

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GLİFOSAT TOKSİSİTESİNE KARŞI ROSMARİNİK VE
VANİLİK ASİTLERİN *İN VİTRO* ORTAMDA BİYOKİMYASAL
VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Gözde ÖZCAN

Yüksek Lisans Tezi
Anabilim Dalı: Biyoloji
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ

EKİM-2018

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİFOSAT TOKSİSİTESİNE KARŞI ROSMARİNİK VE VANİLİK ASİTLERİN
***İN VİTRO* ORTAMDA BİYOKİMYASAL VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN**
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gözde ÖZCAN
(141110102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 03.09.2018
Tezin Savunulduğu Tarih : 05.10.2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ
Diğer Jüri Üyeleri : Dr. Öğr. Üyesi Hatayi ZENGİN
: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TUZCU

EKİM-2018

ÖNSÖZ

Glifosat, dünya çapında yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir herbisittir. Bu tez çalışmasında, *Saccharomyces cerevisiae* L. kültür ortamına farklı dozlarda eklenen rosmarinik ve vanilik asitlerin glifosatın toksik etkisine karşı antioksidan ve biyokimyasal etkileri araştırılmıştır. Biyokimyasal analizler sonucunda 800 mg glifosat içeren kültür ortamındaki hücre yoğunluğunun azaldığı belirlendi. *Saccharomyces cerevisiae* L. kültür ortamında, rosmarinik asit ve vanilik asitin glifosat toksisitesine karşı biyokimyasal değerler üzerinde etkili olduğu belirlendi.

Yüksek Lisans Tez çalışmamın bütün aşamalarında, desteğini, bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan ve her konuda destek olan değerli hocam Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ'a, eğitimim boyunca katkılarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca Doktora öğrencisi Figen ERDEM'e teşekkürlerimi sunarım. Çok değerli aileme ve eşim Harun ÖZCAN'a en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, FF.16.27 proje numarasıyla çalışmamıza destek veren Üniversitemizin FÜBAP birimine teşekkür ederim.

Gözde ÖZCAN
ELAĞIĞ-2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Glifosat (Glyphosate) ve Roundup	6
1.2. Glifosatın Kullanım Alanları	9
1.3. Glifosatın Bitkilerde Etki Mekanizması	9
1.4. Glifosatın Çevresel Yayılımı	10
1.5. Glifosatın Toprakta Kalıcılığı.....	10
1.6. Fenolik Bileşikler.....	11
1.6.1. Fenolik Bileşiklerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	13
1.6.2. Rosmarinik Asit	13
1.6.3. Vanilik Asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit)	14
1.7. Antioksidanlar.....	15
1.8. Maya Hücresi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L.).....	16
1.9. Daha Önceden Yapılmış Çalışmalar.....	17
1.10. Çalışmamızın Amacı	18
2. MATERYAL VE METOT.....	19
2.1. Kullanılacak Kimyasallar ve Organik Çözücüler	19
2.2. Fenolik Asitlerin DPPH Temizleme Aktivitesi	19
2.3. <i>İn Vitro</i> Maya Kültür Ortamlarının Hazırlanması	19
2.3.1. Kontrol grubu (K).....	20
2.3.2. Glifosat grubu (G).....	20
2.3.3. Rosmarinik asit (RA).....	20
2.3.4. Vanilik asit (VA)	20
2.3.5. Glifosat+Rosmarinik Asit Grubu (RA+G)	20
2.3.6. Glifosat+Vanilik Asit Grubu (VA+G).....	21

2.4.	Protein, GSH, GSSG, MDA ve GST Ölçümü için Hücre Peletinin Ekstraksiyonu	21
2.5.	GSH ve GSSG Miktarının HPLC Cihazında Ölçümü	21
2.6.	Lipid Peroksidasyon(MDA) Düzeyinin Ölçümü	22
2.7.	Lipidlerin Ekstraksiyonu	22
2.8.	Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması	23
2.9.	Yağ Asidi Düzeylerinin Gaz Kromatografik Analizi:	23
2.10.	Alfa-Tokoferol ve Ergosterol'ün HPLC Yöntemi ile Analizi:	23
2.11.	Glutasyon-S- Transferaz Enzim Aktivitesi	24
2.12.	Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	24
3.	BULGULAR	25
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	36
	KAYNAKLAR	42
	ÖZGEÇMİŞ	56

