran, A., Kankaynar, M., Şenol, O., Sulukan, E., Yildirim, S., Ceyhun, S. B. 2022. "Effects of the food colorant carmoisine on zebrafish embryos at a wide range of concentrations". *Archives of Toxicology*, 96(4), 1089–1099.
- 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 degragrade AMPA to streams in the United States". *Science of the Total Environment*, 354, 191–197.
- Korkmaz, V., Güngördü, A., Ozmen, M. 2018. "Comparative evaluation of toxicological effects and recovery patterns in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to phosalone-based and cypermethrin-based pesticides". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 265–272.
- Lahiri, K., Vallone, D., Gondi, S. B., Santoriello, C., Dickmeis, T., Foulkes, N. S. 2005. "Temperature Regulates Transcription in the Zebrafish Circadian Clock". *PLoS Biology*, 3(11), e351.
- Lanzarin, G. A., Félix, L. M., Santos, D., Venâncio, C. A., Monteiro, S. M. 2019. "Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation–Roundup® UltraMax-on the early zebrafish embryogenesis". *Chemosphere*, 223, 514–522.
- Li, L. 2019. "Circadian Vision in Zebrafish: From Molecule to Cell and from Neural Network to Behavior". *Journal of Biological Rhythms*, 34(5), 451–462.
- Li, X., Montgomery, J., Cheng, W., Noh, J. H., Hyde, D. R., Li, L. 2012. "Pineal Photoreceptor Cells Are Required for Maintaining the Circadian Rhythms of Behavioral Visual Sensitivity in Zebrafish". *PLoS ONE*, 7(7), e40508.
- Liang, D., Moutinho, J. L., Golan, R., Yu, T., Ladva, C. N., Niedzwiecki, M., ... Sarnat, J. A. 2018. "Use of high-resolution metabolomics for the identification of metabolic signals associated with traffic-related air pollution". *Environment International*, 120, 145–154.
- Lopes, F. M., Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., da Silva, A. C., Guazzelli, V. G., Tavares, G., da Rosa, C. E. 2014. "Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*". *Aquat Toxicol*, 155, 322–326.
- López-Olmeda, J. F., Sánchez-Vázquez, F. J. 2011. "Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*)". *Journal of Thermal Biology*, 36(2), 91–104.
- Ma, X., Li, H., Xiong, J., Mehler, W. T., You, J. 2019. "Developmental Toxicity of a Neonicotinoid Insecticide, Acetamiprid to Zebrafish Embryos". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(9), 2429–2436.
- Mangold, S. A. 2021. "Neuroanatomy, Reticular Formation. In StatPearls". StatPearls Publishing.
- Maskey, E., Crotty, H., Wooten, T., Khan, I. A. 2019. "Disruption of oocyte maturation

- by selected environmental chemicals in zebrafish". *Toxicology In Vitro*, 54, 123–129.
- Matich, E. K., Chavez Soria, N. G., Aga, D. S., Atilla-Gokcumen, G. E. 2019. "Applications of metabolomics in assessing ecological effects of emerging contaminants and pollutants on plants". *Journal of Hazardous Materials*, 373, 527–535.
- Maximino, C., Puty, B., Benzecry, R., Araújo, J., Lima, M. G., de Jesus Oliveira Batista, E., ... Herculano, A. M. 2013. "Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models". *Neuropharmacology*, 71, 83–97.
- McCollum, C. W., Ducharme, N. A., Bondesson, M., Gustafsson, J.-A. 2011. "Developmental toxicity screening in zebrafish". *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(2), 67–114.
- Merola, C., Fabrello, J., Matozzo, V., Faggio, C., Iannetta, A., Tinelli, A., ... Perugini, M. 2022. "Dinitroaniline herbicide pendimethalin affects development and induces biochemical and histological alterations in zebrafish early-life stages". *Science of The Total Environment*, 828, 154414.
- Mukherjee, T., Hanes, J., Tews, I., Ealick, S. E., Begley, T. P. 2011. "Pyridoxal phosphate: Biosynthesis and catabolism". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1814(11), 1585–1596.
- Nguyen, M., Stewart, A. M., Kalueff, A. V. 2014. "Aquatic blues: Modeling depression and antidepressant action in zebrafish". *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 55, 26–39.
