**T.C.**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# KUİNKLORAK HERBİSİTİNİN ERGİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*, Hamilton 1822) SOLUNGAÇ DOKUSU ÜZERİNDE GENOTOKSİSİTESİ VE ROSMARİNİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİ

**KEZBAN YILDIRIM**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fulya Dilek GÖKALP**

**EDİRNE-2024**

**Kezban YILDIRIM'ın** hazırladığı "**KUİNKLORAK HERBİSİTİNİN ERGİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*, Hamilton 1822) SOLUNGAÇ DOKUSU ÜZERİNDE GENOTOKSİSİTESİ VE ROSMARİNİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİ**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

| Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad): | İmza |
|---|---|
| Prof. Dr. Fulya Dilek GÖKALP | …… |
| Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR | …… |
| Prof. Dr. Utku GÜNER | …… |
| Prof. Dr. Cenk ARAL | …… |
| Prof. Dr. Elife Zerrin BAĞCI | …… |

Tez Savunma Tarihi: 27/12/2024

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

PROF.DR. FULYA DİLEK GÖKALP

Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……..……

Doç. Dr. Filiz UMAROĞULLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI**

**DOĞRULUK BEYANI**

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

27 /12 /2024

*Kezban YILDIRIM*

*İmza*

Doktora Tezi

Kuinklorak Herbisitinin Ergin Zebra Balığı (*Danio rerio,* Hamilton 1822) Solungaç Dokusu Üzerinde Genotoksisitesi ve Rosmarinik Asitin Koruyucu Etkisi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

# ÖZET


Dünyada pestisitler içerisinde en fazla herbisitlerin kullanıldığı bilinmektedir. Ülkemizde de herbisit kullanımı her geçen gün artmakta ve bu artışla birlikte herbisitlerin çevre ve canlı organizmalar üzerindeki olumsuz etkileri de buna bağlı olarak artış göstermektedir. Kinolin karboksilik asit türevi olan kuinklorak (3,7-dikloro-8-kinolinkarboksilik asit); yeni, seçici bir oksin grubu herbisit olup, pirinç, çim alanları, buğday ve kimyasal nadasta kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, kuinklorak herbisitinin Zebra balığı üzerinde muamelesi ile solungaç dokularında, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) yöntemiyle DNA hasarı ve Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile antioksidan, oksidatif stres, gen onarımı, ısı şoku, hücre döngüsü kontrolü, apoptoz yolağı gibi belirli hücre savunma sistemlerinin etki mekanizmasının ortaya çıkarılması ve biberiye bitkisinden elde edilen Rosmarinik Asit'in (RA) kuinklorak herbisitinin toksik etkisine karşı koruyucu etki değerlendirilmesinin yapılması, kuinklorak herbisitinin doku üzerinde genotoksik etkisi ile RA'nın arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır. Zebra balıkları, kuinklorak herbisitinin ön çalışma sonrası belirlenen $LC_{50}$ 96 saat değerinin katlar halinde azalan konsantrasyonları ile sırasıyla 177,00 mg/L, 88,50 mg/L, 44,25 mg/L ve 100 µM RA ayrı ayrı ve en yüksek kuinklorak konsantrasyonu ile birlikte 100 µM RA+ 177,00 mg/L 48 saat boyunca muamele edilmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde RAPD profillerinde kuinklorak maruziyeti sonrası tespit edilen göstergeler, yüzde genomik kalıp kararlılığında (% GKK) değişim olduğunu

göstermiştir. Kuinklorak maruziyeti sonrası en yüksek test konsantrasyonunda antioksidan (Cu-Zn SOD, Mn-SOD, GPX, GST, MT2), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF2), ısı şok proteini (HSP70), hücre döngüsü kontrol noktası ($P21^{Kip1}$ ve $P27^{Kip1}$), DNA tamir (XPA, XPC ve XRCC3) ve apoptoz yolağı (P53, BAX, Kaspaz 3, Sitokrom C) genleri ifade düzeylerinde artış tespit edilmiştir. RA'nın en yüksek test konsantrasyonu ile birlikte uygulandığı muamele sonrası, kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak, kuinklorak maruziyetinin Reaktif Oksijen Türleri (ROT) oluşumunu arttırmış olabileceğinden antioksidan savunma sistemi gen ifadelerinde artışa neden olduğu, DNA hasarını indüklediği, hücre döngüsü ilerlemesini kesintiye uğrattığı, DNA onarım sistemi gen ifadelerini arttırdığı, apoptotik yolağı tetiklediği tespit edilmiştir. RA'nın kullanıldığı test gruplarında, antioksidan etki mekanizmasına bağlı olarak, hücreleri toksik etkiden koruyarak sağkalımı indüklediği tespit edilmiştir.

Yıl :2024

Sayfa Sayısı :149

Anahtar Kelimeler :Kuinklorak, Apoptoz, Rosmarinik Asit, Gen İfadesi, Reaktif Oksijen Türleri, Antioksidan Gen, Hücre Döngüsü, DNA Tamir, Zebra Balığı

Doctorate Thesis
Genotoxicity of Quinclorac Herbicide and Protective Effect of Rosmarinic Acid on Gill Tissue of Adult Zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822)
Trakya University Institute of Natural Sciences
Department of Biology

# ABSTRACT

It is known that herbicides are used the most among pesticides in the world. In our country, the use of herbicides is increasing day by day and with this increase, the negative effects of herbicides on the environment and living organisms increase accordingly. Quinclorac (3,7-dichloro-8-quinolinecarboxylic acid), a quinolone carboxylic acid derivative, is a new, selective auxin group herbicide used in rice, turf, wheat and chemical fallow.

In this study, DNA damage by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method and antioxidant, oxidative stress, gene repair, heat shock, cell cycle control by Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) in gill tissues of Zebrafish treated with quinclorac herbicide. It was aimed to reveal the mechanism of action of certain cell defense systems such as apoptosis pathway, to evaluate the protective effect of Rosmarinic acid (RA) obtained from rosemary plant against the toxic effect of quinclorac herbicide, and to reveal the relationship between genotoxic effect of quinclorac herbicide on tissue and RA. Zebrafish were treated with 177.00 mg/L, 88.50 mg/L, 44.25 mg/L and 100 µM RA separately and 100 µM RA+ 177.00 mg/L together with the highest quinclorac concentration for 48 hours with decreasing concentrations of quinclorac herbicide in multiples of the $LC_{50}$ 96 h value determined after the preliminary study.

When the results were evaluated, the indicators detected in RAPD profiles after quinclorac exposure showed a change in percent genomic pattern stability (% GST). The expression levels of antioxidant (Cu-Zn SOD, Mn-SOD, GPX, GST, MT2), insulin-like growth factor (IGF2), heat shock protein (HSP70), cell cycle checkpoint (P21Kip1 and P27Kip1), DNA repair (XPA, XPC and XRCC3) and apoptosis pathway (P53, BAX,

Caspase 3, Cytochrome C) genes increased after quinclorac exposure at the highest test concentration. After treatment with the highest test concentration of RA, results similar to the control group were obtained.

As a result, it was determined that quinclorac exposure caused an increase in antioxidant defense system gene expressions, induced DNA damage, interrupted cell cycle progression, increased DNA repair system gene expressions, and triggered apoptotic pathway since it may have increased ROS formation. In the test groups in which RA was used, it was found to induce survival by protecting cells from toxic effects due to its antioxidant mechanism of action.

Year :2024
Number of Pages :149
Keywords :Quinclorac, Apoptosis, Rosmarinic Acid, Gene Expression, Reactive Oxygen Species, Antioxidant Gene, Cell Cycle, DNA Repair, Zebrafish

# TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmamda bana güvenip bu yola benimle çıkmayı kabul eden, bilgi, birikim ve tecrübelerini benimle paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen, neredeyse üniversite hayatım boyunca birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Fulya Dilek GÖKALP'e çok teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan ve tezin her türlü ayrıntısı ile yakından ilgilenen, bilgi ve tecrübeleriyle teze yeni yaklaşımlar katan hocalarım Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR'a ve Prof. Dr. Utku GÜNER'e teşekkür ederim**.**

2020/148 numaralı TÜBAP projesindeki desteklerinden dolayı Trakya Üniversitesi'ne çok teşekkür ederim.

Çalışmaların bir kısmının yürütüldüğü, donanım ve bilgisini hiç esirgemeyen, daima pozitif yaklaşımlarıyla manevi olarak da katkısı olan Trakya Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Oğuzhan DOĞANLAR'a ve asistanlarından Ayşe Kardelen KURTDERE'ye çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitim sürecinde her türlü sorunumuzu çözmek için uğraşan başta Enstitü Müdürü Doç. Dr. Filiz UMAROĞULLARI olmak üzere tüm Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini ve pozitifliğini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Mitat AYDOĞDU'ya gerek tez çalışmalarım sırasında gerekse sosyal hayatta her zaman yanımda olan ve destek veren dostum Dr. Martin KANEV'e teşekkür ederim.

Bana her konuda sonuna kadar destek veren ve bugünlere gelmemde kuşkusuz en büyük paya sahip olan aileme, eşim Metin YILDIRIM ve canım kızım Gökçe YILDIRIM'a en içten teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunar, bu tezi onlara ithaf ederim.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... iv
ABSTRACT ..... vi
TEŞEKKÜR ..... viii
İÇİNDEKİLER ..... ix
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... xviii
BÖLÜM 1 ..... 1
GİRİŞ ve AMAÇ ..... 1
BÖLÜM 2 ..... 3
GENEL BİLGİLER ..... 3
2.1. Pestisitler ..... 3
2.1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması ..... 5
2.2. Herbisitler ..... 6
2.2.1. Oksin Herbisit Ailesi ..... 6
2.2.1.1. Kuinklorak ..... 8
2.3. Zebra Balığı Genel Özellikleri ..... 9
2.3.1. Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları ..... 10
2.3.1.1. Solungaç Yapı ve İşlevleri ..... 11
2.4. Antioksidan Savunma Sistemi ve Genleri ..... 12

2.4.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ..... 12
2.4.1.1. Serbest Radikaller ..... 12
2.4.2.Antioksidanlar ..... 15
2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) ..... 16
2.4.2.2. Katalaz (KAT) ..... 17
2.4.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GPX) ..... 18
2.4.2.4. Glutatyon S-Transferaz (GST) ..... 20
2.4.2.5 Metallotiyonin Geni (MT2) ..... 21
2.5. Rosmarinik Asit (RA) ..... 23
2.6. Isı Şok proteinleri (HSP) ..... 24
2.6.1. HSP70 ..... 25
2.7. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Geni 2 (IGF 2) ..... 25
2.8. Deoksiribonükleik Asit (DNA) Onarım Genleri ..... 26
2.8.1. DNA Yapısı ..... 26
2.8.2. DNA Hasarı ve Onarımı ..... 27
2.8.2.1.Baz Kesip Çıkarma Onarımı ..... 28
2.8.2.2. Nükleotid Kesip Çıkarma Onarımı ..... 28
2.8.2.2.1. XPC Geni ..... 30
2.8.2.2.2. XPA Geni ..... 30
2.8.2.3. Çift Zincir Kırıklarının Onarımı ..... 30
2.8.2.3.1. X-Ray Onarımı Çapraz Tamamlayıcı Gen 3 (XRCC3) ..... 31
2.8.2.4. Hatalı Eşleşme Onarımı (MMR) ..... 31
2.8.3. Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Genleri ..... 31
2.8.4. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri ..... 33
2.8.4.1. Cip/Kip Ailesi ..... 33

2.8.4.1.1. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A ($P21^{Kip1}$) ..... 33
2.8.4.1.2. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B ($P27^{Kip1}$) ..... 34
2.9. Apoptoz ..... 34
2.9.1. Dışsal Yolak (Ölüm Reseptörü Yolağı) ..... 35
2.9.2. İçsel Yolak (Mitokondriyal Yolak) ..... 36
2.10.Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) ..... 38
2.11. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) ..... 39
BÖLÜM 3 ..... 40
MATERYAL VE METOT ..... 40
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Adaptasyonu ..... 40
3.2.Deneyde Kullanılan Herbisit Konsantrasyonlarının Ön Çalışma ile Belirlenmesi $LC_{50}$ Deneyleri ..... 40
3.3. Deneysel Çalışma ..... 41
3.3.1. Deney Grupları ..... 41
3.4. DNA Ekstraksiyonu ve Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Analizi ..... 42
3.4.1. DNA Ekstraksiyonu ..... 42
3.4.2. RAPD Yöntemi ..... 43
3.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi ..... 44
3.4.4. Genomik Kalıp Kararlılığı (GKK) ..... 44
3.5. Ribonükleik Asit (RNA) Analizi ..... 45
3.5.1. RNA Miktarının Belirlenmesi ve Tamamlayıcı DNA (cDNA) Eldesi ..... 45
3.5.2. cDNA Eldesi ..... 46
3.6. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Çalışmaları ..... 46
3.7. İstatistik Analizler ..... 49
BÖLÜM 4 ..... 50

SONUÇLAR ..... 50
4.1. Kuinklorak Herbisitinin $LC_{50}$ Konsantrasyonu Probit Analizi ..... 50
4.2. RAPD Sonuçları (Toplam DNA Hasarı) ..... 51
4.3. Gen İfadesi Sonuçları ..... 54
4.3.1. Antioksidan Enzimler ..... 54
4.3.1.1. Katalaz ..... 54
4.3.1.2. CuZn-SOD ..... 55
4.3.1.3. Mn-SOD ..... 56
4.3.1.4. GST ..... 57
4.3.1.5. GPX ..... 58
4.3.1.6. MT2 Gen İfadesi ..... 59
4.3.2. HSP 70 Gen İfadesi ..... 60
4.3.3. IGF 2 Gen İfadesi ..... 61
4.3.4. DNA Tamir Gen İfadeleri ..... 62
4.3.4.1. XPC Gen İfadesi ..... 62
4.3.4.2. XPA Gen İfadesi ..... 63
4.3.4.3. XRCC3 Gen İfadesi ..... 64
4.3.5. Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Gen İfadeleri ..... 65
4.3.5.1. $P21^{Kip1}$ Gen İfadesi ..... 65
4.3.5.2. $P27^{Kip1}$ Gen İfadesi ..... 66
4.3.6. Apoptoz Yolağı Gen İfadeleri ..... 67
4.3.6.1. P53 Gen İfadesi ..... 68
4.3.6.2. BAX Gen İfadesi ..... 68
4.3.6.3. BCL2 Gen İfadesi ..... 69
4.3.6.3.1. BCL2/BAX Oranı ..... 70

4.3.6.4. Sitokrom C Gen İfadesi.....71
4.3.6.5. Kaspaz 3 Gen İfadesi .....71
4.3.6.6. Rosmarinik Asidin Etkisi……73
BÖLÜM 5 .....75
TARTIŞMA .....75
KAYNAKLAR .....94
ÖZGEÇMİŞ .....126
EKLER……..127

# ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Pestisitlerin ayrıntılı sınıflandırılmasının gösterimi (Parra-Arroyo et al., 2022). ..... 5

Şekil 2.2. Kuinklorak'ın kimyasal yapısı (Tian et al., 2020). ..... 9

Şekil 2.3. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi ..... 20

Şekil 2.4. Rosmarinik Asitin Molekül Yapısı (Vural et al., 2021)..... 23

Şekil 4.1. Herbisit muamelesi sonucu farklı primerlere ait RAPD profilleri. ..... 52

Şekil 4.2. Balık solungaç dokusunda meydana gelen % GKK değişimleri ..... 54

Şekil 4.3. KAT gen ifadesinde meydana gelen değişimler. ..... 55

Şekil 4.4. CuZn-SOD gen ifadesinde meydana gelen değişimler. ..... 56

Şekil 4.5. Mn-SOD gen ifadesinde meydana gelen değişimler. ..... 57

Şekil 4.6. GST gen ifadesinde meydana gelen değişimler ..... 58

Şekil 4.7. GPX gen ifadesinde meydana gelen değişimler ..... 59

Şekil 4.8. MT2 gen ifadesinde meydana gelen değişimler ..... 60

Şekil 4.9. HSP70 gen ifadesinde meydana gelen değişimler ..... 61

Şekil 4.10. IGF2 gen ifadesinde meydana gelen değişimler ..... 62

Şekil 4.11. XPC gen ifadesinde meydana gelen değişimler..... 65

Şekil 4.12. XPA gen ifadesinde meydana gelen değişimler ..... 65

Şekil 4.13. XRCC3 gen ifadesinde meydana gelen değişimler ..... 65

Şekil 4.14. $P21^{Kip1}$ gen ifadesinde meydana gelen değişimler. ..... 66

Şekil 4.15. $P27^{Kip1}$gen ifadesinde meydana gelen değişimler ..... 67

Şekil 4.16. P53 gen ifadesinde meydana gelen değişimler ..... 68

Şekil 4.17. BAX gen ifadesinde meydana gelen değişimler.....69
Şekil 4.18. BCL2 gen ifadesinde meydana gelen değişimler.....70
Şekil 4.19. Sitokrom C gen ifadesinde meydana gelen değişimler.....71
Şekil 4.20. Kaspaz 3 gen ifadesinde meydana gelen değişimler.....72
Şekil 4.21.Rosmarinik Asitin Etkisi……73

# ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Etki ettikleri organizmaya göre sınıflandırılması .....5

Çizelge 2.2. Herbisitlerin etki aşamaları (Long et al., 2013). .....6

Çizelge 2.3. Herbisit amaçlı kullanılan oksin grubu herbisitler.[(*): Türkiye'de ruhsatlı olarak kullanılan herbisitler, (-): Türkiye'de ruhsatlı olmayan herbisitler (TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, 2024). .....8

Çizelge 2.4. Kuinklorak herbisitinin özellikleri (Pesticides & Authority, 2005).....9

Çizelge 2.5. Oksidan Kaynakları (Hamdallah et al., 2014). .....13

Çizelge 2.6. Oksidanlar (Akkus, 1995). .....14

Çizelge 2.7. Nükleotid Kesip Çıkarma Onarımı sisteminde görev alan bazı genlerin lokalizasyon ve fonksiyonları .....29

Çizelge 3.1. RAPD'de Kullanılan Primerler ve Sekansları .....43

Çizelge 3.2. cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve miktarları. .....46

Çizelge 3.3. qRT-PCR'da Kullanılan Genler ve Sekansları .....47

Çizelge 3.4. qRT-PCR Döngüsü. .....48

Çizelge 4.1. 300-370 mg/L Kinklorak (Faset ®) muamelesi sonrası, 24-96 saat aralığında elde edilen veri tablosu……50

Çizelge 4.2. RAPD profillerinde yeni oluşan ve kaybolan bantların moleküler büyüklükleri (baz çifti)……52

Çizelge 4.3. RAPD profillerinde yeni oluşan ve kaybolan bantların sayısı……53

Çizelge 4.4. Balık solungaç dokusunda herbisit uygulamasına bağlı % GKK' de meydana gelen değişimler……..53

Çizelge 4.5.BCL2/BAX Oranı…….....70
Çizelge 4.6. Rosmarinik asit uygulaması sonrası % değişim. ……73
Çizelge 4.7.Gen ifadelerindekideğişimler……...74

# SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|---|
| A | Adenin |
| ADP | Adenozin difosfat |
| AIF | Apoptoz İndükleyici Faktör |
| AP | Apirimidik veya Apürinik Bölge |
| af-1 | Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 |
| APE | AP Endonükleaz |
| ATP | Adenozin Tri Fosfat |
| BAD | BCL2 İlişkili Ölüm Promotörü |
| BAK | BCL2 Homolog Antagonisti |
| BAX | BCL2 İlişkili X Protein |
| BCL2 | B Hücreli Lenfoma-2 |
| BER | Baz Kesip Çıkarma Onarımı |
| °C | Santigrad Derece |
| C1 | 177,00 Mg/L Kuinklorak |
| C2 | 88,50 Mg/L Kuinklorak |
| C3 | 44,25 Mg/L Kuinklorak |
| Cd | Kadmiyum |
| CD95/Fas/Apo1 | Farklılaşma Kümesi 95/Fas/Apoptoz Antijeni 1 |
| CDK | Siklin Bağımlı Kinaz |
| cDNA | Tamamlayıcı DNA |
| CKI | Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör Proteinleri |
| cm | Santimetre |
| Cu | Bakır |
| $Cu^{+2}$-$Zn^{+2}$-SOD | Bakır Çinko Süper Oksit Dismutaz |
| DDR | DNA Hasarı Cevabı |
| DDT | Diklorodifeniltrikloroetan |

| | |
|---|---|
| DISC | Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi |
| dk | Dakika |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| DNA | Deoksiribonükleikasit |
| DNaz | Deoksiribonükleazlar |
| DR | Ölüm Reseptörü |
| DSBR | Dna Çift Zincir Kırıklarının Onarımı |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik Asit |
| EPA | Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı |
| FAD | Flavin Adenin Dinükleotid |
| FADD | FAS İlişkili Ölüm Bölgesi Proteini |
| FAO | Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü |
| Fe | Demir |
| $Fe^{+3}$-SOD | Demir Süper Opksit Dismutaz |
| G | Guanin |
| g | Gram |
| GH | Büyüme Hormonu |
| GKK | Genomik Kalıp Kararlılığı |
| GPX | Glutatyon Peroksidaz |
| GSH | Glutatyon |
| GSSG | Okside Glutatyon |
| GST | Glutatyon S-Transferaz |
| $H_2O_2$ | Hidrojen Peroksit |
| HR | Homolog Rekombinasyonel DNA Tamiri |
| HSP | Isı Şok Proteinleri |
| IAA | İndol Asetik Asit |
| IGF | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Geni |
| IGFBP | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlanma Proteinleri |
| K | Kaybolon Bantlar |
| KAT | Katalaz |
| kDA | Kilodalton |

| | |
|---|---|
| $LC_{50}$ | Organizma Topluluğunda %50 Oranında Ölüm Oluşturan Konsantrasyon |
| mg/L | Miligram/Litre |
| ml | Mililtre |
| MMR | Hatalı Eşleşme Onarımı |
| Mn | Mangan |
| $Mn^{+3}$-SOD | Manganez Süper Oksit Dismutaz |
| MOMP | Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği |
| MÖ | Milattan Önce |
| MT2 | Metallotiyonin Geni 2 |
| NADPH | Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat |
| NER | Nükleotid Çıkarma Onarımı |
| NHEJ | Serbest Uçların Homolog Olmayan Şekilde Bağlanması |
| Ni-SOD | Nikel Süper Oksit Dismutaz |
| NO | Nitrik Oksit |
| NOS | Nitrik Oksidaz |
| $^1O_2$ | Tekil Oksijen |
| O2- | Süperoksit Anyonu |
| OH- | Hidroksil Radikali |
| OH• | Hidrojen Radikali |
| Omi/HtrA2 | Omi/Yüksek Sıcaklık Gereksinimli Protein A2 |
| $ONOO^-$ | Peroksinitrit |
| $P21^{Kip1}$ | Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1a |
| $P27^{Kip1}$ | Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1b |
| P53 | Tümör Süpresör Protein 53 |
| PCNA | Proliferatif Hücre Nükleer Antijen |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| pol β | DNA Polimeraz |
| pRb | Retinoblastom Proteini |
| qRT-PCR | Kantitatif Real Time Pcr |
| RA | Rosmarinik Asit |
| RAPD | Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Dna |

| | |
|---|---|
| RFC | Replikasyon Faktör C |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| ROOH | Lipid Hidroperoksit |
| ROT | Reaktif Oksijen Türleri |
| RPA | Replikasyon Protein A |
| rpm | Dakika Başına Dönüş Hızı |
| S | Sitozin |
| Se | Selenyum |
| SOD | Süperoksit Dismutaz |
| T | Timin |
| TAE | Tris-Asetik Asit-EDTA Karışımı |
| TNF-α | Tümör Nekroz Faktörü -A |
| TNFR1 | TNF Reseptörü 1 |
| TNFR2 | TNF Reseptörü 2 |
| TRAIL | Fas ve TNF ile İlişkili Apoptozu İndükleyen Ligand |
| UV | Ultraviyole |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |
| XPC | Kseroderma Pigmentosum Grup C Tamir Geni |
| XPA | Kseroderma Pigmentosum Grup A Tamir Geni |
| XRCC3 | X-Ray Onarımı Çapraz Tamamlayıcı Gen 3 |
| Y | Yeni Oluşan Bantlar |
| Zn | Çinko |
| ΔCt | Karşılaştırmalı Döngü Eşiği |
| µl | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |
| µS/cm | Mikrosiemens/Santimetre |

# BÖLÜM 1

# GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde tarımsal uygulamaların vazgeçilmez bir parçası haline gelen pestisit kullanmanın sonucunda ortaya çıkabilecek zirai ürünlerde kalıntı (residü) riski ve mikro/makro çevreye olan negatif etkileri dikkatle incelenmesi gereken bir konudur. Pestisitlerin çok fazla kullanımı, çevre ve insan sağlığı üzerinde birçok olumsuz etki yaratabilen önemli bir sorundur. Bu kimyasalların yoğun ve kontrolsüz kullanımı suda, gıdalarda, toprakta ve havada kalıntılarının ve dönüşüm ürünlerinin birikmesine sebep olabilir. Özellikle herbisitler, dünyada en fazla kullanılan pestisit çeşidi olarak öne çıkmaktadır. Ülkemizde de herbisit kullanımı günden güne artış göstermekte ve bu artışla birlikte herbisitlerin canlı organizmalar ve çevre üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkileri de buna bağlı olarak gün geçtikçe artmaya devam etmektedir (Topal, 2011).

Kinolin karboksilik asit türevi olan kuinklorak (3,7-dikloro-8-kinolinkarboksilik asit); yeni, seçici bir oksin grubu herbisit olup, pirinç, çim alanları, buğday ve kimyasal nadasta kullanılmaktadır (Grossmann, 1998). Ülkemizde 2019 Şubat ayında kullanım ruhsatı verilmiştir (TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, 2024). Kuinklorak konulu bilimsel çalışmalar oksidatif hasar etkisini ortaya koymaktadır. Genotoksik etki mekanizmasını tanımlayan diğer parametreler çalışılmamıştır. Bu çalışmada; toksikoloji çalışmalarında kullanılan model organizma zebra balığı *Danio rerio* solungaç dokusu üzerinde kuinklorak herbisitinin neden olduğu oksidatif hasar, DNA hasar tamiri, hücre döngüsü ve apoptoz üzerine olan etkisinin araştırılması, bu konuda eksik olan literatür açığına sucul organizma üzerinde yapılacak olan bu çalışma ile katkı sağlaması hedeflenmektedir. Bitkisel kaynaklı materyaller antioksidan aktiviteleri nedeni ile sıkça kullanılmaktadır. Biberiye bitkisinden elde edilen RA'nın kuinklorak herbisitinin neden

olabileceği oksidatif strese karşı antioksidan etki değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır.

# BÖLÜM 2

# GENEL BİLGİLER

## 2.1. Pestisitler

Pestisitler, özellikle tarım zararlılarını önlemek veya kontrol altında tutmak için kullanılan kimyasallardır (Randall et al., 2013). Tüm dünyada, mahsulün korunmasına yönelik verim artışı ve ucuz maliyeti nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2014 yılında yayınladığı Pestisit Yönetimine İlişkin Uluslararası Davranış Kuralları'na göre; Pest: Zararlı, bitkilere ve bitki ürünlerine, malzemelere ya da ortamlara zarar veren herhangi bir hayvan, bitki veya patojenik ajan türü, suşu veya biyotipi anlamındadır ve halk sağlığının bozulmasına sebep olan vektörleri içerir. Pestisit: Herhangi bir zararlıyı yok etmek, kovmak, kontrol altına almak veya bitki büyümesini düzenlemek amacıyla tasarlanmış herhangi bir madde veya biyolojik/kimyasal içerikli maddelerin karışımı anlamı taşır (FAO, 2014). EPA (Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı) tanımlamasına göre pestisit, herhangi bir haşereyi (fareler, böcekler ve diğer hayvanlar), istenmeyen bitkileri (yabani otlar) ya da mikroorganizmaları önlemeye, kovmaya, yok etmeye veya azaltmaya yönelik geliştirilen madde ve madde karışımlarıdır (Morillo & Villaverde, 2017).

Pestisitlerin, M.Ö. 2000'den bu yana ürünlerini koruyabilmek amacıyla insanlar tarafından kullanımı tercih edilmiştir. Antik Sümerler tarafından Mezopotamya'da 4500 yıl önce kullanılan kükürt, tarihte bilinen ilk pestisittir. Zararlılara karşı kullanılan zehirli bitkilerden bahseden 4000 yıllık yazıtlar bulunmaktadır (Ranga Roa et al., 2007). Özellikle II. Dünya Savaşı sonrasında dünya nüfusunun ve dolayısıyla yiyecek ihtiyacının

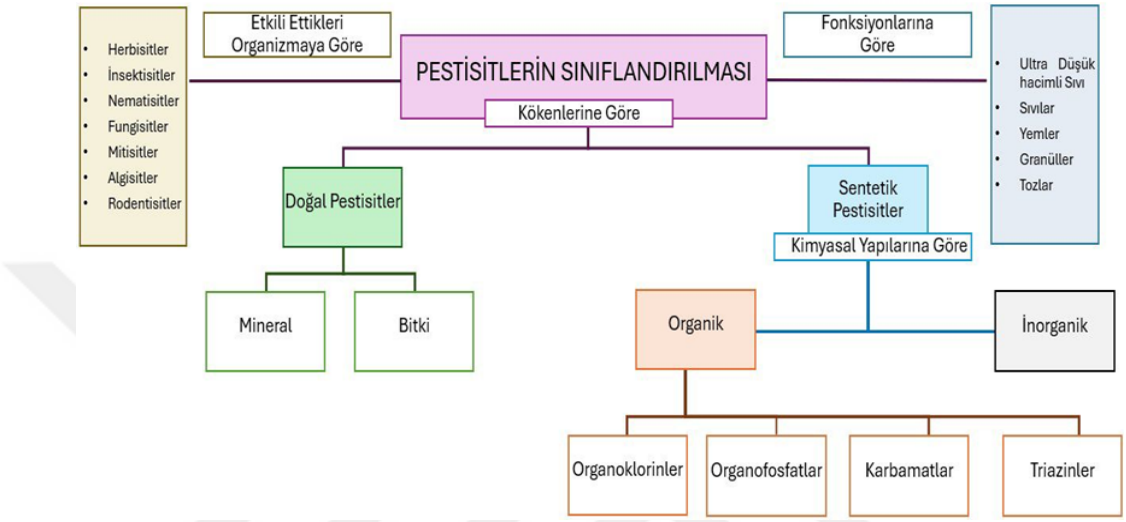
artmasıyla beraber tarımda pestisit kullanımında belirgin bir artış yaşanmıştır (Jurgens et al., 2016).

Pestisitler, bitkilere veya toprağa doğrudan uygulanamamaktadır. Bunun sebebi ise oldukça toksik maddeler olduklarından, zararlılara karşı çevre ve insan sağlığına daha az toksik olacak halde bazı yardımcı maddelerle (katı, sıvı) bir araya getirilerek karışım olarak kullanılırlar. Bu karışımı oluşturan pestisite "etken/aktif madde" denilmektedir. Her toksik madde için pestisit tanımlaması kullanılamamaktadır (DPT, 2001). Bir toksik maddenin pestisit şeklinde tanımlanabilmesi için biyoaktif, efektif, kararlı yapıda; kullanan kişiler, temas halindeki üçüncü kişi ve tüketiciler ile besi hayvanları açısından güvenilir, yabani hayat ve faydalı organizmalar açısından zararsız, çevre için kabul edilebilir ve ticarette soruna sebebiyet vermeyecek özellikte olması gerekmektedir (DPT, 2001). Pestisitler, tüm organizmalar için çeşitli biçimlerde etkilere neden olmakta ve bu çeşitlilik, uygulama sonucu hedef organizmadaki toksisite biyokimyasal zincir döngüler ile ortaya çıkmaktadır. Kimyasal maddeler iki farklı biçimde toksisiteye neden olmaktadırlar: Akut toksisite; pestisitin sadece belirli bir konsantrasyonuna maruziyet sonucunda kısa sürede oluşan ve belirgin sonuçları olan etkidir. Akut toksisite uluslararası literatürde $LC_{50}$ değeri ile ifade edilmektedir. Bir diğer deyişle $LC_{50}$ değeri, organizma topluluğundaki birey sayısının %50'sinde mortaliteye neden olan konsantrasyon olarak tanımlanabilir. $LC_{50}$ değerinin düşük konsantrasyonlarda oluşması, o bileşik için yüksek toksisiteye sahip olduğunu göstermektedir. Kronik toksisite ise uzun vadede, mortaliteye neden olacak konsantrasyon altındaki bileşiğe, birden fazla kez maruziyet sonucu oluşan toksisite durumudur (Giray Kurt, 2007; Yıldız et al., 2005).

Pestisitler; toksisiteleri, doğal ortamda uzun süre kalmaları ve biyobirikimleri açısından özellikle sucul ekosistemdeki hedef organizmalar dışındaki canlılar için ciddi tehditlere yol açmaktadır (Hashmi et al., 2020). Sucul organizmalardan özellikle balıklar, su döngüsündeki akış veya yağmur suları sonucu akuatik ortama pestisitlerin karışması ile kronik şekilde maruziyete uğrarlar. Kirleticiler de yüzey sularına hem su döngüsü hem de farklı eksojen kaynaklar nedeniyle ortama katılmaktadır (Rahman et al., 2002). Pestisitler de kirleticilere benzer şekilde çeşitli eksojen kaynaklar aracılığı ile akuatik sisteme giriş yapar ve sucul ekosistemlerde yaşayan ve asıl hedef organizmalar harici diğer organizmalar için ciddi tehdit oluştururlar (Bonifacio & Hued, 2019).

### 2.1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması

Pestisitler; kimyasal yapılarına, kullanım amaçlarına, formülasyonlarına, kökenlerine ve etki etmesi hedeflenen zararlılara göre sınıflandırılabilmektedir. Şekil 2.1'de pestisitlerin ayrıntılı olarak sınıflandırılması gösterilmiştir.




**Şekil 2.1.** Pestisitlerin ayrıntılı sınıflandırılmasının gösterimi (Parra-Arroyo et al., 2022).

En yaygın sınıflandırma şekli olan etki ettikleri organizmaya göre sınıflandırma şeklidir (Parra-Arroyo et al., 2022) (Çizelge 2.1.).

**Çizelge 2.1.** Etki ettikleri organizmaya göre sınıflandırılması

| **Pestisit sınıfı** | **Etki Ettikleri Organizmaya Göre** |
|---|---|
| Herbisitler | Yabancı Otlara Etki Eden |
| İnsektisitler | Böceklere Etki Eden |
| Fungusitler | Mantarlara Etki Eden |
| Nematisitler | Solucanlara Etki Eden |
| Algisitler | Alglere Etki Eden |
| Rodentisitler | Kemirgenlere Etki Eden |
| Mitisitler | Kenelere Etki Eden |

## 2.2. Herbisitler

Yabani ve/veya istenmeyen bitki türlerini kontrol altına almak amacı ile kullanılan pestisit türleri herbisit olarak adlandırılmaktadır (Mengüç, 2018). Etki gösterdikleri bitki türlerine göre herbisitler seçici ve seçici olmayan olmak üzere iki grupta incelenirler. Seçici olmayan herbisitler kullanıldıkları alanda tüm bitki türlerini etkilmektedirler. Seçici herbisitler ise kullanıldığı ortamdaki spesifik bitki türleri üzerinde toksik etkiye sahip olup, diğer türler için tehlike arz etmeyen herbisit türüdür. Seçici olmayan herbisitler kaynaklarda toplam yabani ot öldürücüler şeklinde tanımlamalar da bulunmaktadır (Solomon et al., 2013).

Mevcut hava koşulları herbisitlerin uygulandıkları ürün grupları üzerindeki etkinliği açısından kritik role sahiptir. Herbisit uygulama metodolojisinde sıcaklığın yanında nem/rutubet ve bitki direnci de uygulanma stratejileri bakımından önemli rollere sahiptir. En efektif kullanım için yaprağın yüzey alanının, yaprağın yüzel özelliklerinin ve en önemlisi herbisitin kimyasal özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir (Long et al., 2013). Hedef bitkisel organizmalarda etki biçimleri Çizelge 2.2'de açıklanmıştır.

**Çizelge 2.2.** Herbisitlerin etki aşamaları (Long et al., 2013).

| Etki Yolu | Etki Mekanizması |
|---|---|
| **TEMAS** | Herbisitin hedef bitkiye temas etmesi gerekir. |
| **EMİLİM** | Herbisitin hedef bitki tarafından emilmesi gerekir. |
| **HAREKET** | Herbisitin hedef bitkideki etki alanına taşınması gerekir. |
| **TOKSİSİTE** | Herbisitin hedef bitkiyi öldürmek için yeterli düzeyde toksisiteye veya güce sahip olması gerekir. |
| **ÖLÜM** | Hedef bitkide hasar oluşturarak ölümüne yol açmalıdır. |

### 2.2.1. Oksin Herbisit Ailesi

Herbisitler sadece etki gösterdikleri organizmalara göre değil aynı zamanda etki mekanizmalarına göre de sınıflandırılabilmektedir. Bu sınıflandırılmadan birisi de bu çalışmada ana deney maddelerinden biri olan kuinklorak herbisitinin dahil olduğu oksin sınıfı herbisitleridir (Çizelge2.3). "Auxin" kelimesi Yunan dilinden gelmekte olup

büyüme/artma anlamına gelen “auxano” kelimesinden türemiştir. Oksinler, bitki hormonları (fitohormon) olarak da bilinen bitki büyümesini regüle eden maddelerin ve morfojenlerin bir grubunu temsil etmektedir. Oksinlerin bitki büyümesi üzerindeki etkileri ilk olarak Hollandalı bilim insanı Frits Went’in 1926 yılındaki çalışmalarında açıklanmıştır (Ünsal, 1993). Bitkilerin doğal yapısında bulunan indol asetik asit (IAA), oksin grubuna giren bir bitki büyüme düzenleyicisidir. Oksinler grubu büyüme regülatörleri, bitki meristem yapılarında, bitkilerin genç yapraklarında, gelişme evresindeki meyve ve tohumlarda üretildikten sonra hedef doku ve bitki organlarına polar taşınma ve/veya floem boruları yardımı ile iletilirler. Oksinin, fizyolojik olarak hücrelerin bölünme ve büyümesi için gerekli enerjinin sağlanması; dokularda oksinin fazla birikimi sonucu büyümeyi redükte eden etilen sentezi; bazı bitkilerin meyve gelişimini indükleme ve meyve olgunlaşmasını geciktirme ile özellikle doku kültürlerinde çiçeklenmenin aktivasyonu gibi önemli rolleri bulunmaktadır (Sterling & Hal, 1997).

IAA’nın bitkilerde düşük konsantrasyonlarda bulunması, farklı çevresel ve ekolojik koşullarda hızlı biyobozunuma uğraması, IAA oksidaz ile doğal olarak parçalanabilmesi ve benzeri faktörler, sentetik oksinlerin kimyasal olarak sentezlenme ihtiyacına zemin hazırlayan en önemli unsurlar olmuştur. Sentetik oksinlerin bitkilerde uğradığı bozunum için tanımlanmış bir metabolik yolak bulunmamaktadır (Salisbury & Ross, 1992). Bitkilerin sentetik oksinlere eksojen maruziyeti iki önemli uygulama alanı ile olmaktadır. Birincisinde, bitki doku kültürü yardımı ile in vitro yöntemlerle bitkilerde rejenerasyon çalışmaları ve diğer doku kültürü denemelerinde sıklıkla kullanılan eksojen oksin maruziyetidir (Babaoğlu et al., 2004). İkinci olarak ise, sentetik oksin grubu maddelerin tarımsal alanlarda biyomücadelede herbisit olarak kullanımıdır. Oksinik herbisitlerden kinolin karboksilik asit türevlerinin (kuinklorak ve kuinmerak) herbisit olarak kullanılması ise 1950-60’lı yıllarda başlamıştır (Cancer & Organization, 1977). Günümüzde, sentetik oksin herbisitler, modern mahsul korumada en önemli zirai kimyasallardan biri haline gelmiştir.

