

**ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNE
GLYPHOSATE'NİN TOKSİK ETKİLERİ**

Ekrem SULUKAN

**Yüksek Lisans Tezi
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
2015
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNE
GLYPHOSATE'NİN TOKSİK ETKİLERİ

Ekrem SULUKAN

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2015

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ ONAY FORMU



Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyonik gelişimi üzerine Glyphosate'nin toksik etkileri

Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN danışmanlığında, Ekrem SULUKAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 30/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP

Üye : Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Üye : Yrd. Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 02.07/2015 tarih ve 26 / 865 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
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.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNE GLYPHOSATE'NİN TOKSİK ETKİLERİ

Ekrem SULUKAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Bu çalışmada, tarım alanlarında ve ormanlık alanlarda yabancı otların öldürülmesi amacı ile sıkça kullanılan, organofosfatlı ve seçici olmayan bir herbisit olan Glyphosate'nin zebra balığının (*Danio rerio*) embriyonik gelişim döneminde vücut morfolojisi ve karbonik anhidraz enzimi aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla anaç zebra balıklarından alınan embriyolar 1, 5, 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında Glyphosate 96 saat süreyle muamele edildi.

Deneme tam şansa bağlı basit deneme planına göre, dört tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Çalışma bir kontrol, dört muamele grubu olmak üzere toplam beş grup bulunmaktadır. Döllenmeyi takiben 4. saatten itibaren Glyphosate'ye maruz bırakılan embriyolar 24, 48, 72 ve 96. saatlerde mikroskop altında incelenerek, vucüt ve kuyruk anormallikleri, ödem varlığı ve hayatta kalma oranları değerlendirilmiştir. 96. saatin sonunda larvalardan hazırlanan homojenttan karbonik anhidraz enzim aktivitesi hidrataz aktivitesi tayin yöntemine göre ölçülmüştür.

Deneme sonunda omurga ve kuyruk bozukluğu bulgularının yanında perikardiyal ve yumurta kesesi ödemi bulgularına da rastlanmış ve fotoğraflanmıştır. 96. saatin sonunda yapılan enzim aktivitesi ölçümü sonucunda, uygulanan Glyphosate konsantrasyonuna bağlı olarak enzim inhibisyonun arttığı gözlenmiştir.

2015, 39 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glyphosate; zebra balığı; embriyonik gelişim; karbonik anhidraz.

ABSTRACT

Master Thesis

TOXIC EFFECTS OF GLYPHOSATE ON EMBRYONIC DEVELOPMENT OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Ekrem SULUKAN

Atatürk University
Graduate School of Agriculture Faculty
Department of Fishery Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

In this study, we investigated the effects of Glyphosate, which is an herbicide organophosphate and unselective widely used agriculture and forest areas for killing weeds, on body morphology and enzyme activity of carbonic anhydrase during the embryonic development of zebrafish. For this purpose, embryos which are obtained from zebra broodfish were treated with glyphosate concentration respectively 1,5,10,100 mg/l for 96 hours.

The study was carried on according to full aleatory simple test plan and four replications. There are five groups one is control whereas others are treated. We evaluated the body and tail abnormalities, presence of oedema and survival rate of embryos treated Glyphosate from 4 hpf with stereo microscope in 24, 48, 72 ve 96 th hours. The enzyme activity of carbonic anhydrase was detected with hydratase activity method from homogenate prepared end of the 96 th hour.

As a result we had determined and photographed vertebra and tail abnormalities besides pericardial and yorcsak oedema. According to results of enzyme activity we observed that the activities of the enzyme decreased with increasing Glyphosate concentrations.

2015, 39 pages

Keywords: Glyphosate; zebrafish; embryonic development; carbonic anhydrase.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın araştırma konusunun belirlenmesi, planlanıp yürütülmesi ve tez haline getirilmesinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a,

Çalışmalarım esnasında gerekli yardımı ve yakın ilgiyi esirgemeyen ve fiziki imkân sağlayan Su Ürünleri Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP başta olmak üzere tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Karbonik anhidraz aktivite ölçümü analiz çalışmasında yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR ve Doktora öğrencisi Mesut IŞIK'a, çevirilerimdeki yardımlarından ve tez yazım aşamasında ki yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Özden FAKIOĞLU'na ve Doktora öğrencisi Mine KÖKTÜRK'e tez yazım aşamasında her zaman yanımda olan Sayın Arş. Gör. Fatih KORKMAZ ve Sayın Arş. Gör. Mehmet SARI'ya, bu süreçte bana katlanan her türlü sıkıntıda yanımda olan arkadaşım Ayşegül ÇEÇEN'e,

Maddi manevi yardım ve desteklerinin yanısıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı başta kıymetli babam Ali SULUKAN ve annem Ayser SULUKAN olmak üzere ailemin tüm fertlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekrem SULUKAN

Haziran, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Araştırma yeri.....	14
3.1.2. Deneme ortamı ve kullanılan malzemeler.....	14
3.1.3. Balık materyali.....	14
3.1.4. Uygulanan kimyasal.....	15
3.1.5. Kullanılan çözelti ve tamponlar.....	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Deneme planı ve kimyasalın uygulanması.....	17
3.2.2. Embriyo morfolojilerinin izlenmesi ve değerlendirilmesi.....	17
3.2.3. Enzim aktivite ölçümü.....	18
3.2.3.a. Homojenat hazırlanması.....	18
3.2.3.b. Enzim aktivite ölçümü.....	18
3.2.4. İstatistiksel analiz.....	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	20
4.1. Morfolojik Bulgular.....	20
4.1.1. Gözlenen vücut bozuklukları.....	20
4.2. Hayatta kalma oranı.....	24
4.3. Enzim aktivitesi bulguları.....	25
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	26
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	40

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CA	Karbonik anhidraz enzimi
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
GF	Glyphosate
HCl	Hidroklorik asit
hdf	Döllenmeyi takip eden saat (hours post fertilization)
KCl	Potasyum klorür
LC ₅₀	Letal doz %50
LD ₅₀	Letal konsantrasyon %50
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
NaCl	Sodyum klorür
PCB	Poliklorlu bifenil
POEA	Polioksietilen amin
ROS	Reaktif oksijen türleri
SiNPs	Silika nanopartikülleri
Tris	Trihidroksimetil aminometan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Denemede anaç olarak kullanılan 1 yaşındaki AB genotipli zebra balıkları.....	15
Şekil 4.1. Omur bozukluğuna ait bulgu	21
Şekil 4.2. Kuyruk bozukluğuna ait bulgu	22
Şekil 4.3. Vücut şekil bozukluğuna ait bulgu	23
Şekil 4.4. Perikardiyal ödeme ait bulgular	23
Şekil 4.5. Gözlenen vücut bozukluklarının uygulanan GF konsantrasyonuna göre seyri ($p<0,05$)	24
Şekil 4.6. Uygulanan GF konsantrasyonuna göre embriyoların 96 saat sonunda hayatta kalma oranları ($p<0,05$)	24
Şekil 4.7. Uygulanan GF konsantrasyonuna göre 96 saat sonunda embriyolarda gözlenen karbonik anhidraz enzimindeki inhibisyon ($p<0,05$)	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Glyphosate'nin moleküler yapısı ve özellikleri.....	16
Çizelge 3.2. Hidrataz aktivitesinde kullanılan maddelerin katılma sırası ve miktarları.....	19

1. GİRİŞ

Günümüzde su, en önemli doğal kaynaktır ve yaşam için mutlak gereklidir. Bilim adamlarının yapmış olduğu çalışmalara göre küresel ısınma ve kirlilik nedeniyle mevcut su kaynaklarının giderek azaldığı saptanmıştır. Günümüzde dünya nüfusu bir önceki yüzyıla oranla üç kat artmasına rağmen, su kaynaklarındaki kullanımın altı kat arttığı bildirilmektedir (Karaman ve Gökalp 2010). Diğer taraftan ziraat ve sanayi kaynaklı kirliliğin yanında evsel atıkların artması sonucu kaynak sularımızın daha fazla kirlendiği gözlenmektedir. Bunun sonucunda da tamamen birbiriyle bağlantılı olarak, besin zinciri en alt basamaktan en üst basamağa kadar etkilenmektedir. Ekolojik dengenin olumsuz yönde değişmesi, beraberinde canlı yaşamını da olumsuz yönde etkilemektedir. Bu kirlilik etmenleri besin zinciri yoluyla toprak, sucul ortam, bitki, hayvan ve insanlara kadar taşınarak yaşamları tehdit etmektedir.

Pestisitler, tarımsal ürünleri, böceklerin, yabancı otların ve diğer zararlıların olumsuz etkilerinden koruyarak verim ve kaliteyi güvence altına almayı amaçlayan tarımsal mücadelede önemli bir yere sahiptir. Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler hava, su ve toprağa oradan da bu ortamlarda yaşayan canlılara geçmekte ve dönüşüme uğrayabilmektedirler (Pulatsü vd 2014). Tarımsal mücadelede kullanılan pestisitler hedef organizmaları yok ederek ürün artışına neden olabildikleri gibi, hedef olmayan canlılarda da hasarlara yol açabilmektedirler (McEven and Stephenson 1979; Amdur *et al.* 1991).

Pestisitlerin bilinçsizce kullanılması, yararlı türler ve direkt veya dolaylı olarak insanlar üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır. Doğada kimyasal kirliliğe yol açan, toprakta, suda, meyvelerde, sebzelerde ve diğer besin maddelerinde uzun süre bozulmadan kalan ve besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşabilen pestisitlerin alerjik, karsinogenik, mutajenik ve teratojenik etkilerinin olduğu çeşitli canlılarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Durmuş 2009).

Pestisitlerin ne şekilde ve ne miktarda uygulanacağına yönelik kullanma talimatlarının bulunmasına ve bu talimatların sucul ortamda pestisit bulaşmasını minimuma indirmeyi amaçlamasına rağmen, pestisit kalıntıları tarımsal alanlardan sulak alanlara çeşitli yollarla taşınabilmektedir (Kaellqvist and Romstad 1994).

Pestisitlerin başlıca bulaşma yolları:

- Tarımsal uygulamalar (havadan püskürtme, rüzgar, yüzey akısı ile),
- İnsektisit olarak evsel kullanımlar,
- Pestisit üretim tesislerinden sızıntılar,
- Çeşitli endüstriyel kuruluşların atık suları ve boş pestisit ambalajlarının sucul ortama ve su kaynaklarına ulaşma riski olan alanlara atılmasıdır (Egemen 2000).

Türkiye’de pestisit tüketimi etkili madde bazında 1979’dan 2002 yılına kadar %45.29’luk bir artış göstermiştir. Bu artışa karşın ülkemizde pestisit tüketimi gelişmiş ülkelere göre oldukça düşüktür. Türkiye’de genel pestisit tüketimi az olmakla birlikte, en yoğun tüketilen pestisitler çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadır (Delen vd 2005).

Kimyasal mücadelede kullanılan pestisitler şunlardır (Öncüer 2004);

- İnsektisit : Böcek, haşerelere karşı kullanılan ilaçlardır.
- Fungusit : Funguslara (Mantar) karşı kullanılan ilaçlardır.
- Herbisit : Yabancı otlara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Mollusit : Yumuşakçalara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Rodentisit : Kemirgenlere karşı kullanılan ilaçlardır.
- Nematisit : Yuvarlak solucanlara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Akarisit : Akarlara karşı kullanılan ilaçlardır.

Diğer yandan zirai mücadelede yaygın olarak kullanılan 4 temel herbisit grubu bulunmaktadır.

Bunlar;

- Organoklorinler (Organik Klorlular)
- Pyretroidler
- Karbamatlar
- Organofosfatlar (Organik Fosforular) (Anonim 2010).