- Ojha, A., Yaduvanshi, S. K., Pant, S. C., Lomash, V., Srivastava, N. 2013. "Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues". *Environmental toxicology*, 28(10), 543–552.
- Op de Beeck, L., Verheyen, J., Olsen, K., Stoks, R. 2017. "Negative effects of pesticides under global warming can be counteracted by a higher degradation rate and thermal adaptation". *Journal of Applied Ecology*, 54(6), 1847–1855.
- Ospina-Alvarez, N., Piferrer, F. 2008. "Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change". *PLoS ONE*, 3(7), e2837.
- Osterauer, R. 2008. "Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)". *Aquatic Toxicology*, 86(4), 485–494.
- Özkara, A., Akyl, D., Konuk, M. 2016. "Pesticides, Environmental Pollution, and Health". İçinde *Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species*. InTech.
- Parlapiano, I., Biandolino, F., Grattagliano, A., Ruscito, A., Libralato, G., Prato, E. 2021. "Effects of commercial formulations of glyphosate on marine crustaceans and implications for risk assessment under temperature changes". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112068.
- Percival, B. C., Grootveld, M., Gibson, M., Osman, Y., Molinari, M., Jafari, F., ... Wilson, P. B. 2018. "Low-Field, Benchtop NMR Spectroscopy as a Potential Tool for Point-of-Care Diagnostics of Metabolic Conditions: Validation, Protocols and Computational Models". *High-Throughput*, 8(1), 2.
- Pereira, V. M., Bortolotto, J. W., Kist, L. W., Azevedo, M. B. de, Fritsch, R. S., Oliveira, R. da L., ... Bogo, M. R. 2012. "Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity

- and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*)". *NeuroToxicology*, 33(3), 469–475.
- Perez, D. J., Okada, E., Menone, M. L., Costa, J. L. 2017. "Can an aquatic macrophyte bioaccumulate glyphosate? Development of a new method of glyphosate extraction in *Ludwigia peploides* and watershed scale validation". *Chemosphere*, 185, 975e982.
- Prasad, S., Srivastava, S., Singh, M., Shukla, Y. 2009. "Clastogenic Effects of Glyphosate in Bone Marrow Cells of Swiss Albino Mice". *Journal of Toxicology*, 2009, 1–6.
- Prokkola, J. M., Nikinmaa, M. 2018. "Circadian rhythms and environmental disturbances – underexplored interactions". *Journal of Experimental Biology*, 221(16).
- Rahman, M. S., Islam, S. M. M., Haque, A., Shahjahan, M. 2020. "Toxicity of the organophosphate insecticide sumithion to embryo and larvae of zebrafish". *Toxicology Reports*, 7, 317–323.
- Rajmohan, K. S., Chandrasekaran, R., Varjani, S. 2020. "A Review on Occurrence of Pesticides in Environment and Current Technologies for Their Remediation and Management". *Indian Journal of Microbiology*, 60(2), 125–138.
- Rebholz, H., Friedman, E., Castello, J. 2018. "Alterations of Expression of the Serotonin 5-HT₄ Receptor in Brain Disorders". *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3581.
- Rey, G., Reddy, A. B. 2013. "Connecting cellular metabolism to circadian clocks". *Trends in Cell Biology*, 23(5), 234–241.
- Richardson, J. R., Fitsanakis, V., Westerink, R. H. S., Kanthasamy, A. G. 2019. "Neurotoxicity of pesticides". *Acta Neuropathol*, 138(3), 343–362.
- Rodríguez-Gil, J. L., Prosser, R. S., Duke, S. O., Solomon, K. R. 2021. "Ecotoxicology of Glyphosate, Its Formulants, and Environmental Degradation Products" (ss. 129–205).
- Rohr, J. R., Sesterhenn, T. M., Stieha, C. 2011. "Will climate change reduce the effects of a pesticide on amphibians?: partitioning effects on exposure and susceptibility to contaminants". *Global Change Biology*, 17(2), 657–666.
- Roy, N. M., Ochs, J., Zambrzycka, E., Anderson, A. 2016. "Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*". *Environ Toxicol Pharmacol*, 46, 292–300.