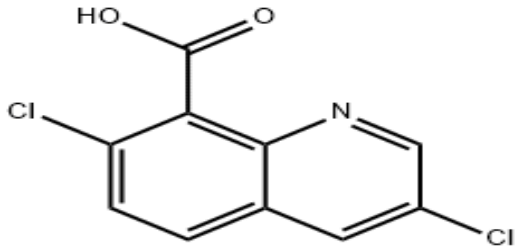
**Çizelge 2.3.** Herbisit amaçlı kullanılan oksin grubu herbisitler.[(*): Türkiye'de ruhsatlı olarak kullanılan herbisitler, (-): Türkiye'de ruhsatlı olmayan herbisitler (TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, 2024).

| Kimyasal Ailesi | Aktif madde | Kısaltması |
|---|---|---|
| **Kinolin karboksilik asit** | 3,7-diklorokinolin-8-karboksilik asit | Kuinklorak * |
| | 7-kloro-3metilkinolin-8-karboksilik asit | Kuinmerak * |
| **Fenoksi karboksilik asit** | 2,4-diklorofenoksi asetik asit | 2,4-D * |
| | 4-(2,4 diklorofenoksi) bütirik asit | 2,4 B- |
| | 2-(2,4- diklorofenoksi) propanoik asit | 2,4-DP- |
| | 2-metil-4-klorofenoksiasetik asit | MCPA * |
| | 4-(4-kloro-o-toliloksi) bütirik asit | MCPB- |
| | 2-(4-Kloro-2-metil fenoksi) propanoik asit | MCPP- |
| **Benzoik asit** | 2-metoksi-3,6-diklorobenzoik asit | Dikamba* |
| | 3-amino-2,5-diklorobenzoik asit | Khloramben- |
| | 2,3,6-trikoloro benzoik asit | TBA- |
| **Piridin karboksilik asit** | 4-amino-3,5,6-trikloropiridin-2-karboksilik asit | Picloram* |
| | 3,6-dikloro-2-piridinkarboksilik asit | Klopyralid* |
| | 2-(4-amino-3,5-dikloro-6-floropiridin-2-il) oksiasetik asit | Fluroksipir * |
| | 2-(3,5,6-trikloropiridin-2-il) oksiasetik asit | Triklopir* |
| **Naftalin asitler** | 2-naftalen-1-il asetik asit | 1-NAA* |
| **1-NAA** | 2-naftalen-1-il oksiasetik asit | NOA- |

### 2.2.1.1. Kuinklorak

Kinolin karboksilik asit türevi olan kuinklorak (3,7-dikloro-8-kinolinkarboksilik asit); yeni, seçici bir oksin grubu herbisit olup, pirinç, çim alanları, buğday ve kimyasal nadasta kullanılmaktadır (Grossmann et al., 2000) (Şekil 2.2). Kuinklorak, toksikolojik sınıf III'e (düşük toksisite) sahip kinolinlerin kimyasal grubunun bir bileşiğidir ve son yıllarda çeltik tarlalarında yabancı otların etkili bir şekilde kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Resgalla et al., 2007) (Çizelge 2.4). Genellikle darıcan gibi tek yıllık dar yapraklı yabancı otlar üzerinde kullanılsa da tek yıllık ve çok yıllık bazı geniş yapraklı yabancı otlar üzerinde de kontrol etkisi gösterir. Geniş yapraklı yabancı otlar üzerinde oksini taklit ederek etkili olurken, dar yapraklılar üzerinde selüloz sentezini

inhibe ederek etki gösterir. Bitkilerde koleoptil ve kökler tarafından kolayca emilir, odun ve soymuk borularıyla kolayca taşınır (Shaner, 2014)




**Şekil 2.2.** Kuinklorak'ın kimyasal yapısı (Tian et al., 2020).

**Çizelge 2.4.** Kuinklorak herbisitinin özellikleri (Pesticides & Authority, 2005).

| **Kimyasal Formül** | **$C_{10}H_5Cl_2NO_2$** |
|---|---|
| **IUPAC Adı** | 3,7-dikloro-8-kinolinkarboksilik asit |
| **Aktif Madde** | 250 g/l Kuinklorak |
| **Formülasyonu** | Süspansiyon Konsantre |
| **Molar Kütle** | 242.06 g/mol |
| **Erime noktası** | 274°C |
| **Kaynama noktası** | 405.4 ± 40.0 °C |
| **Yoğunluk** | 1.7500 g/cm³ |
| **Parlama noktası** | 100 °C |
| **Çözünürlük** | DMSO (Hafif), Metanol (Hafif) |
| **Ticari İsimleri** | FACET®, QQUEN, BAS -514-H |

## 2.3. Zebra Balığı Genel Özellikleri

- Regnum: Animalia (Hayvanlar)
- Filum: Chordata (Kordalılar)
- Subfilum: Vertebrata (Omurgalılar)
- Superklasis: Pisces (Balıklar)
- Klasis: Osteichthyes (Kemikli Balıklar)
- Subklasis: Actinopterygii (Işınsal Yüzgeçliler)
- Superordo: Teleostei (Gerçek Kemikli Balıklar)
- Ordo: Cypriniformes (Sazanlar)
- Familya: Cyprinidae (Sazangiller)
- Cins: *Danio*
- Tür: *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Zebra balığı (*Danio rerio*) tropikal bir tür olup Cyprinidae familyasına ait, anavatanı Güneydoğu Asya ve en fazla Pakistan ve Hindistan sularında bulunmaktadır. Balığın gövdesi ışığın geliş açısına göre koyu mavi, altın sarısı ya da gümüş beyazı çizgilerle kaplıdır. "Zebra balığı" adı, vücutlarının her iki tarafında bulunan yatay çizgilerden gelir. Zebra balığı, ilk olarak George Streisinger (Oregon Üniversitesi) tarafından biyomodel olarak 1970'li yıllarda kullanılmaya başlanmıştır (Kanungo et al., 2014). Su sıcaklığı bakımından geniş bir spektrumda, yaklaşık 18-30 °C arasında hayatlarını sorunsuz bir şekilde devam ettirebilirler. Bu balıklar ovipar (yumurta vererek) üreme göstermektedir. Embriyogenez 24 saat içerisinde gerçekleşirken organ oluşum süreci ise 5 günde yüksek oranda tamamlanmış olur. Yaklaşık 74-75 günlük olan balıklardan, dişi bireyler 24.9 mm, erkekler ise yaklaşık 23.1 uzunluğa eriştiklerinde üreme davranışı gösterebilmektedirler. Bir üreme periyodunda dişi zebra balığı 150 ile 400 kadar yumurta üretebilir ve yaşamı boyunca 1500 ile 1800 arasında yumurta bırakabilir (Mesureur & Vergunst, 2014).

### 2.3.1. Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları

Suda yaşayan organizmaların çevresel kaynaklı stres faktörlerine diğer canlılardan daha fazla oranda maruz kalmaları sebebiyle balıklar üzerinde gerçekleştirilen ekotoksikolojik çalışmalar son derece önemlidir (Mizgirev & Revskoy, 2010). Zebra balıkları, toksikoloji çalışmalarında sıkça tercih edilen model organizmalardan biridir. Bunun birkaç nedeni bulunmaktadır: Kolaylıkla bulunabilir olmaları ve oldukça dayanıklı bir tür olmaları, laboratuvar şartlarında kolaylıkla beslenip çoğalmalarını arttırmaları, erginliğe ulaşmış dişilerin haftalık periyotlarla yüzlerce sayıda yumurta bırakabilmesi, üremelerinin dış döllenmeyle olması, embriyo ve yumurtalarının görülebilir olması neticesinde gelişimlerinin kolaylıkla takibinin sağlanabilmesi, kısa jenerasyon zamanları, embriyolarının toksik maddelere hassasiyet göstermesidir. Ayrıca, zebra balıklarında insanlarda bulunan tümör baskılayıcı (sitokrom P450 grubu) genler de bulunmaktadır, bu da onları insanlarla benzer biyolojik özelliklere sahip bir model organizma yapar (Mohseny & Hogendoorn, 2014). Zebra balıkları, insanlarla genetik olarak yaklaşık %70 benzerlik gösterir. Bu benzerlik, temel organ sistemlerinin gelişimsel ve fizyolojik süreçlerinin insanlarda olduğu gibi iyi bir şekilde yansıtılmasını sağlar. Ayrıca, zebra balıkları insanlarda görülen hastalıkları taklit edebilen bir model organizma olmalarını

sağlayan farmakolojik ajanlara benzer yanıtlar gösterirler (Haque & Ward, 2018). Zebra balıkları, laboratuvar farelerine göre daha hızlı bir yaşam döngüsüne sahiptir. Bu özellikleri, aynı deneylerin zebra balıkları üzerinde de uygulanabilmesini mümkün kılar ve böylelikle çok fazla neslin takibinin yapılabilmesine olanak tanır, çoğunlukla teratojenik testler gibi süregelen deneylerde avantaj sağlar. Ayrıca, zebra balıkları üzerinde yapılan testler sonuçların hızlı ve son derece hassas bir şekilde elde edilmesini sağlar, bu da araştırmacılar için önemli bir tercih sebebidir (Muto & Kawakami, 2013).

#### 2.3.1.1. Solungaç Yapı ve İşlevleri

Balıklar da diğer hayvanlar gibi, hücresel solunum için oksijen alıp karbondioksit vermek zorundadırlar. Bu görev genellikle solungaç lamelleri tarafından yerine getirilir. Solungaçlar, kıvrımlı ve dallı yapılarıyla solunum yüzeyini oluştururlar. Balıklarda solungaçlar, başın iki yanında solungaç kapaklarının altında bulunur. Solungaç boşlukları ağıza doğru ön taraftan, yutağa doğru ise arka taraftan açılır. Solungaçlar, kıkırdak yapıda dört solungaç yayından oluşur. Her solungaç yayı, iki sıra halinde dizilmiş solungaç yapraklarından meydana gelir. Solungaç yaprakları, ince epitel doku ile kaplıdır ve zengin kan damarları içerirler (Evans, 1987).

Solungaçların temel işlevi, solunum yani gaz değişimini sağlamaktır. Bu işlem, su ve kan arasındaki gaz değişimi ile gerçekleşir ve hem solungaçlar hem de genel vücut yüzeyi üzerinde meydana gelir. Solungaçların oldukça geniş yüzey alanına sahip olması, vücudun diğer bölgelerinden daha büyük olduğundan gaz değişiminde kritik bir rol oynar. Ayrıca solungaçlar, elektrolitlerin aktif transportunda, osmoregülasyonda ve vücuttaki asit-baz dengesinin sağlanmasında da görev alırlar (Souza et al., 2014). Solungaçlar, çevre kirliliğinden en hızlı etkilenen organlardandır. Büyük yüzey alanları, toksik maddelerin solungaçlardan geçişini kolaylaştırır. Solungaçlara zarar veren toksik bileşiklerin etki gücü, solungaç hasarının şiddeti ile doğru orantılı olarak gerçekleşmektedir. Tipik solungaç hasarları iki ana gruba ayrılabilir: birincisi doğrudan kimyasalın zarar verici etkilerinden kaynaklananlar, ikincisi ise organizmanın korunma mekanizmalarının bir sonucu olarak ortaya çıkanlardır (Huang & Lin, 2011)

## 2.4. Antioksidan Savunma Sistemi ve Genleri

### 2.4.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksidatif stres, hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROT) normalden fazla üretilmesi ve antioksidan sistemin yetersiz kalması sonucu redoks dengesinin bozulduğu bir durumu ifade eder (Sevcikova et al., 2011). Reaktif oksijen türleri (ROT), aerobik metabolizmanın yan ürünleri olarak ortaya çıkar. Bu türler arasında hidrojen peroksit ($H_2O_2$), süperoksit anyonu ($O_2\cdot$), hidroksil radikalleri (OH-), tekil oksijen ($^1O_2$) gibi moleküller bulunur. Her biri değişik biyolojik reaksiyonlara tepki veren doğal kimyasal özelliklere sahip moleküllerdir. Reaktif oksijen türleri (ROT), genellikle oksidatif stresle ilişkilendirilir ve lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar vererek patolojik durumlara yol açabilirler. Bu türler, metabolizma sırasında mitokondride oksijenli solunumun son aşamasında üretilirler ve antioksidan mekanizmalar tarafından hücrelerden uzaklaştırılırlar. Hücrelerde ksenobiyotikler, metaller ve diğer maddelerin aşırı birikimi, oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına yol açarak oksidatif hasara neden olabilir (Nordberg & Arner, 2001; Sevcikova et al., 2011).

#### 2.4.1.1. Serbest Radikaller

Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron çiftine sahip atomlar veya moleküller serbest radikaller olarak bilinir. Oksijenin indirgenmesi, hücrelere hasar vererek serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına neden olur, bu "oksijen peroksidasyonu" olarak tanımlanır (Ziskoven et al., 2010). Serbest radikaller, pozitif, negatif veya nötr yüklü olabilirler ve çok kısa bir yarılanma ömrüne sahipken son derece reaktiftirler.

Fizyolojik koşullar altında gerçekleşen birçok hücresel aktivite oksidan oluşumuna neden olur. Bu oksidan moleküller, organizma yaşadığı sürece normal biyolojik süreçler sırasında oluştuğu gibi, vücuda giren yabancı maddelerin hastalık oluşturma potansiyeli olduğu durumlarda da belirli ölçülerde üretilebilir. Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı bulunmaktadır (Ondei Lde et al., 2013; Rafieian-Kopaei et al., 2013) (Çizelge 2.5).

Oksidanlar, elektron sebebiyle başka moleküllerle kolaylıkla elektron değişimi yapabilen radikaller ve elektron eksikliği olmamasına rağmen diğer moleküllerle zayıf

bağlantı kuran non-radikal gruplar olarak iki kategoride incelenir (Stadler, 2013). Süperoksit, hidroksil, alkoksil, nitrik oksit, peroksil ile hiperoksi radikalleri radikal; hidrojen peroksit ile hipoklorit non-radikal oksidanlardır (Zarbin, 2012) (Çizelge 2.6).

Reaktif oksijen türleri, yüksek reaktiviteleri nedeniyle mutajenik, karsinojenik veya toksik etkilere yol açabilirler. Serbest radikaller genellikle DNA, lipidler ve proteinler gibi önemli biyomolekülleri hedef alırlar (Nordberg & Arnér, 2001).

**Çizelge 2.5.** Oksidan Kaynakları (Hamdallah et al., 2014).

| Oksidanların Endojen Kaynakları | Oksidanların Eksojen Kaynakları |
|---|---|
| • Mitokondride bulunan elektron transport sistemi,<br>• İskemi, travma, intoksikasyon sonucu oluşan oksidatif stres,<br>• Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, adenozin deaminaz, hemoglobin gibi enzim ve proteinler<br>• Yaşlanma,<br>• Peroksizomlarda var olan enzimler,<br>• Nükleus membran ve endoplazmik retikulumda bulunan elektron transport sistemleri (sitokrom p-450),<br>• Makrofaj ve diğer fagositik hücrelerin aktivasyonu,<br>• NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz içeren plazma membran enzimleri ve lipid peroksidasyonu,<br>• Katekolaminler, tioller, tetrahidroproteinler, hidrokinonlar gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu, | • UV ışınlar, X-rays, gamma ışınları, mikrodalga ışınları,<br>• Pişirme sırasında organik maddelerin yakılması,<br>• Orman yangınları, volkanik faaliyetler,<br>• Asbest, benzen, karbonmonoksit, formaldehit, ozon ve toluen gibi hava kirleticiler,<br>• Temizlik ürünleri, tutkal, boya, tiner, parfümler ve böcek ilaçları gibi kimyasallar, Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirletici maddeler,<br>• Alkol ve sigara kullanımı, sigara dumanı, egzoz dumanı,<br>• Bağışıklık yapan maddeler: uyuşturucu maddeler,<br>• Stres,<br>• Yiyeceklerde bulunan çeşitli katkı maddeleri,<br>• Egzersiz |

**Çizelge 2.6.** Oksidanlar (Akkus, 1995).

| OKSİDANLAR | Oluşumu ve Özellikleri |
|---|---|
| **$O_2 + e^- \rightarrow O_2\cdot$ (Süperoksit)** | Saf oksijen molekülü, bir elektron alarak etrafındaki molekülden ayrıldığında süperoksit radikali oluşur. Süperoksit, bir serbest radikal olarak lipid peroksidasyonuna katkıda bulunabilir ve hidrojen peroksit üretiminde bir ara ürün olarak rol oynar. Ayrıca, geçiş metallerinin iyonlarını indirgeyebilme özelliği ile de önemlidir. Bu süreçler katalaz ve glutatyon gibi antioksidan sistemlerin zayıflamasına yol açabilir. |
| **($^1O_2$) (Tekli oksijen)** | Tekli oksijen, radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Özellikle doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksil radikallerinin oluşumuna ve lipit peroksidasyonunun tetiklenmesine yol açabilir. |
| **$O_2 + 2\ e^- \rightarrow O_2^{-2}$ (Peroksit)**<br>**$O_2^- + 1\ e^- \rightarrow O_2^{-2}$** | Saf oksijen molekülü etrafındaki moleküllerden iki elektron aldığında peroksit oluşur. Aynı zamanda süperoksidin bir elektron almasıyla da peroksit oluşabilir. |
| **$O_2^{-2} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2$ (Hidrojen peroksit)** | Hidrojen peroksit molekülü, peroksitin iki H+ atomu ile birleştiğinde oluşur. Bu bileşik, serbest bir radikal olmadığı halde metal iyonları ile beraber etkileşerek hidroksil radikallerinin oluşumuna yol açarak oksidatif özellik gösterir. Özellikle proteinlerde bulunan hem gruplarıyla etkileşime girip reaktif haldeki demir oluşumunu tetikler. Meydana gelen reaktif demir de lipid peroksidasyonuna benzer serbest radikal reaksiyonlarını başlatır. |
| **$\cdot O^- + H^+ \rightarrow OH\cdot$ (Hidroksil radikali)** | Tek atom halinde ve elektronu eksik olan oksijen partikülü bir H+ iyonu ile reaksiyona girerek reaktivitesi güçlü olan hidroksil radikalini oluşturur. Hidroksil radikali, dokularda büyük hasara yol açabilen en reaktif radikal olarak bilinir. Bu radikal, lipid peroksidasyonu denilen serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatarak biyolojik sistemlerde önemli bir etki yaratır. |
| **$\cdot O^- + 2\ H^+\cdot \rightarrow H_2O$ (su)** | Eksiksiz elektronu bulunan tek atom halindeki oksijen, iki $H^+$ iyonu alarak su molekülünü oluşturur. |
| **$H_2O_2 + Cl \rightarrow HOCl$ (hipoklorit) + OH** | Hidrojen peroksit molekülü, bir klor (Cl) atomu ile tepkimeye girerek hipoklorit oluşturur. |

Serbest radikallerin aşırı üretimi, hücre ve dokularda çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçlere zarar verir. Bu zararlar zincirleme reaksiyonlara neden olarak yeni radikallerin ortaya çıkmasına yol açar. Serbest radikaller, hücredeki çeşitli faaliyetler üstünde önemli etkilere sahiptirler. Proteinler, nükleik asitler, lipitler enzimler, karbonhidratlar ile DNA üzerinde zararlı etkiler gösterebilirler (Langseth, 1995). Serbest radikallerin neden olduğu hasarlar, bedensel yaşlanma süreciyle yakından ilişkilidir. Bu zararlar, hücrelerin ve dokuların oksidatif stres altında kalmasıyla ortaya çıkar. Serbest radikallerin oluşturduğu bu etkiler, lipidlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin ve diğer biyomoleküllerin yapısal ve fonksiyonel bozulmalarına yol açabilir. Serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma mekanizmaları arasında organizmalar oldukça hassas bir denge kurarlar. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek ve hücrelerin oksidatif

stresten korunmasını sağlayarak bu dengeyi desteklerler. Ancak, dengenin oksidan yönünde bozulması durumunda oksidatif stres ortaya çıkar. Bu durumda, hücrelerin oksidatif hasara daha açık hale gelmesi ve yaşlanma sürecinin hızlanması mümkün olabilir. Sonuç olarak, reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma sistemi arasında olan hassas dengenin sağlanması, sağlıklı bir yaşam için önemlidir. Oksidatif stresin kontrol altında tutulması, hücresel ve dokusal sağlığın korunmasında kritik bir rol oynar (Shi et al., 2017).

### 2.4.2.Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarı önleyen veya geciktiren moleküller olarak tanımlanır. Bu koruyucu etki, antioksidanların serbest radikallerle etkileşerek onların zararlı etkilerini azaltmalarıyla sağlanır. Antioksidanlar aktivitelerine bağlı olarak enzimatik ile enzimatik olmayan şeklinde iki ana grupta incelenmektedir. Bunlardan enzimatik olan antioksidanlar, serbest radikallerin hücre içinde oluşturduğu bağların kırılmasını sağlayıp etkisiz hale gelmesinde rol alırlar. Örneğin, süperoksit dismutaz (SOD), serbest radikal olan süperoksiti hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürerek nötralize eder. Daha sonra katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi enzimler, hidrojen peroksiti suya dönüştürerek zararlı oksidatif ürünleri etkisiz hale getirir. Bu enzimatik reaksiyonlarda bakır, çinko, mangan ve demir gibi metal iyonları kofaktör olarak görev alır (Langseth, 1995). Enzimatik olmayan antioksidanlar ise serbest radikallerle doğrudan reaksiyona girerek onları nötralize eder veya oksidatif zincir reaksiyonlarını durdurur. C vitamini (askorbik asit), E vitamini (tokoferol), karotenoidler, bitkisel polifenoller ve glutatyon gibi organik bileşikler enzimatik olmayan antioksidanlara örnektir. Bu antioksidanlar, hücre zarında veya hücre içinde serbest radikallerin oluşturduğu zararı azaltarak hücresel hasarı önlerler (Dasgupta et al., 2018). Antioksidanlar, dört farklı şekilde serbest radikallerin zararlı etkilerini önler:

**Süpürücü etki:** Ortamdaki serbest oksijen radikallerini etkileyip onları yakalama ya da reaktif olmayan yeni moleküller şekline dönüştürme işlemini yerine getirir.

**Onarıcı etki:** Oksidasyon sonucu oluşan hasarların tamir edilmesi için hedef hücrelerin onarılmasını sağlar, özellikle DNA hasarlarının giderilmesinde etkilidir.

**Baskılayıcı etki:** Serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek onların aktivitelerini azaltır veya inaktif hale getirir.

**Zincir kırıcı etki:** Serbest oksijen radikallerini hücre içindeki zincir reaksiyonlarını durdurarak fonksiyonlarını engeller (Kosanic et al., 2012).

### 2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit serbest radikallerinin oksijen ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalize eden enzimdir. Hücrelerde süperoksit radikallerini etkisiz hale getirerek bu radikalin zararlı etkilerinden korunmasını sağlar. Bu olay oksidatif strese karşı oluşan ilk reaksiyondur (Chen et al., 2013). Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde, SOD enzimi önemli bir antioksidan olarak görev yapar. Biyolojik sistemlerde, genellikle enzimler ve indirgeyici maddeler elektron kaynağı olarak işlev görür. Bu indirgeyici maddeler, reaktif türlerinin azaltıp antioksidan etkilerini gösterirken, elektron vericiler ise çoğunlukla geçiş metal iyonlarının oksidasyon/indirgenme reaksiyonlarına hizmet ederek daha az reaktif türleri azaltıp pro-oksidanlar olarak etki gösterirler (Huang et al., 1997).

$2\ O_2\cdot + 2\ H^+ \text{----------} > H_2O_2 + O_2$

SOD'lar hücrelerde $O_2\cdot$ konsantrasyonunu düzenleyip süperoksit radikalinin toksik etkilerinden ve KAT aktivasyonu aracılığıyla ortaya çıkabilecek OH· (hidroksil) ve hidrojen peroksit ($H_2O_2$) radikallerinin toksisitesinden hücreyi korurlar (Marzec-Wroblewska et al., 2011). Fazla oksijen tüketiminin olduğu organlarda daha aktiftir. Ayrıca, peroksinitrit ($ONOO^-$) üretimini önleyen tek antioksidan olma özelliğini taşımaktadır. Hücre hasarına yol açan süperoksitler (O 2 • −), NADPH (nikotinamid adenindinükleotid) oksidaz, ksantin oksidaz, nitrik oksidaz (NOS) ve çeşitli mitokondriyal enzimler tarafından üretilebilir. Üretilen bu süperoksit, SOD tarafından $H_2O_2$'e dönüştürülüp KAT ve GPX tarafından suya indirgenir. $H_2O_2$, hidrojen radikaline (OH•) dönüşebilir ya da nitrik oksit (NO), serbest oksijen radikali ile reaksiyona girip inaktive edilebilir. Bu reaksiyon, ONOO − üretimini sağlar. Bu nedenlerden dolayı SOD, radikalerin toksisitesine karşı hücrede ilk savunma hattını oluşturur. Ayrıca, ROT ve NO'yu düzenlemesiyle birlikte hücre sinyalleşmesinde görev alır (Zhang et al., 2016).
SOD'lar metal içerikleri dikkate alınarak dört sınıfa ayrılır.

1. **Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz ($Cu^{+2}$-$Zn^{+2}$-SOD)**: 32 kDA (Kilodalton) ağırlığında, siyanide duyarlı, ökaryotların sitoplazmasında, kloroplastlarda ve bazı prokaryotların periplazmasında yer almaktadır. Cu-Zn-SOD, iki protein alt ünitesinden oluşur ve her bir alt ünitede bir bakır (Cu) ve bir çinko (Zn) atomu bulunur. Memelilerde en yaygın bulunduğu organlar arasında böbrek, karaciğer, merkezi sinir sistemi ve eritrositler yer alır.
2. **Mangan Süperoksit Dismutaz ($Mn^{+3}$-SOD):** 80 kDa ağırlığında, homotetramerik yapıdadır. Kofaktörü mangandır, alt ünitelerinin her birinde bir mangan (Mn) iyonu bulunur. Bakteriler, arkeler, mitokondri ve kloroplastlarda bulunmaktadır. Hücresel Mn-SOD içeriği beyin, kalp, böbrek, karaciğer gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip dokularda yoğun olarak bulunur. Mn-SOD, $O_2$ radikal anyonun detoksifikasyonunda ilk adımı katalize eden mitokondriyal enzimdir (Marzec-Wroblewska et al., 2011).
3. **Demir Süperoksit Dismutaz ($Fe^{+3}$-SOD):** Aerobik ve anaerobik bakterilerde, arkelerde ve bitkilerde bulunmaktadır. Süperoksit ile demir III ($Fe^{+3}$)'ün, demir II ($Fe^{+2}$)'ye indirgenmesiyle birlikte hidroksil radikalinin oluşmasını engeller.
4. **Nikel Süperoksit Dismutaz (Ni-SOD):** Bazı *Streptomyces* türlerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Ozden et al., 2011; Zhang et al., 2016).

#### 2.4.2.2. Katalaz (KAT)

Katalaz enzimi, glikoprotein yapıda bir hemoproteindir ve ferriprotoporfirin grubunu içeren dört alt üniteden oluşur. KAT enzimi; %80 oranında peroksizomlarda, %20 oranında da sitoplazmada bulunmaktadır. Molekül alt birimlerinin ayrılması, bir enzimin fonksiyonunu etkileyebilir ve hatta inaktive olmasına yol açabilir (Vialykh et al., 2012). Katalaz, enzimler içinde en yüksek katalitik aktivite gösteren bir enzimdir ve aktifliği için $Fe^{+2}$ gereklidir. Bu enzimin dokulardaki aktivitesi büyük ölçüde değişiklik gösterir. Örneğin, karaciğer ve böbrekte katalazın aktivitesi en yüksek düzeydedir, ancak destek doku gibi diğer dokularda aktivite düşüktür. Katalaz, yüksek konsantrasyonlarda bulunan $H_2O_2$'nin etkilerini etkin bir şekilde azaltabilir (Costa et al., 2012). $H_2O_2$'yi parçalayarak moleküler oksijen ve suya dönüştürerek oksijen radikallerinin oluşmasını önler. Bu reaksiyon katalaz tarafından iki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada, kompleks I diye adlandırılan ara ürün meydana gelir. Oluşan ara ürün, katalazın hidrojen peroksidi

bağlamasıyla meydana gelir. Kompleks I, ikinci hidrojen peroksit molekülüyle birlikte reaksiyona girerek su ve moleküler oksijen oluşturur (Hebert-Schuster et al., 2012).

$KAT + H_2O_2 \rightarrow KAT - H_2O_2$ (Kompleks I)

$KAT - H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow KAT + 2\ H_2O + O_2$ (Katalaz aktivitesi)

Metanol ve etanol benzeri hidrojen vericiler, katalazın kompleks I'ine bağlandığında, sonuç olarak su ve bir aldehit ürünü oluşur.

$KAT - H_2O_2 + CH_3OH \rightarrow KAT + 2\ H_2O + HCOH$ (peroksidatik aktivite) (Whittaker, 2012).

KAT enzimi, çevredeki $H_2O_2$ konsantrasyonuna bağlı olarak aktivitesini artırır. Yüksek $H_2O_2$ seviyelerinde katalazın aktivitesi belirgin şekilde artar. Ancak $H_2O_2$ düşük konsantrasyonlarda ise, $H_2O_2$'yi substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (örneğin GPX) devreye girer. Bu enzimler, $H_2O_2$'yi ortamdan uzaklaştırarak metabolik süreçlerin düzenlenmesine katkı sağlarlar. GPX de hidrojen peroksiti detoksifiye edilebilir ancak katalaz özellikle hücrenin kendi sentezlediği hidrojen perokside karşı korunmasını sağlar. KAT ve GPX enzimleri benzer etkilere sahiptir, ancak hücre içinde farklı yerlerde bulunur ve etki gösterirler. KAT peroksizomlarda bulunurken, GPX sitozol ve mitokondride bulunur (Spence et al., 2012).

### 2.4.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GPX)

Tetramerik yapıda olan GPX enzimi 4 adet selenyum (Se) atomundan oluşmaktadır. GPX $H_2O_2$'yi suya dönüştürürerek antioksidan görev yapan bir hücre içi enzimidir (Şekil 2.3). Bu enzim, organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) veya hidrojen peroksitin, glutatyon (GSH) ile reaksiyon yaparak indirgenmesini katalize eder. GPX'in en önemli işlevi, lipid peroksidasyonunu inhibe etmesi ve bu yolla hücreleri oksidatif stresten korumasıdır (Knapen et al., 1999).

GPX hidrojen peroksit ve yağ asidini ortadan kaldırır. Fagositik hücrelerin önemli işlevlerini destekler. Fagositoz esnasındaki solunum artışı sonucu ortaya çıkan serbest radikal peroksidasyonundan, fagositik hücreleri korur (Chang et al., 2020). Glutatyon peroksidasyonun hücre içerisinde aktive olması için çoğunlukla Se'ye ihtiyaç vardır. Reaksiyonlarda substrat olarak ise glutatyon kullanır. Bazı formları Se'yi aktivatör olarak kullansa da bazıları için gerekli değildir. Bundan kaynaklı olarak bu antioksidan enzim,

Se'ye bağlı ve Se'ye bağlı olmayan şekilde ikiye ayrılır. Se'ye bağlı olan GPX'de hidrojen peroksit bulunmaktadır. Ayrıca buna ek olarak diğer organik peroksitlerin de indirgenmesini sağlayan başka yapılarda bulunmaktadır. Se'ye bağlı olmayan GPX ise yalnızca organik hidroperoksitleri indirgermiş hale getirir (Naito et al., 2010).

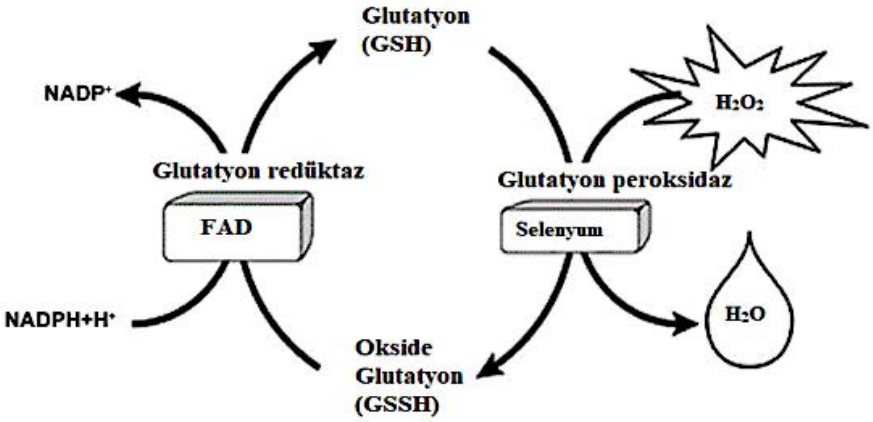
Hücrede GPX aktivitesinin azalması, $H_2O_2$ birikimine ve hücre hasarına neden olur. GPX, özellikle eritrositlerde, lipit peroksidasyonunun başlamasını engelleyerek etkisini gösterir. Çoğunlukla sitozol ve mitokondride bulunur (Short & Williams, 2017).







GPX, $H_2O_2$'yi suya indirgeyerek redükte GSH okside glutatyona (GSSG) dönüşümünde öneme sahiptir. Glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimeyle GSSG, NADPH harcanarak tekrar redükte hale gelir (Ahmad et al., 2006). GR, Flavin adenin dinükleotidine (FAD) bağımlı bir proteindir. Glutatyonun indirgenme reaksiyonlarında elektronlar NADPH'den FAD'ye aktarılır ve GSSG'ye transfer edilerek 2 GSH'ye indirgenir. Bu sayede antioksidan etki gösterir. Ortamda düşük $H_2O_2$ konsantrasyonunda GPX, KAT'a göre daha aktiftir (Kaya et al., 2019).




**Şekil 2.3.** Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi

### 2.4.2.4. Glutatyon S-Transferaz (GST)

GST'ler, iki alt birimden meydana gelen hidrofilik ve elektrofilik bileşiklerin GSH ile etkileşimini sağlayan ve böylelikle reaktif elektrofillere karşı hücresel makromolekülleri koruyan detoksifikasyon enzim ailesinin bir üyesidir. Yabancı bileşiklerin karaciğerde merkaptürik asitlere dönüşümünde ve uzaklaştırılmasında rol oynar. Oksidasyon ürünlerinin, yabancı toksik maddelerin ve diğer vücut makromoleküllerinin birleşmesini engelleyerek, hücre bileşenlerine zarar vermeden bu maddelerin vücuttan atılmasına imkan tanırlar (Fleury et al., 2002).

GST'ler, indirgeme yetenekleri sayesinde membran bileşenlerini lipit peroksidasyonundan korurken, aynı zamanda peroksidaz aktivitesiyle lipit peroksitlere karşı koruyucu etki gösterirler (Becker, 2004). Çeşitli bileşikleri metabolize ederek parçalama yeteneğine sahiptirler. Özellikle pestisitler, kimyasal kanserojenler ve çevresel kirlilik gibi yabancı kimyasalların detoksifikasyonunda büyük önem taşırlar (Sugamura & Keaney, 2011).




Lipit peroksitlerine karşı Se bağımsız GPX aktivitesi göstermektedirler. Lipit peroksitlerinin bozunma ürünleriyle beraber GSH arasındaki olan konjugasyonda da antioksidan olarak rol alırlar (Taniyama & Griendling, 2003). Balıklarda, organik hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda GST'ler GPX'ten daha kritik bir rol oynar ve daha gereklidir. Bunun yanında GST'ler Se'ye bağımlı olmadan çalışabilirler. Se eksikliği durumunda GST devreye girerek, Se'ye bağımlı olarak GPX aktivitesinin boşluğunu doldurur. Se bulunduğunda ise bu enzimlerin aktivitesi baskılanabilir. Ayrıca detoksifikasyon mekanizmasında sitokrom P450'nin aktivasyonunu sağlar. ROT ve oksidatif strese karşı korumada ve ayrıca hormon biyosentezinde görev alırlar (Cnubben et al., 2001; Stephensen et al., 2002).

### 2.4.2.5 Metallotiyonin Geni (MT2)

Margoshes ve Vallee, 1957 yılında at böbreği dokularında kadmiyum tutucu bir protein olan MT'yi keşfetmişlerdir (Margoshes & Vallee, 1957). Bu proteinler, hücre içinde sistein açısından zengin bir grup oluşturur. Bu proteinler bakterilerden omurgalılara kadar çeşitli organizmalarda yer alırlar ve yoğun sülfür içeriğine sahiptirler. Asidik pH ortamlarda metal bağlama özellikleri artabilir. Enzimatik olmayan yapılarına rağmen, çinko (Zn), bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) gibi geçiş metallerine yüksek ilgi gösterirler ve bu özellikleri ile hücre içinde metal bağlayıcı rol alırlar (Bremner & Beattie, 1990). Metallotiyoninler 6-7 kDa gibi düşük molekül ağırlığına sahiptir. Bu proteinler, toplam amino asit içeriğinin yaklaşık %30'unu oluşturan 20 sistein molekülünden meydana gelirler (Kagi et al., 1974; Ruttkay-Nedecky et al., 2013).

MT'nin ana 4 izoformu MT-1, MT-2, MT-3 ile MT-4 olarak tanımlanmıştır. En çok çalışılan ve sentezlenen izoformlar MT-1 ile MT-2'dir. MT-1 metallerin detoksifikasyonunda, MT-2 ise çoğunlukla hücrelerin metabolizması üstünde etkinlik gösterir. MT-1 ve MT-2 böbrek, karaciğer, barsak ve pankreasta bulunur. MT-3 beyin,

testis, epididimis, prostat, ovaryum, kalp, dil ile midede yer alır. MT-4 ise; çok katlı yassı epitel katmanında dil, deri, ağız ve özefagus gibi organ ve dokularda yaygın olarak bulunmaktadır dağılım gösterir (Ryvolova et al., 2011). MT-1 ile MT-2, dört izoform arasında devamlı olarak belirli bir düzeyde ifade edilir. Ayrıca bu izoformlar çeşitli uyarıcılar tarafından yüksek düzeyde indüklenebilir.

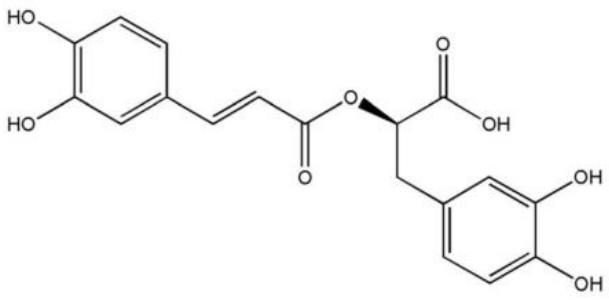
Metallotiyoninler, metal iyonlarını başka proteinlere aktararak metal şaperonu olarak işlev görürler. Temel iz elementlerden olan bakır ve çinkonun serbest iyon derişiminin kontrolünü sağlarlar. Depo ve stok görevleri vardır. Ağır metallerin detoksifikasyon ajanı olarak hareket ederler. MT ayrıca potansiyel olarak antioksidan veya serbest radikal giderici olarak da işlev görebilir. MT sentezi, metallerin yanı sıra etanol gibi kimyasalların, ağır egzersiz yapmanın ve soğuğa maruz kalmanın da etkisiyle artabilir. MT sentezinin artış göstermesiyle beraber hücrelerin serbest radikal tahribatına karşı duyarlılıklarının azalma gösterdiği bildirilmiştir (Ghoshal et al., 1998). ROT üreten oksidatif stres indüktörleri, MT'ler ile kimyasal etkileşime girerek MT genlerinin transkripsiyonunu hızla arttırabilirler (Ghoshal & Jacob, 2001). MT-2'nin serbest radikaller tarafından indüklenen ekspresyonu, bu proteinlerin hücreleri oksidatif strese karşı koruma potansiyeline sahip olabileceği fikrini desteklemiştir (Andrews et al., 2001; Nguyen et al., 2003).

MT moleküllerindeki nükleofilik özellik gösteren fazla sayıda tiyolik grubun varlığı, bu proteinlerin yalnızca reaktif oksijen türleri ile organik radikalleri değil, aynı zamanda reaktif oksijen türlerini ve organik radikalleri metalik katyonları da bağlamasına da olanak sağlar. MT sentezinin artış göstermesi, alkilleyici ajanların ya da serbest radikallerin hücre içindeki metal miktarını arttırmasıyla ilişkilidir. Bu durum, metallotiyoninlerin hücreyi öldürücü bileşiklerden koruma mekanizmasını oluşturur (Campagne et al., 2000). MT redoks döngüsü, MT biyolojik fonksiyonunda önemli bir rol oynar. Esansiyel metallerin homeostazı, toksik metallerin detoksifikasyonu ve oksidatif strese karşı koruma ile bağlantılı olabilir (Ruttkay-Nedecky et al., 2013).

## 2.5. Rosmarinik Asit (RA)

RA ilk defa 1958 yılında İtalyan kimyacılar Scarpati ve Oriente tarafından, nane ailesi olarak bilinen Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasından *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) bitkisinden izole edilerek keşfedilmiştir. Rosmarinik ismi bu bitki üzerinden tanımlanmıştır (Petersen, 2013; Vatan, 2019). Gıda endüstrisinden kozmetik ve ilaç endüstrisine kadar pek çok alanda yararlanılan RA, 3,4-dihidroksifenillaktik asit ile kafeik asidin bir esteridir (Şekil 2.4) (Vatan, 2019). RA'nın moleküler formülü $C_{18}H_{16}O_8$'dir. Moleküler ağırlığı 360,318 g/mol ve kırmızı-turuncu renktedir. Suda az çözünür, ancak dimetil sülfoksit, etanol ve dimetil formamid'de iyi çözünebilmektedir. Bir fenolik asit olan RA'nın, her aromatik halkasında iki komşu OH grubu bulunan iki aromatik halkaya sahiptir. H bağışlama aktivitelerinden dolayı serbest radikalleri yakalayarak etkili bir antioksidan aktivite göstermektedir (Brewer, 2011; Swamy et al., 2018).

RA, izolasyonundan günümüze kadar devam eden çalışmalar ile literatürlerde farmakolojik ve biyolojik aktivitesi zengin doğal bir polifenol olarak yerini almaktadır (Petersen, 2013). Antitümöral, antimutajen, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan vb. pek çok önemli farmakolojik özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Petersen & Simmonds, 2003). RA'nın öne çıkan bu etkilerinin başında antioksidan aktivitesi gelmektedir. Bir yandan ROT üretimini önemli ölçüde ortadan kaldıran RA, bir yandan da mevcut serbest radikalleri temizlemekte ve bu sayede oksidatif strese bağlı hasara engel olmaktadır (Fadel et al., 2011; Vostálová et al., 2010).




**Şekil 2.4.** Rosmarinik Asitin Molekül Yapısı (Vural et al., 2021).

## 2.6. Isı Şok proteinleri (HSP)

1962 yılında Ritossa, *Drosophila melanogaster*'in (Sirke sineği) tükürük bezi hücrelerinin kromozomlarında yüksek ısıya bağlı olarak artan gen ifadesi sonucu puf (şişkinlik) adı verilen yapılar gözlemlemiştir. 12 yıl sonra puf bölgelerinde kodlanan proteinler belirlenmiş ve çevre sıcaklığındaki ani artıştan kaynaklı olarak sentezlerinin artmasından dolayı, bu proteinler ısı şok proteinleri olarak isimlendirilmiştir (Tsan & Gao, 2004). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda ısı artışı dışında enfeksiyon, yangı, etanol, arsenik, ağır metaller, ultraviyole ışınları, viral partiküller, cerrahi/mekanik uygulamalar gibi hücresel toksinlere maruz kalma durumlarında; açlık, oksijen yetersizliği gibi stres faktörlerinin varlığında, doğal bir savunma tepkisi olarak hücre içindeki bazı proteinlerin sentezi önemli ölçüde artış gösterdiği fark edilmiş ve bunlara stres proteinleri de denilmiştir (Whitley et al., 1999). Bu stres proteinlerinin artan gen ifadesi, hücrelerin olumsuz koşullar karşısında dayanıklılığını arttırmaktadır (Cancer Genome Atlas Research, 2012) .

HSP'ler evrimsel açıdan iyi korunmuş moleküllerdir ve tüm organizmalarda, hatta hücrenin farklı organellerinde bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerde çeşitli rollere sahip HSP'lerin, birincil fonksiyonları moleküler şaperonlar şeklinde görev yapmasıdır. Çeşitli faktörler protein denatürasyonuna sebep olmakta ve biyolojik sistemlerin devamlılığını sürekli olarak sekteye uğratmaya neden olmaktadır (Neuer et al., 2000). Hücreler protein denatürasyonuna engelleyebilmek için, hücresel stres tepkisi olarak adlandırılan güçlü savunma mekanizmalarına sahiptirler. HSP'ler homeostatik zorluklara maruz kaldığında hücrelerdeki protein katlanmasını kolaylaştırmakta proteinlerin yapılarını ve işlevlerini sürdürmelerine aracılık etmektedir. Aynı zamanda, protein salgılanması, protein taşınması, protein translokasyonu, protein degradasyonu, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi ve özellikle yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanması gibi çeşitli hücresel işlemlerde yer almaktadırlar (Cancer Genome Atlas Research, 2012). HSP' ler hidrojen bağları, güçlü hidrofobik etkileşimleri ve bipolar heliks stabilitesinden dolayı stres anında denatüre olmadıkları için hücresel korumada tamamlayıcı rol alıp, proteinleri stresten koruyarak hücrelerin zarar görmesini engellerler (Bener et al., 2018). HSP'ler molekül ağırlıklarına, yapılarına ve fonksiyonlarına göre beş gruba ayrılmaktadır. Bunlar HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 ve küçük ısı şok proteinleridir. HSP türlerinin uygun protein yapısının oluşturulması, katlanması ve yer değiştirmesi gibi çeşitli içeren farklı

görevleri vardır. HSP70, HSP60 ve küçük ısı şok proteinleri, protein agregasyonunu önler ve protein katlanmasına yardımcı olur. HSP100 agregasyona uğramış proteinlerin yeniden dağılımını sağlar. HSP90 proteinlerin olgunlaşması ve aktivasyonunda temel rol oynamaktadır. HSP70, geniş doku dağılımı, birçok molekül ile etkileşime girme kabiliyeti ve potansiyel antienflamatuvar özellikleri nedeniyle en sık çalışılan ısı şok proteinidir (Borges et al., 2012).