Organofosfatlı bileşikler arasında yaygın olarak kullanılan ve sentetik bir herbisit olan Glyphosate (GF) [$C_3H_8NO_5P$ ($HO-CO_2NHCH_2P=O(OH)_2$)], 1970 yıllarının başında Amerika'da arpa, buğday vb. tahıl ürünlerinde ve endüstri bölgelerinde kullanılırken, daha sonra tüm dünyada yaygın olarak uygulanmaya başlanmıştır. Brezilya'da yapılan çalışmada ise GF [N-(phosphonmethyl) glycine]'in pirinç tarlaların drenaj sularının sucul ekosisteme girişi balık beslenme mevsimi ile eşzamanlı gerçekleştiği bu nedenle sucul yaşam için potansiyel bir tehlike oluşturduğu bildirilmiştir (Giesy *et al.* 2000; Primel *et al.* 2005).

GF'nin genel olarak uygulanan formüle edilmiş ürünleri Roundup, Kleenup gibi herbisitlerdir. Bu herbisitler isoproylamine tuzunun (çözülebilirliğe yardımcı) bir formunu içeren GF lerdir ki, bunlar çeşitli anjuvanları ile daha gelişmiş bir herbisit özelliği göstermektedir. En önemli ve yaygın kullanılan anjuvanlardan biri polioksietilen aminedir (POEA) (Brausch and Smith 2007).

GF tarım alanlarında ve ormanlık alanlarda istenmeyen bitkilerin öldürülmesi amacı ile sıkça kullanılan, organofosfatlı ve seçici olmayan bir herbisittir. Bu tür kimyasalların istenmeyen canlılar üzerindeki zararlı etkilerinin belirlenmesi amacıyla özellikle model canlılar üzerine yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. GF'nin etkilerini araştırırken model organizma kullanılmasının amacı hücre, doku, organ ve sistem düzeyinde biyolojik, fizyolojik ve patolojik mekanizmaları anlamak, sistem ve sistemler arası ilişkiyi öğrenmek, hastalıklara karşı tedavi yolları bulmak ve hastalık veya hasarın tanısı için yöntemler geliştirmektir. Günümüzde pek çok hastalık için, ilgili hastalığın gelişiminde etkili olan mekanizmaların anlaşılmasını hedefleyen hayvan modelleri

oluşturulmuştur. Hayvan modelleri, insan hastalıklarının kaynağı ve gelişmesi sırasında organizmada meydana gelen değişikliklerin tamamını anlamakta değerli birer araç olmakla beraber, bu canlıların sahip oldukları türe özgü özellikler insan hastalıklarının tanısında etkili olabilmektedir (Anonim 2015).

Model organizmalar, laboratuvar ortamında üretimi kolay, ucuz ve etik açıdan fazla sorun teşkil etmeyen organizmalardır. Bu organizmalar insanlar dahil çalışılması zor organizmaların biyolojik özelliklerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Model organizmalar 3 farklı grup altında toplanmaktadır: a. Genetik, b. Deneysel, c. Genomik şeklindedir. Zebra balığı (*Danio reio*) ve Şişen balık (*Fugu rubripes*) model organizma olarak kullanılan iki balık türüdür. Üretilen mutant zebra balıkları insan hastalıkları için uygun bir modeldir. İlaçların denenmesi içinde kullanılır. Alzheimer hastalığı, konjenital kalp hastalığı, polisistik böbrek hastalığı ve kanser gibi modelleri de içerir (Doğan 2015).

Zebra balıkları, dayanıklı bir tür olmaları, kolay bulunmaları, laboratuvar ortamında yumurta bırakabilmeleri, kolay beslenebilmeleri ve çoğalmaları, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmeleri, dış döllenme ile üremeleri, yumurta ve embriyolarını saydam oluşu, yumurta ve larva gelişimlerinin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanının kısa olması ve embriyoların toksik ajanlara duyarlı oluşu nedenleriyle toksikoloji çalışmalarında en sıklıkla kullanılan model organizmalardan biridir (Atasayar 2011).

Son yıllarda ekotoksikoloji çalışmalarında *Danio rerio* (Zebra balığı) yumurtaları ve embriyoları sıklıkla kullanılmaya başlamıştır (Kimmel *et al.* 1995). Öte yandan son zamanlarda zebra balığı insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında mükemmel bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Bunun nedenleri, Zebra balığı ile insan ve diğer omurgalıların genom yapılarının benzer oluşu, metabolizmalarının ve embriyonik gelişimlerinin hemen hemen aynı olması, en önemlisi insanlarda bulunan tümör baskılayıcı genin (sitokrom P450 grubu) Zebra balığında da keşfedilmiş olmasıdır (Şişman ve Geyikoğlu 2010). Ayrıca gen transferi yapılarak yeni transgenik

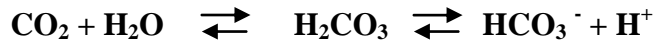
zebra balıkları meydana getirilebilmekte ve laboratuvarında üretilen transgenik balıklar ayrıca insan hastalıklarında model olarak da kullanılmaktadır (Zon 1999; Dooley and Zon 2000). Transgenik zebra balıkları, genlerin fonksiyonlarının ve gen regülasyonlarının çalışılmasına olanak sağlamaları bakımından diğer sistemlere göre daha üstün avantajlar sunmaktadır (Ekici 2007).

Balıklarda sitokromlar ve antioksidan enzimler gibi yapılar pestisitlerden kaynaklanan zararlı etkilere karşı hücrel sistemi koruyabilirler (Alak vd 2011). Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir.

Örneğin, karbondioksit'in (CO_2) su ile reaksiyona girmesiyle karbonik asit meydana gelir ve fizyolojik pH'da meydana gelen karbonik asidin bir kısmı hemen bikarbonat iyonuna dönüşmektedir. İyonizasyon süreci enzim gerektirmez ve asit özelliğine bağlıdır. Canlı vücudunda ise bikarbonat iyonu oluşması karbonik anhidraz (CA) enziminin katalizörlüğünde meydana gelir (Fresht 1999).

Karbonik anhidraz (CA) enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku/organlar ile akciğer arasındaki CO_2 /bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Chegwidden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000). Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması; son altmış yıldır yapılan çalışmalar sonucunda CA enziminin; metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Kılınç 2011).

Karbonik anhidraz (Karbonat hidrolizaz, karbonat dehidrataz, karbonat anhidraz, karbonik asit anhidraz E.C.4.2.1.1) prokaryot, ökaryot ve archaea'da yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran bir metaloenzimdir. İlk defa sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz (CA), canlılarda CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran and Scozzafava 2001).



Birinci reaksiyon karbonik anhidraz enzimi tarafından katalizlenirken, ikincisi kendiliğinden yürüyen bir mekanizmadır. Enzim karbonik asit meydana getirmeden HCO_3^- ve H^+ oluşturarak hem CO_2 'in uzaklaştırılmasında hem de asit-baz dengesinin korunmasında önemli rol oynar.

CA enziminin aktivitesi iki şekilde ölçülebilmektedir; birincisi, CA'nın fizyolojik aktivitesi olan CO_2 hidrataz aktivitesidir, ikincisi ise in vitro şartlarda gerçekleştirilen spektrofotometrik olarak takip edilebilen esteraz aktivitesidir. CO_2 hidrataz aktivitesi CO_2 'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Esteraz aktivitesi yöntemi, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır.

Canlılarda çok yaygın olarak bulunan CA enzimin bulunduğu ortamın şartlarına ve ihtiyacına göre değişik izoenzimleri mevcuttur. Her geçen gün yeni bir izoenzimi ortaya çıkartılmakta olup bilinen 16 tane izoenzimi bulunmaktadır. (Lonnerholm *et al.* 1985; Okuyama *et al.* 1995; Parkkila and Parkkila 1996; Christie *et al.* 1997; Raisanen *et al.* 1999). Bu izoenzimlerin beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Supuran *et al.* 2004; Hilvo 2005). CA-XV'nin ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer

özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izoenzimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimoi 2004; Hilvo 2005; Çoban *et al.* 2009).

İnsanda farklı izoenzimlerin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokular arasında; akciğer, böbrek, gastrit mukoza, göz lensi, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokular başta gelmektedir ve bunların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır (Hewett-Emmett 2000; Sugrue 2000).

Yapılan tez çalışmasında, 96 saat süreyle 1, 5, 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında GF'ye maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında, embriyolojik gelişim döneminde morfolojik vücut bozukluklar ve hayatta kalma oranı 24, 48, 72 ve 96. saatlerde gözlenmiş ve deneme sonunda karbonik anhidraz enzim aktivitesi değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

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

Çalışmamızda canlı materyal olarak birçok bilimsel çalışmada model olarak kullanılan zebra balığı tercih edilmiştir. Gökçe'nin bildirdiğine göre zebra balıkları primer hepatosit kültürünün diğer hayvan örnekleri kullanımına göre daha kısa sürede veri toplanması, deney materyali olarak birçok avantaj sunduğunu kanıtlanarak insan sağlığıyla bağlantılı olarak araştırılması için mükemmel laboratuvar modelleri olduğu bildirilmiştir (Gökçe 2014).

İnsan telomer kısalması mekanizmalarına ve telomeraz aktivitesindeki insanlarınkine benzer değişimler sebebiyle, telomer ve telomeraz çalışmalarında Zebra balığı yoğun olarak kullanılmaktadır. Yıldız yaptığı çalışmada zebra balığının ergin ve yavru bireylerinde kalp, karaciğer, dalak ve dişi bireylerde ayrıca yumurtalık dokularında telomeraz aktivitesini değerlendirmiştir (Yıldız 2015).

Suda çözünen metal bileşiklerinin balıklar üzerinde etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, farklı bakır konsantrasyonlarına maruz bırakılan zebra balıklarının ilk olarak solungaçlarının etkilendiği, sadece morfolojik olarak değil moleküler düzeyde de etkilerinin olduğu saptanmıştır (Griffitt 2007).

Karbon 60 (C60), titanyum dioksit (TiO₂), bakır (Cu) ve gümüş (Ag) nanopartiküllerinin zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, yeni geliştirdikleri test sistemi ile üç farklı zamanda tekrarlanan doz-etki deney sonuçlarının tekrarlanabilir olduğu görülmüş ve LC₅₀ değerleri Ag, Cu ve TiO₂ NP'ler için sırasıyla 0,27; 0,65 ve 897 mg/L olarak hesaplandığı bildirilmiştir. Hg⁺²'nin farklı konsantrasyonları ile yapılan MT-2 gen ekspresyon analizleri sonucunda Hg⁺²'nin gen ekspresyonunu kontrol grubuna oranla 10 kat (%89) arttırdığı tespit

edilmiştir. C60 ve TiO₂ NP'ler ile Hg⁺²'nin birlikte etkisinin araştırıldığı gen ekspresyon deneyleri sonucunda C60 ve TiO₂'in Hg⁺²'nin toksisitesini önemli oranda azalttığı belirlenmiştir. Cu⁺² ve Cu-NP'ün toksisitelerinin karşılaştırıldığı deneylerde Cu⁺²'in sebep olduğu gen ekspresyon artışının Cu-NP'e göre 3 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, sertliği (mg/L CaCO₃) yüksek olan sularda Cu-NP'ün toksisitesinde artış olurken, EDTA bulunan sularda Cu-NP'ün toksisitesinin azaldığı saptanmıştır (Boran 2012).