- Sarasamma, S., Audira, G., Samikannu, P., Juniardi, S., Siregar, P., Hao, E. W., ... Hsiao, C. D. 2019. "Behavioral Impairments and Oxidative Stress in the Brain, Muscle, and Gill Caused by Chronic Exposure of C-70 Nanoparticles on Adult Zebrafish". *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22).
- Scheil, V., Kohler, H. R. 2009. "Influence of Nickel Chloride, Chlorpyrifos, and Imidacloprid in Combination with Different Temperatures on the Embryogenesis of the Zebrafish *Danio rerio*". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(2), 238–243.
- Schnörr, S. J., Steenbergen, P. J., Richardson, M. K., Champagne, D. L. 2012. "Measuring thigmotaxis in larval zebrafish". *Behavioural Brain Research*, 228(2), 367–374.
- Schweizer, M., Brilisauer, K., Triebkorn, R., Forchhammer, K., Köhler, H. R. 2019. "How glyphosate and its associated acidity affect early development in zebrafish (*Danio rerio*)". *PeerJ*, 7, e7094.
- Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Doubkova, V., Prokes, M., Tichy, F., ... Svobodova, Z. 2017. "Toxicity of naproxen sodium and its mixture with tramadol hydrochloride on fish early life stages". *Chemosphere*, 188, 414–423.
- Senol, O., Gundogdu, G., Gundogdu, K., Miloglu, F. D. 2019. "Investigation of the relationships between knee osteoarthritis and obesity via untargeted metabolomics analysis". *Clinical Rheumatology*, 38(5), 1351–1360.

- Shahjahan, M., Rahman, M. S., Islam, S. M. M., Uddin, M. H., Al-Emran, M. 2019a. "Increase in water temperature increases acute toxicity of sumithion causing nuclear and cellular abnormalities in peripheral erythrocytes of zebrafish *Danio rerio*". *Environ Sci Pollut Res Int*, 26(36), 36903–36912.
- Shahjahan, M., Rahman, M. S., Islam, S. M. M., Uddin, M. H., Al-Emran, M. 2019b. "Increase in water temperature increases acute toxicity of sumithion causing nuclear and cellular abnormalities in peripheral erythrocytes of zebrafish *Danio rerio*". *Environmental Science and Pollution Research*, 26(36), 36903–36912.
- Sipes, N. S., Padilla, S., Knudsen, T. B. 2011. "Zebrafish-As an integrative model for twenty-first century toxicity testing". *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(3), 256–267.
- Ślifirski, G., Król, M., Turło, J. 2021. "5-HT Receptors and the Development of New Antidepressants". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9015.
- Sokmen, T. O., Sulukan, E., Turkoglu, M., Baran, A., Ozkaraca, M., Ceyhun, S. B. 2020. "Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*)". *Neurotoxicology*, 77, 51–59.
- Song, J.-W., Lim, S.-J., Lee, K.-J. 2012. "Effects of dietary supplementation of inosine monophosphate on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)". *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 1050–1054.
- Soso, A. B., Barcellos, L. J., Ranzani-Paiva, M. J., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Anziliero, D., ... Finco, J. A. 2007. "Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female *Jundia* (*Rhamdia quelen*)". *Environ Toxicol Pharmacol*, 23(3), 308–313.
- Stehr, C. M., Linbo, T. L., Incardona, J. P., Scholz, N. L. 2006. "The Developmental Neurotoxicity of Fipronil: Notochord Degeneration and Locomotor Defects in Zebrafish Embryos and Larvae". *Toxicological Sciences*, 92(1), 270–278.
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., Kalueff, A. V. 2012. "Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review". *Neuropharmacology*, 62(1), 135–143.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., ... Braunbeck, T. 2012. "Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations". *Reproductive Toxicology*, 33(2), 128–132.
- Sulkan, E. 2015. "Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyonik gelişimi üzerine glyphosate'nin toksik etkileri". *Yüksek Lisans Tezi*, (392127).
- Sulkan, E., Baran, A., Şenol, O., Yildirim, S., Mavi, A., Ceyhun, H. A., ... Ceyhun, S. B. 2022. "The synergic toxicity of temperature increases and nanopolystyrene on zebrafish brain implies that global warming may worsen the current risk based on plastic debris". *Science of The Total Environment*, 808, 152092.