### 2.6.1. HSP70

HSP70, 70 kDa ağırlığına sahip olup nukleus, sitosol, endoplazmik retikulum, mitokondri gibi hücrenin farklı kompartmanlarında bulunabildiği gibi hücre dışında da bulunabilen şaperon proteinleri kapsayan bir ailedir (Pulur et al., 2017; Tkacova & Angelovicova, 2012). HSP70, organeller ve proteinlerin membran translokasyonu ile düzenleyici proteinlerin aktivitesinin kontrolü dahil olmak üzere yeni sentezlenen proteinlerin birleştirilmesi ve katlanması, yanlış katlanmış ve toplanmış proteinlerin yeniden katlanması sürecine yardımcı olur. HSP70, bir proteinin yüzeyindeki küçük bir hidrofobik amino asit gerginliğini tanıyarak yanlış katlanmış proteinleri neredeyse anında tespit eder. Bir dizi daha küçük proteinin, bir HSP70 monomerinin hedef proteinine bağlanmasını sağlar ve ardından HSP70, hedefe sıkıca kenetlenmesini sağlayan konformasyonel bir değişikliğe uğrayarak bir adenozintrifosfat (ATP) molekülünü adenozindifosfat (ADP)'a hidrolize eder (Mayer & Bukau, 2005). HSP70 proteininin ayrışması, ADP salınımından sonra ATP'nin hızlı bir şekilde yeniden bağlanmasıyla indüklenir. HSP proteininin bağlanma ve salınımının tekrarlanan döngüleri, hedef proteinin yeniden katlanmasına yardımcı olur. HSP70' in diğer bir görevi ısı stresine karşı proteinlerin denatürasyonunu önleyerek termotolerans göstermesidir. Çünkü hücre; stres altındayken madde transportu, DNA replikasyonu, protein sentezi veya taşınması gibi normal fizyolojik olayları gerçekleştirmekte zorluk çeker (Hassan et al., 2019). Isı stresi gibi değişik stres koşulları altında HSP70 gen ifadesi büyük oranda artış göstererek, hücrelerin normal aktivitelerini yerine getirmelerine yardımcı olur (Rylander et al., 2005).

## 2.7. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Geni 2 (IGF 2)

IGF, Salmon ve Daughaday tarafından 1957 yılında yaptıkları çalışmada tanımlanmış, serum düzeyleri Büyüme Hormonu (GH) vasıtasıyla kontrol edillir. Bazı

açıdan GH'a bağımlı olup GH'nın anabolik ve mitojenik etkilerinin çoğuna aracılık ederek kimi hücrelerde büyümeyi uyarmaktadır. Proinsüline benzer hücresel farklılaşma ve büyüme gösteren, önemli anti-apoptotik role sahip tek zincirli 7647 dalton ağırlığında polipeptid hormondur. Çoğunlukla lokal olarak etki göstermektedir (Arikan, 2013; Çolak, 2007; Fidan Yaylalı, 2009).

IGF sistemi IGF-1 ve IGF-2 olmak üzere iki liganddan oluşmaktadır, üç tane membran reseptörü içerir: IGF-1R, IGF-2R ve insülin reseptörü (IR) ve altı tane yüksek afiniteli insülin benzeri büyüme faktörü bağlanma proteinleri (IGFBP1-6) bulundururlar. IGF'ler neredeyse tüm organların fonksiyonlarını etkilerken, insülin özellikle kas, yağ ve karaciğer dokularında etkilidir (Samani et al., 2007).

IGF-1, büyüme hormonunun temel düzenleyicisi olup büyümeyi hızlandırmada önemli rol oynar. Doğum sonrası yaşam boyunca dolaşımda anlamlı düzeylerde bulunan IGF-1, insülin gibi mitojenik ve glukoregülatuar özelliklere sahiptir. IGF-2, yapısal olarak IGF-1'e benzerdir. Fakat bir başka gen aracılığıyla kodlanır. Bu molekül, metabolik düzenlemeyi, fetal hücre bölünmesini ve farklılaşmasını etkileyerek kritik bir rol üstlenir (Sandra & Day, 1998).

## 2.8. Deoksiribonükleik Asit (DNA) Onarım Genleri

### 2.8.1. DNA Yapısı

DNA, çift sarmallı bir moleküldür. Bu molekülde birbirlerine kovalent olacak şekilde 3'-5' fosfodiester bağı aracılığıyla bağlı olan bir dizi monodeoksiribonükleotit yer almaktadır. Tipik bir DNA nükleotidinde bir fosfat grubu, bir pentoz şeker ile azotlu bir baz yer almaktadır. DNA'nın ana iskeletini deoksiriboz ve fosfat grupları meydana getirir. DNA'da adenin (A), guanin (G), sitozin (C) ve timin (T) olmak üzere dört çeşit nükleotid vardır. Bu nükleotidler, şeker ve fosfat gruplarıyla birleşerek DNA sarmalının oluşumunu sağlar (Floyd, 1990). Adenin ile timin ve guanin ile sitozin arasındaki hidrojen bağları, DNA'nın çift sarmal yapısını stabilize eder. Bu baz çiftleri, birbirlerine tamamlayıcı baz çiftleri olarak bilinir. Genetik bilginin kodlanmasında nükleotid bazları kritik rol oynar. DNA replikasyonu sırasında çift sarmalın açılmasıyla iki kalıp zincir

meydana gelir ve DNA sentezi, bu kalıpların baz çifti kuralına uygun olarak tamamlanarak gerçekleşir (Floyd, 1990; Tsutsui et al., 2001).

### 2.8.2. DNA Hasarı ve Onarımı

Genomik DNA'nın bütünlüğünün korunması, organizmanın yaşlanmasını önlemek için son derece önemlidir. Hücreler sürekli olarak genomik DNA hasarına neden olan, DNA replikatif stresi, normal hücresel metabolizma sırasında üretilen ROT'lar gibi endojen streslere, iyonlaştırıcı radyasyon, kimyasal maddeler ve virüs, bakteri gibi zararlı mikroorganizmalar gibi eksojen streslere maruz kalır ve bu da bozulmaya, DNA çapraz bağlarına, tek sarmal kırılmalara, çift sarmal kırılmalara ve kromozomal translokasyonlara yol açar (Samarakkody et al., 2020). Fakat hücreler endojen ve eksojen kaynaklardan ortaya çıkan toksik ve mutajenik süreçlere karşı güçlü bir DNA hasar cevabı (DNA Damage Response- DDR) geliştirmiştir. Her gün meydana gelen on binlerce DNA hasar olayının potansiyel olarak tehlikeli sonuçları, çeşitli DNA onarım yolakları ve savunma mekanizmaları aracılığıyla en aza indirgenir (Camps et al., 2007; Madabhushi et al., 2014).

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen her türlü değişiklik DNA hasarı olarak tanımlanır (Friedberg, 1984). DNA hasarı, hücrede ya hasarın onarılmasını sağlayacak ya da bunun mümkün olmadığı durumlarda programlı hücre ölümünü tetikleyecek çeşitli hücresel olayları başlatır. DNA'da hasar meydana geldiğinde karşı hücrede dört önemli yanıt gelişir:

1. Hasara uğrayan DNA'nın onarılması için çıkarılması ve DNA çift sarmalının düzgün bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA onarımı).

2. DNA hasarı kontrol noktalarının aktive edilmesiyle hücre döngüsünün durdurulması; bu sayede hasarlı genetik materyalin onarılmasına olanak tanınması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi.

3. Hücredeki gen transkripsiyon seviyelerinin hücrenin yararına olacak biçimde değişmesi (transkripsiyonel yanıt).

4. Ağır hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılması (programlı hücre ölümü, apoptoz).

Hücreler, DNA hasarlarını DNA tamir mekanizmaları aracılığıyla onarabilirler. Fakat DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse, mutasyonlara ve sonuç olarak

genomik kararsızlığa yol açabilir (Boer & Hoeijmakers, 2000; Sancar et al., 2004). BER (Baz Kesip Çıkarma Onarımı), NER (Nükleotid Çıkarma Onarımı), DSBR (DNA Çift Zincir Kırıklarının Onarımı), MMR (Hatalı Eşleşme Onarımı) olmak üzere 4 ana DNA tamir mekanizması vadır. İnsan hücrelerindeki DNA tamir mekanizmalarında rol oynayan 100'den fazla protein belirlenmiştir (Boer & Hoeijmakers, 2000; Jeppesen et al., 2011; Robertson et al., 2009).

#### 2.8.2.1.Baz Kesip Çıkarma Onarımı

DNA'da bulunan bazların doğal hidrolizi ile kimyasal etkenlerle değişimi sonucu oluşan azotlu baz hasarlarının onarılması, hücrelerin genetik bütünlüğünü korumada önemli bir süreçtir. DNA'da yapısal bozukluğa sahip bazlar, DNA glikozilaz enzimi tarafından algılanır. DNA glikozilaz enzimi, DNA'daki bazın N-glikozidik bağını keserek baz ile şeker arasındaki bağı parçalar. Bu işlem, hasarlı bazın DNA yapısından çıkarılmasını sağlar. Ek olarak, glikozilazlar bazların güçlü bir şekilde bağlandığı bölgelere sahiptirler. Bu iki faktörün birleşimiyle, hatalı eşleşen bazın DNA çift sarmalından çıkarılması daha kolaydır (Bütüner & Kantarcı, 2006). Oluşan bazsız bölge, şeker ve fosfatın bir araya geldiği apurinik veya apirimidinik (AP) bölge olarak tanımlanır. Hasara uğramış olan DNA'da, AP bölgesinin 5' ucu yönünde AP endonükleaz vasıtasıyla bir kesik yapılarak AP bölgesine komşu olan bir 3'-OH ucu meydana gelir. Sonrasında AP bölgesi kısmı kesilerek çıkarılırken, DNA polimeraz ile 3'-OH ucu uzatılır (Beldüz A.O., 2007). Küçük DNA hasarları BER sistemi tarafından düzeltilebilir. Oksidatif stres sonucu DNA'da oluşan okside bazlar, metilleyici ajanlarla meydana gelen küçük ve parçalı lezyonlar da BER aracılığıyla onarılır. Baz kesip çıkarma onarımı, baz uzaklaştırılması ve apirimidik veya apürinik (AP) bölge oluşması, AP bölgesinin kesilip çıkarılması sentez ve ligasyon aşamalarını içerir. DNA glikozilazlar, DNA polimeraz (pol β), APE (AP endonükleaz) ve DNA ligaz enzimleri görev almaktadır (Robertson et al., 2009).

#### 2.8.2.2. Nükleotid Kesip Çıkarma Onarımı

Hasarlı bazların oligonükleotidlerle birlikte uzaklaştırılması nedeniyle bu DNA onarım şekline nükleotid çıkarma onarımı denmektedir. Hasarlı DNA bölgesinin tanınması ve sonrasında onarılmasından oluşan bir seri reaksiyondan meydana gelir. Bu

tamir mekanizması, primidin dimerler, kimyasal olarak indüklenmiş ürünler, çapraz bağlar gibi büyük çaplı hasarları tamir etme özelliğini içerir (Jeppesen et al., 2011; Subba Rao, 2007). Bu yolak boyunca Xseroderma Pigmentosum (XP) geninin yedi üyesinin tamamı (A'dan G'ye) önemli derecede rol oynamaktadır. Hasarın tanınmasıyla onarım sistemi başlar. XPA geni, replikasyon protein A (RPA) ile birlikte kompleks meydana getirir. Sonrasında XPC ile XPE'nin de aracılığıyla birlikte hasara uğramış olan alanı tanır. Hasarlı alana gelmiş olan trankripsiyon faktör IIH, XPD ve XPB ilgili alt birimlerinin helikaz aktivitesiyle birlikte DNA'nın çift sarmal yapısında yaklaşık 25-30 nükleotidlik kadar bir bölüm açılır. Burada yer alan proteinlerin vasıtasıyla XPF-ERCC1 kompleksi, hasarlı bölgeyi 5' ucundan keserken, XPG de 3' ucundan kesip uzaklaştırılmasına olanak tanır. En son aşamada RPA, RFC (replikasyon faktör C), PCNA (proliferatif hücre nükleer antijen) ve DNA pol δ ve ε ile birlikte bölge doldurulup DNA ligaz tarafından meydana getirilen fosfodiester bağı ile sarmal önceki durumuna geri getirilir. Bu mekanizmada rol oynayan bazı genlerin genom içerisinde bulundukları kromozom lokalizasyonları ile beraber fonksiyonları Çizelge 2.7'de yer almaktadır (Leibeling et al., 2006; Strachan. T & Andrew. RP, 1999).

**Çizelge 2.7.** Nükleotid Kesip Çıkarma Onarımı sisteminde görev alan bazı genlerin lokalizasyon ve fonksiyonları

| Gen | Fonksiyon | Kromozom Lokalizasyonu |
|---|---|---|
| **ERCC1** | 5'kesim alt ünitesi | 19q13.32 |
| **ERCC2 (XPD)** | 5'→ 3' DNA helikaz aktivitesi | 19q13.32 |
| **ERCC3 (XPB)** | 3'→ 5' DNA helikaz aktivitesi | 2q14.3 |
| **ERCC4 (XPF)** | 5'kesim alt ünitesi | 16p13.12 |
| **ERCC5 (XPG)** | 3'kesim | 13q33.1 |
| **ERCC6 (CSB)** | Transkripsiyonel tamirde hasar tanıma | 10q11.23 |
| **XPC** | Genel tamirde hasarlı DNA'nın tanınması | 3p25.1 |
| **XPA** | Hasarlı bölgeye bağlanma | 9q22.33 |
| **LIG1** | DNA ligasyonu | 19q13.32 |

#### 2.8.2.2.1. XPC Geni

XPC geni, genom boyunca heliks bozukluklarını tanıyan nükleotid kesip-çıkarma onarımında görev alan ve hasarın bulunduğu bölgeye yerleşen ilk NER onarım genidir. Bu gen, 3. kromozomun kısa kolunun 25 (3p25) bölgesinde yer alır. XPC, hasarın tanınması sırasında açık kompleks oluşumu ve onarım proteini kompleks oluşumu gibi global genom NER'in erken aşamalarında kritik bir rol oynar (Mitchell et al., 2003).

#### 2.8.2.2.2. XPA Geni

XPA; DNA'da hasarlı bölgeye bağlanmada görevli proteini kodlayarak NER için gerekli olan başka proteinlerin biraraya gelmesine katkı sağlamaktadır. XPA ve heterotrimerik protein A (RPA) sonrasında hasarlı olan bölgeye bağlanarak hasarın tanınmasına imkan tanırlar (Hoeijmakers, 2001).

### 2.8.2.3. Çift Zincir Kırıklarının Onarımı

DNA çift zincir kırıkları, DNA hasarının en yıkıcı sonuçlarına neden olan çeşididir. Sağlam DNA olmadığı için daha zor bir mekanizmadır. Onarılmadığı durumlarda kromozom kırıklarına, genotoksik etkilere ve hücreyi ölüme götüren sonuçlara neden olabilmektedir. Bundan dolayı, çift zincir kırıklarının onarımı kromozomal parçalanmaları, translokasyon ve delesyonların engellemesi bakımından oldukça önemli bir süreçtir. Serbest radikaller ve iyonize radyasyon gibi ekzojen faktörler DNA çift zincir kırıklarına neden olabilmektedir (Chu, 1997; Kanaar & Hoeijmakers, 1998). Çift zincir kırıklarının onarılması için 2 yolak tanımlanmıştır. İlk olarak; homolog rekombinasyonel DNA tamiri (HR), diğeri ise serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (NHEJ)'dır. Bu onarım yolakları hücre döngüsünün fazlarına bağlı olarak gerçekleşmektedir. HR, S ve G2 fazlarında meydana gelirken, NHEJ başlıca G0/G1 fazında meydana gelmektedir (Christmann et al., 2003; Johnson & Jasin, 2000). NHEJ'de en önemli olaylardan biri DNA bağımlı protein kinazın aktive olarak diğer proteinlerin hasarlı bölgeye gelmelerine öncülük etmesidir. Bu tür protein komplekslerinin meydana gelmesi DNA ligaz IV-XRCC4 kompleksinin kırık uçları bağlamasını sağlar ve onarım tamamlanır. HR'da ise MRE11-RAD50-NBS1 kompleksinin nükleaz aktivitesi ile kırık uçlar degredasyona uğrar. RAD52 proteini 3' uçlara bağlanır. RAD51 rekombinasyon

oluşturmak üzere kardeş kromatid zincirinin hasar bölgesine invazyonunu sağlar. Oluşan bu zincir kalıp olarak kullanılmakta olup, sentez yapılırak hasar onarılmış olur. BRCA1, BRCA2, XRCC3 gibi 16'dan fazla molekülün bu yolakta görev aldığı bilinmektedir (Kanaar & Hoeijmakers, 1998; Rai et al., 2007).

#### 2.8.2.3.1. X-Ray Onarımı Çapraz Tamamlayıcı Gen 3 (XRCC3)

XRCC3 geni 14. kromozomun uzun kolu üzerinde yer alan (14q32.3) yaklaşık 17kb uzunluğa sahip ve 9 ekzonluk bir gendir. Rad51 protein ailesinin (XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C ve Rad51D) bir üyesi olan XRCC3, DNA çift zincir kırıkları ve çapraz bağların onarımında ve homolog onarım yolağında görevlidir. Ökaryotik Rad51 paralog genlerinin, homolog rekombinasyonda önemli rolü olup mitotik ve mayotik hücre döngülerinde kromozomal bütünlüğü korumaktadırlar (Lin et al., 2006).

XRCC3, kimyasal ajanlar ve iyonize radyasyon kaynaklı oluşabilecek hücre hasarının önlenmesinde önemli proteinlerdendir. Rad51C-XRCC3 kompleks yapısı XRCC3'ün biyolojik fonksiyonu için gerekli olup, HR onarım yolağında anahtar rolü üstlenmektedir (Yamada et al., 2004). HR onarımında DNA çift zincir kırıkları nedeni ile kaybolan genetik bilgileri, ikinci sağlam kopyayı içeren homolog kromozomu kalıp olarak kullanarak düzenler ve onarımı gerçekleştirir (Duarte et al., 2005).

### 2.8.2.4. Hatalı Eşleşme Onarımı (MMR)

MMR, DNA replikasyonu sonucu genomun stabilitesinin sağlanmasında önemli onarım sistemlerinden diğeridir. DNA polimeraz, birçok yanlış eşleşmiş bazı kendini düzeltme aktivitesi ile ortamdan uzaklaştırmaktadır. Bu mekanizma sayesinde replikasyon yaklaşık 50 ile 1000 kat daha güvenilir hale gelmiş olur. Hatalı eşleşme onarım sistemi ile DNA'da gözden kaçabilecek yanlış eşleşmeler, replikasyon sonrasında kontrol altına alabilecek önemli protein komplekslerinden oluşmaktadır (Christmann et al., 2003; Jun et al., 2006).

## 2.8.3. Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Genleri

Hücre döngüsü, hücre içeriğinin iki katına çıkartılıp bölünmesiyle, aynı özelliklere sahip iki yeni hücrenin oluştuğu karmaşık ve düzenli bir süreci içerir.

Hücre döngüsü; G1, S ile G2 aşamalarının yer aldığı interfaz evresi ve mitotik evreden meydana gelir (Şekil 2.7).

1. İnterfaz esnasında, hücre büyümede gerçekleştirir ve DNA replikasyonu yaparak bölünmeye hazırlanır.
2. G1 evresi, hücrenin bir önceki bölünme sonrası sitokinezin tamamlanmasından S evresinin başlamasına kadar olan süredir. Bu evrede hücre bir sonraki bölünmeye hazırlanır veya dinlenme fazı olan G0'a geçer (Icard et al., 2019). Bu aşamada, eğer hücre bölünmeye karar verirse, DNA replikasyonuna hazırlık yapar. G1 en uzun süren büyüme evresi olarak bilinir. Çeşitli biyosentez olayları gerçekleşir ve hücrelerin ihtiyacını karşılamak üzere metabolitler üretilmektedir.
3. S evresinde, DNA çoğalması gerçekleşir ve her kromozom, kendini eşleyerek kardeş kromatidleri oluşturur.
4. G2 evresi S evresinin ardından gerçekleşir. Bu evrede, hücreler membran oluşumunda gerekli yeni lipidlerin üretimi sentezlenmesini arttırarak mitotik sürecin başlatılmasına yönelik hazırlıklar yapar.
5. Mitoz evresi, diğerlerine göre kısa süren bir evredir. Bu aşamada, hücrelerde kromozomların iğ iplikleri tarafından düzenlenmesi ve ardından ayrılması ile nükleer bölünme gerçekleşir. Mitoz; profaz, metafaz, anafaz, telofaz ile sitokinez olmak üzere alt aşamalardan oluşur. Hücre döngüsü süreciyle çoğalma neticesinde genetik olarak benzer yavru hücreler oluşmaktadır (Icard et al., 2019; Schafer, 1998; Wenzel & Singh, 2018).

Yavru hücrelerin doğru bir şekilde meydana gelmesi hücre döngüsünün düzenlenmesi ile sağlanır. Hücrenin döngüsü süresince farklı evrelere geçişi; siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar) ve bu enzimleri bloke eden faktörler tarafından düzenlenmektedir (Schafer, 1998; Wenzel & Singh, 2018). Siklin proteinleri hücre döngüsü düzenlenmesinde anahtar rol oynayan siklin bağımlı kinazlar ile kompleks oluşturarak hücre döngüsü ilerlemesi aşamalarına yön veren anahtar substratların fosforillenmesinde rol alarak sadece belli zamanlarda aktive olurlar (Casimiro et al., 2017; Darzynkiewicz et al., 1996; Malumbres & Barbacid, 2009). Oluşturulan komplekslerde, bir tane mitotik siklin bağımlı kinaz (CDK1), üç tane interfaz siklin

bağımlı kinazı (CDK2, CDK4 ve CDK6) ve dört farklı sınıfa ait on siklin (A-, B-, D- ve E- tipi siklinler) bulunmaktadır (Malumbres & Barbacid, 2009).

Siklinlerden sentez edilen ilk siklin D, G1 fazının ortasında farkedilmeye başlar ve S fazında ise ortadan kaybolmaktadır. D1, D2 ve D3 diye adlandırılan 3 formu bulunur. Genelde hepsi birlikte siklin D diye kabul edilmektedir. Siklin D ve CDK4 G1 fazında birleşip kompleks meydana getirir. Ortaya çıkan komplekste retinoblastom proteinini (pRb) aktive duruma getirmektedir. pRb aktive olmasıyla birlikte hücre döngüsü için bir kapama - açma düğmesi işlevi görerek hücre replikasyonunu çoğaltıcı etki göstermektedir (Coqueret, 2002; Kumar et al., 2004). Diğer bir üye olan siklin E G1 fazının son zamanlarında sentezlenmeye başlar S fazının sonuna doğru ortadan kaybolur. CDK2 ile birleşip pRb proteinini fosforilleyerek aktive olmasını sağlar. (Del Pizzo et al., 1999; Kumar et al., 2004). Hücre döngüsünde başka bir önemli nokta olan G2/M fazları arası geçiş olup, siklin A ile CDK2 arasında meydana gelen kompleks kritik rol oynar. Nükleer zarfın yırtılması ile birlikte mitozun başlamasını tetikleyen siklin B-CDK1 kompleksidir. Bölünmesini gerçekleştiren hücre dinlenme fazına geçer veya G1 fazına girip tekrar replike olur (Coqueret, 2002; Kumar et al., 2004).

### 2.8.4. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri

CDK aktiviteleri, siklin bağımlı kinaz inhibitör proteinleri (CKI) tarafından kontrol edilir. Siklin/CDK kompleksini inhibe edip DNA replikasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin durdurulmasında görev alırlar (Hirai et al., 1995). 2 farklı CDK inhibitör ailesi vardır; Cip/Kip ile INK4/ARF aileleridir. p16, p15, p18 ve p19 INK4/ARF ailesinin üyeleridir. Görevleri siklin D'nin CDK6 ve CDK4'e bağlanmasını inhibe etmektedirler. $P21^{Kip1}$, $P27^{Kip1}$ ve p57 ise Cip/Kip ailesinin üyeleridir. Bunlar siklin A/CDK2, siklin E/CDK2 ile başka siklin/CDK komplekslerine bağlanıp inaktive ederler (Sherr & Roberts, 1999).

#### 2.8.4.1. Cip/Kip Ailesi

##### 2.8.4.1.1. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A ($P21^{Kip1}$)

$P21^{Kip1}$, 164 amino asitten meydana gelmiş 18 kDa ağırlığında bir CDK inhibitörüdür (Stein et al., 1998). DNA hasarı olduğunda $P21^{Kip1}$, tepki olarak P53 tümör

süpresör geni tarafından aktive edilir ve DNA hasarına yanıt olarak G1/S–ve S–CDKS'yi ve dolayısıyla hücre döngüsü girişini bloke ederek, G1 fazında hücre döngüsünü durdurarak hücreye DNA'sını kopyalamaya başlamadan önce hasarı onarması için zaman verir (Morgan, 1995). Böylelikle $P21^{Kip1}$ hücre döngüsünün negatif regülatörü olarak görev yapar (Sherr & Roberts, 1999). $P21^{Kip1}$ geninin transkripsiyonu, P53'e bağlı ve bağımsız mekanizmalarla aktive edilir. DNA hasarı meydana geldiğinde artan $P21^{Kip1}$'in transkripsiyonel aktivasyonu, P53 aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bazı araştırmalarda hücre döngüsü esnasında P53'den bağımsız şekilde sitokinlerle ve hücre adezyonuna bağlı olarak da $P21^{Kip1}$ gen seviyelerinin arttığı bilinmektedir (Datto et al., 1995).

#### 2.8.4.1.2. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B ($P27^{Kip1}$)

$P27^{Kip1}$ 198 amino asitten meydana gelmiş 22 kDa ağırlığında bir CDK inhibitörüdür. Hücre döngüsünün G1 fazı ve S fazının bağlantısında önem teşkil eden siklin E-CDK2 kompleksinin inhibe edilmesini sağlayarak önemli rol oynar. Ayrıca S–Cdk (siklin A–CDK2) ile M–CDK (siklin B–CDK1) üzerinde nispeten az etkiye sahiptir (Morgan, 1995). $P27^{Kip1}$, intrinsik veya hücre dışı antimitojenik sinyallere, Siklin/CDK'lere bağlanıp inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini G fazında bloke ederek yanıt verir (Franke et al., 2000).

$P27^{Kip1}$ aynı zamanda henüz tanımlanmamış mekanizmalar yoluyla apoptozu, farklılaşma süreci ve hücre göçünü düzenleyen bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür. $P27^{Kip1}$, G1/S fazı kontrol noktasında hücre döngüsünü bloke eder ve G0 ve G1 fazlarında duraklamış hücrelerde yüksek oranda ifade edilir (Abbastabar et al., 2018; He et al., 2020).

### 2.9. Apoptoz

Apoptoz, işlevlerini kaybetmiş, düzensiz şekilde gelişmiş, yaşlanmış ve DNA'sı hasara uğramış olan hücrelerin güvenli olarak ortadan kaldırılmasına aracılık eden ve genetik olarak kontrolü sağlanan programlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Pestalozzi et al., 2005). Morfolojik olarak, apoptotik süreç birkaç adımda gerçekleşmektedir. Bu süreç çekirdekte kromatinin yoğunlaşması ve ardından deoksiribonükleazlar (DNazlar) ile nükleer zarın parçalanması ve DNA hidrolizi ile başlamaktadır. Ayrıca, fosfatidilserin (normalde sadece plazma membran katmanı sitozolik tarafında bulunan bir fosfolipid) iki

katmanın ekstrasellüler yüzüne çevrilmektedir. Apoptoza giren hücreler, komşu hücrelerine olan bağlarını kaybetmekte ve hücrenin büzülmesi ile birlikte plazma zarında büzüşmeler (membrana bağlı veziküller) oluşmaktadır. Son olarak, hücrenin bileşenleri makrofajlar ve/veya komşu hücreler tarafından endosite edilen apoptotik cisimler adı verilen membrana bağlı cisimlere paketlenmektedir (Abou-Ghali & Stiban, 2015).

Apoptotik yol hem intrasellüler hem de ekstrasellüler sinyaller ile aktive olabilmektedir. Apoptoza yol açan iki farklı yolak tanımlanmıştır. Bunlar sinyal tipiyle ilişkili olan içsel yolak (mitokondriyal yolak) ve dışsal yolak (ölüm reseptörü yolağı) (Darcy, 2019). İçsel yolak, hasar yanıtı olarak hücrenin kendisi tarafından başlatılırken; dışsal yolak, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından uyarılan ölüm reseptörleri aracılığıyla başlatılarak etki göstermektedir. Her iki yolak da Kaspaz 3 aktive edildiğinde birleşmekte ve hücre ölümüyle neticelenmektedir (Pfeffer & Singh, 2018).

### 2.9.1. Dışsal Yolak (Ölüm Reseptörü Yolağı)

Dışsal yolak, tipik olarak sağlıksız hücreleri yok etmek için bağışıklık sistemi tarafından devreye sokulan yolaktır. Bu yolak bir ekstrasellüler ligandın ölüm reseptörü (DR) olarak bilinen bir hücre yüzeyi reseptörüne bağlandığında tetiklenmektedir. Dışsal yolakta yer alan ligandlar arasında plazma membranından yer alan tümör nekroz faktörü -α (TNF-α), Fas ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) bulunmaktadır (Ziegler et al., 2008). Günümüzde tanımlanmış; farklılaşma kümesi 95/Fas/apoptoz antijeni 1 (CD95/Fas/Apo1), TNF reseptörü 1 (TNFR1), TNF reseptörü 2 (TNFR2) ve DR3-6 dahil olmak üzere, bu sinyali iletebilen şimdi tanımlanmış birden fazla reseptör yer almaktadır. Bu reseptörler, aynı kökenli ligandlarına bağlandıktan sonra başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-8 ve kaspaz-10'u, FAS ilişkili ölüm bölgesi proteini (FADD) gibi adaptör proteinlerin aracılık ettiği dimerizasyon yoluyla aktive edebilmektedir. DR'ye bağlanma meydana geldikten sonra sinyal, ölüm indükleyici sinyal kompleksinin (DISC) birleşmesi ile intrasellüler olarak iletilmektedir. Bu daha sonra başlatıcı kaspazlardan kaspaz-8 ve kaspaz-10'un ayrılmasıyla sonuçlanmakta ve efektör kaspazları yani kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi ayırarak aktive etmektedir. Bir kez tetiklendiğinde bu kaspazlar, sonuç olarak ortaya çıkan geri dönüşümsüz hücre ölümünden sorumludur (Lchim & Tait, 2016; Ziegler et al., 2008).

### 2.9.2. İçsel Yolak (Mitokondriyal Yolak)

Apoptozun mitokondriyal yolağı, hücre içindeki birden fazla hedefi etkileyen çeşitli uyaranların yer aldığı bir süreç olarak bilinir. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik kalsiyum ($Ca^{+2}$) konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar içsel mitokondriyal yolağın başlatılmasını sağlayan bazı tetikleyicilerdir. Uyaranlardan bağımsız olarak bu yolak, artan mitokondriyal geçirgenliğin ve sitoplazmaya sitokrom-C gibi pro-apoptotik moleküllerin salınmasıyla devam eden bir süreci izler (R. S. Wong, 2011).

Tüm yolak, B Hücreli Lenfoma-2 (BCL2) protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. BCL2 proteinlerinin iki ana grubu vardır, bunlar: pro-apoptotik proteinler (BCL2 ilişkili X protein (BAX), BCL2 homolog antagonisti (BAK), BCL2 ilişkili ölüm promotörü (BAD) gibi) ve anti-apoptotik proteinlerdir (BCL2, B Hücre Lenfoma ekstra büyük (BCL-xL) gibi). Anti-apoptotik proteinler sitokrom-C'nin mitokondriyal salınımını bloke ederek apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik proteinler bu salınımı indüklemektedir. Apoptozu başlatan asıl olay, pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulmasıdır (R. S. Wong, 2011). Çeşitli apoptotik uyaranlar, daha sonra hem BAX hem de BAK'ı aktive eden BH3 proteinlerinin yukarı regülasyonu ile sonuçlanmaktadır. BAX, bir tümör baskılayıcı gen olan Tümör Süpresör Protein 53 (P53) tarafından düzenlenmektedir. Aktive edildiğinde, BAX ve BAK oligomerize olmakta, bu da mitokondriyal dış membran geçirgenliğine (MOMP) yol açmaktadır. MOMP, içsel apoptozun tanımlayıcı olayıdır ve geri dönüşü olmayan nokta olarak kabul edilmektedir.

MOMP ile; sitokrom-C, Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF), İkincil Mitokondri Türevi Kaspaz Aktivatörü/ Düşük PI ile Doğrudan IAP Bağlayıcı Protein (Smac/Diablo) ve Omi/yüksek sıcaklık gereksinimli protein A2 (Omi/HtrA2) sitoplazmaya salınmaktadır. Sitokrom-C, apoptozom üretmek için Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile birleşmektedir. Apoptozom, Kaspaz-9'u aktive eden, yedi kollu halka şeklinde çok proteinli bir komplekstir. Aktive edilen Kaspaz-9 enzimleri, efektör kaspaz olarak da adlandırılan Kaspaz 3 ve 7'yi aktifleştirmektedir (R. S. Wong, 2011). Efektör kaspazlar, hücre ölümüne yol açan proteinleri hızla parçalamaya başlamaktadır. Hücre ölümünü sağlayan içsel apoptoza ek adımlar vardır. Omi, kaspaz fonksiyonunun endojen bir inhibitörü olan Apoptoz Proteinlerinin X'e Bağlı Protein

İnhibitörü (XIAP)'nü inhibe eder. Apoptoz sırasında salınan Omi, Apoptoz Proteinlerinin İnhibitörü (IAP) proteinlerini inhibe ederek apoptozom oluşumunu ve dolayısıyla apoptozun ilerlemesini sağlar (Jan & Chaudhry, 2019; Pfeffer & Singh, 2018; R. S. Wong, 2011).

P53 tümör süpresör gendir. Güçlü stres sinyallerine maruz kalan hücrelerde tamir edilemeyecek kadar hasarlı ya da kanserli hücrelerin seçilip ayrılmasını sağlayarak apoptoza ya da yaşlanmaya sürüklemektedir. Düşük seviyede stres şartları altında ise P53 hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı ve antioksidan protein üretimi gibi koruyucu ve hayatta kalmaya yönelik yanıtlar oluşturmaktadır. Böylelikle, onarılabilir hasara uğramış hücrelerde canlılığın sürdürülmesini ve genom bütünlüğünü sağlamaktadır. P53, hücresel stres sonucunda apoptotik yanıtı başlatacak birçok geni transaktive etmektedir (R. S. Wong, 2011). Bu genler arasında; BAX, Puma, Noxa ve Bid gibi içsel yolakta mitokondriyal zar depolarizasyonunu sağlayan BCL2 ailesi üyeleri, apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve dışsal apoptotik yolağın bileşenleri Fas/CD95, ölüm reseptörü 4 ve 5 (DR4 ve DR5) bulunmaktadır. Aynı zamanda, P53 doğrudan BclXL ve BCL2 proteinlerine bağlanarak inhibe edebilmektedir. Daha sonra Sitokrom C salınımı ve ardından da kaspaz aktivasyonu zinciri başlatılır (Ziegler et al., 2008).

Bir hücrede eğer pro-apoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha fazla eğilimli, anti-apoptotik proteinler fazla ise daha az eğilimlidir. BCL2 ailesinin pro-apoptotik bir üyesi olan BAX aynı zamanda P53'ün bir efektörüdür. DNA hasarı sonrası tepki olarak BAX ifadesi uyarılır. Hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğinin belirlenmesinde hücre içi BCL2/BAX oranı son derece önemlidir. Eğer BAX fazla ise hücre apoptoza gidecektir, BCL2 fazla ise apoptoz inhibe edilecektir (R. S. Wong, 2011). Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozu uyarmakta ve malignant oluşumunu engellemektedir. P53, DNA'nın ya da hücrenin hasar görmesi durumunda, DNA'da belli genlerin aktivasyonuna, yani yapımlarının artmasına (BAX, Apaf-1, Fas) belli genlerin ise baskılanmasına (BCL2, Bcl-X) yol açarak apoptozu tetikler. Normal bir hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde, P53 miktarı artarak hücre döngüsü bölünme kontrol noktalarından G1'de durdurup DNA onarımı için hücreye zaman kazandırır. Hasar tamir edilemezse de hücre apoptoza gider (Darcy, 2019).

## 2.10.Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) ilk defa 1990' da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu' nu (PCR) temel alan bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Williams et al., 1990). RAPD yönteminin temel prensibi, ilgili türe ait olan genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, 10 oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında rastlantısal olarak DNA'daki ilişkili bölgelere bağlanarak DNA'yı PCR vasıtasıyla çoğaltmasıdır (Ertuğrul & Koç, 2011; Oruc et al., 2004).

RAPD yöntemi kullanılarak ortaya çıkarılan DNA polimorfizmi olup agaroz jelde RAPD bandının varlığı veya yokluğu ile ifade edilmekte ve genomda şekillenen insersiyon, delesyon, ya da primerlenme bölgeleri arasındaki nükleotid dizilim farkını göstermektedir. Rastgele primerlerin genom üzerindeki sayısız bölgeyi çoğaltabilme özelliğine sahip olması RAPD tekniğinin genetik çalışmalarda sık kullanılmasına yol açmıştır (Lerebours et al., 2013).

RAPD polimorfizmleri genellikler primer bağlanma bölgelerinin bulunduğu bölgeleri etkileyerek bölgeler arası kısmın ölçüsünü değiştirebilen mutasyonlardan kaynaklanabilir.

Bunun yanı sıra amplifikasyonu engelleyen delesyon, insersiyon ve inversiyon gibi mutasyonlardanda meydana gelebilmektedir. RAPD tekniğinde zorluk sonuçta oluşmuş olan bant profillerinin reaksiyon koşullarındaki varyasyonlara, DNA kalitesine ve PCR ısı profiline karşı duyarlılığıdır (Bakri et al., 2007).

RADP-PCR yönteminin aşamaları genel olarak;

1. Hücresel materyalden DNA izolasyonu.
2. İzole edilen DNA'da miktar ve kalite tayini.
3.Genomik DNA'nın rastgele seçilen primerlerle optimal koşullarda PCR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi.
4. Elde edilen PCR ürünlerinin uygun agaroz jelde yürütülmesi.
5. Elektroforezle oluşan RAPD bantlarının UV altında görünür hale gelmesine imkan sağlayacak boyalarla boyanması.
6. RADP bantlarının değerlendirilmesi şeklindedir (Kumar & Gurusubramanian, 2011).

## 2.11. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR)

Moleküler araştırma tekniklerinde PCR kullanımı sonrasında, geleneksel PCR'a göre daha hassas, hızlı ve kolay olan kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) olarak isimlendirilen önemli bir yöntem geliştirilmiştir (Hagen-Mann & Mann, 1995).

DNA'nın çoğaltılarak oluşan ürünlerin tek bir tüpte belirlenebilmesine imkan tanır. Yöntemde PCR işlemi neticesinde ortaya çıkan çoğaltımlar görünür şekle gelir, sonrasında görüntülenebilen bir floresan işaretleyicili boya ile birlikte probların kullanıldığı, çoğalan DNA ve floresanın paralel şekilde artış gösterdiği amplifikasyon yöntemidir (Miyajima et al., 2013; Vegi & Wolf-Hall, 2013).

Kantitatif PCR sisteminin avantaj sağlayan yönleri fazladır. Bu yöntem ile reaksiyon sırasında floresans ışıma ile eş zamanlı şekilde veri toplama işlemi yapılarak analiz aynı esnada gerçekleştirilebilir.

Diziye özgü mutasyonu tanıyabilen problar kullanıldığı için spesifik şekilde olmayan çoğaltımlardan etkilenmeleri söz konusu değildir ve sonuçlanmada ikinci bir tekniğe gereksinim duyulmadığı için yüksek verimlilik elde edilir (Palle-Reisch et al., 2014).

Kontaminasyon olasılığı kapalı sistem olmalarından dolayı çok azdır. Reaksiyon sonrasında başka işlemlere gereksinim duyulmadığı için qPCR işlem süresi 45 dakika kadar sürmektedir (Babu et al., 2011).

# BÖLÜM 3

# MATERYAL VE METOT

## 3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Adaptasyonu

Bu çalışmada ticari firmalardan temin edilen Zebra balıkları, Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Sucul Hayvan Deneyleri Araştırma Laboratuvarına getirilmiştir. Balıklar uygun kaplarda pH 7-8'de, sıcaklık 24-26 °C'de devamlı şekilde havalandırma işlemi yapılarak, 12:12 olmak üzere gece-gündüz periyodunda 1 hafta süresince ortama adaptasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan suyun; pH'sı 7.68, klorür 1.00 mg/L, sülfat 7.65 mg/L, sodyum 1.98 mg/L, oksitlenebilirliği 5.4 mg/L ve iletkenliği de 150.3 µs/cm (20ºC) olarak ölçülmüştür. Adaptasyon süresince balıklar her gün kuru balık yemi ile beslenmiş, sıcaklık ve iletkenlik değerleri ölçülmüştür. Metabolizma ile yem artıklarının uzaklaştırılması amacıyla günlük sifonlamaları işlemi gerçekleştirilmiştir.