Billsson *et al.* (1998) döllenen zebra balığı yumurtalarına 50 µl PCB60, PCB104, PCB173 ve PCB190 enjekte etmişler ve çalışmanın sonunda yüksek oranda ölüm meydana geldiği, ödem oluşumu, embriyonik gelişimin yavaş olması ve anterior kusurlu oluşumlar meydana geldiğini saptamışlardır.

Olsson *et al.* (1999) PCB60, PCB190 ve PCB104'ü zebra balıklarının ergin dişilerine enjeksiyonla vermişler ve dişilerin yumurta veriminde bir azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir.

GF veya ticari ürünü Roundup'ın hayvanların üremeleri üzerine yapılan çalışmada ise, bu herbisitlere maruz kalan dişi balıklarda cinsiyet hormon profilinde değişimler, yumurta verimliliği ve embriyo yaşayabilirliğinde azalma bildirilmiştir (Webster *et al.* 2014).

Kirleticilere karşı sucul organizmaların tepkileri fizyolojik ve hematolojik parametrelerin ölçülebileceği bildirilmiştir (Gimeno *et al.* 1995; Sancho *et al.* 1998; 2000; Begum 2004). Glyphosatın toksikolojisi üzerine fare, tavşan, köpek ve sucul omurgasızlar ve balıklar üzerine çalışmalar yapılmış olup bitkilerde yüksek toksik etkiye sahip iken hayvanlarda nispeten toksik etki tespit edilmemiştir (Williams *et al.* 2000).

Erkek tavşanlarda yapılan bir çalışmada, GF maruz bırakıldıklarında sperm hücrelerinde anormal ölümlerin artmasına bağlı olarak sperm konsantrasyonunun azalması tespit etmişlerdir (Yousef *et al.* 1995).

Çavaş and Könen (2007), dünya genelinde yaygın olarak kullanılan GF herbisitinin japon balığı (*Carassius auratus*) üzerindeki etkilerini incelemişler ve çalışmanın sonucunda GF herbisitinin hedef olmayan sucul organizmalarda da DNA hasarı meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Cavalli *et al.* (2013)'in fareler üzerinde yapmış olduğu bir diğer çalışmada GF ve Roundup herbisitlerinin spermatogenesis oluşumunun devamlılığını sağlayan sertoli hücrelerinin ölümlerini etkilediğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra Walsh *et al.* (2000) yapmış oldukları çalışmada GF'nin farelerde testis Leydig hücrelerindeki protein oluşumunda bozulmalar tespit etmişlerdir.

Harayashiki *et al.* (2013) tarafından lepistes balıkları (*Poecilia*) türleri üzerine yapmış oldukları çalışmada GF içerikli Roundup'un sperm fonksiyonları üzerine negatif etkileri gözlemlenmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada yine Roundup'ın farelerde sperm oluşumu üzerinde değişimlere neden olduğu bildirilmiştir (Romano *et al.* 2012).

Balıklar üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda, Roundup ve GF'nin hücrel antioksidan üretimini engelleyerek veya ROS (Reaktif oksijen türleri) oluşumunu tetikleyerek oksidatif stresi neden olduğu bildirilmiştir. Bu herbisitlerden Roundup 6 günden fazla süre 1-20 mg/l dozunda uygulandığında balıklarda proteinler, lipitler ve DNA da oksidatif zararlara neden olduğu ve hücrel antioksidanların miktarını değiştirdiği tespit etmişlerdir (Cavalcante *et al.* 2008; Ferreira *et al.* 2010).

Kedi balıkları (*Clarias batrachus*) ve yılan balıklarında (*Anguilla anguilla*) da 9 gün süre ile Roundup, GF ve POEA ile yapılan uygulamalarda karaciğer hücreleri ve kan

hücrelerinde DNA hasarları bildirilmiştir (Guilherme *et al.* 2010; Castilhos and Cestari 2013).

Gümüş kedi balığı yavruları üzerine GF ve Roundupun etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, 0,1 - 100 µg/L GF uygulamaları sonucu gonadlarında herhangi bir değişim belirlenmez iken 3,6 mg/L Roundup uygulamasında bazı olumsuz etkiler tespit etmişlerdir (Le Mer *et al.* 2013).

Yapılan bir diğer çalışmada GF'nin, yayın balığı (*Clarias gariepinus*) yavrularının ölüm oranı ve davranışsal tepkileri üzerine etkileri araştırılmıştır. Yavrularda huzursuzluk, koordinasyonsuz hareketler, denge kaybı ve tankın alt kısımlarında hareketsiz kalma gibi birkaç anormal davranış gözlenmiş ve bunun yanı sıra herbisit konsantrasyonunun artışı ile yavrular tarafında tüketilen oksijenin azaldığı bildirilmiştir (Okayi *et al.* 2010).

Yavru gökkuşağı alabalıkları üzerine yapılan bir diğer çalışmada GF'nin balıkların yüzme performansı ve antioksidan sistemin üzerine etki ettiği ve bulunan değerlerin karaciğer histopatolojik bulguları ile örtüştüğü bildirilmiştir (Topal *et al.* 2014).

El-Shebly and El-kady (2008), Nil tilapiaları (*Oreochromis niloticus*) üzerine Roundup herbisitinin büyüme hormonu (GH) ve kas protein'inin serum konsantrasyonları üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, kas protein içeriği önemli ölçüde azaldığını saptamışlardır.

Herbisit GF bir asetilkolinesteraz inhibitörü olarak sınıflandırılmamış olmasına rağmen, bazı çalışmalar, saf formu ve ticari formülasyonlarına in vivo olarak maruz bırakıldıktan sonra, asetilkolinesteraz aktivitesinde azalma olduğu bildirmişlerdir. Ancak in vitro olarak yapılan bir çalışmada kahverengi midye *Perna perna*, zebra balığı *Danio rerio* ve *Jenynsia multidentata* türlerinde kolinesteraz enzim aktivitesi üzerine GF'nin etkileri belirlenmiştir. Sonuç olarak GF, kolinesteraz enzim aktivitesini farklı balık türlerinde farklı dokularında inhibe edebildiği ortaya konulmuştur (Sandrini *et al.* 2013).

Lopes *et al.* (2014)'nın Zebra balığı (*Danio rerio*) sperm kalitesi üzerine GF'ın etkilerini araştırdığı çalışma sonucunda, sperm konsantrasyonunda büyük bir farklılık gözlenmediği fakat sperm hareketlilik süresinde azalma tespit edilmiştir. Buda GF'ın zebra balığı üreme parametreleri üzerine zararlı etkileri tetikleye bildiğini göstermişlerdir.

Bir diğer çalışmada zebra balığına, Roundup ve GF uygulaması sonucu embriyonun ilk evresinde ölüm oranını ve yumurtadan erken çıkış oranını arttırdığı ve bu kimyasalların zebra balığında oksidatif stres ve üreme toksitelerine neden olduğu tespit etmişlerdir (Webster *et al.* 2013).

Yapılan tez çalışmasında çalışılan bir diğer parametre olan karbonik anhidraz (CA) enzimi insan ve fare eritrositlerinden, fare salyasından, sığır lökositlerinden ve sığır kemiklerinden saflaştırılmış ve çalışılmıştır. CA enzimi göz, ciğer ve merkezi sinir sistemi gibi çoğu dokuda dağıldığını bildirmişlerdir (Beydemir and Gülçin 2004).

Lionettoli *et al.* (2000) *in vitro* şartlarda yapılan bir aktivite çalışmasında, yılan balıklarında (*Anguilla anguilla*) kadmiyumun, hem solungaç hem de bağırsak CA izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırılmış, solungaç ve bağırsak homojenatlarında CA aktivitelerinde önemli oranda inhibisyon olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada deltamethrine akut maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı solungaçlarında CA enziminin inhibisyonu gözlenmiştir. Aynı alışmada CA enzimi gökkuşağı alabalığı solungacından saflaştırılmış ve deltamethrinin yanında diazinon, propoxur ve cypermethrinin inhibisyon etkisi *in vitro* ortamda araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tüm pestisitlerin inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır (Ceyhun *et al.* 2010).

Bir diğer çalışmada hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve mezigit (*Merlangius merlangus euxinus*) ballıklarının solungaç dokularından CA enzimleri sırasıyla 1473, 2800 EU x mg⁻¹ spesifik aktiviteleriyle ve %26,3, %23,3 saflıkta Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Hamsi ve mezigit balığı dokuları CA aktiviteleri üzerine bazı ağır metallerin (bakır, çinko, gümüş, nikel, kadmiyum, kobalt, kurşun, demir ve arsenik) inhibisyon etkileri hidrataz ve esteraz metodu kullanılarak in vitro şartlarda ayrı ayrı incelenmiştir (Arslan 2013).

Ceyhun *et al.* (2010) yürütmüş oldukları alışma Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) solungaçlarından karbonik anhidraz enzimini için afinite kromatografisi ile Sepharose-4B anilin-sülfonilamid kullanarak saflaştırmışlar çeşitli pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine in vitro etkilerini incelemişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma yeri

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

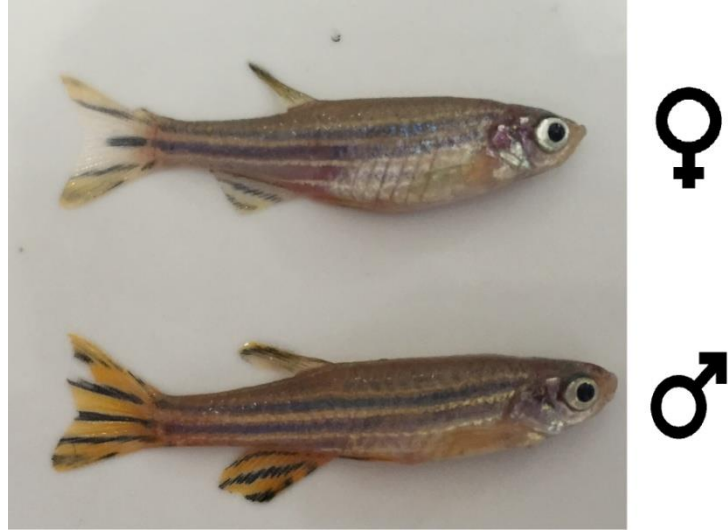
3.1.2. Deneme ortamı ve kullanılan malzemeler

Deneme steril 100 ml lik cam beher kaplar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her grup için eşit sayıda yumurta içeren beherler 28.5°C sıcaklıktaki su banyosunda konularak deneme süresince yumurtaların optimum sıcaklıkta kalmaları sağlanmıştır. Çalışma için kullanılan karanlık odada 10 saat gündüz 14 saat gece olmak üzere fotoperiyot uygulaması yapılmıştır.

3.1.3. Balık materyali

Yapılan çalışmada, özellikle toksikoloji çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir model organizma olan AB genotipli zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları kullanılmıştır. Araştırmada zebra balıklarının kullanılmasının birçok nedeni vardır. Bunlardan en önemlileri, besleme ve büyüme çalışmalarında model organizma olarak kullanılması, özellikle son yirmi yılda omurgalı gelişimi ve insan hastalıklarını modellemede kullanılıyor olmasıdır.

Zebra balığı *Cyprinidae* familyasını ait bir tür olup, anavatanı Güneydoğu Asya, baskın olarak da Pakistan ve Hindistan'dır. Bu tez çalışması, Oregon Üniversitesi (ABD) Uluslararası Zebra Balığı Kaynak Merkezi'nden temin edilen AB genotipli zebra balıkları embriyolarında yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Denemede anaç olarak kullanılan 1 yaşındaki AB genotipli zebra balıkları (*Danio rerio*)

Phyllum: Chordata

Classis: Actinopterygii

Ordo: Cypriniformes

Familia: Cyprinidae

Genus: Danio

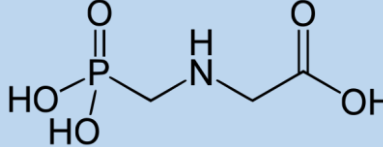
Species: *Danio rerio*

AB genotipi ilk olarak 70'li yıllarda daha güzel görünümlü ve sağlıklı yavrular elde etmek için Oregon Üniversitesi araştırmacıları tarafından ıslah edilmiştir. Sonraları bu hat, özellikle moleküler biyolojide yeni ve teknolojik yöntemlerin gelişmesi ile birlikte toksikoloji çalışmalarında ideal bir model olmuştur.