ÖZET

Glifosat [N-fosfonometil glisin], dünya çapında yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir herbisittir. Glifosat; tirozin, triptofan ve fenilalanin gibi aromatik amino asitlerin oluşumu için gerekli olan enzim 5-enolpiruvil-şikimat-3-fosfat sentaz enziminin (EPSPS) aktivitesini inhibe ederek bitkilerin gelişimini önler. Rosmarinik asit ve vanilik asit ise pek çok bitkide doğal olarak bulunan fenolik asitlerdir. Bu çalışmada, moleküler biyoloji ve biyokimya alanlarındaki çalışmalarda model organizma olarak kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* L. kullanılmıştır ve glifosatın toksik etkisine karşı kültür ortamına farklı dozlarda eklenen rosmarinik ve vanilik asitin antioksidan ve biyokimyasal etkileri araştırılmıştır. Kültür ortamlarına hem glifosat hem de rosmarinik ve vanilik asit konsantrasyonları litrede 200, 400 ve 800 mg olarak eklendi. Kültür sıvıları otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilizasyon yapıldı. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra, steril ortamda maya hücrelerinin aşılması yapıldı. Bu işlemten sonra 30 °C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kültür sıvılarının yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm'de ölçüldü. Daha sonra hücre peleti +4 °C'de 6000 rpm'de santrifüj edilerek izole edildi. Hücre peleti % 0.9'luk NaCl solüsyonu ile yıkandı ve daha sonra Tris-EDTA tamponu (pH=7.4) ile homojenize edilerek üst süpernatant kısım +4 °C'de 6000 rpm'de pelet kısımdan ayrıldı. Süpernatant kısımdan total protein, GSH, GSSG, MDA ve Glutasyon S-Transferaz enzim aktivitesi ölçüldü. Geriye kalan pelet kısmı 3/2 (v/v) n-hekzan/izopropil alkol karışımı ile homojenize edildi. Santrifüj yapılarak süpernatant kısmı alındı ve esterleştirme işlemi yapılarak gaz kromatografisinde yağ asitlerinin analizi yapıldı. Gaz kromatografisi ile yapılan analiz sonucunda, maya hücresi peleti ekstraktı içinde oktanoik asit (8:0), laurik asit (12:0), miristik asit (14:0), palmitik asit (16:0), palmitoleik asit (16:1 n-7), stearik asit (18:0), oleik asit (18:1 n-9) ve linoleik asit (18:2n-6) asitlerin bulunduğu gözlemlendi. D, E ve K vitamin miktarlarının analizi ise HPLC Cihazı ile yapıldı. Bu analiz sonucunda, K₂, δ-tokoferol, D₂, D₃, α-tokoferol, ergosterol, K₁, stigmasterol, β-sitosterol gibi moleküller tanımlandı. Biyokimyasal analizler sonucunda 800 mg glifosat içeren kültür ortamındaki hücre yoğunluğunun azaldığı belirlendi. Protein miktarı, GST, lipid peroksidasyon ile yağ asidi düzeylerinde farklılıklar gözlemlendi. *Saccharomyces cerevisiae* L. kültür ortamında, glifosat toksisitesine karşı vanilik ve rosmarinik asitin biyokimyasal değerler üzerinde etkili olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Glifosat, Vanilik asit, Rosmarinik asit, Antioksidan etki, Total protein, GSH, GSSG, Lipid peroksidasyon, Yağ asidi, DPPH, GST, *Saccharomyces cerevisiae* L.

SUMMARY

Investigation of Biochemical and Antioxidant Effects of Rosmarinic and Vanillic Acids Against Glyphosate Toxicity *In Vitro* Medium