## 3.2.Deneyde Kullanılan Herbisit Konsantrasyonlarının Ön Çalışma ile Belirlenmesi $LC_{50}$ Deneyleri

Kuinklorak herbisitinin daha önce diğer balıklar üzerinde yapılan $LC_{50}$ çalışmaları dikkate alınarak, bu çalışmada 8 mg/L ile 3200 mg/L aralığında konsantrasyonlar belirlenmiş, her gruba 5 balık olacak şekilde 96 saat muamele yapılarak canlılıkları gözlenmiştir. Deney 3 kez tekrar edilmiş $LC_{50}$ 96 saat değeri belirlenmiştir. Ön çalışma yapılmasının amacı, genotoksisite çalışmalarında test edilecek konsantrasyonun belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlara maruz bırakılacak deney materyalinde 24-96 saat aralığında canlılık-ölüm miktarları tespit edilerek, probit analizi ile farklı sürelerde $LC_{50}$ miktarı belirlenir. Sucul organizmalarda 96 saat $LC_{50}$ konsantrasyonu belirlenerek, bu konsantrasyonunun katlar halinde azalan

konsantrasyonları deney materyaline muamele edilerek genotoksisite çalışmaları yapılır. Trimmed Spearman–Karber yöntemi kullanılarak $LC_{50}$ 96 saat değeri tespit edilmiştir (Hamilton et al., 1978).

### 3.3. Deneysel Çalışma

Zebra balıkları ön çalışma sonrası belirlenen $LC_{50}$ 96 saat değerinin katlar halinde azalan konsantrasyonları *Danio rerio* ergin bireyleri üzerine 48 saat maruz bırakılmıştır. Deney her grupta 5'er balık olacak şekilde, büyüklükleri 8x16x12 cm olan polypropilen akvaryumlarda 2 litrelik su hacmi içinde uygulanmıştır. Su 24-26 °C sıcaklıkta ortam ise aydınlık: karanlık (12:12) olacak şekilde sabitlenmiş olup akvaryumların devamlı olarak havalandırılması sağlanmıştır. Beslenme günde bir defa olmak üzere kuru yem verilerek gerçekleştirilmiştir. Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuş, deney süresi boyunca beslenme yapılmamıştır. Her grupta 5 balık olmak üzere 48 saat süre sonunda deney sonlandırılmıştır. Deney 3 defa tekrarlanmıştır. Deney süresi sona erdiğinde kontrol ile en düşük konsantrasyonlardan başlanarak balıklar pellet buz-su karışımında anestezi altında sakrifiye edilerek solungaçların diseksiyonu yapılmıştır. Çalışma sonunda solungaçlar, eppondorflara alınarak genetik analizler için kullanılmak üzere derin dondurucuda -86 °C sıcaklıkta saklanması sağlanmıştır.

#### 3.3.1. Deney Grupları

**1.grup**: Kontrol grubu olup **(K),** herbisit muamelesi yapılmaz.
**2.grup** :100 µM Rosmarinik asit (**RA**) içerir (Shahrestani et al., 2021)
**3.grup**: $LC_{50}$ /**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak (**C1**) konsantrasyonu içerir.
**4.grup**: $LC_{50}$ /**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak **(C2)** konsantrasyonu içerir.
**5.grup**: $LC_{50}$ /**8** mg/L (44,25 mg/L) kuinklorak (**C3)** konsantrasyonu içerir.
**6.grup**: $LC_{50}$ /**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak **(C1)** + 100 µM (**RA**) içerir.

1.grup: Kontrol grubuna herbisit muamelesi yapılmaz. 2.grup: Daha önce yapılan çalışmalarda etkili olduğu belirlenen 100 µM RA konsantrasyonu içermektedir. RA; distile su ve organik bir çözücü olan dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözdürülmüştür. DMSO'nun akvaryumdaki konsantrasyonu 2 litre su içinde 5 µl değerini geçmemektedir. 3.grup: En yüksek test konsantrasyonu 177,00 mg/L kuinklorak içermektedir. 4.grup: En

yüksek test konsantrasyonunun yarısı 88,50 mg/L kuinklorak içermektedir. 5.grup: En düşük test konsantrasyonu 44,25 mg/L kuinklorak içermektedir. 6.grup: En yüksek test konsantrasyonu 177,00 mg/L kuinklorak ile 100 µM RA içermektedir. RA, en yüksek test konsantrasyonu eklenmeden 2 saat önce uygulanmıştır.

## 3.4. DNA Ekstraksiyonu ve Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Analizi

### 3.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA'lar Zebra balığı dokularından PureLink™ Genomik DNA Mini Kit (Invitrogen™) protokolü kullanılarak aşağıdaki protokole göre izole edilmiştir.

**PureLink™ Genomik DNA Mini Kit (Invitrogen™) Protokol**

1. Zebra balığı solungaç dokuları -80 °C'den hızlı bir şekilde kuru parçalama için 2 adet demir bilye ve 1 kaşık cam bilye içeren eppendorflara aktarılarak, TissueLyzer (QIAGEN marka) cihazında parçalanmıştır.
2. Parçalanan hücrelerin üzerine 180 µl Genomik Digestion Buffer eklenerek vortekslenmiştir.
3. Ardından örneklerin üzerine 20 µl Proteinaz K eklenerek tekrar vortekslenmiştir.
4. Örnekler çalkalamalı inkübatör üzerinde 55 °C'de 300 rpm'de 1-2 saat inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyon sonrasında 20 µl RNaz A eklenip, tekrar vortekslenerek ve oda sıcaklığı şartlarında 2 dk inkübe edilmiştir.
6. Oluşan karışımın üstüne 200 µl Genomik Lizis/Binding Buffer eklenip homojenliği sağlanıncaya kadar vortekslenmiştir.
7. Üzerine %96'lık 200 µl etanol eklenerek vortekslenmiş sonrasında 1,5 ml'lik tüp içindeki karışım, kitte yer alan spin kolonlara aktarılmıştır.
8. 10000 g'de 1 dk oda sıcaklığında kolonlar santrifüj edilmiş ve kolonların altındaki tüp içindeki sıvı ile beraber atılıp, kolonlarda temiz tüplere alınmıştır.
9. 500 µl birinci yıkama tamponu kolonlara eklenerek sonrasında 10000 g'de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj işlemi yapılmıştır.
10. 500 µl ikinci yıkama tamponu kolonlara eklenip sonrasında en yüksek hızda 3 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.

11. Yeni 1,5 ml'lik tüplere alınan kolonların üstüne 50 µl Genomik Elution Buffer eklenip 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve en yüksek hızda olmak üzere 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
12. Santrifüj işlemi sonunda, altta kalmış olan sıvıda genomik DNA yer almaktadır.
13. Genomik DNA'ların saflıkları ile miktarlarını ölçülebilmesi amacıyla Nanodrop cihazı (Optizen, Nano Q) kullanılmış olup ardından +4°C'de saklanmıştır.

### 3.4.2. RAPD Yöntemi

RAPD-PCR işlemi için daha önce izole edilen genomik DNA'lar, PCR reaksiyonundan önce DNaz/RNaz içermeyen suyla uygun olan konsantrasyona eşitlenerek kalıp DNA olarak kullanılmıştır. RAPD-PCR analizinde; standart 50 µL PCR reaksiyonu (kalıp DNA, AmpliTaq Gold PCR Master Mix, primer ile nükleaz içermeyen su) hazırlanarak, 25 µL Master Mix, 23 µL primer ve 2 µL DNA olacak şekilde pipetlenmiştir. PCR işlemi Applied Biosystems® ProFlex™ cihazında reaksiyon 1 döngü 3 dakika 95 °C, 40 döngü 30 saniye 95 °C, 40 döngü 30 saniye 37 °C, 40 döngü 90 saniye 72 °C, 1 döngü 30 dakika 72 °C olmak üzere reaksiyon başlatılmıştır. Bu çalışmada toplam 5 farklı 9-11 bazlık RAPD primerleriyle çalışılmış ve analizlerde kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** RAPD'de Kullanılan Primerler ve Sekansları

| Primerler | Sekansları |
|---|---|
| **AP5** | 5' TCCCGCTGCG 3' |
| **16 OPC 11** | 5' AAAGCTGCGG 3' |
| **O OPO 10** | 5' GTGATCGCAG 3' |
| **P2** | 5' GTAGCTGACG 3' |
| **20 OPC 15** | 5' GACGGATCAG 3' |

### 3.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

RAPD-PCR işlemi sonrasında meydana gelen ürünler agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinin uygulama basamakları aşağıda verilmiştir;

1. 2X TAE (Tris 1.6 M, asetik asit 0.8 M, EDTA 40 mM) tamponuyla %2'lik agaroz jel hazırlanarak içine 8 µL Etidyum Bromid eklenmiştir.
2. Jel, kaset içine dökülerek daha sonra taraklar takılmış donması için bırakılmıştır.
3. Kasetin tarakları çıkartılarak tanka yerleştirilmiş ve üzeri 2X TAE tamponuyla tamamlanmıştır.
4. Marker olarak ilk ve son kuyucuklara 100 bp DNA Ladder (FERMANTAS) 6 µL, diğer kuyucuklara ise örnekler 12 µL olacak şekilde pipetlenerek yüklenmiştir.
5. Tankın güç kaynağına bağlantısı sağlanarak 70-80 Volt'da 4 saat yürütülmüştür.
6. Süre sonunda elde edilen bantlar UV transilluminator (Infinity Capture, Vilber Lourmat) izlenerek fotoğraflanarak sonrasında BIO-1D++ programı kullanılarak moleküler ağırlık (baz çifti) analiz edilmiştir.

### 3.4.4. Genomik Kalıp Kararlılığı (GKK)

GKK, RAPD yöntemiyle elde edilen veriler kullanılarak hesaplanmıştır. Bu işleme göre;

$c = (a+ b)/2$

$GKK (\%) = [1- (c/n)] \times 100$

a = yeni oluşan bantlar,

b = kaybolan bantlar,

c = toplam polimorfik bant sayısının ortalaması,

n = kontroldeki toplam bantların sayısını ifade etmektedir (Atienzar et al., 1999a) .

### 3.5. Ribonükleik Asit (RNA) Analizi

#### 3.5.1. RNA Miktarının Belirlenmesi ve Tamamlayıcı DNA (cDNA) Eldesi

RNA izolasyonunda Total RNA PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies, USA) kullanılmış ve izolasyon kit protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

**PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies, USA) Protokol**

1. Solungaç dokuları -80 °C'den hızlıca alınıp, 2 adet demir bilye 1 kaşık cam bilye içeren eppendorflara aktarılmış, TissueLyser (QIAGEN) cihazında kuru parçalama işlemi yapılmıştır.
2. Her bir örnek üzerine 300 µL %1'lik 2- merkaptoetanol içeren lizis tamponu eklenmiş 30 sn kadar santrifüj edilmiştir.
3. Örnekler oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk boyunca çalkalama cihazında inkübe edilmiş, hücrelerin parçalanması sağlanmıştır (Lizis).
4. 1:1 oranında %70' lik etanol eklenmiş, hızlı bir şekilde vortekslenmiştir.
5. Bu karışım spin kolonlara aktarılarak 12.000 G'de 15 saniye 25 °C'de santrifüj edilmiş ve altta biriken sıvı uzaklaştırılmıştır.
6. Kolon üzerine 700 µl birinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 G'de 15 saniye 25°C'de santrifüj edilip sonrasında spin kolonların alt tüpleri içindeki sıvıyla birlikte uzaklaştırılmıştır.
7. Kolon üzerine 500 µl ikinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 G'de 15 saniye 25°C'de santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır (Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır).
8. Kolon üzerindeki membranın kuruması için 2 dakika 12.000 G'de 25 °C'de santrifüj edilmiş alttaki tüp atılmış, kuruyan kolon 1,5 ml hacminde steril toplama tüplerinin içine alınmıştır.
9. Kolonun tam merkezine 30 µl RNaz içermeyen su pipetlenerek oda ısısında bir dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 12.000 G'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanmıştır.

RNA izolasyonundan sonra örneklerden, 2 µl alınıp her örnek için RNA miktar ve saflık analizi Nano Optizen Q Nanodrop cihazı ile yapılmıştır.

### 3.5.2. cDNA Eldesi

Elde edilen toplam RNA konsantrasyonları, DNA RNAaz içermeyen ultra saf su (Sigma, USA) kullanılarak eşitlenmiştir. Eşitlenmiş olan toplam RNA'lardan cDNA Ters transkriptaz (High Capacity cDNA Reverse Transcriptase) kiti (Life Technologies, USA) ile cDNA sentezi işlemi yapılmıştır.

Eşitlenmesi sağlanmış RNA'lardan her bir PCR stripine 10 µl konulmuş ve üstüne cDNA kit protokolüne göre hazırlanan 10 µl cDNA karışımı ilave edilmiştir. RNA'dan cDNA elde edilmesi işleminde kit içindeki kimyasallar ve kullanılan miktar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve miktarları.

| Madde | Hacim |
|---|---|
| **Toplam RNA** | 10 µl |
| **10 X RT Buffer (Tampon)** | 2 µl |
| **25 X dNTP Karışımı (100mM)** | 0,8 µl |
| **10X RT Random Primer (Rastgele Hekzamer)** | 2 µl |
| **MultiScribe Reverse Transcriptase (Ters Transkriptaz)** | 1 µl |
| **Nuclease Free Water (Nukleaz İçermeyen Su)** | 4,2 µl |
| **Toplam** | **20 µl** |

Thermal cycler AppliedBiosystems® ProFlex™ PCR sistemi (adım 1: 25 °C, 10 dakika; adım 2: 37 °C, 120 dakika; adım 3: 85 °C, 5 dakika) ile cDNA sentezi işlemi yapılmıştır. Elde edilmiş olan cDNA'lar sonraki analizlerde kullanılması için -20 °C'de saklanmıştır.

## 3.6. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Çalışmaları

İzole edilen RNA'lardan elde edilen bu cDNA'lar qPCR'da BlasTag 2X qPCR Mastermix (abm, USA) protokolüne uygun olarak belirlenmiş primerlerle çoğaltılmıştır.

Çoğaltma esnasında elde edilen piklere ait Ct değerleri gen ifadelerinin belirlenmesinde kullanılmış ve karşılaştırmalı döngü eşiği (ΔCt) yöntemi ile hesaplanmıştır.

Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak beta-aktin (B-Aktin) ve 18S primerleri kullanılmıştır. Gen ifadelerinin belirlenmesi için 18 genin Forward(F) ve Reverse(R) primerleri kullanılarak primer mix hazırlanmıştır (Çizelge.3.3).

**Çizelge 3.3.** qRT-PCR'da Kullanılan Genler ve Sekansları

| Genler | Genlerin Primer Kodları | Genlerin Baz Dizileri |
|---|---|---|
| **Antioksidan Savunma Sistem Genleri** | **KAT**(Katalaz) | **F 5'TCTGTTTCCGTCCTTCATCCA 3'**<br>**R 5'TCCGTATCCGTTCATATGACG 3'** |
| | **CuZn-SOD** (Bakır-Çinko Süper Oksit Dismutaz) | **F 5'TCTGAAGAAGCCCATCGAGT 3'**<br>**R 5'GCAGATAGTAGGCGTGCTCC 3'** |
| | **Mn-SOD** (Manganez Süper Oksit Dismutaz) | **F 5'GCGTGACTTTGGCTCATTTCA 3'**<br>**R 5'TGCATGCTCCCAGACATCTAT 3'** |
| | **GST**(GlutatyonS-Transferaz) | **F 5'CTGCCCTACTTGATTGATGGG 3'**<br>**R 5'CTGGATTGTAGGAGATCATGC 3'** |
| | **GPX** (Glutatyon Peroksidaz) | **F 5'CCACTTCGGACATCAGCTTC 3'**<br>**R 5'CACCGTTCACTTCCAGCTTC 3'** |
| | **MT2** (Metallotiyonin Protein Geni 2) | **F 5'GATTGCGCCAAGACTGGAACT 3'**<br>**R 5'CAGACGGGCAACAGGAACA 3'** |
| **Isı Şok Protein Geni** | **HSP70** (Isı Şoku Proteini 70**)** | **F 5'GAATCATCAACGAGCCCACAG 3'**<br>**R 5'TGCCATCTTCAATGGTCAGGA 3'** |
| **İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Geni** | **IGF2** (İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Geni 2) | **F 5'GGACGCGTACAGTTTGTGT 3'**<br>**R 5'CCTGTAGGGATGTGGCTGAA 3'** |
| **DNA Hasar Tamir Genleri** | **XPC (**Kseroderma Pigmentosum Grup C Tamir Geni) | **F 5'GCCAACATCCGTCTCAGAAT 3'**<br>**R 5'GAACGGTTGGAAAAACCAAG 3'** |
| | **XPA** (Kseroderma Pigmentosum Grup A Tamir Geni) | **F 5'GCTGGGGAGACATGAAACTC 3'**<br>**R 5'TGCTGATGAATGCTGGTGTC 3'** |
| | **XRCC3** (X-Işını Onarımı Çapraz Tamamlayıcı 3**)** | **F 5'GCCTGGTGGTCATCGACTC 3'**<br>**R 5'ACAGGGCTCTGGAAGGCACTGCTCAGG 3'** |
| **Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Genleri** | **$P21^{Cip1}$** (Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A) | **F 5'GGAAGACCATGTGGACCTGT 3'**<br>**R 5'GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA 3'** |
| | **$P27^{Kip1}$** (Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B) | **F 5'GCCCTCCCCAGTCTCTCTTTA 3'**<br>**R 5'TCAAACTCCCAAGCACCTC 3'** |

| | | |
|---|---|---|
| **Apoptoz Yolağı Genleri** | **P53** (Tümör Proteini 53) | **F 5'GCTCTGACTGTACCACCATCC 3'**<br>**R 5'CTCTCGGAACATCTCGAAGCG 3'** |
| | **BCL2** (B-Hücre lenfoma 2) | **F 5'CTGAAAACTGGACGAGGAA 3'**<br>**R 5'AAAAGGCCTCCGATGGTCACTC 3'** |
| | **BAX** (BCL-2 ile ilişkili X protein) | **F 5'GATCGGAGATGAGCTGGATG 3'**<br>**R 5'CCTGGTGGAAATAGCCTTGATG 3'** |
| | **Sitoktom C** (Sitokrom C) | **F 5'TTTGGATCCAATGGTTGATGTTGAG 3'**<br>**R 5'TTTGAATTCCTCATTAGTAGCTTTTTTGAG 3'** |
| | **Kaspaz 3** (Kaspaz 3) | **F 5'CAGGACAGGCATGAACCAAC 3'**<br>**R 5'CTGTGGTGCTTATGGGAAC 3'** |
| **Endojen (Kontrol) Genleri** | **B-Aktin** (Beta Aktin) | **F 5'CCTCTGAACCCTAAGGCCAAC 3'**<br>**R 5'TGCCACAGGATTCCATACCC 3'** |
| | **18S** | **F 5'GAGGATGAGGTGGAACGTGT 3'**<br>**R** 5'**GGACCTGGCTGTATTTTCCA 3'** |

Bu primerler kullanılarak hazırlanan primer mix ile qPCR'da BlasTag 2X qPCR Mastermix ile hazırlanan mix kullanılmış aşağıda yer aldığı gibi qRT-PCR işlemi yapılmıştır. BlasTag 2X qPCR Mastermix ROX referans boyası içerir. Bu çalışmada 2.5 ml'ye 2 µl ROX eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.

1. Real Time PCR'da kullanılan primerler kullanım için + 4 °C' de eritilmiştir.
2. Her bir örnek için,10 µl Forward Primer, 10 µl Reverse Primer, 500 µl deiyonize su karıştırılması sağlanarak total Primer Mix hazırlanmıştır.
3. 4.5 µl cDNA, BlasTag Mix 120 µl hazırlanarak iyi bir şekilde karıştırılmıştır.
4. Her bir kuyucuğa 6 µl Primer Mix, 6 µl BlasTag + cDNA mix eklenmiştir.
5. Plaka cihaza yüklenmiştir (Çizelge 3.4).
6. PCR işlemi bitiminde sonuçlar analiz edilerek ilgili dosyaya kaydedilmiştir.

**Çizelge 3.4.** qRT-PCR Döngüsü.

| ADIM | SICAKLIK | SÜRE | DÖNGÜ |
|---|---|---|---|
| **Enzim Aktivasyonu** | 95 °C | 10 dakika | 1 |
| **Denatürasyon** | 95 °C | 15saniye | |
| **Primer Bağlanma ve Zincirin Uzaması** | 60 °C | 1 dakika | 52 |
| **Erime Eğrisi** | 95 °C | 15saniye | 1 |

### 3.7. İstatistik Analizler

$LC_{50}$ 96 saat değeri hesaplamaları için IBM® (International Business Machines) SPSS Statistics 22 programında Probit analizine göre yapılmıştır. RAPD analizi sonucunda % GKK verileri ile gen ifadesi seviyelerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde; kontrol grubu ile diğer deneme gruplarının karşılaştırılmasında ve ortalamaların girmiş olduğu grupların tespit edilmesinde Tukey Testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde anlamlılık düzeyi ($p \leq 0.05$) olacak şekilde SPSS 22 yazılımı kullanılmıştır. Verilerin ortalaması, standart sapmaları ve grafiklerin oluşturulmasında Microsoft Office Excel 2016 programından yararlanılmıştır.

# BÖLÜM 4

# SONUÇLAR

## 4.1. Kuinklorak Herbisitinin $LC_{50}$ Konsantrasyonu Probit Analizi

$LC_{50}$ 96 saat değerleri SPSS programında Probit analizi ile hesaplandığında; $LC_{50}$ 96 saat değeri: 354,009 mg/L, Alt limit değeri: 349,660 mg/L, Üst Limit değeri:358,409 mg/L olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

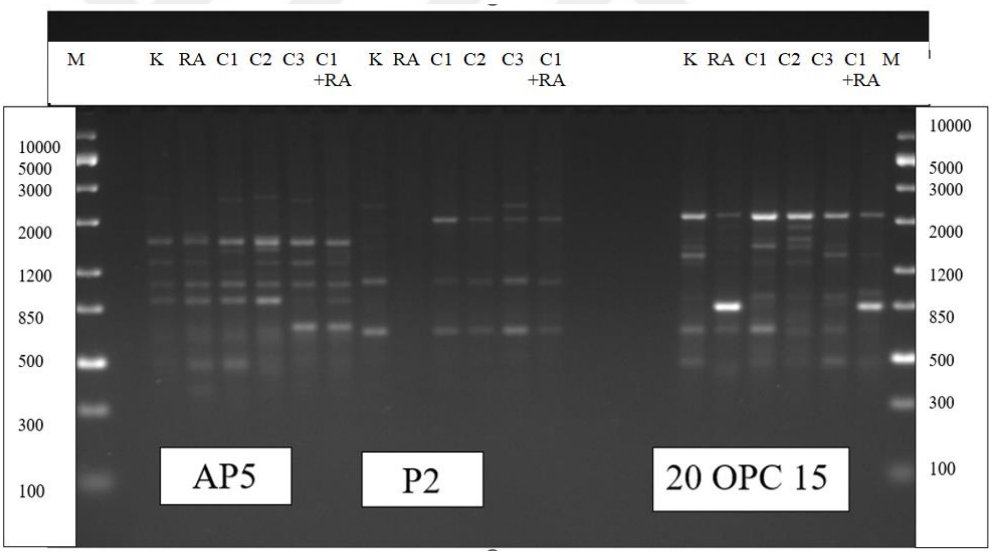
**Çizelge 4.1.** 300-370 mg/L Kinklorak (Faset ®) muamelesi sonrası, 24-96 saat aralığında elde edilen veri tablosu.

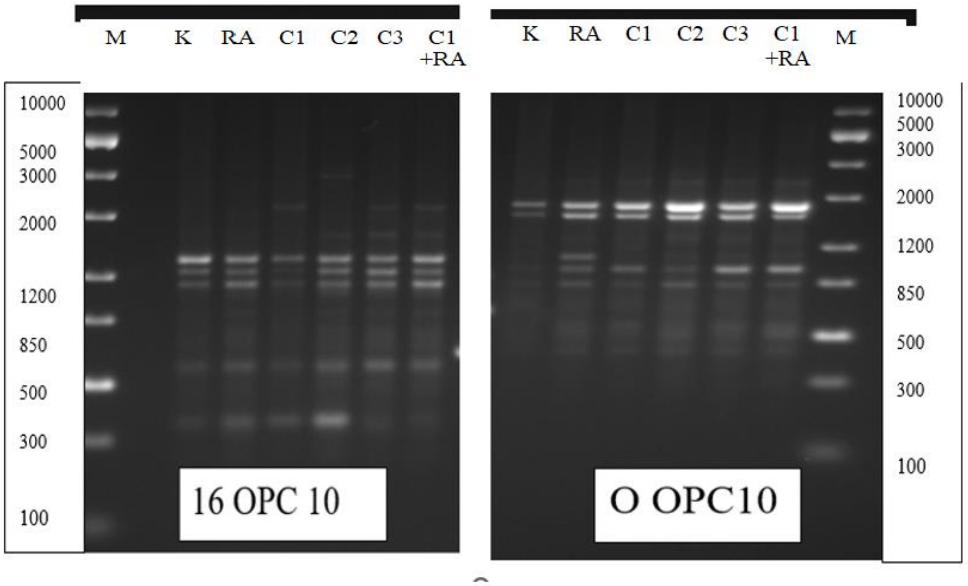
| Kontrol ve Konsantrasyonlar | Hayvan Sayısı | 24 saat | 48 saat | 72 saat | 96 saat | Toplam ölüm |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol 1.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **Kontrol 2.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **Kontrol 3.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **300 mg/L 1.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **300 mg/L 2.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **300 mg/L 3.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **340 mg/L 1.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **340 mg/L 2.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **340 mg/L 3.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **350 mg/L 1.Tekrar** | 5 | - | - | - | - | 0 |
| **350 mg/L 2.Tekrar** | 5 | 1 | - | - | - | 1 |
| **350 mg/L 3.Tekrar** | 5 | 1 | - | - | - | 1 |
| **360 mg/L 1.Tekrar** | 5 | 3 | - | - | 2 | 5 |
| **360 mg/L 2.Tekrar** | 5 | 3 | - | - | - | 3 |
| **360 mg/L 3.Tekrar** | 5 | 5 | - | - | - | 5 |
| **370 mg/L 1.Tekrar** | 5 | 5 | - | - | - | 5 |
| **370 mg/L 2.Tekrar** | 5 | 5 | - | - | - | 5 |
| **370 mg/L 3.Tekrar** | 5 | 5 | - | - | - | 5 |

## 4.2. RAPD Sonuçları (Toplam DNA Hasarı)

Genotoksik etkinin göstergelerinden biri DNA polimorfizmidir. DNA polimorfizmi tespit edilmesi için yapılan çalışmada 5 farklı primer ile Şekil 4.1'deki RAPD bant profilleri elde edilmiştir. Yeni oluşan ile kaybolan bantların moleküler büyüklükleri Çizelge 4.2'de, sayıları ise Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek bant değişimi, en yüksek test konsantrasyonu olan 177,00 mg/L'de (3 kaybolan bant, 12 yeni oluşan bant) meydana gelmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2). % GKK'de meydana gelen değişimler hesaplandığında, 177,00 mg/L (P=0,009); 44,25 mg/L (P=0,033);177,00 mg/L+100 µM RA da (P=0,033); konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı azalış tespit edilmiştir. En fazla oranda % GKK azalması en yüksek test konsantrasyonu olan 177,00 mg/L uygulaması sonucu meydana gelmiştir.






**Şekil 4.1.** Herbisit muamelesi sonucu farklı primerlere ait RAPD profilleri.

M:Marker (Zip Ruller DNA İşaretleyici standart bp uzunlukları). K:Kontrol, RA:100 µM RA, C1:$LC_{50}$/2 mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, C2:$LC_{50}$/4 mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, C3:$LC_{50}$/8 mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, C1+RA: $LC_{50}$/2 mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

**Çizelge 4.2.** RAPD profillerinde yeni oluşan ve kaybolan bantların moleküler büyüklükleri (baz çifti).

K: Kaybolan bantlar; Y: Yeni Oluşan bantlar (-: kaybolan veya yeni oluşan bant olmadığını ifade etmektedir).

| PRİMER | KONTROL | RA (100 µM) | C1 (177,0 mg/L) | C2 (88,50 mg/L) | C3 (44,25 mg/L) | C1+RA (177,0 mg/L+100 µM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AP5 | 1697,1349,1081, 931 | K:-__ Y:504 | K:1349 Y:2694,1526, 1208,504 | K:- Y:2694 | K:931 Y:2694,730 | K:- Y:730 |
| P2 | 2467,1142,709 | K:2467,1142, 709 Y:- | K:2467 Y:2098 | K:2467 Y:2098 | K:- Y:2098 | K:2467 Y:2098 |
| 20 OPC 15 | 2141,1556,1400, 685,500 | K:1556,1400 Y:850 | K:- Y:1286,967 | K: 500 Y:1860,1700 | K: 1556 Y: - | K:1556,685, 500 Y: 967,850 |
| 16 OPC 11 | 1505,1344, 1191,621,358 | K:- Y:- | K:1344 Y:2239 | K:- Y:3047 | K:- Y:2265,1800 | K:358 Y:2291,1800 |
| 0 OPC 10 | 1918,1767, 1019,850 | K:- Y:1152,569, 454 | K:- Y:2608,1284, 569,454 | K:- Y:2608,569, 454 | K:- Y:2608,569, 454 | K:- Y:569,454 |

**Çizelge 4.3.** RAPD profillerinde yeni oluşan ve kaybolan bantların sayısı.

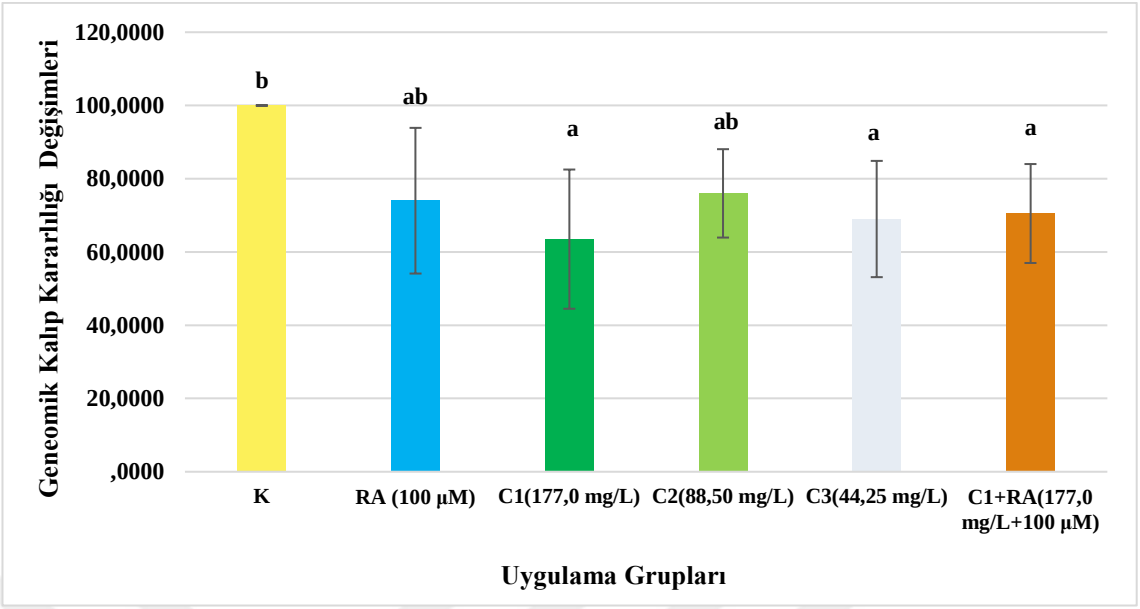
**K**: Kaybolan bantlar; **Y**: Yeni Oluşan bantlar. **K**:Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

| **Primerler** | **Kontrol Grubu** | **RA** (100 µM) | | **C1** (177,0 mg/L) | | **C2** (88,50 mg/L) | | **C3** (44,25 mg/L) | | **C1+RA** (177 mg/L+100 µM) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **K** | **Y** | **K** | **Y** | **K** | **Y** | **K** | **Y** | **K** | **Y** |
| **AP5** | 4 | 0 | 1 | 1 | 4 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| **P2** | 3 | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| **20 OPC15** | 5 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 3 | 2 |
| **16 OPC11** | 5 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| **0 OPC 10** | 4 | 0 | 3 | 0 | 4 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 2 |
| **Toplam Bant** | 21 | 5 | 5 | 3 | 12 | 2 | 8 | 2 | 8 | 5 | 8 |
| **K+Y** | | **10** | | **15** | | **10** | | **10** | | **13** | |

**Çizelge 4.4.** Balık solungaç dokusunda herbisit uygulamasına bağlı % GKK' de meydana gelen değişimler

(Ort: Ortalama; SS: Standart sapma). Anlamlılık sonuçları P≤0,05 * ; P≤0,01 ** olmak üzere değerlendirilmiştir. **K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

| **Primer** | **KONTROL** | **RA** (100 µM) | **C1** (177,0 mg/L) | **C2** (88,50 mg/L) | **C3** (44,25 mg/L) | **C1+RA** (177 mg/L+100 µM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **AP5** | 100 | 87.5 | 37,5 | 87,5 | 62,5 | 87,5 |
| **P2** | 100 | 50 | 70 | 70 | 50 | 70 |
| **20 OPC 15** | 100 | 70 | 80 | 70 | 90 | 50 |
| **16 OPC 11** | 100 | 100 | 80 | 90 | 80 | 70 |
| **0 OPC 10** | 100 | 62,5 | 50 | 62,5 | 62,5 | 75 |
| **Ort ± SS** | **100** | **74 ±19,8** | **63,5±19,0**** | **76,00±12,0** | **69,00±15,8*** | **70,50±13,5*** |




**Şekil 4.2.** Balık solungaç dokusunda meydana gelen % GKK değişimleri

Grafiklerde veriler üstünde görülen Tukey testi sonucunda elde edilmiş farklı harfler istatistiksel açıdan birbirinden farklı olan grupları temsil etmektedir. **K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

## 4.3. Gen İfadesi Sonuçları

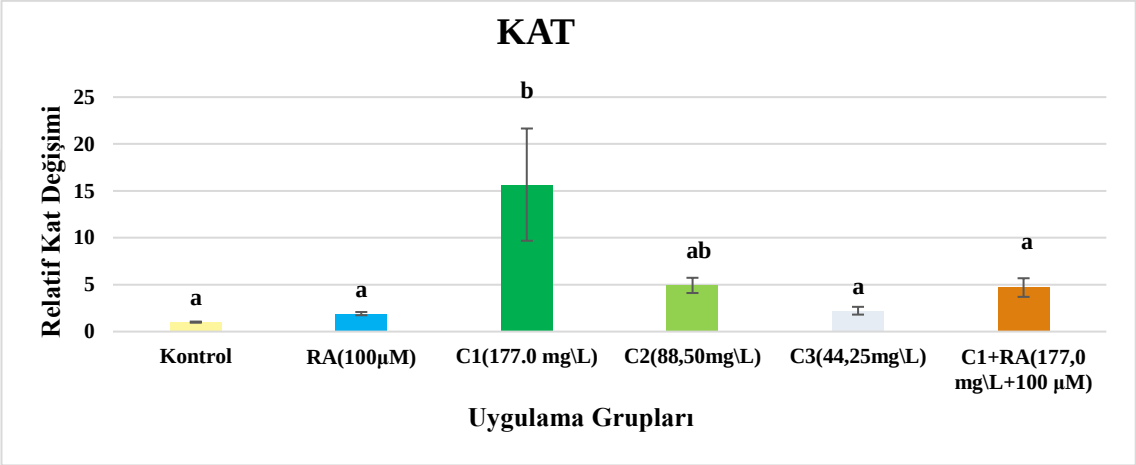
### 4.3.1. Antioksidan Enzimler

Farklı herbisit uygulamaları organizmalarda oksidatif stres kaynaklı ROT üretilmesine sebebiyet verebilir. Antioksidan sisteminin yetersizliğinde ROT düzeyleri gen baskılanması ya da fazla ifadesi gibi genotoksik etkilere neden olmaktadır. Antioksidan genler, oksidatif stresin izlenmesinde hızlı ve duyarlı biyobelirteçlerdir. Zebra balığı solungaç doku örnekleri üzerinde uygun analizler yapılmış, antioksidan gen belirteçlerinden KAT, Cu-Zn SOD, Mn-SOD, GST, GPX, MT2 ifadeleri ölçülmüştür.

#### 4.3.1.1. Katalaz

KAT, ana hücresel antioksidan enzimlerden biridir ve oksidatif stres sırasında fazla hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasını sağlar. Glikoprotein bir yapı teşkil eden hemoproteindir. Hidrojen peroksitin artış gösterdiği durumlarda yüksek aktivite göstermektedir. Zebra balığı solungaç doku örneklerine ait KAT geni ifade düzeyleri

verilmiştir (Şekil 4.3). Sonuçlar incelendiğinde RA, C1, C2, C3, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla P=1,00 (1,91±0,17), P=0,003 (15,6±5,98), P=0,875 (4,92±0,81), P=0,999 (2,22±0,41), P=0,900 (4,69±0,99) kat artma tespit edilmiştir (Ortalama±Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda C1'de (P=0,003**) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplarda kontrole göre bir artış görülse de istatistiksel olarak farklılık tespit edilmemiştir.



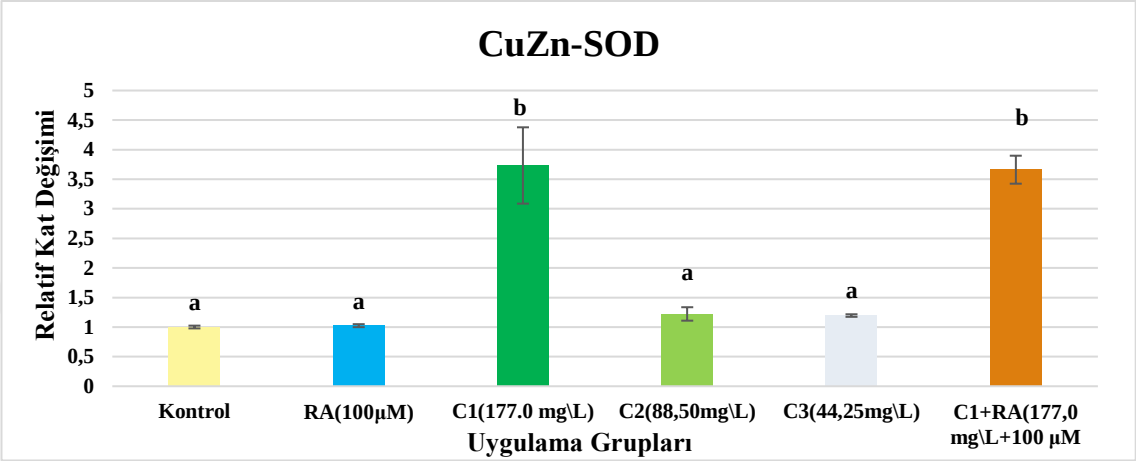

**Şekil 4.3.** KAT gen ifadesinde meydana gelen değişimler.

Grafiklerde veriler üstündeki Tukey testi sonucunda elde edilmiş farklı harfler istatistiki açıdan birbirinden farklı olan grupları temsil etmektedir. Anlamlılık sonuçları P≤0,05*; P≤0,01**; P≤0,001*** olacak şekilde değerlendirilmiştir. Bu aşağıda yer alan tüm ifade değişimleri için geçerlidir. **K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak**, C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.1.2. CuZn-SOD

CuZn-SOD hücrelerdeki süperoksit radikallerini etkisiz hale getirerek zararlarını önlerler. CuZn-SOD, süperoksit serbest radikallerinin hidrojen peroksit ve oksijene dönüşmesi olayını katalize edilmesinde görev alır. Ökaryotların sitoplazmasında, kloroplastlarda ve bazı prokaryotların periplazmasında bulunur. CuZn-SOD geni ifade düzeyleri verilmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde RA, C1, C2, C3, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla P=1,00 (1,02±0,02), P=0,000 (3,73±0,64), P=0,994 (1,22±0,11), P=0,996 (1,19±0,02), P=0,000 (3,66±0,23) kat artma gözlenmiştir

(Ortalama±Standart hata). İstatistik analiz sonucunda en yüksek uygulama grubu olan C1'de (P=0,000***); en yüksek uygulama RA eklenmesiyle elde edilen C1+RA'da (P=0,000***) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki artma istatistiksel olarak bir fark oluşturmamıştır.

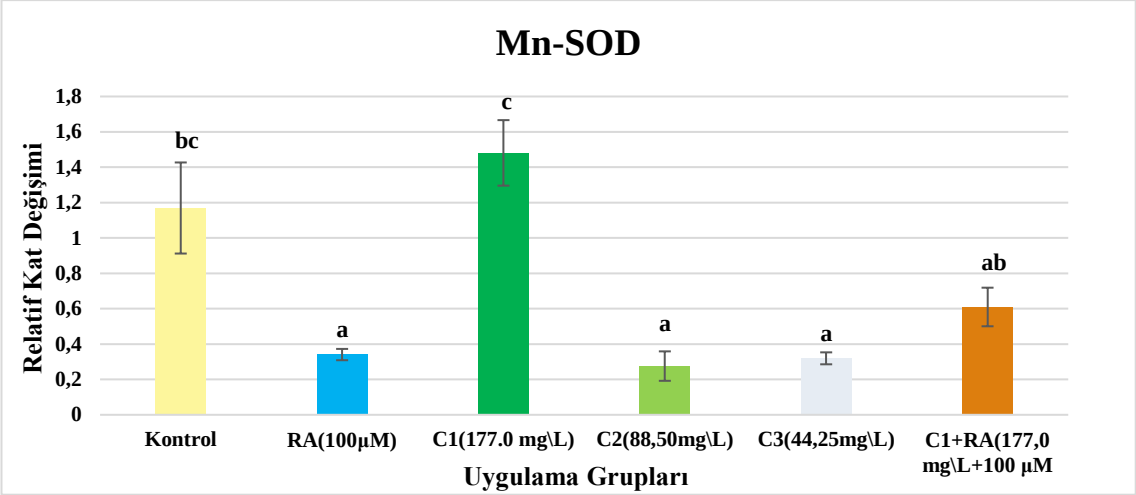



**Şekil 4.4.** CuZn-SOD gen ifadesinde meydana gelen değişimler.

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.1.3. Mn-SOD

Mn-SOD stres koşullarında hücrede meydana gelen aktif süperoksit anyon radikalinin nötralize edilmesini sağlar. Bakteriler, arkeler, mitokondri ve kloroplastlarda bulunur. Mn-SOD gen ifade düzeyleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Mn-SOD gen ifade düzeyleri incelendiğinde, RA, C2, C3, C1+RA kontrole göre sırasıyla P=0,003 (0,34±0,03), P=0,001 (0,27±0,08), P=0,003 (0,31±0,03), P=0,089 (0,60±0,10) kat azalma; C1 grubunda ise P=0,638 (1,48±0,18) kat artma gözlenmiştir (Ortalama±Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda RA (P=0,003**); C2 (P=0,001***); C3 (P=0,003**) gruplarında kontrole göre anlamlı azalış gözlenmiştir. C1+RA grubundaki değişim anlamlı değildir.

