



**FİPRONİL VE SİFLUTRİN PESTİSİTLERİNİN ZEBRA BALIKLARINDA
(*Danio rerio*, HAMILTON, 1822) SANGER VE YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ
İLE DNA METİLASYON MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Gölsüm KOÇAK

**DOKTORA TEZİ
ÇEVRE BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gölsüm KOÇAK

26/01/2024

FİPRONİL VE SİFLUTRİN PESTİSİTLERİNİN ZEBRA BALIKLARINDA (*Danio rerio*, HAMILTON, 1822) SANGER VE YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ İLE DNA METİLASYON MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Gülsüm KOÇAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2024

ÖZET

Çevresel kirlilik modern insan yaşamında önemli sorunlardan biri olarak ele alınmaktadır. Artan nüfus ve sanayi ile birlikte tüketim ihtiyacı artmış ve bu doğrultuda ürünlerdeki zararlıların uzaklaştırılması ve ürün verimi açısından kimyasal maddelere yönelim de artış göstermiştir. Dünyada pestisitlerin aşırı kullanımı özellikle sucul canlıları olumsuz etkilemektedir. Bu tez çalışmasının amacı; endokrin bozucu olduğu bilinen sentetik piretroid insektisitlerden siflutrin ve fenilprezol insektisit ailesinden fipronilin sucul bir model organizma olan zebra balıklarında (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) DNA metilasyon mekanizmasının araştırılmasıdır. Araştırma akut toksisite ve DNA metilasyonu deneyleri olmak üzere iki bölümde yürütülmüştür. Akut toksisite deneylerinde ortalama boyları $2,51 \pm 0,49$ cm ve ağırlıkları $0,14 \pm 0,06$ g olan zebra balıkları kullanılmıştır. Laboratuvara adaptasyonları sağlanan 100 adet balık, 5 adet akvaryuma eşit şekilde dağıtılmış ve adaptasyon sürecinde ölüm oranının %5'ten az olmasına dikkat edilmiştir. Kontrol grubu, deney gruplarında ise test kimyasallarının LC_{50} değerinin 1/10 ve 1/100'ü (siflutrin 3,61 µg/L ve fipronil 1,81 µg/L) alınarak dozlama yapılmıştır. Deney grubundaki akaryumlarda 96. saat ve 7. günde metabolik artıkları sucul ortamdan uzaklaştırmak amacıyla akvaryum suları değiştirilerek dozlama tekrarlanmıştır. 7. günün sonunda balıklar baş ve kuyruk kısımları kesilerek, -80°C'de saklanmıştır. Bu çalışmada belirlenen *CYP1A*, *HSP70* genleri ile üç adet *ACTB*, *B2M* ve *EF1A* referans gen çalışılmıştır. Sonuç olarak siflutrin ve fipronil için Sanger dizileme metilasyon yüzdeleri gruplara göre ayrı ayrı hesaplanmış ve Grup 1 (Kontrol) yüzdesi 28,36; Grup 2 (fipronil 7. gün düşük doz) 26,73; Grup 3 (fipronil 7. gün yüksek doz) 27,65 olarak belirlenmiştir. Siflutrin pestisit gruplarında ise Grup 4 (siflutrin 96. saat düşük doz) 27,26; Grup 5 (siflutrin 96. saat yüksek doz) 28,31; Grup 6 (siflutrin 7. gün düşük doz) 28,26 ve Grup 7 (siflutrin 7. gün yüksek doz) 28,22 olarak verilmiştir. Yeni nesil dizi analizi istatistik sonuçlarına göre ise $p < 0,05$ olmak üzere CG, CHG ve CHH bölgelerinde ortalama farklar 0,05 seviyesinde anlamlıdır ve genler arasında anlamlı ilişki bulunduğu belirlenmiştir. Çevre kirleticisi olan iki pestisit sucul organizmalar üzerine etkilerinin belirlenmesi ve çevresel epigenetik ile literatüre katkı sağlanmıştır.

Bilim Kodu : 203, 10105.07
Anahtar Kelimeler : Zebra balığı, DNA metilasyonu, fipronil, siflutrin, Sanger dizileme, Yeni nesil dizileme
Sayfa Adedi : 107
Danışman : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL
İkinci Danışman : Prof. Dr. A. Çağlan GÜNAL

INVESTIGATION OF THE DNA METHYLATION MECHANISM OF FIPRONIL AND
CYFLUTHRIN PESTICIDES IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*, HAMILTON, 1822) BY
SANGER AND NEXT GENERATION SEQUENCE ANALYSIS

(Ph. D. Thesis)

Gölsüm KOÇAK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2024

ABSTRACT

Environmental pollution is considered one of the important problems in modern human life. With the increasing population and industry, the need for consumption has increased, and accordingly, the tendency towards chemical substances has increased in terms of removing pests from products and product efficiency. Excessive use of pesticides in the world negatively affects especially aquatic organisms. The purpose of this thesis study is to investigate the DNA methylation mechanism of cyfluthrin, a synthetic pyrethroid insecticide known to be an endocrine disruptor, and fipronil, a member of the phenylpyrazole insecticide family, in zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822), an aquatic model organism. The research was conducted in two parts: acute toxicity and DNA methylation experiments. Zebrafish with an average length of 2.51 ± 0.49 cm and a weight of 0.14 ± 0.06 g were used in acute toxicity experiments. 100 fish adapted to the laboratory were distributed equally among 5 aquariums, and care was taken to ensure that the mortality rate was less than 5% during the adaptation process. In the control group and experimental groups, dosing was done by taking 1/10 and 1/100 of the LC50 value of the test chemicals (cyfluthrin 3.61 µg/L and fipronil 1.81 µg/L). In the aquariums of the experimental groups, dosing was repeated by changing the aquarium water at the 96th hour and on the 7th day to remove metabolic residues from the aquatic environment. At the end of the 7th day, the head and tail parts of the fish were cut off and stored at -80°C. In this study, the determined *CYP1A*, *HSP70* genes, and reference genes *ACTB*, *B2M*, and *EF1A* were studied. As a result, Sanger sequencing methylation percentages for cyfluthrin and fipronil were calculated separately according to groups and the percentage of Group 1 (Control) was 28.36; Group 2 (fipronil day 7 low dose) 26.73; Group 3 (fipronil high dose on day 7) was determined as 27.65. Among the cyfluthrin pesticide groups, Group 4 (cyfluthrin 96th-hour low dose) was 27.26; Group 5 (cyfluthrin 96th-hour high dose) was 28.31; Group 6 (cyfluthrin day 7 low dose) was 28.26 and Group 7 (cyfluthrin day 7 high dose) was given as 28.22. According to the statistical results of the next-generation sequence analysis, the average differences in the CG, CHG, and CHH regions were significant at the 0.05 level, with $p < 0.05$, and it was determined that there was a significant relationship between the genes. Contributions were made to the literature by determining the effects of two pesticides, which are environmental pollutants, on aquatic organisms and environmental epigenetics.

Science Code : 203, 10105.07
Key Words : Zebrafish, DNA methylation, fipronil, cyfluthrin, Sanger sequencing, Next generation sequencing
Page Number : 107
Supervisor : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL
Co-Supervisor : Prof. Dr. A. Çağlan GÜNAL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteğini ve ilgisini her zaman hissettiğim, bana hep yeni kapılar açan, akademik gelişimime katkıda bulunan ve yoluma ışık tutan, anlayış ve özveriyle çalışmamı başarılı bir şekilde tamamlamamı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL'e, bilgi ve tecrübeleriyle yardımcı olan, tez çalışmama dair geri bildirimleriyle ufkumu açan, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, saygıdeğer hocam ikinci danışmanım, Prof. Dr. A. Çağlan GÜNAL'a, tez çalışmamın her aşamasında değerli fikir ve görüşleriyle beni yönlendiren ve destekleyen değerli tez izleme kurulu jüri üyelerim Prof. Dr. Rabia SARIKAYA ve Prof. Dr. Aydın AKBULUT hocalarıma, SD Lab Araştırma Grubu Üyelerine, Laboratuvarıda yardımlarından dolayı Uzm. Biyolog Sahra Setenay BARAN'a, Desteği, emekleri ve önerileri için Uzm. Biyolog Ferudun Koçer'e, Uzun ve meşakkatli doktora yolcuğumda bana sabır gösteren, takıldığım her anda yanımda olan, işlerimi kolaylaştırmak için bilgisini benimle paylaşan, her konuda desteğini esirgemeyen güzel insan sevgili eşim, Tarık Anıl Koçak'a ve bu süreçte her an yanımda olan canım kızım Eliz Sevim Koçak'a, Beni yetiştirip bugünlere getiren aileme ve tez sürecim boyunca her zaman desteklerini hissettiğim eşimin ailesine en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: FDE-2023-8307) birimi tarafından desteklenmiştir. GÜ-BAP birimine sağlamış oldukları maddi imkânlardan dolayı teşekkür ederim. Doktora eğitim sürecimde burs desteği sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu'na (100/2000 Öncelikli Alanlar-Toksikoloji) teşekkür ederim.

Babama ithafen...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Endokrin Bozucu Kimyasallar (EBK)	5
2.1.1. Endokrin bozucu kimyasalların sınıflandırılması	7
2.1.2. Endokrin bozucu kimyasalların etki mekanizması	7
2.1.3. Endokrin bozucu kimyasalların toksisitesi.....	8
2.2. Pestisitler	9
2.2.1. Siflutrin	11
2.2.2. Fipronil.....	12
2.2.3. Fipronil ve siflüttrin ile ilgili yasal düzenlemeler	15
2.3. DNA ve protein sentezi	16
2.4. Epigenetik	18
2.4.1. DNA metilasyonu	20
2.4.2. Histon modifikasyonları.....	21
2.4.3. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA)	22
2.5. Genlerin seçilmesi	23
2.5.1. Isı şoku proteinleri (<i>HSP70</i>).....	23

	Sayfa
2.5.2. Sitokrom P4501A (<i>CYP1A</i>)	24
2.6. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)	28
2.7. Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.8. Model Organizma, Zebra balığı (<i>Danio rerio</i> , Hamilton, 1822)	29
2.9. Sanger Dizileme	32
2.10. Yeni Nesil Dizileme (NGS [Next Generation Sequencing])	33
3.MATERYAL METOT	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler	35
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	36
3.1.3. Çalışmada kullanılan primerler	37
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışı	38
3.1.5. Araştırma yeri.....	38
3.1.6. Akvaryum suyunun özellikleri.....	39
3.1.7. Su parametrelerinin ölçülmesi.....	39
3.1.8. Deney hayvanlarının hazırlanması.....	40
3.2. Metot	42
3.2.1. Subletal toksisite deneyleri.....	42
3.2.2. Biyokimyasal analizler	43
3.2.3. İstatistiksel hesaplamalar.....	50
4.BULGULAR	53
4.1. Akut Toksisite Test Bulguları	53
4.2. DNA izolasyon bulguları.....	55
4.3. Bisülfid DNA ve PZR bulguları.....	55
4.4. Sanger Dizi Analizi Bulguları	57
4.5. Yeni Nesil Dizi Analizi Bulguları.....	65

	Sayfa
5.TARTIŞMA	77
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR	877
ÖZGEÇMİŞ	107

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Başlıca endokrin bozucu kimyasallar	7
Çizelge 2.2. Seçilen referans genler ve görevleri	26
Çizelge 2.3. Zebra balığının sınıflandırılması.....	30
Çizelge 2.4. Balıklar için akut toksikolojik çalışmalarda kullanılan su parametreleri.....	31
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	35
Çizelge 3.2. Çalışma aşamasında kullanılan kit ve reaktif bilgileri.....	35
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan cihaz bilgileri	36
Çizelge 3.4. Belirlenen genler için tasarlanan primer dizileri	37
Çizelge 3.5. Zebra balıkları ile yapılan akut toksisite testi ortalama su kalitesi parametreleri (Ocak-Mart 2023).....	40
Çizelge 3.6. Çalışma için belirlenen siflutrin ve fipronil dozlama grupları.....	43
Çizelge 3.7. Reaktif bilgileri ve amplifikasyon PZR koşulları.....	48
Çizelge 3.8. FastGene Optima HotStart Ready Mix Miktarları ve PZR koşulları	49
Çizelge 4.1. Siflutrinin 96 saatlik tahmini letal konsantrasyonları (LC) ve güven aralıkları.....	53
Çizelge 4.2. DNA izolasyonu yapılan dokuların ortalama ve standart sapma değerleri	55
Çizelge 4.3. Bisülfite dönüştürülmüş DNA'ların kübit ölçüm değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri	56
Çizelge 4.4. Belirlenen beş genin primer, dizi, baz sayısı, GC oranı ve erime derecesi bilgileri	56
Çizelge 4.5. <i>HSP70</i> geni tanımlayıcı istatistik bulguları	65
Çizelge 4.6. <i>HSP70</i> genler arasında ANOVA testi istatistik bulguları.....	65
Çizelge 4.7. <i>HSP70</i> ANOVA testi istatistik bulguları	66
Çizelge 4.8. <i>CYP1A</i> tanımlayıcı istatistik bulguları.....	67
Çizelge 4.9. <i>CYP1A</i> ANOVA testi istatistik bulguları	67
Çizelge 4.10. <i>ACTB</i> referans geni tanımlayıcı istatistik bulguları.....	67

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.11. <i>ACTB</i> referans geni ANOVA-Dunnett C testi istatistik bulguları.....	68
Çizelge 4.12. <i>ACTB</i> referans geni ANOVA-Dunnett C testi istatistik bulguları.....	68
Çizelge 4.13. <i>B2M</i> tanımlayıcı istatistik bulguları.....	69
Çizelge 4.14. <i>B2M</i> ANOVA- Dunnett C testi istatistik bulguları.....	69
Çizelge 4.15. <i>B2M</i> ANOVA- Dunnett C testi istatistik bulguları.....	69
Çizelge 4.16. <i>EF1A</i> tanımlayıcı istatistik bulguları	70
Çizelge 4.17. <i>EF1A</i> ANOVA testi istatistik bulguları	70
Çizelge 4.18. <i>EF1A</i> ANOVA testi istatistik bulguları	70
Çizelge 4.19. Örneklerin CG, CHH ve CHG sonuçlarında; okuma derinliği (x eksen) ve metilasyon yüzde (y eksen) bulguları	71

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Endokrin bozucu kimyasalların hormonları taklit etme ve engelleme yöntemleri.....	6
Şekil 2.2. Pestisit yayılım yolları	11
Şekil 2.3. Fipronilin GABA reseptörler üzerindeki etkisi	14
Şekil 2.4. Epigenetik modifikasyonlar	19
Şekil 2.5. DNA metilasyonunun moleküler mekanizması.....	21
Şekil 2. 6. Zebra balığının embriyo gelişimi ve yetişkin zebra balığı.	30
Şekil 2.7. Erişkin zebra balığı görüntüsü	31
Şekil 3.1. DNA izolasyon işlem basamakları	44
Şekil 4.1. Zebra balıklarının 96. saat probit değerleri ve regresyon eğrisi	54
Şekil 4.2. Fipronilin 7. gün yüksek dozlu örneğine ait pik görüntüleri net olan Sanger kromotogram bulguları.....	57
Şekil 4.3. Sanger dizileme sonucu tüm örneklerle ait beş gen grubunun metilasyon yüzde bulguları	64
Şekil 4.4. Fipronil ve siflutrin gruplarına ait Sanger dizileme yüzde bulguları.....	64

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Balıkların laboratuvar ortamına adaptasyon koşulları	39
Resim 3.2. Su parametrelerinin ölçülmesi (YSI, model 51B)	40
Resim 3.3. Deney sonrası buz anestezisi uygulanan balık.....	41
Resim 3.4. Laboratuvar ortamında çalışma öncesi deney hayvanlarının hazırlanması.....	42
Resim 3.5. Laboratuvar ortamı deney düzeneği	43
Resim 3.6. Spektrofotometre ile izole DNA'ların ölçülmesi.....	45
Resim 3.7. DNA miktar tayini ölçümü ve grafiği.....	46
Resim 3. 8. DNA numunelerinin kütüphane hazırlık aşaması.....	50
Resim 4.1. Örneklerle ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri a. F1, F2, F3, F4, F5, b. F8, F9, S1, S3, c. S5, S6, S8, S9, S10, S11, S13).	57
Resim 4.2. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin <i>HSP70</i> geninin kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları	58
Resim 4.3. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin <i>CYP1A</i> geni kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları	58
Resim 4.4. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin <i>ACTB</i> referans geninin kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları.....	59
Resim 4.5. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin <i>B2M</i> referans geninin kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları.....	59
Resim 4.6. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin <i>EF1A</i> referans geninin kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları.....	59
Resim 4.7. Fipronilin 7. gün düşük doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (<i>HSP70</i> , <i>CYP1A</i> , <i>ACTB</i> , <i>EF1A</i> ve <i>B2M</i>) metile sitozinlerin yoğunluk durumları	60
Resim 4.8. Fipronilin 7. gün yüksek doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (<i>HSP70</i> , <i>CYP1A</i> , <i>ACTB</i> , <i>EF1A</i> ve <i>B2M</i>) metile sitozinlerin yoğunluk durumları	60
Resim 4.9. Siflutrinin 96. saat düşük doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (<i>HSP70</i> , <i>CYP1A</i> , <i>ACTB</i> , <i>EF1A</i> ve <i>B2M</i>) metile sitozinlerin yoğunluk durumları	61

Resim	Sayfa
Resim 4.10. Siflutrinin 96. saat yüksek doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (<i>HSP70</i> , <i>CYP1A</i> , <i>ACTB</i> , <i>EF1A</i> ve <i>B2M</i>) metile sitozinlerin yoğunluk durumları	61
Resim 4.11. Siflutrinin 7. gün düşük doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (<i>HSP70</i> , <i>CYP1A</i> , <i>ACTB</i> , <i>EF1A</i> ve <i>B2M</i>) metile sitozinlerin yoğunluk durumları	61
Resim 4.12. Siflutrinin 7. gün yüksek doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (<i>HSP70</i> , <i>CYP1A</i> , <i>ACTB</i> , <i>EF1A</i> ve <i>B2M</i>) metile sitozinlerin yoğunluk durumları	62
Resim 4.13. Fipronil 7.gün yüksek dozlu <i>HSP70</i> genine ait sanger görüntüsü.....	62
Resim 4.14. Fipronil 7.gün yüksek doz grubu <i>EF1A</i> genine ait sanger görüntüsü.....	62
Resim 4.15. Siflutrin kontrol grubuna ait <i>B2M</i> referans geni kromotogram görüntüsü	63
Resim 4.16. Siflutrin 96. Saat düşük doz grubu <i>B2M</i> referans geni kromotogram görüntüsü	63
Resim 4.17. Fipronil 7. gün yüksek doz grubu ile siflutrinin 96. saat düşük doz grubunun <i>CYP1A</i> referans geni NGS görüntüsü	73
Resim 4.18. Siflutrinin 7.gün düşük doz grubuna ait <i>HSP70</i> geni NGS görüntüsü	73
Resim 4.19. Siflutrinin 7. gün düşük dozlu <i>CYP1A</i> referans gen NGS görüntüsü.....	74
Resim 4.20. Fipronilin 7 gün yüksek doz grubu örneğine ait sanger dizi (a) ve yeni nesil dizi analizinde (b) metile olan sitozinler.....	74
Resim 4.21. Siflutrin 96. saat düşük doz grubu örneğine ait sanger dizi (a) ve yeni nesil dizi analizinde (b) metile olan sitozinler.....	75
Resim 4.22. Siflutrin 7. gün düşük doz grubu örneğine ait sanger dizi (a) ve yeni nesil dizi analizinde (b) metile olan sitozinler.....	75
Resim 4.23. Farklı örneklerle ait temiz olarak elde edilmiş Sanger dizileme kromotogram bulguları (a. Kontrol grubu, b. Fipronil 7.gün yüksek doz, c. Siflutrin 96. saat düşük doz, d. Siflutrin 7. gün düşük doz).....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

mg

Miligram

mL

Mililitre

mmol

Milimolar

%

Yüzde

°C

Derece Celsius

µg

MikroGram

µL

MikroLitre

µmo

MikroMolar

Kısaltmalar

Açıklamalar

AC

Avrupa Komisyonu

AhR

Aril hidrokarbon reseptörü

BPA

Bisfenol A

B2M

Beta2 mikroglobulin

bç

Baz çifti

CpG

Sitozin fosfat guanin

CYP1A

Sitokrom P450 1a

DES

Dietilstilbestrol

DMSO

Dimetilsülfoksit

DNA

Deoksiribo nükleik asit

dNTP

Deoksinükleot trifosfat

ddNTP

Dideoksinükleot trifosfat

DSÖ

Dünya Sağlık Örgütü

EBK

Endokrin Bozucu Kimyasallar

EC

Avrupa komisyonu

EDTA

Etilen Diamino Tetra Asetik Asit

Kısaltmalar**Açıklamalar**

EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
<i>EF1A</i>	Uzama faktörü 1 alfa
ELISA	Enzim ilintili immun test
ERα	Östrojen reseptörü- α
Erβ	Östrojen reseptörü- β
EtBr	Ethidium Bromide
GABA	Gama-amino bütirik asit
Glu	Glutamat
GPR30	G protein bağlı reseptör
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HKG	Housekeeping gen
<i>HSP</i>	Isı şoku proteini
L	Litre
LC₅₀	Organizmaların %50'sini öldüren konsantrasyon
LC-MS/MS	Kütle Spektrometresi/Sıvı Kromatografisi
MRL	Maksimum kalıntı limit
NGS	Next generation sequencing
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PAN	Avrupa Pestisit Eylem Ağı
PCBs	Poliklorlu bifeniller
ROS	Reaktif oksijen değeri
ST	Standart
T_m	Erime derecesi
tRNA	taşıyıcı RNA
mRNA	mesajcı RNA
US EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
UV	Ultra viyole
WGBS	Tüm genom dizi analizi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
YND	Yeni nesil dizileme

1. GİRİŞ

Çevresel kirlilik modern insan yaşamında öne çıkan sorunlardan biri olarak ele alınmaktadır. Çevresel kimyasallardan pek çoğuna maruz kalma insanlar ve ekosistemdeki tüm canlıların endokrin süreçlerini etkileyeceği için son dönemde oldukça önemli hale gelmiştir. Dünya nüfusunun artışına bağlı olarak tarım alanlarının gün geçtikçe kullanım kapasiteleri azalmaktadır ve bununla birlikte günümüzün önemli sorunlarının başında gelen açlık sorunu ortaya çıkmaktadır. Gübreleme ve verim artışı için pek çok zararlı için mücadele edilmektedir. Bu zararlılar verim kaybına sebep olmaktadır, onlarla mücadelede kullanılan bazı yöntemler zahmetli, uzun ve maliyetli olduğu için de kimyasal maddelerin kullanımı önem kazanmaktadır.

Pestisit olarak adlandırılan kimyasal madde grubu zararlılarla mücadelede önemli yer tutmaktadır. Son yıllarda bu maddelerin aşırı ve bilinçsiz kullanımları insan ve ekosistem için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Birleşmiş Milletler Çevre Programında kurulan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) pestisit ve çeşitli kirleticilerin de içinde yer aldığı yüz yetmiş altı (176) adet bileşik listesi yayınlamıştır (Ying, 2011). Dünyada pestisitlerin aşırı kullanımıyla birlikte sağlık üzerindeki etkilerinin de hızla artması kaygıyı beraberinde getirmektedir. Yapılan araştırmalar kapsamında bu maddelerin çeşitli sağlık sorunlarına neden olduğu ortaya konmuş ve daha sonra kullanımlarına kısıtlama getirilmiş veya yasaklanmıştır. Sadece tarım alanında değil diğer tüm alanlarda (halk sağlığı, sivrisinek veya zararlı böcek türleri ile mücadelede) kullanımları gün geçtikçe artış göstermiştir. Pestisitler kullanıldıklarında doğrudan veya dolaylı yollarla toprağa oradan da yağmur suları ile yer altı sularına karışarak deniz, göl, akarsu gibi yerlerde bir araya gelerek besin zinciri aracılığıyla insanlara ulaşmaktadır. Kullanılan bu maddelerin çok az bir kısmı hedef organizmaya ulaşmakta olup geri kalan kısım hedef dışı canlıları ve ekosistemi olumsuz etkilemektedir. Bu maddelere maruz kalan insanlarda toksik özellik gösterebilmektedir ve bu etkiler akut ve kronik olmak üzere iki farklı yolla ortaya çıkmaktadır. Akut toksisite, pestisit dozunun tek sefer alınmasıyla aniden ortaya çıkarken, kronik toksisite ise düşük dozların uzun süre alınması sonucu ortaya çıkmaktadır (Costa, 2008; Mahmood, Imadi, Shazadi, Gul ve Hakeem, 2016).

Bu etkiler göz önüne alındığında; 1990'ların başında ortamda meydana gelen doğal ve insan yapımı maddelerin vahşi yaşamda ve insanlarda gelişim ve çoğalmayı olumsuz etkilediği için endokrin bozulma hipotezi olarak ortaya çıkmış ve o tarihten itibaren çalışmalarda artış gözlenmiştir (Colborn, Vom Saal ve Soto, 1993; Segner, 2009). Endokrin bozucu kimyasallar doğal ve sentetik olarak ekosistemde yer almaktadır. Endüstriyel ürünlerden plastik gibi maddeler günlük hayatta ve diğer alanlarda oldukça fazla kullanılmaktadır. Tarım ilaçları, kozmetik ürünleri, organik çözücüler, bebek bakım ürünleri gibi pek çok alanda karşımıza çıkmaktadır ve bu maddelere maruziyet deoksiribonükleik asit (DNA) yapısını etkileyerek epigenetik değişikliklere neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalar, toksik maddelere maruz kalan omurgalılarda, gen transkripsiyonunu etkileyen epigenetik mekanizmanın DNA metilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (Corrales ve diğerleri, 2014; Kamstra, Aleström, Kooter ve Legler, 2015; Strömqvist, Tooke ve Brunström, 2010).

Epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlamayan RNA'lar olarak sınıflandırılmaktadır ve hepsi de kromatinin yapısını etkilemektedir. Epigenetik modifikasyonların beslenme, endokrin bozucu kimyasal maddelere maruz kalma gibi iç ve dış ortamdaki değişikliklerden etkilendiği bilinmektedir. Bu uyarıların epigenetik yapılardaki gen düzenlemesi üzerindeki etkileri çevresel epigenetik olarak tanımlanmaktadır (Baylin ve Jones, 2011; X. Wang, Spandidos, H. Wang ve Seed, 2012). Gen ifadesi, transkripsiyon faktörlerinin ve arttırıcıların gen promotörlerine erişimi ile düzenlenir ve bu da DNA'nın (DNA metilasyonu) veya histonların (asetilasyon, deasetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon) moleküler modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilir. Bu mekanizmalardan en çok çalışılan DNA metilasyonu olmuştur. DNA metilasyonu genom bakımında ve gen susturmada rol alan tipik epigenetik bir mekanizmadır. Zebra balığı gibi omurgalı model organizmalarda sitozin-guanin dinükleotit (CpG) motiflerinde gözlenmektedir. Çevresel stres ve kimyasal maddelere maruz kalma gibi uyarıların birlikte DNA metilasyon durumunda farklılaşma ortaya çıkabilmektedir. DNA metilasyonunu etkileyen durumlar, belirli hücresel sinyal yollarını baskılayarak metabolik hastalık tablosuna, farklı gelişim süreçlerine ve kansere sebep olmaktadır. Yapılan bir çalışmada DNA metilasyonunun yaşamın erken dönemlerinde dış çevresel olumsuzluklara karşı çok hassas olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda beyin fonksiyon bozukluğu gibi nörotoksik etkilere neden olabilecek DNA metilasyon mekanizmasının aydınlatılmasına büyük önem verilmiş çalışmalar mevcuttur (Dorts ve diğerleri, 2016; Qian, Ji, Yue ve Zhao, 2017; 2019; Khor, Soga ve Parhar, 2016).

Çevresel toksikoloji araştırmalarında DNA metilasyon analizleri için model organizma olarak zebra balıklarının kullanılması değerlidir ve bazı hususların dikkate alınması gerekmektedir. Metilasyon yolaklarında bulunan proteinlerin rolünü ve toksik maddelerle etkileşimlerini aydınlatabilmek için gen inaktivasyonu veya aşırı ifadelenmesi gibi fonksiyonel çalışmaların yanı sıra protein analizi de yapılabilir. Bu tür çalışmalar, epigenetiğin toksikolojideki rolünü anlamak için uygun bir model organizma olarak zebra balığının kullanılabilirliğini artırabilmektedir. Maruziyet sonucunda metillenmiş DNA bölgelerini tespit etmek oldukça güç olup genom çapında analizlerin örneğin, tüm genom dizi analizi-WGBS gibi analizler ilk tarama yöntemi olarak önerilmektedir. Sekans analizlerinde Sanger dizileme yöntemi ve yeni nesil dizileme yöntemi de oldukça önem kazanmıştır.

Bu araştırmada iki önemli pestisit olan siflutrin ve fipronilin zebra balıklarına farklı dozlarda maruz bırakılması sonrasında belirlenen genler üzerindeki metilasyon durumları incelenmiştir. Araştırma için bisülfıt sekanslama yöntemi ile metile DNA'lar belirlenerek veriler yorumlanmıştır.

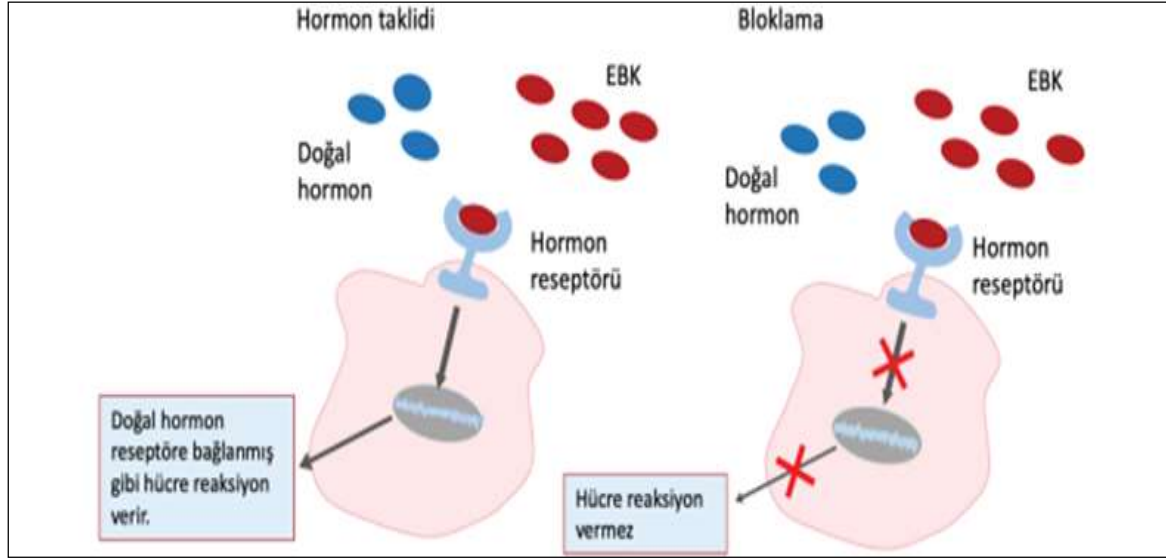
Çalışma; endokrin bozucu olduğu bilinen ve üzerinde birçok çalışmanın sürdürüldüğü siflutrin ve fipronilin suçul bir model organizma olan zebra balıklarında maruz bırakılan doz ve süre sonucunda (96. saat ve 7. gün) belirlenen genler (*HSP70*, *CYP1A*) incelenerek bu bölgelerde meydana gelebilecek metilasyon durumunun incelenmesi amacıyla oluşturulmuştur. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, risk değerlendirme sürecinde endokrin bozucu kimyasalların toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Bozucu Kimyasallar (EBK)

Endokrin bozucu kimyasallar; sağlıklı bir canlıda veya onun gelecek nesillerinde endokrin sistemin fonksiyonunu olumsuz etkilemektedir. Aynı zamanda gelişim, üreme, sinir ve immün sistemi de olumsuz etkileyerek ciddi sağlık sorunlarına sebep olan ve dışarıdan alınan madde veya madde karışımları olarak tanımlanmaktadır (Amir ve diğerleri, 2021; Arsenescu ve diğerleri, 2008; Collotta, Bertazzi ve Bollati, 2013; Liu ve diğerleri, 2016; Seralini ve Jungers, 2021). İlk kez 1991 yılında Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (US EPA) tarafından endokrin bozucular olarak adlandırılmışlardır (Diamanti-Kandarakis ve diğerleri, 2009). Bu kimyasallar aynı zamanda endokrin modülatörler, çevresel hormonlar, endokrin taklitçiler ve endokrin aktif bileşikler olarak da bilinmektedir (Yang, Kim, Weon ve Seo, 2015).

Çevrede pek çok formda serbest olarak bulunabilir ve yapı ve fonksiyon olarak; doğal hormonlar, sentetik hormonlar, fitoöstrojenler, klorlu pestisitler, poliklorlu bifeniller (PCBs), fitalat ve alkilfenoller gibi endüstriyel kimyasalları içerirler (Gálvez-Ontiveros, Páez, Monteagudo ve Rivas, 2020). Gündelik yaşamda kullanılan ürünlerde (gıda, plastik eşyalar, metal kutular, oyuncaklar, kozmetik ürünler, zirai ilaçlar vb.) bulunmakta ve gıda üretiminde sıklıkla tercih edilmektedirler (Yilmaz, Terekeci, Sandal ve Kelestimur, 2020). Gıda ve su ile karışım halinde insana ulaşabilen bu kimyasallar, önemli bir risk oluşturarak, sucul ortamlarda etkileşerek antagonistik, aditif ve sinerjistik etkiler gösterebilmektedir. Bu kimyasallar doğada tek başına bulunmazlar, diğer kimyasallarla birlikte kokteyl/çorba formunda yer alırlar. Doğal hormonların sentezi, salgılanması, taşınması, aktivitesi veya eliminasyonu ile etkileşime girerek hormonların hareketlerini engelleyebilir veya taklit edebilir ve böylece çok çeşitli yan etkiler oluştururlar (Şekil 2.1.) (Caballero-Gallardo, Olivero-Verbel ve Freeman, 2016; Matthiessen, Wheeler ve Weltje, 2018; Mnif ve diğerleri, 2011; Seralini ve Jungers, 2021; Tutanç, Cansız, E. Emekli-Alturfan ve A. Alturfan, 2021; You ve Song, 2021;).



Şekil 2.1. Endokrin bozucu kimyasalların hormonları taklit etme ve engelleme yöntemleri (Tutaç, Cansız, E. Emekli-Alturfan ve A. Alturfan, 2021).

Endokrin bozucu etkilere bağlı olarak; omurgasızlar (Gooding, Wilson, Folmar, Marcovich ve LeBlanc, 2003; Heidrich, Steckelbroeck ve Klingmuller, 2001), sürüngenler, balıklar (Crain, Guillette Jr, Rooney ve Pickford, 1997; Sultana ve diğerleri, 2021; Teta ve Naik, 2017), kuşlar (Vos ve diğerleri, 2000), ve memeliler (Mnif, Pillon, Balaguer ve Bartegi, 2007) çalışmalarda kullanılmıştır. Birçok farklı canlı türlerinde çalışmalar mevcut olup son yıllarda da artış göstermiştir (Diamanti-Kandarakis ve diğerleri, 2009; You ve Song, 2021).