- Sulkan, E., Ghosigharehagaji, A., Baran, A., Yildirim, S., Bolat, İ., Ceyhun, S. B. 2021. "A versatile toxicity evaluation of ethyl carbamate (urethane) on zebrafish embryos: Morphological, physiological, histopathological, immunohistochemical, transcriptional and behavioral approaches". *Toxicology Letters*, 353, 71–78.
- Sulkan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Işık, M., Atamanalp, M., Ceyhun, S. B. 2017. "“An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Daino rerio*)”". *Chemosphere*, 180, 77–85.
- Sulkan, Ekrem, Baran, A., Kankaynar, M., Kızıltan, T., Bolat, İ., Yıldırım, S., ...

- Ceyhun, S. B. 2023. "Global warming and glyphosate toxicity (II): Offspring zebrafish modelling with behavioral, morphological and immunohistochemical approaches". *Science of The Total Environment*, 856, 158903.
- Székács, A., Darvas, B. 2018. "Re-registration challenges of glyphosate in the European Union". *Frontiers in Environmental Science*, 6, 78.
- Toss, V., Leito, I., Yurchenko, S., Freiberg, R., Krüve, A. 2017. "Determination of glyphosate in surface water with high organic matter content". *Environ Sci Pollut Res Int*, 24(9), 7880–7888.
- Tresnakova, N., Stara, A., Velisek, J. 2021. "Effects of Glyphosate and Its Metabolite AMPA on Aquatic Organisms". *Applied Sciences*, 11(19), 9004.
- Truong, L., Saili, K. S., Miller, J. M., Hutchison, J. E., Tanguay, R. L. 2012. "Persistent adult zebrafish behavioral deficits results from acute embryonic exposure to gold nanoparticles". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(2), 269–274.
- Türkoğlu, M., Baran, A., Sulukan, E., Ghosigharehagaji, A., Yildirim Ceyhun, H. A., S., Ceyhun, S. B. 2021. "The potential effect mechanism of high-fat and high-carbohydrate diet-induced obesity on anxiety and offspring of zebrafish". *Eating and Weight Disorders-Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*, 1–15.
- Uren Webster, T. M., Laing, L. V., Florance, H., Santos, E. M. 2014. "Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*)". *Environ Sci Technol*, 48(2), 1271–1279.
- van der Werf, M. J., Takors, R., Smedsgaard, J., Nielsen, J., Ferenci, T., Portais, J. C., ... Sauer, U. 2007. "Standard reporting requirements for biological samples in metabolomics experiments: microbial and in vitro biology experiments". *Metabolomics*, 3(3), 189–194.
- Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., Foulkes, N. S. 2011. "It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock". *FEBS Letters*, 585(10), 1485–1494.
- Velasques, R. R., Sandrini, J. Z., da Rosa, C. E. 2016. "Roundup® in zebrafish: effects on oxidative status and gene expression". *Zebrafish*, 13(5), 432–441.
- Villas-Boas, G. R., Lavorato, S. N., Paes, M. M., de Carvalho, P. M. G., Rescia, V. C., Cunha, M. S., ... Oesterreich, S. A. 2021. "Modulation of the Serotonergic Receptosome in the Treatment of Anxiety and Depression: A Narrative Review of the Experimental Evidence". *Pharmaceuticals*, 14(2), 148.
- Wang, B. 2012. "Molecular Mechanism Underlying Sialic Acid as an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition". *Advances in Nutrition*, 3(3), 465S–472S.
- Wang, D., Yang, L., Wang, J., Hu, G., Liu, Z., Yan, D., ... Kalueff, A. V. 2020. "Behavioral and physiological effects of acute and chronic kava exposure in adult zebrafish". *Neurotoxicology and Teratology*, 79, 106881.
- Wang, T., Gnanaprakasam, J. N. R., Chen, X., Kang, S., Xu, X., Sun, H., ... Wang, R. 2020. "Inosine is an alternative carbon source for CD8⁺-T-cell function under glucose restriction". *Nature Metabolism*, 2(7), 635–647.
- Weber, G. J., Sepúlveda, M. S., Peterson, S. M., Lewis, S. S., Freeman, J. L. 2013. "Transcriptome Alterations Following Developmental Atrazine Exposure in Zebrafish Are Associated with Disruption of Neuroendocrine and Reproductive System Function, Cell Cycle, and Carcinogenesis". *Toxicological Sciences*, 132(2), 458–466.