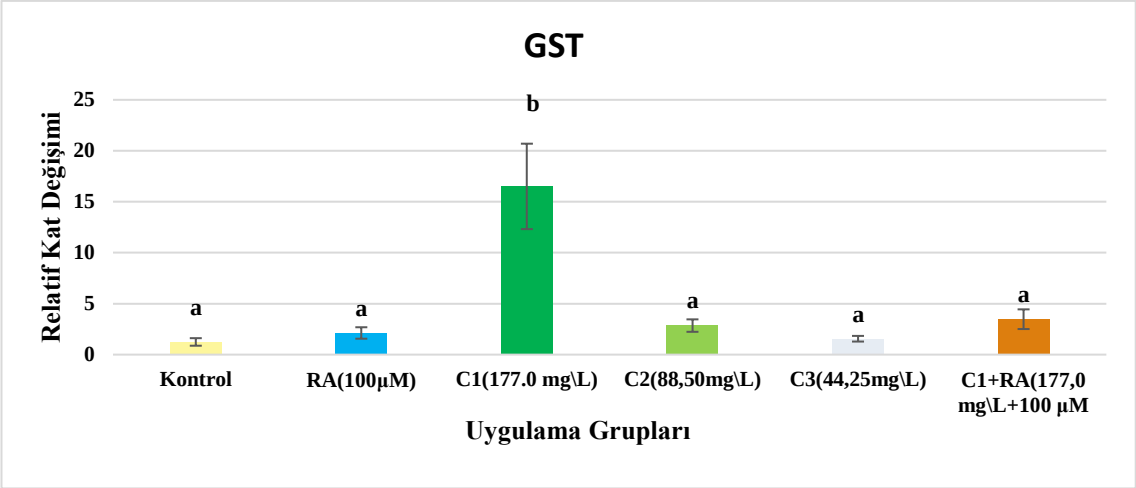



**Şekil 4.5.** Mn-SOD gen ifadesinde meydana gelen değişimler.

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.1.4. GST

GST, oksidasyon sonrasında ortaya çıkan ürünlerin, yabancı toksik maddelerin, vücuttaki diğer makromoleküller ile birleşmesini engel olup hücre komponentlerine hasar oluşturmadan vücuttan atılmasında rol oynar. İndirgeme özelliği sayesinde, koruyucu etki göstererek membran bileşenlerini lipit peroksidasyonundan korur. GST gen ifade düzeyleri Şekil 4.6'da yer almaktadır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında RA, C1, C2, C3, C1+RA kontrole göre sırasıyla P=0,999 (2,12±0,56), P=0,000 (16,5±4,19), P=0,988 (2,84±0,61), P=1,00 (1,55±0,27), P=0,949 (3,47±0,96) kat artma görülmüştür (Ortalama± Standart hata). İstatistik analiz sonucunda C1'de (P=0,000***) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

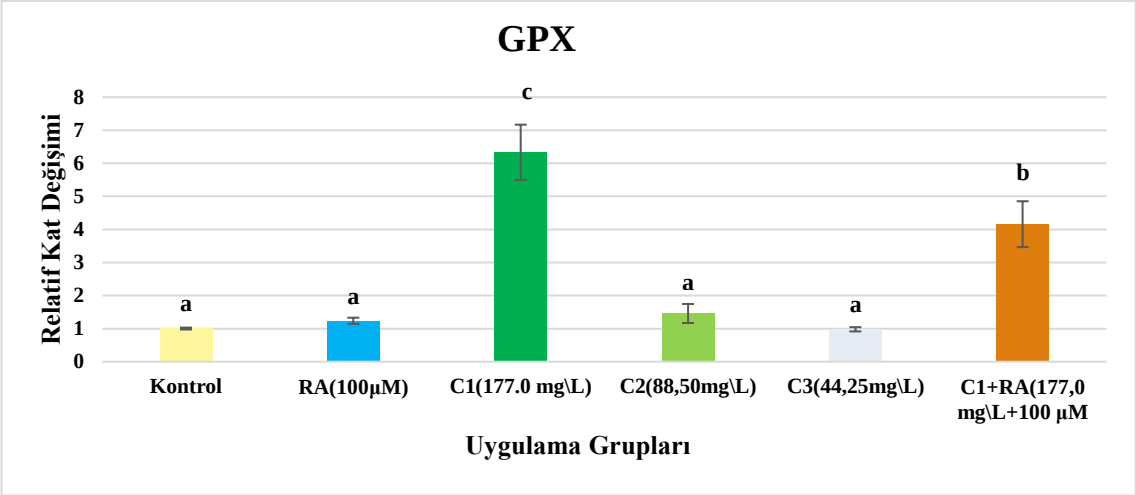



**Şekil 4.6.** GST gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.1.5. GPX

GPX, hidrojen peroksitin GSH tarafından indirgenme tepkimesinin katalizlenmesinde görev alır. GPX gen ifade düzeyleri Şekil 4.7'de yer almaktadır. Yapılan analizlere bakıldığında RA, C1, C2, C1+RA kontrole göre sırasıyla P=0,999 (1,23±0,09), P=0,000 (6,33±0,83), P=0,981 (1,45±0,28), P=0,000 (4,15±0,69) kat artma C3'de P=1,00 (0,97±0,06) azalma tespit edilmiştir (Ortalama±Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda C1 konsantrasyonunda (P=0,000***); C1+RA konsantrasyonunda (P=0,000***), kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki değişim anlamlı değildir.

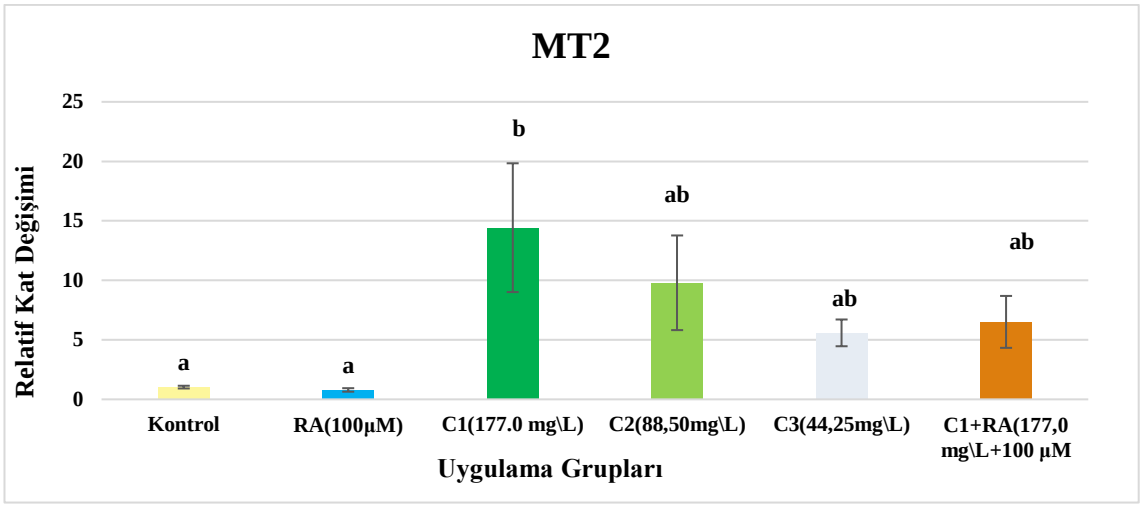



**Şekil 4.7.** GPX gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.1.6. MT2 Gen İfadesi

MT2, serbest radikal süpürücüsü olmasının yanında apoptozda ve intraselülar redoks dengesinin ayarlanmasında rol oynar. MT2 gen ifadeleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Gen ifadeleri değerlendirildiğinde; C1, C2, C3, C1+RA kontrole göre sırasıyla P=0,031 (14,4±5,41), P=0,303 (9,79±3,97), P=0,876 (5,58±1,12), P=0,768 (6,50±2,18) kat artma RA'da ise P=1,00 (0,79±0,14) kat azalma görülmüştür (Ortalama±Standart hata). İstatistik analiz sonucunda C1 konsantrasyonunda (P=0,031*) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki değişimler anlamlı değildir.

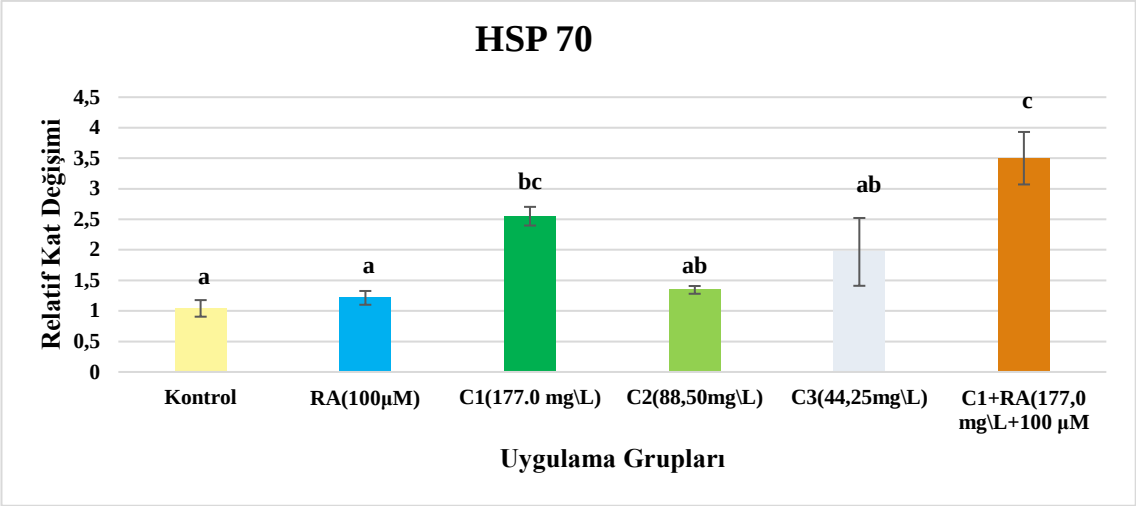



**Şekil 4.8.** MT2 gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**:Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.2. HSP 70 Gen İfadesi

Stres altında, proteinler doğru bir şekilde katlanamaz ve hidrofobik bölgeler açığa çıkar. Bu durum, proteinlerin birbirine yapışarak agregat (yığılma) oluşturmasına neden olabilir. Hsp70, bu yanlış katlanmış proteinlere bağlanarak agregat oluşumunu engeller ve zararlı protein birikimlerinin hücreye zarar vermesini önler. Zebra balığı solungaç doku örneklerine ait HSP70 geni ifade düzeyleri Şekil 4.9'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde RA, C1, C2, C3, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla P=0,999 (1,21±0,11), P=0,016 (2,55±0,15), P=0,980 (1,34±0,06), P=0,287 (1,96±0,55), P=0,000 (3,50±0,42) kat artma tespit edilmiştir (Ortalama±Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda HSP70 gen ifadeleri incelendiğinde, C1 konsantrasyonunda (P=0,016**), C1+RA konsantrasyonunda (P=0,000***) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki artma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

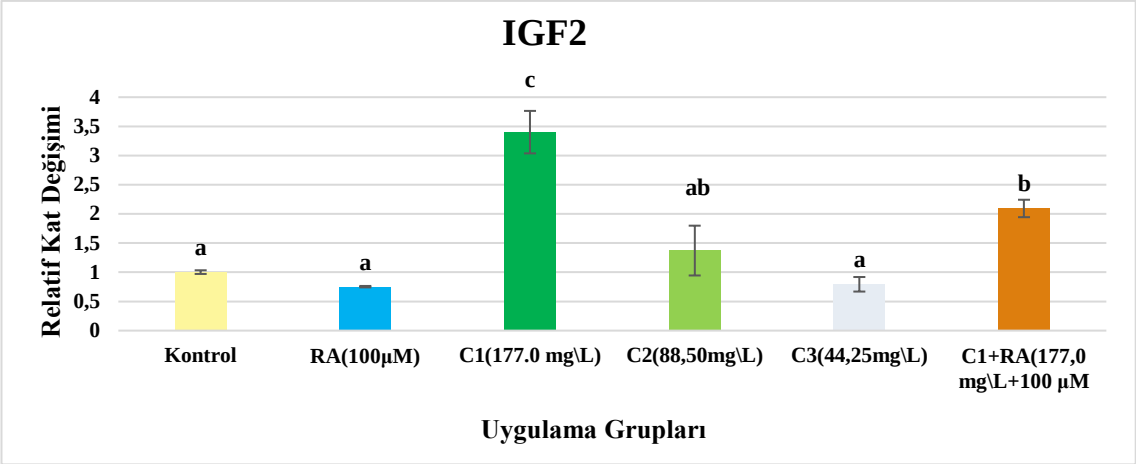



**Şekil 4.9.** HSP70 gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.3. IGF 2 Gen İfadesi

IGF2, hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde ve epitel hücre yenilenmesinde görevli olan mitojenik ve anti-apoptotik bir moleküldür. Zebra balığı solungaç doku örneklerine ait IGF2 gen ifade düzeyleri Şekil 4.10'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, C1, C2, C3, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla P=0,000 (3,40±0,36), P=0,887 (1,37±0,42), P=0,037 (2,09±0,14) kat artma RA ve C3 gruplarında P=0,997 (0,75±0,012), P=0,990 (0,79±0,12) kat azalma tespit edilmiştir (Ortalama±Standart hata). Yapılan analiz sonucunda, C1 konsantrasyonunda (P=0,000***), C1+RA konsantrasyonunda (P=0,037*) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki değişim anlamlı değildir.




**Şekil 4.10.** IGF2 gen ifadesinde meydana gelen değişimler

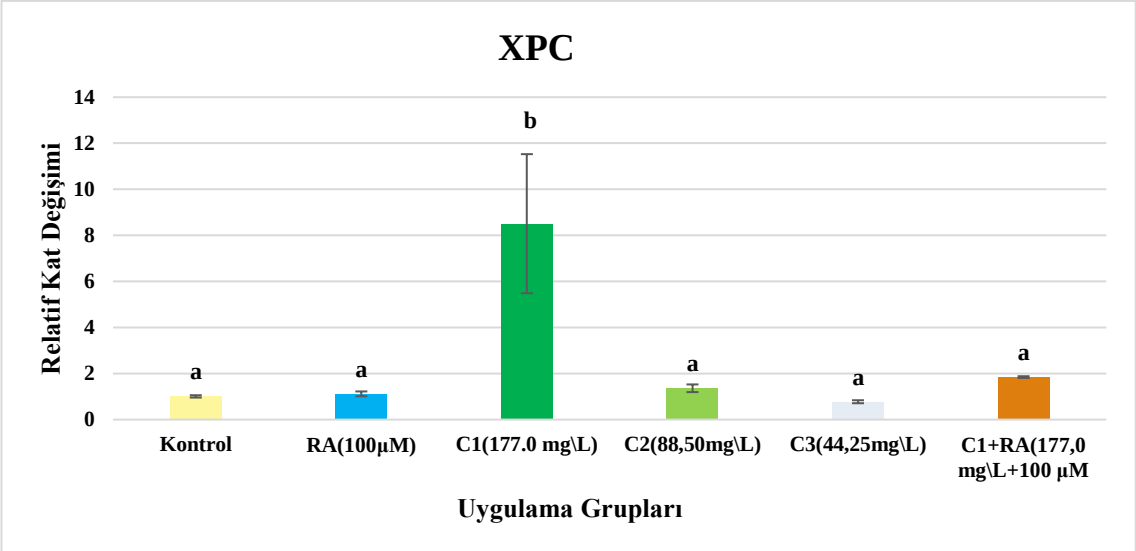
**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.4. DNA Tamir Gen İfadeleri

Genom, çevresel faktörler yüzünden sürekli olarak devamlı uğrayarak hasar görür. Onarılamayan DNA hasarı lezyonlara, apoptoza ve çeşitli hastalıklara yol açar. DNA onarım enzimleri genomun bütünlüğünün korunmasında önemlidir. Zebra balığı solungaç doku örnekleri üzerinde uygun analizler yapılmış, DNA tamir gen belirteçlerinden XPA, XPC, XRCC3 ifadeleri ölçülmüştür.

#### 4.3.4.1. XPC Gen İfadesi

XPC, nükleotid eksizyon onarımında hacimli DNA eklentilerinin tanınmasında rol oynar. XPC proteini genomda heliksteki bozuklukları tanıyıp, hasarlı bölgeye yerleşen ilk proteindir. XPC gen ifadeleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Gen ifadeleri değerlendirildiğinde, RA, C1, C2, C1+RA kontrole göre sırasıyla P=1,00 (1,11±0,10), P=0,002 (8,50±3.02), P=1,00 (1,35±0,16), P=0,997 (1,84±0,03) kat artma C3 de ise P=1,00 (0,77±0,06) kat azalma görülmüştür (Ortalama±Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda C1 konsantrasyonunda (P=0,002**) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

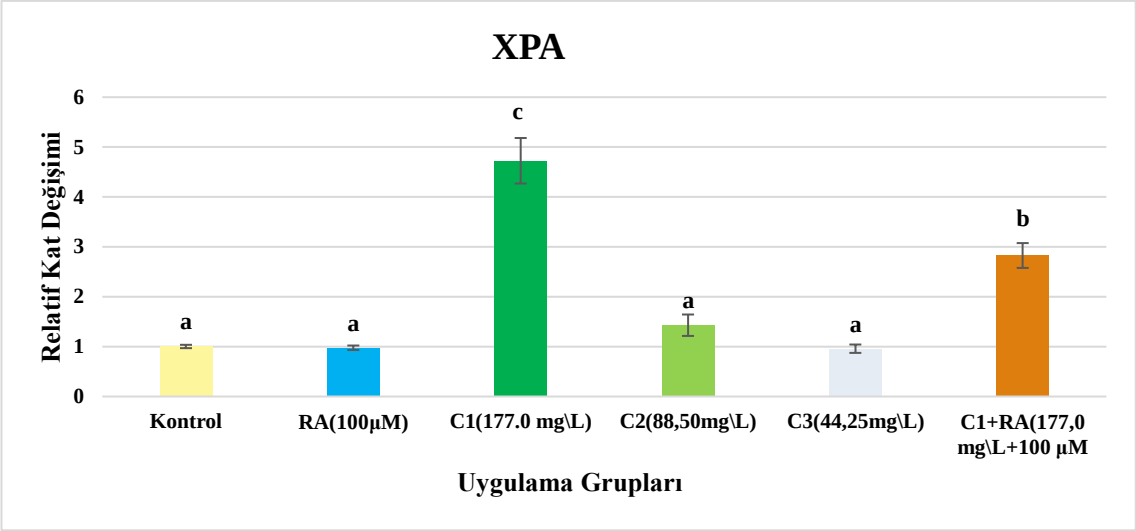



**Şekil 4.11.** XPC gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.4.2. XPA Gen İfadesi

XPA, hasarlı bölgeye girip açık DNA kompleksini meydana getirmesine engel olmaktadır ve bu açık yapıyı stabilize edip hasar almamış diziyi yanlış kesimden korunmasını sağlar. Zebra balığı solungaç doku örneklerine ait XPA geni ifade düzeyleri verilmiştir (Şekil 4.12). XPA gen ifadeleri incelendiğinde, C1, C2, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla P=0,000 (4,72±0,45), P=0,787 (1,42±0,21), P=0,000 (2,82±0,24) kat artma, RA ve C3 gruplarında ise P=1,00 (0,97±0,045), P=1,00 (0,95±0,08) kat azalma tespit edilmiştir (Ortalama±Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda XPA gen ifadeleri incelendiğinde, C1 konsantrasyonunda (P=0,000***); C1+RA konsantrasyonunda (P=0,000***), kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki değişimler anlamlı değildir.

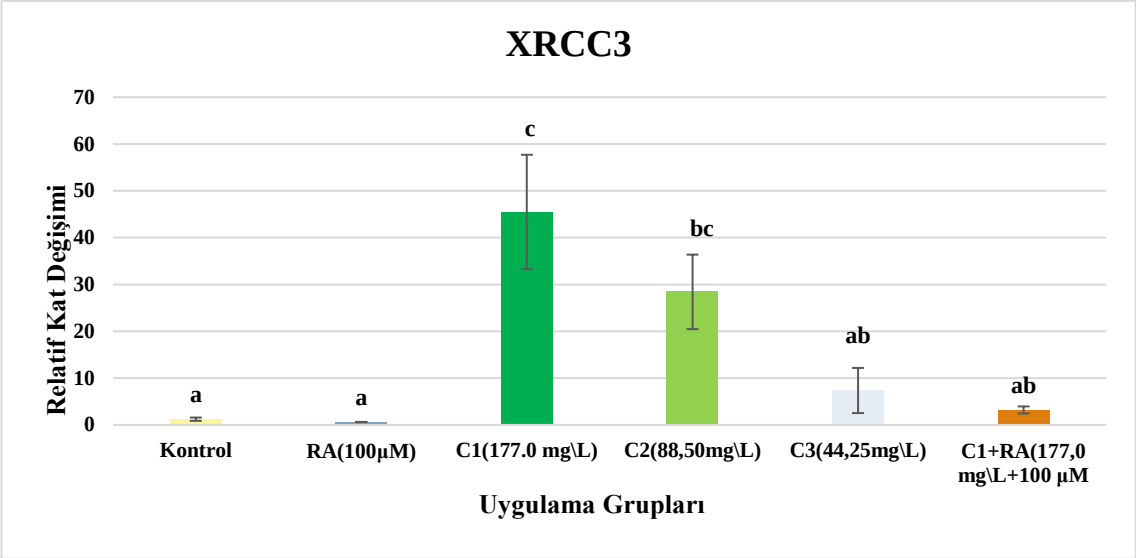



**Şekil 4.12.** XPA gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.4.3. XRCC3 Gen İfadesi

XRCC3, kromozom stabilitesini korumak ve DNA hasarını onarmak için homolog rekombinasyona katılan RecA/Rad51 ile ilişkili protein ailesinin bir üyesini kodlar. XRCC3 gen ifadeleri Şekil 4.13'te gösterilmiştir. XRCC3 gen ifadeleri incelendiğinde, C1, C2, C3, C1+RA kontrole göre sırasıyla P=0,000 (45,48±12,22), P=0,048 (28,41±7,96), P=0,982 (7,34±4,82), P=1,00 (3,19±0,75) kat artma RA' da ise P=1,00 (0,62±0,02) kat azalma görülmüştür (Ortalama±Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda, C1 konsantrasyonunda (P=0,000***), C2 konsantrasyonunda (P=0,048*) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplarda kontrole göre artmalar görülse de istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı değildir.




**Şekil 4.13.** XRCC3 gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

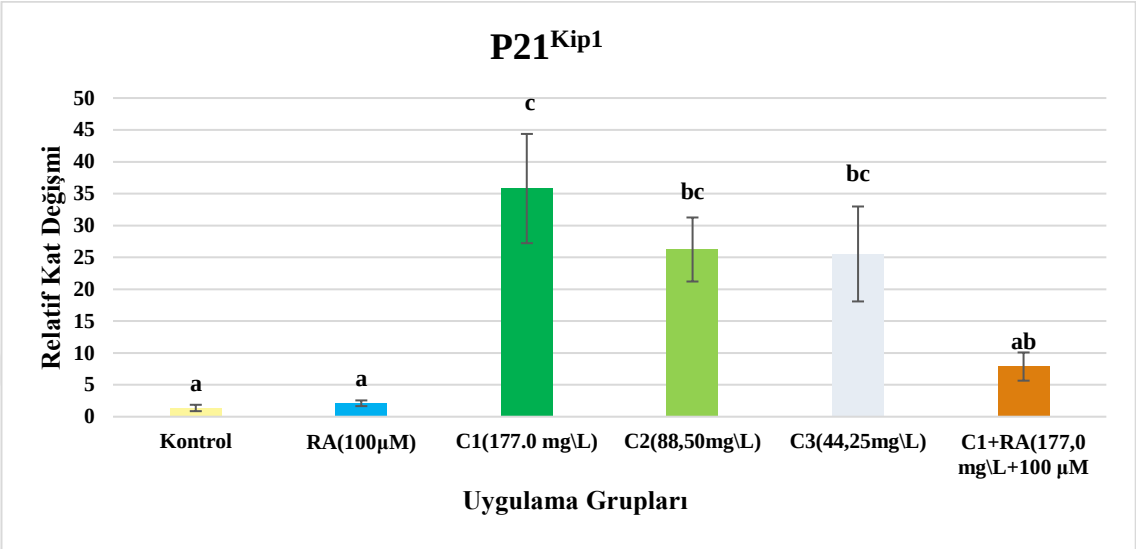
### 4.3.5. Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Gen İfadeleri

Hücre döngüsü, genetik materyalin kopyalanmasını ve hücre bölünmesini sağlayan organize bir süreçtir. Proliferasyon, siklinler ile kompleks halinde hareket eden sikline bağlı kinaz (CDK) tarafından düzenlenir. Siklin/sikline bağımlı kinaz kombinasyonları, G1, G1/S, S ve G2/M fazlarında hücre döngüsü olaylarını yönlendirir ve düzenler. Zebra balığı solungaç doku örnekleri üzerinde uygun analizler yapılmış, hücre döngüsü kontrol noktası gen belirteçlerinden $P21^{Kip1}$ ve $P27^{Kip1}$ ifadeleri ölçülmüştür.

#### 4.3.5.1. $P21^{Kip1}$ Gen İfadesi

$P21^{Kip1}$ DNA hasarı oluştuğunda P53 aracılı G1 baskılanmasında görev alan inhibitördür. Aktive olması, hücre döngüsünün ilerlemesinde kritik bir durumdur. P53 geni tarafından DNA hasarına karşı olarak aktive edilmektedir. Zebra balığı solungaç doku örneklerine ait $P21^{Kip1}$ gen ifade düzeyleri Şekil 4.14'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde RA, C1, C2, C3, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla P=1,00 (2,11±0,44), P=0,001 (35,80±8,57), P=0,021 (26,23±5,02), P=0,026 (25,53±7,44), P=0,946 (7,86±2,21) kat artma tespit edilmiştir (Ortalama±Standart hata). Yapılan

istatistik analiz sonucunda. C1 konsantrasyonunda (P=0,001***), C2 konsantrasyonunda (P=0,021*), C3 konsantrasyonunda (P=0,026*) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki değişim anlamlı değildir.

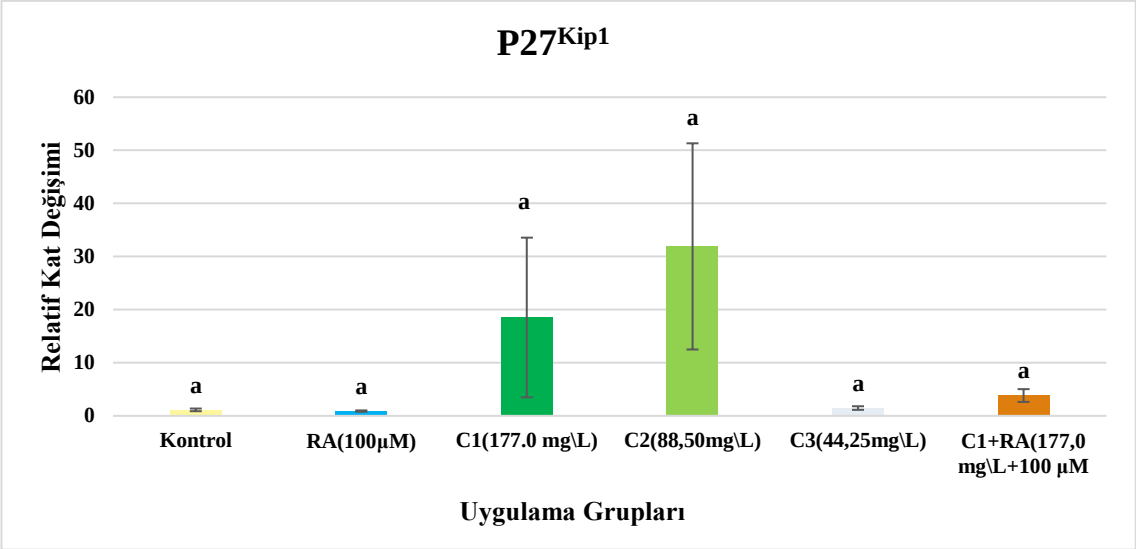



**Şekil 4.14.** $P21^{Kip1}$ gen ifadesinde meydana gelen değişimler.

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.5.2. $P27^{Kip1}$ Gen İfadesi

$P27^{Kip1}$ hücre dışı hücre çoğalımını engelleyen (antiproliferatif) sinyallere karşı yanıt olarak hücre döngüsünün durmasını uyarmaktadır. G1 fazından S fazına geçişin düzenlenmesinde kritik bir rol üstlenmiştir. $P27^{Kip1}$ gen ifadeleri Şekil 4.15'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, C1, C2, C3, C1+RA kontrole göre sırasıyla P=0,821 (18,51±15,03), P=0,282 (31,90±19,41), P=1,00 (1,46±0,33), P=1,00 (3,82±1.20) kat artma RA'da ise P=1,00 (0,89±0,12) kat azalma görülmüştür (Ortalama±Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda, C1 konsantrasyonunda (P=0,821), C2 konsantrasyonunda (P=0,282) kontrole göre anlamlı artış gözlenmemiştir. Diğer gruplardaki değişim anlamlı değildir.




**Şekil 4.15.** P27$^{Kip1}$gen ifadesinde meydana gelen değişimler

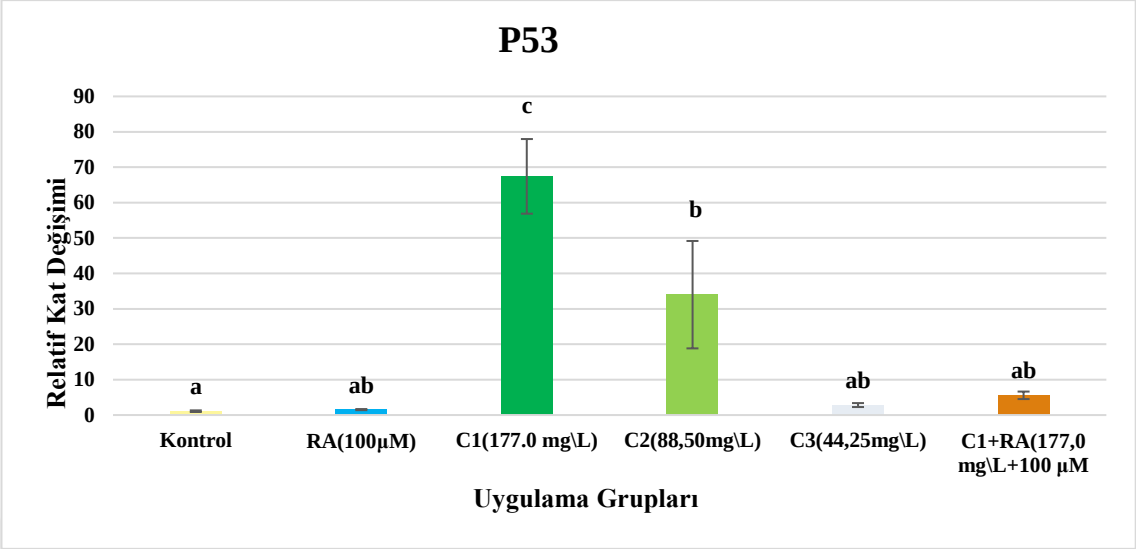
**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.6. Apoptoz Yolağı Gen İfadeleri

Apoptoz, DNA hasarının tamir edilemediği durumlarda ortaya çıkan organizmanın homeostazisinin korunması için gerekli programlı hücre ölüm çeşididir. Zebra balığı solungaç doku örnekleri üzerinde uygun analizler yapılmış, apoptoz yolağı gen belirteçlerinden P53, BAX, BCL2, Sitokrom C, Kaspaz 3 ifadeleri ölçülmüştür.

#### 4.3.6.1. P53 Gen İfadesi

Tümör süprösör gendir. DNA hasar meydana çıktığında hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak hücreye DNA onarımında zaman kazandırır. Eğer tamir gerçekleşmezse BAX pro-apoptotik geni arttırıp, BCL2 anti-apoptotik geni baskılar böylece apoptozu indükler. Zebra balığı solungaç doku örneklerine ait P53 geni ifade düzeyleri verilmiştir (Şekil 4.16). Sonuçlar incelendiğinde RA, C1, C2, C3, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla P=1,00 (1,53±0,15), P=0,000 (67,41±10,54), P=0,046 (34±15,16), P=1,00 (2,82±0,55), P=0,998 (5,57±1,05) kat artma tespit edilmiştir (Ortalama ± Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda, C1 konsantrasyonunda (P=0,000***), C2 konsantrasyonunda (P=0,046*) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki değişimler anlamlı değildir.

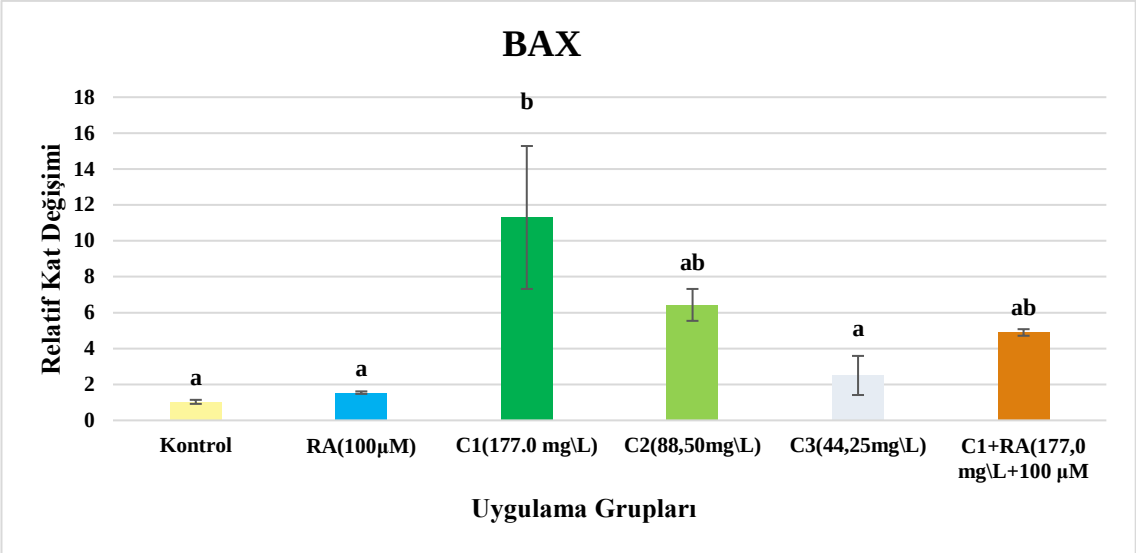



**Şekil 4.16.** P53 gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 Mm RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 Mm RA içerir.

### 4.3.6.2. BAX Gen İfadesi

BAX, BCL2 ailesinden pro-apoptotik etkilere sahip olan üyesidir. Düzenlenmesinde P53 rol oynar. DNA hasarı sonrasında verilen tepkilerden bir tanesi olarak BAX ifadesi uyarılır ve artış gösterir. BAX gen ifade düzeyleri Şekil 4.17'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde RA, C1, C2, C3, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla P=1,00 (1,54±0,06), P=0,003 (11,3±3,98), P=0,262 (6,43±0,8), P=0,990 (2,5±1,08), P=0,615 (4,89±0,18) kat artma tespit edilmiştir (Ortalama ± Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda C1 konsantrasyonunda (P=0,003**) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki değişim anlamlı değildir.

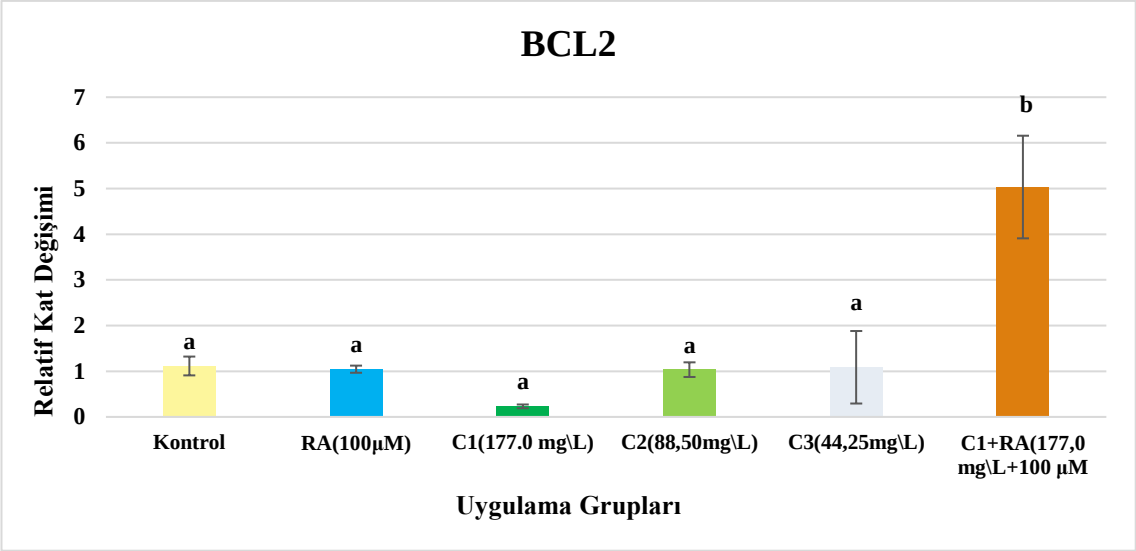



**Şekil 4.17.** BAX gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.6.3. BCL2 Gen İfadesi

BCL2 anti-apoptotik gendir. P53 geni tarafından baskılanır. BCL2 geni ifade düzeyleri Şekil 4.18'de yer almaktadır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde RA, C1, C2, C3 gruplarında kontrole göre sırasıyla P=1,00 (1,04±0,07), P=0,881 (0,23±0,04), P=1,00 (1,03±0,16), P=1,00 (1,08±0,79) kat azalma, C1+RA grubunda ise P=0,000 (5,03±1,12) kat artma gözlenmiştir (Ortalama±Standart hata). Yapılan analiz sonucunda gen ifadeleri incelendiğinde, C1+RA konsantrasyonunda (P=0,000***) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir.




**Şekil 4.18.** BCL2 gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

#### 4.3.6.3.1. BCL2/BAX Oranı

Bu çalışmada elde edilen BCL2/BAX oranı Çizelge 4.5.'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, konsantrasyon arttıkça bu oran azalmaktadır.

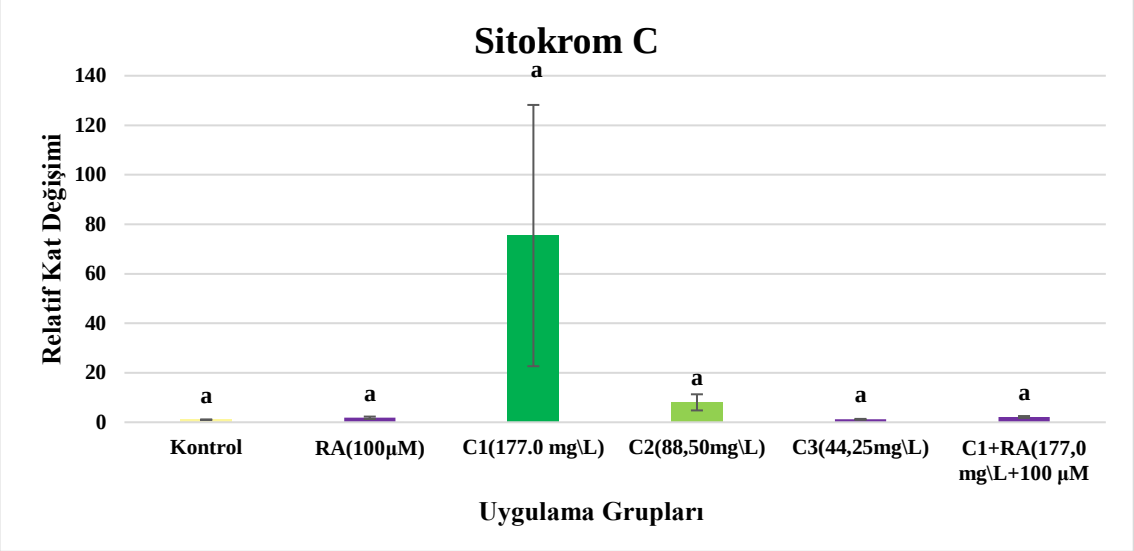
**Çizelge 4.5.** BCL2/BAX Oranı.

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

| GRUP | BCL2/BAX | SONUÇ |
|---|---|---|
| **KONTROL** | 1.00/1.00 | 1.00 |
| **RA** | 1.04/1.54 | 0.67 |
| **C1** | 0.23/11.3 | 0.02 |
| **C2** | 1.03/6.43 | 0.16 |
| **C3** | 1.08/2.5 | 0.43 |
| **C1+RA** | 5.03/4.89 | 1.02 |

### 4.3.6.4. Sitokrom C Gen İfadesi

Sitokrom C içsel apoptotik yolakta görevli apoptozla birlikte salınması artmaktadır. Sitoplazmada aktive duruma gelen prokaspaz-3 enzimini aktifleşmesini sağlayarak Kaspaz 3'e dönüştürür. Apoptozun başlamasını tetiklemiş olur. Sitokrom C gen ifade düzeyleri Şekil 4.19'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde RA, C1, C2, C3, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla P=1,00 (1,81±0,48), P=0,176 (75,43±52,77), P=1,00 (8,04±3,25), P=1,00 (1,16±0,19), P=1,00 (2,13±0,37) kat artma tespit edilmiştir (Ortalama ± Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda, C1 konsantrasyonunda (P=0,176) kontrole göre anlamlı artış gözlenmemiştir. Diğer gruplardaki değişim anlamlı değildir.