2.1.1. Endokrin bozucu kimyasalların sınıflandırılması

Endokrin bozucu kimyasallar endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değiştiren, ekzojen madde veya madde karışımları olarak tanımlanmaktadır (Azzouz, Colón, Souhail ve Ballesteros, 2019; Vos ve diğerleri, 2000; Wang ve Baskin, 2008). Bunlar doğal olarak bulunabildikleri gibi farklı sentetik ve endüstriyel ürünlerin içerisinde de bulunabilirler. Canlılar tarafından üretilen doğal endokrin bozucular fitoöstrojenler olarak tanımlanmaktadır. Fitoöstrojenler; ayrıca östrojenik, antioksidan, antiproliferatif, antiinflamatuvar ve antiöstrojenik etki gösterir. Doğal endokrin bozucu maddelerin yarı ömürleri kısa olduğu için dokularda birikmez ve vücuttan kolaylıkla atıldıklarından önemli yan etki oluşturmazlar. Örnek olarak günlük hayatta sıklıkla tüketilen elma, havuç, patates, kahve vs. verilebilmektedir (Rietjens, Louisse ve Beekmann, 2017). Sentetik endokrin bozucular ise tarımda, endüstride ve evlerde kullanılan farklı ürünlerin içerisinde yer almaktadır. Dietilstilbestrol (DES) 1940'lı yıllarda kadınlara reçete edilmiş olan ilk sentetik

non-steroid yapıdaki östrojen olarak tarihe geçmiştir. Yaygın olarak kullanılan EBK'lar Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Başlıca endokrin bozucu kimyasallar

Fitoöstrojenler	Glisetein, Prunetin, Desmetilangolestin, Daidzein, Formononetin, Pratensein, Genistein, Ekuol, Biokanin-A, Enterolakton
Fitalatlar	Butil benzil fitalat, Di-heksil fitalat, Di-etilheksil fitalat, Di-n-butil fitalat, Di-n-fenil fitalat, Di-propil fitalat, Dikloroheksil fitalat
Pestisitler	Etilparation, Atrazin, Benomil, Metoksiklor, Karbaril, Klordan, Endosulfan, Heptaklor, Kepon, Vinklozolin, Ketokonazol, Lindan, Malation, Trifluralin
Organohalojenler	Furanlar, Dioksinler, Hekzaklorobenzen, Pentaklorofenol, Poliklorine bifeniller
Ağır metaller	Cıva, Arsenik, Kurşun, Kadmiyum, Uranyum,
İlaçlar	Dietilstilbestrol, Simetidin, Doğum kontrol hapları
Diğerleri	Etan dimetan, Sulfonat, Bisfenol A, B ve F, Metanol, Benzofenol, 2,4-diklorofenol

2.1.2. Endokrin bozucu kimyasalların etki mekanizması

Endokrin bozucu etkilerin anlaşılması için, birçok bileşenden oluşan bir sistem olan endokrin sistem hakkında net bir fikre sahip olmak gerekmektedir. Endokrin bozucular hormonlarla aynı özellikleri gösterirler. Bu maddeler etkilerini nükleer reseptörlerle, nükleer olmayan steroid hormon reseptörleriyle, non-steroid reseptörler veya karmaşık enzimatik yollarla göstermektedir. Aynı zamanda bu kimyasallar reseptörler aracılığıyla etki gösterebileceği gibi hormonun yapımı, yıkımı, taşınması ve atılımını artırıcı veya azaltıcı yönde etki gösterirler (Diamanti-Kandarakis ve diğerleri, 2009). Doğrudan reseptör sinyallemesine müdahale ederek veya herhangi bir başka sinyal yolunu özellikle ksenobiyotik maddenin metabolizmasında önemli rol oynayan bir reseptör olan aril hidrokarbon reseptörünü (AhR) aktive edip etkileyebilir. Bu maddeler östrojen reseptörü- α (ER α) ve östrojen reseptörü- β (ER β) ile düşük bağlanma özelliğine sahip olsa da dünyada oldukça fazla kullanılmaktadır (Shanle ve Xu, 2011). Taklitçi endokrin bozucular östrojenler ve başka nükleer reseptörler arasındaki ER α bağlantılı transkripsiyonel aktiviteyi ve aynı zamanda büyüme faktörü modülasyonunu da bozarlar. G protein bağlı reseptör (GPR30) ve ER α aracılığıyla, ER α bağımlı kinaz yollarını da uyarabilmektedirler (Watson, Bulayeva, Wozniak ve Alyea, 2007).

Endokrin bozucu kimyasallar doğrudan kan hormon seviyelerine etki ettikleri için nörotoksik maddeler, karsinogenler ve ağır metallere ayrılmaktadırlar. Aynı zamanda lipofilik özelliğe sahip olup kısmen de olsa taklit ettikleri endojen hormon ligandına yapı olarak benzerlik göstermektedir. Çalışmalarda uygulanan dozlar göz önünde bulundurulduğunda yüksek dozlar hiçbir etki göstermezken, orta veya düşük dozlar daha fazla etki gösterebilmektedir. Bu durumun sebebi olarak aynı endokrin bozucu kimyasalın konsantrasyonuna bağlı olarak agonist ve antagonist olarak hareket edebilmeleri ve birden fazla etki şekline sahip olabilmeleridir (Kabir, E.R Rahman ve M.S Rahman, 2015).

2.1.3. Endokrin bozucu kimyasalların toksisitesi

Endokrin bozucu kimyasalların insan sağlığını etkilediği bilinmektedir özellikle de tiroit fonksiyonlarını ve üreme sistemini etkilemesinin yanı sıra başka birçok etkisinin olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu maddelere maruz kalınan doz arttıkça veya etkilenme süresi uzadıkça ortaya çıkabilecek olumsuz etkiler daha da şiddetli hale gelebilmektedir. Ayrıca bu maddeler insan ve hayvanlarda üreme, kanser, bağışıklık, doğum kusurları, gelişimsel bozukluklara ve diğer organ bozukluklarına neden olabilmektedir (Kuzukıran ve diğerleri, 2018). Endokrin bozucu kimyasallardan olan pestisitler anti-androjenik ve östrojenik etkiler göstermektedir (Abubakar ve diğerleri, 2020; Stoker ve Kavlock, 2010).

Geniş bir kullanım alanına sahip olan bu maddelerle günlük hayatta sıklıkla karşılaşmaktadır. Uzun süreli maruziyet durumunda ise zararlı etkileri artış göstermektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ile Avrupa Komisyonu (EC) gibi kuruluşlar tarafından belirlenmiş olan “izin verilen en yüksek derişim oranı” ve “kabul edilebilir günlük alım” gibi bazı limitler ile yasal düzenlemeler yapılmıştır. Örneğin, maruziyetin doz ve süresi, maruz kalma dönemi, maruziyetin yolu, birçok maddeye aynı anda maruz kalma gibi etkiler gelecek nesiller için de epigenetik açıdan risk oluşturmaktadır. Bu durumda özellikle maruz kalma yaşı çok önemlidir. Çünkü yetişkinlik dönemi maruziyet sonuçları önemli olmakla birlikte, gelişimin ilk dönemlerinde bu maddelere maruz kalma yaşamın geri kalan kısmını da etkileyen sonuçlara yol açmaktadır (Bourguignon ve diğerleri 2016; Gore ve diğerleri 2015; Yirun ve diğerleri, 2021). Endokrin bozucu kimyasalların kullanımlarından veya maruziyetinden sonra belirli bir süre geçmiş olsa bile organizma vücudunda ve çevrede bulunabilmeleri söz konusudur. Bu sebeple bazıları uzun yarılanma ömrüne sahip oldukları için insanların ve diğer canlıların sağlıklarında uzun süre dahi tehlikeli sonuçlar

oluşturabilirler (Porte ve diğerleri, 2006). Yarılanma süreleri uzun olan maddelerin dayanıklılık direnci artacağı için, birikerek veya besin zincirinde bir basamaktan başka bir basamağa taşınırlar (Annamalai ve Namasivayam, 2015; Yirun ve diğerleri, 2021).

Çevresel kirletici maddeler doğal ortamlarda canlılarla etkileşime girmektedir ve bunun sonucunda biyokonsantrasyon, biyoakümülyasyon ve biyomagnifikasyon gibi bazı kavramların bilinmesi önem kazanmaktadır. Biyokonsantrasyon; sucul ortamda bulunan kimyasal maddelerin organizmanın vücuduna girerek burada birikmesi olayıdır. Biyoakümülyasyon; kimyasal maddelerin canlı vücuduna girerek birikmesi olayı olup kimyasalların vücuttan atılım hızları canlı bünyesine giriş hızından yavaş ise kimyasallar birikmeye başlamaktadır. Özellikle bu birikim yağ dokuda yoğunlaşarak ileriki dönemlerde ciddi olumsuz etkilere sebep olabilmektedir. Biyomagnifikasyon ise; organizmada biriken maddenin besin zinciri aracılığıyla diğer canlılara geçmesi ve konsantrasyonunun katlanarak artmasıdır. Örneğin, pestisitler sucul omurgasız veya omurgalıların solungaç, deri veya sindirim sistemlerinden geçerek canlı vücudunda hedef bir organda birikime neden olabilmektedir. Bu pestisit molekül yapısı küçük ise pasif difüzyon ile organizma vücuduna alınır. Bu olayda sucul canlının yaşı, büyüklüğü, beslenme şekli ve metabolizma hızı pasif difüzyonu etkilemektedir (Gaaied, Oliveira, Bihanic, Cachot ve Banni, 2019; Wang ve diğerleri, 2019).

2.2. Pestisitler

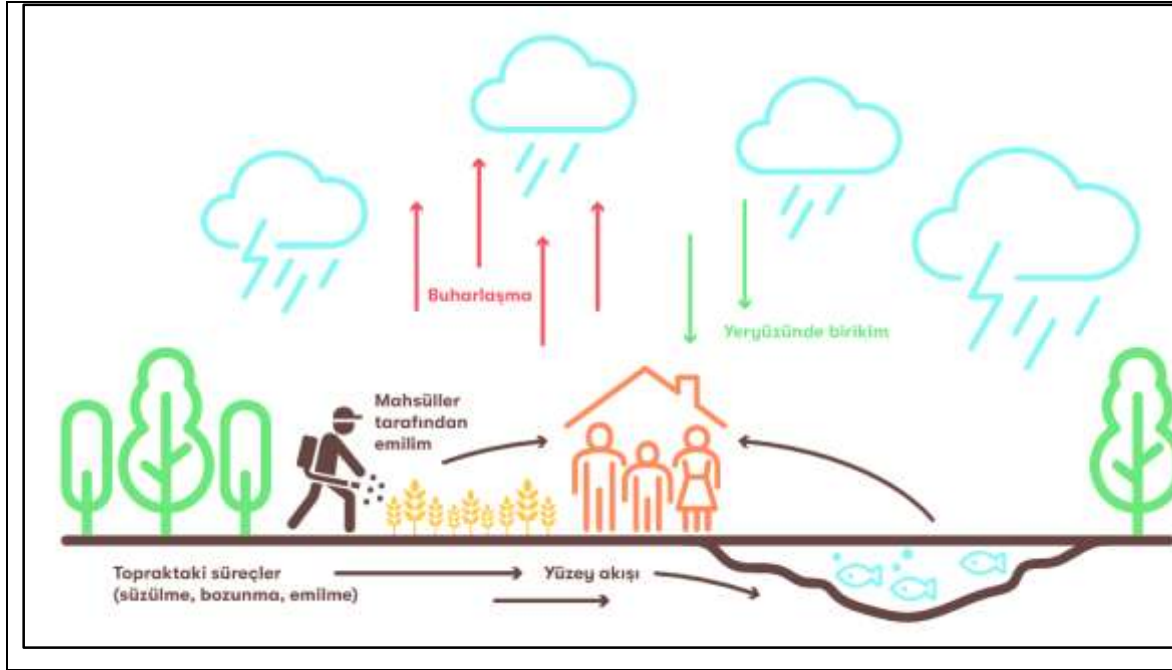
Dünya nüfusunun hızla artması sebebiyle doğal kaynakların aşınması ve kirlenmesine bağlı olarak, güvenilir özelliklere sahip gıdalara olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Pestisit kalıntılarının, çevre kirliliği, gıda güvenliği ve toksikoloji gibi çeşitli uygulama alanları için analiz edilmeleri önemlidir.

Tarımsal üretimde büyük önem taşıyan pestisitler, tarım, ormancılık ve hayvancılığı tehdit eden zararlıları önlemek veya kontrol altına almak için kullanılmaktadır. Ayrıca bitkilerin büyüme ve gelişmesini düzenlemek içinde kullanımları yaygınlaşmaktadır. Son yıllarda tarımın hızla gelişmesiyle birlikte giderek daha önemli bir rol oynayan pestisitlerin 2017 yılında küresel kullanımı 4 milyon tonu aşmıştır (Bernardes, Pazin, Pereira ve Dorta, 2015; Cui ve diğerleri, 2023). Dünya üzerinde 1000'den fazla pestisit çeşidi bulunmaktadır ve bunların büyük bir çoğunluğu da aktif olarak kullanılır. 2017 yılı itibariyle 2019 yılı Dünya

Sağlık Örgütü (DSÖ) raporuna göre günümüze kadar belirlenmiş olan çevre ve insan sağlığını tehdit eden 482 adet pestisit olduğu bildirilmiştir. Bu pestisitlerin ise hepsinin farklı özelliklerinin bulunduğu ve toksikolojik etkilerinin olduğu vurgulanmıştır (WHO, 2019). Ayrıca Avrupa Pestisit Eylem Ağı (PAN) raporuna göre ise pestisitlerin endokrin bozucu etkileri ve etki göstermeyen maksimum doz oranları bildirilmiştir. Besinlerde kullanılacak olan pestisit türlerinin pestisit limitleri bulunmaktadır. Maksimum kalıntı limit (MRL) değerini aşan tüm besinler insan sağlığını hem akut hem de kronik maruziyet ile etkilemektedir (Damalas ve Eleftherohorinos, 2011; Lyssimachou ve Muilerman, 2016).

Pestisitlerin büyük çoğunluğu sentetik olarak üretilmekte olup kullanım amaçlarına göre insektisitler, herbisitler, fungusitler ve akarisitler vb. olarak sınıflandırılır. Pestisitlerin önemli derecede yan etkileri mevcuttur. Bunlardan bazıları reaktif oksijen ürünleri üretimi, DNA'nın yapısındaki bazı değişiklikler, serbest radikallerin seviyesindeki artış, antioksidan savunma sistemi üzerine etkiler olarak örnek verilebilir. Ayrıca büyüme ile ilgili genlerin ifade düzeylerini azaltıcı yönde etki, farklı türlerde hücre ve dokularda ısı şok proteini indükleyicisi olma gibi pek çok etki de mevcuttur (Ceyhun, Aksakal, Kırım, Atabeyoğlu ve Erdoğan, 2012).

Pestisit kirliliği sadece insan sağlığını değil aynı zamanda yüzey ve yeraltı suları, mikro ve makro flora, toprak gibi pek çok çevresel unsuru da olumsuz etkilemektedir (Atreya, 2008; Kaushik, Satya ve Naik, 2009). Modern yaşam tarım için pestisit kullanımını büyük ölçüde teşvik etmektedir, hastalık etkenlerini ve haşereleri kontrol altına alarak halk sağlığını korurken aynı zamanda bilinçsiz kullanımı doğal ekosistemlerde istemeden kirlenmeye yol açmaktadır. Tarımsal uygulamada genel olarak toprak ıslatma ve tohum kaplama ve yaprak spreyleri olarak kullanılır. Aktif bileşenlerinin büyük bir çoğunluğu ise sızıntı ve akıntı yoluyla birlikte su kaynaklarına karışarak potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır. Tarımsal ürünlere pestisit uygulanmasından sonra, uygulanan miktarın belirli bir kısmı hedef ürüne ulaşamamakta ve yüzey suları gibi hedef dışı ekosistemlerde kaybolmaktadır (Şekil 2.2) (Jensen, 2019). Kısacası, sucul canlılar pestisitlerin bilinçsiz kullanımı sonucunda bu tür kirlenmiş sucul alanlarda doğrudan etkilenmektedir. Bu yüzden pestisitlerin sucul canlılar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve bu konu üzerinde önemle durulması gerekmektedir.



Şekil 2.2. Pestisit yayılım yolları (Çağlayan, Yavuz ve Şehiroğlu, 2023)

2.2.1. Siflutrin

Siflutrin [(CAS Numarası: 68359-37-5) siyano (4-floro-3-fenoksi-fenil) metil3-(2,2-dikloroetenil)-2,2-dimetilsiklopropankarboksilat]. Böceklerin kontrolü için, bahçede, evcil hayvanlar ve hayvancılıkta, sivrisinek kontrolünde ve halk sağlığı için gerekli durumlarda kullanılan nonsistemik böcek öldürücülerin aktif maddesidir (İla ve diğerleri, 2008; Verma ve diğerleri, 2021). Siflutrinin özellikle balıklarda çok yüksek toksik (very high toxic<0,1 ppm) özellik gösterdiği belirtilmiştir (Fishel, 2005). Çalışmalarda, letal konsantrasyon (LC_{50}) yani bir grupta bulunan deney hayvanlarının %50'sini öldüren dozun konsantrasyon değerleri belli olan siflutrinin belirlenen sürelerde toksisiteleri incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda siflutrinin yüzey sularındaki değeri 5 $\mu\text{g/L}$ olarak rapor edilmiştir (Kadiru, 2021; Lanteigne, Whiting ve Lydy, 2015; Yang, Hunter, Spurlock ve Gan, 2007). Günümüzde pek çok yapılan çalışmada endokrin bozucu kimyasalların hedef dışı kara ve su canlılarında akut veya kronik toksisiteye sebep olan ve hem insan sağlığı hem de ekosistem için geri dönüşü olmayan zararlar verebileceği açıkça ortaya konulmuştur. Siflutrinin farklı sucul organizmalar ve farklı test sürelerindeki LC_{50} değerleri; Bakır Burun (*Lepomis macrochirus*)'un 96 saat LC_{50} değeri 1.5 $\mu\text{g/L}$, Sazan (*Cyprinus carpio*)'ın 96 saat LC_{50} değeri 22 $\mu\text{g/L}$ (Sepici-Dinçel ve diğerleri, 2009) olarak verilmiştir. Diğer bir tür Altın Orfe (*Leuciscus idus*)'nin 96 saat LC_{50} değeri 32 $\mu\text{g/L}$ olarak verilmiştir. Ek olarak Işın Yüzgeçli

(*Cyprinodon variegatus*)’nin 48 saat LC₅₀ değeri 25.82 µg/L (Bradbury ve Coats, 1989), Nil Tilapyası (*Oreochromis niloticus*)’nin 72 saat LC₅₀ değeri 21.07 µg/L verilmiştir (Benli, 2005). Son olarak Zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) embriyosunun 96 saat LC₅₀ değeri 3.44 µg/L (Kadiru, 2021)’dir.

Siflutrinin toksisitesi

Siflutrin, birçok böcek zararlısını kontrol etmek için evlerde, endüstriyel ve tarım alanlarında yaygın olarak uygulanan aktif bir sentetik pestisittir. Aynı zamanda nötr ve asidik çözeltilerde stabilite sergileyen tip II piretroid olarak da sınıflandırılır. Sodyum iyonlarının hücre zarından taşınma sürecini engelleyebilir (Tiware ve Bhatt, 2000). Çin’de yapılan çalışmada su örneklerinde siflutrinin maksimum tespit edilen konsantrasyonu 1388 ng/L olarak verilmiştir. Son yıllarda içme suları insanlar için potansiyel sağlık riski oluşturmaktadır. Pek çok hidrofilik organik kirletici olan piretroidler yüzey toprağından yer altı sularına, tarım arazilerinden nehirlerle taşınarak sağlığı tehdit etmektedir (Tang, Lenzen, McBratney ve Maggi, 2021). Tarımsal ortamlarda piretroid böcek ilaçlarının yaygın kalıntıları, ekolojik sağlık üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir ve insan sağlığı için potansiyel riskleri bulunmaktadır. Bu bileşiklerin, memelilerde ve balıklarda endokrin bozucu bileşikler olarak etki gösterdiği ve doğrudan reseptör etkileşimleri yoluyla ve dolaylı olarak yukarı akış sinyal yolları yoluyla endojen hormonları bloke ederek, taklit veya sinerji haline getirerek endokrin sinyallemesine etki ettiği gösterilmiştir. Ayrıca siflutrin balıklar ve tatlı su omurgasızları ile karşılaştırıldığında insanlar için çok daha az toksisite göstermesine rağmen, soluma, dokunma ya da yutma ile maruz kalma sonucunda, baş ağrısı, bulantı, nefes darlığı, kas zayıflığı, tükürük salgısı ve nöbetlere neden olabilmektedir. Kan dolaşımından hızlı emilimi ile birlikte vücuda hızla yayılmakta ve sonrasında solunum sistemini, sinir ve bağışıklık sistemlerini, üreme fonksiyonunu bozmaktadır. Yaygın olarak kullanılan tarım ürünlerinde Çin ve ABD’nin gıda güvenliği standardına göre izin verilen siflutrin kalıntı konsantrasyon değerleri 0,1 ppm ile 7,0 ppm arasındadır (Ray, 2001; Qin ve diğerleri, 2023).

2.2.2. Fipronil

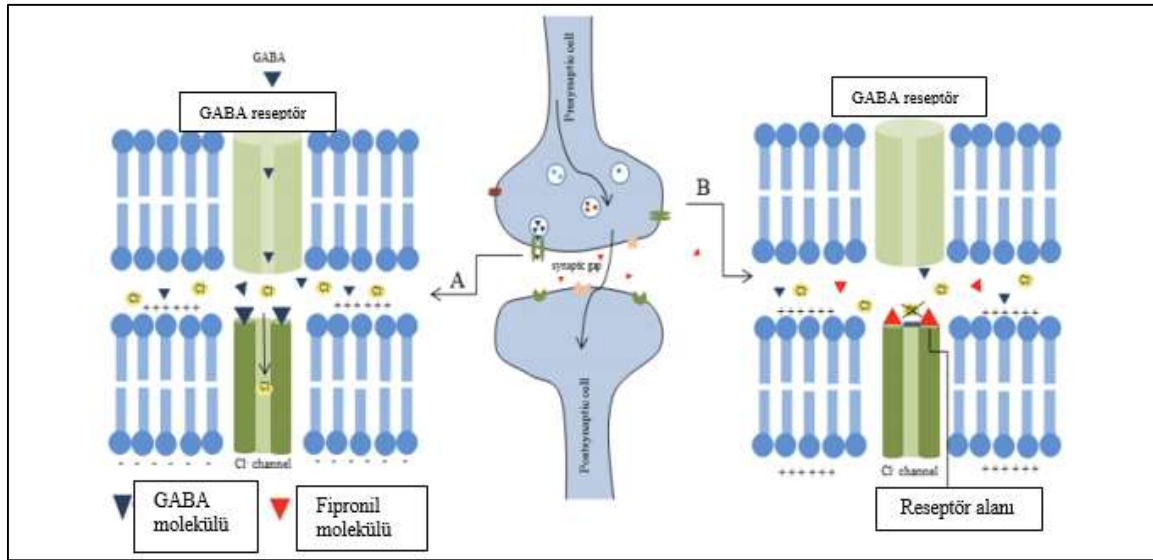
Fipronil, Rhône-Poulenc tarafından 1985 ile 1987 yılları arasında keşfedilip geliştirildikten sonra 1993 yılında piyasaya sürülen ticari bir insektisittir (Tingle, Rother, Dewhurst, Lauer ve King, 2003). Fipronil (Cas no:120068-37-3) pestisitler gibi antropojenik kimyasallar,

sucul ortamlarda büyük kirletici sınıflarını oluşturmaktadır. Halk sağlığı ve veterinerlik uygulamalarında kullanılan fenilpirazol insektisittir (Eadie ve diğerleri, 2020). Pestisitler genel olarak tahıllara kısa süreli uygulandıklarından balıkların gelişim dönemlerini pek etkilemezler. Fakat nörotoksik etki modu aktif olan özellikle bu tip kimyasallar, yüzme kabiliyetlerini bozmaya yatkındırlar (Floyd, Geist ve Werner, 2008). Yüzey suyunda 1 ila 70 mg/L ile değişen fipronilin tortu seviyesi kerevit endüstrisini ve birçok sucul omurgasız tehdit etmektedir. Fipronil sucul organizmalarda oldukça toksiktir ve biyoakümülyasyona uğramaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda fipronilin sucul organizmalardaki toksisitesi 0.001-10.004 µg/L olarak rapor edilmiştir (Abd El Hakim ve diğerleri, 2019; Budd, Ensminger, Wang ve Goh, 2015; Mize, Porter ve Demcheck, 2008). Fipronilin son durumda küresel insektisit pazarının yaklaşık olarak %10'unu oluşturduğu bildirilmiştir. 2007 yılında insektisit ve toplam ilaç kullanımındaki artışın dışında, yıl bütününe bakıldığında artışın katlanarak devam ettiği ve 2018 yılında 22.000 ton insektisit ve 60.000 ton toplam ilaç kullanıldığı görülmektedir. Dünya pazarı oranının ülkemizde de geçerli olduğu varsayımı ile 2018 yılında fipronil kullanımının 2.200 ton olduğu görülmektedir. Bu durum, fipronil kontaminasyon riskinin sürekli olarak arttığının bir göstergesi olmaktadır (Simon-Delso ve diğerleri, 2015). Zararlı böcek popülasyonlarına karşı kimyasal mücadelede kullanılan insektisitler, besin ve çevre kirlenmesi, akut ve kronik zehirlenme, insan ve hayvanlarda teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkiler, biyolojik dengenin bozulması gibi pek çok çevre sorunlarının ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Fipronilin farklı sucul organizmalar ve farklı test sürelerindeki LC₅₀ değerleri; Su piresi (*Daphnia pulex*)'nde 10 gün LC₅₀ değeri 16 µg/L (Stark ve Vargas, 2005), su piresi (*Ceriodaphnia dubia*)'nde 48 saat LC₅₀ değeri 17.7 µg/L (Konwick, Fisk, Garrison, Avants ve Black, 2005) olarak verilmiştir. Diğer türlerde ise Kerevit (*Crayfish*)'te 96 saat LC₅₀ değeri 14.3 µg/L (Schlenk ve diğerleri, 2001), Opossum karidesleri (*Mysid shrimp*)'inde EC₅₀ değeri 0.14 µg/L, Koyun kafalı yavru balığı (*Sheephead minnow*)'nda EC₅₀ değeri 130 µg/L verilmiştir. Gökkuşağı alabalığı (*Rainbow trout*)'nda 96 saat LC₅₀ değeri 250 µg/L, Bakır burun (*Bluegill sunfish*)'un 96 saat LC₅₀ değeri 83 µg/L, Midye (*Unio delicatus*)'nin 96 saatlik LC₅₀ değeri 2,64 mg/L İstiridye (*Oysters*)'nin EC₅₀ değeri ise 770 µg/L olarak bildirilmiştir (Arslan ve Günal, 2023).

Fipronilin toksisitesi

Fipronilin, omurgalı ve omurgasız canlılarda olduğu gibi hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde üreme, nörotoksik ve nörodejeneratif hastalıklar, sitotoksik ve hepatotoksik etkiler gibi zararlı pekçok etkileri bulunmaktadır (Wang ve diğerleri, 2016). Bu maddeler hedef canlılara yönelik yapılan uygulamaların yanı sıra hedef olmayan türleri de etkilemektedir. Pestisit ve insektisit gibi pek çok kimyasal maddenin çevresel etkilerini yansıtacak hava, su, toprak ve çevre kirliliği düzeylerinin belirlenmesi için toksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmalar önem kazanmaktadır. Fipronil, gama-amino bütirik asit (GABA) reseptör bağlayıcı pestisitler arasında doğal memeli reseptörleri ile karşılaştırıldığında 150-2000 kat seçici özelliğe sahiptir (Şekil 2.3).

Gama-amino bütirik asit, glutamat (Glu) reseptörleri üzerinde etkisini göstermektedir ve aynı zamanda memelilerde ve böceklerin sinir sistemlerinde klorür kanalını bloke etmektedir. Fipronil böceklerin sinir sisteminde memelilerde olduğundan daha fazla nörotoksite göstermektedir (Narahashi, Zhao, Ikeda, Salgado ve Yeh, 2010; Ramkumar ve diğerleri, 2022; Wu, Lu, Hsu, ve Wang, 2021) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Fipronilin GABA reseptörler üzerindeki etkisi (Robea, Nicoara, Plavan, Strugaru ve Ciobica, 2018).

Veteriner kimyasallarının ve tarımsal pestisitlerin bilinçsiz bir şekilde kullanılması ciddi halk sağlığı sorunu oluşturmakta olup çevreyi tehdit etmektedir. Yapılan çalışmalarda sağlık sorunlarının yanı sıra piretroid ve organofosfat gibi pestisitlerin, bazı vücut antioksidanlarını

inhibe ederek *Bombyx mori* ve *Culex quinquefasciatus* larvalarında antioksidatif tepkiyi ve detoksifikasyon enzim sistemini de etkilediğini göstermiştir (Hu, Jiang, Zhang, Huang ve Jiang 2019; Li, X., Ma, Li, H., Zhang, ve Ma, 2020).

2.2.3. Fipronil ve siflütrin ile ilgili yasal düzenlemeler

Toksik ve kanserojen bir insektisit olan fipronil ekosistem ve gıda açısından bir risk oluşturmaktadır. Bu veriler doğrultusunda son yıllarda kullanımları gittikçe artış göstermekte ve yıllık kullanım oranı 2000 tona ulaşmaktadır. Tarım ve Orman Bakanlığının yasaklı aktif madde listesinde yer alan fipronilin ithalat, imalat ve kullanımı 01.01.2019 tarihinde yasaklanmıştır (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2018). Avrupa Birliği ülkelerinde de yasaklanan fipronilin bazı ülkelerde hala kullanımına devam edilmektedir. Örneğin Çin’de arılar ve sucul canlılardaki zararları dolayısıyla 2009 yılında yasaklanmıştır. ABD’de ise diğer formüle edilmiş ürünlerle (UltraThor, Fipforce, Taurus ve Termidor) orta derecede toksik olduğunu gösteren bir uyarı etiketi ile satılırken, Afrika ve Avustralya da, ürünün çok düşük toksisiteye sahip olduğu için bir dikkat etiketi ile satılmaktadır (Bhatt ve diğerleri, 2023). Bu kimyasalların kullanımı sonucunda doğrudan veya dolaylı olarak yüzey sularına karışan maddeler boomerang etkisi göstererek yüzey veya yer altı suları ile birçok farklı ülkeye ulaşmaktadır. Sadece kendi ülkemizde değil dünyadaki tüm canlıları tehdit etmektedir. Ayrıca tarım ve ev uygulamaları sonucunda bu maddeler besin zincirine girmektedir (Lin ve diğerleri, 2021). Fipronil, Fipron 268 mg olarak (ürün 268 mg fipronil içermektedir); evcil hayvanlarda pire enfestasyonu (*Ctenocephalides felis*) ve buna bağlı pire allerjisi dermatilerinin tedavisi ve önlenmesinde, köpeklerde kene (*Ixodes spp.*) ve bit (*Felicola subrostratus*) enfestasyonunun tedavisi ve önlenmesinde kullanılmaktadır (Hovda ve diğerleri, 2002; Bhatt ve diğerleri, 2023). Türkiyede ise ruhsatlı olarak satılmaktadır (Bioveta, 2016). Fipronil yasaklanmasına rağmen halk sağlığı alanında böcekler için jel yemlerde kullanılmaya devam etmektedir. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Çevre Sağlığı Daire Başkanlığı sayfasında yer alan biyosidal ürünlerde kullanımı onaylanan maddeler listesinde (Güncelleme tarihi: 07.11.2022) yer alıp onay başlangıç tarihi 01/10/2013 ve onay bitiş tarihi 30/09/2023 olarak verilmiştir (Biyosidal Ürünler, 2023).

Dünya Sağlık Örgütü fipronili memeliler için orta derecede tehlikeli bir insektisit etken maddesi olarak belirlemiştir ve insanlar için uzun süreli maruziyet sonucunda karaciğer, böbrek ve tiroit fonksiyonlarını olumsuz etkileyebildiği bildirilmiştir (EFSA, 2006, Açıkgoz

ve Güneş, 2019). Fipronil uygulamasının bir sonucu olarak GABA klorür kanallarını inhibe eden ve biyokütle kaybından muzdarip balıklar da mevcuttur (Bencic ve diğerleri, 2013; Clasen ve diğerleri, 2012; Eadie ve diğerleri, 2020). Yavru zebra balıklarında fipronile maruz kalan dokularda glutatyon s-transferaz enzim aktivitesi değişmekte ayrıca sodyum kanallarını da olumsuz etkilemektedir (Glinski ve diğerleri, 2018; Testa ve diğerleri, 2019; Xu ve diğerleri, 2018; Zheng ve diğerleri, 2014). Yapılan çalışmalarda ksenobiyotiklere maruz kalma ile epigenetik etkinin uyarılması arasındaki ilişki incelenmektedir ve birçok toksik maddenin epigenetik mekanizmaları değiştirme potansiyeli olduğu ortaya konulmuştur (Liu, Li ve Tollefsbol, 2008).

Pestisit kullanımı son yıllarda ülkemizde artmış olsa da Avrupa ile karşılaştırıldığında pestisit kullanım sırasında gerilerde yer almaktadır. Ülkemizde hektar başına kullanılan pestisit miktarı her ne kadar az gibi görünse de kullanılan bu maddeler sağlık ve çevre açısından bakıldığında oldukça tehlikelidir. Siflutrin, güçlü ve geniş bir dağılım aralığına sahip genellikle düşük toksisitesi olan bir piretroidtir. Siflutrinin ilk kaydı 1987’de US EPA tarafından alınmıştır. Karınca, sivrisinek, pire, pamuk kurtları gibi zararlıların mücadelesinde kullanılmaktadır. Bu toksik etki ise çoğunlukla deniz ve tatlı su canlılarını etkiler (Benli, 2005). Haşere kontrolü için 1975 sonrasında kullanılmış olup, çoğunlukla sinir hücrelerini etkisizleştirerek toksik etki göstermektedir.

2.3. DNA ve protein sentezi

DNA, canlı hücrelerdeki temel bilgi deposu olarak yer alan en önemli moleküllerden birisidir. DNA birbirleriyle hidrojen bağı kurarak baz çiftleri oluşturabilen nükleotidlerden meydana gelmektedir. Nükleotidler birbirlerine, nükleotidin şeker kısmında bulunan 5 ve 3 numaralı karbonlar arasında bağlantı kuran bir fosfat grubu ile bağlanmaktadır. DNA, birbirine zıt yönde (anti-paralel) ilerleyen bu tür iki zincirden oluşmaktadır. Bazlar ise merkezde yer alır ve birbirleriyle eşleşerek DNA'nın tipik çift sarmal yapısını oluşturmaktadır. Negatif yüklü olan bu zincirler çok sayıda fosfat grubuna sahiptir ve bu da DNA'ya büyük bir negatif yük kazandırmaktadır. Bilgi de DNA içinde bazların sırasına göre depolanır ve depolanan bu bilgi transkripsiyon işlemi sırasında hücrede kullanılır. Protein sentezi sırasında da ribozom amino asit yüklü taşıyıcı RNA (tRNA) ve mesajcı RNA (mRNA)'yı bir araya getirir, kodon ve antikodon eşleştirilir ve amino asitler doğru sırayla birleştirilir. Bu süreç üç aşamada gerçekleşmektedir: ribozomun mRNA üzerinde toplandığı

başlatma, üçlü kodun okunduğu ve amino asitlerin büyüyen peptit zincirine eklendiği uzama ve protein sentezinin durduğu sonlandırma işlemleridir (Minchin ve Lodge, 2019).

Başlangıç

Protein kompleksi, çekirdekte mRNA'nın 5' ucuna bağlanır. Daha sonra mRNA sitoplazmaya aktarılır ve başlatma faktörlerini, bir metiyoninle yüklü tRNA'yı ve küçük (40S) ribozomal alt birimi alır. Başlatma faktörleri de bağlanır ve küçük alt birim ilk AUG başlangıç kodonuyla karşılaşana kadar mRNA'nın 5' çevrilmemiş bölgesi boyunca tarama yapar. Bu, başlatıcı tRNA'nın antikodon kodonu tarafından tanınır, büyük alt birim daha sonra çeviri kompleksini vermek üzere kenetlenir. P bölgesinde metiyonin yüklü tRNA ile 80S ribozomu artık bir sonraki tRNA'yı kabul etmeye hazırdır.

Uzama

Başlatma tamamlandığında mRNA, A bölgesi boş ve bir sonraki kodon açıkta olacak şekilde doğru okuma çerçevesindedir. Uzama aşamasında, bir aminoasitle yüklü bir aminoasıl tRNA, bir uzama faktörü ile kompleks halinde ribozoma getirilir ve A bölgesine girer. Taşıdığı antikodon açıktaki kodona tamamlayıcı ise alıcı bölgeye doğru şekilde konumlanır ve GTP uzama faktörü üzerinde hidrolize olur. Daha sonra P bölgesindeki amino asidin C terminali ile A bölgesindeki amino asidin N terminali arasında bir peptit bağı oluşur, bu reaksiyon ribozomun büyük alt biriminin peptidil transfer merkezinde katalize edilir. Bunun etkisi, büyüyen peptit zincirinin A bölgesinde gelen aminoasıl tRNA'ya aktarılması ve P bölgesinde boş veya harcanmış bir tRNA bırakmasıdır. Son olarak, büyüyen peptit zincirinin bağlı olduğu peptidil tRNA P bölgesine hareket eder. Bu adıma translokasyon denir ve enerji, uzama faktörü EF-G tarafından GTP'nin hidrolizi ile sağlanır. Harcanan tRNA, ribozomu terk edebileceği çıkış bölgesine hareket eder. mRNA, bir sonraki kodon A bölgesinde başka bir amino asitle yüklü yeni bir aminoasıl-tRNA'yı kabul etmeye hazır olacak şekilde hareket eder. Uzama fazı sırasında ribozom bu süreç boyunca, A bölgesinde bir durma kodonu açığa çıkana kadar büyüyen peptit zincirine amino asitler ekleyerek döngü yapar. Yeni protein, büyük alt birimdeki bir çıkış tüneli aracılığıyla ribozomdan çıkar (Minchin ve Lodge, 2019; Roberts, 2019).