Glyphosate inhibits the growth of plants by inhibiting the activity of enzyme 5-enolpyruvyl-shikimic-3-phosphate synthase (EPSPS), which is required for the formation of aromatic amino acids such as tyrosine, tryptophan and phenylalanine. Rosmarinic acid and vanillic acid are naturally occurring phenolic acids in many plants. In this study, *Saccharomyces cerevisiae* L. was used as a model organism in studies in molecular biology and biochemistry and antioxidant and biochemical effects of rosmarinic and vanillic acid added at different doses to the culture medium against the toxic effect of glyphosate were investigated. Both glyphosate and rosmarinic and vanillic acid concentrations in culture media were added as 200, 400 and 800 mg per liter. The culture broth was autoclaved at 121 ° C for 15 minutes. After cooling at room temperature, yeast cells were inoculated in sterile medium. After this procedure, the 30 °C sample was allowed to incubate for 72 hours. At the end of the period, the concentrations of the culture fluids were measured at 600 nm in the spectrophotometer. The cell pellet was then isolated by centrifugation at 6000 rpm at +4 ° C. The cell pellet was washed with 0.9% NaCl solution and then homogenized with Tris-EDTA buffer (pH = 7.4) and the upper supernatant was separated from the pellet at 6000 rpm at +4 ° C. Total protein, GSH, GSSG, MDA and Glutathione S transferase activities were measured from the supernatant. The remaining pellet portion was homogenized with a mixture of 3/2 (v / v) n-Hexane / isopropyl alcohol. The supernatant fraction was removed by centrifugation and esterification was performed to analyze fatty acids in gas chromatography. Analysis by gas chromatography revealed that the yeast cell pellet extract contained octanoic (8: 0), lauric (12: 0), myristic (14: 0), palmitic (16: 0), palmitoleic (16:1 n-7), stearic (18: 0), oleic (18:1 n-9) and linoleic (18:2 n-6) acids were observed. Analyzes of vitamin A, D, E, and K vitamins were performed with an HPLC instrument. As a result of this analysis, molecules such as K₂, δ-tocopherol, D₂, D₃, α-tocopherol, ergosterol, K₁, stigmasterol, β-sitosterol were identified. Biochemical analyzes indicated that cell density decreased in culture medium containing 800 mg glyphosate. Protein amount, GST activity, lipid peroxidation and fatty acid levels were observed. . It was determined that vanillic and rosmarinic acid against glyphosate toxicity were effective on biochemical values in *Saccharomyces cerevisiae* L. culture medium.

Key words: Glyphosate, Vanillic acid, Rosmarinic acid, Antioxidant effect, Total protein, GSH, GSSG, Lipid peroxidation, Fatty acid, DPPH, GST, *Saccharomyces cerevisiae* L.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Glifosatın kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.2. Rosmarinik asitin kimyasal yapısı	14
Şekil 1.3. Vanilik asitin kimyasal yapısı	14
Şekil 1.4. A. <i>S.cerevisiae</i> nın taramalı elektron mikroskobu görüntüsü, B. <i>S.ceravisiae</i> ’nin transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü.....	17
Şekil 4.1. Piruvatın etil alkole dönüşümü	38



TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Rosmarinik asitin (RA) değişik konsantrasyonlarda DPPH• radikalini temizleme aktivitesi (%).....	25
Tablo 3.2. Vanilik asitin değişik konsantrasyonlarda DPPH radikalini temizleme aktivitesi(%).....	25
Tablo 3.3. Kültür ortamına 40 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki ADEK vitaminleri ve sterollerin miktarının değişimi (µg/g hücre peleti)	26
Tablo 3.4. Kültür ortamına 80 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki ADEK vitaminleri ve sterollerin miktarının değişimi (µg/g hücre peleti)	27
Tablo 3.5. Kültür ortamına 160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki ADEK vitaminleri ve sterollerin miktarının değişimi (µg/g hücre peleti)	28
Tablo 3.6. Kültür ortamına 40 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki yağ asitlerinin değişimi (%).....	29
Tablo 3.7. Kültür ortamına 80 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki yağ asitlerinin değişimi (%).....	30
Tablo 3.8. Kültür ortamına 160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki yağ asitlerinin değişimi (%).....	31
Tablo 3.9. Kültür ortamına 40, 80 ve 160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki hücre peletlerinde total protein ve MDA miktarının değişimi.	33
Tablo 3.10. Kültür ortamına 40, 80 ve 160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki hücre peletlerinde GSH VE GSSG miktarının değişimi (µg/ g hücre peleti).....	34

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
AMPA	: Aminometilfosfonik asit
BHT	: Butilhidroksitoluen
CDNB	: 1-klor-2,4-dinitrobenzen
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPSPS	: 5-enolpiruvil-şikimat-3-fosfat sentaz enzimi
G	: Glifosat
GC	: Gaz kromatografisi
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon S- transferaz
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
Kg	: Kilogram
KHCO₃	: Potasyum Bikarbonat
KOH	: Potasyum Hidroksit
MDA	: Malondialdehit
NaCl	: Sodyum Klorür
NADPH	: Nikotinamit Adenin Dinüklotid Fosfat
PCA	: Perklorik Asit
POEA	: Polioksietilen amin
PPO	: Polifeniloksidaz
RA	: Rosmarinik Asit
RNT	: Reaktif azot türü
ROT	: Reaktif oksijen türü
VA	: Vanilik Asit