3.1.4. Uygulanan kimyasal

Yapılan çalışmada GF kaynağı olarak 480 gr/l konsantrasyonunda glyphosate isopropilamin tuzu içeren ve Kleenup ticari adıyla piyasada bulunan herbisit kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Glyphosate'nin moleküler yapısı ve özellikleri

Kimyasal adı	Glyphosate
Kimyasal adı	2-(phosphonomethylamino) asetat
Moleküler yapısı	
Özellikleri	<p>Renk: Sarımsı kahverengi - Beyaz Form: Granül (serbest akışlı, tozsuz, higroskopik) Koku: Hafif Yanma noktası: Yoktur, yanıcı katı madde olarak sınıflandırmaz Erime Noktası: 185 °C Partikül ebadı: 700 µm (parçacık çapı) Molekül ağırlığı: 169,1 Yoğunluk: 0,70 g/cm³; (toz yoğunluğu) Çözünürlük (Su): 10,1 g/L (20°C) pH: 3,6 10 g/L</p>

3.1.5. Kullanılan çözelti ve tamponlar

- Tris HCl Tamponu;
- 25 mM Tris
- 0,1 Na₂SO₄
- Veronal Tamponu;
- 0,025 M Sodyum barbatil (C₈H₁₂N₂O₃)
- E3 Medium Çözeltisi;
- 5 mM NaCl
- 0,17 mM KCl
- 0,33 mM CaCl₂
- 0,33 mM MgSO₄
- %0,01 Metilen Mavisi

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme planı ve kimyasalın uygulanması

Deneme tam şansa bağlı basit deneme planına göre, dört tekerrürlü olarak ortamı yenilenen toksikoloji deneyleri esasına göre dizayn edilmiştir. Denemede biri kontrol, dördü muamele olmak üzere toplam 5 grup bulunmaktadır. Muamele gruplarına 1, 5, 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında GF uygulanmıştır. Denemenin ilk gününde alınan yumurtalardan rastgele seçilen 20 yumurta içerisinde 30 ml E3 (5mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, %0,01 metilen mavisi) bulunan 100 ml'lik beherlere alınmıştır. Döllenmeyi takip eden ilk 4 saat süresinde yumurtalar sürekli gözlenmiş ve döllenmemiş yumurtalar uzaklaştırılarak yerine döllenmiş yumurta ilave edilerek 20 embriyo ile denemeye başlanmıştır. 4. saat sonunda kontrol ve muamele grupları, belirtilen konsantrasyonlarda E3 ortam içerisinde hazırlanmış kaplara aktarılarak sıcaklığı 28,5°C'ye ayarlanmış su banyosuna konulmuştur. Tüm deneme ortamları her gün yenilenmiştir.

3.2.2. Embriyo morfolojilerinin izlenmesi ve değerlendirilmesi

Deneme başlangıcından itibaren 24, 48, 72 ve 96. saatlerde tüm gruplara ait tüm embriyolar Zeiss marka Discovery V12 model stereo mikroskop altında görüntülenmiştir. Bu aşamada embriyoların, vücut morfolojilerindeki anormallikler ve hayatta kalma oranları kaydedilmiştir. Vücut morfolojilerindeki anormalliklerin belirlenmesinde, kuyruk şekil bozukluğu, omur şekil bozukluğu, vücudun herhangi bölgesinde meydana gelen ödem bulguları aranarak kaydedilmiştir. Hayatta kalma oranı ise, her gün her grupta bulunan ölü embriyolar sayılarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Enzim aktivite ölçümü

3.2.3.a. Homojenat hazırlanması

96. saat sonunda her gruptan 5 larva uygun miktar Tris-HCl tamponu içerisinde Qiagene marka Tissue Laser model homojenizatör yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen larvalar 4°C sıcaklıkta 13 000 rpm de 30 dk boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant aktivite ölçümü için kullanılmıştır.

3.2.3.b. Enzim aktivite ölçümü

Karbonik anhidraz enzimi in vitro şartlarda iki farklı aktiviteye sahip olan nadir enzimlerden bir tanesidir. Bu yüzden enzimin izoenzimlerinin bu özelliklerinden faydalanılarak esteraz ve hidrataz olmak üzere farklı iki aktivite ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Yapılan tez çalışmasında hidrataz aktivitesi kullanılmıştır. Hidrataz aktivitesi ile CA aktivite ölçümü için sağlam sonuçlar alınmaktadır.

Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemi (Wilbur and Anderson 1948). CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Karbonik anhidraz enzimi canlı metabolizmasında CO₂'in HCO₃⁻'a dönüşümünü katalizlemektedir. Bu esasa dayanarak hidrataz aktivitesi deneyi ile bu enzimin aktivitesi belirlenmektedir. Bu amaçla, kör olarak hazırlanan deney tüpüne 1 ml 0,025 M veronal tamponu (pH:8,2), 0,1 ml %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 ml saf su ve son olarak 2,5 ml CO₂ (substrat) çözeltisi ilave edilmiştir. CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi yani pH'ın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre bir kronometre kullanılarak ölçülmüştür. Bu süre kör değer için hesaplandığından t₀ olarak adlandırılmaktadır. Numune tüpünde ise sudan 0,05 ml azaltarak bunun yerine süpernatant ilave edilmiş ve yine deney tüpüne en son substrat

(CO₂) çözeltisi ilave edilerek, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlenmiştir (t_c).

Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzim olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Çalışmada aşağıdaki formül kullanılarak her gruba ait enzim ünitesi hesaplanmıştır (Maren 1960).

$$EU = \frac{t_o - t_c}{t_c}$$

Çizelge 3.2. Hidrataz aktivitesinde kullanılan maddelerin katılma sırası ve miktarları

Kullanılan maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µl)	Numune Tüpü (µl)
0,025 M veronal tamponu (pH=8,2)	1000	1000
%0,04'lük brom timol mavisi	100	100
Saf su	600	595
Enzim çözeltisi	-	5
CO ₂ gazı ile doyurulmuş çözelti	2500	2500
Toplam Hacim	4200	4200

3.2.4. İstatistiksel analiz

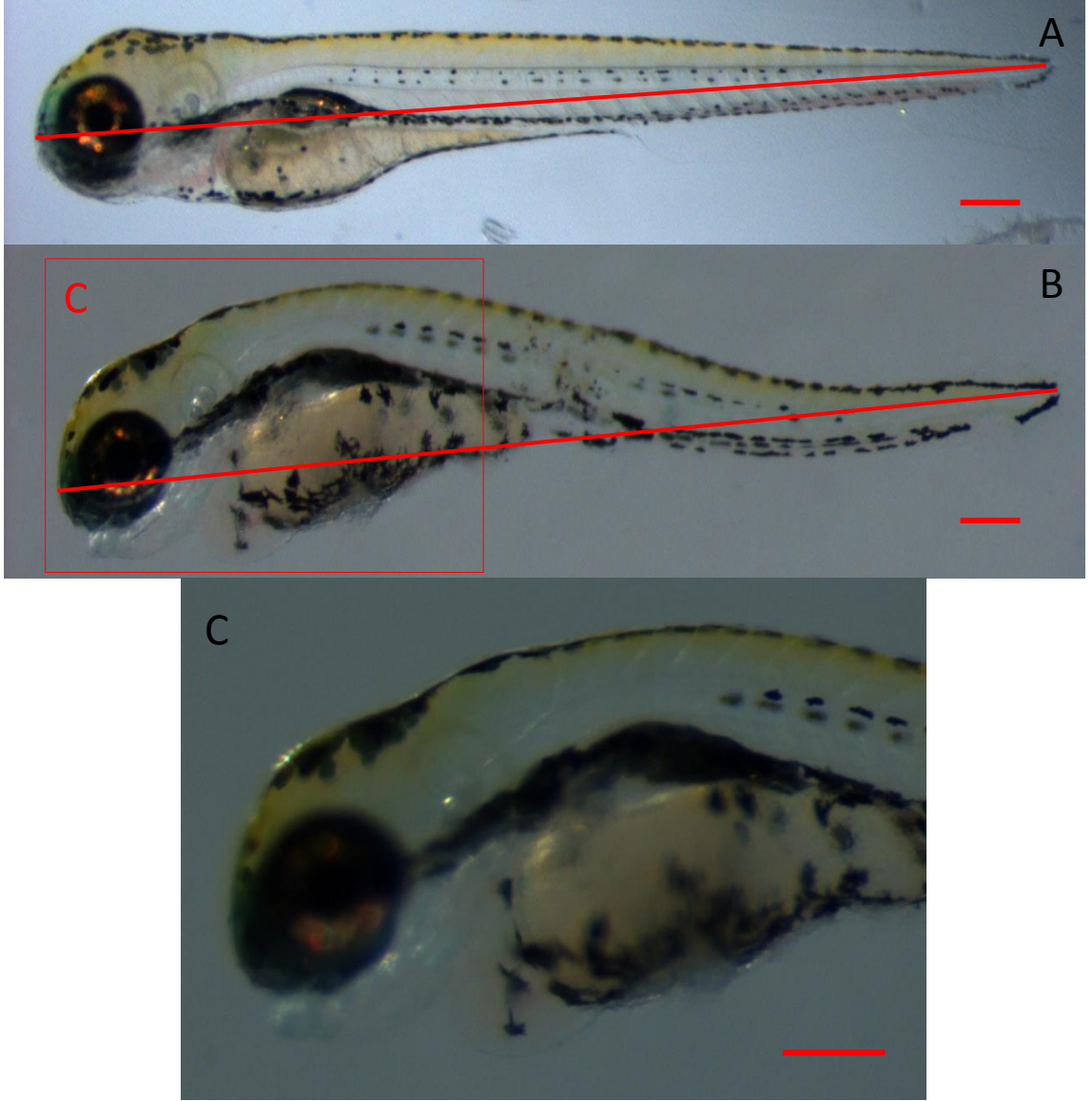
Yapılan çalışma tam şansa bağlı basit deneme planına göre, dört tekerrürlü olarak yapılmıştır. Gruplar arası fark varyans analizi yapılarak belirlenmiştir (ANOVA). İstatistiksel önem p<0,05 seviyesinde SPSS 17.0 ile Two-Way ANOVA and Duncan çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