Durdurma

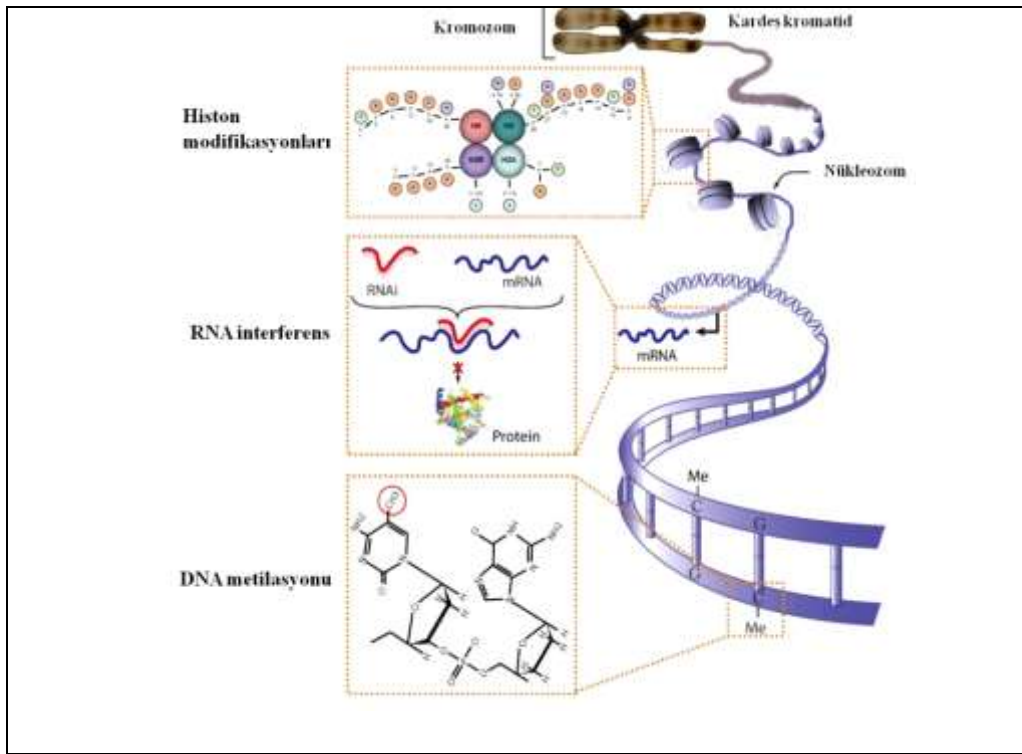
Dur kodonu, bir tRNA üzerindeki bir antikodon tarafından tanınarak çözülmemektedir. Bunun yerine sonlandırma ya da serbest bırakma faktörleri adı verilen proteinler tarafından tespit edilmektedir ve ökaryotlarda, A bölgesine giren üç dur kodonunu da tanıyan tek bir serbest bırakma faktörü (RF1) bulunmaktadır. Peptit zincirini P bölgesindeki tRNA'yı bağlayan ester bağı kırılır ve peptit ribozomdan salınmaktadır. Ribozomun iki alt birimi ayrılır ve geri dönüştürülür. Ribozomların yapısı ve işlevi, hem ökaryotik hem de prokaryotik ribozomlarda bulunan yapısal olarak korunmuş proteinlerin ve rRNA'ların büyük bir çekirdeği ile oldukça korunmuştur. Bununla birlikte, hem rRNA'larda hem de translasyonda yer alan bazı ek proteinlerde bazı farklılıklar vardır. Uzama aşaması oldukça korunmuştur ancak protein sentezinin nasıl başlatıldığı konusunda önemli farklılıklar vardır. Bakteriyel mRNA'lar ribozom bağlanma bölgesi veya Shine-Dalgarno dizisi adı verilen özgül bir diziye sahiptir. mRNA'nın ribozomda doğru şekilde konumlandırılmasını sağlamak için Shine-Dalgarno dizisi, küçük alt birimdeki 16S rRNA'nın tamamlayıcı bir dizisine bağlanır. Bakterilerde başlatıcı tRNA, modifiye edilmiş bir amino asit N-Formilmetiyonin ile yüklenir (Minchin ve Lodge, 2019; Roberts, 2019).

2.4. Epigenetik

Epigenetik terimi ilk kez 1942 yılında Waddington tarafından ortaya atılmış olup, genotipte değişiklik olmadan fenotipteki değişiklikler olarak tanımlanmıştır. Başka bir deyişle, gen diziliminde herhangi bir değişiklik meydana gelmeden, gelişme ve hücre çoğalması sırasında gerçekleşen gen ekspresyon potansiyelinde kararlı bir değişiklik olarak tanımlanmaktadır. DNA diziliminde değişiklik yapmadan, gen ifadesini düzenlemesi açısından, DNA diziliminde değişikliklere sebep olan genotoksik mekanizmalardan ayrılmaktadır. Bu açıdan birey, kendi epigenetik özelliğini değiştirebilmektedir ve oluşturduğu bu epigenetik fark bir sonraki nesile de aktarabilmektedir (Van Speybroeck, 2002). Gen ifadesinin epigenetik düzenlenmesi normal hücre gelişimi ve fonksiyonu için vazgeçilmezdir. Belirli genlerin ifadesini bastırırken diğerlerinin aktivitesini uyarmaktadır. Epigenetik mekanizmadaki herhangi bir bozukluk gen ifadesinde aktivasyon, baskılanma sorunları gibi veya kanserle sonuçlanabilmektedir (Lim ve Maher, 2010). Metabolik bozuklukların ortaya çıkmasında, çevresel uyaranların etkilerinde ve günümüze kadarki sürede iyi karakterize edilmiş

epigenetik mekanizma olarak yer almaktadır (X. Lu ve diğerleri, 2020; Rosen ve diğerleri, 2018).

Epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA (ncRNA)'ları kapsamaktadır (Şekil 2.4). Özellikle son yıllarda *in vitro* ve *in vivo* şartlarda yapılan çalışmalar pestisite maruz kalmanın epigenetik modifikasyonlara neden olduğunu göstermektedir (Markowitz ve Bertagnolli, 2009; Miranda ve Jones, 2007). Aynı zamanda bu üç mekanizmaya bağlı olarak gen ifadesi baskılanmakta veya aşırı artmaktadır.



Şekil 2.4. Epigenetik modifikasyonlar (Sawan, Vaissière, Murr ve Herceg, 2008)

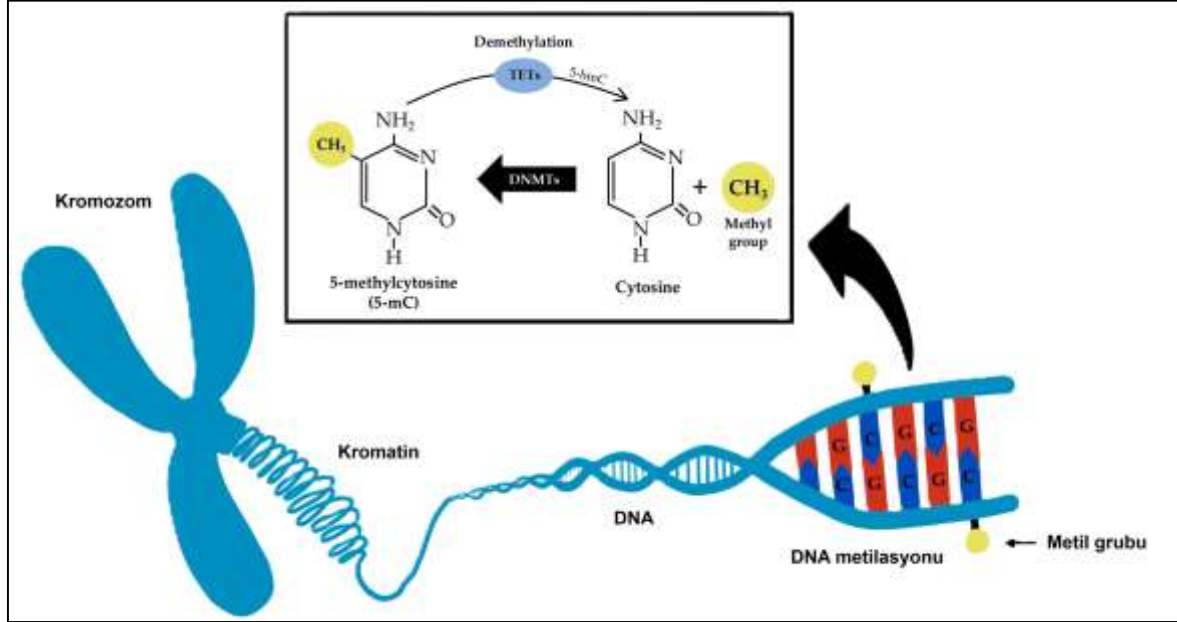
1980'lerde DNA dizisinin bir organizmanın hücreleri boyunca büyük ölçüde sabit olduğu kabul edilmesine rağmen, DNA metilasyonu hücre tipleri arasında ve genom boyunca değişmektedir. Epigenetik mekanizmaların birbiriyle uyum içinde etkileşmesi ve düzenlenmesi, organizmanın normal bir embriyonik gelişim geçirebilmesi için çok önemlidir. Bu süreçte, aynı genetik diziyeye sahip hücreler, farklı ifade profili sergileyerek değişik fenotipler gösterir. DNA metilasyonu analizleri için de, çalışma alanının amacına uygun bir yöntem seçilmesi önemlidir. Metilasyon gen ifadesinin kontrolüne katkıda bulunmaktadır. Ayrıca endokrin bozucu kimyasalların epigenetik toksisitesinde global ve

gene özgü metilasyon değişikliklerini ölçmek için yeni geliştirilen Zebra Balığı Embriyo Toksikite Testinin (OECD 236) kullanılması önemlidir (Greally ve Jacobs, 2013). Kalıtsal hastalıklarda en çok üzerinde durulan konu epigenetik modifikasyonlardır. Özellikle de çevresel epigenetik, gen düzenleyici mekanizmaların genom dizisini değiştirmeden kromatin üzerinde nasıl rol oynadığını, kirletici maddeler ve stres gibi uyaranlara karşı verilen tepkileri ele almaktadır (Zaman ve diğerleri, 2010; Cortessis ve diğerleri, 2012; Fan, Moore, Zhang ve Weng, 2021). Son yapılan araştırmalar incelendiğinde endokrin bozucu kimyasallar ve epigenetik mekanizmalar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılmış olsa da sayı bakımından yetersizdir.

2.4.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, omurgalılarda yaygın bir epigenetik modifikasyondur, gen ekspresyonu ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.5) (Bird, 2002; Gao ve diğerleri 2018; Surani ve diğerleri, 1990). DNA metilasyonu esas olarak CpG dinükleotidlerinde meydana gelmektedir. CpG adaları olarak bilinen insan genomunda normal koşullarda metillenmeyen aynı zamanda genin promotor bölgesine yakın kısımda yer alan (promotörlerin ~%70'i CpG adalarında bulunmaktadır) yoğunluk oranı yüksek CpG dinükleotidlerine sahip bölgeler bulunmaktadır (Portela ve Esteller, 2010; Zhang ve diğerleri, 2020). Sitozin metilasyonu, memeli türleri arasında uzun sitozin-guanin çiftleri veya CpG adalarında yüksek oranda korunmaktadır. Memeli genomunda tüm sitozinlerin yaklaşık %2-5'i metillenmiştir ve metillenmiş sitozinler genom boyunca üç farklı CpG, CHG veya CHH bölgelerinde bulunmaktadır (Fang, Thornton, Scheffler ve Willett, 2013). DNA metilasyonuna, 5-metilsitozin (5-mC) oluşturmak üzere S-adenozil metiyoninden (SAM) bir metil grubunu bir sitozin kalıntısının beşinci karbonuna aktaran, DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) olarak bilinen bir grup enzim aracılık eder. DNA metilasyonu farklı yöntemler ve teknikler kullanılarak analiz edilebilmektedir. Bazı yöntemler, kimyasala maruz kalmayan modellerle karşılaştırıldığında, maruz kalan *in vivo* veya *in vitro* modellerde 5-mC'nin seviyelerini enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) (Engvall ve Perlmann, 1972), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Kuo ve diğerleri, 1980) veya sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi ile (LC-MS/MS) (Jemal, 2000), ölçerek DNA metilasyon seviyelerinin genel bir incelemesine imkân vermektedir. Diğer yöntemler ise tüm genomdaki veya belirli genlerdeki metilasyon profilini analiz ederek, maruziyetten sonra metilasyon farklılıkları olan lokus (örneğin, bisülfid dizilimi (Yong, Hsu ve Chen, 2016), mikrodiziler

(Blohm ve Guiseppi-Elie, 2001), yeni nesil dizileme (NGS) (Moore, Balbi, Ingham, Arkenau ve Bennett, 2018) ve metilasyona özgü polimeraz zincir reaksiyon (PZR)'dur.



Şekil 2.5. DNA metilasyonunun moleküler mekanizması

2.4.2. Histon modifikasyonları

DNA'nın paketlenmesinde görev alan büyük oranda korunmuş olan proteinlerdir. Sekiz adet histon molekülünü çevreleyen yaklaşık olarak 146 baz çifti (bç) uzunluğundaki sarmal DNA, nükleozom olarak adlandırılan birimleri oluşturmaktadır. Nükleozomda bulunan her histon çekirdeği, histon kuyruğu adı verilen, bazik yapıdaki aminoasitlerden oluşan, 25-30 rezidü uzunluğunda yüksek miktarda dinamik amino terminal uca sahiptir. Histon kuyrukları nükleozomal dizinin daha düzenli halde katlanmasında önemli rol oynamaktadır. Nükleozomun yapısına dâhil olan histon proteinleri H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olarak sıralanmaktadır. Bağlayıcı histon olan H1, nükleozom bütünlüğünü korumak için DNA'ya bağlanmaktadır. H2A ise diğerlerinden farklı bir şekilde nükleozom yapıdan dışarı uzanan yaklaşık 37 aminoasit uzunluğundaki karboksi-ucu bölgesine de sahiptir (Munshi, Shafi, Aliya ve Jyothy, 2009). Histon proteinleri, amino asit dizilerine bağlı olarak arkealardan insanlara kadar korunmuş yapıdadır. Histon modifikasyonları, enzimler aracılığıyla histon proteinlerine diğer moleküllerin eklenmesi ile ya da çıkarılması ile oluşmaktadır. Histon proteinlerinin -amino ucunda, metilasyon, asetilasyon, ubiquitinizasyon, fosforilasyon ADP ribozilasyon ve sumozilasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar

gerçekleşmektedir (Tsankova, Renthall, Kumar ve Nestler, 2010). Histon modifikasyonları farklı histonların etkileşimleri veya histon-DNA etkileşimleri üzerinde ciddi etkilere sahip olup kromatin yapısını ve protein-protein etkileşimini değiştirerek gen ifadesini düzenlemektedir (Park, Lee, Kim ve Yi, 2022).

2.4.3. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA)

Kodlamayan RNA'lar, proteinleri kodlamayan fakat mRNA'nın düzenlenmesi için gerekli olan, translasyonu önleyen ya da kromatinin yeniden şekillenmesini yönlendiren transkripsiyonlu ve düzenlenmiş RNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır. ncRNA'lar için mikroRNA'lar (miRNA'lar), Piwi-ilişkili RNA'lar (piRNA'lar), küçük interfering RNA'lar (siRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) olarak kendi içinde alt başlıklara ayrılmaktadır. Bunlar epigenetik mekanizmaları için önemli bir bileşen olsalarda, ksenobiyotik maruziyeti ile nesiller arası modifikasyonlar açısından önemleri çok az bilinmektedir (Abbas, Perbellini ve Thum, 2020; Terrazas-Salgado ve diğerleri, 2022).

Transkripsiyonlu genomun büyük bir kısmını ncRNA oluşturmaktadır. mRNA'nın aksine, bu diziler protein kodlamayıp, onun yerine gen ifadesinin epigenetik, transkripsiyon sonrası ve translasyonel koordinasyonunda düzenleyici olarak rol almaktadırlar (Greco ve Condorelli, 2015). Yapılan araştırmalara bakıldığında son yıllarda, yeni nesil dizileme teknolojilerinin maliyetinin düşmesi, yeni tanımlanan ncRNA'larda bir yükselişe yol açmış ve gittikçe biriken kanıtlar, biyolojik işlevleri hakkında daha detaylı bilgiler sunmuştur (Fang ve diğerleri, 2018, Pham ve diğerleri, 2021).

2.5. Genlerin Seçilmesi

Gen materyali olarak DNA, primer olarak ise stres geni olan *HSP70* ve sitokrom P450 (*CYP1A*) kullanılıp kontrol geni (housekeeping) için ise fish Beta-actin (*B-ACTIN*), elongation factor 1 alpha (*EF1A*) ve beta-2 microglobulin (*B2M*) genleri tercih edilmiştir. Zebra balığı ile ilgili östrojenik çalışmalarda (Zhao ve diğerleri, 2017), üreme işlevinde, morfolojik değişikliklerde (Wirbisky ve diğerleri, 2016), lokomotor aktivite çalışmalarında hücre apoptozu, immün toksisite ve gen ekspresyonu üzerindeki inhibitör etkileri üzerine literatürde birçok veri bulunmaktadır. Endokrin bozucularla ilgili çalışılan kimyasal maddeler (Bisfenol A, Atrazin, Sipermetrin, Malation) ve çeşitli gen türleri de mevcuttur

(*CYP1A*, *HSP70*, *SOX2*, *CAT*, *SOD1*, *TSH*) (Guo ve diğerleri, 2017; Hasan, Asakawa, Watabe ve Kinoshita, 2021; Jiang ve diğerleri, 2015).

Balıklar, doğal çevrelerinde bir dizi stres etkiyle karşılaştıklarından ve farklı stres etkenlerine maruz kaldıklarından, deneysel olarak HSP ekspresyonu ve *CYP1A* çalışmak için vazgeçilmez bir model organizmadır. Stres iç ve dış kaynaklı olmak üzere farklı yollardan gelişebilmektedir. Metabolik, fizyolojik, patofizyolojik, oksidatif ve çevreden kaynaklanan çevresel stresler örnek olarak sıralanabilir. Çevresel stres faktörlerine örnek olarak organizmaya dışardan giren herhangi bir madde olarak adlandırılan ksenobiyotikler, ışık, sıcaklık vs. verilebilir. Günlük hayatta karşılaştığımız her türlü kimyasal madde, ilaç etken maddeleri, kozmetik ürünleri, tarımda sık kullanılan pestisitler (insektisit) ve herbisitler, dioksinler, bisfenoller ve karsinojen alkoloidler örnek olarak verilir (Deane ve Woo, 2011; Fulda, Gorman, Hori ve Samali, 2010).

Canlı organizmalar birçok stres türüyle karşı karşıya gelmektedir ve bu da çevreleriyle etkileşimin doğal bir sonucudur. Karasal veya sucul yaşamda canlı sistemlerinin karşılaştığı abiyotik maddelerin hepsi potansiyel birer stres faktörü olarak yer almaktadır. Canlı bünyesine dışarıdan giren herhangi bir kimyasal ajan, pestisit, ilaç ve hatta diyetle alınan gıda maddeleri canlı tarafından metabolize edilerek o canlıda mutlaka biyokimyasal değişiklikler meydana getirmektedir (Kremer, Williams, Parkinson ve Borghoff, 2005; Patterson, Gonzalez ve Idle, 2010).

2.5.1. Isı şoku proteinleri (*HSP70*)

Isı şoku proteinleri, hücre içi proteinlerden oluşan ve bakterilerden insanlara kadar incelenmiş olan tüm organizmalarda bulunan süper bir aile olarak tanımlanmaktadır. Bu stres proteinleri, hücrenin stres ve olumsuz şartlara karşı korunabilmesi ve onarılmasında rol alan bol miktarda ve indüklenabilir proteinden oluşmaktadır. Bu nedenle çevresel faktörlerin balıklar da dâhil olmak üzere çeşitli hayvan türleri üzerindeki etkisini izlemek için kullanılan çok yararlı biyobelirteçlerdir. Moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılmaktadırlar. *HSP100*, *HSP90*, *HSP70*, *HSP60* ve küçük *HSP*'lerdir (MW<40 kDa) olmak üzere gruplandırılmıştır. *HSP*'ler hipertermi ile indüklenmeleri sonucu keşfedilip, protein denatürasyonunun sitotoksik sonuçlarına göre de koruma sağlamaktadırlar. Ayrıca etanole, ağır metallere, hipoksiye ve pestisitlere maruziyetleri gibi denatüre edici şartlarda ısı şoku proteinlerinin

sentezini de indüklemektedirler. Son çalışmalar ayrıca pestisit gibi kirleticilerin neden olduğu oksidatif stresin HSF'yi aktive edebileceğini ve *HSP70* gen ekspresyonunu artırabileceğini göstermektedir (Ceyhun ve diğerleri, 2010; Dorts ve diğerleri, 2016).

Sentezlenen HSP genleri ile stresin seviyesi arasındaki ilişki, genel olarak strese yanıt verme ve toksisite seviyelerinin değerlendirilebilmesi için bir indikatör olarak stres genlerinin ekspresyonunun kullanılması fikrini ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalarda pek çok araştırmacı çevre kirliliğinin bir biyobelirteci olarak *HSP70* ekspresyonunun indüksiyonunu kullanmıştır. Bu genin artış gösterdiği çalışmalarda pestisit ile ilişki gösterdiği bildirilmiştir (Gupta, Sharma, Mishra, Mishra ve Chowdhuri, 2010; Hassanein ve diğerleri, 1999). Bu tarz çalışmalarda zebra balıkları çok yönlülüğü nedeniyle model organizma olarak tercih edilmektedir. Son yıllarda kullanımları gittikçe artan pestisitler su, sediment ve gıda yoluyla balıklara ve diğer sucul organizmalara ulaşmaktadır ve bunun sonucunda da proteinler, bazı enzimler ve genler canlı sistemler için tehlikeli olabileceği için pestisitlerin zararlı etkileri üzerinde önemle durulmalıdır.

2.5.2. Sitokrom P4501A (*CYP1A*)

Sitokrom P450 (CYP) enzimi, hemoprotein1 içeren çok çeşitli enzim ailesinden biridir. Prokaryotlardan ökaryotlara, primatlardan insanlara ve bitkilerden hayvanlara kadar binlerce CYP geni tanımlanmış ve isimlendirilmiştir. Bunlar temelde birçok bileşiğin biyotransformasyonunda rol oynamaktadır ve aynı zamanda bakterilerde antibiyotikler, mantarlarda ergosteroller, bitkilerde pigmentler ve hatta insan ilaçları da dâhil olmak üzere pekçok molekül dünyasında yer almaktadır (Danielson, 2002; Jamieson, Endo, Darwesh, Samokhvalov ve Seubert, 2017; J. Lu ve diğerleri, 2020).

CYP1A ailesi ise deniz canlılarında kirlilik çalışmalarında, iç sularda ve atık sularda biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Hasselberg, Grøsvik, Goksøyr ve Celander, 2005; Sen, Ulutas, Tutuncu, Ertas ve Cok, 2010). Aynı zamanda ilaçların, çevresel kirleticilerin ve fizyolojik maddelerin metabolizmasında yer alan önemli bir alt ailedir. *CYP1A* alt ailesi iki genden oluşmaktadır. Bunlar *CYP1A1* ve *CYP1A2*' dir. *CYP1A* ekspresyon çalışmaları farklı balık türlerinde çalışılmıştır. Alabalık (*O. mykiss*), somon balığı (*Salmo salar*), kefal (*Liza saliens*) ve farklı sucul organizmalar da ekosisteme yayılan toksik ve karsinojenik maddeler yapılan çalışmalarla kirliliğin boyutlarını ortaya çıkarmaktadır (Fisher, Crane ve Callaghan,

2003; Gjernes, Schlenk ve Arukwe, 2012; Sen, Ulutas, Tutuncu, Ertas ve Cok, 2010; Valdehita, Fernández-Cruz, Torrent, Sericano ve Navas 2012).

Büyük ve çeşitli bir enzim grubu olan sitokrom P450'nin başlıca görevi organik maddelerin oksidasyonunu katalize etmektedir. CYP enzimlerinin substratları arasında lipitler ve steroidal hormonlar gibi metabolik ara ürünlerin yanı sıra bazı toksik kimyasallar ve ilaçlar yer almaktadır. *CYP1A*'nın indüklenmesi, yabancı bir bileşiğin hücresel bir reseptöre bağlanması ile meydana gelmektedir. *CYP1A*'yı kodlayan genin ifadesini tetikleyerek RNA transkripsiyonunun artmasına neden olmaktadır ve dolayısıyla da *CYP1A* sentezinin artmasına sebep olmaktadır. Bu sebepten dolayı da *CYP1A* indüksiyonu balıklarda ve balık hücrelerinde pestisit gibi pek çok kirleticilere maruz kaldıklarında bunun bir göstergesi biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Hassanain, Abdel-Rahman, Abo-Hegab, Tawfik ve Abbas, 2007).

2.5.3. Referans genler (Housekeeping genler)

Referans genler (RG), hücre canlılığı için gerekli olan ve çoğu hücrede ifade edilen birçok proteini kodlayan genlerdir. Bu genlerden bazıları farklı şekilde duruma özgü ifade gösterirken (yaş, doku, normal veya patolojik şartlar), diğerleri ise birçok farklı hücre tipi ve koşulunda nispeten sabit bir oranda kopyalanmaktadır (Butte, Dzau ve Glueck, 2001). RG'lerin sentezi, tüm nükleuslu hücre tiplerinde vardır ve bu genler hücrenin hayatta kalması için gereklidir (Chen ve diğerleri, 2004; Erdoğan, Atamanalp, Sisman, Aksakal ve Alak, 2007).

Hücresel fizyoloji için gerekli olan minimum temel transkriptleri üretirler. Bu genlerin kararlı ifade düzeyi, geniş ifade aralığı ve yüksek ifade düzeyi tek bir genin özellikleri olup, gen ifadesi araştırmalarında kullanılmaktadır. Çalışmalar incelendiğinde karşımıza pek çok referans gen çıkmaktadır. Bu genlerin ekspresyon seviyelerinin türe, canlılığın gelişim dönemine, doku tiplerine göre değiştiği ortaya konmaktadır. Bu sebeple referans genler çalışmanın tasarımına uygun seçilip değerlendirilmelidir. En çok kullanılanlar arasında beta-2 mikroglobulin, beta-aktin (Çizelge 2.2.) yer almaktadır (Alberts ve diğerleri, 2002; Lee, Sladek, Greenwood ve Hudson, 2002).

Çizelge 2.2. Seçilen referans genler ve görevleri (Casadei ve diğerleri, 2011)

Gen sembolü	Gen adı	Genin fonksiyonu
β - <i>ACTIN</i>	Aktin Beta	ATP, nükleotit ve protein bağlama
<i>B2M</i>	Beta-2-mikroglobulin	Translasyon uzama faktörü aktivitesi
<i>EF1A</i>	Uzama faktörü 1-alfa Elongation factor 1-alpha	Bağışıklık yanıtı bileşeni

Deneysel şartlarda ifadenin istikrarlı olmaması, incelenen genlerin ifadelerinin yanlış yorumlanmasına sebep olabilmektedir. Bu sebeple, yapılacak deneyde iki veya hatta üç referans gen kullanılması tavsiye edilmektedir.

Referans genler hücresel metabolik olaylardan protein sentezi, DNA sentezi ve transkripsiyonda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca CPG bölgeleri ile ilişkili olup, dokuya özgü eksprese olan genlerden farklı promotör bölgelere sahiplerdir. Promotör bölgelerinin düşük korunumlu olması sebebiyle çeşitli kimyasal maddeler, radyasyon, mutasyon gibi faktörlerden dolayı ekspresyon seviyelerinin değiştiği bildirilmiştir (Farre, Bellora, Mularoni, Messeguer ve Alba, 2007).

Zebra balıkları gelişimsel analizler ve çeşitli hastalıklar için modelleme ve toksikolojik çalışmalar açısından önemi giderek artan bir model organizmadır. Yapılan çalışmalarda referans genler cinsiyet, doku, deney protokolleri gibi özellikler dikkate alınarak değerlendirilmiştir (Jaramillo ve diğerleri, 2018).

Beta Aktin (*B-ACTIN*) geni

Beta aktin (*B-ACTIN*), hücrenin hareketini ve yapısını korumakla görevli olan ve her hücrede bulunan “housekeeping” bir proteindir. Beta aktin hücre iskeleti yapısal proteinlerini kodlamaktadır (Lin, Spikings, Zhang ve Rawson, 2009; Liu ve diğerleri, 2016, Rassier ve diğerleri, 2020). Referans genler en sık RT-qPCR verilerini normalleştirmek için kullanılır. Genellikle housekeeping gen (HKG) olarak adlandırılan bu genler, incelenen dokularda veya hücrelerde veya deneysel tedaviye yanıt olarak değişmemelidir. Gen ifadesi verilerini normalleştirmek için bir referans kontrol geni seçmek de deneysel tasarımdaki en önemli adımlardan biridir. Yapılan çalışmalar kimyasal maddelere, strese veya bazı hastalıklara maruz kalmanın housekeeping genlerin ekspresyon aktivitelerini etkileyebileceği

gösterilmiştir. Bu sebeple, referans genlerin doğrulanması önemlidir ve deneylerden önce mutlaka yapılmalıdır (Dheda ve diğerleri, 2004; Wan ve diğerleri, 2010).

Beta-2-mikroglobulin (*B2M*)

Beta-2-mikroglobulin ilk olarak 1964 yılında keşfedilmiştir. İnsanlarda kromozom 15'te bulunan bir gen tarafından kodlanan 100 amino asitlik bir proteindir (11,8 kDa). Hemen hemen tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde ifade edilen majör histo-uyumluluk kompleksi sınıf I (MHC-I) molekülünün önemli bir bileşeni olarak yer almaktadır. *B2M*, inflamasyon, antijen sunumu ve işlenmesi, kompleman kaskadı ve stres yanıtında kilit rol oynayan MHC-I molekülünün hücre yüzeyi ekspresyonu ve yapısal stabilitesi için gerekli bir proteindir (Li, Dong ve Wang, 2016; Lin, Spikings, Zhang ve Rawson, 2009; Shi, Sun ve Kaptohe, 2021).

Uzama faktörü 1-alfa (*EF1A*)

Uzama faktörü 1-alfa (*EF1 α*) en bol bulunan sitoplazmik proteinlerden biridir ve testlerde internal kontrol genleri olarak kullanılmaktadır. Hücrelerde önemli bir rolü olan translasyonel mekanizmanın da temel bir bileşenidir (Lin, Spikings, Zhang ve Rawson, 2009; Liu ve diğerleri, 2016). RG'ler genellikle homeostazın sürdürülmesinde rol alsa da yapısal olarak ifade edildiği varsayılmaktadır. Birçok araştırma bu genlerin ifade düzeylerinin farklı faktörlerle önemli derecede değiştiğini göstermektedir (Paria ve diğerleri, 2016). *EF1A* konsantrasyonu ve yapısındaki değişiklikler hücrelerin mitotik potansiyelleri ile ilişkilendirilmiştir. *EF1 α* geninin ifadesi translasyonel düzeyde ve bazı ribozomal proteinlerin ifadesi ile birlikte düzenlenebilmektedir.

2.6. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimer zincir reaksiyonu, *in vitro* veya *in vivo* şartlarda genomik DNA'nın seçilecek bölgeye özel primerler kullanılarak ve DNA polimeraz enzimi aracılığıyla defalarca kopyalanıp moleküler olarak değerlendirilebilir hale getirilmesi işlemidir. Bu işlem ilk defa Mullis tarafından geliştirilmiştir ve ilk çoğaltılan bölge ise β -globulin geninin 1. ekzonuna ait olan 110 baz çiftlik bölge olmuştur (Meiser ve diğerleri, 2022; Mullis, 1990). Bir kopyanın 10^7 - 10^9 kez çoğaltılabilmesi için ortamda tek bir DNA kopyasının olması yeterli olmaktadır (Yang ve Rothman, 2004). PZR yapılabilmesi için öncelikle kalıp DNA,

deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP), 17-65 nükleotit uzunluğunda bir çift primer, $MgCl_2$ ve enzim olarak ise *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilmiş olan Tag DNA polimeraza ihtiyaç vardır. Bu işlem 3 basamakta meydana gelmektedir; 1) Denatürasyon: ilk aşamada DNA'nın çift zincirli yapısının yüksek sıcaklık ile birbirlerinden ayrılıp tek zincirli hale gelme işlemidir. 2) Bağlanma (Annealing): Denatürasyonun devamında sıcaklık düşürülerek tek zincir hale gelen DNA'da primerlerin özgül bölgelere bağlanmasıdır. Bu bağlanma derecesini ise içerdiği GC baz oranları ve primer dizilerinin uzunlukları belirlemektedir. 3) Uzama (Elongasyon): Bu bölümde ise DNA polimeraz enziminin çalışabilmesi için gereken ısı $72^{\circ}C$ 'ye kadar çıkarılarak DNA zincirinin uzatılması sağlanır, bu durum hedef DNA'nın uzunluğuna göre değişim gösterebilir, her bir kilobaz için ise 1 dakika yeterli olmaktadır. Bu basamaklar tamamlandıktan sonra DNA miktarı teorikte iki katına çıkmaktadır. DNA metilasyonundaki değişikliklerin fipronil ve siflutrin nedeniyle gen ifadesindeki değişikliklerle bağlantılı olup olmadığını değerlendirebilmek için PZR basamağı kullanılacaktır.

2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA, RNA ve protein molekülleri gibi yüklü makro moleküllerin bir elektrik alan içerisinde (-) ve (+) yüklü kutuplar arasında bir kutuptan diğerine doğru hareket ettirilerek ayrıştırılması yöntemine elektroforez denir. Agaroz jel, 10 nm çapından büyük olan moleküllerin analizi için kullanılır. Agaroz, kırmızı deniz yosundan elde edilen bir polisakkarittir. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan malzemeler elektroforez tankı, güç kaynağı, elektroforez tamponu, örnek yükleme tarakları, jeli dökmek için tepsi, yükleme tamponu, boya ve transillüminatördür. Jel hazırlamasında, elektroforez tamponuna belirlenen yoğunlukta agaroz tozu karıştırılır ve mikrodalga fırında ısıtılarak eritilir. Elektroforez işlemi sonrasında DNA görüntüsünün kolay alınabilmesi için jele EtBr (Ethidium Bromide) ($0,5 \mu g/mL$) eklenir. Çözelti, $65^{\circ}C$ 'ye kadar soğuduğunda örnek yüklenmesi için tarakların bulunduğu tepsiye dökülerek, oda sıcaklığında jel haline dönüşene kadar soğumaya bırakılır. Daha sonra tarak, kuyucuklar bozulmadan dikkatli bir şekilde çıkarılır. Tepsi içinde bulunan jel, tampon ile tamamen kaplanabilmesi için yatay bir şekilde elektroforez tankına yerleştirilir. Örneklerin kuyucuklara yerleştirilmesi mikro pipet ile yapılarak kapak ve güç kabloları takıldıktan sonra güç kaynağı açılarak enerji uygulanır. Elektrot uçlarında baloncukların oluşmaya başlaması, akım hareketinin başladığının göstergesidir. Jeldeki DNA'nın hareketi bromfenol mavisi ve ksilen siyanol gibi boyaların

hareketleri sonucu oluşan izler ile belirlenir. Elektroforez işlemi sonrasında makro molekül karışımı yapısı delikli jel içerisinde ayrışır ve alt yada üst kısmından ultraviyole ışığı verildiğinde bant görüntüsü oluşur. Klasik elektroforez sisteminde jel içindeki makro moleküllerin hareketi, güç kaynağının kutupları elektrolit çözeltisi ile jelin bulunduğu tankın uçlarına bağlanarak sağlanmaktadır (Kavsaoğlu ve Mersinkaya, 2019).