- Westerfield, M. 2000. "The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish". http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.
- Xu, C., Niu, L., Liu, J., Sun, X., Zhang, C., Ye, J., Liu, W. 2019. "Maternal exposure to fipronil results in sulfone metabolite enrichment and transgenerational toxicity in

- zebrafish offspring: Indication for an overlooked risk in maternal transfer?". *Environmental Pollution*, 246, 876–884.
- Yang, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Wu, X., Zheng, Y. 2019a. "Dysregulation of circadian rhythm in zebrafish (*Danio rerio*) by thifluzamide: Involvement of positive and negative regulators". *Chemosphere*, 235, 280–287.
- Yang, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Wu, X., Zheng, Y. 2019b. "Flutolanil affects circadian rhythm in zebrafish (*Danio rerio*) by disrupting the positive regulators". *Chemosphere*, 228, 649–655.
- Yanik, T., Aslan, I. 2018. "Impact of Global Warming on Aquatic Animals". *Pakistan Journal of Zoology*, 50(1).
- Zakharov, A., Khivintseva, E. 2020. "Clinical Use of Melatonin in the Treatment of Sleep Disorders". *İçinde Melatonin - The Hormone of Darkness and its Therapeutic Potential and Perspectives*. IntechOpen.
- Zanuncio, C., M, C. L., Alcantara-de la Cruz, R., B, P. B., Pereira, A. I. A., C, F. W., ... C, S. S. 2018. "Glyphosate-based herbicides toxicity on life history parameters of zoophytophagous *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)". *Ecotoxicol Environ Saf*, 147, 245–250.
- Zhang, H., Wang, X., Qian, M., Jin, Y. 2022. "Atrazine Exposure Induces Hepatic Metabolism Disorder in Male Adult Zebrafish". *Toxics*, 10(7), 400.
- Zhang, L., Rana, I., Shaffer, R. M., Taioli, E., Sheppard, L. 2019. "Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis and supporting evidence". *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 186–206.
- Zhang, S., Xu, J., Kuang, X., Li, S., Li, X., Chen, D., ... Feng, X. 2017. "Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*)". *Chemosphere*, 181, 270–280.
- Zhang, W. D., Wang, J. C., Song, J. S., Feng, Y. R., Zhang, S. J., Wang, N., ... Kang, W. J. 2021. "Effects of low-concentration glyphosate and aminomethyl phosphonic acid on zebrafish embryo development". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226.
- Zhao, Y., Zhang, K., Fent, K. 2018. "Regulation of zebrafish (*Danio rerio*) locomotor behavior and circadian rhythm network by environmental steroid hormones". *Environmental Pollution*, 232, 422–429.
- Zheng, X., Zhang, K., Zhao, Y., Fent, K. 2021. "Environmental chemicals affect circadian rhythms: An underexplored effect influencing health and fitness in animals and humans". *Environment International*, 149, 106159.
- Zhou, Q., Kerbl-Knapp, J., Zhang, F., Korbelius, M., Kuentzel, K. B., Vujić, N., ... Madl, T. 2021. "Metabolomic Profiles of Mouse Tissues Reveal an Interplay between Aging and Energy Metabolism". *Metabolites*, 12(1), 17.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Ekrem SULUKAN
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Eğitim	
Lisans:	Sinop Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi (2012)
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği Ana Bilim Dalı (2015)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği Ana Bilim Dalı (2022)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
1. Sulukan, E., Baran, A., Kankaynar, M., Kızıltan, T., Bolat, İ., Yıldırım, S., ... & Ceyhun, S. B. (2023). Global warming and glyphosate toxicity (II): Offspring zebrafish modelling with behavioral, morphological and immunohistochemical approaches. Science of The Total Environment, 856, 158903. 2. Sulukan, E., Baran, A., Senol, O., Kankaynar, M., Yıldırım, S., Bolat, İ., Ceyhun, H., Toraman, E.,... & Ceyhun, S. B. (2023). Global warming and glyphosate toxicity (I): Adult zebrafish modelling with behavioural, immunohistochemical and metabolomic approaches on November 08, 2022.	