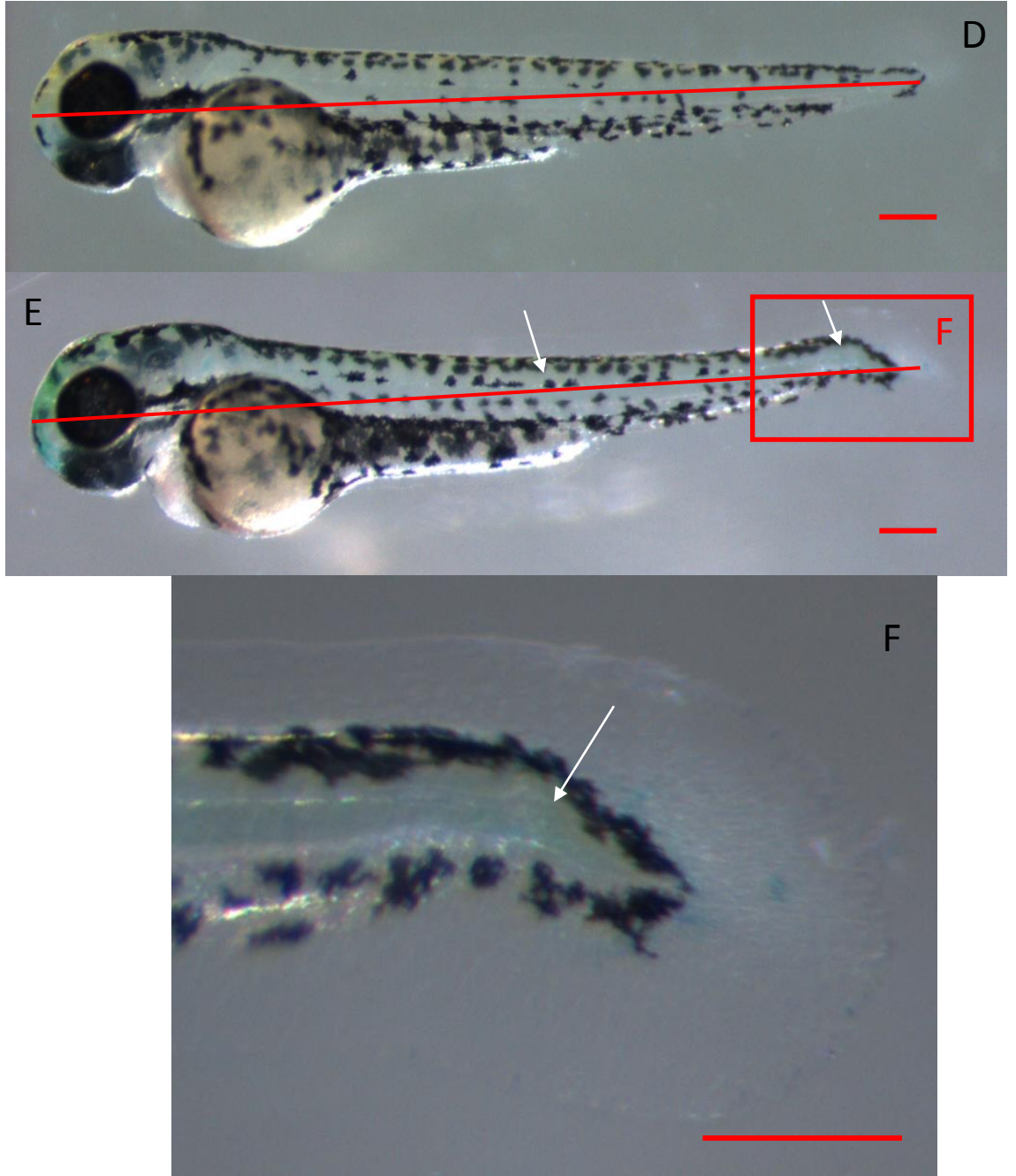
4.1. Morfolojik Bulgular

4.1.1. Gözlenen vücut bozuklukları

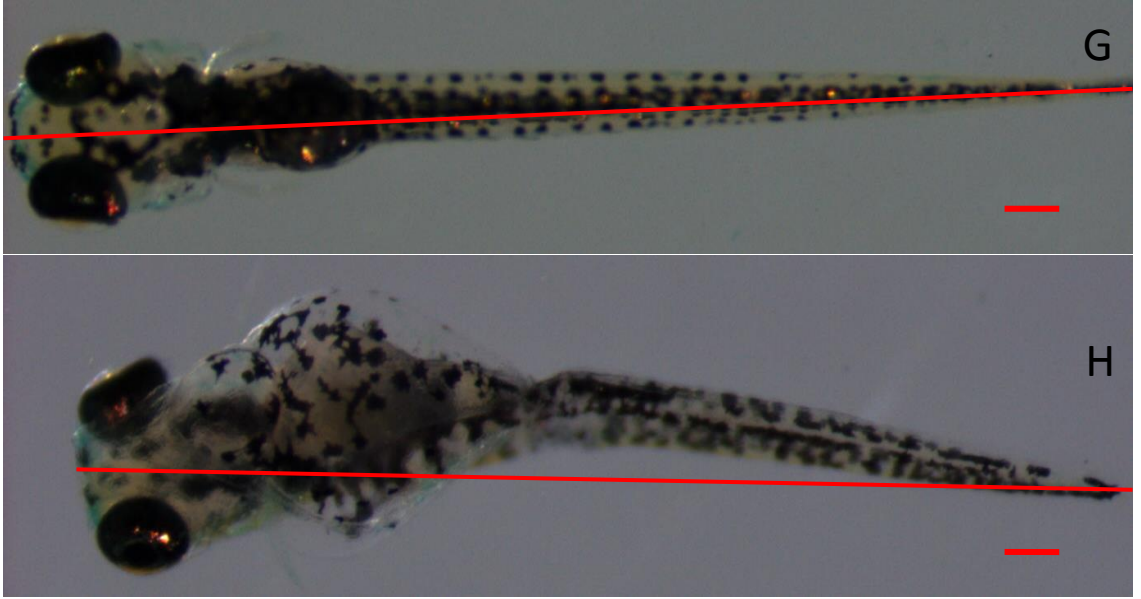
Döllenmeyi takiben 4. saatten itibaren dört farklı dozda GF uygulanan embriyolar, 96 saat boyunca 12, 24, 48 ve 96. saatlerde mikroskop altında incelenmiŐ ve gözlenen vücut bozuklukları fotoğraflanmıştır. İnceleme sırasında kuyruk Şekil bozukluğu, omur Şekil bozukluğu, vücudun herhangi bölgesinde meydana gelen ödem bulguları aranarak kaydedilmiştir. Yapılan inceleme sonucunda 10 mg/l dozunda 1 embriyoda ve 100 mg/l dozunda ise 2 embriyoda perikardiyal ödeme rastlanmıştır (Şekil 4.4). 100 mg/l dozunda 1 embriyoda ise yumurta kesesi ödemi bulgusuna rastlanmıştır. Yine yapılan inceleme sonucunda, 1 mg/l dozunda 2 embriyoda, 5 mg/l dozunda 5 embriyoda, 10 mg/l dozunda 5 embriyoda ve 100 mg/l dozunda ise 9 embriyoda kuyruk ve/veya omur bozukluğu bulgusuna rastlanmıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.5).



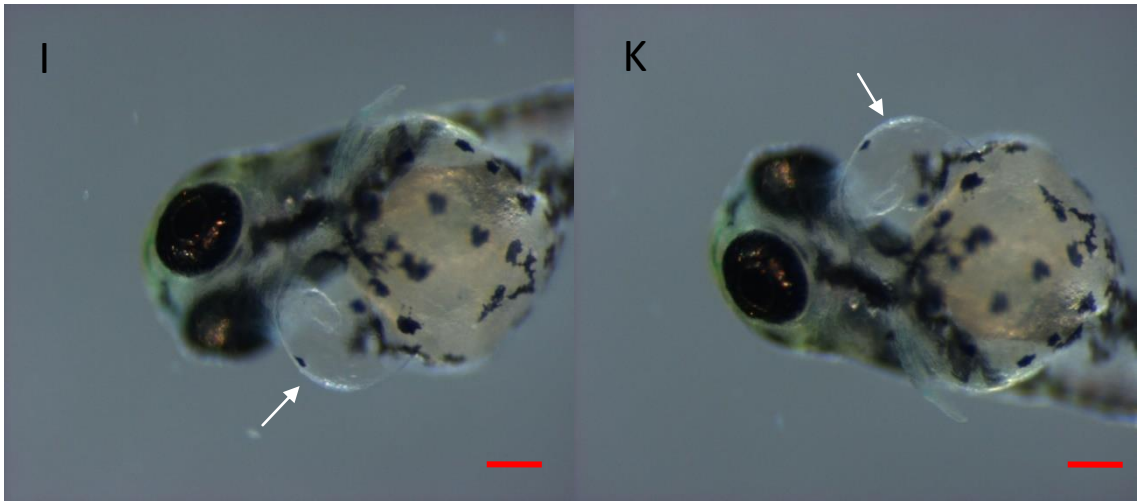
Şekil 4.1. Omur bozukluğuna ait bulgu
(A kontrol 96 hpf, B 100 mg/l doz 96 hpf, C B'den detay) (Bar 50 μ m)



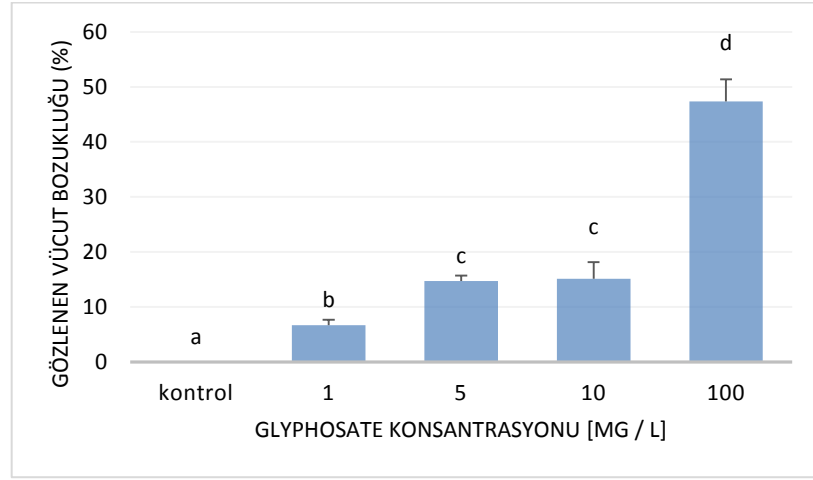
Şekil 4.2. Kuyruk bozukluğuna ait bulgu
(D kontrol 72 hpf, E 100 mg/l doz 72 hpf, F E'den detay) (Bar 50 μ m).