2.8. Model Organizma, Zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)

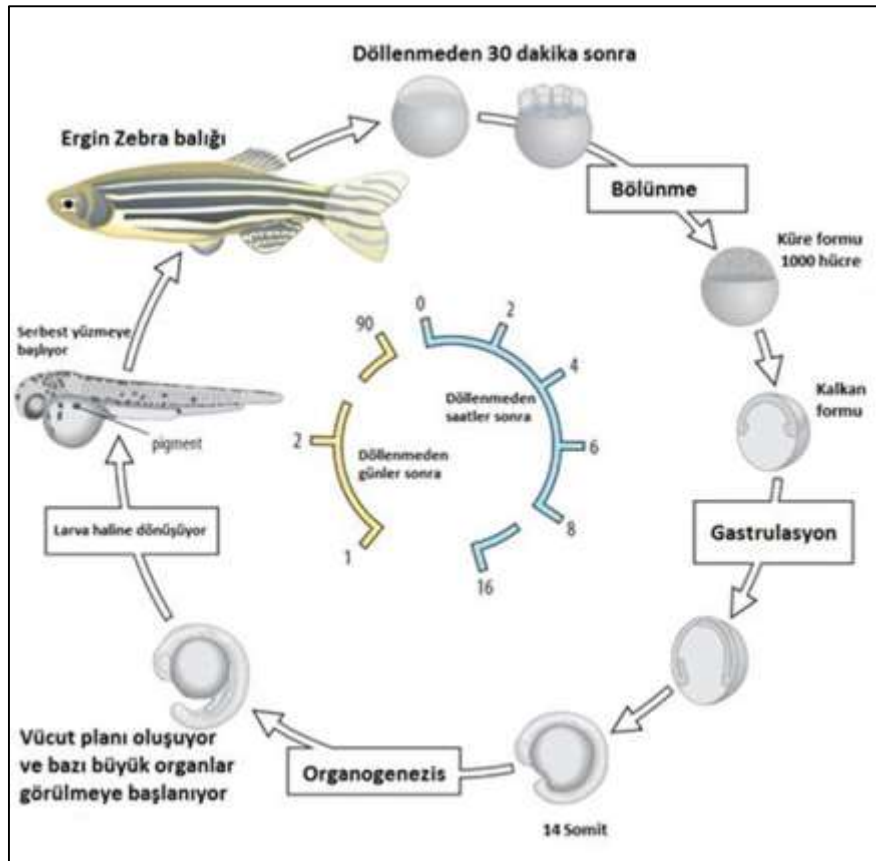
Hindistan ve Güney Asya nehirlerine özgü küçük bir tropikal balık olan zebra balığı, gelişim genetiği ve (eko) toksikolojide son yıllarda oldukça önem kazanan model organizmalardan biri haline gelmiştir. Zebra balıkları, 20. yüzyılın sonlarında moleküler araştırmalardaki gelişmeler ve insanlarla benzer olan homolojileri nedeniyle omurgalı biyolojisini incelemek için, gelişimsel, genetik ve davranış çalışmalarında (Morris, 2009; Lange ve diğerleri, 2012; Mrinalini, Tamilanban, Kumar ve Manasa, 2022) tercih edilen model organizma olmuştur (Dooley ve Zon, 2000). Hızlı gelişimi, yüksek doğurganlık oranı, laboratuvarında kolay bakımı, çok sayıda yavru, embriyoların şeffaflığı ve insanlar arasında yüksek oranda genetik homolojiye (% 85) sahip olmaları gibi bir dizi özelliğe sahiptir (Cavalieri ve Spinelli, 2017; Jiang ve diğerleri, 2013; Horzmann ve Freeman, 2018; Nguyen, Petrikas, Chambers ve Wingert, 2023). Balıklarda solungaçlar birincil maruziyet yüzeylerinden biri olduğu için çevreden gelebilecek etkilere karşı daha hassastır. Bu sebeple sucul ortama karışan pestisitler hem solunum yolu hem de sindirim yolu ile vücuda alınarak toksisite oluşturabilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda bu tür maddelerin balıkların yağ dokularında daha çok birikim gösterdiği bildirilmiştir (Ali ve diğerleri, 2011).

Yapılan bir araştırmada, insan genomları ve zebra balıkları arasındaki homolojinin %70'ten fazla olduğu gösterilmiştir (Toni, Arena, Cioni ve Tedeschi, 2023). Aynı zamanda, farklı iki araştırma insan hastalıklarıyla ilgili olan genlerin %82' sinin zebra balıklarında homolog genlerinin olduğunu ve gen dizisi benzerlik oranının %87 gibi yüksek bir oranda olduğunu ortaya koymaktadır (Cornet ve diğerleri, 2017; Jayasinghe ve Jayawardena, 2019).

Bu çalışmada kullanılan Zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)'nın sınıflandırılması Çizelge 2.3'de, embriyo gelişimi Şekil 2.6.'da, yetişkin zebra balığı görüntüsü Şekil 2.7.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Zebra balığının sınıflandırılması

Taksonomik Hiyerarşi	
Alem	Animalia
Alt-Âlem	Bilateria
İnfra-Âlem	Deuterostomia
Şube	Chordata
Alt-Şube	Vertebrata
İnfra-Şube	Gnathostomata
Üst-Sınıf	Actinopterygii
Sınıf	Teleostei
Takım	Cypriniformes
Üst-Aile	Cyprinoidea
Familya	Cyprinidae
Cins	Danio
Tür	Tür <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)



Şekil 2.6. Zebra balığının embriyo gelişimi ve yetişkin zebra balığı (D'costa ve Shepherd, 2009).



Şekil 2.7. Erişkin zebra balığı görüntüsü

Ayrıca balıklar için akut toksikolojik çalışmalarda kullanılan su parametreleri Çizelge 2.4’de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Balıklar için akut toksikolojik çalışmalarda kullanılan su parametreleri

Parametre	Sınır değerleri
pH	6-9
Çözünmüş oksijen	Soğuk su balıkları için ≥ 6 mg/L Ilık su balıkları için ≥ 4 mg/L
Sıcaklık	Soğuk su balıkları için 12-15 °C Ilık su balıkları için 20-25 °C
Amonyak	< 20 µg/L
Toplam sertlik	40-200 mg/L (CaCO_3)

Sucul canlılar ile yapılan çalışmalarda toksisite testleri testin süresine göre akut ve kronik test olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Akut testler (24, 48, 72 ve 96 saat sürelerde yapılan testler) ve deney süresi canlı türüne göre değişiklik göstermektedir. Kronik test ise, deney süresi bir hafta, 30 gün veya daha fazla süren testtir. Bu test türünde kullanılan organizmanın büyüme ve gelişimi önemlidir. Farklı toksik madde miktarlarının organizmaların üreme ve gelişmeleri üzerine etkileri gibi çalışmalarda kullanılmaktadır. Ortama toksik madde ilavesine göre ise; statik, yarı statik ve sürekli akış sistemli olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Statik testte deney ortamı deney süresince değişmez. Genellikle metabolizma atıklarından kaynaklı olumsuzluklar için 96 saat tercih edilir. Yarı statik testte ise deney ortamı belirli zaman aralıklarıyla yenilenir. Zaman aralıkları toksik madde ve organizmaya

göre belirlenir ve genellikle farklı zaman dilimleri tercih edilmektedir. Sürekli akış sistemli test türünde ise ortam devamlı olarak yenilenir ve kısa süreli toksik deneyler için tercih edilir (Cho, Pham, Zhao, Stolte ve Yun, 2021).

2.9. Sanger Dizileme

Mikrobiyal dünyanın genetik yapısı hakkında genom dizilimi bize çok güçlü veriler sağlamaktadır. Bir türün benzersiz DNA dizilimini çözmek, yaşamın moleküler temelini anlaşılmamasını gerektirmektedir. Polinükleotit zincirlerinin nükleik asit dizisi sonuçta karasal ve sucul yaşamın genetik ve metabolik özelliklerini belirler. Bu sebeple biyolojik araştırmalar açısından bu tür dizileri ölçebilmek veya çıkarım yapabilmek çok önemlidir. Yaygın olarak kullanılan dizi belirleme yöntemi di-deoksi zincir sonlandırma teknolojisiyle gerçekleştirilmektedir. Zincir sonlandırma dizileme yöntemi, Sanger dizileme olarak bilinmektedir. Frederick Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir ve o yıllardan günümüze kadar kullanılan en yaygın yöntem olmuştur (Sanger, Nicklen ve Coulson, 1977). DNA dizilimi icat edildiği yıllardan itibaren en güçlü teknoloji olup araştırmacılar için hala altın standart olarak görülse de bazı sınırlamaları mevcuttur. Örneğin, daha büyük dizi çıktısı için, elek ile ayırma olarak kullanılan jellere veya polimerlere duyulan ihtiyaç ve sadece az sayıda örnek paralel olarak analiz edilebilmektedir. Numune hazırlığı için otomasyonu sağlamak zordur. Daha büyük diziler elde edebilmek için DNA parçalarının bakterilere klonlanması gerekmektedir. Dizileme için yüksek maliyete ihtiyaç duyulmaktadır ve sıralama hataları olabilmektedir (Fakruddin ve Chowdhury, 2012).

Sanger dizileme yaşam bilimleri için önemli fırsatlar sunarak nükleik asitler ile ilgili verileri geliştirerek hücresel mekanizmalar ve bazı hastalıkların daha anlaşılır olmasını sağlamıştır. Yöntem için DNA polimeraz, tek iplikli DNA, dört adet dNTP ve bir dideoksinükleotit trifosfat (ddNTP) gereklidir. Tamamlayıcı DNA sentezi DNA polimeraz tarafından dNTP'ler ile gerçekleştirilmektedir ve enzim reaksiyonu ddNTP olunca sonlanır. Oluşan reaksiyon sonrasında elde edilen fragmanların dizi uzunluk optimizasyonları farklı ddNTP/dNTP oranının test edilmesi ile sağlanmaktadır. dNTP verisine göre dizileme ürünleri jel üzerinde ayrıştırılma işlemi gerçekleştirilir ve sonuç için tam DNA dizisi analiz edilir (Arı ve Arıkan, 2016; Vietina, Agrimonti ve Marmiroli, 2013).

Dünya çapında birçok araştırma grubu, DNA dizilemenin alternatif prensiplerini geliştirmek için çaba sarf etmektedir. Moleküler biyolojide yeni mekanizmaların ve kavramların keşfedilmesi, yaşam bilimlerinin hemen hemen her alanında yeni kapıların açılması dizileme teknolojileri için kendi ihtiyaçlarını oluşturmuştur. Bunun sonucunda ise DNA dizileme için yeni bir yöntem olan yeni nesil dizileme yöntemi ortaya konmuştur (Saini, Gaurav, Kumar ve Suna, 2023).

2.10. Yeni Nesil Dizileme (NGS [Next Generation Sequencing])

Yeni Nesil Dizileme (YND) yöntemi DNA'nın enzimatik reaksiyonlarla kesilerek çok sayıda DNA parçasıyla bir kütüphane oluşturulması olup kütüphaneyi oluşturan bu DNA parçalarının çoğaltılmasına dayanmaktadır. Sanger dizileme yöntemi günümüzde hala DNA dizi analizi için altın standart yöntem olarak kabul edilmiş olsa da uzun sonuç verme süresi ve maliyetinin fazla olması gibi dezavantajlarından dolayı eskisi kadar talep görmemektedir. Son yıllarda geliştirilen YND teknolojisi ile pek çok verinin düşük maliyetle ve hızlı bir şekilde analizleri yapılabilmektedir (Rizzo ve Buck, 2012). Bu teknolojinin başarılı ve güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için gelişmiş biyoinformatik analiz araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni nesil dizileme yönteminde kullanılan ilk cihaz Next Generation Sequencing 2005 yılında kullanılmıştır. Tüm ekzom dizileme yöntemleri ve tüm genom özellikle nadir hastalıklara sebep olan mutasyonların tanısında, genotipik ve fenotipik heterojenite sahip hastalıkların tanısında, yeni gen keşfinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Doğan ve diğerleri, 2017; Schang, Sabéran-Djoneidi ve Mezger, 2018; Volk ve Kubisch, 2017). Bu teknoloji ile doğruluk oranı yüksek ve oldukça hızlı bir şekilde dizileme yapılabildiği için "yüksek verimli sekanslama" olarak adlandırılmaktadır. Fonksiyonel genomik çalışmaları, moleküler biyoloji çalışmaları ve DNA ve RNA materyallerinin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca YND ile mikrodizi tekniklerine göre birçok avantaj sağlanmaktadır; tek nükleotit çözünürlüğü vererek ilgili genleri alternatif olarak eklenmiş transkriptleri, alelik gen varyantlarını ve tek nükleotit polimorfizmlerini bulabilmemizi sağlar. Genom veya genomik özelliklere ilişkin ön bilgiye gerek duyulmamaktadır. Daha yüksek dinamik sinyal aralığına sahiptir. Daha az girdi DNA/RNA gerekmektedir ve daha yüksek tekrarlanabilirliği mevcuttur. Kısacası yeni nesil dizileme binlerce hatta milyonlarca DNA molekülünün aynı anda dizilenmesine olanak tanıyan sağlam ve güvenilir bir platformdur (Saini, Gaurav, Kumar ve Sanu, 2023).

3. MATERİYAL METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda ve farklı maruziyet sürelerinde siflutrin ve fipronil maddelerine maruz bırakılmış olan zebra balıklarında (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) DNA metilasyon değişimleri araştırılmıştır.

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler

Yapılan araştırmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1, kullanılan kit ve reaktif bilgileri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Fipronil (%98)	Borik asit
Siflutrin (%92,5)	Agaroz
Tris	Etanol
EDTA	Dimetilsülfoksit
Etidyum bromür	

Kit ve reaktifler

Çizelge 3.2. Çalışma aşamasında kullanılan kit ve reaktif bilgileri

Kit/Reagent Adı	Marka	Katalog No
Illumina DNA Prep Beads + Buffers (96 Samples)	Illumina	20015828
Illumina DNA Prep Tagmentation (M) Beads (96 Samples)	Illumina	20015880
Illumina DNA Prep PCR + Buffers (96 Samples)	Illumina	20015829
IDT for Illumina DNA/RNA UD I. Set A (96 Indexes-96 Samples)	Illumina	20026121
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	Illumina	20028312
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit (300 Cycles)	Illumina	20039233
Qubit dsDNA HS Assay Kit, 500 Assays	Invitrogen/Thermo	Q32854
AMPure XP Bead	Beckman Coulter	A63881
Ethanol Absolute %99,9	ISOLAB	64-17-5

Çizelge 3.3. (devam) Çalışma aşamasında kullanılan kit ve reaktif bilgileri

QIAxcel DNA High Resolution Kit	Qiagen	929002
Nippon Tube Strips with single flat caps	Nippon	FG-088WF
FastGene Optima HotStart Ready Mix	Nippon	LS31
EpiMark® Hot Start Taq DNA Polymerase - 100 rxns	NEB	M0490S
EZ DNA Methylation Kit	Zymo	D5002
GeneJET Genomic DNA Purification Kit	Thermo	K0721
EZ DNA Metilasyon Kiti	Zymo Research	D5002 200rx.
Genomik DNA İzolasyon kiti	GeneJET	K0721-50 rx.
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific	SM0241

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada toksisite testleri ve biyokimyasal analizlerde kullanılan cihaz bilgileri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan cihaz bilgileri

Cihaz Adı	Marka	Model
NovaSeq 6000	Illumina	NovaSeq 6000
Qubit 4 Fluorometer	Invitrogen	Qubit 4
DLab MX-F Vorteks	Dragon Lab	DLab MX-F
QIAxcel	Qiagen	QIAxcel Advanced
FastGene Ultra Cyclor Gradient	Nippon	Ultra Cyclor Gradient
Eppendorf Thermomixer R	Eppendorf	Thermomixer R
Axygen Pipet Seti	Axygen	Single Channel/Multi Channel
DynaMag 96 Side	Invitrogen/Thermo	12331D
FastGene Mini Centrifuge	Nippon	Mini Centrifuge
3130XL Genetic Analyzer	Applied Biosystem	3130XL
Nanodrop-Spektrofotometre	Thermo Scientific	ND 1000
Mini Santrifüj	Eppendorf	AG Minispın
UV Görüntüleme cihazı	MaestroGen	UV-6L-2126
Agaroz jel elektroforezi	Hoefer	SUB13
Hassas terazi	Shimadzu	ATX224
Buzdolabı	Vestel	SP157
Mikrodalga	Beko	MD 1510
Termal Blok	Eppendorf	Thermostat Plus
Bulaşık makinesi	Smeg	GW4090

3.1.3. Çalışmada kullanılan primerler

Çalışmada *HSP70*, *CYP1A*, *B-AKTİN*, *EF1A*, *B2M* genleri seçilerek uygun diziler belirlenmiştir. Ardından elde edilen dizilerin blastlaması NSBI/Primer-BLAST veri tabanı aracılığıyla doğruluğu tayin edilmiştir. Çalışmada kullanmak amacıyla primer dizileri 100 nmol miktarda sentezlettilerilerek -20°C’de saklanmıştır (Oligomer Biyoteknoloji/Ankara). Kullanılan primerler Çizelge 3.4’ de verilmiştir. Bu genlerin tercih edilmesindeki sebep ise ortamda bulunan kimyasal maddelere karşı canlıların stres tepkisini ölçmek ve bunun sonucunda meydana gelebilecek metilasyon seviyelerini belirlemektir.

Çizelge 3.5. Belirlenen genler için tasarlanan primer dizileri

Gen	İleri primer ve Geri Primer (5’-3’)
<i>HSP70</i>	F- CGGCGTTTTGATTAGGTGTTTCGAGGGTG
	R- CGACCTCCTACACCATTCTCTCGATCTC
<i>CYP1A</i>	F- GGAGAGTACGTCGAAAGTTGGCGTTTAATG
	R- AATTTCCGCTACCCACGATCTTCCCGAA
<i>*B-AKTİN</i>	F- CGAGGAGTTCGTGGATTGATTGTAGA
	R- CCGCTAATAAACGCTAATAACAACGCGC
<i>*EF1A</i>	F- GGGGAGTAGTAGTTGAGGAGTGATTTTT
	R- CGAACCCGTAACCTCAAACCGCTTATACC
<i>*B2M</i>	F- GTTGAAGAACGGATAGGTTATGTCCG
	R- CGTCCGCCTCGCTACCCGATTAAATTTAC

* Referans genler

Genlerin hepsi internet ortamında gen bankası NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sitesi kullanılarak seçilmiştir. Promotor bölge kod numaralı mRNA verilerinin baz dizilimleri değerlendirmeye alınıp oluşturulan primerlerin ilgili bölgeye özgüllükleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kontrol edilerek belirlenmiştir. Daha sonra primer tasarımlarını yapmak amacıyla Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) programı kullanılmıştır (Dorrington, Zanette, Zacchi, Stegeman ve Bains, 2012). Genlerin uygun dizileri belirlenmiştir ve ardından elde edilen dizilerin blastlaması NCBI/Primer-BLAST veritabanı aracılığıyla doğruluğu tayin edilmiştir. Çalışmada kullanmak amacıyla bu primer dizileri Sentebiolab firmasına 100 nmol miktarda sentez ettirilerek -20°C’de saklanmıştır.

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve hazırlanışı

Siflutrin (%95)

Çalışmada ön deneyler ile belirlenen subletal konsantrasyonlar kullanılmıştır. Deneyde kullanılan %95'lik siflutrin çözeltisi, toz halde bulunan kimyasal madde, hassas terazide tartılarak volumetrik cam balon jojede belirli hacim analitik saflıkta dimetilsülfoksit (DMSO) ile tamamlanarak hazırlanmıştır. DMSO polar aprotik çözücüdür. Hücre biyolojisi ve biyokimya alanında yaygın kullanıma sahip bir çözücüdür. Dozlamalar 96 saat LC₅₀ değerinin (3,61 µg/L) 1/10 ve 1/100'ü olacak şekilde yapılmıştır.

Fipronil (%95)

Deneyde kullanılan fipronil çözeltisi, toz halde bulunan kimyasal madde, hassas terazide tartılarak volumetrik cam balon jojede belirli hacim analitik saflıkta DMSO ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Fipronil için literatürde verilen 96 saat LC₅₀ değerinin (1,81 µg/L) (Wang a, Zhou, Ding, Zhu ve Guo, 2010) 1/10 ve 1/100 olacak şekilde dozlar hesaplanarak uygulama yapılmıştır. Dozlama aşaması için hazırlanan çözeltiler balon jojenin etrafı ışık görmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılıp, kullanım zamanına kadar +4°C'de saklanmıştır. Çözeltiler dozlama yapılacağı zaman ortam sıcaklığına getirilerek deney akvaryumlarına belirlenen konsantrasyonlarda uygulamaları yapılmıştır. Dozlama sırasında havalandırma kesilmiş ve test solüsyonları otomatik pipetler yardımıyla akvaryumlara eklenmiştir.

3.1.5. Araştırma yeri

Deneyler, Ocak-Aralık 2023 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Balıkların bulunduğu ortam 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde ayarlanıp fotoperiyot kurularak balıkların yaşamını devam ettirebilmesi için uygun koşullar sağlanmıştır (Westerfield, 2000). Balıkların laboratuvar koşullarına uyum süreci için 15 gün laboratuvar ortamına alışmaları sağlanmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1. Balıkların laboratuvar ortamına adaptasyon koşulları

3.1.6. Akvaryum suyunun özellikleri

Hacimleri belli olan akvaryumlara, deneylerden önce, içinde yaklaşık 10 L dinlendirilmiş ve havalandırılmış kaynak suyu konulup; akvaryumlar, hava motorları yardımıyla sürekli havalandırılmıştır.

3.1.7. Su parametrelerinin ölçülmesi

Çalışmadan önce ve çalışma süresince su kalitesi değerleri (suda çözünmüş oksijen, pH, iletkenlik, sertlik, sıcaklık) iki günde bir ölçülmüştür. Su parametrelerinin ölçülmesinde YSI, model 51B cihaz kullanılmıştır ve ortalama değerler (Çizelge 3.5.) verilmiştir (Resim 3.2.). Çalışmada kullanılan suyun pH'sı 7,3, iletkenlik 113-830 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (ortalama 453.4 $\mu\text{S}/\text{cm}$) suyun sıcaklığı 21°C ve çözünmüş oksijen değeri ise 5,5 mg/L ölçülmüştür.



Resim 3.2. Su parametrelerinin ölçülmesi (YSI, model 51B)

Çizelge 3.6. Zebra balıkları ile yapılan akut toksisite testi ortalama su kalitesi parametreleri (Ocak-Mart 2023)

Model organizma	Kirletici madde	pH	Sıcaklık (°C)	Çözünmüş oksijen (mg/L)	İletkenlik (µS/cm)
Zebrafish (<i>Danio rerio</i> , Hamilton, 1822)	Siflutrin	7.74	24	7.0	291
	Fipronil	7.73	24	6.9	309

3.1.8. Deney hayvanlarının hazırlanması

Bu çalışmada ortalama boyları $2,51 \pm 0,49$ cm ve ağırlıkları da $0,14 \pm 0,06$ g zebra balıkları kullanılmıştır. Toplam yüz adet zebra balığı (dişi/erkek eşit dağılım) beş adet akvaryuma dağıtılmıştır. Akvaryumların popülasyonu yansıtması açısından dişi ve erkek balık sayısı eşit tutulmuştur. Metabolik atıkların ortamdaki uzaklaştırılması için akvaryum suyunun temizliği günlük olarak yapılmıştır. Balıklar sertifikalı üretim ve satışı yapılan firmadan temin edilip, laboratuvarında uygun şartlarda adaptasyonları sağlanmıştır. Laboratuvar şartlarına uyum için 15 gün deney akvaryumlarında bekletilmiştir. Uyum periyodunda balıklar vücut ağırlıklarının %2'si oranında ticari akvaryum balık yemi (Ahm Cichlid Flake Food) ile beslenmişlerdir.

Boyutları 10x20x35 ve hacimleri 15 L olan akvaryumlara deneylerden önce, içinde yaklaşık 10 L dinlendirilmiş ve havalandırılmış kloru uzaklaştırılmış kaynak suyu konulup; akvaryumlar, hava motorları yardımıyla sürekli havalandırılıp ve termostatlı ısıtıcılar vasıtasıyla su sıcaklığı 28°C’de sabit tutulmuştur. Fotoperiyot 14 saat aydınlık 10 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır (Liu ve diğerleri, 2016). Akvaryum sularının kalitesi, suda çözünmüş oksijen, pH, iletkenlik, sertlik, sıcaklık ile amonyak, nitrit, nitrat konsantrasyonları alıştırma peryodunda 2 günde bir ölçülmüştür (Westerfield, 2000) (Resim 3.3, Resim 3.4). Ayrıca günlük sifonlamaları yapılarak yem ve balık atıklarının ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Kontrol grubunda kimyasalları çözmede kullanılan DMSO ile dozlama yapılırken deney gruplarında belirlenen siflutrin ve fipronil konsantrasyonları hazırlanarak 96. saat ve 7. günde dozlamaları yapılmıştır. Dozlama sonrasında deney ve kontrol grubunda hayatta kalan balıklar DNA metilasyonu deneylerinde kullanılmak üzere sıvı nitrojen ile dondurularak -80 °C’ de saklanmıştır.



Resim 3.3. Deney sonrası buz anestezisi uygulanan balık



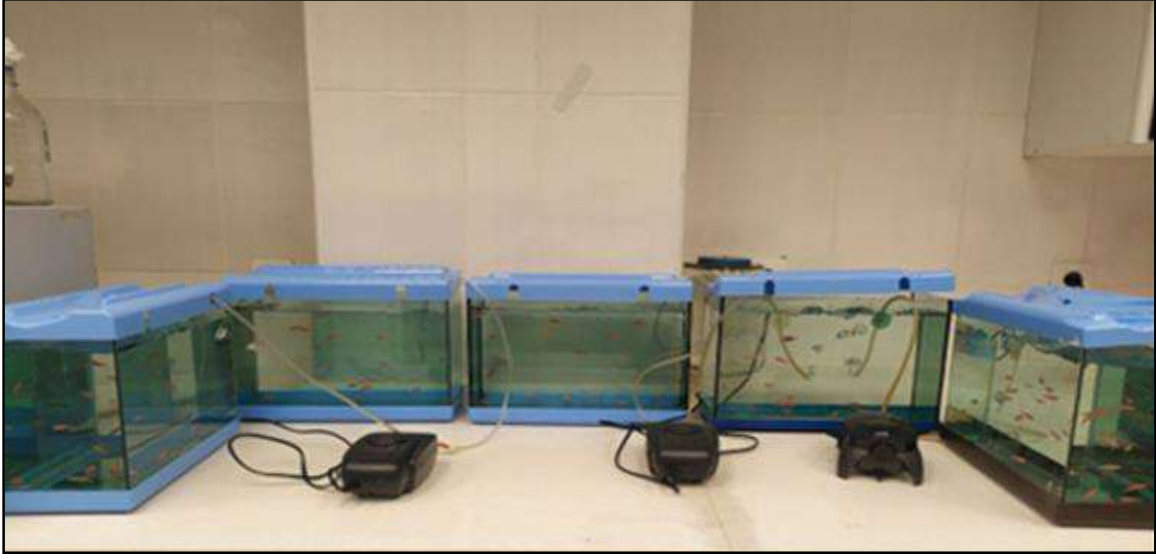
Resim 3.4. Laboratuvar ortamında çalışma öncesi deney hayvanlarının hazırlanması

3.2. Metot

3.2.1. Subletal toksisite deneyleri

Subletal deneyler öncesinde siflutrin maddesinin akut toksik konsantrasyonu belirlenmiştir. Yarı statik deney şartlarında siflutrinin 96 saatlik LC_{50} değeri hesaplanmıştır. Daha sonra akut toksisite test sonucunda subletal konsantrasyonlar belirlenerek, balıklar 24., 96. saat ve 7 gün süresince bu dozlara maruz bırakılmıştır. Dozlama yapılan akvaryum grupları ve doz miktarları Çizelge 3.6.' da verilmiştir.

Akvaryumlarda bulunan suların kimyasal derişimlerinin sabit kalabilmesi için deney ortamında iki günde bir olacak şekilde suların değışimleri yapılmış ve dozlama tekrarlanmıştır. Su değışim işleminde yem kalıntıları ve atıklar sifonlama işlemi ile temizlenmiştir (Resim 3.5).



Resim 3.5. Laboratuvar ortamı deney düzeneği

İki kimyasal için grupların dağılımı Çizelge 3.2. 'de verilmiştir.

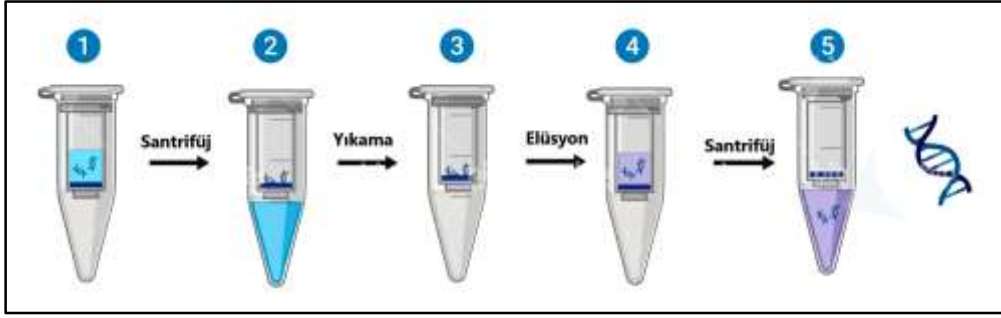
Çizelge 3.7. Çalışma için belirlenen siflutrin ve fipronil dozlama grupları

Gruplar	Maddeler	Dozlama süresi	Doz miktarı (µL)
Grup 1	Kontrol		
Grup 2	F	7. gün düşük doz	18
Grup 3	F	7. gün yüksek doz	180
Grup 4	S	96 saat düşük doz	170
Grup 5	S	96 saat yüksek doz	1700
Grup 6	S	7. gün düşük doz	170
Grup 7	S	7. gün yüksek doz	1700

3.2.2. Biyokimyasal analizler

DNA izolasyonu

DNA izolasyonu, kısaca deoksiribonükleik asidin yani DNA'nın içerisinde bulunduğu hücreden, dokudan ya da virüsten elde edilmesi işlemidir. DNA izolasyonu üç temel adımdan oluşmaktadır. Bunlar, hücre parçalaması, çöktürme ve saflaştırma (Şekil 3.1.). DNA izolasyonunda standardizasyon amaçlı kit kullanılmıştır (GeneJET Genomic DNA Purification Kit/Thermo/K0721). Kit kullanılırken ticari firmanın önerdiği protokol takip edilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2020; Liu ve diğerleri, 2016).



Şekil 3.1. DNA izolasyon işlem basamakları

- Her örnek için 2 adet 1,5 ml'lik tüp, 1 adet GeneJET Genomic DNA Purification kolonu, 1 adet küçük petri kabı isimlendirilir ve 1 adet bisturi hazırlanır.
- Isı bloğu 56°C'ye ayarlanır.
- Tüm doku petri kabı içinde bistüri ile minik parçalara bölünür. 200 µl parçalama çözeltisi petri kabına eklenir ve daha minik doku parçaları 200 µl parçalama çözeltisi ile birlikte çekilip 1,5 ml'lik tüpe aktarılır. 200 µl lizis tamponu petri kabına eklenir ve kalan küçük parçalar da lizis tampon ile birlikte çekilip 1,5 ml'lik tüpe aktarılır.
- Tüpe aktarılan doku parçaları + parçalama çözeltisi + lizis tamponu üzerine 25 µl proteinase K çözeltisi eklenir.
- 1,5 ml'lik tüp önceden 56°C'ye ısıtılmış ısı bloğuna yerleştirilir, bloğun çalkalama hızı 700 rpm'e ayarlanır ve 10 dk inkübasyona bırakılır. 1,5 ml'lik tüp ara ara vortekslenip tekrar ısı bloğuna yerleştirilebilir. Doku tamamen homojen olmak zorunda değildir.
- Inkübasyondan sonra tüpe 20 µl RNase A çözeltisi eklenir, oda ısısında 10 dk inkübasyona bırakılır.
- Inkübasyondan sonra tüpe 400 µl %96'lık EtOH eklenir ve vortekslenir.
- 8. Tüm sıvı kolona aktarılır. Kolonu tıkayabilecek büyüklükteki parçalar aktarılmaz.
- GeneJET Genomic DNA Purification Column 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Kolonun alt kısmı dökülür ve kolona 500 µl yıkama tamponu I eklenir, 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Kolonun alt kısmı dökülür ve kolona 500 µL yıkama tamponu II eklenir maximum hızda (12000 x g) 3 dakika santrifüj edilir.
- Kolonun alt kısmı atılır, kolon yeni bir 1,5 ml'lik tüpe yerleştirilir.
- 50 µl elüsyon tamponu kolonun tam ortasındaki filtreye eklenir, oda ısısında 5 dk inkübe edilir ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilir.

- 1,5 ml'lik tüpte toplanan sıvı tekrar aynı kolona yüklenir, tekrar oda ısısında 5 dk inkübe edilir ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- İzole edilen DNA -20 °C'de saklanabilir.

DNA' nın saflık ve miktar tayini

DNA örneklerinin saflığı ve miktarı spektrofotometre cihazı ile belirlenmiştir (Resim 3.6). DNA miktar tayini ölçümü ve grafiği Resim 3.7.'de verilmiştir. DNA ile bağlantılı olarak yapılan tüm analizlerin güvenilirliğini ve doğruluğunu etkileyen faktörler arasında DNA kalitesi, saflığı ve miktarı yer almaktadır. 260 nm de ölçümleri yapılan absorbans değerleri saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng ya da µg olarak miktarlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. 260 nm dalga boyunda okunan değer ile 280 nm ve 230 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Saflaştırılmış DNA oranı yaklaşık olarak 1,75-1,8 üzerinde olmalıdır (Lee, McCord ve Buel, 2014; Sambrook ve Russell, 2001).



Resim 3.6. Spektrofotometre ile izole DNA'ların ölçülmesi



Resim 3.7. DNA miktar tayini ölçümü ve grafiği

Dokulardan izole edilen DNA'ların bisülfıt dönüşümü

İzole edilen DNA'lar spektrofotometre ile ölçümleri tamamlandıktan sonra bisülfıt dönüşümleri (Zymo Research EZ DNA Methylation Kit Cat no: D5002) kit protokolüne göre yapılmıştır.

CT Dönüştürücü reaktif hazırlanması

Bu kit içinde sağlanan CT dönüştürücü reaktif katı bir karışımdır ve ilk kullanımdan önce aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmalıdır.

1. Bir CT dönüştürücü reaktif tüpüne 750 µl su ve 210 µl M-dilüsyon tamponu eklenir.
2. Sık sık vorteksleyerek veya çalkalayarak oda ısısında 10 dakika karıştırılır. CT dönüştürücü reaktif tüpünde eser miktarda çözünmemiş reaktif görülmesi normaldir. Her bir CT dönüştürücü reaktif tüpü 10 ayrı DNA işlemi için tasarlanmıştır. CT dönüştürücü reaktif ışığa duyarlıdır. En iyi sonuçlar için hazırlandıktan hemen sonra kullanılmalıdır. Hemen kullanılmazsa, oda ısısında bir gece, 4°C'de bir hafta veya 20°C'de bir ay saklanabilir. Depolanan reaktif kullanılmadan önce 37°C'ye getirilmeli ve vortekslenerek kullanılmalıdır.

M-Yıkama tamponu hazırlanması

Kullanmadan önce 6 ml M-Yıkama tamponuna (D5001) 24 ml %100 etanol veya 24 ml yıkama tamponuna (D5002) 96 ml %100 etanol eklenmelidir.

Protokol

- DNA örneğine 5 µl M-Dilüsyon tamponu eklenir ve toplam hacim su ile 50 µl'ye ayarlanır. Numuneyi yukarı ve aşağı doğru hafifçe vurarak veya pipetleyerek karıştırılır. Örneğin 14 µl DNA örneği için 5 µl M-Dilüsyon tamponu ve 31 µl su eklenmelidir.
- Örnek 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilir.
- İnkübasyondan sonra, her örneğe 100 µl hazırlanmış CT dönüştürücü reaktif eklenir ve karıştırılır.
- Tüpler karanlıkta, 50°C'de 12-16 saat inkübe edilir.
- Reaksiyonun ışığa maruz kalması en aza indirilmelidir. Alternatif inkübasyon koşulları için ekler bölümünde Illumina Infinium Metilasyon Testi kullanılırken'e bakılmalıdır.
- Tüpler 0-4°C'de (örn. buz üzerinde) 10 dakika boyunca inkübe edilir. Örnekler 4°C'de 20 saate kadar saklanabilir.
- Zymo-Spin IC Kolonu kolon toplama tüpüne yerleştirilir ve kolona 400 µl M-Bağlanma tamponu eklenir. Kolon, kolon toplama tüpünün üzerindeyken kolon toplama tüpünün kapasitesi 800 µl'dir. Kolon içeriğinin kontaminasyonunu önlemek için gerektiğinde toplama tüpünü boşaltılmalıdır.
- Örnekler (Adım 5'ten) M-Bağlanma tamponu içeren Zymo-Spin IC Kolonuna yüklenir. Kolonun kapağı kapatılır ve kolonu birkaç kez ters çevirerek karıştırılır (ya da 400 µl M-Bağlanma tamponu ve buzda bekleyen örnekler bir tüpte karıştırılır ve kolona yüklenir).
- Kolonlar >10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir ve kolon altı dökülür.
- Kolona 100 µl M-Yıkama tamponu eklenir. Kolonlar >10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir ve kolon altı dökülür.
- Kolona 200 µl M-desülfantasyon tamponu eklenir ve oda ısısında 15-20 dakika inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra >10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir.
- Kolona 200 µl M-Yıkama tamponu eklenir >10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir. 200 µl daha M-Yıkama tamponu eklenir ve >10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir.

- Kolon 1,5 ml'lik bir tüpe yerleştirilir. 10 µl M-Elüsyon tamponu doğrudan kolon matriksine eklenir, sonra $>10.000 \times g$ 'de 30 saniye santrifüjlenir.