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artışı ile beraber yaşam için gerekli en önemli ihtiyaçlardan biri olan besin ihtiyacı da artmaktadır. Yeryüzündeki yaşamın kaynağını bitkiler oluşturur. İnsanlar tarafından tüketilen enerjinin %90'ı, proteinin ise %80'i bitkisel kaynaklıdır. Geriye kalan enerji ve protein ihtiyacı ise hayvansal kaynaklı ürünlerden karşılanmaktadır. Kontrolsüz endüstrileşme ile yok edilen tarım alanları ve artan besin isteğini karşılamak için, üretim miktarını artırma amaçlı çeşitli yollar aranmaktadır (Morsümbül vd., 2010).

Tarımsal üretimi artırma için, pestisitler yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Bu kimyasalların kullanımı aynı zamanda çevre kirliliğine de neden olmaktadır. Bu maddelerin yarılanma ömürleri uzun olup; toprakta, sebze ve meyvelerin üzerinde kalmakta ve besin zinciri ile de insana kadar ulaşmaktadır. Tarım ilaçları olarak belirtilen pestisitlerin büyük çoğunluğu hem kontrol edilmek istenen canlılara, hem de insan ve memelilere karşı çok toksiktir. Bu maddelerin çoğunluğu uygulandıkları bitki, toprak ve su ortamında uzun süre bozulmadan kalabilmekte, canlıların bünyesinde birikebilmektedir (Ortiz vd., 2004).

Pestisitler uzun yıllardır zirai mücadele amacıyla kullanılmaktadır. Pestisitler; zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak ya da zararlarını azaltmak için kullanılan madde veya maddelerden oluşan karışımlardır (Tabrez vd., 2014). Virüs ya da bakteri gibi biyolojik bir ajan veya dezenfektanlar gibi kimyasal ajanlar pestisit olarak kullanılabilir (Pimentel ve Pimentel, 2008).

Pestisitler, hastalık yayan böceklere, bitki patojenlerine, yabancı otlara, yumuşakçalara, kuşlara, memelilere, balıklara, solucanlara ve mikroplara karşı kullanılmaktadır. Pestisitler etkiledikleri canlı gruplarına göre; İnsektisit (Böcekleri öldüren), Herbisit (Yabancı otları öldüren), Fungusit (Mantarları öldüren), Rodentisit (Kemirgenleri öldüren), Akarisit (Akarları öldüren), Nematisit (Nematodları öldüren), Mollusisit (Yumuşakçaları öldüren), Avisit (Kuşları öldüren), Afisit (Yaprak bitlerini öldüren), Bakterisit (Bakterileri öldüren), Algisit (Algleri öldüren) olarak adlandırılır (Dökmeci, 1988).

Dünyada ve ülkemizde pestisit kullanımı yaygın şekilde yapılmaktadır. Dünyada pestisitler hem tarımda verimi arttırmak hem de tarım dışı amaçlar için günümüzde milyonlarca ton tarım ilacı kullanıldığı ve bunların büyük bir kısmının uygulandığı yerlerden başka yerlere taşındığı belirtilmiştir. Tarımsal amaçla kullanılan bir ilaç; mikroorganizmalar, güneş ışığı ya da kimyasal yollarla bozulma özelliğinde değilse zamanla toprakta birikerek

bitkilerin yapılarına geçmektedir. Bundan dolayı tarımsal amaçla kullanılan her pestisit türünün potansiyel etkisini belirlemeye yönelik biyokimyasal çalışmaların yapılması çevrenin korunması ve insan sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir (Balkaya ve Bayraklı, 2000).

Çeşitli yollarla toprağa ulaşan pestisitler buharlaşarak atmosfere geçebildikleri gibi, su ve erozyon ile taşınarak yüzey sularına karışmakta, ya da sızarak yer altı suyuna ulaşabilmektedir. Yüzey sularına ulaşan pestisitler burada yaşayan canlıları olumsuz yönde etkilemekte böylece besin zincirinde birikime de uğramaktadırlar. Pestisitlerin yarılanma ömrü ne kadar yüksekse çeşitli faktörler ile taşınması ve canlılara besin yoluyla ulaşması etkili olmaktadır (Balkaya ve Bayraklı, 2000).