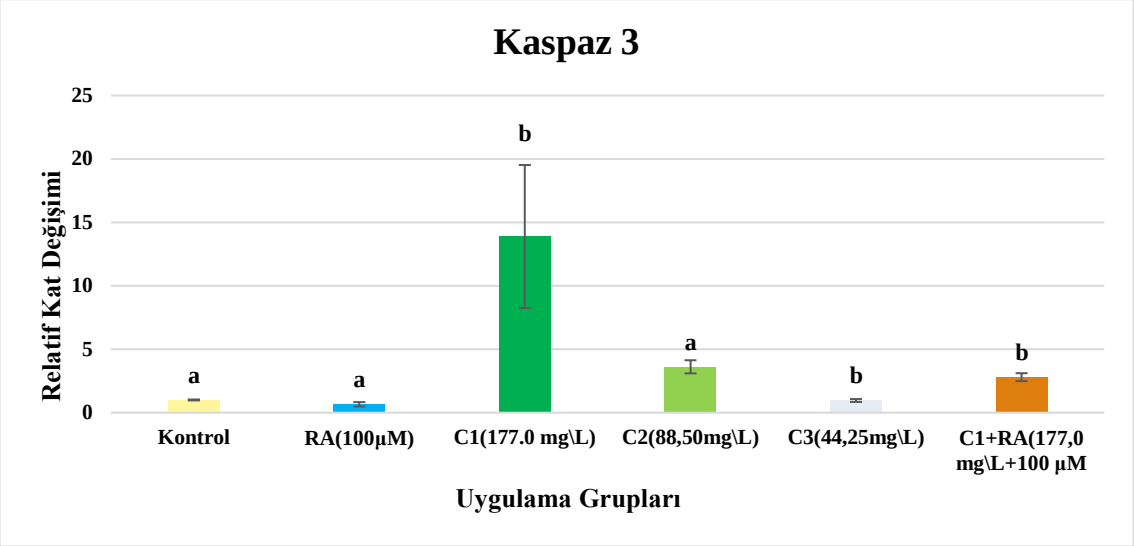

**Şekil 4.19.** Sitokrom C gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.6.5. Kaspaz 3 Gen İfadesi

Kaspaz 3, içsel yolakta görev alan apaptoz aktivötörlerindendir. Apoptoz sinyali sonrasında inaktif durumda olan prokaspaz enzimleri diğer kaspazlar vasıtasıyla aspartik asit birimlerinden kesilip aktif hale getirilir. Kaspaz 3 gen ifade düzeyleri Şekil 4.20'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde C1, C2, C1+RA gruplarında kontrole göre sırasıyla

P=0,005 (13,89±5,63), P=0,966 (3,61±0,51), P=0,993 (2,80±0,31) kat artma RA ve C3 gruplarında P=1,00 (0,66±0,17), P=1,00 (0,96±0,11) kat azalma tespit edilmiştir (Ortalama±Standart hata). Yapılan istatistik analiz sonucunda, C1 konsantrasyonunda (P=0,005**) kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer gruplardaki değişim anlamlı değildir.

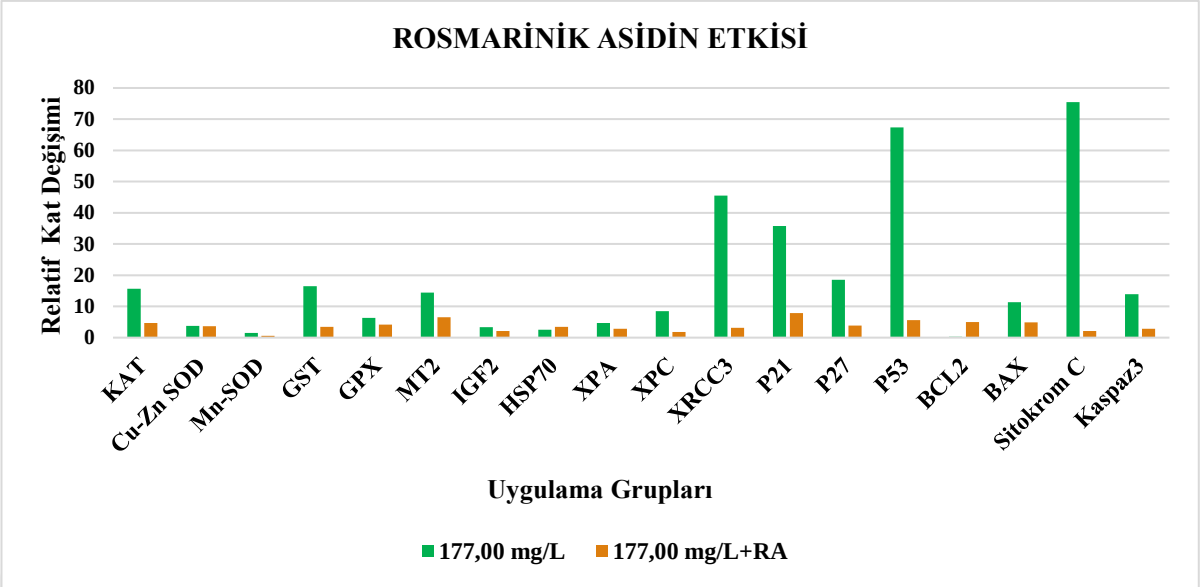



**Şekil 4.20.** Kaspaz 3 gen ifadesinde meydana gelen değişimler

**K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

### 4.3.6.6. Rosmarinik Asitin Etkisi

En yüksek test konsantrasyonu ve en yüksek test konsantrasyonu ile RA'nın birlikte uygulanması sonrası gen ifadelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.21'de ve Çizelge 4.6'da verimiştir. En fazla % değişim KAT, GST, XPC, XRCC3, $P21^{Kip1}$, $P27^{Kip1}$, P53, Sitokrom C, Kaspaz 3 gen ifadelerinde meydana gelmiştir. Çizelge 4.7'de tüm gen ifadeleri verilmiştir.




**Şekil 4.21.** Rosmarinik asidin etkisi.

$LC_{50}$/2 mg/L (177,00 mg/L) C1 kuinklorak, $LC_{50}$/2 mg/L (177,00 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

**Çizelge 4.6.** Rosmarinik asit uygulaması sonrası % değişim.

$LC_{50}$/2 mg/L (177,00 mg/L) C1 kuinklorak, $LC_{50}$/2 mg/L (177,00 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

| GENLER | C1 | C1+RA | % DEĞİŞİM |
|---|---|---|---|
| **KAT** | 15,66 | 4,69 | -70 |
| **Cu-Zn SOD** | 3,73 | 3,66 | -1,9 |
| **Mn-SOD** | 1,48 | 0,6 | -55,4 |
| **GST** | 16,5 | 3,47 | -79 |
| **GPX** | 6,33 | 4,15 | -34,44 |
| **MT2** | 14,4 | 6,5 | -54,87 |
| **IGF2** | 3,4 | 2,09 | -38,5 |
| **HSP70** | 2,55 | 3,5 | +37,25 |
| **XPC** | 8,5 | 1,84 | -78,3 |
| **XPA** | 4,72 | 2,82 | -40,26 |
| **XRCC3** | 45,48 | 3,19 | -93 |
| **$P21^{Kip1}$** | 35,8 | 7,86 | -78,05 |
| **$P27^{Kip1}$** | 18,51 | 3,82 | -79,37 |
| **P53** | 67,41 | 5,57 | -91,74 |
| **BCL2** | 0,23 | 5,03 | +2.087 |
| **BAX** | 11,3 | 4,89 | -56,72 |
| **Sitokrom C** | 75,43 | 2,13 | -97,17 |
| **Kaspaz 3** | 13,89 | 2,8 | -79,84 |

**Çizelge 4.7.** Gen ifadelerindeki değişimler

Tablodaki anlamlılık sonuçları P≤0,05 *; P≤0,01 **; P≤0,001 *** olacak şekilde değerlendirilmiştir. **K**: Kontrol, **RA**:100 µM RA, **C1**:$LC_{50}$/**2** mg/L (177,00 mg/L) kuinklorak, **C2**:$LC_{50}$/**4** mg/L (88,50 mg/L) kuinklorak, **C3**:$LC_{50}$/**8** mg/L (44,25) mg/L kuinklorak, **C1+RA**: $LC_{50}$/**2** mg/L (177,0 mg/L) C1 kuinklorak + 100 µM RA içerir.

| GEN ADI | KONTROL | RA (100 µM) | C1 (177,0 mg/L) | C2 (88,50 mg/L) | C3 (44,25 mg/L) | C1+RA (177,0mg/L+100 µM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Antioksidan Savunma Sistem Genleri** | | | | | | |
| **KAT** | 1,00±0,06 | 1,91±0,17 | 15,66±5,98** | 4,92±0,81 | 2,22±0,41 | 4,69±0,99 |
| **CuZn-SOD** | 1,02±0,02 | 1,02±0,02 | 3,73±0,64*** | 1,22±0,11 | 1,19±0,02 | 3,66±0,23*** |
| **Mn-SOD** | 1,16±0,25 | 0,34±0,03** | 1,48±0,18 | 0,27±0,08*** | 0,31±0,03** | 0,60±0,10 |
| **GST** | 1,24±0,36 | 2,12±0,56 | 16,5±4,19*** | 2,84±0,61 | 1,55±0,27 | 3,47±0,96 |
| **GPX** | 1,00±0,02 | 1,23±0,09 | 6,33±0,83*** | 1,45±0,28 | 0,97±0,06 | 4,15±0,69*** |
| **MT2** | 1,02±0,11 | 0,79±0,14 | 14,4±5,41* | 9,79±3,97 | 5,58±1,12 | 6,50±2,18 |
| **Isı Şok Protein Geni** | | | | | | |
| **HSP70** | 1,04±0,13 | 1,21±0,11 | 2,55±0,15** | 1,34±0,06 | 1,96±0,55 | 3,50±0,42*** |
| **İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Geni** | | | | | | |
| **IGF2** | 1,00±0,03 | 0,75±0,012 | 3,40±0,36*** | 1,37±0,42 | 0,79±0,12 | 2,09±0,14* |
| **DNA Hasar Tamir Genleri** | | | | | | |
| **XPC** | 1,00±0,05 | 1,11±0,10 | 8,50±3.02** | 1,35±0,16 | 0,77±0,06 | 1,84±0,03 |
| **XPA** | 1,00±0,03 | 0,97±0,045 | 4,72±0,45*** | 1,42±0,21 | 0,95±0,08 | 2,82±0,24*** |
| **XRCC3** | 1,21±0,35 | 0,62±0,02 | 45,48±12,22*** | 28,41±7,96** | 7,34±4,82 | 3,19±0,75 |
| **Hücre Döngüsü Kontrol Noktası Genleri** | | | | | | |
| **$P21^{Kip1}$** | 1,00±0,03 | 2,11±0,44 | 35,80±8,57*** | 26,23±5,02* | 25,53±7,44* | 7,86±2,21 |
| **$P27^{Kip1}$** | 1,00±0,05 | 0,89±0,12 | 18,51±15,03 | 31,90±19,41 | 1,46;0,33 | 3,82±1.20 |
| **Apoptoz Yolağı Genleri** | | | | | | |
| **P53** | 1,00±0,03 | 1,53±0,15 | 67,41±10,54*** | 34±15,16** | 2,82±0,55 | 5,57±1,05 |
| **BCL2** | 1,00±0,05 | 1,04±0,07 | 0,23±0,04 | 1,03±0,16 | 1,08±0,79 | 5,03±1,12*** |
| **BAX** | 1,00±0,03 | 1,54±0,06 | 11,3±3,98** | 6,43±0,8 | 2,5±1,08 | 4,89±0,18 |
| **Sitokrom C** | 1,00±0,05 | 1,81±0,48 | 75,43±52,77 | 8,04±3,25 | 1,16±0,19 | 2,13±0,37 |
| **Kaspaz 3** | 1,00±0,05 | 0,66±0,17 | 13,89±5,63** | 3,61±0,51 | 0,96±0,11 | 2,80±0,31 |

# BÖLÜM 5

# TARTIŞMA

Herbisitlerin kolay uygulanabilirliği, hızlı etki etmesi ve ürünün farklı fenolojik dönemlerinde kullanılabilmesinden dolayı kimyasal yabancı ot mücadelesi en çok tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir (Durmuşoğlu et al., 2010). Bu bileşikler, antropojenik aktivitelerde kullanılmaları ve sudaki çözünürlükleri dikkate alınarak suda yaşayan kirletici maddeler haline gelebilirler. Özellikle, herbisitler istilacı yabani otları kontrol etmek için doğrudan uygulamaların yanı sıra tarımsal akış ve sızma 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 et al., 2021). Toksikolojik çalışmalarda letal konsantrasyonların tespit edilmesi gerekliliği, bu çalışmada test materyali olarak kullanılan FACET®'nin (kuinklorak) deney objesi olarak kullanılan zebra balığı üzerinde tespiti sağlanmıştır. Bu amaçla yapılan ön çalışmada test edilen etken maddesi kuinklorak olan herbisit FACET®'nin $LC_{50}$ 96 saat değeri: 354,009 mg/L, Alt limit değeri: 349,660 mg/L, Üst Limit değeri:358,409 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bu herbisit ile yapılan letal konsantrasyon tespiti çalışmalarında, bu çalışma sonucuna yakın değerler elde edildiği saptanmıştır. Gümüş yayın balığında (*Rhamdia quelen*) yapılan çalışmada FACET® herbisitinin 96 saat $LC_{50}$ değeri 395.0 mg/L olarak tespit edilmiştir (Miron et al., 2004). Bu çalışmada tespit edilen $LC_{50}$ 96 saat değerine oldukça yakın bir sonuç olup, bu değerler sucul organizma türüne, boyutuna, ortam şartlarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir.

Genotoksikolojik çalışmalarda RAPD testi hasar belirlenmesinde bir yaklaşım sunmaktadır. RAPD genom iafadesindeki değişimleri ortaya koyan bir test olarak uygulanmaktadır. Rastgele dizilimlere sahip kısa oligonükleotid primerler kullanılmasıyla genomik DNA'dan belirli parçaların çoğaltılması RAPD-PCR yöntemiyle gerçekleştirilmektedir. Oluşan amplifikasyon ürünleri, standart jel elektroforezinde bantlar halinde gözlemlenerek, oluşan bu bantların farklı uygulamalar neticesinde yok olması veya yeniden oluşumu değerlendirilir. Sonucunda primerlerin bağlandığı alanlarda etkili olan inversiyonlar, delesyonlar, nokta mutasyonlar, insersiyonlar ya da kromozomal yeniden düzenlenmeler meydana geldiğinde RAPD yöntemiyle görüntülenmesi sağlanan bantlarda yok olma ya da yeni oluşumlar tespit edilebilir. RAPD çalışması ile uygulanan herbisitlere bağlı olarak değişen elektroforetik bantlar ve % GKK, meydana gelen reaktif oksijen türlerinin zararları sonucudur. Aynı zamanda ortaya çıkan RAPD bant polimorfizmi, genom yeniden düzenlenmesinden dolayı oligonükleotidlerin bağlanma bölgelerinde meydana gelen değişiklikler neticesinde de ortaya çıkabilmektedir (Atienzar et al., 1999b; Conte et al., 1998). Bu çalışmanın amaçlarından biri kuinklorak herbisitinin *Danio rerio'nun* DNA'sı üzerindeki etkilerinin belirlenmesidir. Bu amaçla RAPD analizi kullanılmıştır. *Danio rerio'*nun solungaç dokusu örneklerinden elde edilen genomik DNA'lardaki modifikasyonlar, RAPD bant profilleri kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek bant değişimi, en yüksek test konsantrasyonu olan 177,00 mg/L de (3 kaybolan bant,12 yeni oluşan bant) meydana gelmiştir. Yeni bantların ortaya çıkmasının herbisit toksisitesinin neden olduğu stres faktörleri sonucu oluşan DNA hasarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Normal bantların kaybolmasının ise, genotoksinlerin ortaya çıkardığı DNA'da meydana gelen hasar, nokta mutasyonları ile kompleks kromozomal yeniden düzenlemeler gibi olaylarla ilgili olabileceği düşünülmektedir (Atienzar et al., 2002; De Wolf et al., 2004). Aynı zamanda yeni bant meydana gelmesinin genomik kalıp kararsızlığından da kaynaklanabilmektedir (Liu et al., 2005). Bu çalışmada *Danio rerio*'nun solungaç dokusu örneklerinden elde edilen total DNA'larının % GKK değerleri çalışmada kullanılan beş primerdeki ortalama bant değişiklikleri ile hesaplanmıştır. Yeni oluşan ve kaybolan bant sayıları kullanılarak hesaplanan % GKK verileri sonucunda konsantrasyona göre % GKK miktarının azalma gösterdiği tespit edilmiştir. % GKK'da oluşan değişimlere bakıldığında en fazla 177,00 mg/L (P=0,009); 44,25 mg/L (P=0,033);177,00 mg/L+100

μM RA da (P=0,033); kontrole grubuna göre anlamlı azalmalar meydana gelmiştir. En fazla % GKK azalması 177,00 mg/L en yüksek uygulama sonucu meydana gelmiştir. Genetik stabilite, hücrenin sahip olduğu DNA tamir ve replikasyon mekanizmalarının etkinliğine bağlı şekilde meydana gelen DNA hasarıyla ilişkilidir (Silins & Hogberg, 2011). RAPD bant profillerindeki değişikliklerin belirlenmesinde bir gösterge olarak kullanılan GKK, toksik bir faktörün etkisi altında hızlı yanıt verir, dokulardaki DNA onarım ve replikasyon mekanizmalarının bir sonucu olarak ortaya çıkar (Liu et al., 2005). Yapılan önceki çalışmalar kuinklorak ve aynı gruptaki herbisit uygulamasına maruz kalan türlerde RAPD bant profillerinde değişime ve GKK'nın azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Kuinklorak herbisitine maruz bırakılan çeltik çeşitlerinde (Alyürük, 2023), kuinklorak herbisiti ile aynı oksin grubu herbisitlerinden olan pikloramın *Phaseolus vulgaris* (Fasülye) bitkisinde (5, 10, 20 ve 40 mg/L pikloram) DNA hasar profili değişikliklerinde artışa, ve genomik kalıp kararlılığında (GKK) azalmaya neden olduğu görülmüştür (Taspinar et al., 2017). Atrazin ve glifosat herbisitlerinin *Biomphalaria glabrata* salyangozları üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir araştırmada herbisit maruziyetinin etkisi altında DNA hasarına bağlı yapısal değişiklikler meydana getirmiştir (Mona et al., 2013). Başka bir çalışmada zebra balığı As ve Cd metallerine maruz bırakılmış metal uygulaması sonra GKK oranının azaldığı tespit edilmiştir (Doganlar et al., 2016). Bu çalışmada % GKK'de gözlenen bant değişimleri, herbisit muamelesi sonrası hücrenin redoks potansiyeli ile kimyasal kompozisyonunun zarara uğramasıyla ortamda açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin bu ortamdan uzaklaştırılamadığı ve bu durumun gen tamir mekanizmalarının yetersizliğiyle ilişkili olarak DNA hasarına yol açabileceğine işaret etmektedir.

Normal fizyolojik koşullarda, hücrelerde sürekli oluşan ROT ile onlarla etkileşime geçen antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması hücrede süperoksit radikallerinin birikmesi ya da endojen savunma sistemlerinin yetersiz kalması oksidatif stres olarak tanımlanır. Hücreler, oksidatif strese yol açarak bunun neticesinde hücresel hasar oluşumununa sebep olan ROT üretimini baskılamak ya da oluşmuş olanları yok etmede görevli antioksidan sistemine sahiptir (Kakoolaki et al., 2013; Zivna et al., 2013). Hücre eksojen ve endojen kaynaklı herhangi bir oksidatif strese maruz kalırsa, antioksidan savunma sisteminde bulunan enzimlerin sentezlenmesini arttırıp yanıt vermektedir (Kakoolaki et al., 2013). Önceki çalışmalar, herbisitlerin redoks döngülerine

girebildiklerini ve sonuç olarak balıklarda oksidatif hasara neden olan ROT seviyesini arttırabileceklerini bildirmiştir (Lushchak, 2011; Piancini et al., 2015; Slaninova et al., 2009). Hücredeki dengenin kontrolünde hayati bir etkiye sahiptirler. Kirleticilere verilen bir tepkinin sonucu olarak antioksidan enzim aktiviteleri toksikolojik çalışmalarda, hücre hasarlarının incelenmesinde oldukça önemli bir indikatör görevi görürler (Yonar et al., 2011). Bu çalışmada KAT, Cu-Zn SOD, Mn-SOD, GST, GPX, MT2 olmak üzere farklı antioksidan enzimlerin gen ifade seviyeleri incelenmiştir.

KAT, ana hücresel antioksidan enzimlerden stres koşulları altında oluşan $H_2O_2$'nin $H_2O$ ve $O_2$'ye dönüşümünü sağlayarak hücreleri strese karşı korumada görevli önemli bir enzimatik antioksidandır (Radwan et al., 2019). Bu sayede hidrojen peroksitin hücredeki olumsuz etkisi engellenmektedir (Yonar et al., 2016). Bu çalışmada, KAT gen ifadesi sonuçlarında tüm gruplarda kontrole göre artma tespit edilmiştir. Kontrole göre anlamlı artış, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 177,00 mg/L de gözlenmiştir.

Sucul organizmalarda yapılan önceki çalışmalarda pestisitlere maruziyet sonrası KAT protein aktivite ve KAT gen ifadelerinin artışı tespit edilmiştir. *Ciprinus carpio* (Sazan balığı)'da yapılan çalışmalar; 7 ve 30 gün boyunca kuinklorak herbisit muamelesi (Toni et al., 2013), kuinklorak herbisitinin dahil olduğu oksin grubu 2,4-D herbisitinin böbrek dokusunda (Oruc et al., 2004), 14 ve 28 gün boyunca simazin herbisitinin *Ciprinus carpio* karaciğer dokusunda (Stara et al., 2012) KAT aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir. Atrazin herbisitinin (1000 µg\l) 14 gün muamelesi *Danio rerio* karaciğer dokusunda (Jin et al., 2010), 2,4-D herbisitinin *Carassius auratus* (akvaryum balığı) solungaç dokusunda KAT aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Atamaniuk et al., 2013). Gen ifadesi analizleri; kuinklorak herbisitine maruz bırakılan çeltik çeşitlerinde KAT gen ifadelerinin artmış olduğu tespit edilmiştir (Alyürük, 2023). Kuinklorak gibi çeltiklerde kullanılan thiocarbamate ailesinden sihalofop-bütil herbisitine 96 saatlik maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında (Zhu et al., 2015), glifosat bazlı herbisite maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* (Tilapia balığı ) dokularında (Acar et al., 2021), As ve Cd metallerine maruz bırakılmış zebra balığı solungaçlarında (Doganlar et al., 2016), 3 farklı pestisitin *Ctenopharyngodon idella* ot sazanı yavrularında (Liu et al., 2013), lambda-kyhalothrin herbisitinin zebra balık dokularında KAT gen ifadesini arttırdıkları (Sharma et al., 2024) tespit edilmiştir.

SOD, ROT'ların toksik etkilerine karşı geliştirilen antioksidan savunma mekanizmasının ilk bileşenidir (Lushchak, 2011). SOD enzimi, oksijen radikallerinin ($O_2 \cdot$) hidrojen peroksite ($H_2O_2$) değişimini katalizlemektedir ve daha sonraki basamakta; hidrojen peroksit, katalaz enzimi ile tepkimeye girerek suya dönüşmektedir (Kirici et al., 2017; Peixoto et al., 2006). Cu-Zn SOD ökaryotların kloroplastlarında, sitoplazmasında ve belli prokaryotların periplazmasında yer almaktadır. Bu çalışmada, Cu-Zn SOD gen ifadesi sonuçlarında tüm gruplarda kontrole göre artma tespit edilmiş olup en yüksek uygulama konsantrasyonu 177,00 mg/L ve 177,00 mg/L +RA uygulaması yapılan grupta kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Mn-SOD, $O_2$ radikal anyonun detoksifikasyonunda ilk adımı katalize eden mitokondriyal enzimdir. Mn-SOD mitokondri matriksinde birincil olarak yer alırken kloroplastlarda da bulunur. Daha sonra KAT enzimi ile $H_2O$'ye indirgenir (Huang et al., 1997). Bu çalışmada Mn-SOD gen ifadesi sonuçlarında en yüksek uygulama konsantrasyonu 177,00 mg/L olan grupta kontrole göre artış göstermiş olsa da anlamlı değildir. Sucul organizmalar üzerinde yapılan önceki çalışmalar pestisitlerin SOD protein aktivasyonu ve gen ifadesini arttırdığını göstermektedir. SOD aktivitesi çalışmalarında; metribuzin herbisiti *Carassius auratus* (Japon balığı) solungaç dokusunda SOD aktivitesinin konsantrasyona bağlı olarak, en yüksek konsantrasyonda (71,4 mg\l) %41 daha yüksek oranda (Husak et al., 2016), piraoksistrobin fungusitine maruz bırakılan zebra balıklarında Mn-SOD aktivitesinde (Li et al., 2018), 14 günlük atrazin maruziyeti zebra balığı karaciğer dokusunda (Jin et al., 2010), diazinon insektisitine maruz bırakılan sazanların solungaç, kas ve böbrek dokularında (Oruç et al., 2007), terbutrin herbisiti sazan karaciğer ve beyin dokularında (Velisek et al., 2011), 2,4-D herbisiti *Carassius auratus* solungaç dokularında SOD aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir (Atamaniuk et al., 2013). Sucul organizmalarda her iki Cu-Zn SOD ve Mn-SOD gen ifadesi çalışmalarında; Lambda-cyhalothrin herbisitinin zebra balıkları üzerinde SOD gen ifadesini arttığı (Sharma et al., 2024), zebra balığı sipermetrin insektisitine maruz bırakıldığında Mn-SOD, Cu-Zn SOD gen ifadelerinin (Jin et al., 2011), sihalofop-bütil herbisitine 96 saatlik maruziyetten sonra zebra balığı embriyolarında Cu-Zn SOD ve Mn-SOD gen ifadelerinin (Zhu et al., 2015), glifosat herbisitine maruz bırakılan *Oreochromis niloticus*'un testis dokusunda SOD (Acar et al., 2021), zebra balığı As ve Cd metallerine maruz bırakıldığında Cu-Zn SOD ve Mn-SOD gen ifadelerinin (Doganlar et al., 2016), azoksistrobin fungusitiyle

muamelesi sonucunda zebra balığı larvalarında Cu-Zn SOD, Mn-SOD, gen ifadelerinin arttığı tespit edilmiştir (Cao et al., 2018). Bir diğer çalışma kuinklorak herbisitine maruz bırakılan çeltik çeşitlerinde Cu-Zn SOD ve Mn-SOD gen ifadelerinin artmış olduğu tespit edilmiştir (Alyürük, 2023). Balıkların pestisit maruziyeti sonrası, oksidatif stres nedeniyle süperoksit radikallerinin (veya süperoksitten üretilen diğer radikallerin) saldırısından korunmak amacı ile SOD aktivitesinin artmış olabileceğii öne sürmekte (Husak et al., 2016), bu çalışmada benzer şekilde hücre canlılığını sürdürmek amacıyla oksidan antioksidan dengesini sağlamak üzere gen ifadesinin artmış olabileceğini düşündürmektedir.

GPX, hücrelerin sitoplazmasında bulunur. $H_2O_2$, organik hidroperoksitler ve lipit peroksitlerin GSH tarafından indirgenmesini katalizleyerek hücredeki redoks dengesini korumak ve hasara karşı oksidatif stresin önlenmesinde görev alan bir enzimdir (Massarsky et al., 2017; Sen & Chakraborty, 2011). Bu çalışmada GPX gen ifadesi sonuçlarında, en yüksek uygulama konsantrasyonu 177,00 mg/L ve 177,00 mg/L +RA uygulaması yapılan grupta kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Sucul organizmalar üzerinde yapılan önceki çalışmalar pestisitlerin GPX protein aktivasyonu ve gen ifadesini arttırdığını göstermektedir. Sucul organizmalarda yapılan çalışmalarda; *Carassius auratus* (Japon balığı) metribuzin herbisitine maruziyeti sonrası solungaç dokusunda (Husak et al., 2016), kuinklorak herbisitinin yer aldığı oksin grubunda olan dikamba herbisitine maruz kalan zebra balığında (Felisbino et al., 2023), *Carassius auratus* solungaçları 2,4-D herbisit konsantrasyonu ile 96 saat muamele edilmesi sonrası GPX aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir (Atamaniuk et al., 2013). Diğer gen ifadesi çalışmalarında; sihalofop-bütil herbisitinin zebra balığı embriyoları 96 saatlik uygulaması sonrası (Zhu et al., 2015), sipermetrin insektisiti zebra balığı maruziyeti sonrası (Jin et al., 2011), glifosat bazlı herbisitin *Oreochromis niloticus* uygulaması sonrası testis dokularında GPX gen ifadesinin artmış olduğu tespit edilmiştir (Acar et al., 2021). As ve Cd metallerine maruz bırakılmış Zebra balığı solungaç dokusunda GPX gen ifadesinin arttığı gözlenmiştir (Doganlar et al., 2016). Bitkisel dokularda yapılan bir çalışmada kuinklorak herbisitine maruz bırakılan çeltik çeşitlerinde GPX gen ifadelerinin artmış olduğu tespit edilmiştir (Alyürük, 2023). GPX gen ifadesinde görülen artışın aktive olan GSH sentez mekanizmaları ve başka detoksifikasyon mekanizmaları ile ilgili olabileceğini akla getirmektedir (Mona et al., 2013).

GST, herbisit detoksifikasyonunda rol oynayan önemli bir enzimdir. Bununla birlikte tepkime ile oluşan veya dışarıdan alınan toksik ürünlerin, vücuttaki diğer küçük moleküller ile bir araya gelmesini engellemektedir. Bu sebepten dolayı GST'ler hücrede önemli roller üstlenen enzim grupların içerisinde yer almaktadır (Hayes et al., 2005). Çeşitli bileşiklerin metabolize edilmesini, parçalanmasını sağlayarak özellikle kimyasal kanserojenler, pestisid, antikanser ilaçları ile çevresel kirleticiler gibi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynarlar (Armstrong, 1997; Sugamura & Keaney, 2011). Bu çalışmada, GST gen ifadesi sonuçlarında, kontrole göre anlamlı artış, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 177,00 mg/L de gözlenmiştir. RA uygulamasının bu gen ifadesini çarpıcı oranda (%79) düşürdüğü gözlenmiştir.

Sucul organizmalarda yapılan GST protein aktivitesi ve gen ifadesi çalışmalarında; kuinklorak herbisitinin *Cyprinus carpio* dokularında 7 ve 30 gün maruzuyetinin GST aktivitesini arttırdığı (Toni et al., 2013), metribuzin herbisitinin *Carassius auratus* (Japon balığı) üzerinde uygulanması sonucu solungaç dokularında (Husak et al., 2016), azoksistrobin fungusitinin zebra balığı üzerinde GST aktivitelerini arttırdığı (Han et al., 2016), kuinklorak herbisitin dahil olduğu oksin grubu herbisitlerinden dikambaya 48 saat maruz bırakılan kurbağa yavrularında (Attademo et al., 2021), 96 saat boyunca klorpirifos insektisitine maruz kalan *Daphnia magna*'da GST aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Ferrario et al., 2018). Benzer gen ifadesi çalışmalarında; azoksistrobin ve piraklostrobin fungusitleri uygulaması zebra balığı embriyolarında (Kumar et al., 2020), lambda-cyhalothrin herbisitinin zebra balığı dokularında (Sharma et al., 2024), glifosat bazlı herbisite maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* dokularında GST gen ifadelerini arttığı tespit edilmiştir (Acar et al., 2021). Bir diğer çalışma kuinklorak herbisitine maruz bırakılan çeltik çeşitlerinde GST, gen ifadelerinin artmış olduğu tespit edilmiştir (Alyürük, 2023).

Enzimatik olmayan antioksidanların bir başka grubunda bulunan MT2'ler oksidatif strese karşı hücresel savunmada merkezi bir rol oynar. Yüksek tiyol içerikleri nedeniyle bu proteinler, çeşitli ROT türlerini etkili bir şekilde temizleyebilir. MT genlerinin pestisit zehirlenmesinden kaynaklanan oksidatif stres tarafından kolaylıkla uyarıldığı gösterilmiştir (Miles et al., 2000). Bu çalışmada MT2 gen ifadesi sonuçlarında tüm gruplarda kontrole göre artma tespit edilmiş. Kontrole göre anlamlı artış, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 177,00 mg/L'de gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, su

midyesi *Unio tumidus* roundup herbisitine maruz bırakılmış ve MT2 aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Khoma et al., 2021). Bir başka çalışmada sucul solucan *Tubifex tubifex,* herbisit izoproturona *maruz* bırakılmış ve MT2 aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir (Mosleh et al., 2005). Diğer bir çalışmada glifosat herbisitinin sıçanlara uygulaması sonrası MT2 gen ifadelerini arttığı görülmüştür (Soudani et al., 2019). Herbisit uygulaması sonrası sucul organizmalarda gözlenen benzer sonuçlar, bu çalışma sonuçları ile uygunluk göstermekte olup dış ajanların oksidatif strese neden olduğunu, buna bağlı olarak ROT artışı ile MT2 gen aktivitesinin artmış olabileceğini düşündürmektedir.

KAT, SOD, GST, GPX, MT2 gibi, balıkların antioksidan sistemlerinde de görülen temel enzim gruplarının serbest radikalleri yok edici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Uzun parçalanma süreleri olan herbisitlerin yaygın ve kontrolsüz kullanımının sucul canlılar için önemli problemler yaratacağı kaçınılmazdır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, daha önce yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen veriler, tarım alanlarında kullanılan kimyasalların sucul canlılara zarar verdiğini veya zarar verme potansiyellerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Balıklar, aktif ve pasif süreçler yoluyla, yaşadıkları suda bulunan herhangi bir ksenobiyotiği tutma yeteneğine sahiptir. Bu hayvanlarda ölçülen parametreler, sudaki zirai kimyasalların kirletici potansiyelinin belirteçleri olarak kabul edilir (Brum et al., 2014). Sonuç olarak, bu çalışmada kuinklorak herbisitinin, balıkların solungaç dokuları üzerine zararlı akut etkileri olduğunu göstermiştir. Balıklardaki söz konusu antioksidan sistem genlerinin çevresel kirlilik çalışmaları ve ekotoksikolojik risk belirlemelerinde uygun ve güvenli indikatörler olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada, antioksidan sistem gen ifadeleri sonuçları, kuinklorak herbisitinin oksidatif hasara neden olarak antioksidan sistem gen ifadeleri seviyelerinde değişikliklere neden olmuş olabileceğini ifade etmektedir.

HSP'ler farklı türler arasında yüksek oranda korunur ve maruziyet ile hücresel hasar arasındaki doğrudan ilişkiyi yansıtır; bu nedenle, çevresel stresin erken bir göstergesi olarak kabul edilirler (Faggio et al., 2016). HSP'ler organizmaların çevresel stresörlere karşı geliştirdiği hücresel yanıtların önemli bileşenleri olarak dikkat çekmektedir. Son yıllarda, çevresel değişimlerin organizmalar üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla HSP'lerin kullanımı giderek artmıştır. Su ekosistemlerinde yaşayan organizmalar, suyun sıcaklık, pH, oksijen seviyesi ve kirleticiler gibi değişen

koşullarına sürekli maruz kalmaktadır. Bu nedenle, HSP'ler, sucul organizmalarda çevresel stresin biyokimyasal belirteçleri olarak işlev görebilir (Eder et al., 2009; Xing et al., 2013; Xing et al., 2015). HSP70, yeni polipeptit zincirlerinin katlanmasına katılır, translokasyon için gereklidir ve hasar proteinlerinin bozunması ve onarımında rol almaktadır (Basu et al., 2002). Bu çalışmada HSP70 gen ifadesi sonuçlarında, en yüksek uygulama konsantrasyonu 177,00 mg/L ve 177,00 mg/L +RA uygulaması yapılan grupta kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Çevresel kirleticilere maruz kalan balıkların dokularında çeşitli HSP'lerin yüksek seviyeleri ölçülmüştür; Indoxacarb insektisitine maruz bırakılan sazan balığında HSP70'in artmış gen ifadesi, doku hasarını ortaya çıkarmıştır (Ghelichpour et al., 2019). Klorprifosun insektisitine maruz kalan Chinook somonunun karaciğer dokusunda (Eder et al., 2009), deltametrin insektisitinin gökkuşağı alabalığı dokularında (Atamanalp & Erdoğan, 2010), glifosat bazlı herbisitin sazan balığının solungaçları 7 gün maruziyetinden sonra HSP70 mRNA seviyeleri önemli ölçüde artmıştır (Ma et al., 2019). Sazan balıklarında yapılan çalışmalarda atrazine ve paraquat herbisitlerine maruz kaldıktan sonra balığın, dalak, böbrek ve karaciğer dokularında HSP70 seviyelerinin artmış olduğu bildirilmiştir (Liu et al., 2013; Ma et al., 2018; Xing et al., 2013; Xing et al., 2015). Pestisit uygulamasından farklı olarak As ve Cd metallerinin zebra balığı solungaç dokularında HSP70 gen ifade seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (Doganlar et al., 2016). HSP70'in artan gen ifade seviyeleri, sitoprotektif mekanizmanın, herbisit maruziyetinden sonra yanlış katlanmış proteinlerin bozunmasını içeren süreci ifade edebilmektedir. Farklı stres koşulları altında HSP70 gen ifadesi büyük oranda artış göstererek, hücrelerin normal aktivitelerini yerine getirmelerine yardımcı olur (Rylander et al., 2005). Bu çalışmada RA kullanılan grupta HSP70 gen ifadesinin, en yüksek pestisit uygulaması yapılan gruba göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. HSP70, yanlış katlanmış ve toplanmış proteinlerin yeniden katlanması sürecine yardımcı olması yanında, organeller ve proteinlerin membran translokasyonu ile düzenleyici proteinlerin aktivitesinin kontrolü, yeni sentezlenen proteinlerin birleştirilmesi ve katlanması gibi aktiviteleri bulunabilmektedir (Mayer & Bukau, 2005). Bu çalışmada diğer çalışmalara benzer sonuç elde edilmesi herbisit muamelesinden sonra hücresel stresten dolayı HSP 70 gen ifadesinin artmış olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Artmış olan HSP70 gen ifadesi genel hücre stresi için bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır.

Oksidatif stresi önlemek için antioksidan savunmalar yetersiz olduğunda, doku hasarları hayvanların hayatta kalmasını gerektirebilecek kadar kritik olabilir. Bu durumda hormonlar da ksenobiyotik maruziyetine organizma tepkisinde önemli bir rol oynamaktadır. Balıklarda da, yüksek omurgalılarda olduğu GH ile IGF'ler arasındaki ilişki ağı, hücre büyümesi, hücre farklılaşmasının teşviki, davranış, metabolizma, osmoregülasyon, apoptozun inhibisyonu veya bağışıklık fonksiyonu gibi fizyolojik süreçleri düzenler (Canosa et al., 2007; Fox et al., 2010; Picha et al., 2008; Reinecke et al., 2005). Ksenobiyotik maruziyeti de dahil olmak üzere hem endojen hem de eksojen faktörler, GH ile IGF'ler arasındaki ilişki ağının inhibisyonunu ya da uyarılmasını belirler (Scarth, 2006). Hipofiz bezinde üretilen GH, periferik dokulardaki IGF'leri serbest bırakarak doğrudan veya dolaylı olarak etki edebilir (Vong et al., 2003). IGF1 ve IGF2 olmak üzere iki ana IGF tanımlanmıştır. IGF1, GH'nin sistemik etkilerinin çoğuna aracılık eden, hücre farklılaşması ve çoğalmasından, iskelet uzaması ile ilgili süreçlerin uyarılmasından ve bunun sonucunda vücut büyümesinden sorumlu olarak hücre proliferasyonunu başlatmak için endokrin, parakrin ve otokrin sinyallemede önemli bir rol oynayan bir mitojen ve sitoprotektif peptittir. IGF2, IGF1'e yapısal bir homolojiye sahip bir mitojendir (Picha et al., 2008; Reinecke et al., 2005). Bu çalışmada IGF2 gen ifadesi sonuçlarında, en yüksek uygulama konsantrasyonu 177,00 mg/L ve 177,00 mg/L +RA uygulaması yapılan grupta kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada indoxacarb insektisitine maruz kalan sazan balıklarında IGF2 gen ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (Ghelichpour et al., 2019). Bu çalışmada olduğu gibi IGF'nin artışı, hücrelerin yenilenmesine ve vücudun hayatta kalmasını garanti altına alacak şekilde hasar görmüş hücrelerin yerine yenilerinin gelmesine yol açabilir. Bu süreç, organizmanın sağlığını sürdürmesine ve hayatta kalmasına katkı sağlamaktadır.

XPC geni, genom boyunca helikal bozuklukları tanıyan nükleotid kesip-çıkarma onarımında görev alan ve hasarın bulunduğu bölgeye yerleşen ilk NER onarım genidir (Mitchell et al., 2003). Yapılan önceki çalışmalarda etinilestradiol sucul kimyasal kirleticiye maruz bırakılan zebra balıklarında XPC gen ifadesini arttırdığı (Soares et al., 2012), ultraviyole radyasyona maruz bırakılan zebra balığı hepatositlerinde XPC gen ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir (Sandrini et al., 2009). XPC geninin ifadesi P53 tarafından düzenlenir ve bu indüksiyonun kinetiği, hasar meydana geldikten sonra

gerçekleşir. Gen ifadelerindeki artış, DNA onarımı işlemi sırasında bozulan bu proteinlerin seviyesini yenilemek için önemli olabilir (Ford & Mutagenesis, 2005).

XPA, DNA'da hasarlı bölgeye bağlanacak olan proteini kodlar. NER için gerekli diğer proteinlerin bir araya gelmesini sağlayıp hasarlı bölgeye girip, açık DNA kompleksini meydana getirmesine ve bu açık yapıyı stabilize ederek hasarlanmamış diziyi yanlış kesimden korumaktadır (Hoeijmakers, 2001; Mitchell et al., 2003). Bu çalışmada, XPA gen ifadesi sonuçlarında kontrole göre en yüksek uygulama konsantrasyonu 177,00 mg/L ve 177,00 mg/L +RA uygulaması yapılan grupta kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Eksojen ajanların DNA hasar onarımını indüklediğine dair yapılan çalışmalarda; etinilestradiol sucul kimyasal kirleticiye maruz bırakılan zebra balıklarında (Soares et al., 2012), nanoapartiküle maruz bırakılan *Drosophila melanogaster* larvalarında XPA gen ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (Yalçın, 2023). Bu çalışmada, XPC gen ifadesi sonuçlarında kontrole göre anlamlı artış, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 177,00 mg/L de gözlenmiştir.