Şekil 4.3. Vücut şekil bozukluğuna ait bulgu
(G kontrol 96 hpf, H 100 mg/l doz 96 hpf) (Bar 50 μ m)



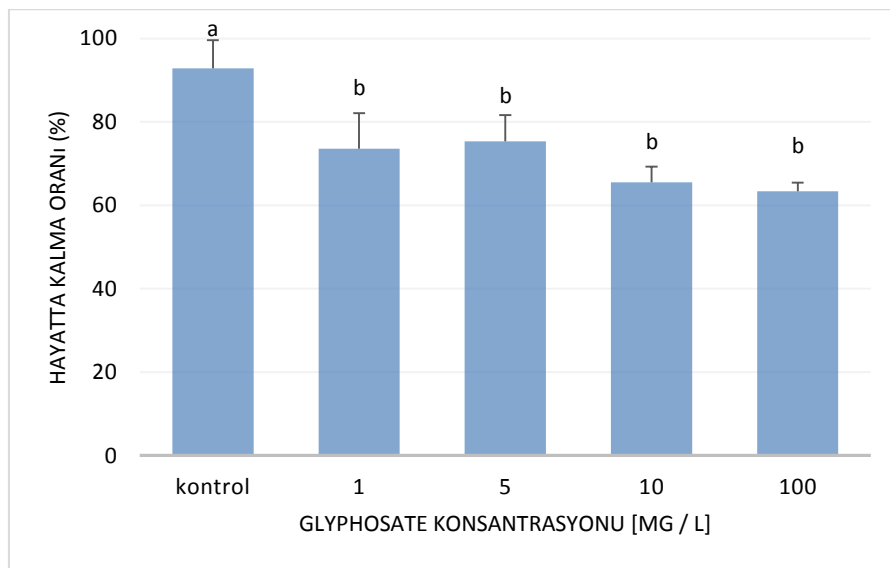
Şekil 4.4. Perikardiyal ödeme ait bulgular
(I,K 100 mg/l doz 72 hpf) (Bar 50 μ m)



Şekil 4.5. Gözlenen vücut bozukluklarının uygulanan GF konsantrasyonuna göre seyri ($p < 0,05$)

4.2. Hayatta kalma oranı

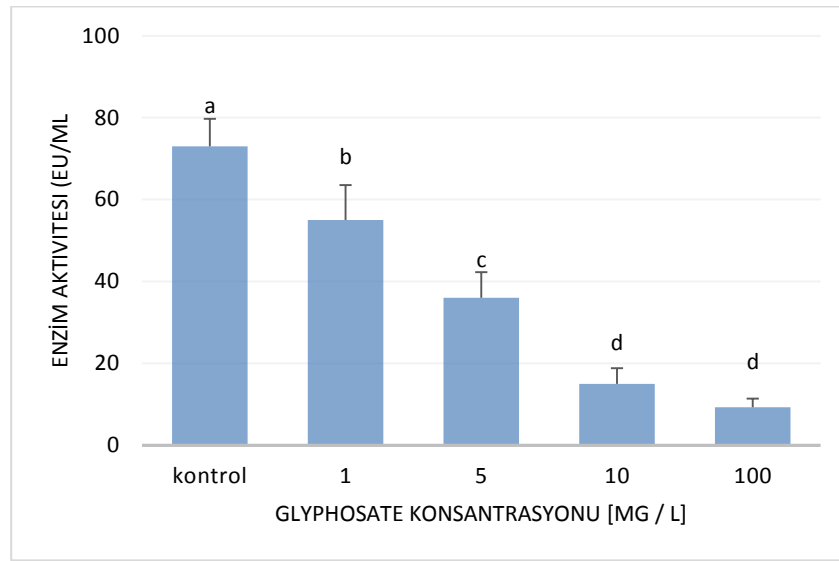
Döllenmeyi takiben 4. saatten itibaren dört farklı dozda GF uygulanan embriyolar 96 saat boyunca 12, 24, 48 ve 96. saatlerde incelenerek ölü embriyolar ortamdan uzaklaştırılarak sayıları kaydedilmiş ve yüzde olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Uygulanan GF konsantrasyonuna göre embriyoların 96 saat sonunda hayatta kalma oranları ($p < 0,05$)

4.3. Enzim aktivitesi bulguları

96 saat boyunca 4 farklı dozda GF'ye maruz bırakılan embriyolardan 5'er tanesi uygulama sonunda karbonik anhidraz enzim aktivitesi analizi için kullanılmıştır. Yapılan analiz neticesinde elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7.Uygulanan GF konsantrasyonuna göre 96 saat sonunda embriyolarda gözlenen karbonik anhidraz enzimindeki inhibisyon ($p < 0,05$)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Glyphosate (GF) (N-phosphonomethyl glycine), tarım alanlarında ve ormanlık alanlarda yabancı otlardan korunmak amacı ile yaygın bir şekilde kullanılan, organofosfatlı ve seçici olmayan bir herbisittir (Chan and Mahler 1992). GF tarım alanlarında uygulama esnasında havanın rüzgarlı ve yağışlı olması nedeniyle çevreye yayılımı ve birikimi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Daruich *et al.* 2001). GF, giderek artan kullanımı nedeni ile hedef olmayan organizmalarda morfolojik ve fizyolojik değişikliklere ve uygulama esnasında yayıldığı alanlarda hedef olmayan ürünlerde hasara, neden olmaktadır (Tate *et al.* 1997; Gilreath *et al.* 2000). Tarım ürünlerinin GF içerikli herbisitlere karşı direnç kazandırılması amacı ile bazı kültür bitkilerine genetik modifikasyon yapılmış ve çiftçiler, bu modifiye ürünlerinin dirençli olmalarının verdiği rahatlıkla GF içerikli herbisitleri tarım alanlarında daha fazla kullanmaya başlamışlardır (Kolpin *et al.* 2006). Güney Brezilya'da 2000-2002 yılları arasında soya fasulyesi ve mısıra 4562 ton GF uygulanmıştır (Inoue *et al.* 2003). Bu bilinçsizce kullanım sonucunda, çevre tahribatı, insan ölümleri ve pek çok canlı türünün tükenmesi ile sonuçlanmaktadır (Benbrook 2001). GF kullanım amacı bitkilerin üretimiyle, ürünlerden alınan verimin artırılması amaçlanmakta fakat bu bitkilerin tüketilmesi yolu ile insanlar ve hayvanlar GF'a maruz kalmaktadırlar (Takahashi *et al.* 2001). Diğer yandan GF dirençli 'süper yabancı otlar' ortaya çıkmakta ve bunların temizlenmesi de daha fazla GF kullanımını gerektirmektedir. Özellikle tarım alanlarında kullanılan miktarından düşük dozları dahi memeli hayvanların gebelik döneminde toksik etkiler göstermektedir. Hamilelik döneminde GF içerikli herbisitlere maruz kalan kadın işçilerde düşük oranında artış ve erken doğum gibi hamilelik problemlerinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Savitz *et al.* 1997; De Roos *et al.* 2005). GF'ın su ortamında çözünürlüğü 15,7 mg/L'dir (Rodrigues and Almeida 1998). Sudaki yarı ömrü 12 saatten 7 haftaya kadar değişiklik gösteren GF'ın, sudaki kalıcılığı topraktaki kalıcılığına göre daha azdır ve sudaki yüksek çözünürlüğü genellikle ortamda Polioksietilen amin'e bağlıdır (Perkins *et al.* 2000; Tsui and Chu 2003, 2004).

Bilindiği üzere tarım alanlarında istenmeyen canlılarla mücadele için yaygın olarak kullanılan kimyasalların hedef olmayan canlılar üzerine etkilerinin araştırılması büyük önem arz etmektedir. Söz konusu kimyasal maddeler, organizmaya girdikten sonra organizmada çeşitli reaksiyonlar gerçekleşir. Bunlardan ilki Faz I olarak nitelendirilen ve özellikle sitokrom ailesinden birçoğunun da içinde bulunduğu çeşitli enzimlerin vasıtasıyla hidrofobik özellikte olan maddelerin hidrofilik özelliğini artırarak su ile birlikte vücuttan uzaklaştırılmasıdır. Bu esnada enzimler aracılığı ile reaksiyona giren maddelerin yapıları değişir ve metabolit adı verilen yeni bileşikler ortaya çıkabilir. Bu durum kimyasal maddenin partitasyon katsayısı ile orantılı olarak değişmektedir. Logaritmik bir değer olan ve maddelerin organik ortamdaki çözünürlüğünün sudaki çözünürlüğüne oranını ile hesaplanan partitasyon katsayısı, vücuda giren maddelerin Faz I reaksiyonları ile atılıp atılabilemeyeceği konusunda fikir sahibi olmamızı sağlar. Öyle ki partitasyon katsayısı için 3 sınır değer olarak kabul edilmektedir (Parlak vd 2009). Bunun anlamı, madde organik fazda suda çözündüğünden 1000 kat daha fazla çözünme eğilimindedir. Maddenin kimyasal yapısına da bağlı olmakla birlikte genellikle bu değer 3'ten büyük olması durumunda Faz I reaksiyonları yetersiz kalacak ve organizma söz konusu maddeyi atabilmek için çeşitli konjügasyonların gerçekleştiği Faz II reaksiyonlarını kullanacaktır. Buradan da sonuç alınamaması durumunda biyoakümülyasyon olarak isimlendirilen vücutta birikim gerçekleşecektir.

Vücuda alınan kimyasallar değişik organlarda toksik etki oluşturabilir. Toksikiteyi belirleyen önemli faktörler doz, kimyasalın özelliği ve birey duyarlılığıdır. Genel olarak düşük dozlarda toksisite görülmemesine rağmen doz arttıkça toksisite de artar. Diğer taraftan düşük dozlarda aynı kimyasala sürekli maruz kalan canlılarda kimyasalın özelliğine göre uzun sürede olumsuz etki görülür.

Toksik maddelerin bu etkilerinin hedef alınmayan canlılarda belirlenmesi, bu ürünlerin kullanım koşulları ve dozları hakkında önemli bilgiler vermektedir. Ayrıca bu tür çalışmaların model organizmalar üzerinde yapılmasıyla, söz konusu maruziyetin insanlarda olması durumunda gözlenebilecek etkilerin tahmin edilebilmesi noktasında daha tatmin edici veriler elde edilebilmektedir.

Yapılan bu tez çalışması, bilim dünyasında yaygın olarak kullanılan ve önemli bir omurgalı modeli olan zebra balıkları üzerinde yapılmıştır. AB genotipli zebra balığı anaçlarından elde edilen embriyolara 1, 5, 10 ve 100 mg/l dozlarında GF uygulanmış ve embriyonik gelişim dönemindeki morfolojik bozukluklar tespit edilmiştir. Yürütmüş olduğumuz bu çalışmada kuyruk şekil bozukluğu, omur şekil bozukluğu, vücudun herhangi bölgesinde meydana gelen ödem bulguları aranarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre artan GF konsantrasyonuna paralel olarak gözlenen morfolojik bulguların sayısı da artmıştır (Şekil 4.5). Yapılan inceleme sonucunda 10 mg/l dozunda 1 embriyoda ve 100 mg/l dozunda ise 2 embriyoda perikardiyal ödeme rastlanmıştır (Şekil 4.4). Yine yapılan inceleme sonucunda, 1 mg/l dozunda 1 embriyoda, 5 mg/l dozunda 3 embriyoda 10 mg/l dozunda 5 embriyoda ve 100 mg/l dozunda ise 7 embriyoda kuyruk ve omur bozukluğu bulgusuna rastlanmıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3). Elde edilen bulgular literatürlerde yapılan benzer çalışmalarla örtüşmektedir. Öyle ki;

Yapılan bir çalışmada 10 mg/L konsantrasyonunda 21 gün boyunca GF'ye maruz bırakılan zebra balıklarında yumurta veriminin düştüğü tespit edilmiştir. Aynı çalışmada erken embriyonik dönemde ölüm oranının ve yumurtadan erken çıkış oranının arttırdığı ve bu kimyasalların zebra balığında stres gibi üreme toksitelerine neden olduğu bildirilmiştir (Webster *et al.* 2013).

Brezilya'da yürütülen bir diğer çalışmada doğal sularda GF'in 65 µg/L bulunduğunu tespit etmişler ve zebra balıkları bu orana 15 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak zebra balıklarında hedef olmayan organizmalara toksik etki ettiği, ayrıca dişi balıkların üremesinde olumsuz yönde etkili olabileceğini saptamışlardır (Armiliato *et al.* 2014).

Lopes *et al.* (2014) yılında yaptıkları çalışmada, 5 ve 10 mg/l konsantrasyonlarında GF'ye maruz bırakılan zebra balıklarında spermatik hücre yoğunluğu, sperm hareketliliği gibi sperm kalite parametrelerini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlarına göre sperm konsantrasyonunda önemli bir fark gözlenmezken sperm hareketliliğinde azalma gözlenmiştir.