DNA analize hazırdır veya daha sonra kullanılmak üzere -20°C 'de veya altında saklanabilir. Uzun süreli depolama için -70°C veya altında saklanmalıdır. Her PCR için 1-4 µl elüe edilmiş DNA kullanılması önerilir. Ancak gerekirse 10 µl'ye kadar kullanılabilir. Elüsyon hacmi deneyin gereksinimlerine bağlı olarak $>10 \mu\text{l}$ olabilir. Ancak küçük elüsyon hacimleri daha konsantre DNA verecektir. Alternatif olarak, deney için gerekliyse elüsyon için su veya TE ($\text{pH} \geq 6.0$) kullanılabilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve sanger dizileme

Numuneler için reaktif bilgileri ve PZR koşulları Çizelge 3.7, FastGene Optima HotStart Ready Mix Miktarları ve PZR koşulları Çizelge 3.8' de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Reaktif bilgileri ve amplifikasyon PZR koşulları

NEB EpiMark Hot Start Taq DNA Polimeraz (Cat: M0490)				Amplifikasyon PZR Koşulları		
Reaktif	Miktar (µl) (Yarım12,5)	13	Örneklilik	Isı	Süre	Döngü
5X EpiMark Hot StartTaq Tepkime Tamponu	2,5	32,5		95 °C	30 sn	
10 mM dNTPs	0,25	3,25		95 °C	30 sn	40 döngü
10 µM Forward Primer	0,25	3,25		67	60 sn	
10 µM Reverse Primer	0,25	3,25				
EpiMark Hot Start TaqDNA Polimeraz	0,06	0,81		68 °C	1 dk	
Template DNA (250 ng)	9,2	119,6				
Nükleaz içermeyen su				68 °C	5 dk	
Toplam	12,5	162,7				

Çizelge 3.9. FastGene Optima HotStart Ready Mix Miktarları ve PZR koşulları

FastGene Optima HotStart Ready Mix Miktarları		FastGene Optima HotStart Ready Mix PCR Koşulları	
2X FastGene Optima HotStart ReadyMix boya ile	95 °C	3 dk	
F Primer (10 µM)	95 °C	15 sn	40 döngü
R Primer (10 µM)	68 °C	30 sn	
DNA	72 °C	1 dk	
H ₂ O	72 °C	1 dk	
Toplam	4 °C	∞	
	2 saat 10 dakika		

PZR yöntemi ile istenilen bölgelerin çoğaltılması gerçekleştirildikten sonra, PZT ürünleri Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiştir. Agaroz 1,5 g tartılarak 150 mL’de ve 5 µL midori green boyası eklenerek daha sonra mikrodalga fırında çözdürülmüştür. Hazırlanan jel 65°C’ye kadar soğutulmuştur. jel dökülüp, taraklar tanklara takılarak 15-20 dk kadar donması için beklenmiştir. Sonra 0,6xTAE tamponu hazırlanıp yürütme tamponu olarak tanklara eklenmiştir. İlk kuyucuğa ladder yüklenip diğer kuyucuklara da sırasıyla örnekler yüklenerek 130-150 V arasında 40-60 dk kadar yürütülmüştür. Hazırlanan jelin daha sonra görüntüleri alınmıştır.

Agaroz jel elektroforezinin görüntülenmesi ile istenilen büyüklükte olduğu gözlemlenen DNA’ların dizilerinin elde edilmesi için Sanger dizileme gerçekleştirildi. Ticari bir şirketten hizmet alımı olarak yapılan Sanger dizilemeleri tamamlanmıştır (Genoks Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi/Ankara).

Yeni nesil dizileme

Yeni nesil dizileme ile dizileme yapılması için çok önemli bir basamak olan kütüphane hazırlığı basamağı örnek tiplerine uygun olarak tamamlandı. Örneklerin kütüphane hazırlığı üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi (Resim 3.8). Kütüphane hazırlığı biten tüm örneklerin, Qubit 4 florometre ölçümleri yapıldı, Agaroz jel elektroforezinde istenilen boyutlarda gözlemlenen örnekler, dizileme işlemine alınmadan önce son basamak olan dizileme havuzu hazırlığına alındı. Bu basamaktaki amaç; dizilemesi yapılacak olan tüm örneklerin tek bir tüpte toplanıp, uygun konsantrasyonda olacak şekilde birleştirilmesi ve

bunun sonucunda da tek seferde birden fazla örneğin dizisinin elde edilmesidir. Dizileme sonunda elde edilen diziler Illumina Novaseq sistemi tarafından otomatik olarak birbirlerinden ayrılmıştır. Bu sayede, elde edilen dizilerin biyoinformatik analizleri yapılabilmiş ve istenilen örneğin dizileri elde edilebilmiştir. Dizileme için uygun konsantrasyona sahip olan dizileme havuzu, tüm bu işlemlerin ardından Illumina MiSeq sisteminde dizilemeye alındı. Oluşturulan havuzun dizileme işlemi yapılırken Illumina Novaseq 6000 sisteminde uzun diziler elde etmek için kullanılan “Novaseq Reagent Kit” (600-Döngü) ile dizileme işlemi gerçekleştirildi. Dizileme işlemi sonucunda evrensel öncüllere göre Illumina sistemi tarafından otomatik olarak ayrılan örnekler “.fastq” formatında elde edildi. Dizileri içeren bu dosyaların biyoinformatik analizleri dizileme işleminden sonra gerçekleştirildi.



Resim 3.8. DNA numunelerinin kütüphane hazırlık aşaması

3.2.3. İstatistiksel hesaplamalar

Siflutrin pestisitinin akut toksisite test sonuçlarında LC_{50} değeri EPA Probit Analiz Programı (Version 1.4) programı kullanılarak belirlenmiştir. Sanger dizileme de tüm örnekler önce sanger cihazına yüklenerek veriler elde edilmiş ve dizilerin hizalanması, BLAST araştırması, plasmid çizimi, ABI ve Beckman chromatogram dosyalarının görselleştirilmesi için Bioedit ve Chromas programları kullanılmıştır. Kullanılan YND platformunun sağladığı yazılım ile çıktı olarak nükleotit dizisini ve okuduğu her bir nükleotidin kalite değerlerini bir arada bulunduran bir yazılım dosyası olan FASTQ (Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm and Quality) dosyası oluşmaktadır. Yeni nesil dizi analizi sonuçlarında bisülfıt uygulanmış okumaları ilgili genomla eşleştiren ve metilasyon bilgileri Bismark (Version

0.24.2) kullanılarak tamamlanmıştır. Bismarktan alınan çıktıların görselleştirilmeleri de ViewBS (Version 0.1.11) ile yapılmıştır. Tüm gen ve gruplar için tanımlayıcı istatistik yapılarak ANOVA testi kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel hesaplamalara göre *ACTB*, *HSP70*, *B2M*, *EF1A* ve *CYP1A* genleri için $p < 0,05$ ve ortalama fark 0,05 seviyesinde anlamlı bulunmuştur.

4. BULGULAR

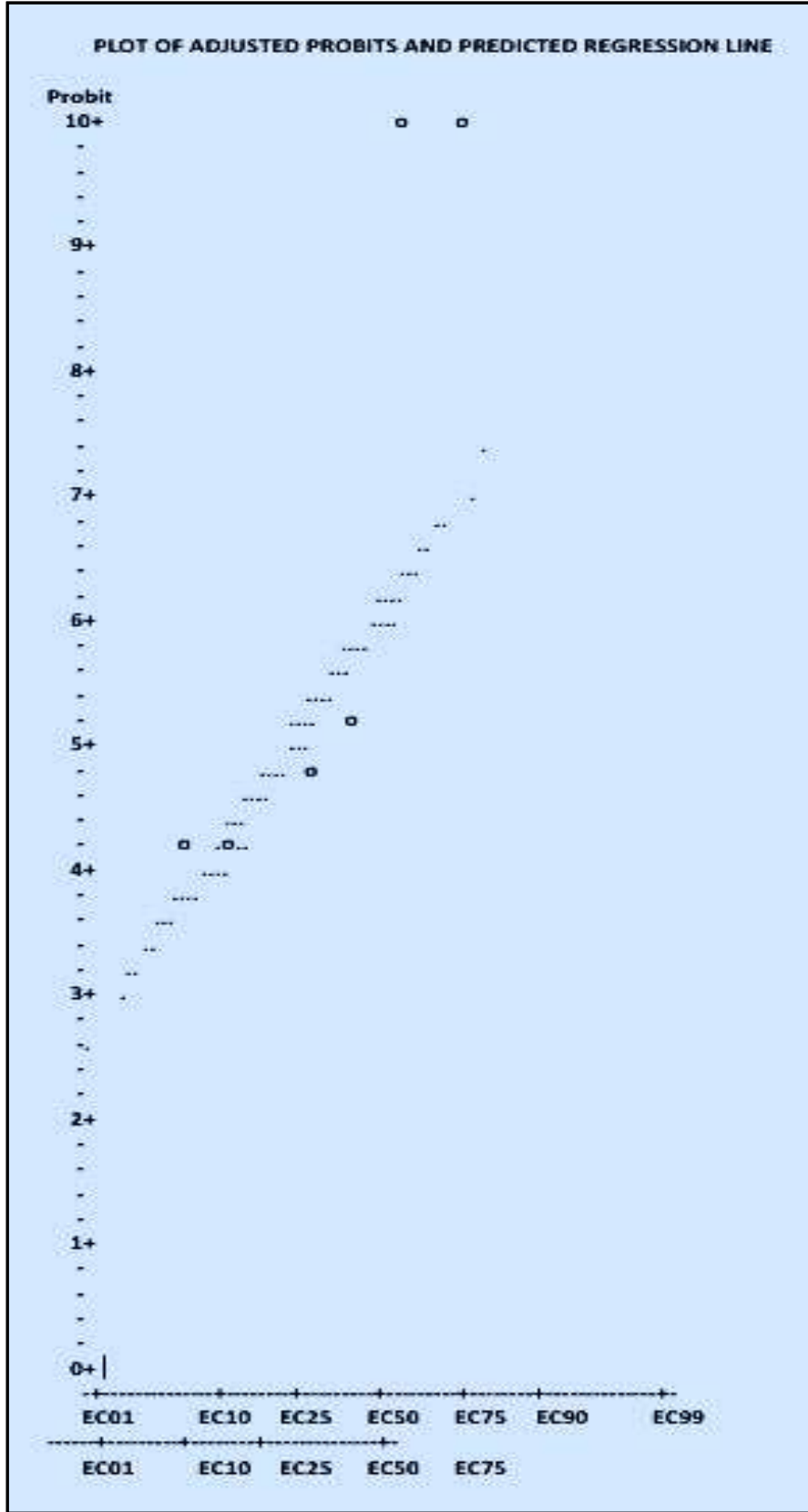
Bu çalışmada düşük ve yüksek konsantrasyonda fipronil ile siflutrin uygulanan zebra balıklarında, belirlenen genlerde (*CYP1A* ve *HSP70*) meydana gelen DNA metilasyonu araştırılmış ve elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur:

4.1. Akut Toksisite Test Bulguları

Sucul organizmalar üzerinde yapılan toksisite testleri temel olarak uygulanan herhangi bir maddenin test canlıları üzerinde hangi konsantrasyonda zararlı olduğunun belirlenmesine dayanır. Bu çalışma kapsamında yapılan ön deneylerde siflutrinin erişkin zebra balığında 96 saatlik LC₅₀ değeri 3,61 µg/L olarak belirlenmiştir. Siflutrin kimyasalının 96 saat sonunda tahmini letal konsantrasyon ve güven aralık değerleri Çizelge 4.1.' de verilmiştir. Ayrıca zebra balıklarının 96 saatlik probitleri ve regresyon eğrisi de Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Siflutrinin 96 saatlik tahmini letal konsantrasyonları (LC) ve güven aralıkları

Değer	Konsantrasyon (µg/L)	95% Güven aralığı
LC1.00	0.09	0.00-0.47
LC5.00	0.027	0.00-0.97
LC10.00	0.48	0.01-1.45
LC15.00	0.71	0.03-1.93
LC50.00	3.61	1.06-9.18
LC85.00	18.23	7.49-197.08
LC90.00	26.74	10.21-474.16
LC95.00	47.18	15.60-1802.02
LC99.00	136.82	32.69-23294.57



Şekil 4.1. Zebra balıklarının 96. saat probit değerleri ve regresyon eğrisi

4.2. DNA izolasyon bulguları

Fipronil ve siflutrin maruziyeti sonrasında tüm vücut balık dokularının DNA izolasyon değerleri spektrofotometre ile ölçüldükten sonra tüm değerler ortalama ve standart sapma olarak Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. DNA izolasyonu yapılan dokuların ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	Madde	Dozlama Süresi	Konsantrasyon (ng/ μ L) ortalama $\pm$ std sapma	A260/280 ortalama $\pm$ std sapma
Grup 1		Kontrol	354,5 $\pm$ 128,82	1,86 $\pm$ 0,054
Grup 2	F	7. gün düşük doz	535,35 $\pm$ 237,09	1,87 $\pm$ 0,028
Grup 3	F	7. gün yüksek doz	323,45 $\pm$ 33,16	1,88 $\pm$ 0,092
Grup 4	S	96 saat düşük doz	407 $\pm$ 32,67	1,82 $\pm$ 0,028
Grup 5	S	96 saat yüksek doz	231 $\pm$ 44,55	1,74 $\pm$ 0,064
Grup 6	S	7 gün düşük doz	185 $\pm$ 63,64	1,69 $\pm$ 0,035
Grup 7	S	7 gün yüksek doz	168,75 $\pm$ 38,82	1,68 $\pm$ 0,120

260/280 nm absorbands oranı DNA ve RNA'nın saflığını değerlendirmek için kullanılır. DNA için ~1.8 oranı genel olarak "saf" kabul edilir; ~2.0 oranı genellikle RNA için "saf" olarak kabul edilir. Her iki durumda da oranın kayda değer ölçüde düşük olması, 280 nm veya yakınında güçlü bir şekilde emilen protein, fenol veya diğer kirletici maddelerin varlığını gösterebilir. 260/230 oranı nükleik asit saflığının ikincil bir ölçüsü olarak kullanılır. "Saf" nükleik asit için 260/230 değerleri genellikle ilgili 260/280 değerlerinden daha yüksektir. Beklenen 260/230 değerleri genellikle 2,0-2,2 arasında bir değer olmalıdır. Oranın beklenenden önemli ölçüde düşük olması, 230 nm'de emilen kirletici maddelerin varlığını göstermektedir.

4.3. Bisülfite DNA ve PZR bulguları

Bu çalışma kapsamında bisülfite dönüştürülmüş DNA'ların kübit ölçüm değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

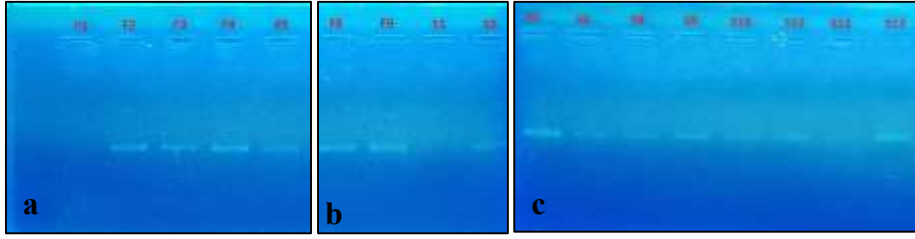
Çizelge 4.3. Bisülfite dönüştürülmüş DNA'ların kübit ölçüm değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	Konsantrasyon ortalama±std sapma (ng/μL)	A260/280 ortalama±std sapma
Grup 1	98,85±38,60	2,1±0,06
Grup 2	126,45±35,57	2,10±0,021
Grup 3	112,95±80,68	2,11±0,08
Grup 4	132,2±16,40	2,17±0,021
Grup 5	83,3±2,97	2,21±0,042
Grup 6	82,25±6,58	2,2±0,028
Grup 7	75,1±1,70	2,175±0,007

Bisülfit PZR için belirlenen beş genin primer bilgileri Çizelge 4.4. ve örneklere ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü Resim 4.2.' de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Belirlenen beş genin primer, dizi, baz sayısı, GC oranı ve erime derecesi bilgileri

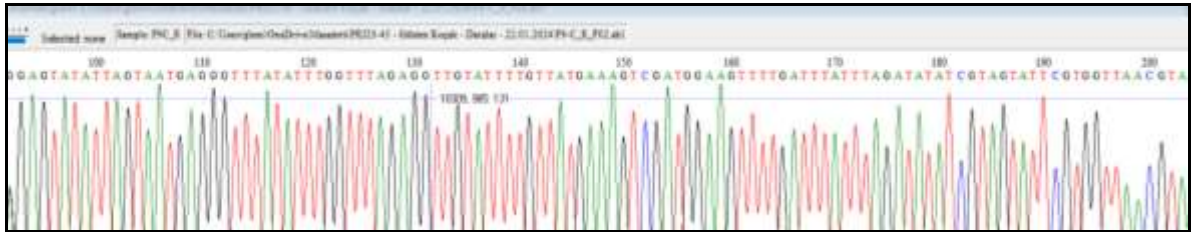
Primer Adı	Dizi	Baz Sayısı	GC	Tm (Melting temperature)	
<i>HSP70-F</i>	CGGCGTTTTGATTTAGGTGTTTCGAGGGTG	29	52%	68	68
<i>HSP70-R</i>	CGACCTCCTACACCATTCTCTCGATCTC	28	54%	68	
Primer Adı	Dizi	Baz Sayısı	GC	Tm	
<i>CYP1A-F</i>	GGAGAGTACGTCGAAAGTTGGCGTTTAA TG	30	47%	67	67
<i>CYP1A-R</i>	AATTTCGCTACCCACGATCTTCCCGAA	28	50%	67	
Primer Adı	Dizi	Baz Sayısı	GC	Tm	
<i>B-AKTİN-F</i>	CGAGGAGTTCGTGGATTGATTGTAGA	26	46%	63	64
<i>B-AKTİN-R</i>	CCGCTAATAAACGCTAATAACAACGCGC	28	46%	65	
Primer Adı	Dizi	Baz Sayısı	GC	Tm	
<i>EF1A-F</i>	GGGGAGTAGTAGTTGAGGAGTGATTTTT	28	43%	64	65,5
<i>EF1A-R</i>	CGAACCCGTAACCTCAAACCGCTTATACC	29	48%	67	
Primer Adı	Dizi	Baz Sayısı	GC	Tm	
<i>B2M-F</i>	GTTGAAGAACGGATAGGTTATGTCGG	26	46%	63	65,5
<i>B2M-R</i>	CGTCCGCCTCGCTACCCGATTTAAATTTC	30	50%	68	



Resim 4.1. Örneklere ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri (a. F1, F2, F3, F4, F5, b. F8, F9, S1, S3, c. S5, S6, S8, S9, S10, S11, S13).

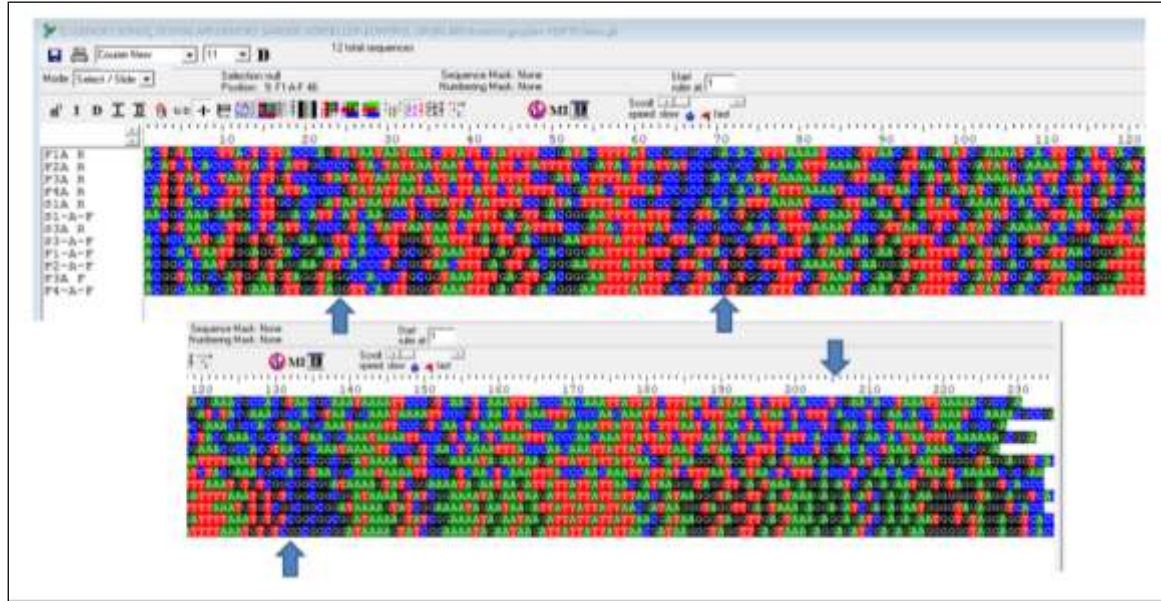
4.4. Sanger Dizi Analizi Bulguları

Örneklerin Sanger dizileme işlemi bittikten sonra elde edilen veriler Bioedit programı kullanılarak görselleştirilmiştir, metile sitozinler mavi renkli olarak verilmiştir. Sanger dizileme için örnekler cihaza yüklenmeden önce her örneğe bir kod verilerek ondan sonra yükleme işlemi yapılmıştır. Daha sonra elde edilen verilerden örneklere ait kromotogram görüntüleri elde edilmiştir. İdeal ve sekans bilgisine güvenilebilecek bir kromatogram görüntüsünde gürültü az olmalı, pikler birbirinden yeterince ayrı, parçalanmamış ve sıralı bir şekilde görünmelidir (Şekil 4.2.).

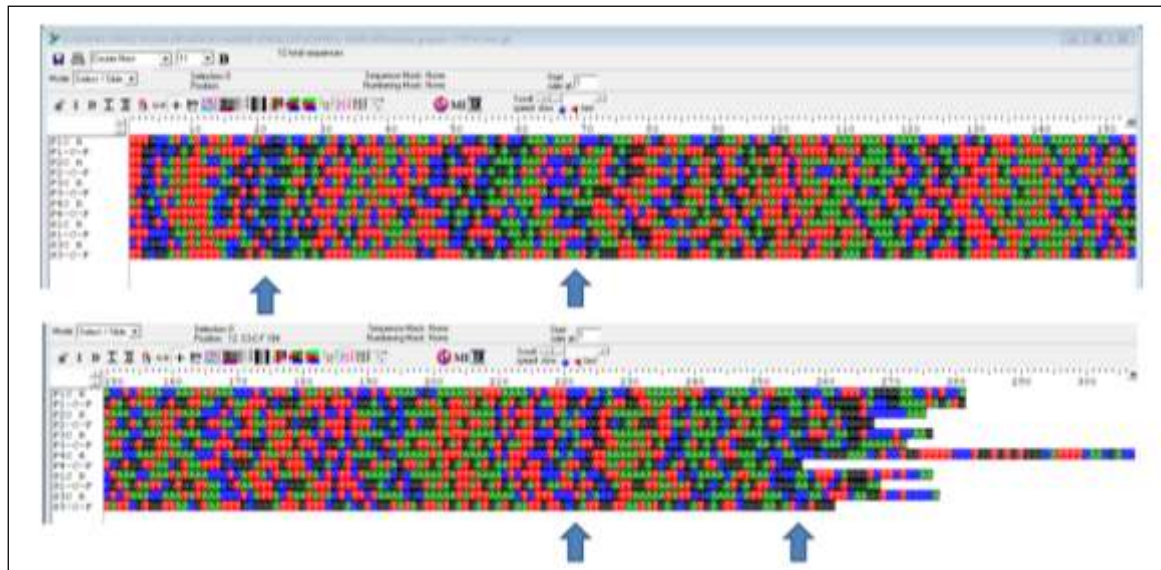


Şekil 4.2. Fipronilin 7. gün yüksek dozlu örneğine ait pik görüntüleri net olan Sanger kromotogram bulguları

Çalışma planlanırken belirlemiş olduğumuz iki adet *HSP70* ve *CYP1A* genlerinin kontrol gruplarında meydana gelen metilasyon durumlarının Sanger dizileme sonrası Bioedit programı ile görüntüleri elde edilmiştir (Resim 4.2, 4.3.). Mavi ile işaretli bazlar metile sitozinleri (C) temsil etmektedir. Yeşil renkli baz Adenin (A), kırmızı renkli baz Timin (T) ve siyah renkli baz ise guanin (G) olarak verilmiştir. Sol tarafta örneklerin forward ve reverse primerlerini gösteren örnek kısaltmaları verilmiştir ve alttaki görsel üstteki görselin devamı şeklindedir. Metilasyon sonuçlarına bakıldığı zaman genel olarak kontrol gruplarında benzer bölgelerde metilasyonun olduğunu ve bir kümeleşme meydana geldiği görülmektedir.

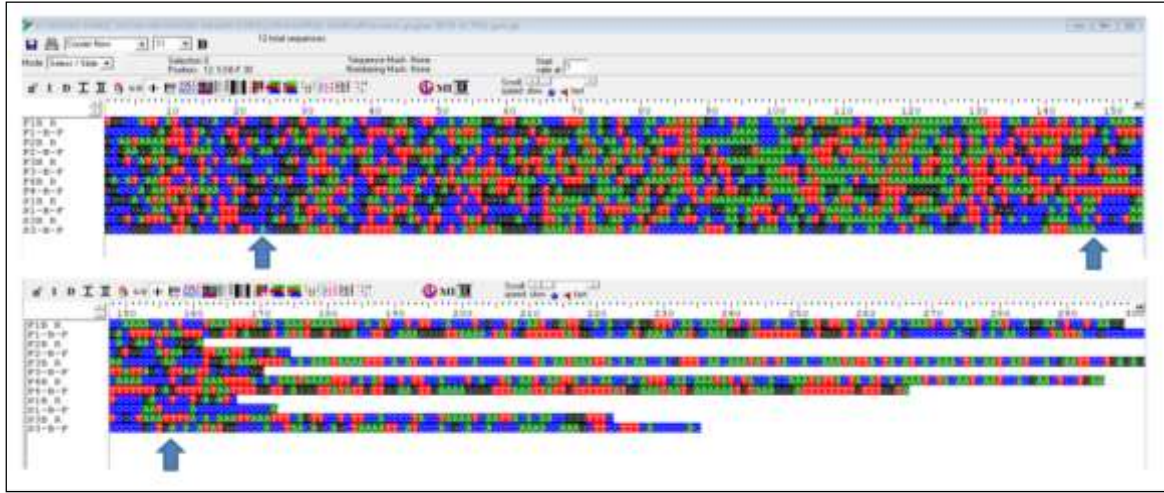


Resim 4.2. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin *HSP70* geninin kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları

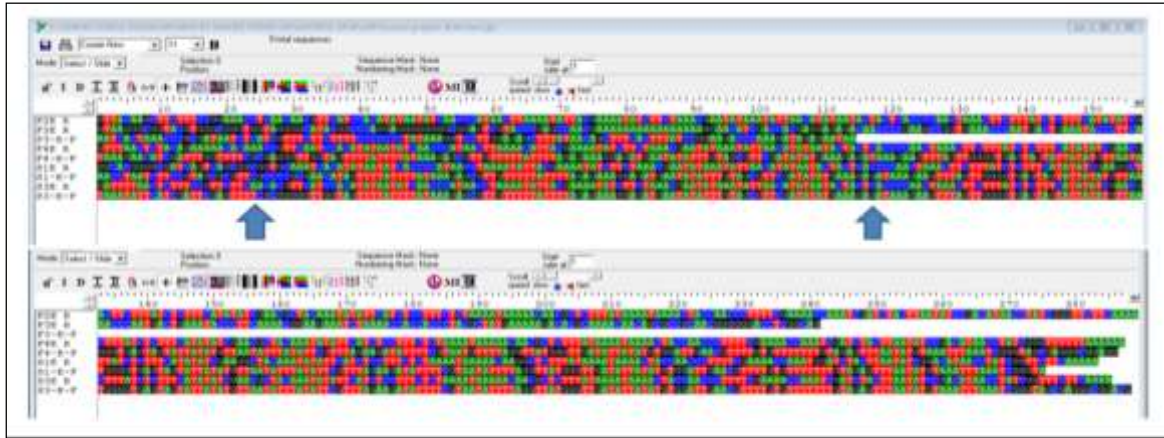


Resim 4.3. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin *CYP1A* geni kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları

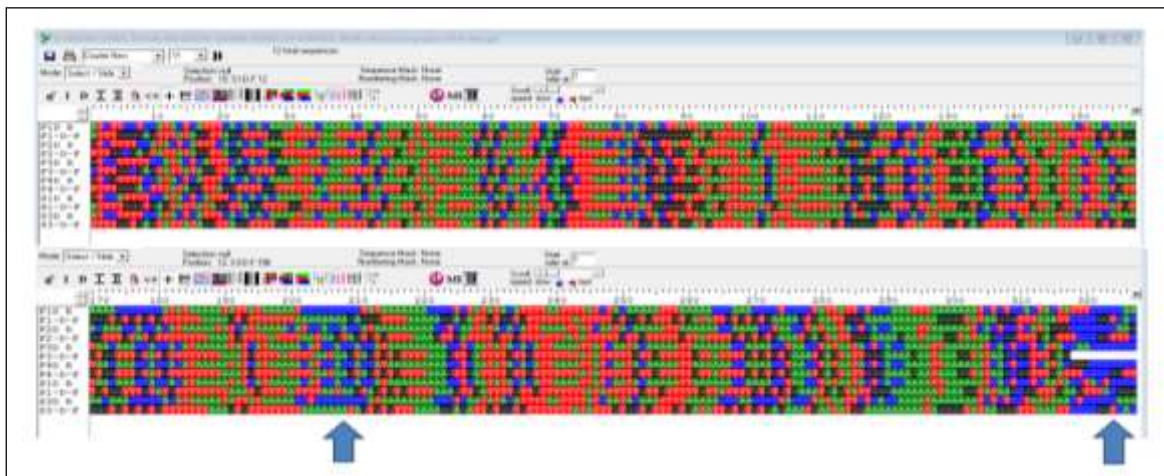
Siflutrin ve fipronil pestisiterine ait *ACTB*, *B2M* ve *EF1A* referans genlerinin Sanger dizileme sonrası Bioedit programı ile elde edilen görüntüler metile sitozinlerin yoğunluğunu göstermektedir (Resim 4.4, 4.5 ve 4.6). Mavi görülen kısımlar metile sitozinleri ifade etmektedir.



Resim 4.4. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin *ACTB* referans geninin kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları

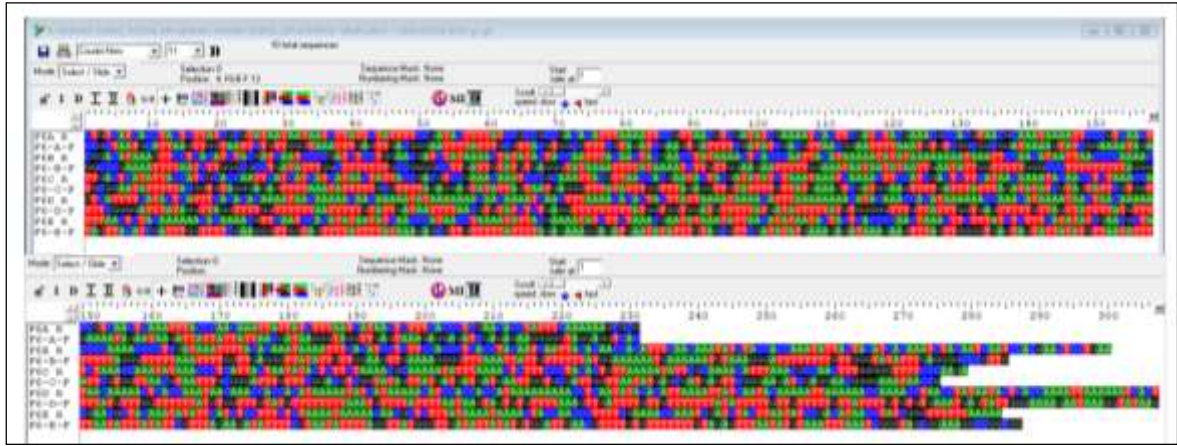


Resim 4.5. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin *B2M* referans geninin kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları



Resim 4.6. Siflutrin ve fipronil pestisitlerinin *EF1A* referans geninin kontrol gruplarında meydana gelen metile sitozinlerin yoğunluk durumları

Çalışma sonucunda fipronil 7. gün hem yüksek hem de düşük dozlu gruplar incelendiğinde; düşük doz uygulanmış gruptaki (Resim 4.7.) metilasyon yoğunluğunun yüksek doz uygulanmış gruba göre daha az olduğu görülmektedir (Resim 4.8.). Mavi renginin yoğunluğuna bakıldığında yüksek doz uygulanmasına rağmen metilasyon seviyesinde kayda değer bir artış görülmemektedir. Bu da bize aslında hipometilasyon olabileceği hakkında bilgi vermektedir.



Resim 4.7. Fipronilin 7. gün düşük doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (*HSP70*, *CYP1A*, *ACTB*, *EF1A* ve *B2M*) metile sitozinlerin yoğunluk durumları

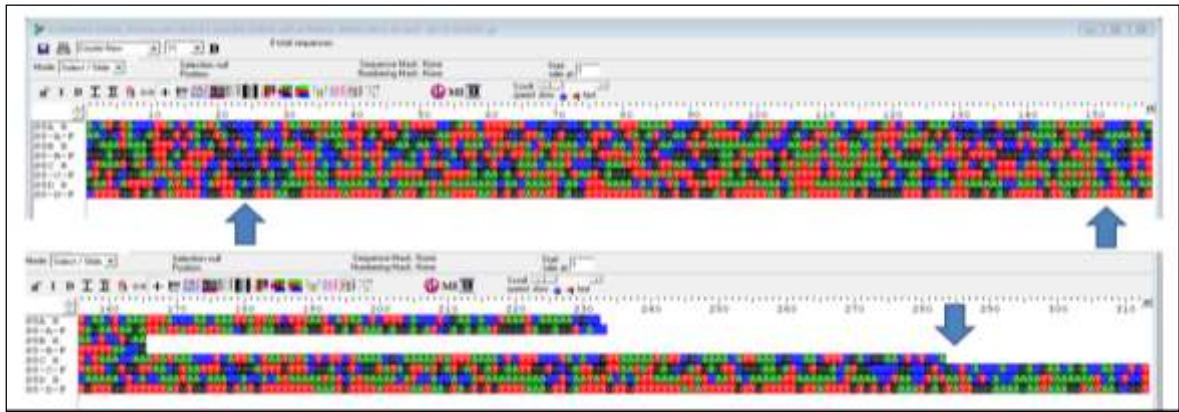


Resim 4.8. Fipronilin 7. gün yüksek doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (*HSP70*, *CYP1A*, *ACTB*, *EF1A* ve *B2M*) metile sitozinlerin yoğunluk durumları

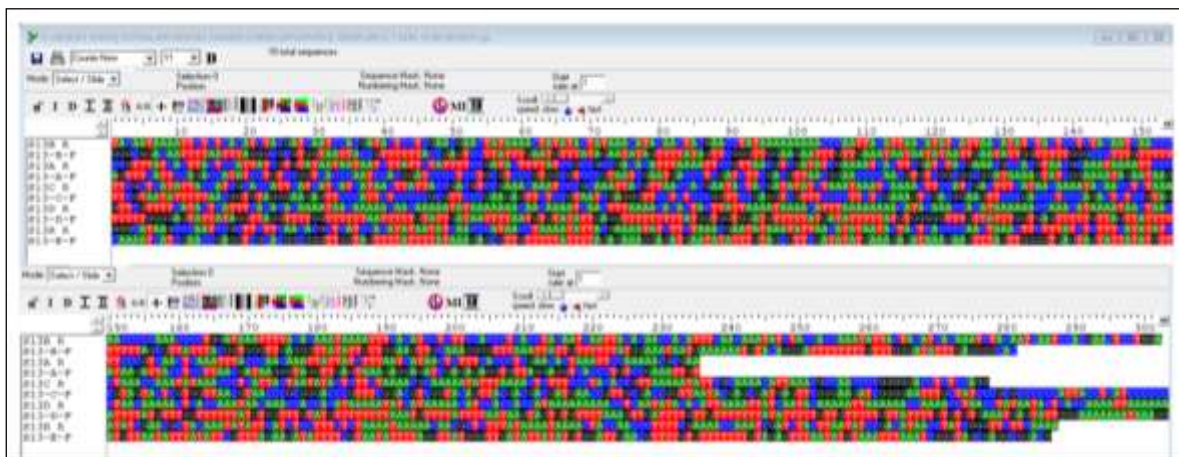
96. saat düşük ve yüksek doz uygulanmış siflutrin grubunda metile sitozin oranına bakıldığında;



Resim 4.9. Siflutrinin 96. saat düşük doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (*HSP70*, *CYP1A*, *ACTB*, *EF1A* ve *B2M*) metile sitozinlerin yoğunluk durumları

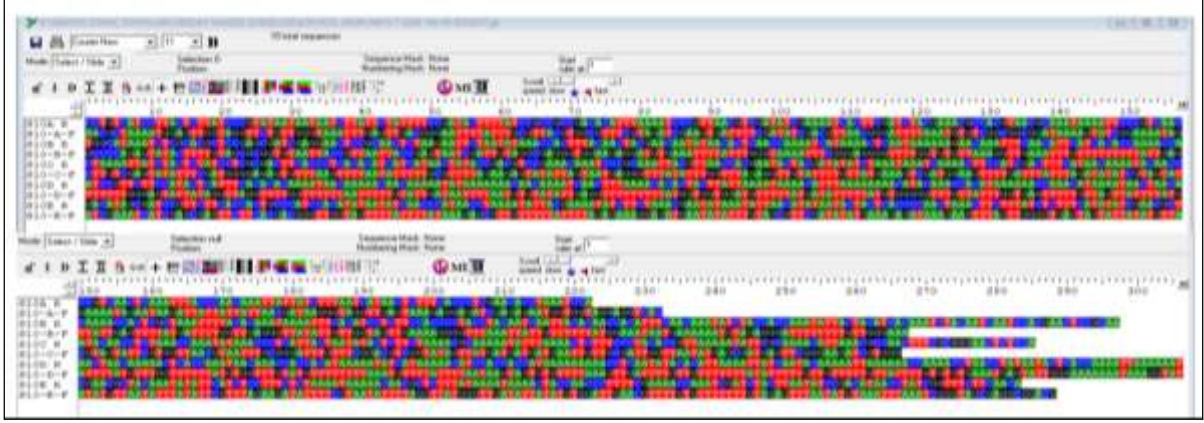


Resim 4.10. Siflutrinin 96. saat yüksek doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (*HSP70*, *CYP1A*, *ACTB*, *EF1A* ve *B2M*) metile sitozinlerin yoğunluk durumları



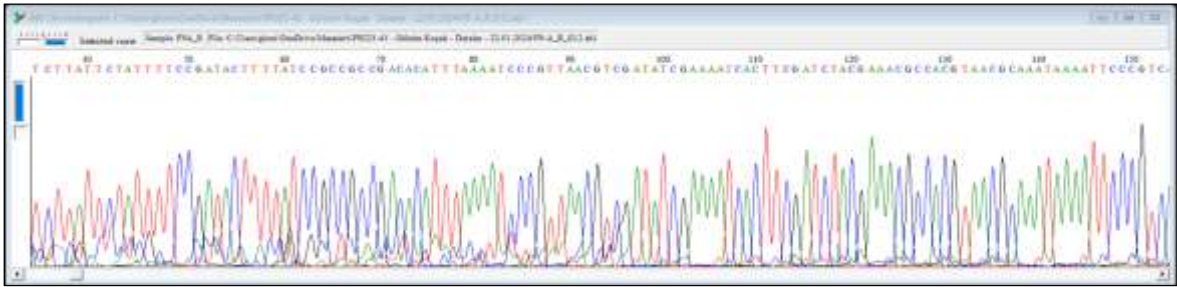
Resim 4.11. Siflutrinin 7. gün düşük doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (*HSP70*, *CYP1A*, *ACTB*, *EF1A* ve *B2M*) metile sitozinlerin yoğunluk durumları

Siflutrinin 7.gün düşük ve yüksek dozlu gruplara ait sanger dizileme kromotogram görüntülerinde metile sitozin yoğunlukları Resim 4.11 ve Resim 4.12’de verilmiştir.