XRCC3, DNA çapraz bağlanmalar ile çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon onarımına hem erken hem de geç dönemde etki eden DNA tamir yolağının öncü bileşenidir (Brenneman et al., 2002; Jiao et al., 2008). Bu çalışmada, XRCC3 gen ifadesi diğer DNA hasar onarım gen ifadelerine göre çarpıcı oranda artış göstermiş olup, kontrole göre anlamlı artış, en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 177,00 mg/L ve 88,50 mg/L de gözlenmiştir. RA uygulanan grupta bu çarpıcı gen ifadesi artışı gözlenmemiştir. Yapılan bir çalışmada zebra balığı arsenik ve kadmiyum metallerine maruz bırakılmış metal uygulaması sonrası XRCC3 gen ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (Doganlar et al., 2016). XRCC3 gen ifadesininin çarpıcı artışı, bu proteinin homolog rekombinasyonla DNA tamir yolağında aktif olduğundan, çift iplik kırıklarının neden olabileceği kromozom fragmentasyonu, translokasyon ve delesyonları önlemek üzere gen aktivasyonunun arttırmış olabileceğini düşündürmektedir. NER genleri olan XPA ve XPC'de artışlar XRCC3 kadar fazla olmaması, DNA molekülünde helikal bozukluklara da neden olan NER onarımı gerektirebilecek diğer DNA hasarlarının da oluşmuş olabileceğini düşündürmektedir.

DNA hasarına çoğunlukla hücre döngüsü durması eşlik eder. $P21^{Kip1}$, DNA hasarına karşı oluşan cevapta G1 baskılanmasından sorumludur (Gartel et al., 1996). Bu baskılanma DNA lezyonlarının hayati hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkilerini önleyen artmış bir $P21^{Kip1}$ gen ifadesi ile ilişkilidir (Zhu et al., 2000). Bu çalışmada $P21^{Kip1}$ gen ifadesinde kontrole göre tüm konsantrasyonlarda kontrole göre çarpıcı artış gözlenmiştir. $P21^{Kip1}$ ifade düzeyinin artışı, DNA hasarına cevap veren, genetik olarak stabil olmayan hücrelerin varlığını göstermektedir. Zebra balıklarında yapılan çalışmalarda etinilestradiol, arsenik, kadmiyum, maruz bırakılması sonucu $P21^{Kip}$ gen ifadelerinin arttığı görülmüştür (Doganlar et al., 2016; Sandrini et al., 2009; Soares et al., 2012). $P21^{Kip1}$gen ifadesinin artışı UV radyasyon, iyonlaştırıcı radyasyon, hidrojen peroksite ve mikrosistin gibi hepatoksinler ile çeşitli ajanlar tarafından da tetiklenen DNA hasarından sonra gözlenmiştir (Grace & Blakely, 2007; Weber et al., 2007; Žegura et al., 2008).

$P27^{Kip1}$ antimitojenik sinyallere karşı oluşan cevapta, büyümeyi düzenleyen önemli bir moleküldür. $P27^{Kip1}$, intrinsik veya hücre dışı antimitojenik sinyallere, Siklin/CDK'lere bağlanıp inhibe ederek hücre döngüsü ilerlemesini G fazında bloke ederek yanıt verir (Nho & Sheaff, 2003). Bu çalışmada yüksek konsantrasyonlarda $P27^{Kip1}$ ifadesi artmış olsa da anlamlılık göstermemektedir. Bu da bazı sucul organizmaların hücre dışı antimitojenik ortam şartlarından da etkilenmiş olabileceği kanısını uyandırmaktadır. Benzer bir çalışmada zebra balığının arsenik ve kadmiyum metallerine maruz bırakılması, $P27^{Kip1}$ gen ifadesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Doganlar et al., 2016). Diğer bir çalışmada, heksaklorobenzen organik kirleticinin meme kanseri hücre hattında $P27^{Kip1}$ gen ifadesindeki artış tespit edilmiştir (Murray et al., 2005). DNA hasarı sonrası, hasarlı DNA'nın onarımı için fazladan zamana izin vermek ve genomik stabiliteyi sağlamak için hücre döngüsü kontrol noktalarının aktive edildiği bildirilmiştir (Hoeijmakers & Kanaar, 1998; Zona et al., 2014) .

Bu çalışmada hücre döngüsü kontrol noktası gen ifadelerinde $P21^{Kip1}$ 'in tüm konsantrasyonlarda kontrole göre çarpıcı artışının olması, bu herbisitinin DNA hasar yoluyla hücrede toksik etki yaratmış olabileceğini göstermektedir. $P27^{Kip1}$ gen ifadesindeki artış iç ve dış antimitojenik sinyallere cevap olarak G0 ve G1 fazlarında duraklamış olabileceğini göstermektedir. $P27^{Kip1}$, G1 / S fazı kontrol noktasında hücre döngüsünü bloke eder ve G0 ve G1 fazlarında duraklamış hücrelerde yüksek oranda ifade edilir (Abbastabar et al., 2018; He et al., 2020).

DNA hasarından sonra gözlenen önemli bir yanıt, DNA onarımı için zaman sağlayan hücre döngüsü duraksamasında rol oynayan moleküllerin aktivasyonudur. Bunlar arasında P53, DNA hasarına yanıtta anahtar rolü olan bir proteini kodlar. Hücre döngüsünün zamanlaması ve kontrolü birçok düzenleyici yol ve kontrol noktası içerir. Bunlar P53, siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve CDK inhibitörleridir (Cunningham et al., 2009). P53, hücresel genotoksik stres yanıtında önemli bir transkripsiyon faktörüdür. P53'teki değişiklikler, P53 proteininin birikmesine ve stabilizasyonuna yol açarak, G1/S geçişini kontrol eden siklin/CDK komplekslerinin inhibe edilmesine neden olur. Bu süreç, $P21^{Kip1}$ geninin transkripsiyonunu artırarak G1 tutuklanmasına sebep olur. Tümör baskılayıcı P53, hücresel genotoksik stres yanıtında önemli bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. P53'teki değişiklikler, P53 proteininin birikimini ve stabilizasyonunu ve G1/S'yi teşvik eden siklin/CDK komplekslerinin susturulmasında rol oynayan güçlü bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan $P21^{Kip1}$ G1/S geçiş kontrol noktası geni , hedef genler için transkripsiyon aktivitesini düzenleyerek G1 tutuklanmasına neden olur (Wahl & Carr, 2001). P53'ün seviyesinde gözlenen artış, DNA hasarına veya oksidatif strese yanıtı ve hücrelerin apoptotik bir duruma girme olasılığını arttırır (Sheikh & Fornace Jr, 2000). Ayrıca, P53 ve $P21^{Kip1}$ gen ifade seviyelerinde bir artış gözlenmesi hücre döngüsü bloğunda P53 / $P21^{Kip1}$ yolunun olası bir rolünü göstermektedir (Koroxenidou et al., 2005). Ökaryotik hücrelerde DNA hasarının neden olduğu hücre döngüsü ilerlemesinin durdurulması, hücrelere hasarlı DNA'yı onarmak için fazladan zaman tanır. Hücrelerdeki geri dönüşü olmayan hasar apoptozu tetikleyecektir (AshaRani et al., 2009). Hücre döngüsü kontrol noktaları ve apoptoz yakından bağlantılıdır, çünkü hücre döngüsü durmasını takiben hücre kaderini belirler: DNA onarılırsa hücre döngüsü devam eder ve hasar şiddetli ve onarılamaz olduğunda hücresel apoptoz meydana gelir (King & Cidlowski, 1998). P53'ün çevresel kirleticiler tarafından aktivasyonu, hücre döngüsü durmasına ve apoptoza neden olabilir veya zebra balıklarında DNA onarımını teşvik edebilir (Zhu et al., 2015). Bu çalışmada, $P21^{Kip1}$ ve P53 gen ifadelerinin kontrole göre çarpıcı oranda artışı DNA onarımını gerçekleştirmek üzere G1 fazında hücre döngüsünde duraksamaya neden olmuş olabileceğini göstermektedir.

DNA hasarıyla başa çıkmada iki hücresel strateji gelişmiştir. İlkinde DNA hasarı onarılır. İkincisi onarılamayan DNA hasarı genellikle kromozomal değişiklikler, gen mutasyonları ve malign dönüşümler olarak ortaya çıkan zararlı sonuçlara neden olur. Bu

da hücreleri ölüme götüren bir savunma mekanizması olan apoptoza yol açar (Roos & Kaina, 2006). P53 tümör süpresör gendir. Güçlü stres sinyallerine maruz kalan hücrelerde tamir edilemeyecek kadar hasarlı hücrelerin seçilip ayrılmasını sağlayarak apoptoza ya da yaşlanmaya sürüklemektedir. Apoptozu destekleyen bir mekanizma, hücre sağkalımını destekleyen veya hücre ölümünü kolaylaştıran büyük bir apoptoz düzenleyici ailesi olan BCL2 ailesinin üyeleriyle ilgilidir. P53 proteininin aktivasyonu, BAX ve BCL2 gibi proteinleri doğrudan düzenleyerek hücrenin apoptoza yönelmesini sağlar. Apoptoz, bir hücre içindeki anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerle etkileşimleri içeren bir süreçtir. Anti-apoptotik proteinlerden BCL2 Sitokrom C'nin mitokondriyal salınımını bloke ederek apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik protein olan BAX bu salınımı indüklemektedir (Abdelkader et al., 2013; Clark et al., 1997; Deng et al., 2009). BCL2/BAX protein oranının değişmesi mitokondriyal Sitokrom C salınımını etkileyebilir (Hildeman et al., 2003). Apoptozu başlatan asıl olay, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulmasıdır (Oltvai et al., 1993; R. Wong, 2011). Bu iki protein seviyesinin oranı, bir hücrenin apoptoz geçirip geçirmediğini öngörebilir (Gross et al., 1999). Bu çalışmada BCL2/BAX oranının, uygulama konsantrasyonları arttıkça azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyon uygulamalarındaki BAX gen ifadesi miktarının artışı pro-apoptotik mekanizmanın işlev kazanması, BCL2 gen ifadesi miktarının azalışı anti-apoptotik mekanızmanın aktif olmaması anlamına gelebilmektedir. Bu durumda hücrenin apoptoz süreci içinde olduğunu düşündürmektedir. Nitekim bu çalışmada P53 gen ifadesinin çarpıcı oranda kontrole göre artmış olması apoptoz sürecini desteklemektedir. Mitokondrinin dış zarında bulunan BAX, P53 transkripsiyonel aktivasyonunun doğrudan hedefidir (Li et al., 2000).

Bu çalışmada apoptoz yolağı genlerinden Sitokrom C ve Kaspaz 3 gen ifadelerinin kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. BAX geni ifadesi ve aktive edilmiş Kaspaz 3 sebebiyle Sitokrom C'nin artışı, mitokondriyal apoptotik yolağın tetiklenmesi anlamına gelmektedir (Bernardi et al., 2001). BAX, mitokondriyal membran geçirgenliğini artırarak hücre apoptozunu teşvik etmek için Sitokrom C salınımını indükleyebilir (Chipuk et al., 2004). Sitoplazmaya salındıktan sonra, Sitokrom C, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'in oligomerizasyonunu katalizler, böylece kaspaz aktivasyonunu teşvik eder (Eskes et al., 2000; Zimmermann et al., 2001). Kaspaz aktivitesinin, hücre apoptozunun ilerlemesini belirlemede çok önemli bir belirteç olduğu düşünülmektedir.

Kaspaz 3'ün, esas olarak birçok anahtar hücresel proteinin spesifik bölünmesini katalize ederek apoptozda önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (Liu et al., 2007; Zeng et al., 2014).

Hücre döngüsü durması ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli sonuçlara yol açabilen P53 proteininin aktivasyonu, hücrenin apoptotik bir duruma girdiğinin etkili bir göstergesi olarak bilinmektedir (Wang et al., 2004). Pek çok apoptotik sinyal süreci, P53, BCL2/BAX ve Sitokrom C, Kaspaz 3 gibi apoptozla ilişkili moleküllerin değişiklikleriyle ilgilidir (Zhao et al., 2009). Bu çalışmada, P53, Sitokrom C, Kaspaz 3 ve BAX gibi çeşitli apoptotik genlerin ifadesinin arttığını ve anti-apoptotik gen BCL2 gen ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada apoptotik gen ifadelerinden olan P53 ve Sitokrom C ifadelerinin yüksek konsantrasyon uygulama gruplarında fazla olması, anapoptotik genlerin (BCL2/BAX) ifade oranlarının düşük olması apoptotik mekanizmanın aktif olduğu anlamına gelebilmektedir.

Son zamanlarda, zebra balıklarında çevresel kirleticilerin neden olduğu apoptozla ilişkili genlerin mRNA ifade seviyelerindeki değişiklikler geniş çapta incelenmiştir (Deng et al., 2009; Shi et al., 2008). Apoptozla ilişkili genlerin sucul organizmalardaki çalışmalarında; etinilestradiol sucul kimyasal kirleticiye maruz bırakılan zebra balıklarında P53, BAX, genlerinin ifadesini bu çalışmada olduğu gibi arttırdığı (Soares et al., 2012), zebra balığı sipermetrin insektisitine maruz bırakıldığında P53, Kaspaz 3, Sitokrom C, BAX genlerin ifadesinin arttığı (Jin et al., 2011), sihalofop-bütil pestisitin 96 saatlik maruziyetten sonra zebra balığı embriyolarında P53, Kaspaz 3, BAX, gen ifadesi seviyelerini arttırırken BCL2 gen ifadesini azalttığı (Zhu et al., 2015), zebra balığı embriyolarına 0.1, 10 ve 100 μg/L azoksistrobin ve piraklostrobin fungusitlerine maruz bırakıldığında P53 ve BAX gen ifadelerini arttırdığı (Kumar et al., 2020), azoksistrobin fungusiti muamelesi sonucunda zebra balığı larvalarında P53, BAX, Kaspaz3, Sitokrom C gen ifadeleri arttığı BCL2 gen ifadesinin azaldığı (Cao et al., 2018), *Daphnia magna* (su piresi), metil civayla muamelesi sonucu, karaciğer dokusunda BAX gen ifadesinin arttığı (Azevedo et al., 2016), zebra balığı arsenik ve kadmiyum metallerine maruz bırakılmış metal uygulaması sonrası Kaspaz 3, BAX, Sitokrom C, gen ifadelerini arttırdığı (Doganlar et al., 2016), krom metaline maruz kalan zebra balığında P53, Kaspaz 3, Sitokrom C, gen ifadeleri artış gösterirken BCL2 gen ifadesinin azaldığı (Shaw et al., 2022), ultraviyole radyasyona maruz bırakılan zebra balığı hepatositlerinin P53, BAX

gen ifadesini artarken, BCL2 ifadesinin azaldığı (Sandrini et al., 2009), piraklostrobin fungusitinin sıçanlara uygulanması sonucu BAX, Kaspaz3, P53, gen ifadesini arttırdığı BCL2 ifadesini ise azalttığı (Zemheri-Navruz et al., 2023), hidrojen peroksite maruz bırakılan sıçanlarda P53 gen ifadesinin arttığı (Weber et al., 2007) tespit edilmiştir. Eksojen ajanların, bu çalışmaya benzer şekilde hücre sağkalım mekanizmaları üzerinde etkileri; apoptoz yolak genlerinin ifade edilmesi sonucu geri dönüşü olmayan hasarın apoptozu tetiklemiş olduğunu göstermektedir.

ROT ve oksidatif stres oluşumunun önemli bir apoptotik sinyal olduğu kanıtlanmıştır (Livingstone, 2001). Çeşitli araştırmalar, oksidatif stres ve hücre apoptozu arasındaki çift yönlü etkileşimlerin çevresel kimyasallar tarafından indüklenebileceğini göstermiştir. Balıklarda benzer sonuçlar bulunmuştur. Zhao ve ark. asetofenatın neden olduğu hücre içi ROT oluşumunun ve DNA hasarının, fare makrofaj hücrelerinde P53 sinyal yolu yoluyla apoptoza yol açtığını tespit etmiştir (Zhao et al., 2009). Jin ve ark. zebra balıklarında hepatik oksidatif strese, DNA hasarına ve apoptoza neden olma potansiyeline sahip olduğunu öne sürmüştür (Jin et al., 2011). Bu sonuçlar birlikte ele alındığında, kuinklorak herbisitinin ROT ve oksidatif stres sonucu, P53 aktivasyonu ile zebra balığı solungaç dokusunda apoptozu indükleyebileceği varsayılabilir. P53 aktive olduktan sonra, hücre içinde mitokondriye geçer ve burada pro-apoptotik proteinlerin üretimini sağlayan genleri harekete geçirir. Bu süreçte BAX aktive olur ve hücre zarında geçirgenliği arttırır. Apoptozun önemli bir uygulayıcısı olan Kaspaz 3 tetiklenir ve Sitokrom C salınımı artar. Bu enzimler, apoptoza ve solungaç dokuda hasara yol açan ölüm substratlarının parçalanmasını teşvik eder. Zebra balığında, oksidatif hasarın bir sonucu olarak genomik instabilite meydana gelmiş olabileceği ve DNA hasarına neden olabilen bir madde olan kuinklorak herbisitin onarım mekanizmaları ile onarılamayan DNA hasarına bağlı olarak solungaç dokusunda apoptoza neden olmuş olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada antioksidan etkili olduğu bilinen RA'nın kullanılan kimyasal ajan ile birlikte etkinliği test edilmiştir. RA; 3,4 dihidroksifenillaktik ile kafeik asitin esteri olup biyosentezi fenilpropanoid yolu ile tirozin türevli yol vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Jiang et al., 2016; Zhang et al., 2014). RA, gıda koruyucularından kozmetiklere kadar geniş bir uygulama yelpazesine sahip doğal bir fenolik bileşiktir. RA ve türevlerinin antienflamatuar (Chu et al., 2012; J. Lee et al., 2008), antioksidatif (Sánchez-Campillo et

al., 2009; Zhang et al., 2010), anti-apoptotik (Domitrović et al., 2014; Hajhosseini et al., 2013; H. J. Lee et al., 2008; Lima et al., 2006), antialerjik(R. S. Costa et al., 2012), antitümör (Venkatachalam et al., 2013), antimikrobiyal(Moreno et al., 2006), antiviral (Swarup et al., 2007) gibi biyolojik aktivitelerin ortaya çıkarılmasına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Kim et al., 2015).

Bu çalışmada RA en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 177,00 mg/L+100µM RA eklenmesiyle test edilmiştir. En yüksek uygulama konsantrasyonu 177,00 mg/L grubuyla karşılaştırıldığında gen ifadelerinin azalma miktarlarına bakıldığında sonuçlarımıza göre RA varlığında antioksidan sistem gen ifadelerinde en fazla KAT, GST, GPX, MT2 gen ifadelerinde değişim gözlenmiş, gen ifadelerini sırasıyla %70, %79, %34,44, %54,87 oranında düşürdüğü, DNA hasar tamir genlerinde gözlenen en yüksek koruyucu etki; XRCC3 gen ifadesini %93 oranında düşürdüğü, XPC ve XPA gen ifadelerini sırasıyla %78,3, %40,26 oranlarında düşürdüğü gözlenmiştir. Hücre döngüsü kontrol noktası genlerinden $P21^{Kip1}$ ve $P27^{Kip1}$ gen ifadelerini sırasıyla %78,05, %79,37 oranlarında düşürdüğü tespit edilmiştir. Apoptoz yolağı, anti apoptotik genlerinden BCL2 gen ifadesinde %2087 artış, pro-apoptotik gen ifadelerinde; P53, BAX, Sitokrom C, Kaspaz 3 sırasıyla %91,74, %56,72, %97,17, %79,84 oranlarında düşürdüğü tespit edilmiştir.

RA ile yapılan protein ve gen ifadesi çalışmalarında; streptozotosin kimyasalı ile indüklenen diyabetik sıçanların karaciğer ve böbreklerinde oksidatif hasarı önlemede RA etkinliği araştırılmış ve RA'nın antioksidan enzimlerden SOD ve KAT aktivitelerini azalttığı (Mushtaq et al., 2015), RA'nın tümörle ilişkili GST üzerindeki inhibisyon etkileri değerlendirildiği çalışmada RA'nın GST aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (Gülçin et al., 2016). Gen ifadesi çalışmalarında kadmiyuma maruz bırakılan farelerin dokularında RA'nın SOD, KAT, GST, GPX ifadelerini azalttığı, diğer içsel apoptoz yolağı genlerinden Sitokrom C, Kaspaz 3 gen ifadelerini azalttığı, BCL 2 gen ifadesini arttırdığı görülmüştür (Joardar et al., 2019). Bu etkiler, RA'nın radikal süpürücü etkisi (Adomako-Bonsu et al., 2017) ile birlikte RA tarafından ROT üretiminin doğrudan engellenmesi (Qiao et al., 2005; Revoltella et al., 2018) ile ilişkilendirilebilir. Karbon tetraklorür ile fareler üzerinde yapılan bir çalışmada RA'nın Cu-Zn SOD ve Kaspaz 3 gen ifadelerini azalttığı (Domitrović et al., 2013), kobalt klorür maruziye sonrası sıçan hepatositlerinde BAX ve Kaspaz 3 gen ifadelerini azalttığı ve BCL2 seviyesini arttırdığı

(Jeon et al., 2014), tiaklopridin insektisitine maruz kalan tavuk embriyolarında RA'nın BCL2 gen ifadesini arttırdığı, Kaspaz 3 gen ifadesini azalttığı tespit edilmiştir (Farag et al., 2021). Önceki çalışmalara benzer şekilde, bu çalışmada RA'nın oksidatif stresi düşürdüğü, antioksidan etkili olması nedeniyle DNA hasarını engellediği, buna bağlı olarak hücre döngüsü kontrol noktası gen ifadelerinde artışa neden olmayıp, anti-apoptotik yolağı aktive ettiği tespit edilmiştir. Diğer çalışmalar ve bu çalışmanın sonucunda, RA'nın ROT üretimini ortadan kaldırdığı, serbest radikalleri süpürücü etkisi, oksidatif strese bağlı hasara engel olması sebebi ile RA sitoprotektif ve antioksidan etkili olduğu gözlenmiştir. Antioksidan etkili olması, sitoprotektif etkisinden dolayı DNA hasarı bulunmaması, DNA hasar tamir genlerinin ifade edilmemesi ile sonuçlanmış, sağkalım sonucu hücre apoptotik sürece dahil edilmediğinden Kaspaz 3, Sitokrom C, P53 gen ifadelerinin düşük, BCL2 anti-apoptotik gen ifadesinin yüksek olması, RA'nın eksojen ajanlara karşı hücre koruyucu etkisini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen parametreler kendi içlerinde değerlendirildiğinde; Antioksidan sistem genlerinin hepsinde özellikle en yüksek test konsantrasyonu olan 177,00 mg\L'de bir ifade artışı gözlenmiştir. KAT, GST ve MT2 sonuçları birbirine daha yakın şekilde ifade edilirken, Cu-Zn SOD ve GPX gen ifadeleri birbirine benzer şekilde olduğu görülmüştür. Cu-Zn SOD ve Mn-SOD yüksek konsantrasyonlarda artış gösterse de hücrede farklı yerlerde yer almasından dolayı ifadelerindeki farklılık açıklanabilir. IGF2 ve HSP70 gen ifadelerinin de yüksek konsantrasyonlarda artışı savunma mekanizmalarının tetiklendiği anlamına gelmektedir. DNA tamir genlerinden XRCC3'ün özellikle en yüksek test konsantrasyonu olan 177,00 mg\L'de gen ifadesi artışı dikkat çekici olmakla birlikte XPA ve XPC genlerinde de artması hücrenin kuinklorak herbisitinin neden olduğu DNA hasarına karşı onarım genlerini aktive ettiğinin göstergesidir. XRCC3'ün daha fazla ifadesi özellikle çift zincir kırıklarının onarımında rol alması sebebiyle kuinklorak herbisitinin DNA'da yüksek oranda çift kırık hasarına neden olabileceğini düşündürmektedir. Hücre döngüsü kontrol noktası genleri $P21^{Kip1}$ ve $P27^{Kip1}$'nin yüksek konsantrasyonlardaki artan ifadesi DNA'da meydana gelen hasarın onarılmasına imkan tanımak adına hücre döngüsünün baskılanması, DNA tamir genlerinin de artan ifadesiyle örtüşmektedir. Hücre döngüsü kontrol noktaları ve apoptoz yakından bağlantılıdır, çünkü hücre döngüsü durmasını takiben hücre kaderini belirler: DNA onarılırsa hücre döngüsü devam eder ve hasar şiddetli ve onarılamaz olduğunda

hücresel apoptoz meydana gelir. Antioksidan genlerin, DNA tamir genlerinin, hücre döngüsü kontol noktası genlerinin yüksek konsantrasyonlardaki artan ifadesi, DNA'da kuinklorak herbisitine maruziyet sonrası oksidatif hasarın bir sonucu olarak genomik instabilite meydana gelmiş olabileceği ve bu hasarın gideriminde yetersiz kalması sebebiyle apoptoz yolağı genlerinden apoptotik olan P53, BAX, Sitokrom C, Kaspaz 3 genlerinin yüksek konsantrasyonlarda artan ifadesi, anti-apoptotik gen BCL2'nin azalan ifadesi, meydana gelen hasarın hücreleri apoptoza sürüklemiş olabileceğini göstermektedir. Genomik instabilite sonrası mitokondriyal membran bozulması, mitokondriden Sitokrom C salınmasına ve P53'e bağlı hücre apoptozunu aktive ettiği ile açıklanabilir.

Bu çalışmada kuinklorak herbisitinin özellikle en yüksek test konsantrasyonunda zebra balığı solungaç dokusunda 48 saat uygulamada etkili olduğu gözlenmiş; Antioksidan sistem genlerinin qRT-PCR'si, RAPD testi ve % GKK deneyinden elde edilen veriler, toplam DNA'nın hasara uğradığını, antioksidan sistem, DNA tamir sistemi, hücre döngüsü kontol noktası genlerinin kuinklorak herbisitinin yol açtığı genotoksik hasarı gidermek üzere sistemleri aktive ettiği, sağkalınımın korunamaması sonrasında apoptoz yolağına başvurduğu gözlenmiştir. Ancak yüksek konsantrasyona 177,00 mg/L+ RA eklenmesiyle tüm gen ifadelerinde yüksek oranda değişimler gözlenmiş, kontrol grubuna yakın gen ifadeleri elde edilmiştir. Kuinklorak herbisitinin meydana getirebileceği hasarın RA gibi bir antioksidan varlığında değişebileceğini bu çalışmadaki sonuçlar desteklemektedir. Farklı model organizmalar ile yapılacak antioksidan katkılı çalışmalar; pestisitlerin genotoksik hasarını ortaya konması, çeşitli antioksidanlar ile bu etkinin önlenmesi, mevcut bilgiye katkı sağlaması açısından değerli olacağı görüşündeyiz.

# KAYNAKLAR


Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S. S., Maniati, M., & Karimian, A. J. D. r. (2018). Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *69*, 63-72.

Abdelkader, T. S., Chang, S. N., Kim, T. H., Song, J., Kim, D. S., & Park, J. H. J. J. o. A. T. (2013). Exposure time to caffeine affects heartbeat and cell damage-related gene expression of zebrafish Danio rerio embryos at early developmental stages. *33*(11), 1277-1283.

Abou-Ghali, M., & Stiban, J. (2015). Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J Biol Sci*, *22*(6), 760-772. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.005

Acar, Ü., İnanan, B. E., Navruz, F. Z., Yılmaz, S. J. C. B., Toxicology, P. P. C., & Pharmacology. (2021). Alterations in blood parameters, DNA damage, oxidative stress and antioxidant enzymes and immune-related genes expression in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) exposed to glyphosate-based herbicide. *249*, 109147.

Adomako-Bonsu, A. G., Chan, S. L., & Pratten, M. (2017). Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *40*, 248-255.

Ahmad, I., Maria, V. L., Oliveira, M., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2006). Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of Anguilla anguilla L. exposed to chromium with or without pre-exposure to beta-naphthoflavone. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *608*(1), 16-28. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.04.020

Akkus, I. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1-151. *J Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım AS Konya*.

Alyürük, G. (2023). Osmancik-97 ve cameo çeltik çeşitlerinin tarımındakullanılan bazi herbİsitlerin morfolojİk, fizyolojİk ve genetik etkİlerinin incelenmesi.

Andrews, G. K., Lee, D. K., Ravindra, R., Lichtlen, P., Sirito, M., Sawadogo, M., & Schaffner, W. (2001). The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *EMBO J*, *20*(5), 1114-1122. https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.1114

Arikan, Ş. (2013). Üniversite öğrencilerinin vücut ağırlığı, vücut kitle indeksi, plazma büyüme hormonu-, ghrelin-, leptin düzeyleri ve dayanıklılık antrenmanı arasındaki ilişkiler.

Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*, *10*(1), 218. https://doi.org/10.1021/tx960072x

AshaRani, P., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., & Valiyaveettil, S. J. A. n. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *3*(2), 279-290.

Atamanalp, M., & Erdoğan, O. (2010). Alterations of HSP70 gene expression in rainbow trout (Oncorhyncus mykiss) exposed to deltamethrin. *Turkish Journal of Veterinary*, *34*(4), 359-363.

Atamaniuk, T. M., Kubrak, O. I., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. J. E. (2013). Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D): studies with goldfish gills. *22*(10), 1498-1508.

Atienzar, F. A., Conradi, M., Evenden, A. J., Jha, A. N., & Depledge, M. H. (1999a). Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in Daphnia magna exposed to benzo[a]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *18*(10), 2275-2282. https://doi.org/10.1002/etc.5620181023

Atienzar, F. A., Conradi, M., Evenden, A. J., Jha, A. N., & Depledge, M. H. (1999b). Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic

DNA: Comparison of genomic template stability with key fitness parameters in Daphnia magna exposed to benzo[a]pyrene. *Environ Toxicol Chem*, *18*(10), 2275-2282. https://doi.org/10.1002/etc.5620181023

Atienzar, F. A., Venier, P., Jha, A. N., Depledge, M. H. J. M. R. G. T., & Mutagenesis, E. (2002). Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *521*(1-2), 151-163.

Attademo, A. M., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Boccioni, A. P. C., Martinuzzi, C., Simonielo, F.,…Research, P. (2021). Effects of the emulsifiable herbicide Dicamba on amphibian tadpoles: an underestimated toxicity risk? , *28*, 31962-31974.

Azevedo, S. L., Ribeiro, F., Jurkschat, K., Soares, A. M., Loureiro, S. J. E. T., & Chemistry. (2016). Co-exposure of ZnO nanoparticles and UV radiation to Daphnia magna and Danio rerio: Combined effects rather than protection. *35*(2), 458-467.

Babaoğlu, M., Gürel, E., & Özcan, S. (2004). *Bitki biyoteknolojisi*. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.

Babu, B. K., Mesapogu, S., Sharma, A., Somasani, S. R., & Arora, D. K. J. M. (2011). Quantitative real-time PCR assay for rapid detection of plant and human pathogenic Macrophomina phaseolina from field and environmental samples. *103*(3), 466-473.

Bakri, Y., Arabi, M. I. E., & Jawhar, M. J. P. J. o. M. (2007). RAPD technique is a useful tool to distinguish Penicillium species. *56*(4), 273.

Basu, N., Todgham, A., Ackerman, P., Bibeau, M., Nakano, K., Schulte, P., & Iwama, G. K. J. G. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *295*(2), 173-183.

Becker, L. B. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular research*, *61*(3), 461-470.

Beldüz A.O., H. R., OZKAN H. . (2007). DNA replikasyonu ve onarımı. *DNA replikasyonu ve onarımı.Moleküler biyoloji kitabı*(3), 93-142.

Bener, L., Yaşar, R., & Kuran, M. J. B. S. J. o. A. (2018). Isi şok proteinleri ve in Vitro embriyo. *1*(3), 89-93.

Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F., & Forte, M. J. T. i. b. s. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. *26*(2), 112-117.

Boer, J., & Hoeijmakers, J. H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, *21*(3), 453-460.

Bonifacio, A. F., & Hued, A. C. (2019). Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate based pesticides on structural biomarkers in Cnesterodon decemmaculatus. *Chemosphere*, *236*, 124311. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.042

Borges, T. J., Wieten, L., van Herwijnen, M. J., Broere, F., van der Zee, R., Bonorino, C., & van Eden, W. (2012). The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol*, *3*, 95. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00095

Bremner, J., & Beattie, J. H. (1990). Metallothionein and the trace metals. . *Ann Rev Nutr ,, 10*, 63-83.

Brenneman, M. A., Wagener, B. M., Miller, C. A., Allen, C., & Nickoloff, J. A. (2002). XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell*, *10*(2), 387-395. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00595-6

Brewer, M. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *10*(4), 221-247.

Brum, A., Dotta, G., Roumbedakis, K., Gonçalves, E. L., Garcia, L. P., Garcia, P.,…Martins, M. L. J. J. o. E. S. (2014). Hematological and histopathological changes in silver catfish Rhamdia quelen (Siluriformes) exposed to clomazone herbicide in the Madre River, Santa Catarina State, Southern Brazil. *%J Journal of Environmental Science Health, Part B*, *49*(3), 169-175.

Bütüner, B., & Kantarcı, G. (2006). Mutasyon, Dna Hasarı, Onarım Mekanizmaları Ve Kanserle İlişkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, *35*(2), 149-170.

Campagne, M., Thibodeaux, H., Van Bruggen, N., Cairns, B., & Lowe, D. G. (2000). Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and-2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *20*(14), 5200-5207.

Camps, C., Sirera, R., Iranzo, V., Taron, M., & Rosell, R. (2007). Gene expression and polymorphisms of DNA repair enzymes: cancer susceptibility and response to chemotherapy. *Clin Lung Cancer*, *8*(6), 369-375. https://doi.org/10.3816/CLC.2007.n.017

Cancer Genome Atlas Research, N. (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, *489*(7417), 519-525. https://doi.org/10.1038/nature11404

Cancer, I. A. f. R. o., & Organization, W. H. (1977). *Some fumigants, the herbicides 2, 4-D and 2, 4, 5-T, chlorinated dibenzodioxins and miscellaneous industrial chemicals* (Vol. 15). World Health Organization.

Canosa, L. F., Chang, J. P., Peter, R. E. J. G., & Endocrinology, C. (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *151*(1), 1-26.

Cao, F., Wu, P., Huang, L., Li, H., Qian, L., Pang, S., & Qiu, L. J. A. t. (2018). Short-term developmental effects and potential mechanisms of azoxystrobin in larval and adult zebrafish (Danio rerio). *198*, 129-140.

Casimiro, M. C., Pestell, R. G., & Knudsen, E. S. (2017). Cell cycle-related kinases. In *Cancer Therapeutic Targets* (pp. 989-996). Springer Dordrecht Heidelberg New York.

Chang, C., Worley, B. L., Phaeton, R., & Hempel, N. (2020). Extracellular Glutathione Peroxidase GPx3 and Its Role in Cancer. *Cancers (Basel)*, *12*(8). https://doi.org/10.3390/cancers12082197

Chen, X., Zhang, E., Fang, L., Zhang, J., Zhu, J., He, W., & Luo, X. (2013). Repair effects of exogenous SOD on Bacillus subtilis against gamma radiation exposure. *J Environ Radioact*, *126*, 259-263. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.09.005

Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., & Green, D. R. J. S. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *303*(5660), 1010-1014.

Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., & Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, *193*(1-2), 3-34. https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00287-7

Chu, G. (1997). Double strand break repair. *J Biol Chem*, *272*(39), 24097-24100. https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24097

Chu, X., Ci, X., He, J., Jiang, L., Wei, M., Cao, Q.,…He, J. J. M. (2012). Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic acid, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *17*(3), 3586-3598.

Clark, R. S., Chen, J., Watkins, S. C., Kochanek, P. M., Chen, M., Stetler, R. A.,…Graham, S. H. J. J. o. N. (1997). Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. *17*(23), 9172-9182.

Cnubben, N. H., Rietjens, I. M., Wortelboer, H., van Zanden, J., van Bladeren, P. J. J. E. t., & pharmacology. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *10*(4), 141-152.

Conte, C., Mutti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regina, G., Maestri, E., & Marmiroli, N. (1998). DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere*, *37*(14-15), 2739-2749. https://doi.org/10.1016/s0045-6535(98)00317-8

Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*, *299*(1-2), 35-55. https://doi.org/10.1016/s0378-1119(02)01055-7

Costa, Almeida, A. A., Costa, J. P., Gracas Lopes Cito, A. M., Saffi, J., & Freitas, R. M. (2012). Superoxide dismutase and catalase activities in rat hippocampus pretreated with garcinielliptone FC from Platonia insignis. *Pharm Biol*, *50*(4), 453-457. https://doi.org/10.3109/13880209.2011.611146

Costa, R. S., Carneiro, T. C. B., Cerqueira-Lima, A. T., Queiroz, N. V., Alcântara-Neves, N. M., Pontes-de-Carvalho, L. C.,…Figueiredo, C. A. J. I. I. (2012). Ocimum gratissimum Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway

inflammation in an experimental model of respiratory allergy to Blomia tropicalis. *13*(1), 126-134.

Cunningham, J., Vierkant, R., Sellers, T., Phelan, C., Rider, D., Liebow, M.,…Wang, X. J. B. j. o. c. (2009). Cell cycle genes and ovarian cancer susceptibility: a tagSNP analysis. *101*(8), 1461-1468.

Çolak, R. (2007). İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinler. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci., 3(37*, 10-17.

Darcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int, 43*(6), 582-592. https://doi.org/10.1002/cbin.11137

Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelt, B., & Traganos, F. (1996). Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry, 25*(1), 1-13. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960901)25:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-N

Dasgupta, S., Choyke, S., Ferguson, P. L., & McElroy, A. E. (2018). Antioxidant responses and oxidative stress in sheepshead minnow larvae exposed to Corexit 9500® or its component surfactant, DOSS. *194*, 10-17.

Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., & Wang, X.-F. J. P. o. t. N. A. o. S. (1995). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *92*(12), 5545-5549.

Davico, C. E., Pereira, A. G., Nezzi, L., Jaramillo, M. L., de Melo, M. S., Müller, Y. M. R.,…Research, P. (2021). Reproductive toxicity of Roundup WG® herbicide: impairments in ovarian follicles of model organism Danio rerio. *28*, 15147-15159.

De Wolf, H., Blust, R., & Backeljau, T. J. M. R. R. i. M. R. (2004). The use of RAPD in ecotoxicology. *566*(3), 249-262.

Del Pizzo, J. J., Borkowski, A., Jacobs, S. C., & Kyprianou, N. J. T. A. j. o. p. (1999). Loss of cell cycle regulators p27Kip1 and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. *155*(4), 1129-1136.

Deng, J., Yu, L., Liu, C., Yu, K., Shi, X., Yeung, L. W.,…Zhou, B. J. A. T. (2009). Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *93*(1), 29-36.

Doganlar, O., Doganlar, Z. B., Muranlı, F. D. G., Guner, U. J. W., Air,, & Pollution, S. (2016). Genotoxic effect and carcinogenic potential of a mixture of as and cd in zebrafish at permissible maximum contamination levels for drinking water. *227*, 1-16.

Domitrović, R., Potočnjak, I., Crnčević-Orlić, Ž., Škoda, M. J. F., & Toxicology, C. (2014). Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. *66*, 321-328.

Domitrović, R., Škoda, M., Marchesi, V. V., Cvijanović, O., Pugel, E. P., Štefan, M. B. J. F., & toxicology, c. (2013). Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *51*, 370-378.

DPT, D. P. T. K. S. T. İ. Ö. İ. K. (2001). *Kimya sanayii (Tarım İlaçları) özel ihtisas komisyonu raporu* (Devlet Planlama Teşkilatı Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı; yayın no. DPT ; 2582 ÖİK ; 594., Issue.

Duarte, M., Colombo, J., Rossit, A. R., Caetano, A., Borim, A. A., Wornrath, D., & Silva, A. E. (2005). Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, *11*(42), 6593.

Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O., & Canhilal, R. (2010). Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongresi.

Eder, K. J., Leutenegger, C. M., Köhler, H.-R., Werner, I. J. E., & safety, E. (2009). Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha). *72*(1), 182-190.

Ertuğrul, F., & Koç, İ. (2011). Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University*, *2011*(2).

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., & Martinou, J.-C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane.

Evans, D. H. (1987). The Fish Gill - Site of Action and Model for Toxic Effects of Environmental-Pollutants. *Environmental Health Perspectives, 71*, 47-58. https://doi.org/Doi 10.2307/3430412

Fadel, O., El Kirat, K., & Morandat, S. J. B. e. B. A.-B. (2011). The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *1808*(12), 2973-2980.

Faggio, C., Pagano, M., Alampi, R., Vazzana, I., & Felice, M. R. J. A. T. (2016). Cytotoxicity, haemolymphatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in Mytilus galloprovincialis. *180*, 258-265.

FAO, W., . (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations ve

World Health Organization. *The International Code of Conduct on Pesticide*

*Management*.https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/CODE_2014Sep_ENG.pdf

Farag, M. R., Khalil, S. R., Zaglool, A. W., Hendam, B. M., Moustafa, A. A., Cocco, R.,…Alagawany, M. J. B. (2021). Thiacloprid induced developmental neurotoxicity via ROS-oxidative injury and inflammation in chicken embryo: the possible attenuating role of chicoric and rosmarinic acids. *10*(11), 1100.

Felisbino, K., Kirsten, N., da Silva Milhorini, S., Marçal, I. S., Bernert, K., Schiessl, R.,…Guiloski, I. C. J. E. P. (2023). Teratogenic effects of the dicamba herbicide in Zebrafish (Danio rerio) embryos. *334*, 122187.

Ferrario, C., Parolini, M., De Felice, B., Villa, S., & Finizio, A. J. E. p. (2018). Linking sub-individual and supra-individual effects in Daphnia magna exposed to sub-lethal concentration of chlorpyrifos. *235*, 411-418.

Fidan Yaylalı, G. (2009). Obez insülin direnci olan hastalarda IGF-1 gen polimorfizmi.

Fleury, C., Mignotte, B., & Vayssiere, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie, 84*(2-3), 131-141. https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01369-x

Floyd, R. A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *11*(9), 1447-1450. https://doi.org/10.1093/carcin/11.9.1447

Ford, J. M. J. M. R. F., & Mutagenesis, M. M. o. (2005). Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *577*(1-2), 195-202.

Fox, B. K., Breves, J. P., Davis, L. K., Pierce, A. L., Hirano, T., Grau, E. G. J. G., & Endocrinology, C. (2010). Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. *166*(3), 573-580.

Franke, K. H., Miklosi, M., Goebell, P., Clasen, S., Steinhoff, C., Anastasiadis, A. G.,…Schulz, W. A. J. U. (2000). Cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 is expressed preferentially in early stages of urothelial carcinoma. *56*(4), 689-695.

Friedberg, E. (1984). DNA Repair, . *Freeman WH and Company*, 1-2.

Gartel, A. L., Serfas, M. S., Tyner, A. L. J. P. o. t. S. f. E. B., & Medicine. (1996). p21—negative regulator of the cell cycle. *213*(2), 138-149.

Ghelichpour, M., Mirghaed, A. T., Hoseinifar, S. H., Khalili, M., Yousefi, M., Van Doan, H., & Perez-Jimenez, A. J. A. t. (2019). Expression of immune, antioxidant and stress related genes in different organs of common carp exposed to indoxacarb. *208*, 208-216.