Willey and Krone (2001), tarafından yapılan çalışmada zebra balığı embriyolarına yüksek dozda (10-7 M) endosülfan ve nonilfenol uygulaması yapılarak zebra balığı embriyo ve prelarvalarındaki değişimler gözlenmiştir. Endosülfan ve nonilfenol uygulamaları döllenmeden sonraki 2. saatte yapılmıştır. Endosülfan uygulaması sonucunda 3-4 günlük zebra balığı prelarvalarında anormal dairesel yüzüş, omurgada anormallikler ve gövde ekseninde eğrilmeler tespit edilmiştir. Hem endosülfan hem nonilfenol uygulaması sonucunda prelarvalarda ödem oluşumları, mikrosephali (baş oluşumunun normalden küçük olması) ve harekette yavaşlama tespit edilmiştir.

Farklı bir tür üzerinde GF denemesinde ise, Tate *et al.* (1997) *Pseudosuccinea columella* (su salyangozu) ile yaptıkları çalışmada, uzun dönem sub-letal dozda (0,1-10 mg/L) yumurtadan çıkma oranında, yumurta yayılımında, üreme potansiyelinde, büyüme ve gelişim oranında azalma tespit etmişlerdir.

Siluridae familyasına ait bir balık türü Jundi'a (*Rhamdia quelen*) ile yapılan sub-letal çalışmada GF'in, fertilizasyon oranını, kuluçka randımanı, tek seferde yumurtadan çıkan yavru sayısını, embriyonun hayatta kalması ve gelişimini etkileyebileceği belirtilmiştir (Soso *et al.* 2007).

Sağlıklı 80-100 g'lık 72 *Cyprinus carpio* ile yapılan bir diğer çalışmada, kontrol grubu, 1. grup (Roundup'ın %0,05'lik sulu çözeltisi; 205 mg GF/L, 1 saat uygulama) ve 2. grup (Roundup'ın %0,1'lik sulu çözeltisi; 410 mg GF/L, 0,5 saat uygulama) olmak üzere üç grup oluşturularak Roundup uygulaması yapılmıştır. Roundup uygulanan balıklarda, her iki dozda da ölümler görülmüştür (Szarek *et al.* 2000).

Cyprinus carpio'larla yapılan diğer bir akut toksisite testinde, 96 saatlik uygulama sonucu Roundup'ın LC₅₀ değeri ise GF'inkinden daha düşük olmakla birlikte (2 ila 55 mg/L), bu değer balık türüne, gelişim dönemine ve ortam koşullarına göre değiştiği de tespit edilmiştir (Jiraungkoorskul *et al.* 2002).

Brezilya'nın güney ve güneydoğu bölgesinde biyoindikatör olarak tanımlanan (Camargo and Martinez 2006; Simonato *et al.* 2007), neotropikal bir balık türü, *Prochilodus lineatus* juvenillerinde Roundup'ın LC₅₀ değeri 13,7 mg/L gibi oldukça düşük bir değer olarak belirtilmiştir (Langiano and Martinez 2008). Yapılan bu çalışmada da GF'nin hayatta kalma oranında büyük ölçüde etki ettiği görülmüştür.

Bir diğer organofosfat herbisit olan paraquat yılanbaş (*Channa punctata*) (Parvez and Raisuddin 2006), zebra balığı (*Danio rerio*) (Bretaud *et al.* 2004) ve gökkuşuğu alabalığı (Stephensen *et al.* 2002) üzerine uygulanmış ve sonuçta oksidatif stresi artırdığı rapor edilmiştir.

Silika nanopartikülleri (SiNPs)'nin toksik etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise zebra balığı embriyoları 96 süresince SiNPs (25, 50, 100, 200 mg / ml) ile muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ölümler, yumurtadan çıkma oranında azalma ve vücut anormallikleri tespit edilmiştir. Ayrıca bizim çalışmamıza benzer şekilde uygulanan doza bağlı bir şekilde perikardiyal ödem, kuyruk ve baş abnormalite tespit edilmiştir (Duan *et al.* 2013).

Yürütülen çalışmada incelenen bir diğer parametre ise karbonik anhidraz enziminin aktivitesindeki değişimdir. Karbonik anhidraz (CA) yetişkin zebra balıklarında karbondioksit atılımı için çok önemliken larva dönemindeki karbonik anhidraz fonksiyonu ve ekspresyonu ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Gilmour *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada döllenmeden sonra 0-120 saat arasında CA enzim aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonucunda 24 ile 48 saat arasında olan zebra balığı larvalarında CO₂ atılımı artışı için gerekli olan CA aktivitesi başladığını tespit etmişlerdir.

Yapılan bu tez çalışmasında 1, 5, 10 ve 100 mg/l dozlarında GF 96 süreyle maruz bırakılan uygulanan zebra balığı larvalarında uygulama sonunda CA enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre artan GF konsantrasyonun CA enziminde artan inhibisyona neden olduğu saptanmıştır (Şekil 4.7). Tüm uygulama gruplarında kontrol

grubuna göre önemli derecede inhibisyon görülmüştür. En fazla inhibisyonun görüldüğü doz 100 mg/l olmasına karşın 10 kat daha düşük uygulanan dozda görülen inhibisyon etkisi 100 mg/l dozunda görülenden istatistiksel olarak farklı çıkmamıştır. Bu durumda zebra balığı embriyoları için 96 sürelik maruziyette 10 mg/l dozun karbonik anhidraz enzimi için en etkin konsantrasyon olduğu söylenebilir. CA özellikle balıklarda CO₂'nin eliminasyonunun yanında asit-baz dengesinin ayarlanmasında kritik öneme sahip bir enzimdir. Dolayısıyla söz konusu doz CA aktivitesinde görülen inhibisyon önemli bir markır olabilir.

Beydemir *et al.* (2011) yaptığı bir çalışmada ise, farklı stok yoğunluklarının gökkuşağı alabalıkları karaciğer, kas, solungaç ve böbrek CA enzimi aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar solungaçlarda CA enziminin aktivitesinin artan stok yoğunluğuna paralel olarak arttığı diğer organlarda ise azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada, uygulanan dozlardaki GF'nin önemli bir model organizma olan zebra balıklarının embriyonik gelişimlerini olumsuz yönde etkilediği, vücut morfolojilerinde çeşitli bozulmalara neden olduğu ayrıca CA enzimi aktivitesinde inhibisyona neden olduğu saptanmıştır. Uygulanan dozların düşüklüğü, söz konusu pestisitlerin yaygın kullanımı, suda kolaylıkla çözünebildiği ve elde edilen bulgular ışığında aşağıdaki sonuçlar çıkarılabilir;

- Tarım alanlarında GF kullanımının kontrollü olarak yapılması,
- Özellikle hamilelik dönemdeki kadınların sakınılması,
- İlaçlama faaliyetlerinde havadan değil daha kısa menzilli yem araçlarının kullanılması,
- İlaçlamalarda su kaynaklarına ulaşımının engellenmesi için gerekli tedbirlerin alınması,

- Rüzgârlı havalarda taşınma ihtimalinin artmasından dolayı ilaçlama faaliyetlerinde atmosfer olaylarının dikkate alınması,
- İnsanlara ve insanlar tarafından tüketilen canlılara ulaşmaması için tarımsal ürünlerde pazara ulaşmadan gerekli önlemlerin alınması.

KAYNAKLAR

- Alak, G., Sönmez, A.Y. ve Hisar O., 2011. Bazı Pestisitlerin Balıkların Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Dergi., 42 (1): 91-93.
- Amdur, M.O., Doull, J. and Klassen C.D., 1991. Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. Pergamon Press, New York 1033, 565-623.
- Anonim 2010. Pestisit. tr.wikipedia.org/wiki/Pestisit. (25.05.2015).
- Anonim 2015. <http://tip.baskent.edu.tr>. Hayvan Modelleri: Molekülden Hastalığa. (06.05.2015).
- Armiliato, N., Ammar D., Nezzi L., Stralioetto M., Yara M. R. and Nazari M., 2014. Changes In Ultrastructure And Expression Of Steroidogenic Factor-1 In Ovaries Of Zebrafish *Danio Rerio* Exposed To Glyphosate. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 77:405–414.fwebster
- Arslan, N., 2013. Hamsi (*Engraulis Encrasicolus*) ve Mezgit (*Merlangius Merlangus Euxinus*) Balıklarının Solungaç Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.128s.
- Atasayar, Z., 2011. Zebra Balığı'nda (*Denio reio*) Peroksiredoksin 6 geni rs 41055489 Polimorfizminin Antioksidatif Göstergeler Ve Ağır Metal Düzeyleriyle İlişkisi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Tezi. 123s.
- Begum, G., 2004. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. Aquat. Toxicol. 66, 83–92.
- Benbrook, C., 2001. "Do GM crops mean less pesticides use", Pesticide Outlook, Ekim, Royal Society of Chemistry, 204-207.
- Beydemir, Ş. and Gülçin İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19, 193-197.
- Beydemir, Ş., Aksakal, E., Alim, Z., Erdoğan, O. and Ceyhun, S.B., 2011. The Effects of Stocking Density on CYP 450 1A Gene Expression and Carbonic Anhydrase Enzyme Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fresenius Environmental Bulletin 20 (6), 1452-1457.
- Billsson, K., Westerlund, L., Tysklind M. and Olsson P.E., 1998. Developmental disturbances caused by Polychlorinated biphenyls in Zebrafish (*Brachydanio rerio*). Marine Environmental Research, 46, 461-464.
- Boran, H., 2012. Nanopartiküllerin zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları üzerine olan etkilerinin gen ekspresyon yöntemiyle belirlenmesi Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği A.B.D. Doktora Tezi.79s.
- Brausch, J.M. and Smith, P. N., 2007 Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52 (2), 217–221.

- Bretau, S., Lee, S. and Guo, S., 2004. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26: 857–864. DOI:10.1016/j.ntt.2004.06.014.
- Camargo, M.P. and Martinez, C.B.R., 2006, Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 61-69.
- Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III and IV are present in human esophageal epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45, 35- 40.
- Castilhos Ghisi, N. and Cestari, M. M., 2013. Genotoxic effects of the herbicide Roundup in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. *Environ. Monit. Assess.* 185 (4), 1–7.
- Cavalcante, D., Martinez, C. and Sofia, S., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 655 (1), 41–46.
- Cavalli, V.L.L.O., Cattani, D., Heinz Rieg, C.E., Pierozan, P., Zanatta, L., Parissoto, E.B., Filho, D.W., Mena Barreto Silva, F.R., Pessoa-Pureur, R. and Zamoner, A., 2013. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rats testis and Sertoli cells. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 335–346.
- Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Erdoğan, O. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 97, 177-181
- Chan, P.O. and Mahler, J.F., 1992, NTP technical report on toxicity studies of glyphosate (CAS no.1071-83-6) administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. National Toxicology Program Toxicity Report Series no.16, 92-3135.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y. and Carter, N., 2000. The Carbonic Anhydrase-New Horizons. *Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., pp. 2165-2204, McGraw-Hill, Inc., Newyork.
- Christie, K.N., Thomson, C., Xue, L.Z., Lucocq, J.M. and Hopwood, D., 1997.
- Çavaş, T. and Könen, S., 2007. “Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay”, *Mutagenesis*, 22, 4, 263-268.
- Çoban, T.A., Beydemir, S., Gülcin, İ., Ekinçi, D., Innocenti, A., Vullo, D. and Supuran, C.T., 2009. Sildenafil is a strong activator of mammalian carbonic anhydrase isoforms I–XIV. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.*
- Daruich, J., Zirulnik, F. and Gimenez, M.S., 2001, Effect of herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environmental Research* 85 (Section A), 226-231.
- De Roos, A.J., Blair, A., Rusiecki, J.A., Hoppin, J.A., Svec, M., D'os, emeci, M., Sandler, D.P. and Alavanja, M.C., 2005, Cancer incidence among glyphosate exposed pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ. Health Perspect.* 113, 49-54.