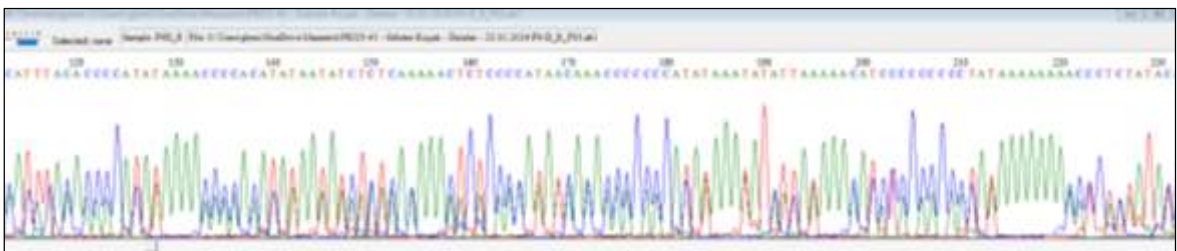


Resim 4.12. Siflutrinin 7. gün yüksek doz uygulanmış grubunda meydana gelen genlere ait (*HSP70*, *CYP1A*, *ACTB*, *EF1A* ve *B2M*) metile sitozinlerin yoğunluk durumları

Bioedit programı ile kromatogram görüntüsü elde edilen yüksek doz uygulanmış fipronil örneğinde mavi pikler metilasyon yoğunluğunu ifade etmektedir. Benzer şekilde aynı gruba ait farklı referans geni ile alınan sonuçta da metile sitozinler mavi olarak görülmektedir. Fipronilin yüksek doz grubunun *HSP70* ve *EF1A* referans genlerine ait kromatogram görüntüleri verilmiştir (Resim 4.13, 4.14.).

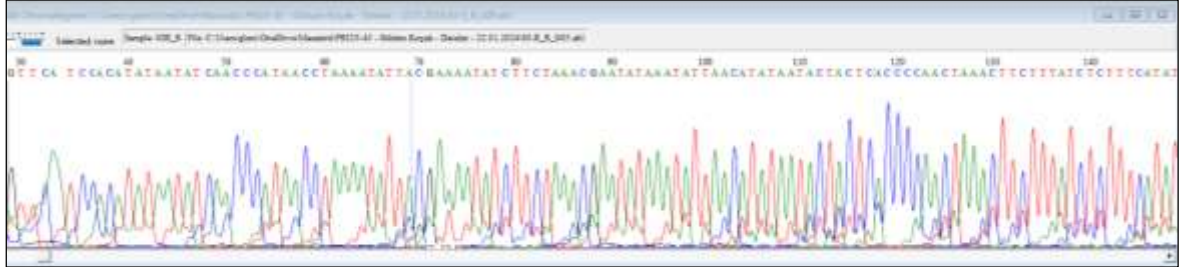


Resim 4.13. Fipronil 7.gün yüksek dozlu *HSP70* genine ait sanger görüntüsü

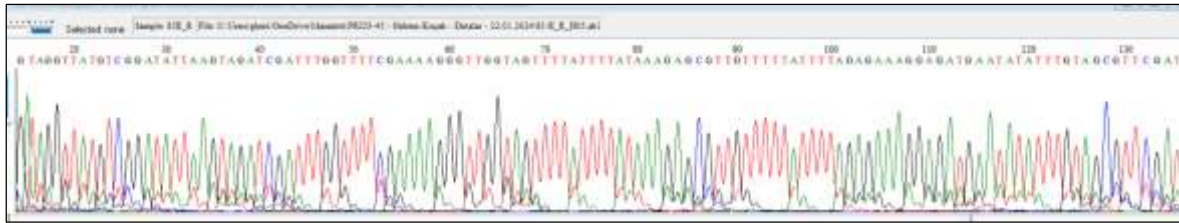


Resim 4.14. Fipronil 7.gün yüksek doz grubu *EF1A* genine ait sanger görüntüsü

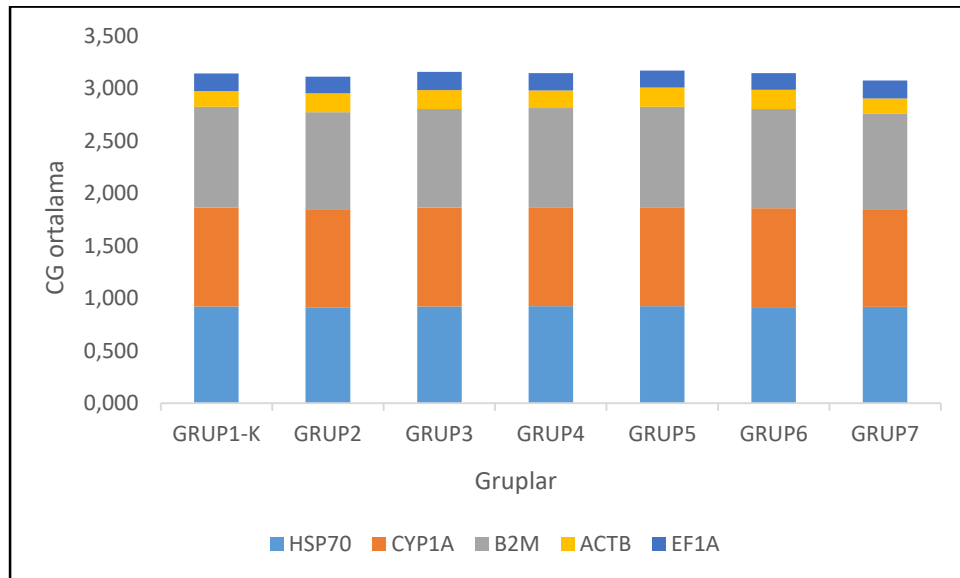
Siflutrinin 96. saat düşük doz uygulanmış *B2M* referans gen grubunda (Resim 4.16.) metile sitozin yoğunluğu, kontrol (Resim 4.15.) grubuna göre metile sitozin sayılarında bir azalma görülmüştür.



Resim 4.15. Siflutrin kontrol grubuna ait *B2M* referans geni kromotogram görüntüsü



Resim 4.16. Siflutrin 96. Saat düşük doz grubu *B2M* referans geni kromotogram görüntüsü

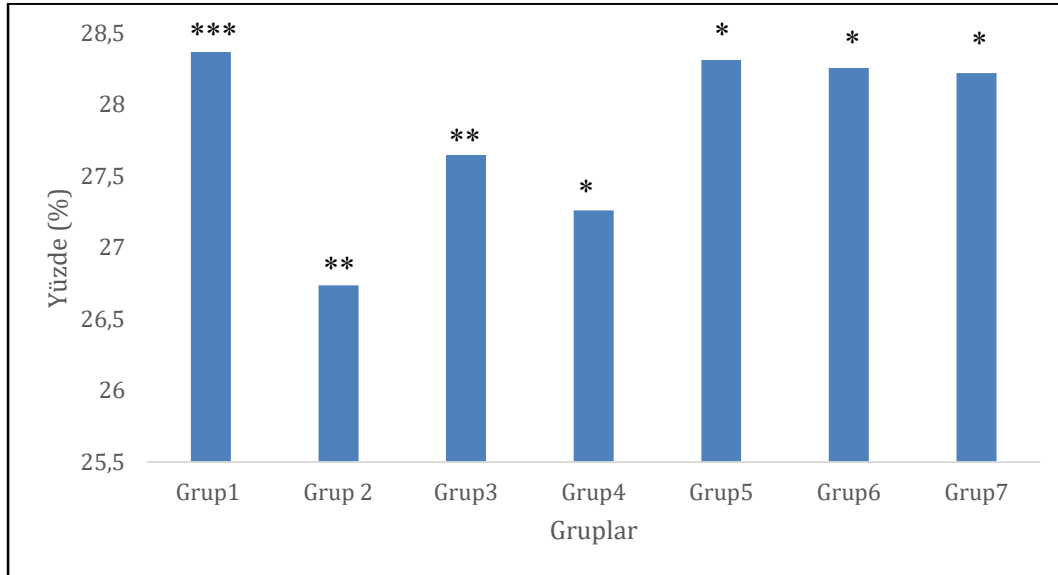


Şekil 4.3. Siflutrin ve fipronil gruplarına ait *HSP70*, *CYP1A* genleri ve *B2M*, *ACTB*, *EF1A* referans genlerine ait CG metilasyon bulguları

Grafik incelendiğinde *HSP70* ve *CYP1A* genlerinin metilasyon oranları ile referans genlerden *B2M* geni CG metilasyon ortalama değerleri birbirine yakın olduğu

görülmektedir. *ACTB* ve *EF1A* referans genlerinde ise bu oran çok daha düşük değerdedir (Şekil 4.3.).

Örneklerin kontrol grubu, dozlama miktarları ve sürelerine göre gruplandırılıp beş gen için ayrı ayrı grup yüzdeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4.). Grup 1(***) her iki pestisit için kontrol olarak belirlenmiştir ve deney süreci sonunda ortaya çıkan sonuçlarda doğal bir süreçte de metilasyonun olabileceğini ifade etmektedir. Grup 2’de (**) fipronilin 7.gün düşük dozlu, Grup 3’te (**) ise fipronilin 7. gün yüksek dozlu örnekleri yer almaktadır ve hipometilasyonun varlığını ifade etmektedir. Benzer şekilde Grup 4’(*) te siflutrinin 96. saat düşük doz uygulanmış grubunda da hipometilasyonun varlığından söz edilebilmektedir. Grup 5 (*) siflutrinin 96. saat yüksek dozlu, Grup 6 (*) siflutrinin 7. gün düşük doz grubunu ve Grup 7 (*) ise siflutrinin 7. gün yüksek doz grubunun Grup 2, 3 ve 4’e göre metilasyon seviyesinde artış olduğu görülmektedir. Grafik incelendiğinde Grup 1 yüzdesi 28,36; Grup 2 26,73; Grup 3 27,65; Grup 4 27,26; Grup 5 28,31; Grup 6 28,26 ve Grup 7 28,22 olarak verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde siflutrinin fipronil grubuna göre metilasyon seviyesinde artış olduğu söylenebilmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise değerler yüzde olarak birbirine yakındır.



Şekil 4.4. Fipronil ve siflutrin gruplarına ait Sanger dizileme yüzde bulguları

4.5. Yeni Nesil Dizi Analizi Bulguları

Agaroz jel görüntüleri elde edilen örneklerin Illumina cihazı ile dizilenmeleri tamamlanmış ve BAM dosyası çıktısı olarak elde edilmiştir. Elde edilen BAM ve BAI dosyaları IGV (Integrative Genomics Viewer) programı ile analizleri tamamlanmıştır. CpG dinükleotidlerindeki sitozin metilasyonu ile ilişkili olan DNA metilasyonu, epigenetik mekanizmalar arasında en çok çalışılmıştır. Bununla birlikte, sitozin metilasyonu, H'nin A, C veya T olduğu CHG ve CHH dizi bölgeleri dahil olmak üzere CpG olmayan bölgelerde de meydana gelebilmektedir. Örneklerle ait CG, CHG ve CHH bölgelerinde metilasyon yüzde değerleri Çizelge 4.5.'te verilmiştir.

Çalışılan beş genin CG, CHG ve CHH bölgelerindeki metilasyon seviyeleri için tanımlayıcı istatistik yapılmış ve daha sonra ANOVA testi uygulanarak gruplar arasındaki anlamlılık düzeyine bakılmıştır. CG, CHG, CHH bölgeleri ile birlikte gen gövdesi (body), 5'(upstream) ve 3'(downstream) bölgelerindeki metilasyon seviyelerinin sonuçları istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Ortalama farklar 0,05 seviyesinde anlamlıdır ve genler arasında anlamlı ilişki bulunduğu belirlenmiştir. *HSP70* genine ait tanımlayıcı istatistik bulguları Çizelge 4.5.'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. *HSP70* geni tanımlayıcı istatistik bulguları

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std, Deviation	Varyans	Skewness	Kurtosis
Örnek	1521	1	23	12,00	7,283	53,046	,000	-1,445
GRUP1	1521	1	3	1,61	,763	,582	,791	-,852
GRUP2	1521	1	3	2,03	,810	,656	-,057	-1,473
SONUÇ	1521	0	1	,292195500 848919	,423462524 917371	,179	,817	-1,321

Tablo incelendiğinde ANOVA testi CG, CHG ve CHH bölgeleri arasında anlamlı fark bulunmuştur (Çizelge 4.6., Çizelge 4.7.). ($p=0$)

Çizelge 4.6. *HSP70* genler arasında ANOVA testi istatistik bulguları

Değişkenler					
			F	p	Anlamlı Fark
Örnek	CG	CHG	0	1	
		CHH			
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			
		CHG			
GRUP1	CG	CHG	1,587	0,205	
		CHH			
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			
		CHG			
SONUÇ	CG	CHG	206056,03	0	*
		CHH			*
	CHG	CG			*
		CHH			*
	CHH	CG			*
		CHG			*

*: Ortalama fark 0,05 seviyesinde anlamlıdır,

Çizelge 4.7. *HSP70* ANOVA testi istatistik bulguları

Değişkenler					
			F	p	Anlamlı Fark
Örnek	BODY	DOWNSTREAM	0	1	
		UPSTREAM			
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			
		DOWNSTREAM			
GRUP2	BODY	DOWNSTREAM	1,197	0,302	
		UPSTREAM			
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			
		DOWNSTREAM			
SONUÇ	BODY	DOWNSTREAM	1,397	0,248	
		UPSTREAM			
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			
		DOWNSTREAM			

*: Ortalama fark 0,05 seviyesinde anlamlıdır,

CYP1A genine ait tanımlayıcı istatistik bulguları Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. *CYP1A* tanımlayıcı istatistik bulguları

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Varyans	Skewness	Kurtosis
Sample	1487	1	23	11,59	7,288	53,111	,120	-1,400
GRUP 1	1487	1	3	1,27	,683	,466	2,145	2,603
GRUP 2	1487	1	3	2,06	,808	,654	-,114	-1,461
SONUÇ	1487	0	1	,378939229736743	,454356541576228	,206	,478	-1,744

ANOVA testi bulgularına göre CG, CHG ve CHH bölgeleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$) (Çizelge 4.9.). Body, upstream ve downstream verileri bu grupta olmadığı için grup 2 analizleri yapılamamıştır.

Çizelge 4.9. *CYP1A* ANOVA testi istatistik bulguları

Değişkenler			F	p	Anlamlı Fark
Örnek	CG	CHG	1,534	0,216	
		CHH			
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			
		CHG			
GRUP1	CG	CHG	1,534	0,216	
		CHH			
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			
		CHG			
SONUÇ	CG	CHG	1487,177	0	*
		CHH			*
	CHG	CG			*
		CHH			*
	CHH	CG			*
		CHG			*

*: Ortalama fark 0,05 seviyesinde anlamlıdır,

ACTB genine ait tanımlayıcı istatistik bulguları Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. *ACTB* referans geni tanımlayıcı istatistik bulguları

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Varyans	Skewness	Kurtosis
Örnek	1780	1	23	12,05	7,094	50,320	-,024	-1,449
GRUP1	1780	1	3	1,65	,655	,429	,519	-,701
GRUP2	1780	1	3	1,99	,815	,664	,020	-1,493
SONUÇ	1780	0	1	,065918196268542	,183485184056530	,034	3,627	12,942

ANOVA testi bulgularına göre CG, CHG ve CHH bölgeleri arasında istatistiksel olarak $p=0$ bulunmuştur (Çizelge 4.11.). Çizelge 4.12.'de Grup 2 sonuçlarına göre body, upstream (5') ve downstream (3') arasında da anlamlı fark olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. *ACTB* referans geni ANOVA-Dunnett C testi istatistik bulguları

Değişkenler			F	p	Anlamlı Fark
Örnek	CG	CHG	0,004	0,996	
		CHH			
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			
		CHG			
GRUP1	CG	CHG	0,477	0,621	
		CHH			
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			
		CHG			
SONUÇ	CG	CHG	247,556	0	*
		CHH			*
	CHG	CG			*
		CHH			
	CHH	CG			*
		CHG			

*: Ortalama fark 0,05 seviyesinde anlamlıdır,

Çizelge 4.12. *ACTB* referans geni ANOVA-Dunnett C testi istatistik bulguları

Değişkenler			F	p	Anlamlı Fark
Örnek	BODY	DOWNSTREAM	0	1	
		UPSTREAM			
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			
		DOWNSTREAM			
GRUP2	BODY	DOWNSTREAM	0,054	0,948	
		UPSTREAM			
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			
		DOWNSTREAM			
SONUÇ	BODY	DOWNSTREAM	0,729	0,483	
		UPSTREAM			
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			
		DOWNSTREAM			

*: Ortalama fark 0,05 seviyesinde anlamlıdır,

B2M genine ait tanımlayıcı istatistik bulguları Çizelge 4.13.'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. B2M tanımlayıcı istatistik bulguları

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std, Deviation	Skewness	Kurtosis
Örnek	2161	2	23	12,74	6,897	-,002	-1,404
GRUP1	2161	1	3	1,54	,836	1,033	-,773
GRUP2	2161	1	3	2,07	,842	-,128	-1,579
SONUÇ	2161	0	1	,325003107928747	,446684254389665	,692	-1,502

ANOVA testi bulgularına göre CG, CHG ve CHH bölgeleri arasında anlamlı fark bulunmuştur (Çizelge 4.14.). Çizelge 4.15.'te Grup 2 sonuçlarına göre body ve upstream (5') arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. B2M ANOVA- Dunnett C testi istatistik bulguları

Değişkenler			F	p	Anlamlı Fark
Örnek	CG	CHG	0,395	0,674	
		CHH			
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			
		CHG			
GRUP1	CG	CHG	4,407	0,012	
		CHH			
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			
		CHG			
SONUÇ	CG	CHG	11621,228	0	*
		CHH			*
	CHG	CG			*
		CHH			*
	CHH	CG			*
		CHG			*

*: Ortalama fark 0,05 seviyesinde anlamlıdır,

Çizelge 4.15. B2M ANOVA- Dunnett C testi istatistik bulguları

Değişkenler			F	p	Anlamlı Fark
Örnek	BODY	DOWNSTREAM	0,159	0,853	
		UPSTREAM			
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			
		DOWNSTREAM			
GRUP2	BODY	DOWNSTREAM	3,232	0,4	
		UPSTREAM			*
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			*
		DOWNSTREAM			
SONUÇ	BODY	DOWNSTREAM	0,279	0,756	
		UPSTREAM			
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			
		DOWNSTREAM			

EF1A genine ait tanımlayıcı istatistik bulguları Çizelge 4.16.'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. *EF1A* tanımlayıcı istatistik bulguları

	N	Minimu m	Maximu m	Mean	Std, Deviation	Varyan s	Skewnes s	Kurtosi s
Örnek	152 1	1	23	12,04	7,277	52,950	-,005	-1,444
GRUP1	152 1	1	3	2,28	,897	,804	-,572	-1,513
GRUP2	152 1	1	3	2,07	,830	,690	-,133	-1,538
SONU Ç	152 1	0	1	,05294242824716 1	,18834496949862 2	,035	4,528	19,598

EF1A geni ANOVA istatistik sonuçları incelendiğinde CG, CHG ve CHH gen bölgelerinde CG ve CHH bölgelerinde anlamlı fark olduğu görülmektedir. ($p<0,05$). (Çizelge 4.17.)

Çizelge 4.17. *EF1A* ANOVA testi istatistik bulguları

Değişkenler			F	p	Anlamlı Fark
Örnek	CG	CHG	0,007	0,993	
		CHH			
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			
		CHG			
GRUP1	CG	CHG	5,846	0,003	
		CHH			*
	CHG	CG			
		CHH			
	CHH	CG			*
		CHG			
SONUÇ	CG	CHG	138,967	0	*
		CHH			*
	CHG	CG			*
		CHH			
	CHH	CG			*
		CHG			

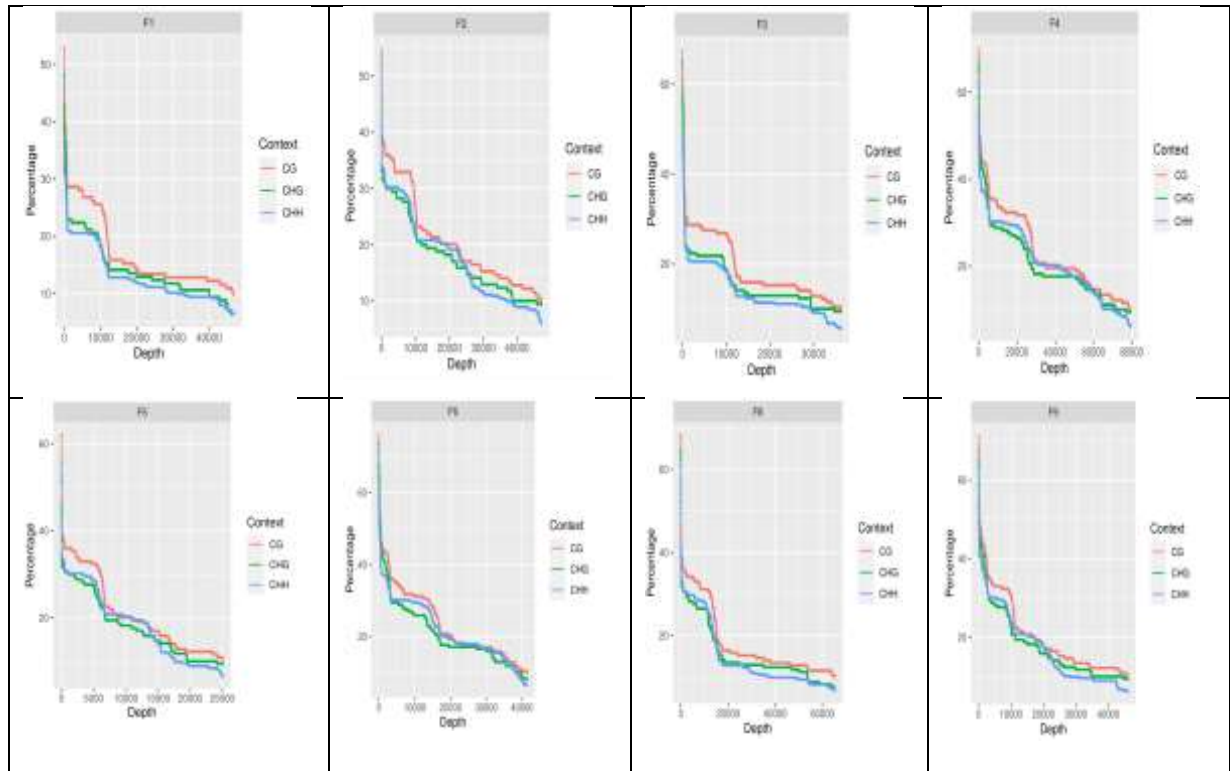
*: Ortalama fark 0,05 seviyesinde anlamlıdır,

EF1A ANOVA testi istatistik sonuçlarına göre body, downstream ve upstream grupları arasında anlamlı fark olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

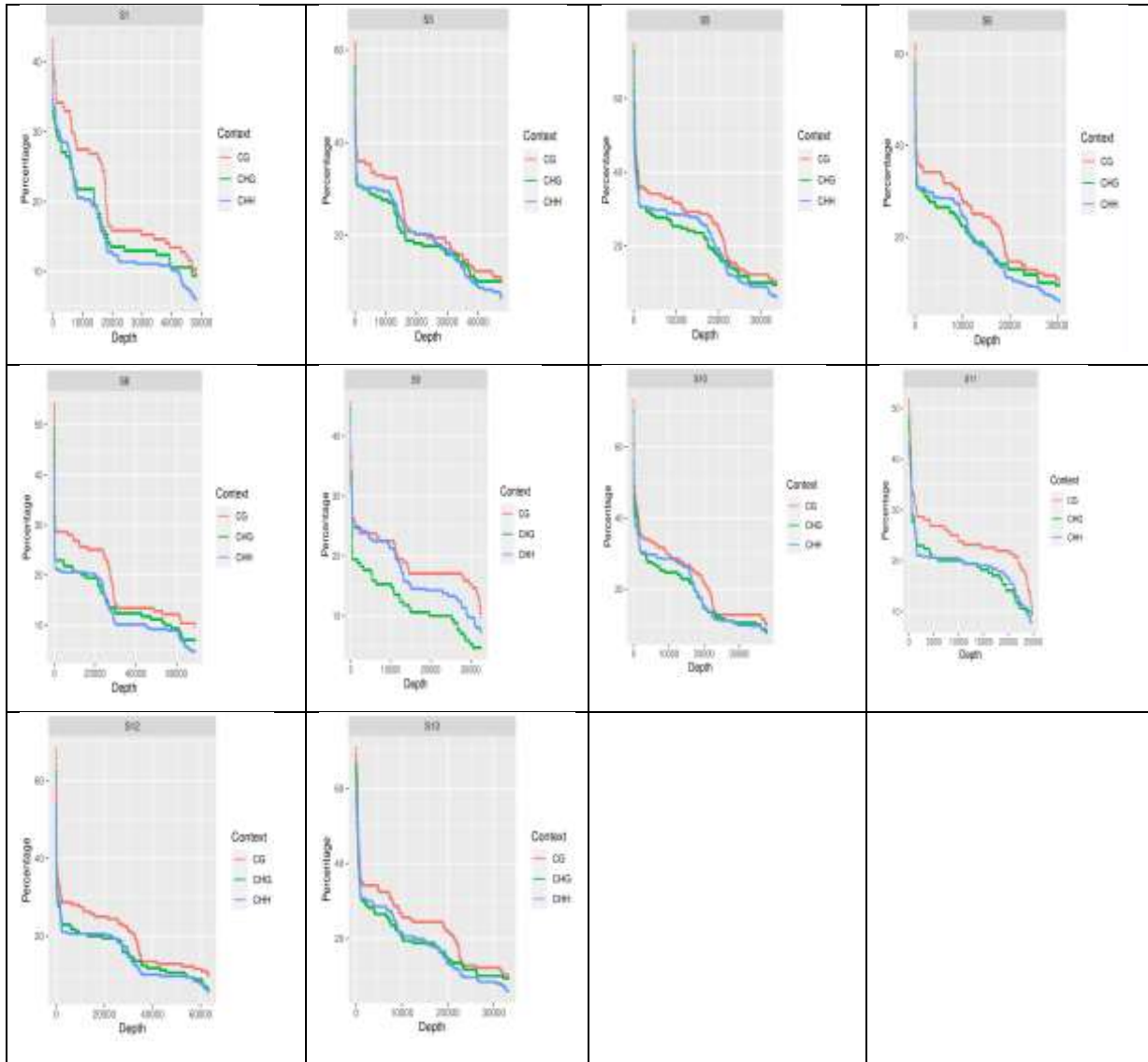
Çizelge 4.18. *EFIA* ANOVA testi istatistik bulguları

Değişkenler			F	p	Anlamlı Fark
Örnek	BODY	DOWNSTREAM	0,007	0,993	
		UPSTREAM			
	DOWNSTREAM	BODY			
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			
		DOWNSTREAM			
GRUP2	BODY	DOWNSTREAM	7,346	0,001	*
		UPSTREAM			*
	DOWNSTREAM	BODY			*
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			*
		DOWNSTREAM			
SONUÇ	BODY	DOWNSTREAM	11,321	0	*
		UPSTREAM			*
	DOWNSTREAM	BODY			*
		UPSTREAM			
	UPSTREAM	BODY			*
		DOWNSTREAM			

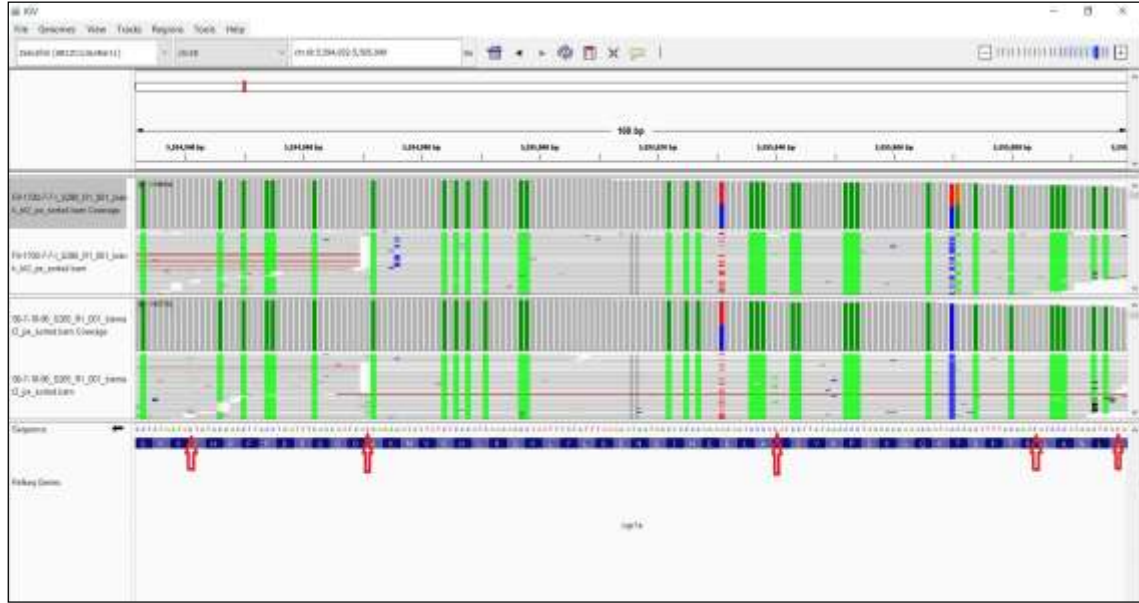
Çizelge 4.19. Örneklerin CG, CHH ve CHG sonuçlarında; okuma derinliği (x eksen) ve metilasyon yüzde (y eksen) bulguları



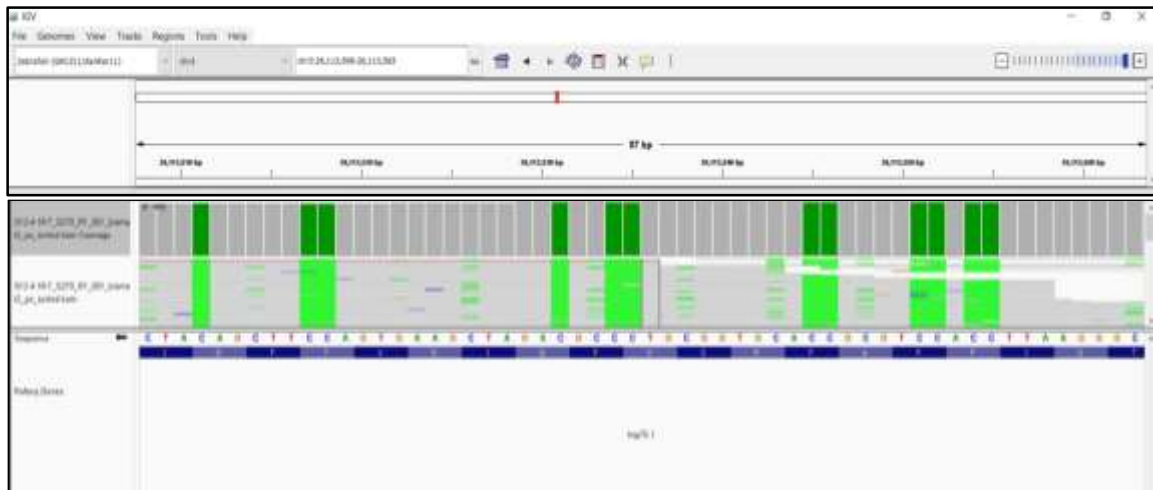
Çizelge 4.20. (devam) Örneklerin CG, CHH ve CHG sonuçlarında; okuma derinliği (x eksen) ve metilasyon yüzde (y eksen) bulguları



Fipronil ve siflutrin örneklerine ait *HSP70* ve *CYP1A* referans genlerinin yeni nesil dizi analizi sonucu IGV (Integrative Genomics Viewer) programı ile metilasyon durumlarını gösteren ekran görüntüsü verilmiştir (Resim 4.17, Resim 4.18). Kırmızı ok ile işaretli yerler metile sitozinleri göstermektedir.



Resim 4.17. Fipronil 7. gün yüksek doz grubu ile siflutrinin 96. saat düşük doz grubunun *CYP1A* referans geni NGS görüntüsü



Resim 4.18. Siflutrinin 7.gün düşük doz grubuna ait *HSP70* geni NGS görüntüsü

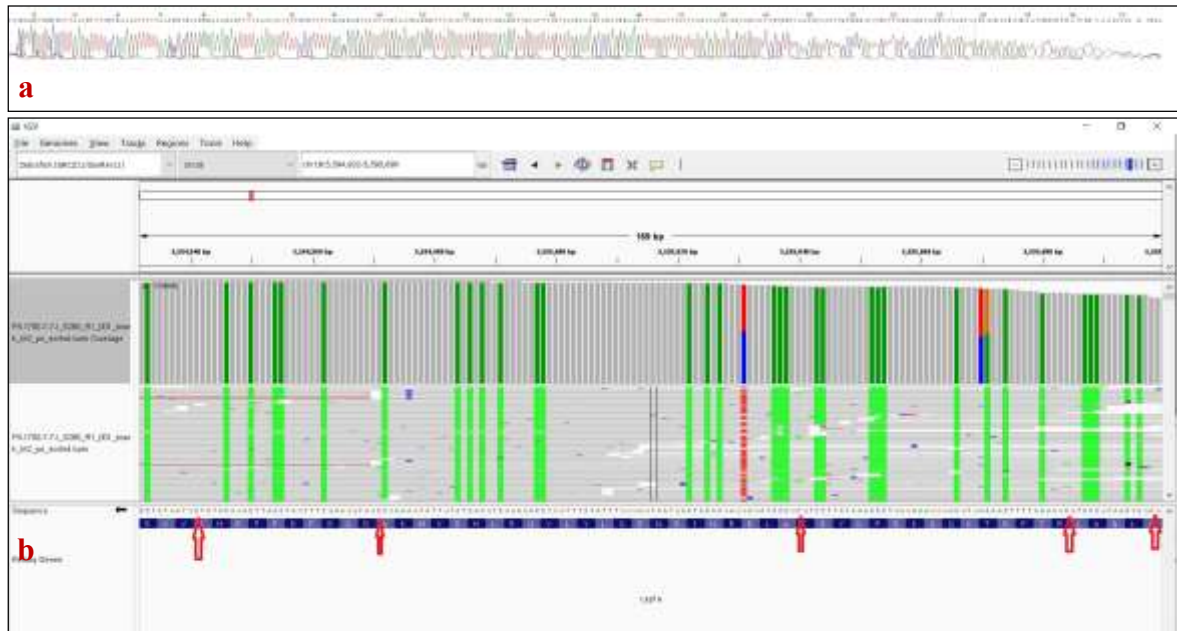
Zebra balıklarında siflutrinin 7. gün düşük doz uygulanmış (3,61 $\mu\text{g/L}$) örneğine ait mavi ile işaretli kısımlar metile sitozinleri göstermektedir. Kromozom 18 de meydana gelen *CYP1A* geni görüntüsü yer almaktadır (Resim 4.19.).