Ghoshal, K., & Jacob, S. T. (2001). Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, *66*, 357-384. https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)66034-8

Ghoshal, K., Wang, Y., Sheridan, J. F., & Jacob, S. T. (1998). Metallothionein induction in response to restraint stress. Transcriptional control, adaptation to stress, and role of glucocorticoid. *J Biol Chem*, *273*(43), 27904-27910. https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.27904

Giray Kurt, A. (2007). *Callisto Herbisitinin Zea mays L.(Mısır)'ın Martha F1 Kültür formunda total glutatyon, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve pigment içeriği üzerine etkileri*

Grace, M., & Blakely, W. J. R. M. (2007). Transcription of five p53-and Stat-3-inducible genes after ionizing radiation. *42*(6-7), 1147-1151.

Gross, A., McDonnell, J. M., Korsmeyer, S. J. J. G., & development. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *13*(15), 1899-1911.

Grossmann, K., Kwiatkowski, J. J. P. B., & Physiology. (2000). The mechanism of quinclorac selectivity in grasses. *66*(2), 83-91.

Grossmann, K. J. W. S. (1998). Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides. *46*(6), 707-716.

Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Koksal, Z., Turkan, F., Çetinkaya, S.,…chemistry, m. (2016). Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *31*(6), 1698-1702.

Hagen-Mann, K., & Mann, W. (1995). RT-PCR and alternative methods to PCR for in vitro amplification of nucleic acids. *%J Experimentalclinical endocrinology*

*diabetes Care*, *103*(03), 150-155.

Hajhosseini, L., Khaki, A., Merat, E., Ainehchi, N. J. A. J. o. T., Complementary, & Medicines, A. (2013). Effect of rosmarinic acid on sertoli cells apoptosis and serum antioxidant levels in rats after exposure to electromagnetic fields. *10*(6), 477-480.

Hamdallah, A., Davydov, V. V., & Shvets, V. N. (2014). Oxidative stress and the enzyme system of aldehyde catabolism in the muscle mitochondria of immobilized pubertal rats. *Ukr Biochem J, 86*(6), 50-55. https://doi.org/10.15407/ubj86.06.050

Hamilton, M., Russo, R., Thurston, R. J. E. S., & Technology. (1978). Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in bioassays. *12*(4), 417-417.

Han, Y., Liu, T., Wang, J., Wang, J., Zhang, C., Zhu, L. J. P. B., & Physiology. (2016). Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (Danio rerio) livers. *133*, 13-19.

Haque, E., & Ward, A. C. (2018). Zebrafish as a Model to Evaluate Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials*, *8*(7). https://doi.org/ARTN 56110.3390/nano8070561

Hashmi, T. A., Qureshi, R., Tipre, D., & Menon, S. J. E. F. (2020). Investigation of pesticide residues in water, sediments and fish samples from Tapi River, India as a case study and its forensic significance. *21*(1), 1-10.

Hassan, F. U., Nawaz, A., Rehman, M. S., Ali, M. A., Dilshad, S. M. R., & Yang, C. J. (2019). Prospects of HSP70 as a genetic marker for thermo-tolerance and immuno-modulation in animals under climate change scenario. *Animal Nutrition*, *5*(4), 340-350. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.06.005

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *45*, 51-88. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857

He, L., Shen, D., Li, J., & Mao, W. J. T. A. R. (2020). RETRACTED: Alpinumisoflavone suppresses human Glioblastoma cell growth and induces cell cycle arrest through activating peroxisome proliferator-activated receptor-γ. *303*(11), 2801-2810.

Hebert-Schuster, M., Fabre, E. E., & Nivet-Antoine, V. (2012). Catalase polymorphisms and metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *15*(4), 397-402. https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328354a326

Hildeman, D. A., Mitchell, T., Aronow, B., Wojciechowski, S., Kappler, J., & Marrack, P. J. P. o. t. N. A. o. S. (2003). Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *100*(25), 15035-15040.

Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A., & Sherr, C. J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*, *15*(5), 2672-2681. https://doi.org/10.1128/MCB.15.5.2672

Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*(6835), 366-374. https://doi.org/10.1038/35077232

Hoeijmakers, J. H., & Kanaar, R. (1998). Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *8*(12), 483-489.

Huang, C. Y., & Lin, H. C. (2011). The effect of acidity on gill variations in the aquatic air-breathing fish, Trichogaster lalius. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, *158*(1), 61-71. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.09.004

Huang, Y., Peng, J., Oberley, L. W., & Domann, F. E. (1997). Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radic Biol Med*, *23*(2), 314-320. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00095-6

Husak, V. V., Mosiichuk, N. M., Maksymiv, I. V., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I. J. E. T., & Pharmacology. (2016). Oxidative stress responses in gills of goldfish, Carassius auratus, exposed to the metribuzin-containing herbicide Sencor. *45*, 163-169.

Icard, P., Fournel, L., Wu, Z., Alifano, M., & Lincet, H. J. T. i. b. s. (2019). Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer. *44*(6), 490-501.

Jan, R., & Chaudhry, G. E. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*, *9*(2), 205-218. https://doi.org/10.15171/apb.2019.024

Jeon, Y. J., Song, K. S., Han, H. J., Park, S. H., Chang, W., & Lee, M. Y. J. A. o. p. r. (2014). Rosmarinic acid inhibits chemical hypoxia-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. *37*, 907-915.

Jeppesen, D. K., Bohr, V. A., & Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, *94*(2), 166-200. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.04.013

Jiang, J., Bi, H., Zhuang, Y., Liu, S., Liu, T., & Ma, Y. J. B. l. (2016). Engineered synthesis of rosmarinic acid in Escherichia coli resulting production of a new intermediate, caffeoyl-phenyllactate. *38*, 81-88.

Jiao, L., Hassan, M. M., Bondy, M. L., Wolff, R. A., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., & Li, D. H. (2008). XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk

of pancreatic cancer. *American Journal of Gastroenterology*, *103*(2), 360-367. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01615.x

Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H.,…Fu, Z. J. C. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (Danio rerio). *78*(7), 846-852.

Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., & Fu, Z. J. C. (2011). Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (Danio rerio). *82*(3), 398-404.

Joardar, S., Dewanjee, S., Bhowmick, S., Dua, T. K., Das, S., Saha, A., & De Feo, V. J. I. j. o. m. s. (2019). Rosmarinic acid attenuates cadmium-induced nephrotoxicity via inhibition of oxidative stress, apoptosis, inflammation and fibrosis. *20*(8), 2027.

Johnson, R. D., & Jasin, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo Journal*, *19*(13), 3398-3407. https://doi.org/DOI 10.1093/emboj/19.13.3398

Jun, S. H., Kim, T. G., & Ban, C. (2006). DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *FEBS J*, *273*(8), 1609-1619. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05190.x

Jurgens, M. D., Crosse, J., Hamilton, P. B., Johnson, A. C., & Jones, K. C. (2016). The long shadow of our chemical past - High DDT concentrations in fish near a former agrochemicals factory in England. *Chemosphere*, *162*, 333-344. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.078

Kagi, J. H., Himmelhoch, S. R., Whanger, P. D., Bethune, J. L., & Vallee, B. L. (1974). Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition, and metal content. *J Biol Chem*, *249*(11), 3537-3542. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4831228

Kakoolaki, S., Talas, Z. S., Cakir, O., Ciftci, O., & Ozdemir, I. (2013). Role of propolis on oxidative stress in fish brain. *Basic Clin Neurosci*, *4*(2), 153-158. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25337342

Kanaar, R., & Hoeijmakers, J. H. (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol*, *8*(12), 483-489. https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01383-x

Kanungo, J., Cuevas, E., F Ali, S., & Paule, M. G. J. C. p. d. (2014). Zebrafish model in drug safety assessment. *20*(34), 5416-5429.

Kaya, A. A., Şentürk, M., & Kaya, E. Ç. J. G. Ü. S. B. D. (2019). Nitro grubu İçeren Bazı Maddelerin Glutatyon Redüktaz Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi. *8*(4), 438-443.

Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackiv, T., Mishchenko, L., Manusadžianas, L.,…safety, e. (2021). Common and particular biochemical responses of Unio tumidus to herbicide, pharmaceuticals and their combined exposure with heating. *208*, 111695.

Kim, G.-D., Park, Y. S., Jin, Y.-H., & Park, C.-S. (2015). Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *99*, 2083-2092.

Kirici, M., Turk, C., Caglayan, C. J. A. E., & Research, E. (2017). Toxic effects of copper sulphate pentahydrate on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of freshwater fish Capoeta umbla (Heckel, 1843) tissues. *15*(3).

Knapen, M. F., Zusterzeel, P. L., Peters, W. H., & Steegers, E. A. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, *82*(2), 171-184. https://doi.org/10.1016/s0301-2115(98)00242-5

Koroxenidou, L., Ohlson, L. C., & Hällström, I. P. J. J. o. h. (2005). Long-term 17α-ethinyl estradiol treatment decreases cyclin E and cdk2 expression, reduces cdk2 kinase activity and inhibits S phase entry in regenerating rat liver. *43*(3), 478-484.

Kosanic, M., Rankovic, B., & Dasic, M. (2012). Mushrooms as Possible Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *11*(4), 1095-1102. <Go to ISI>://WOS:000313093700013

Kumar, N., Willis, A., Satbhai, K., Ramalingam, L., Schmitt, C., Moustaid-Moussa, N., & Crago, J. J. C. (2020). Developmental toxicity in embryo-larval zebrafish (Danio rerio) exposed to strobilurin fungicides (azoxystrobin and pyraclostrobin). *241*, 124980.

Kumar, N. S., & Gurusubramanian, G. J. S. V. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *11*(3), 116-124.

Kumar, V., Abbas, K., & Fausto, N. (2004). Pathologic Basis of Disease. *Seventh Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders*, *26-32*, 289-306.

Langseth, L. (1995). *Oxidants, antioxidants, and disease prevention*. ILSI Europe Brussels's, Belgium.

Lchim, G., & Tait, S. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, *16*(8), 539-548.

Lee, H. J., Cho, H.-S., Park, E., Kim, S., Lee, S.-Y., Kim, C.-S.,…Chun, H. S. J. T. (2008). Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *250*(2-3), 109-115.

Lee, J., Jung, E., Koh, J., Kim, Y. S., & Park, D. J. T. J. o. d. (2008). Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *35*(12), 768-771.

Leibeling, D., Laspe, P., & Emmert, S. J. J. o. m. h. (2006). Nucleotide excision repair and cancer. *37*, 225-238.

Lerebours, A., Cambier, S., Hislop, L., Adam-Guillermin, C., Bourdineaud, J.-P. J. M. R. G. T., & Mutagenesis, E. (2013). Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. *755*(1), 55-60.

Li, G., Bush, J. A., & Ho, V. C. J. J. o. i. d. (2000). p53-Dependent Apoptosis in Melanoma Cells After Treatment with Camptothecin 1. *114*(3), 514-519.

Li, H., Yu, S., Cao, F., Wang, C., Zheng, M., Li, X.,…safety, e. (2018). Developmental toxicity and potential mechanisms of pyraoxystrobin to zebrafish (Danio rerio). *151*, 1-9.

Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. J. L. s. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *79*(21), 2056-2068.

Lin, Z., Kong, H., Nei, M., & Ma, H. (2006). Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(27), 10328-10333. https://doi.org/10.1073/pnas.0604232103

Liu, C., Yu, K., Shi, X., Wang, J., Lam, P. K., Wu, R. S., & Zhou, B. J. A. t. (2007). Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (Oreochromis niloticus). *82*(2), 135-143.

Liu, L., Jiang, C., Wu, Z.-Q., Gong, Y.-X., Wang, G.-X. J. E., & safety, e. (2013). Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (Ctenopharyngodon idella) juveniles. *98*, 297-302.

Liu, W., Li, P., Qi, X., Zhou, Q., Zheng, L., Sun, T., & Yang, Y. J. C. (2005). DNA changes in barley (Hordeum vulgare) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *61*(2), 158-167.

Livingstone, D. J. M. p. b. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *42*(8), 656-666.

Long, P., Huang, H., Liao, X., Fu, Z., Zheng, H., Chen, A.,…Agriculture. (2013). Mechanism and capacities of reducing ecological cost through rice–duck cultivation. *93*(12), 2881-2891.

Lushchak, V. I. J. A. t. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *101*(1), 13-30.

Ma, J., Li, Y., Li, W., & Li, X. J. S. o. t. t. e. (2018). Hepatotoxicity of paraquat on common carp (Cyprinus carpio L.). *616*, 889-898.

Ma, J., Zhu, J., Wang, W., Ruan, P., Rajeshkumar, S., & Li, X. J. E. p. (2019). Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *252*, 1288-1300.

Madabhushi, R., Pan, L., & Tsai, L.-H. J. N. (2014). DNA damage and its links to neurodegeneration. *83*(2), 266-282.

Malumbres, M., & Barbacid, M. J. N. r. c. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *9*(3), 153-166.

Margoshes, M., & Vallee, B. L. (1957). A Cadmium Protein from Equine Kidney Cortex. *Journal of the American Chemical Society*, *79*(17), 4813-4814. https://doi.org/DOI 10.1021/ja01574a064

Marzec-Wroblewska, U., Kaminski, P., Lakota, P., Szymanski, M., Wasilow, K., Ludwikowski, G.,…Michalkiewicz, J. (2011). Zinc and iron concentration and SOD activity in human semen and seminal plasma. *Biol Trace Elem Res*, *143*(1), 167-177. https://doi.org/10.1007/s12011-010-8868-x

Massarsky, A., Kozal, J. S., & Di Giulio, R. T. J. C. (2017). Glutathione and zebrafish: Old assays to address a current issue. *168*, 707-715.

Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellularmolecular life sciences 62*, 670-684.

Mengüç, Ç. (2018). Herbisit toksisitesi ve yabancı otlara karşı alternatif mücadele stratejileri. *Turkish Journal of Weed Science*, *21*(1), 61-73.

Mesureur, J., & Vergunst, A. C. (2014). Zebrafish embryos as a model to study bacterial virulence. 41-66.

Miles, A. T., Hawksworth, G. M., Beattie, J. H., & Rodilla, V. (2000). Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *35*(1), 35-70. https://doi.org/10.1080/10409230091169168

Miron, D. d. S., Silva, L. V. F. d., Golombieski, J. I., Machado, S. L. d. O., Marchezan, E., & Baldisserotto, B. J. C. R. (2004). Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, Rhamdia quelen, fingerlings. *34*, 1465-1469.

Mitchell, J. R., Hoeijmakers, J. H., & Niedernhofer, L. J. J. C. o. i. c. b. (2003). Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *15*(2), 232-240.

Miyajima, Y., Satoh, K., Uchida, T., Yamada, T., Abe, M., Watanabe, S.-i.,…Makimura, K. J. J. o. d. s. (2013). Rapid real-time diagnostic PCR for Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *69*(3), 229-235.

Mizgirev, I. V., & Revskoy, S. (2010). A new zebrafish model for experimental leukemia therapy. *Cancer Biol Ther*, *9*(11), 895-902. https://doi.org/10.4161/cbt.9.11.11667

Mohseny, A., & Hogendoorn, P. J. C. A. i. O. (2014). Zebrafish as a model for human osteosarcoma. 221-236.

Mona, M. H., Gaafar, R. M., Helal, I. B., Omran, N. E., Salama, W. M. J. T. J. o. B., & Zoology, A. (2013). Evaluation of cytotoxic effects of atrazine and glyphosate herbicides on Biomphalaria glabrata snails. *66*(2), 68-75.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. J. F. r. r. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *40*(2), 223-231.

Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, *374*(6518), 131-134.

Morillo, E., & Villaverde, J. (2017). Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Sci Total Environ*, *586*, 576-597. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.020

Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Biagianti-Risbourg, S., & Vernet, G. (2005). Effects of the herbicide isoproturon on metallothioneins, growth, and antioxidative defenses in the aquatic worm Tubifex tubifex (Oligochaeta, Tubificidae). *Ecotoxicology*, *14*(5), 559-571. https://doi.org/10.1007/s10646-005-0008-6

Murray, S. A., Yang, S., Demicco, E., Ying, H., Sherr, D. H., Hafer, L. J.,…Xiao, Z. X. J. J. J. o. c. b. (2005). Increased expression of MDM2, cyclin D1, and p27Kip1 in carcinogen-induced rat mammary tumors. *95*(5), 875-884.

Mushtaq, N., Schmatz, R., Ahmed, M., Pereira, L. B., da Costa, P., Reichert, K. P.,…biochemistry. (2015). Protective effect of rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of strepotozotocin-induced diabetic rats. *71*, 743-751.

Muto, A., & Kawakami, K. (2013). Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. *Frontiers in Neural Circuits*, *7*. https://doi.org/ARTN 11010.3389/fncir.2013.00110

Naito, Y., Masaichi, C.-i. L., Kato, Y., Nagai, R., & Yonei, Y. J. A.-A. M. (2010). Oxidative stress markers. *7*(5), 36-44.

Neuer, A., Spandorfer, S., Giraldo, P., Dieterle, S., Rosenwaks, Z., & Witkin, S. J. H. r. u. (2000). The role of heat shock proteins in reproduction. *6*(2), 149-159.

Nguyen, T., Sherratt, P. J., & Pickett, C. B. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *43*, 233-260. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229

Nho, R. S., & Sheaff, R. J. J. P. i. c. c. r. (2003). p27kip1 contributions to cancer. *5*, 249-259.

Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *%J Free radical biology*, *31*(11), 1287-1312.

Nordberg, J., & Arner, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, *31*(11), 1287-1312. https://doi.org/Doi 10.1016/S0891-5849(01)00724-9

Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. J. c. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death. *74*(4), 609-619.

Ondei Lde, S., Estevao Ida, F., Rocha, M. I., Percario, S., Souza, D. R., Pinhel, M. A., & Bonini-Domingos, C. R. (2013). Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia heterozygotes. *Rev Bras Hematol Hemoter*, *35*(6), 409-413. https://doi.org/10.5581/1516-8484.20130122

Oruc, E. O., Sevgiler, Y., & Uner, N. J. C. B. (2004). Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2, 4-D and azinphosmethyl. *%J Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, *137*(1), 43-51.

Oruç, E. Ö., Usta, D. J. E. t., & pharmacology. (2007). Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of Cyprinus carpio. *23*(1), 48-55.

Ozden, O., Park, S. H., Kim, H. S., Jiang, H., Coleman, M. C., Spitz, D. R., & Gius, D. (2011). Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress. *Aging (Albany NY)*, *3*(2), 102-107. https://doi.org/10.18632/aging.100291

Palle-Reisch, M., Cichna-Markl, M., & Hochegger, R. J. F. c. (2014). Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of three mustard species (Sinapis alba, Brassica nigra and Brassica juncea) in food. *153*, 66-73.

Parra-Arroyo, L., Gonzalez-Gonzalez, R. B., Castillo-Zacarias, C., Melchor Martinez, E. M., Sosa-Hernandez, J. E., Bilal, M.,…Parra-Saldivar, R. (2022). Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. *Sci Total Environ*, *807*(Pt 3), 151879. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151879

Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D., Fontaínhas-Fernandes, A. J. P. B., & Physiology. (2006). Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia Oreochromis niloticus. *85*(2), 91-96.

Pestalozzi, B., Luporsi-Gely, E., Jost, L., & Bergh, J. (2005). ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of primary breast cancer. *Annals of Oncology*, *16*, i7-i9.

Pesticides, A., & Authority, V. M. (2005). Evaluation of the new active QUINCLORAC in the product Drive Herbicide.

Petersen, M., & Simmonds, M. S. J. P. (2003). Rosmarinic acid. *62*(2), 121-125.

Petersen, M. J. P. R. (2013). Rosmarinic acid: new aspects. *12*, 207-227.

Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*, *19*(2). https://doi.org/10.3390/ijms19020448

Piancini, L., Guiloski, I., de Assis, H. S., & Cestari, M. J. T. R. (2015). Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. *2*, 1157-1163.

Picha, M. E., Turano, M. J., Beckman, B. R., & Borski, R. J. J. N. a. j. o. a. (2008). Endocrine biomarkers of growth and applications to aquaculture: a minireview of growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding proteins as potential growth indicators in fish. *70*(2), 196-211.

Pulur, A., Karaca, İ., & Karaca, S. Y. (2017). Isı şok protein 70 (Heat Shock Proteın 70) düzeylerinin normal ve preeklamptik gebelerdeki seviyesi. *27*(2), 88-92.

Qiao, S., Li, W., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K., Takeuchi, F.,…Yoshino, M. J. F. r. r. (2005). Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264. 7 macrophages. *39*(9), 995-1003.

Radwan, D., Mohamed, A., Fayez, K., & Abdelrahman, A. J. H. (2019). Oxidative stress caused by Basagran® herbicide is altered by salicylic acid treatments in peanut plants. *5*(5).

Rafieian-Kopaei, M., Baradaran, A., & Rafieian, M. (2013). Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. *J Res Med Sci*, *18*(7), 629. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516501

Rahman, M., Hossain, Z., Mollah, M., & Ahmed, G. (2002). Effect of Diazinon 60 EC on Anabas testudineus, Channa punctatus and Barbodes gonionotus.

Rai, R., Peng, G., Li, K., Lin, S.-Y. J. C. G., & Proteomics. (2007). DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. *4*(2), 99-106.

Randall, C., Hock, W., Crow, E., Hudak-Wise, C., & Kasai, J. J. N. A. o. S. D. o. A. R. F., Washington, DC. Search in. (2013). National pesticide applicator certification core manual.

Ranga Roa, G. V., Rupela, O. P., Rameshwar Roa, V., & Reddy, Y. V. (2007). Role of biopesticides in crop protection: present status and future thrust. *Indian Journal of Plant Protection*.

Reinecke, M., Björnsson, B. T., Dickhoff, W. W., McCormick, S. D., Navarro, I., Power, D. M.,…endocrinology, c. (2005). Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *142*(1-2), 20-24.

Resgalla, C., Jr., Noldin, J. A., Tamanaha, M. S., Deschamps, F. C., Eberhardt, D. S., & Rorig, L. R. (2007). Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas, Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicology, 16*(8), 565-571. https://doi.org/10.1007/s10646-007-0165-x

Revoltella, S., Baraldo, G., Waltenberger, B., Schwaiger, S., Kofler, P., Moesslacher, J.,…Jansen-Duerr, P. J. M. (2018). Identification of the NADPH oxidase 4 inhibiting principle of Lycopus europaeus. *23*(3), 653.

Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., & Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci, 66*(6), 981-993. https://doi.org/10.1007/s00018-009-8736-z

Roos, W. P., & Kaina, B. J. T. i. m. m. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *12*(9), 440-450.

Ruttkay-Nedecky, B., Nejdl, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T.,…Kizek, R. (2013). The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences, 14*(3), 6044-6066. https://doi.org/10.3390/ijms14036044

Rylander, M. N., Feng, Y., Bass, J., & Diller, K. R. (2005). Thermally induced injury and heat-shock protein expression in cells and tissues. *Cell Injury: Mechanisms, Responses, and Repair, 1066*, 222-242. https://doi.org/10.1196/annals.1363.009

Ryvolova, M., Krizkova, S., Adam, V., Beklova, M., Trnkova, L., Hubalek, J., & Kizek, R. J. C. A. C. (2011). Analytical methods for metallothionein detection. *7*(3), 243-261.

Salisbury, F., & Ross, C. J. B., CA. (1992). Plant physiology 4th edition Wadsworth.

Samani, A. A., Yakar, S., LeRoith, D., & Brodt, P. J. E. r. (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *28*(1), 20-47.

Samarakkody, A. S., Shin, N. Y., & Cantor, A. B. (2020). Role of RUNX Family Transcription Factors in DNA Damage Response. *Mol Cells, 43*(2), 99-106. https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0304

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, *73*, 39-85. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723

Sánchez-Campillo, M., Gabaldon, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Baño, M., Alcaraz, M.,…Toxicology, C. (2009). Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *47*(2), 386-392.

Sandra, D., & Day, N. M. (1998). Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-II). *30*(7), 767-771.

Sandrini, J. Z., Trindade, G. S., Nery, L. E. M., Marins, L. F. J. P., & Photobiology. (2009). Time-course expression of DNA repair-related genes in hepatocytes of zebrafish (Danio rerio) after UV-B exposure. *85*(1), 220-226.

Scarth, J. J. X. (2006). Modulation of the growth hormone–insulin-like growth factor (GH–IGF) axis by pharmaceutical, nutraceutical and environmental xenobiotics: An emerging role for xenobiotic-metabolizing enzymes and the transcription factors regulating their expression. A review. *36*(2-3), 119-218.

Schafer, K. A. (1998). The cell cycle: a review. *Veterinary pathology*, *35*(6), 461-478.

Sen, S., & Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, *1083*, 1-37. https://doi.org/BOOK_DOI 10.1021/bk-2011-1083

Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., & Svobodova, Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinarni Medicina*, *56*(11), 537-546. https://doi.org/10.17221/4272-Vetmed

Shahrestani, V. N., Haddadi, M., Kermani, A. R. S. J. B., & Neuroscience, C. (2021). Behavioral and molecular analysis of antioxidative potential of rosmarinic acid against methamphetamine-induced augmentation of Casp3a mRNA in the zebrafish brain. *12*(2), 243.

Shaner, D. L. (2014). *Herbicide handbook*. Weed Science Society of America.

Sharma, D., Sarmah, R., Sarmah, R., Pokhrel, H., Bhagabati, S. K., Sarma, D. K.,…Mili, K. J. E. (2024). Lambda-Cyhalothrin induced behavioural, neurotoxic and oxidative stress on vertebrate model Danio rerio (Hamilton-Buchanan 1822). 1-14.

Shaw, P., Mondal, P., Dey Bhowmik, A., Bandyopadhyay, A., Sudarshan, M., Chakraborty, A.,…Toxicology. (2022). Environmentally relevant hexavalent chromium disrupts elemental homeostasis and induces apoptosis in zebrafish liver. *108*(4), 716-724.

Sheikh, M. S., & Fornace Jr, A. J. J. J. o. c. p. (2000). Role of p53 family members in apoptosis. *182*(2), 171-181.

Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *13*(12), 1501-1512.

Shi, G. H., Cui, Q. Q., Pan, Y. T., Sheng, N., Sun, S. J., Guo, Y., & Dai, J. Y. (2017). 6:2 Chlorinated polyfluorinated ether sulfonate, a PFOS alternative, induces embryotoxicity and disrupts cardiac development in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, *185*, 67-75. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.002

Shi, X., Du, Y., Lam, P. K., Wu, R. S., Zhou, B. J. T., & pharmacology, a. (2008). Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *230*(1), 23-32.

Short, S. P., & Williams, C. S. (2017). Selenoproteins in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Selenium and Selenoproteins in Cancer*, *136*, 49-83. https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.08.002

Silins, I., & Hogberg, J. (2011). Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J Environ Res Public Health*, *8*(3), 629-647. https://doi.org/10.3390/ijerph8030629

Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., & Svobodova, Z. J. N. L. (2009). REVIEWS Oxidative stress in fish induced by pesticides. *30*(1), 2.

Soares, J., Castro, L. F. C., Reis-Henriques, M., Monteiro, N., & Santos, M. J. E. (2012). Zebrafish (Danio rerio) life-cycle exposure to chronic low doses of

ethinylestradiol modulates p53 gene transcription within the gonads, but not NER pathways. *21*, 1513-1522.

Solomon, K. R., Dalhoff, K., Volz, D., & Van Der Kraak, G. (2013). Effects of herbicides on fish. In *Fish physiology* (Vol. 33, pp. 369-409). Elsevier.

Soudani, N., Chaâbane, M., Ghorbel, I., Elwej, A., Boudawara, T., Zeghal, N. J. G. P., & Biophysics. (2019). Glyphosate disrupts redox status and up-regulates metallothionein I and II genes expression in the liver of adult rats. Alleviation by quercetin. *38*(2).

Souza, K. B., Jutfelt, F., Kling, P., Forlin, L., & Sturve, J. (2014). Effects of Increased CO2 on Fish Gill and Plasma Proteome. *PLoS One*, *9*(7). https://doi.org/ARTN e10290110.1371/journal.pone.0102901

Spence, S. A., Clark, V. L., & Isabella, V. M. (2012). The role of catalase in gonococcal resistance to peroxynitrite. *Microbiology (Reading)*, *158*(Pt 2), 560-570. https://doi.org/10.1099/mic.0.053686-0

Stadler, K. J. D. A. O. D., a New Insight. (2013). Oxidative stress in diabetes. 272-287.

Stara, A., Machova, J., Velisek, J. J. E. T., & Pharmacology. (2012). Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (Cyprinus carpio L.). *33*(2), 334-343.

Stein, J. P., Ginsberg, D. A., Grossfeld, G. D., Chatterjee, S. J., Esrig, D., Dickinson, M. G.,…Cote, R. J. (1998). Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, *90*(14), 1072-1079. https://doi.org/10.1093/jnci/90.14.1072

Stephensen, E., Sturve, J., & Forlin, L. (2002). Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, *133*(3), 435-442. https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00129-1

Sterling, T. M., & Hal, J. C. (1997). Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. *Reviews in Toxicology*, *1*, 111-142.

Strachan. T, & Andrew. RP. (1999). Human Molecular Genetics 2. *2nd ed: Garland Science*.

Subba Rao, K. (2007). Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol*, *3*(3), 162-172. https://doi.org/10.1038/ncpneuro0448

Sugamura, K., & Keaney, J. F., Jr. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, *51*(5), 978-992. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004

Swamy, M. K., Sinniah, U. R., Ghasemzadeh, A. J. A. m., & biotechnology. (2018). Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *102*, 7775-7793.

Swarup, V., Ghosh, J., Ghosh, S., Saxena, A., Basu, A. J. A. a., & chemotherapy. (2007). Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *51*(9), 3367-3370.

Taniyama, Y., & Griendling, K. K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, *42*(6), 1075-1081. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F

TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI, T. O. B. B. K. Ü. R. (2024). *Tarım Orman Bakanlığı Bitki Koruma Ürün Ruhsatları*. https://bku.tarimorman.gov.tr/BKURuhsat/Index

Taspinar, M. S., Aydin, M., Sigmaz, B., Yildirim, N., Agar, G. J. E. S., & Research, P. (2017). Protective role of humic acids against picloram-induced genomic instability and DNA methylation in Phaseolus vulgaris. *24*, 22948-22953.

Tian, Z., Shen, G., Yuan, G., Song, K., Lu, J., & Da, L. J. J. o. C. P. (2020). Effects of Echinochloa crusgalli and Cyperus difformis on yield and eco-economic thresholds of rice. *259*, 120807.

Tkacova, J., & Angelovicova, M. (2012). Heat shock proteins (HSPs): a review. *17*, 18.

Toni, C., Menezes, C., Clasen, B., Leitemperger, J., Pretto, A., Adaime, M. B.,…safety, e. (2013). Oxidative stress in carp exposed to quinclorac herbicide under rice field condition. *92*, 27-31.

Topal, S. (2011). Allelokimyasalların herbisit etkileri. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *25*, 23-26.

Tsan, M. F., & Gao, B. (2004). Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol*, *1*(4), 274-279. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16225770

Tsutsui, H., Ide, T., Shiomi, T., Kang, D., Hayashidani, S., Suematsu, N.,…Takeshita, A. J. C. (2001). 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *104*(24), 2883-2885.

Ünsal, N. P. (1993). *Bitki büyüme maddeleri*. İstanbul Üniversitesi.

Vatan, Ö. (2019). Rosmarinik Asidin Cisplatine Karşı Antisitotoksik ve Antigenotoksik Etkisinin A549 ve Beas-2B Hücre Hatlarında Araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, *45*(3), 263-270.

Vegi, A., & Wolf-Hall, C. E. J. J. o. f. s. (2013). Multiplex real-time PCR method for detection and quantification of mycotoxigenic fungi belonging to three different genera. *78*(1), M70-M76.

Velisek, J., Stara, A., Kolarova, J., Svobodova, Z. J. P. B., & Physiology. (2011). Biochemical, physiological and morfological responses in common carp (Cyprinus carpio L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. *100*(3), 305-313.

Venkatachalam, K., Gunasekaran, S., Jesudoss, V. A. S., Namasivayam, N. J. E., & Pathology, T. (2013). The effect of rosmarinic acid on 1, 2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *65*(4), 409-418.

Vialykh, E., Solidolova, M., OIu, B., Bulgakova, I., & Polonikov, A. J. Z. n. i. p. i. S. K. (2012). Catalase gene polymorphism is associated with increased risk of cerebral stroke in hypertensive patients. *112*(8 Pt 2), 3-7.

Vong, Q., Chan, K., & Cheng, C. J. J. o. E. (2003). Quantification of common carp (Cyprinus carpio) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. *178*(3), 513-521.

Vostálová, J., Zdařilová, A., & Svobodová, A. J. A. o. d. r. (2010). Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *302*, 171-181.

Vural, N., Yalçinçiray, Ö., & Cavuldak, Ö. A. (2021). Experimental design and multi-response optimization of green solvent extraction conditions for rosmarinic acid and antioxidant components in Ocimum basilicum L.

Wahl, G. M., & Carr, A. M. (2001). The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nature cell biology*, *3*(12), E277-E286.

Wang, T., Chen, F., Chen, Z., Wu, Y.-F., Xu, X.-L., Zheng, S., & Hu, X. J. W. J. o. G. (2004). Honokiol induces apoptosis through p53-independent pathway in human colorectal cell line RKO. *10*(15), 2205.

Weber, H., Hühns, S., Jonas, L., Sparmann, G., Bastian, M., Schuff-Werner, P. J. F. r. b., & medicine. (2007). Hydrogen peroxide-induced activation of defense mechanisms against oxidative stress in rat pancreatic acinar AR42J cells. *42*(6), 830-841.

Wenzel, E. S., & Singh, A. T. J. I. V. (2018). Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *32*(1), 1-5.

Whitley, D., Goldberg, S. P., & Jordan, W. D. J. J. o. v. s. (1999). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *29*(4), 748-751.

Whittaker, J. W. (2012). Non-heme manganese catalase--the 'other' catalase. *Arch Biochem Biophys*, *525*(2), 111-120. https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.008

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. J. N. a. r. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *18*(22), 6531-6535.

Wong, R. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *30*, 1-14.

Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, *30*(1), 87. https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87

Xing, H., Li, S., Wang, X., Gao, X., Xu, S., & Wang, X. J. C. (2013). Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of common carp (Cyprinus carpio L.). *90*(3), 910-916.

Xing, H., Liu, T., Zhang, Z., Wang, X., Xu, S. J. F., & immunology, s. (2015). Acute and subchronic toxic effects of atrazine and chlorpyrifos on common carp (Cyprinus carpio L.): Immunotoxicity assessments. *45*(2), 327-333.

Yalçın, B. (2023). Farklı Sentetik Polimerler İle Kaplanan Manyetik Demir Oksit (Manyetit) Nanopartiküllerinin Sitotoksik Ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması.

Yamada, N. A., Hinz, J. M., Kopf, V. L., Segalle, K. D., & Thompson, L. H. J. J. o. B. C. (2004). XRCC3 ATPase activity is required for normal XRCC3-Rad51C complex dynamics and homologous recombination. *279*(22), 23250-23254.

Yıldız, M., Gürkan, M. O., Turgut, C., Kaya, Ü., & ÜNAL, G. (2005, 3-7 Ocak). *Tarimsal savaşımda kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları* VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi,

Yonar, M., Ispir, U., Yonar, S. M., Kirici, M. J. C., & Biology, M. (2016). Effect of copper sulphate on the antioxidant parameters in the rainbow trout fry, Oncorhynchus mykiss. *62*(6), 55-58.

Yonar, S. M., Sakin, F., Yonar, M. E., Ispir, U., & Kirici, M. J. F. E. B. (2011). Oxıdatıve Stress Bıomarkers Of Exposure To Deltamethrın In Raınbow Trout Fry(Oncorhynchus mykiss). *20*(8), 1931-1935.

Zarbin, M. (2012). Treatment of Oxidative Stress With Chelation Therapy. *Archives of Ophthalmology*, *130*(12), 1597-1598. https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.1306

Žegura, B., Zajc, I., Lah, T. T., & Filipič, M. J. T. (2008). Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *51*(4), 615-623.

Zemheri-Navruz, F., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Acaroz, U., Demirel, H. H., Demirkapi, E. N. J. E. S., & Research, P. (2023). Resveratrol alleviates pyraclostrobin-

induced lipid peroxidation, oxidative stress, and DNA damage in rats. *30*(3), 6414-6423.

Zeng, C., Sun, H., Xie, P., Wang, J., Zhang, G., Chen, N.,…Li, G. J. A. t. (2014). The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. *149*, 25-32.

Zhang, H. Y., Firempong, C. K., Wang, Y. W., Xu, W. Q., Wang, M. M., Cao, X.,…Xu, X. M. (2016). Ergosterol-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with enhanced in vitro antitumor activity and oral bioavailability. *Acta Pharmacologica Sinica*, *37*(6), 834-844. https://doi.org/10.1038/aps.2016.37

Zhang, S., Yan, Y., Wang, B., Liang, Z., Liu, Y., Liu, F.,…Bioengineering. (2014). Selective responses of enzymes in the two parallel pathways of rosmarinic acid biosynthetic pathway to elicitors in Salvia miltiorrhiza hairy root cultures. *117*(5), 645-651.

Zhang, Y., Li, X., & Wang, Z. (2010). Antioxidant activities of leaf extract of Salvia miltiorrhiza Bunge and related phenolic constituents. *48*(10), 2656-2662.

Zhao, M., Zhang, Y., Wang, C., Fu, Z., Liu, W., & Gan, J. J. C. R. i. T. (2009). Induction of macrophage apoptosis by an organochlorine insecticide acetofenate. *22*(3), 504-510.

Zhu, L., Mu, X., Wang, K., Chai, T., Yang, Y., Qiu, L., & Wang, C. J. E. p. (2015). Cyhalofop-butyl has the potential to induce developmental toxicity, oxidative stress and apoptosis in early life stage of zebrafish (Danio rerio). *203*, 40-49.

Zhu, Q., Wani, M. A., El-Mahdy, M., & Wani, A. A. J. J. o. B. C. (2000). Decreased DNA repair efficiency by loss or disruption of p53 function preferentially affects removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and slow repair sites in transcribed strand. *275*(15), 11492-11497.

Ziegler, D. S., Kung, A. L., & Kieran, M. W. (2008). Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. *J Clin Oncol*, *26*(3), 493-500. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.9717

Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *%J Pharmacology therapeutics92*(1), 57-70.

Ziskoven, C., Jager, M., Zilkens, C., Bloch, W., Brixius, K., & Krauspe, R. (2010). Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? *Orthopedic Reviews, 2*(2), 95-101. https://doi.org/ARTN e2310.4081/or.2010.e23

Zivna, D., Plhalova, L., Praskova, E., Stepanova, S., Siroka, Z., Sevcikova, M.,…Svobodova, Z. (2013). Oxidative stress parameters in fish after subchronic exposure to acetylsalicylic acid. *Neuro Endocrinol Lett, 34 Suppl 2*, 116-122. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24362103

Zona, S., Burton, M. J., Moraes, G. N., & Lam, E. (2014). FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *1839*(11), 1316-1322.

# ÖZGEÇMİŞ

Kezban YILDIRIM ilk ve orta öğrenimini Edirne'de tamamladı. 2010 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ve 2012 yılında Trakya Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi İşletme Bölümünde yan dal eğitimine başladı. 2014 yılında hem lisans hem de yan dal eğitiminden mezun oldu. 2014 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı lisansüstü eğitime başladı. 2016 yılında 'Kadmiyum ve Arseniğin Ergin Zebra Balığı (*Danio rerio*, Hamilton 1822) Isı Şok Protein Genleri Üzerindeki Etkisi' başlıklı teziyle lisansüstü eğitimini tamamladı. 2018 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı doktora programında eğitime başladı. İstanbul Üniversitesi Genetik Kulübü (İÜGEN) tarafından düzenlenen Uluslararası Katılımlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okullarında 2013, 2014 ve 2015 yıllarında en iyi poster yarışmalarında 1.lik kazandı. Lisans ve lisansüstü eğitimi sırasında hakemli ulusal ve uluslararası kongrelerde 1 sözlü, 10 poster bildirisi; lisansüstü eğitimi süresince diğer ulusal ve uluslararası hakemli dergilerde 1 adet makale; SCI indekslerine giren dergilerde 2 makalesi yayınlandı.

**EKLER**

## Kullanılan Cihazlar

| CİHAZ | MARKA | ÜLKE |
|---|---|---|
| Santrifüj | Centurion Scientific | İngiltere |
| Otomatik Pipet Seti | RAININ | Almanya |
| Dijital Pipetör | Thermo Fisher Scientific | ABD |
| Mikroplate Okuyucu | Thermo Fisher Scientific | ABD |
| Mini Santrifüj | Daihan Scientific | Kore |
| Soğutmalı Santrifüj | Hettich | Almanya |
| Nanodrop | Optizen | Kore |
| PCR Cihazı | Applied Biosystems | ABD |
| Gerçek Zamanlı PCR Cihazı | Applied Biosystems | ABD |
| Vorteks | WiseMix | Kore |
| Karıştırıcı Blok | Bioer | Çin |
| Çalkalayıcı | Wisemix | Kore |
| Elektronik Tartı | A&D Company | Japonya |
| 4°C Buzdolabı | Vestel | Türkiye |
| -20°C Derin Dondurucu | Vestel | Türkiye |
| -80°C Derin Dondurucu | Wisd | Kore |
| Distile-Ultra Saf Su Cihazı | TKA | ABD |
| Tissue Lyser LT | Qiagen | Almanya |
| Mini Jel Tankı | Invitrogen | ABD |
| Güç Kaynağı | Cleaver | İngiltere |

## Kimyasal Sarf ve Diğer Malzemeler

| **MALZEME** | **MARKA** | **ÜLKE** |
|---|---|---|
| Etanol | Merck | ABD |
| Dimetil Sülfoksit | Merck | ABD |
| Dnaz/Rnaz İçermeyen Su | Invitrogen | ABD |
| RNA İzolasyon Kiti | Life Technologies | ABD |
| cDNA Ters Transkriptaz (High Capacity cDNA Reverse Transcription)Kiti | Applied Biosystems | ABD |
| Blastaq 2X qPCR Master Mix Rox | Abm | Kanada |
| Rosmarinik Asit | Sigma-Aldrich | ABD |
| Kuinklorak | Facet | Almanya |
| 0.2 mm Çapında İnce Bilye | Next Advance | ABD |
| Cam Malzemeler | Lamtek | Türkiye |
| 0,2 ml'lik PCR Strip Tüpleri | Axygen | Meksika |
| 1.5 ve 2 ml'lik Tüpler | Eppendorf | Almanya |
| Steril Eldiven | Dolphin | Türkiye |