- Delen, N., Durmusoğlu, E., Günçan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak A., 2005. Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalinti ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi, 629-648.
- Doğan, Y., 2015. Model Organizmalar. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s_model.pdf (01.06.2015).
- Dooley, K. and Zon, L.I., 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10, 252-256.
- Duan, J., Yu, Y., Shi, H., Tian, L., Guo, C., Huang, P., Zhou, X., Peng, S. and Sun Z., 2013. Toxic Effects of Silica Nanoparticles on Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS ONE* 8(9): e74606.
- Durmuş, D., 2009. DDVP’nin (Dichlorvos) Subletal Dozlarının Galleria mellonella L.’nin Protein, Lipit ve Karbonhidrat Düzeyine Etkileri. Y. Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye.
- Egemen, Ö., 2000. Çevre ve su kirliliği. Ege Üniversitesi Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi Yayın No: 42, İzmir.
- Ekici, A., 2007. Döllenmiş Zebra Balığı (Danio rerio (Hamilton, 1822)) Yumurtalarına gen (GFP) transferi üzerinde bir araştırma. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- El-Shebly, A.A. and El-kady, M.A.H., 2008. Effects of Glyphosate Herbicide on Serum Growth Hormone (GH) Levels and Muscle Protein Content in Nile Tilapia (Oreochromis Niloticus L.), *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, 3(2): 84-88.
- Fernanda Moreira Lopes, F.M., Juniora, A.S.V., Corcinib, C.D., Cardoso da Silvae, A., Guazzellid, V.G., Tavaresd, G. And Eduardo da Rosa, C., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish Danio rerio, *Aquatic Toxicology*. 155 322–326.
- Ferreira, D., Costa da Motta, A., Kreutz, L. C., Toni, C., Loro, V. and Barcellos, L., 2010. Assessment of oxidative stress in Rhamdia quelen exposed to agrichemicals. *Chemosphere*. 79 (9), 914–921.
- Fresht, A., 1999. Structure and mechanism in protein science, W.H. Freeman and Company, New York, ABD.
- Giesy, J. P., Dobson, S. and Solomon, K. R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35–120.
- Gilmour, K. M., Thomas K., Esbaugh A. J. and Perry S.F., 2009. Carbonic anhydrase expression and CO₂ excretion during early development in zebrafish Danio rerio. *The Journal of Experimental Biology* 212, 3837-3845.
- Gilreath, J.P., Chase, C.A. and Locascio, S.J., 2000. Influence of sub-lethal glyphosate rates on leaf mineral concentration of tomato. *HortScience* 35, 1078-1082.
- Gimeno, L., Ferrando, M.D., Sanchez, S., Gimeno, L.O. and Andreu, E., 1995. Pesticide effects on eel metabolism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 153–157.
- Gökçe, B., 2014. Zebra balığından (Danio rerio, Cyprinidae, Teleostei) primer hepatosit kültürü eldesi ve bazı zehirsizleştirme enzimleri aktivasyonunda kullanılması İncelenmesi Ege Üniversitesi Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Yüksek Lisans Tezi. 104s.
- Griffitt, R.J., Weil R., Hyndman K.A., Denslow N. D., Taylor D. and Barber D. S., 2007. Exposure to Copper Nanoparticles Causes Gill Injury and Acute Lethality in Zebrafish (Danio rerio). *Environ. Sci. Technol.* 41 (23), pp 8178–8186.

- Guilherme, S., Gaivao, I., Santos, M. and Pacheco, M., 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®, A glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 2010, 25 (5), 523–530.
- Harayashiki, C.A.Y., Varela Junior, A.S., Machado, A.A.S., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Bianchini, A. and Corcini, C.D., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat. Toxicol.* 142–143, 176–184.
- Hewett-Emmett, D., 2000. Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. In: Chegwidde WR, Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases-New horizons*. Basel: Birkhauser Verlag, pp 29–78.
- Hilvo, M., 2005. Expression studies on carbonic anhydrase IX. Master's thesis, Institute of Medical Technology, University of Tampere.
- Inoue, M.H., Oliveira Jr. R.S., Regitano, J.B., Tormena, C.A., Tornisiello, V.L., Constantin, J., 2003. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná, *Planta Daninha*, 21, 313-323.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S. and Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *ScienceAsia* 28, 121-127.
- Kaellqvist, T. and Romstad R., 1994. Effects of agricultural pesticides on planktonic algae and cyanobacteria - examples of interspecies sensitivity variations. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences Supplement* 0(13):117-131.
- Karaman, S. ve Gökalp, Z., 2010. Küresel Isınma ve İklim Değişikliğinin Su Kaynakları Üzerine Etkileri. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi* 3 (1): 59-66.
- Kılınç, N., 2011. Karbonik Anhidraz I Ve II İzoenzimlerinin Koyun Midesinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. 118s.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F., 1995. "Stages of embryonic- development of The zebrafish", *Developmental Dynamics*, 203: 253-310
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E.A., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Glassmeyer, S.T., 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment* 354, 191-197.
- Langiano, V.C. and Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*, *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 222-231.
- Le Mer, C., Roy, R. L., Pellerin, J., Couillard, C. M. and Maltais, D., 2013. Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 174–181.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S. and Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquat. Toxicol.* 48, 561–571.
- Lonnerholm, G., Selking, O. and Wistrand, P.J., 1985. Amount and distribution of carbonic-anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract. *Gastroenterology*, 88, 1151-1161.

- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental*
- McEwen, F.L. and Stephenson, G.L., 1979. The use and significance of pesticides in the environment, John Wiley & Sons Pub., New York 538.
- Nishimori, I., 2004. Acatalytic CAs, carbonic anhydrase related proteins, in carbonic anhydrase, its inhibitors and activators. (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL. 24-43.
- Okayi, R.G., Annune, P.A., Tachia, M.U. and Oshoke, O.J., 2010. Acute Toxicity Of Glyphosate On *Clarias Gariepinus* fingerlings, *Journal Of Research In Forestry, Wildlife And Environment*, 155pp
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusomoto, W., Zhu, X.L. and Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase IV role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, (315-312).
- Olsson, P.E., Westerlund, L., Teh S.J., Billsson, K., Berg A.H., Tysklind, M., Nilsson, J., Eriksson L.O. and Hinton D.E., 1999. Effects of maternal exposure to estrogen and PCB on different life stages of Zebrafish (*Danio rerio*). *Ambio*, 28, 100-106.
- Öncüer, C., 2004. Pestisitler. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları V. Baskı. Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları No:19, Aydın, 424-425.
- Parkkila, S. and Parkkila, A.K., 1996. Carbonic anhydrase in the elementary tract-roles of the different isoenzymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. *Scandinavian Journal of Biological Gastroenterology*, 31, 305-317.
- Parlak, H., Arslan, Ö., Boyacıoğlu, M. ve Karaaslan, M., 2009. Ekotoksikoloji. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yayınları No: 79 Ders Kitabı Dizini No: 39.
- Parvez, S. and Raisuddin, S., 2006. Effects of paraquat on the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch): non- enzymatic antioxidants as biomarkers of exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 50: 392–397. DOI: 10.1007/s00244-005-5083-4.
- Perkins, P.J., Boermans, H.J. and Stephenson, G.R., 2000, Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo tetragonosis assay-*Xenopus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 940-945.
- Primel, E.G., Zanella, R., Kurz, M.H.S., Gonç, alves, F.F., Machado, S.O. and Marchezan, E., 2005. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigadona região central do Estado do Rio Grande de Sul. Brasil: Predição teórica e monitoramento. *Quím. Nova* 48 (4), 605–609.
- Pulatsü, S., Topçu, A. ve Atay, D., 2014. Su Kirlenmesi ve Kontrolü. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayın: 1617 Ders Kitabı:569. s.384.
- Raisanen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, P.L. and Vaananen, H.K., 1999. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB Journal*, 13, 513-522.
- Rodrigues, B.N. and Almeida, F.S., 1998, *Guia de Herbicidas*, fourth ed. Londrina, Parana, Brasil, pp. 137-142.
- Romano, M.A., Romano, R.M., Santos, L.D., Wisniewski, P., Campos, D.A., Souza, P.B., Vlau, P., Bernardi, M.M., Nunes, M.T. and Oliveira, C.A., 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Reprod. Toxicol.* 86, 663–673.

- Sancho, E., Cero' n, J.J. and Ferrando, M.D., 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 81–86.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Ferna' ndez, C. and Andreu, E., 1998. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 168–175.
- Sandrini, J.Z., Rola, R.C., Lopes, F.M., Buffon, H.F., Freitas, M.M., Martins, C.M.G. and Carlos Eduardo da Rosa., 2013. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies, *Aquatic Toxicology* 130– 131 (2013) 171– 173.
- Savitz, D.A., Arbuckle, T., Kaczor, D. and Curtis K.M., 1997, Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol* 146:1025-1036.
- Simonato, J.D., Guedes, C.L.B. and Martinez, C.B.R., 2007, Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 112-120.
- Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., Silva, L.B.D., Ritter, F. and Bedin, A.C., 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.
- Stephensen, E., Sturve, J. and Förlin, L., 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol., C* 133: 435–442. DOI: 10.1016/S1532-0456(02)00129-1.
- Sugrue, M.F., 2000. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research* 19 (1), 87-112.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2000. *Eur. J. Med. Chem.* 35, 867.
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 1: 61-97.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. and Conway, J., 2004. Carbonic anhydrase its inhibitors and activators. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Szarek, J., Siwicki, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E. and Banaszkiwicz, T., 2000. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Environ. Res.* 50, 263-266.
- Şişman, T. ve Geyikoğlu F., 2010. PCB 126'ya maruz kalmış Zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarındaki sensorimotor hasarlar. *Tübav Bilim Dergisi*, Cilt: 3, Sayı:1, 61-66 s.
- Takahashi, M., Horie, M. and Aoba, N., 2001, Analysis of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in agricultural products by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42:304-308.
- Tate, T.M., Spurlock, J.O., Christian, F.A., 1997, Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. *Arch Environ Contam Toxicol.* 33:286-9.
- Therapeutics, 130, 26.
- Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E.M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kılınç, N., Erdoğan, O. and Ceyhun, S.B., 2014. Effect of

- glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. Published by Elsevier Inc. 0147-6513.
- Tsui, M.T.K. and Chu, L.M., 2003, Aquatic toxicity of glyphosatebased formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189-1197.
- Tsui, M.T.K. and Chu, L.M., 2004, Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous sediment porewater exposures, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 316-323.
- Webster, T.M.U., Laing, L.V., Florance, H. and Santos, E.M., 2014. Effects of glyphosate and its formulation, Roundup, on reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48, 1271–1279.
- Webster, T.U.M., Laing, L.V., Florance, H. and Santos, E.M., 2013. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Science & Technology*. 48, 1271–1279.
- Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Willey, J.B. and Krone, P.H., 2001. Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos, *Aquatic Toxicology*, 54(1-2): 113-123.
- Williams, G.M., Kroes, R. and Munro, I.C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.* 31, 117–165.
- Yıldız, H., 2015. Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın farklı dokularında telomeraz enzimi aktivitesi ölçümü İncelenmesi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Yüksek Lisans Tezi.35s.
- Yousef, M.I., Salem, M.H., Ibrahim, H.Z., Helmi, S., Seehy, M.A. and Bertheussen, K., 1995. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *J. Environ. Sci. Health* 30, 513–534.
- Zon, L.I., 1999. Zebrafish: a new model for human disease. *Genome Research*, 9, 99-100.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimi Trabzon'da tammladı. 2009 yılında girdiği Sinop Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde 2012 yılında mezun oldu. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Tezli Yüksek Lisans eğitimine başladı ve halen devam etmektedir.