Resim 4.19. Siflutrinin 7. gün düşük dozlu *CYP1A* referans gen NGS görüntüsü

Bazı örneklerle ait sanger ve yeni nesil dizi analizi görüntülerinin karşılaştırılması

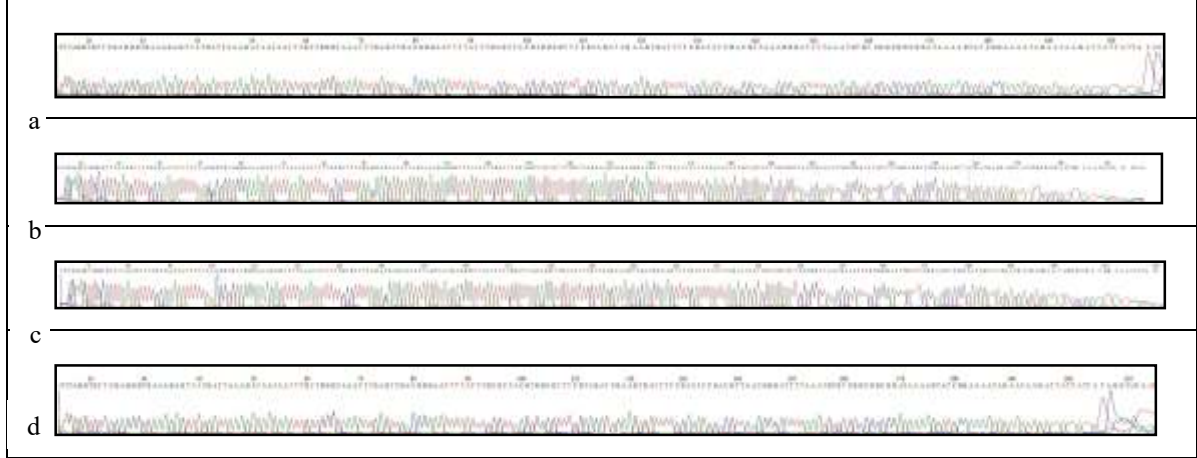
Kontrol grubu Sanger dizi analizinde metile sitozinler kırmızı ok işaretleri ile gösterilmiştir. Fipronilin 7. gün yüksek doz grubu örneğine ait Sanger dizileme (a) ve yeni nesil dizi analizinde (b) metile olan sitozinler Resim 4.20.'de verilmiştir.



Resim 4.20. Fipronilin 7 gün yüksek doz grubu örneğine ait sanger dizi (a) ve yeni nesil dizi analizinde (b) metile olan sitozinler

Farklı örneklere ait dört sanger görüntüsünün net olduğu, pik değerlerinin düzenli ve temiz bir görüntü elde edildiğine dair örnekler verilmiştir (Resim 4.23).

Görüntüleri temiz çıkan bazı örneklere ait sanger kromotogram görüntüleri;



Resim 4.23. Farklı örneklere ait temiz olarak elde edilmiş Sanger dizileme kromotogram bulguları (a. Kontrol grubu, b. Fipronil 7.gün yüksek doz, c. Siflutrin 96. saat düşük doz, d. Siflutrin 7. gün düşük doz).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada fipronil ve siflutrin maruziyetinin yaratabileceği olumsuz etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması hedeflenmiştir ve model organizma olarak yetişkin zebra balıkları tercih edilmiştir. Son yıllarda çevrede uzun süre kalıcı etkisi olan pestisitler yerine toksisitesi düşük neonikotinoid pestisitler ve sentetik piretroidler halk sağlığı ve tarımsal alanlarda tercih edilmektedir. Kullanılan bu pestisitler sucul canlıların yanı sıra hedef olmayan organizmaları da olumsuz etkileyebilmektedir. Toksik etkileri olduğu bilinen bu tür maddeler canlıların genetik yapılarını bozabileceğinden hem ekolojik hem de popülasyonun devamlılığı açısından risk oluşturmaktadır. Tarımda kullanılan bu tür maddeler yüzey suları yoluyla sucul canlılara ulaşmakta ve besin zinciri aracılığıyla da bu canlılarla beslenen diğer organizmaları etkilemektedir. Bu kirleticiler biyolojik birikim sonucunda besin zincirinin en üstündeki türlere kadar ulaşmaktadır. Dolayısıyla sadece balıklar değil insanlar da bu kirlilikten etkilenebilmektedir.

Çalışılan pestisitlerden fipronilin, omurgalı ve omurgasız canlılarda nörotoksik , sitotoksik ve hepatotoksik etkileri olduğu bilinmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda üreme sistemi ve nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. (Wang ve diğerleri, 2016). Etki mekanizmasına bakıldığında gama-amino bütirik asit, glutamat reseptörleri üzerine etki ederek memelilerde ve böceklerin sinir sistemlerinde klorür kanalını bloke etmektedir. Fipronil sucul organizmalarda oldukça toksiktir ve biyoakümülyasyona uğramaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda fipronilin sucul organizmalardaki toksisitesi 0.001-10.004 µg/L olarak rapor edilmiştir (Abd El Hakim ve diğerleri, 2019; Budd, Ensminger, Wang ve Goh, 2015; Mize, Porter ve Demcheck, 2008).

Çalışmamızda kullanılan diğer pestisit siflutrin ise; birçok böcek zararlısını kontrol etmek için evlerde, endüstriyel ve tarım alanlarında yaygın olarak uygulanan aktif bir sentetik pestisittir. Böceklerin kontrolünde, bahçelerde, evcil hayvanlar için, hayvancılıkta, sivrisinek kontrolünde ve halk sağlığı için gerekli pek çok alanda kullanılan nonsistemik böcek öldürücülerin aktif maddesidir (İla ve diğerleri, 2008; Verma ve diğerleri, 2021). Sodyum iyonlarının hücre zarından taşınma sürecini engelleyebilmektedir (Tiwari ve Bhatt, 2000). Bu tür pestisitlerle yapılan epigenetik çalışmalar çoğunlukla memelilerde yürütülmektedir ve çalışmalar esas olarak geri dönüşü olmayan etkilerin tetiklenebileceği erken gelişim aşamalarına odaklanmaktadır. Ancak balıklarla ilgili yapılan çalışmalar

sınırlıdır. Özellikle de endokrin bozucu kimyasallara maruziyet sonucunda epigenetik etkiler hakkında çok kısıtlı veri mevcuttur. Epigenetik modifikasyonlar, hücrel ve yaşamsal özellikleri sürdürebilmek için genetik mekanizmalarla iç içe geçmiştir (Frank-Bertoncelj, Klein ve Gay, 2017; Ji ve diğerleri, 2019).

Son yıllarda epigenetik modifikasyonlardan DNA metilasyon değişiklikleri ve çevresel toksikoloji arasındaki ilişkiyi açıklamak üzere yapılmış çalışmalara sıklıkla rastlanmaktadır (Bansal ve diğerleri, 2017; Brander, Biales ve Connon, 2017; Qian, Ji, Yue ve Zhao, 2019). Büyük oranda nörotoksik bir madde olarak bilinen fipronil memelilerden farelerin, sıçanların ve hatta insanların sinir sistemi üzerinde ciddi toksik etki oluşturmaktadır (Magalhães ve diğerleri, 2015). DNA metilasyon kalıplarının değiştirilmesi, DNA replikasyonu sırasında sabit bir şekilde kalıtsal hale gelebilir ve sonraki nesillere aktararak kalıcı toksik sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir (Szyf, 2011; Guerrero-Bosagna ve Skinner, 2012; Fang, Thornton, Scheffler ve Willett, 2013).

Zebra balıklarında DNA metilasyonu ile ilişkili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu embriyolar ve larvalar kullanılarak yapılmıştır (Dorts ve diğerleri, 2016; Corrales ve diğerleri, 2014). Mhanni ve McGowan, 2004; Segner, 2009). Ayrıca DNA metilasyonu düşük doz kimyasal kontaminasyonlar gibi dış ortamdan kaynaklanan değişikliklere veya uyarılara yanıt olan en hassas epigenetik modifikasyon kabul edilmektedir (Jones ve Takai, 2001; Tammen, Friso ve Choi, 2013). Çoğunlukla metil sitozin içeren bölgelerde gösterilen metilasyon pikleri, genom çapında DNA metilasyon durumunun analizi için anahtar parametreler olarak kullanılmaktadır (Hogart ve diğerleri, 2012). Zebra balığı embriyolarındaki DNA metilasyon kalıpları farelerdekine benzediğinden memeliler için epigenetik bir model olarak tercih edilmektedir. İlk başlarda tartışmalı olsa da memeliler gibi zebra balıklarının da embriyogenezin erken dönemlerinde genomda demetilasyona uğradığı ve bunu *de novo* metilasyonun izlediği yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur (Fang, Corrales, Thornton ve Willett, 2013; Feng ve diğerleri, 2010; Head, Mittal ve Basu, 2014).

Genom içinde, CpG adaları olarak adlandırılan yüksek göreceli CpG yoğunluğuna sahip bölgeler bulunmaktadır. Transkripsiyon başlangıç bölgelerinin yakınında bulunduklarında, genellikle metillenmezler ve transkripsiyonel olarak izin verici bir kromatin durumuna geçerler (Falisse ve diğerleri, 2018, Head, Mittal ve Basu, 2014). Memelilerde DNA metilasyonunun ağırlıklı olarak CpG dinükleotidlerinde gerçekleştiği düşünülmektedir;

ancak embriyonik kök hücrelerde belirli bir miktarda CpG dışı metilasyon gösterilmiştir (Lister ve Ecker, 2009). Metilasyon hem simetrik CpG veya CHG hem de asimetrik CHH bölgelerinde (H'nin A, T veya C olabileceği) oldukça yaygındır (Feng ve diğerleri, 2010; Law ve Jacobsen, 2010). Farklı dizilerde veya model organizmalarda meydana gelen metilasyon analizini mümkün kılmak için, Bismark'taki metilasyon sonuçları çevredeki dizileri dikkate alır ve CpG, CHG ve CHH bölgelerinde sitozinler arasında ayırım yapmaktadır.

Balıklarda, *CYP1A* alt ailesi, özellikle pestisitler olmak üzere eksojen kimyasalların metabolizmasında önemli rollere sahiptir ve su ortamının kontaminasyonunu değerlendirmek için bir biyobelirteç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Wang ve diğerleri, 2016; Sarasquete ve Segner, 2000). Balıklarda fipronil metabolizması, sitokrom P450 ile ilişkili enzimler tarafından katalize edilen ve farklı fipronil metabolitleri üreten oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile gerçekleşir (Konwick, Fisk, Garrison, Avants ve Black, 2005; Wang ve diğerleri, 2016; Li, You ve Wang, 2018). CYP gen süper ailesi, tipik olarak moleküler oksijen ve eşdeğer sayıda elektron içeren mono-oksijenaz reaksiyonlarını katalize eden P450 enzimlerini kodlayan çok sayıda genden oluşur. Bu enzimler ilaçlar, kimyasal karsinojenler ve çevresel kirleticiler gibi eksojen kimyasalların detoksifikasyonunda ve steroidler, yağ asitleri, vitaminler ve prostanooidler gibi endojen substratların metabolizmasında rol oynar (Uno, Ishizuka ve Itakura, 2012). Bu metabolitler böcekler, memeliler, sucul organizmalar ve kuşlar için toksik olabilmektedir (Leghait ve diğerleri, 2009). Fipronilin CYP ile ilişkili aktiviteler üzerindeki etkileri tartışmalıdır; örneğin, insan hepatositleri ile yapılan *in vitro* çalışmalar (Das, Cao, Cherrington, Hodgson ve Rose, 2006) düşük konsantrasyonlarda (1 µM) *CYP1A1* ile ilişkili aktivitede bir artış ve daha yüksek konsantrasyonlarda (10 ve 25 µM) bir azalma olduğunu ileri sürmüştür. CYP ile ilişkili bu aktivite, zebra balığında su kaynaklı fipronil maruziyetine yanıt veren tek aktivite olup, maruziyetten 24 saat sonra çeşitli dokularda doza bağlı bir değişim göstermiştir (Wu, Lu, J., Lu, H., Lin ve Wilson, 2015). *Rutilus kutum* ile yapılan yeni bir çalışmada, *CYP1A* gen ekspresyonu ile karaciğer de dahil olmak üzere çeşitli dokulardaki farklı antioksidan tepkiler arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Çalışma, fipronil enjeksiyonundan sonra *CYP1A* gen ekspresyonundaki artışın, bazı aril hidrokarbon reseptör agonistleri arasındaki yapısal benzerliklerden kaynaklanabileceğini öne sürmüştür (Ardeshir, Zolghamein, Movahedinia, Salamat ve Zabihi, 2018). Son zamanlarda yüksek doz fipronilin enantioselektif bir şekilde DNA metilasyonunu indükleyerek zebra balığının

erken evresinde önemli enantiyoselektif gelişimsel toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir (Qian ve diğerleri, 2017). Çalışmamızda ise *CYP1A* gen sonuçları *HSP70* gen sonuçları ile karşılaştırıldığında, *HSP70* genine göre metilasyon oranı daha yüksek ve yoğunluk olarak bazlarda meydana gelen metile sitozinlerde kümeleşmeler görülmektedir. *HSP70* gen ailesi ise, ısı şoku proteinleri arasında en çok çalışılan olup bu ailenin üyeleri tüm hücre içi kompartmanlarda bulunur ve bu konumlarda protein katlanması ve translokasyonunda önemli bir rol oynamaktadırlar. Omurgalılarda, *HSP70* gen ailesi hem stresle indüklenebilir hem de konstitütif olarak ifade edilen üyelerden oluşmaktadır (Krone, Evans ve Blechinger, 2003). Bu gen çalışma sonuçlarında ise yeni nesil dizileme siflutrin grubunda fipronil grubuna göre daha az metilasyon meydana geldiği söylenebilmektedir. Bu iki pestisit için Sanger dizileme sonuçlarına bakıldığında ise sonuçların benzer olduğu görülmektedir.

Yapılan araştırmada 7 gün bisfenol A (BPA)'ya maruz bırakılan zebra balıkları testis ve yumurtalıklarında DNA metilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir (Liu ve diğerleri, 2016). Bouwmeester ve diğerleri (2016) ise yaptıkları çalışmada zebra balığı embriyolarının farklı ksenobiyotiklere maruz bırakıldıktan sonra çeşitli genlerinde metilasyon modifikasyonları olduğunu bildirmiş fakat global DNA metilasyonun da herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Monofitalata maruz bırakılan zebra balıklarının belirli bölgelerinde DNA metilasyonunda potansiyel olarak bir sonraki nesillere aktarılan modifikasyonlara rastlanmıştır (Kamstra, Sales, Aleström ve Legler, 2017; Falisse ve diğerleri, 2018). Diğer bir çalışmada ise 17 α -ethinylestradiol (EE2)'e maruz bırakılan zebra balıklarının DNA metilasyon seviyelerinde değişiklik olduğu belirtilmiştir. Yetişkin zebra balıklarında, 14 gün boyunca 0,34 nM EE2'e maruz kalmanın ardından karaciğerde vitellogenin gen promotörünün demetilasyonu gözlenmiştir (Kamstra, Aleström, Kooter ve Legler ve diğerleri, 2015). Tüm çalışmalar göz önüne alındığında balıklar üzerindeki toksikolojik çalışmalar epigenetik değişiklikleri göstermektedir (Strömqvist ve diğerleri, 2010; Dolinoy, Weidman ve Jirtle, 2007). İyi çalışılmış bir fitoöstrojen olan genisteinin DNA metiltransferazlar üzerinde etkileri olduğu bildirilmiştir (Casati, Sendra, Sibilis ve Celotti, 2015). Sentetik bir östrojen olan dietilstilbestrol ve plastikleştirici olarak kullanılan bisfenol A'nın, DNA metilasyonunu etkiledikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Casati ve diğerleri, 2012). Dioksin sınıfından olan 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksinin (TCDD) zebra balıklarında DNA metilasyonunu ve gen spesifik DNA metilasyonuna neden olduğu vurgulanmıştır (Aluru ve diğerleri, 2015). Endokrin bozucu kimyasal olarak kabul edilen vinklozolin, anti-androjenik aktiviteye sahip

olup tarımda da çoğunlukla tercih edilmektedir. Nesiller arası fenotipleri belirleyebilmek için epigenetik deneysel çalışmalarda kullanılmıştır (Wong, Dynlacht, Cedervall ve Dewey, 1995). Kiral insektisit olan fipronil, son 20 yıldır pirinç, pamuk ve mısır mahsullerinin yanı sıra konutlarda böcek kontrolünde yaygın olarak kullanılmıştır. Fipronil kullanımından fayda sağlanmış olsa da sucul çevre için risk oluşturabilmektedir (Konwick, Garrison, Black, Avants ve Fisk, 2006).

Yapılan çalışmalarda ksenobiyotiklere maruz kalma ile epigenetik etkinin uyarılması arasındaki ilişki incelenmektedir ve birçok toksik maddenin epigenetik mekanizmaları değiştirme potansiyeli olduğu ortaya konulmuştur (Liu, Li ve Tollefsbol, 2008). Epoksi reçineler ve polikarbonat plastiklerin üretiminde kullanılan bir kimyasal olan Bisfenol A, yüzme gibi davranışsal parametrelerde değişikliklere neden olmuştur. Bu tür değişiklikler, sinir sistemiyle ilgili genlerin metilasyon modellerindeki değişikliklere bağlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada 100; 200; 400; 800 µg/L konsantrasyonlarda fipronil'in epigenetik etkilerinin araştırılması, zebra balığı gelişimini içeren genlerin deregülasyonunun, bileşik tarafından indüklenen hipermetilasyonlarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Braga ve diğerleri, 2024; Qian ve diğerleri, 2017).

Bisfenol A çevresel olarak uygun konsantrasyonlarda zebra balığı larvalarında global ve gene özgü DNA metilasyon durumu için bir demetilasyon ajanı olarak çalışılmaktadır. BaP, *rassf1*, *tert*, *c-jun* ve *c-myc*'da gen spesifik metilasyon kaybına neden olmamıştır, ancak vasa promotöründeki DNA metilasyonunu önemli ölçüde azaltmış ve ardından çevresel olarak ilgili konsantrasyonlarda vasa mRNA ekspresyonunu artırmıştır. Yaşamın erken dönemlerinde BaP kaynaklı DNA hipometilasyonunun neden olduğu uzun vadeli fenotipik değişiklikleri değerlendirmek için gelecekteki çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Fang, Thornton, Scheffler ve Willett, 2013). Yapılan bir çalışmada zebra balıkları 7 gün ve 35 gün boyunca 15 µg/L Bisfenol A'ya maruz bırakılmış. BPA'nın zebra balığı gonadlarındaki epigenetik modifikasyon üzerindeki etkileri ELISA ve kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemiyle çalışılmıştır. Bisfenol A maruziyetinin hem yumurtalıklarda hem de testislerde global DNA metilasyonunda önemli bir düşüşe neden olduğu bulunmuştur. Bu araştırmada önemli olan BPA'nın potansiyel üreme toksisitesine ve zebra balığındaki epigenetik düzenleme üzerindeki etkisine öncülük etmesidir. DNA metilasyonunun endokrin bozucu kimyasallara maruz kaldıktan sonra gen ekspresyonu ve sinyal iletimindeki değişikliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir (Liu ve diğerleri, 2016). Arseniğe (As) maruz

bırakılan zebra balıklarında, kuyruk ve gövdelerinde anormal bir DNA metilasyon deseni gözlemlenmiştir. Özellikle, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 24 saat sonra hipometilasyon ve 48 saat sonra ise hipermetilasyon gözlemlenmiştir (Li ve diğerleri, 2009). Bizim çalışmamızda ise 96 saat pestisit uygulanması sonucunda hipometilasyon gözlenirken, 7 gün pestisit uygulanan gruplarda hipermetilasyon gözlenmiştir.

Çalışmamızın genel olarak sonuçlarına baktığımızda ise siflutrin ve fipronil için Sanger dizileme metilasyon yüzdeleri gruplara göre ayrı ayrı hesaplanmış ve Grup 1 (Kontrol) yüzdesi 28,36; Grup 2 (fipronil 7. gün düşük doz) 26,73; Grup 3 (fipronil 7. gün yüksek doz) 27,65 olarak belirlenmiştir. Siflutrin pestisit gruplarında ise Grup 4 (siflutrin 96. saat düşük doz) 27,26; Grup 5 (siflutrin 96. saat yüksek doz) 28,31; Grup 6 (siflutrin 7. gün düşük doz) 28,26 ve Grup 7 (siflutrin 7. gün yüksek doz) 28,22 olarak verilmiştir. Yeni nesil dizi analizi sonuçlarında ise metilasyon seviyelerine göre CG, CHG VE CHH bölgelerinde ve body, upstream (5') ve downstream (3') gruplar arasında anlamlı fark olduğu gözlenmiştir. Fipronil pestisitine 7 gün maruz bırakılan gruplarda yüzde ve Sanger dizileme görüntüleri incelendiğinde CG oranlarına bakılarak hipometilasyon meydana geldiği söylenebilmektedir. Fakat siflutrin pestisitinin uygulandığı gruplarda ise kontrol grubuyla CG ortalama değerleri ile birbirine yakın değerlerin çıktığı görülmektedir. Fipronil ile karşılaştırıldığında ise siflutrinin hipermetilasyona neden olduğu görülmektedir. Siflutrin sonuçlarına bakıldığında ise fipronile kıyasla meydana gelen metile sitozin yüzdesi artmıştır. Yapılan çalışmalar sınırlı olfduğu için iki pestisit ve diğer pestisitlerle ilgili yapılacak araştırmalar önem kazanmaktadır.

Geçmişten günümüze kadar çevresel faktörlerin biyolojik süreçler üzerindeki rolü uzun yıllardır araştırılmaktadır. Endokrin bozucu kimyasallar günümüzde insan sağlığı açısından tehdit unsuru oluşturan önemli maddelerdir ve nesiller boyu etkileri, genomun epigenetik etiketinin altında yatan bir mekanizma olarak gösterilmiştir (Chang, Anway, Rekow ve Skinner 2006). Çevresel toksikoloji kapsamında DNA metilasyonunun incelenmesi, çevredeki bu zararlı kimyasalların etkilerinin moleküler mekanizmaları hakkında önemli veriler sağlayabilmektedir. Bunun sonucunda ise insan sağlığı üzerindeki olası etkilerini en aza indirgeyebilme yollarının geliştirilmesine katkıda bulunabilmektedir. Çevresel faktörler fenotip oluşum sürecinde yaşamın ilerleyen süreçlerinde gen ifadesinin uzun vadeli düzenlenmesini etkilemektedir. Örneğin, çevresel etkenlerden kaynaklanan epigenetik değişiklikler, obezite, üreme kusurları ve son yıllarda ciddi artış gösteren kanser gibi

hastalıklara yol açan fenotipik sonuçlara sahiptir. DNA metilasyonunun, özellikle nörolojik süreçlerde yer alan belirli sinyal yollarıyla ilgili genlerde düzensizleşmesi, erişkin, embriyonik ve larva zebra balıklarında gözlenen anksiyete benzeri davranışlara ve nörotoksik etkilere katkıda bulunabilmektedir. Bu epigenetik mekanizmaların anlaşılması, fipronil kaynaklı nörotoksisitenin altında yatan moleküler yollar hakkında bilgi sağlayabilir ve olumsuz etkilerini hafifletmek için potansiyel hedefler sunabilir (Qian, Ji, Yue ve Zhao, 2019).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda artan nüfus ile birlikte, tarımsal üretimden maksimum verim sağlayabilmek için tarım alanlarında gübre ve zirai ilaçların kullanımı artık kaçınılmaz olmuştur. Modern kimya endüstrisinin de gelişmesiyle birlikte tarım alanında özellikle ürün kalitesini ve miktarını artırmaya yönelik doğada doğal olarak parçalanamayan birçok pestisit üretilmiştir. Tarım ilaçlarının aşırı ve bilinçsiz kullanımının önlenmesi için Entegre Pestisit Yönetimi, Zararlılarla Entegre Mücadele, Entegre Ürün Yönetimi ve İyi Tarım Uygulamaları gibi yöntemlerin uygulanması pestisit kirliliğini kaynağında önleyebilmek açısından faydalıdır.

Pestisitlerle ilgili yapılan çalışmalar insan ve doğaya verdiği zararlarla ilgili olup bu konuda yapılacak araştırmalar önemlidir. Tüm canlılar için hayati bir öneme sahip olan su düşünüldüğünde bu alanlardaki etkileri araştırılıp gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Epigenetik, teknolojinin ilerlemesi sayesinde DNA metilasyon çalışmalarında da artış gözlenmiştir. Özellikle de 2000'li yıllardan itibaren yeni nesil dizileme yöntemlerinin başlatılması, ulaşılabilirlik ve verimliliği büyük ölçüde artırmıştır. Bu da bisülfid bazlı teknolojilerin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Karmaşık bir ekosistem olan su ortamı, suda yaşayan organizmalarla etkileşime giren çok sayıda abiyotik ve biyotik stres etkeni içermektedir. Bu stres etkilerine uyum sağlamak için suda yaşayan organizmalar, genlerinin ekspresyon profillerini ve fonksiyonlarını önemli ölçüde değiştirerek fenotip plastisitesinin epigenetik evrimini destekleyen ana tepki stratejilerinden biri olarak genotip-çevre etkileşimlerini uygulamaktadır.

Siflutrin ve fipronil ürünleri dünyada yaygın olarak kullanılan böcek ilaçları arasında yer almaktadır ve son yıllarda haşere kontrolü için kullanılan maddeler arasında oldukça popüler hale gelmiştir. Bu maddeler sucul yaşam, özellikle de balıklar için oldukça toksiktir. Pestisitler doğrudan veya dolaylı olarak alıcı sulara deşarj edilmektedir ve bu kimyasalların çevredeki varlığı küresel bir sorun haline gelmiştir. Kirleticilere maruz kalmanın DNA metilasyonu üzerindeki kalıtsal etkilerini incelemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulsa da, son veriler zebra balığının çevresel epigenetikte bir model olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar, DNA metilasyon modifikasyonlarının çevreden etkilenmeye yatkın olduğunu ve aynı zamanda pestisit maruziyetinin metilasyon modifikasyonlarına neden olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Metilasyon

da dahil olmak üzere epigenetik modifikasyonlar hala gelişmekte olan bir araştırma alanıdır. Pestisit maruziyetinin neden olduğu DNA metilasyon modifikasyonları, pestisit kaynaklı toksisitenin ortaya çıkmasından sorumlu mekanizmaları anlamamıza yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Özellikle de Sanger dizileme ve yeni nesil dizileme gibi yeni nesil teknolojilerin kullanılarak bu alanda elde edilecek verilere katkı sağlanmalıdır. Epigenetik modifikasyonların pestisit maruziyeti ve sağlık etkileri arasında nedensel bir bağlantı olarak hareket edip edemeyeceğini veya daha ziyade maruziyetin hassas bir belirteci olup olmadığını değerlendirmek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Bu çalışma ile fipronil ve siflutrin pestisitlerinin model bir organizma olan zebra balıklarında metilasyon düzeyinde etkilerinin olup olmadığı ortaya konulmuştur. Kullanımları gittikçe artan bu maddelerin sucul organizmalar aracılığıyla insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin araştırılması bakımından önem arz etmektedir ve olası zararların önlenmesi için bu alanda yapılacak çalışmalar artırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abbas, N., Perbellini, F., Thum, T. (2020). Non-coding RNAs: emerging players in cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. *Basic Research in Cardiology*, 115, 1-20.
- Abubakar, Y., Tijjani, H., Egbuna, C., Adetunji, C. O., Kala, S., Kryeziu, T. L., Ifemeje J.C ve Patrick-Iwuanyanwu, K. C. (2020). Pesticides, history, and classification. In *Natural remedies for pest, disease and weed control* (29-42).
- Abd El Hakim, Y., Neamat-Allah, A. N., Baeshen, M., Ali, H. A. (2019). Immune-protective, antioxidant and relative genes expression impacts of β -glucan against fipronil toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 94, 427-433.
- Açıkgöz, Z., Güneş, H. Y. (2019). Yumurta Tavukçuluğunda Kanatlı Kırmızı Akarı (*Dermanyssus gallinae*) Problemi ve Mücadele. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 56(4), 553-560.
- Kavsaoğlu, A. R., Mersinkaya, İ. (2019). Python ile Mini Jel Elektroforez Kontrol Yazılımı ve Sistem Tasarımı. *Gazi University Journal of Science Part C: Design and Technology*, 7(4), 969-984.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). The Molecular Genetic Mechanisms That Create Specialized Cell Types. In *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science.
- Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P., Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(2), 115-133.
- Aluru, N., Karchner, S. I., Franks, D. G., Nacci, D., Champlin, D., Hahn, M. E. (2015). Targeted mutagenesis of aryl hydrocarbon receptor 2a and 2b genes in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic Toxicology*, 158, 192-201.
- Amir, S., Shah, S. T. A., Mamoulakis, C., Docea, A. O., Kalantzi, O. I., Zachariou, A., Calina D., Carvalho F., Sofikitis N., Makrigiannakis A., Tsatsakis, A. (2021). Endocrine disruptors acting on estrogen and androgen pathways cause reproductive disorders through multiple mechanisms: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1464.
- Annamalai, J., Namasivayam, V. (2015). Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environment International*, 76, 78-97.
- Ardesir, R. A., Zolgharnein, H., Movahedinia, A., Salamat, N., Zabihi, E. (2018). CYP1A gene expression as a basic factor for fipronil toxicity in Caspian kutum fish. *Toxicology Reports*, 5, 113-124.
- Arı, Ş., Arikan, M. (2016). Next-generation sequencing: advantages, disadvantages, and future. *Plant omics: Trends and Applications*, 109-135.

- Arsenescu, V., Arsenescu, R. I., King, V., Swanson, H., Cassis, L. A. (2008). Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environmental Health Perspectives*, 116(6), 761-768.
- Arslan, P., Günal, A. Ç. (2023). Does Fipronil Affect on Aquatic Organisms? Physiological, Biochemical, and Histopathological Alterations of Non-Target Freshwater Mussel Species. *Water*, 15(2), 334.
- Atreya, K. (2008). Health costs from short-term exposure to pesticides in Nepal. *Social Science & Medicine*, 67(4), 511-519.
- Azzouz, A., Colón, L. P., Souhail, B., Ballesteros, E. (2019). A multi-residue method for GC-MS determination of selected endocrine disrupting chemicals in fish and seafood from European and North African markets. *Environmental Research*, 178, 108727.
- Bansal, V., Gassenhuber, J., Phillips, T., Oliveira, G., Harbaugh, R., Villarasa, N., Topol, E. J., Seufferlein, T., Boehm, B. O. (2017). Spectrum of mutations in monogenic diabetes genes identified from high-throughput DNA sequencing of 6888 individuals. *BMC Medicine*, 15(1), 1-14.
- Baylin, S. B., Jones, P. A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, 11(10), 726-734.
- Bencic, D. C., Villeneuve, D. L., Biales, A. D., Blake, L., Durhan, E. J., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Martinovic-Weigelt, D., Ankley, G. T. (2013). Effects of the insecticide fipronil on reproductive endocrinology in the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(8), 1828-1834.
- Benli, A. C. K. (2005). Investigation of acute toxicity of cyfluthrin on tilapia fry (*Oreochromis niloticus* L. 1758). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(2), 279-282.
- Bernardes, M. F. F., Pazin, M., Pereira, L. C., Dorta, D. J. (2015). Impact of pesticides on environmental and human health. *Toxicology Studies-Cells, Drugs and Environment*, 195-233.
- Bhatt, P., Gangola, S., Ramola, S., Bilal, M., Bhatt, K., Huang, Y., Zhou, Z., Chen, S. (2023). Insights into the toxicity and biodegradation of fipronil in contaminated environment. *Microbiological Research*, 266, 127247.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6-21.
- Blohm, D. H., Guiseppi-Elie, A. (2001). New developments in microarray technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(1), 41-47.
- Bouwmeester, M. C., Ruiter, S., Lommelaars, T., Sippel, J., Hodemaekers, H. M., van den Brandhof, E. J., Pennings, L.A., Kamstra, J. H., Jelinek, J., Issa, J-P, J., Legler, J., van der Ven, L. T. (2016). Zebrafish embryos as a screen for DNA methylation modifications after compound exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 291, 84-96.

- Bradbury, S. P., Coats, J. R. (1989). Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 133-177.
- Braga, A. P. A., Souza, L. R. D., Lima, M. G. F., Cruz, J. M., Souza, A. C. Z. D., Costa, M. S., Castro, V. L.S. Z., Marin-Morales, M. A. (2024). The Zebrafish as an Alternative Animal Model for Ecotoxicological Research and Testing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67.
- Brander, S. M., Biales, A. D., Connon, R. E. (2017). The role of epigenomics in aquatic toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(10), 2565-2573.
- Bourguignon, J. P., Slama, R., Bergman, Å., Demeneix, B., Ivell, R., Kortenkamp, A., Pnzica G. C., Trasande L., Zoeller, R. T. (2016). Science-based regulation of endocrine disrupting chemicals in Europe: which approach?. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 4(8), 643-646.
- Budd, R., Ensminger, M., Wang, D., Goh, K. S. (2015). Monitoring fipronil and degradates in California surface waters, 2008–2013. *Journal of Environmental Quality*, 44(4), 1233-1240.
- Butte, A. J., Dzau, V. J., Glueck, S. B. (2001). Further defining housekeeping, or “maintenance,” genes Focus on “A compendium of gene expression in normal human tissues”. *Physiological Genomics*, 7(2), 95-96.
- Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., L Freeman, J. (2016). Toxicogenomics to evaluate endocrine disrupting effects of environmental chemicals using the zebrafish model. *Current Genomics*, 17(6), 515-527.
- Cavalieri, V., Spinelli, G. (2017). Environmental epigenetics in zebrafish. *Epigenetics & Chromatin*, 10, 1-11.
- Casadei, R., Pelleri, M. C., Vitale, L., Facchin, F., Lenzi, L., Canaider, S., Strippoli, P., Frabetti, F. (2011). Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 11(3-4), 271-276.
- Casati, L., Sendra, R., Colciago, A., Negri-Cesi, P., Berdasco, M., Esteller, M., Celotti, F. (2012). Polychlorinated biphenyls affect histone modification pattern in early development of rats: a role for androgen receptor-dependent modulation? *Epigenomics*, 4(1), 101-112.
- Casati, L., Sendra, R., Sibilía, V., Celotti, F. (2015). Endocrine disrupters: the new players able to affect the epigenome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3, 37.
- Ceyhun, S. B., Şentürk, M., Ekinci, D., Erdoğan, O., Çiltaş, A., Kocaman, E. M. (2010). Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(2), 215-223.
- Ceyhun, S. B., Aksakal, E., Kırım, B., Atabeyoğlu, K., Erdoğan, O. (2012). Chronic toxicity of pesticides to the mRNA expression levels of metallothioneins and cytochrome P450 1A genes in rainbow trout. *Toxicology and Industrial Health*, 28(2), 162-169.

- Chang, H. S., Anway, M. D., Rekow, S. S., Skinner, M. K. (2006). Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology*, 147(12), 5524-5541.
- Chen, W. Y., John, J. A. C., Lin, C. H., Lin, H. F., Wu, S. C., Lin, C. H., Chang, C. Y. (2004). Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 69(3), 215-227.
- Cho, C. W., Pham, T. P. T., Zhao, Y., Stolte, S., Yun, Y. S. (2021). Review of the toxic effects of ionic liquids. *Science of The Total Environment*, 786, 147309.
- Clasen, B., Loro, V. L., Cattaneo, R., Moraes, B., Lopes, T., de Avila, L. A., Zanella, R., Boschmann, Reimche, G., Baldisserotto, B. (2012). Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice– fish cultivation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 77, 45-51.
- Colborn, T., Vom Saal, F. S., Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101(5), 378-384.
- Collotta, M., Bertazzi, P. A., Bollati, V. (2013). Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, 307, 35-41.
- Cornet, C., Calzolari, S., Miñana-Prieto, R., Dyballa, S., Van Doornmalen, E., Rutjes, H., Savy, T., D'Amico, D., Terriente, J. (2017). ZeGlobalTox: an innovative approach to address organ drug toxicity using zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 864.
- Corrales, J., Fang, X., Thornton, C., Mei, W., Barbazuk, W.B., Duke, M., Scheffler B.E. ve Willett, K.L. (2014). Effects on specific promoter DNA methylation in zebrafish embryos and larvae following benzo [a] pyrene exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 163, 37-46.
- Cortessis, V. K., Thomas, D. C., Levine, A. J., Breton, C. V., Mack, T. M., Siegmund, K. D., Haile, R. V., ve Laird, P. W. (2012). Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure–response relationships. *Human Genetics*, 131, 1565-1589.
- Costa, L. G. (2008). Toxic effects of pesticides. *Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons*, 8, 883-930.
- Crain, D. A., Guillette Jr, L. J., Rooney, A. A., ve Pickford, D. B. (1997). Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environmental Health Perspectives*, 105(5), 528-533.
- Cui, J., Tian, S., Gu, Y., Wu, X., Wang, L., Wang, J., Chen, X., ve Meng, Z. (2023). Toxicity effects of pesticides based on zebrafish (*Danio rerio*) models: Advances and perspectives. *Chemosphere*, 139825.

- Damalas, C. A., Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402-1419.
- Danielson, P. Á. (2002). The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism*, 3(6), 561-597.
- Das, P. C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., ve Rose, R. L. (2006). Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 164(3), 200-214.
- D'costa, A., Shepherd, I. T. (2009). Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish*, 6(2), 169-177.
- Deane, E. E., Woo, N. Y. (2011). Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21, 153-185.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., ve Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37(1), 112-119.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller T., ve Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293-342.
- Doğan, M. V., Beach, S. R., Philibert, R. A. (2017). Genetically contextual effects of smoking on genome wide DNA methylation. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 174(6), 595-607.
- Dolinoy, D. C., Weidman, J. R., Jirtle, R. L. (2007). Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reproductive toxicology*, 23(3), 297-307.
- Dooley, K., Zon, L. I. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(3), 252-256.
- Dorrington, T., Zanette, J., Zacchi, F. L., Stegeman, J. J., ve Bainy, A. C. (2012). Basal and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*. *Aquatic Toxicology*, 124, 106-113.
- Dorts, J., Falisse, E., Schoofs, E., Flamion, E., Kestemont, P., ve Silvestre, F. (2016). DNA methyltransferases and stress-related genes expression in zebrafish larvae after exposure to heat and copper during reprogramming of DNA methylation. *Scientific Reports*, 6(1), 34254.
- Eadie, A., Vasquez, I. C., Liang, X., Wang, X., Souders II, C. L., El Chehouri, J., Hoskote, R., Feswick, A., Cowie, A.M., Loughery, J.R., ve Martyniuk, C. J. (2020). Residual molecular and behavioral effects of the phenylpyrazole pesticide fipronil in larval zebrafish (*Danio rerio*) following a pulse embryonic exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 36, 100743.

- Erdoğan, O., Atamanalp, M., Sisman, T., Aksakal, E., ve Alak, G. (2007). Effects of 2, 2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (DDVP) on *Hsp70* gene expression in rainbow trout.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2006). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil. *EFSA Journal*, 4(5), 65.
- Engvall, E., Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The Journal of Immunology*, 109(1), 129-135.
- Fakruddin, M. D., Chowdhury, A. (2012). Pyrosequencing an alternative to traditional Sanger sequencing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(1), 14-20.
- Falisse, E., Ducos, B., Stockwell, P. A., Morison, I. M., Chatterjee, A., ve Silvestre, F. (2018). DNA methylation and gene expression alterations in zebrafish early-life stages exposed to the antibacterial agent triclosan. *Environmental Pollution*, 243, 1867-1877.
- Fan, K., Moore, J. E., Zhang, X. O., ve Weng, Z. (2021). Genetic and epigenetic features of promoters with ubiquitous chromatin accessibility support ubiquitous transcription of cell-essential genes. *Nucleic Acids Research*, 49(10), 5705-5725.
- Fang, X., Thornton, C., Scheffler, B. E., ve Willett, K. L. (2013). Benzo [a] pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(1), 40-50.
- Fang, S., Zhang, L., Guo, J., Niu, Y., Wu, Y., Li, H., Zhao, L. H., Yuan, X., Teng, X. Y., Sun, X. H., Sun, L., Zhang, M. Q., Chen, R. S., ve Zhao, Y. (2018). NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D308-D314.
- Farre, D., Bellora, N., Mularoni, L., Messeguer, X., ve Albà, M. M. (2007). Housekeeping genes tend to show reduced upstream sequence conservation. *Genome Biology*, 8, 1-10.
- Feng, S., Cokus, S. J., Zhang, X., Chen, P. Y., Bostick, M., Goll, M. G., Hetzel, J., Jain, J., Strauss, S. H., Ukomadu, C., Sadler, K. C., Pradhan, S., Pellegrin, M., ve Jacobsen, S. E. (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8689-8694.
- Fishel, F. M. (2005). Restricted use pesticides. *On-line. Retrieved October*, 31, 2006.
- Fisher, T., Crane, M., Callaghan, A. (2003). Induction of cytochrome P-450 activity in individual *Chironomus riparius* Meigen larvae exposed to xenobiotics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(1), 1-6.
- Floyd, E. Y., Geist, J. P., Werner, I. (2008). Acute, sublethal exposure to a pyrethroid insecticide alters behavior, growth, and predation risk in larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(8), 1780-1787.
- Frank-Bertoncelj, M., Klein, K., Gay, S. (2017). Interplay between genetic and epigenetic mechanisms in rheumatoid arthritis. *Epigenomics*, 9(4), 493-504.

- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., ve Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010.
- Gaaied, S., Oliveira, M., Le Bihanic, F., Cachot, J., ve Banni, M. (2019). Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. *Chemosphere*, 224, 289-297.
- Gálvez-Ontiveros, Y., Páez, S., Monteagudo, C., ve Rivas, A. (2020). Endocrine disruptors in food: impact on gut microbiota and metabolic diseases. *Nutrients*, 12(4), 1158.
- Gao, R., Wang, C., Gao, Y., Xiu, W., Chen, J., Kou, X., Zhao, Y., Liao, Y., Bai, D., Qiao, Z., Yang, L., Wang, M., Zang, R., Liu, X., Jia, Y., Wang, H., Wan, X., Liu, W., Zhang, Y., ve Gaol, S. (2018). Inhibition of aberrant DNA re-methylation improves post-implantation development of somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Stem Cell*, 23(3), 426-435.
- Gjernes, M. H., Schlenk, D., Arukwe, A. (2012). Estrogen receptor-hijacking by dioxin-like 3, 3' 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB126) in salmon hepatocytes involves both receptor activation and receptor protein stability. *Aquatic Toxicology*, 124, 197-208.
- Glinski, D. A., Purucker, S. T., Van Meter, R. J., Black, M. C., ve Henderson, W. M. (2018). Analysis of pesticides in surface water, streamflow, and throughfall in an agricultural area in South Georgia, USA. *Chemosphere*, 209, 496-507.
- Gooding, M. P., Wilson, V. S., Folmar, L. C., Marcovich, D. T., ve LeBlanc, G. A. (2003). The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environmental Health Perspectives*, 111(4), 426-430.
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari J., ve Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), E1-E150.
- Greally, J. M., Jacobs, M. N. (2013). In vitro and in vivo testing methods of epigenomic endpoints for evaluating endocrine disruptors. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 30(4), 445-471.
- Greco, C. M., Condorelli, G. (2015). Epigenetic modifications and noncoding RNAs in cardiac hypertrophy and failure. *Nature Reviews Cardiology*, 12(8), 488-497.
- Guo, H., Deng, Y., Yao, Z., Yang, Z., Wang, J., Lin, C., ve Tang, C. Y. (2017). A highly selective surface coating for enhanced membrane rejection of endocrine disrupting compounds: Mechanistic insights and implications. *Water Research*, 121, 197-203.
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K., ve Chowdhuri, D. K. (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far?. *Life Sciences*, 86(11-12), 377-384.
- Guerrero-Bosagna, C., Skinner, M. K. (2012). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354(1-2), 3-8.

- Hasan, S., Asakawa, S., Watabe, S., ve Kinoshita, S. (2021). Regulation of the Expression of the Myosin Heavy Chain (MYH) Gene myh14 in Zebrafish Development. *Marine Biotechnology*, 23, 821-835.
- Hassanein, H. M. A., Banhawey, M. A., Soliman, F. M., Abdel-Rehim, S. A., Müller, W. E. G., ve Schröder, H. C. (1999). Induction of *Hsp70* by the herbicide oxyfluorfen (Goal) in the Egyptian Nile fish, *Oreochromis niloticus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 78-84.
- Hassanain, M. A., Abdel-Rahman, E. H., Abo-Hegab, S., Tawfik, M. A., ve Abbas, W. T. (2007). Induction of cytochrome P450 1A1 as a biomarker of Benzo-a-pyrene pollution in Egyptian fresh water fish. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(8), 1161-1169.
- Hasselberg, L., Grøsvik, B. E., Goksøyr, A., ve Celandier, M. C. (2005). Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic *CYP1A* and *CYP3A*, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Hepatology*, 4(1), 1-15.
- Head, J. A., Mittal, K., Basu, N. (2014). Application of the LU minometric M ethylation A ssay to ecological species: tissue quality requirements and a survey of DNA methylation levels in animals. *Molecular Ecology Resources*, 14(5), 943-952.
- Heidrich, D. D., Steckelbroeck, S., Klingmuller, D. (2001). Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids*, 66(10), 763-769.
- Hogart, A., Lichtenberg, J., Ajay, S. S., Anderson, S., Margulies, E. H., Bodine, D. M., ve NIH Intramural Sequencing Center. (2012). Genome-wide DNA methylation profiles in hematopoietic stem and progenitor cells reveal overrepresentation of ETS transcription factor binding sites. *Genome Research*, 22(8), 1407-1418.
- Horzmann, K. A., Freeman, J. L. (2018). Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicological Sciences*, 163(1), 5-12.
- Hovda, L. R., Hooser, S. B. 2002. Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 32(2), 455-467.
- Hu, X., Jiang, H., Zhang, Y., Huang, F., ve Jiang, M. (2019). Effect of fipronil on biogas production performance during anaerobic digestion of chicken manure and corn straw. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(6), 449-458.
- İla, H. B., Topaktas, M., Rencuzogullari, E., Kayraldiz, A., Donbak, L., ve Daglioglu, Y. K. (2008). Genotoxic potential of cyfluthrin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 656(1-2), 49-54.
- İnternet: Çağlayan, Ç., Yavuz, M., ve Şehiroğlu, B. (2023). Pestisitler ve Sağlığa Etkileri. URL: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglefindmkaj/https://www.env-health.org/wp-content/uploads/2023/01/Pesticides_Brief_Final.pdf. Son Erişim Tarihi: 09.12.23.
- İnternet: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. (2018). URL: <file:///C:/Users/glsmi/Downloads/Fipronil%20Aktif%20Maddesinin%20Yasaklanmas%C4%B1%20.pdf>. Son Erişim Tarihi: 08.10.2023.

- İnternet: Bioveta. (2016). Fipron 268 Mg Spot-On Köpekler İçin Solüsyon L. URL: <https://www.bioveta.cz/tr/urunlerimiz/hayvan-sagligi/fipron-268-mg-spot-on-kopekler-icin-solusyon-l.html>. Son Erişim Tarihi: 04.09.2023.
- İnternet: Biyosidal Ürünler. (2023). URL: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/biyosidal-urunler.html>. Son Erişim Tarihi: 12.06.2023.
- İnternet: WHO. (2019). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2019 edition. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662>. Son Erişim Tarihi: 14.01.2024.
- İnternet: Lyssimachou, A., Muilerman H. (2016). Impact Assessment of The Criteria for Endocrine Disrupting Pesticides. URL: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.pan-europe.info/sites/pan-europe.info/files/public/resources/reports/pan-report-impact-endocrine-criteria-2016.pdf>. Son Erişim Tarihi: 11.01.2024.
- Jamieson, K. L., Endo, T., Darwesh, A. M., Samokhvalov, V., ve Seubert, J. M. (2017). Cytochrome P450-derived eicosanoids and heart function. *Pharmacology & Therapeutics*, 179, 47-83.
- Jaramillo, M. L., Pereira, A. G., Davico, C. E., Nezzi, L., Ammar, D., Müller, Y. M. R., ve Nazari, E. M. (2018). Evaluation of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR assays in organs of zebrafish exposed to glyphosate-based herbicide, Roundup. *Animal*, 12(7), 1424-1434.
- Jayasinghe, C. D., Jayawardena, U. A. (2019). Toxicity assessment of herbal medicine using zebrafish embryos: A systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Jemal, M. (2000). High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomedical Chromatography*, 14(6), 422-429.
- Jensen, O. P. (2019). Pesticide impacts through aquatic food webs. *Science*, 366(6465), 566-567.
- Jiang, J. Q., Zhou, Z., Patibandla, S., Shu, X. (2013). Pharmaceutical removal from wastewater by ferrate (VI) and preliminary effluent toxicity assessments by the zebrafish embryo model. *Microchemical Journal*, 110, 239-245.
- Jiang, J., Wu, S., Wang, Y., An, X., Cai, L., Zhao, X., ve Wu, C. (2015). Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development. *Toxicology In Vitro*, 29(7), 1473-1481.
- Jones, P. A., Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293(5532), 1068-1070.
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 241-258.

- Kadiru, S. (2021). Developmental Toxicity of Cyfluthrin in Embryolarval Stages of Zebrafish. *International Journal of Advanced Scientific Research and Management*, 3, 12.
- Kamstra, J. H., Sales, L. B., Aleström, P., ve Legler, J. (2017). Differential DNA methylation at conserved non-genic elements and evidence for transgenerational inheritance following developmental exposure to mono (2-ethylhexyl) phthalate and 5-azacytidine in zebrafish. *Epigenetics & Chromatin*, 10, 1-18.
- Kamstra, J. H., Aleström, P., Kooter, J. M., ve Legler, J. (2015). Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 16262-16276.
- Kaushik, G., Satya, S., Naik, S. N. (2009). Food processing a tool to pesticide residue dissipation—A review. *Food Research International*, 42(1), 26-40.
- Khor, Y. M., Soga, T., Parhar, I. S. (2016). Early-life stress changes expression of GnRH and kisspeptin genes and DNA methylation of GnRH3 promoter in the adult zebrafish brain. *General and Comparative Endocrinology*, 227, 84-93
- Konwick, B. J., Fisk, A. T., Garrison, A. W., Avants, J. K., ve Black, M. C. (2005). Acute enantioselective toxicity of fipronil and its desulfinyl photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(9), 2350-2355.
- Konwick, B. J., Garrison, A. W., Black, M. C., Avants, J. K., ve Fisk, A. T. (2006). Bioaccumulation, biotransformation, and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout. *Environmental Science & Technology*, 40(9), 2930-2936.
- Kremer, J. J., Williams, C. C., Parkinson, H. D., ve Borghoff, S. J. (2005). Pharmacokinetics of monobutylphthalate, the active metabolite of di-n-butylphthalate, in pregnant rats. *Toxicology Letters*, 159(2), 144-153.
- Krone, P. H., Evans, T. G., Blechinger, S. R. (2003). Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 14(5), 267-274.
- Kuzukiran, O., Yurdakok-Dikmen, B., Sevin, S., Sireli, U. T., Iplikcioglu-Cil, G., ve Filazi, A. (2018). Determination of selected endocrine disruptors in organic, free-range, and battery-produced hen eggs and risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 35376-35386.
- Lange, M., Norton, W., Coolen, M., Chaminade, M., Merker, S., Proft, F., Schmitt, A., Vernier, P., Lesch, K-P., ve Bally-Cuif, L. (2012). The ADHD-susceptibility gene *lphn3*. 1 modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Molecular Psychiatry*, 17(9), 946-954.
- Lanteigne, M., Whiting, S. A., Lydy, M. J. (2015). Mixture toxicity of imidacloprid and cyfluthrin to two non-target species, the fathead minnow *Pimephales promelas* and the amphipod *Hyaella azteca*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68, 354-361.

- Law, J. A., Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204-220.
- Lee, S. B., McCord, B., Buel, E. (2014). Advances in forensic DNA quantification: a review. *Electrophoresis*, 35(21-22), 3044-3052.
- Lee, P. D., Sladek, R., Greenwood, C. M., ve Hudson, T. J. (2002). Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Research*, 12(2), 292-297.
- Leghait J., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Camp, M., Perdu, E., Toutain, P. L., ve Viguié, C. (2009). Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology*, 255(1-2), 38-44.
- Li, D., Lu, C., Wang, J., Hu, W., Cao, Z., Sun, D., Xia, H., ve Ma, X. (2009). Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 91(3), 229-237.
- Li, L., Dong, M., Wang, X. G. (2016). The implication and significance of beta 2 microglobulin: a conservative multifunctional regulator. *Chinese Medical Journal*, 129(04), 448-455.
- Li, X., Ma, W., Li, H., Zhang, Q., ve Ma, Z. (2020). Determination of residual fipronil and its metabolites in food samples: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 185-195.
- Li, H., You, J., Wang, W. X. (2018). Multi-compartmental toxicokinetic modeling of fipronil in tilapia: accumulation, biotransformation and elimination. *Journal of Hazardous Materials*, 360, 420-427.
- Lim, D. H., Maher, E. R. (2010). DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 12(1), 37-42.
- Lin, C., Spikings, E., Zhang, T., ve Rawson, D. (2009). Housekeeping genes for cryopreservation studies on zebrafish embryos and blastomeres. *Theriogenology*, 71(7), 1147-1155.
- Lin, Z., Pang, S., Zhou, Z., Wu, X., Bhatt, P., ve Chen, S. 2021. Current insights into the microbial degradation for butachlor: strains, metabolic pathways, and molecular mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), 4369-4381.
- Lister, R., Ecker, J. R. (2009). Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Research*, 19(6), 959-966.
- Liu, L., Li, Y., Tollefsbol, T. O. (2008). Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Current Issues in Molecular Biology*, 10(1-2), 25-36.
- Liu, Y., Zhang, Y., Tao, S., Guan, Y., Zhang, T., ve Wang, Z. (2016). Global DNA methylation in gonads of adult zebrafish *Danio rerio* under bisphenol A exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 124-132.

- Lu, X., Fraszczyk, E., van der Meer, T. P., van Faassen, M., Bloks, V. W., Kema, I. P., van Beek, A. P., Li, S., Franke, L., Westra, H. J., Consortium, B., Xu, X., Huo, X., Snieder, H., Wolffenbuttel, B. H. R., ve Vliet-Ostaptchouk, J. V. (2020). An epigenome-wide association study identifies multiple DNA methylation markers of exposure to endocrine disruptors. *Environment International*, 144, 106016.
- Lu, J., Shang, X., Zhong, W., Xu, Y., Shi, R., ve Wang, X. (2020). New insights of *CYP1A* in endogenous metabolism: a focus on single nucleotide polymorphisms and diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(1), 91-104.
- Magalhães, J. Z., Udo, M. S., Sánchez-Sarmiento, A. M., Carvalho, M. P., Bernardi, M. M., ve Spinoza, H. S. (2015). Prenatal exposure to fipronil disturbs maternal aggressive behavior in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 52, 11-16.
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., ve Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*, 253-269.
- Markowitz, S. D., Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(25), 2449-2460.
- Matthiessen, P., Wheeler, J. R., Weltje, L. (2018). A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. *Critical Reviews in Toxicology*, 48(3), 195-216.
- Meiser, L. C., Nguyen, B. H., Chen, Y. J., Nivala, J., Strauss, K., Ceze, L., and Grass, R. N. (2022). Synthetic DNA applications in information technology. *Nature Communications*, 13(1), 352.
- Mhanni, A. A., McGowan, R. A. (2004). Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo. *Development Genes and Evolution*, 214, 412-417.
- Minchin, S., Lodge, J. (2019). Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry*, 63(4), 433-456.
- Miranda, T. B., Jones, P. A. (2007). DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 384-390.
- Mize, S. V., Porter, S. D., Demcheck, D. K. (2008). Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA. *Environmental Pollution*, 152(2), 491-503.
- Mnif, W., Pillon, A., Balaguer, P., ve Bartegi, A. (2007). Les perturbateurs endocriniens xénoœstrogéniques: mécanismes moléculaires et méthodes de détection. *Thérapie*, 62(5), 369-386.
- Mnif, W., Hassine, A. I. H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., ve Roig, B. (2011). Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), 2265-2303.

- Morris, J. A. (2009). Zebrafish: a model system to examine the neurodevelopmental basis of schizophrenia. *Progress in Brain Research*, 179, 97-106.
- Moore, D. A., Balbi, K., Ingham, A., Arkenau, H. T., ve Bennett, P. (2018). Analysis of a large cohort of non-small cell lung cancers submitted for somatic variant analysis demonstrates that targeted next-generation sequencing is fit for purpose as a molecular diagnostic assay in routine practice. *Journal of Clinical Pathology*, 71(11), 1001-1006.
- Mrinalini, R., Tamilanban, T., Kumar, V. N., ve Manasa, K. (2023). Zebrafish–The Neurobehavioural Model in Trend. *Neuroscience*, 520, 95-118.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65.
- Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., ve Jyothy, A. (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *Journal of Genetics and Genomics*, 36(2), 75-88.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V. L., ve Yeh, J. Z. (2010). Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(2), 149-152.
- Nguyen, T. K., Petrikas, M., Chambers, B. E., ve Wingert, R. A. (2023). Principles of Zebrafish Nephron Segment Development. *Journal of Developmental Biology*, 11(1), 14.
- Pham, T. P., Bink, D. I., Stanicek, L., Van Bergen, A., Van Leeuwen, E., Tran, Y., Matic, L., Hedin, U., Wittig, I., ve Boon, R. A. (2021). Long non-coding RNA aerrie controls DNA damage repair via YBX1 to maintain endothelial cell function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 619079.
- Paria, A., Dong, J., Babu, P. P., Makesh, M., Chaudhari, A., Thirunavukkarasu, A. R., Purushothaman, C. S., ve Rajendran, K. V. (2016). Evaluation of candidate reference genes for quantitative expression studies in Asian seabass (*Lates calcarifer*) during ontogenesis and in tissues of healthy and infected fishes.
- Park, J., Lee, K., Kim, K., ve Yi, S. J. (2022). The role of histone modifications: From neurodevelopment to neurodiseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 217.
- Patterson, A. D., Gonzalez, F. J., Idle, J. R. (2010). Xenobiotic metabolism: a view through the metabolometer. *Chemical Research in Toxicology*, 23(5), 851-860.
- Porte, C., Janer, G., Lorusso, L. C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M. P., Fossi, M. C., ve Canesi, L. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(3), 303-315.
- Portela, A., Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1057-1068.

- Ramkumar, G., Muthusamy, R., Narayanan, M., Dhanapal, R., Karthik, C., Shivakumar, M. S., Malathi G. ve Kariyanna, B. (2022). Pretreatment of mosquito larvae with ultraviolet-B and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons induces increased sensitivity to permethrin toxicity. *Heliyon*, 8(10).
- Ray, D. E. (2001). Pyrethroid insecticides: mechanisms of toxicity, systemic poisoning syndromes, paresthesia, and therapy. In *Handbook of Pesticide Toxicology*, (1289-1303).
- Rassier, G. T., Silveira, T. L., Remião, M. H., Daneluz, L. O., Martins, A. W., Dellagostin, E. N., Ortiz, H. G., Domingues, W. B., Komninou, E. R., Kütter, M. T., Marins, L. F. F., ve Campos, V. F. (2020). Evaluation of qPCR reference genes in GH-overexpressing transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific Reports*, 10(1), 12692.
- Rietjens, I. M., Louisse, J., Beekmann, K. (2017). The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1263-1280.
- Rizzo, J. M., Buck, M. J. (2012). Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prevention Research*, 5(7), 887-900.
- Robea, M. A., Nicoara, M., Plavan, G., Strugaru, S. A., ve Ciobica, A. (2018). Fipronil: mechanisms of action on various organisms and future relevance for animal models studies. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 20-31.
- Roberts, M. A. (2019). Recombinant DNA technology and DNA sequencing. *Essays in biochemistry*, 63(4), 457-468.
- Rosen, A. D., Robertson, K. D., Hlady, R. A., Muench, C., Lee, J., Philibert, R., Horwath, S., Kaminsky, Z. A., ve Lohoff, F. W. (2018). DNA methylation age is accelerated in alcohol dependence. *Translational Psychiatry*, 8(1), 182.
- Saini, M. K., Gaurav, H. B., Kumar, J., ve Sanu, K. (2023). DNA Sequencing techniques: Sanger to Next Generation Sequencing. *DNA*, 3(09), 2378-2393.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). Isolation and quantification of DNA. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 1-80.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sawan, C., Vaissière, T., Murr, R., Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 642(1-2), 1-13.
- Schang, A. L., Sabéran-Djoneidi, D., ve Mezger, V. (2018). The impact of epigenomic next-generation sequencing approaches on our understanding of neuropsychiatric disorders. *Clinical Genetics*, 93(3), 467-480.
- Schlenk, D. H. D. B., Huggett, D. B., Allgood, J., Bennett, E., Rimoldi, J., Beeler, A. B., Block, D., Holder, A. W., Howinga, R., ve Bedient, P. (2001). Toxicity of fipronil and its degradation products to *Procambarus* sp.: field and laboratory studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 325-332.

- Segner, H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 187-195.
- Sen, A., Ulutas, O. K., Tutuncu, B., Ertas, N., ve Cok, I. (2010). Determination of 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) induction in leaping mullet (*Liza saliens*) from the highly contaminated Aliaga Bay, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 165, 87-96.
- Seralini, G. E., Jungers, G. (2021). Endocrine disruptors also function as nervous disruptors and can be renamed endocrine and nervous disruptors (ENDs). *Toxicology Reports*, 8, 1538-1557.
- Sepici-Dinçel, A., Benli, A. Ç. K., Selvi, M., Sarıkaya, R., Şahin, D., Özkul, I. A., ve Erkoç, F. (2009). Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1433-1439.
- Shanle, E. K., Xu, W. (2011). Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chemical Research in Toxicology*, 24(1), 6-19.
- Shi, F., Sun, L., Kaptoge, S. (2021). Association of beta-2-microglobulin and cardiovascular events and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 320, 70-78.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., ve Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5-34.
- Stark, J. D., Vargas, R. I. (2005). Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(1), 11-16.
- Stoker, T. E., Kavlock, R. J. (2010). Pesticides as endocrine-disrupting chemicals. In *Hayes' handbook of Pesticide Toxicology*, 551-569.
- Strömqvist, M., Tooke, N., Brunström, B. (2010). DNA methylation levels in the 5' flanking region of the vitellogenin I gene in liver and brain of adult zebrafish (*Danio rerio*) Sex and tissue differences and effects of 17 α -ethinylestradiol exposure. *Aquatic Toxicology*, 98(3), 275-281.
- Sultana, Z., Khan, M. M., Mostakim, G. M., Moniruzzaman, M., Rahman, M. K., Shahjahan, M., ve Islam, M. S. (2021). Studying the effects of profenofos, an endocrine disruptor, on organogenesis of zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 20659-20667.

- Surani, M. A., Kothary, R., Allen, N. D., Singh, P. B., Fundele, R., Ferguson-Smith, A. C., ve Barton, S. C. (1990). Genome imprinting and development in the mouse. *Development*, 108, 89-98.
- Sarasquete, C., Segner, H. (2000). Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Science of the Total Environment*, 247(2-3), 313-332.
- Szyf, M. (2011). The early life social environment and DNA methylation: DNA methylation mediating the long-term impact of social environments early in life. *Epigenetics*, 6(8), 971-978.
- Tammen, S. A., Friso, S., Choi, S. W. (2013). Epigenetics: the link between nature and nurture. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(4), 753-764.
- Tang, F. H., Lenzen, M., McBratney, A., ve Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature Geoscience*, 14(4), 206-210.
- Teta, C., Naik, Y. S. (2017). Vitellogenin induction and reduced fecundity in zebrafish exposed to effluents from the City of Bulawayo, Zimbabwe. *Chemosphere*, 167, 282-290.
- Terrazas-Salgado, L., García-Gasca, A., Betancourt-Lozano, M., Llera-Herrera, R., Alvarado-Cruz, I., ve Yáñez-Rivera, B. (2022). Epigenetic transgenerational modifications induced by xenobiotic exposure in zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 200.
- Testa, C., Salis, S., Rubattu, N., Roncada, P., Miniero, R., ve Brambilla, G. (2019). Occurrence of Fipronil in residential house dust in the presence and absence of pets: a hint for a comprehensive toxicological assessment. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(6), 441-448.
- Tingle, C. C., Rother, J. A., Dewhurst, C. F., Lauer, S., ve King, W. J. (2003). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*, 1-66.
- Tiwari, S. K., Bhatt, R. S. (2000). Effect of cyfluthrin on the developmental stages of rice-moth, *Corcyra cephalonica* Staint.(Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Applied Zoological Researches*, 11(2/3), 137-139.
- Toni, M., Arena, C., Tedeschi, G. (2023). Temperature-and chemical-induced neurotoxicity in zebrafish. *Frontiers in Physiology*, 14, 1276941.
- Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., ve Nestler, E. J. (2010). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Focus*, 8(3), 435-448.
- Tutanç, L., Cansız, D., Alturfan, E. E., ve Alturfan, A. (2021). Endokrin Bozucu Kimyasallar ve Tekstil Alanında Kullanımları. *Experimed*, 11(2), 130-139.
- Uno, T., Ishizuka, M., Itakura, T. (2012). Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(1), 1-13.

- Valdehita, A., Fernández-Cruz, M. L., Torrent, F., Sericano, J. L., ve Navas, J. M. (2012). Differences in the induction of *Cyp1a* and related genes in cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Additional considerations for the use of EROD activity as a biomarker. *Journal of Fish Biology*, 81(1), 270-287.
- Van Speybroeck, L. (2002). From epigenesis to epigenetics: the case of CH Waddington. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 981(1), 61-81.
- Verma, R., Rajawat, N. K., Awasthi, K. K., Syed, F., John, P. J., ve Soni, I. (2021). ROS dependent neurotoxicity, genotoxicity & histopathological alterations triggered by β -cyfluthrin, a synthetic pyrethroid. *Materials Today: Proceedings*, 42, 1737-1743.
- Vietina, M., Agrimonti, C., Marmiroli, N. (2013). Detection of plant oil DNA using high resolution melting (HRM) post PCR analysis: A tool for disclosure of olive oil adulteration. *Food Chemistry*, 141(4), 3820-3826.
- Volk, A. E., Kubisch, C. (2017). The rapid evolution of molecular genetic diagnostics in neuromuscular diseases. *Current Opinion in Neurology*, 30(5), 523-528.
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J. V., Brandt I., ve Vethaak, A. D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(1), 71-133.
- Yang, S., Rothman, R. E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(6), 337-348.
- Yang, O., Kim, H. L., Weon, J. I., ve Seo, Y. R. (2015). Endocrine-disrupting chemicals: review of toxicological mechanisms using molecular pathway analysis. *Journal of Cancer Prevention*, 20(1), 12.
- Yang, W. C., Hunter, W., Spurlock, F., ve Gan, J. (2007). Bioavailability of permethrin and cyfluthrin in surface waters with low levels of dissolved organic matter. *Journal of Environmental Quality*, 36(6), 1678-1685.
- Yilmaz, B., Terekci, H., Sandal, S., ve Kelestimur, F. (2020). Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 21, 127-147.
- Ying, G. G. (2011). Endocrine Disrupting Chemicals. What? Where. *Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food*, 3-17.
- Yirun, A., Ozkemahli, G., Balci, A., Erkekoglu, P., Zeybek, N. D., Yersal, N., ve Kocer-Gumusel, B. (2021). Neuroendocrine disruption by bisphenol A and/or di (2-ethylhexyl) phthalate after prenatal, early postnatal and lactational exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 26961-26974.
- You, H. H., Song, G. (2021). Review of endocrine disruptors on male and female reproductive systems. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 244, 109002.

- Yong, W. S., Hsu, F. M., ve Chen, P. Y. (2016). Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics & Chromatin*, 9(1), 1-16.
- Zaman, M. S., Chen, Y., Deng, G., Shahryari, V., Suh, S. O., Saini, S., Majid, S., Liu, J., Khatri, G., Tanaka Y., ve Dahiya, R. (2010). The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 103(2), 256-264.
- Zhang, C., Li, D., Ge, T., Han, J., Qi, Y., ve Huang, D. (2020). 2, 4-Dichlorophenol induces feminization of zebrafish (*Danio rerio*) via DNA methylation. *Science of The Total Environment*, 708, 135084.
- Zhao, F., Wei, P., Wang, J., Yu, M., Zhang, X., Tian, H., Wang W., ve Ru, S. (2017). Estrogenic effects associated with bisphenol a exposure in male zebrafish (*Danio rerio*) is associated with changes of endogenous 17 β -estradiol and gene specific DNA methylation levels. *General and Comparative Endocrinology*, 252, 27-35.
- Zheng, N., Cheng, J., Zhang, W., Li, W., Shao, X., Xu, Z., Xu, X., ve Li, Z. (2014). Binding difference of fipronil with GABAARs in fruitfly and zebrafish: insights from homology modeling, docking, and molecular dynamics simulation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44), 10646-10653.
- Qian, Y., Wang, C., Wang, J., Zhang, X., Zhou, Z., Zhao, M., ve Lu, C. (2017). Fipronil-induced enantioselective developmental toxicity to zebrafish embryo-larvae involves changes in DNA methylation. *Scientific Reports*, 7(1), 2284.
- Qian, Y., Ji, C., Yue, S., ve Zhao, M. (2019). Exposure of low-dose fipronil enantioselectively induced anxiety-like behavior associated with DNA methylation changes in embryonic and larval zebrafish. *Environmental Pollution*, 249, 362-371.
- Qin, T., Zhao, X., Song, C., Lv, T., Chen, S., Xun, Z., Xu, Z., Zhang, Z., Xu, H., Zhao, C., Liu, B., ve Peng, X. (2023). A ratiometric supramolecular fluorescent probe for on-site determination of cyfluthrin in real food samples. *Chemical Engineering Journal*, 451, 139022.
- Xu, H., Liu, X., Jia, Y., Dong, F., Xu, J., Wu, X., Yang, Y., ve Zheng, Y. (2018). Fipronil-induced toxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) larvae by using digital gene expression profiling. *Science of the Total Environment*, 639, 550-559.
- Wan, H., Zhao, Z., Qian, C., Sui, Y., Malik, A. A., ve Chen, J. (2010). Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Analytical Biochemistry*, 399(2), 257-261.
- Wang, M. H., Baskin, L. S. (2008). Endocrine disruptors, genital development, and hypospadias. *Journal of Andrology*, 29(5), 499-505.
- Wang a, X., Zhou a, S., Ding, X., Zhu, G., ve Guo, J. (2010). Effect of triazophos, fipronil and their mixture on miRNA expression in adult zebrafish. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45(7), 648-657.
- Wang, X., Spandidos, A., Wang, H., ve Seed, B. (2012). PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic acids research*, 40(1), 1144-1149.

- Wang, X., Martínez, M. A., Wu, Q., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A., ve Yuan, Z. (2016). Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(10), 876-899.
- Wang, X., Zhong, W., Xiao, B., Liu, Q., Yang, L., Covaci, A., ve Zhu, L. (2019). Bioavailability and biomagnification of organophosphate esters in the food web of Taihu Lake, China: Impacts of chemical properties and metabolism. *Environment International*, 125, 25-32.
- Watson, C. S., Bulayeva, N. N., Wozniak, A. L., ve Alyea, R. A. (2007). Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids*, 72(2), 124-134.
- Westerfield, M. (2000). A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) Eugene. *University of Oregon Press*, 1(9.7), 10-16.
- Wirbisky, S. E., Damayanti, N. P., Mahapatra, C. T., Sepulveda, M. S., Irudayaraj, J., ve Freeman, J. L. (2016). Mitochondrial dysfunction, disruption of F-actin polymerization, and transcriptomic alterations in zebrafish larvae exposed to trichloroethylene. *Chemical Research in Toxicology*, 29(2), 169-179.
- Wong, R. S. L., Dynlacht, J. R., Cedervall, B., ve Dewey, W. C. (1995). Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of DNA double-strand breaks induced by heat and/or X-irradiation in bulk and replicating DNA of CHO cells. *International Journal of Radiation Biology*, 68(2), 141-152.
- Wu, C. H., Lu, C. W., Hsu, T. H., Wu, W. J., ve Wang, S. E. (2021). Neurotoxicity of fipronil affects sensory and motor systems in zebrafish. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 177, 104896.
- Wu, J., Lu, J., Lu, H., Lin, Y., ve Wilson, P. C. (2015). Occurrence and ecological risks from fipronil in aquatic environments located within residential landscapes. *Science of the Total Environment*, 518, 139-147.



Gazili olmak ayrıcalıktır