Herhangi bir pestisit maddesinin hedefi olmayan organizmaları tehdit etmesi ve su kaynaklarının kirlenmesi nedeniyle pestisit kalıntılarının incelenmesi ve teşhis edilmesine büyük ihtiyaç vardır (Soulas ve Lagacherie, 2001). Pestisitlerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı sonucu, zararlı organizmaların adaptasyon sağlama riskleri ve kalıntılar yoluyla insan sağlığına ve çevreye olumsuz etkileri göz ardı edilmemelidir (Chubykin vd., 2007). Pestisitlerin; piyasa ömrünü, insan sağlığını ve çevreye etkililiğini en fazla etkileyen olayların başında pestisitlere karşı zararlı organizmaların duyarlılık azalışı gelmektedir (Tiryaki vd., 2010).

Bir pestisite organizmaların duyarlılığı azaldıkça, o pestisitinin etkililiği de düşmektedir. Uygulayıcı ise, eski etkinliği elde edebilmek için devamlı konsantrasyon yükseltmesine gitmektedir. Böylece artan yoğunlaşmalara paralel olarak çevrede pestisit kalıntıları daha fazla yoğunlaşmaya başlamaktadır. Pestisitlerin bilinçsiz kullanımlarından dolayı, insan yaşamı belki de gelecekte daha fazla sağlık ve çevre problemlerine neden olabilecek tehlikeli sonuçlar ile karşı karşıya kalacaktır. Bu tehlikeli sonuçların azaltılması için bu durumun ciddi bir şekilde kontrol altına alınması ve bunun bir sağlık politikası haline getirilmesi gerekmektedir. Günümüz tarımında pestisitler gıda üretimini artırmak için verilen çabalarda önemli bir role sahiptir. Yetiştirilen ve hasat edilen ürünlerin korunmasında ve halk sağlığı amaçlı koruyucu uygulamalarda (örnek sıtma) pestisitlerden faydalanılmaktadır. Ancak aynı zamanda toksititeleri ve bazen yüksek kalıntı bırakmaları, endokrin sisteme muhtemel etkileri ile doğal hayvan popülasyonlarının üreme performanslarını olumsuz etkilemeleri, biyoakümülyasyon riskleri nedeniyle çevresel ve sağlık zararlarına sebep olabilmektedirler (Bergl f ve Pajuste, 2003).

Pestisit kalıntıları açısından yapılan çalışmaların, gelişmiş ülkelere oranla ülkemizde oldukça az olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, bitkisel ürünlerimizde tolerans üstü pestisit kalıntısı içerenlerin sayısı az olmasına karşın, AB ülkelerine giden ürünlerimizin uygun bulunmayan partilerinde pestisit kalıntıları ve mikotoksinler önemli bir sorun olarak görülmektedir (Delen vd., 2005).

Glifosat [N-(fosfonometil) glisin], fosfonometil aminoasit türevidir ve bazı herbisitlerin aktif bileşeni olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda mısır, soya fasulyesi, kanola ve pamukta olduğu gibi glifosata dirençli tohumların geliştirilmesi ile ekiminin artmasına bağlı olarak glifosat herbisit ticareti artmıştır. Glifosat memelilerde olmayan fakat bitkilerde bulunan aromatik amino asit (fenilalanin, tirozin ve triptofan) sentezinin gerçekleştiği metabolik yolu (şikimik asit yolağı) inhibe ederek aktivite göstermektedir. Bu metabolik yol insanlarda dâhil olmak üzere memelilerde bulunmadığı için bu canlılarda sağlık açısından pestisitlerin bir risk oluşturmadığı kabul edilmektedir (Hernández-Plata vd., 2015). Bununla birlikte son yıllarda, insanlarda maruz kalma, hayvanlarda ise deneysel çalışmalarda hem glifosat ihtiva eden ticari karışımların hem de glifosatın nörotoksik etkilere sahip olduğu ifade edilmiştir. Glifosat içeren ticari karışımlara maruz kalan insanlarda glifosatın kan beyin bariyerini geçebildiği, beyin ve omurilik sıvısında bulunduğu tespit edilmiştir (Hernández-Plata vd., 2015).

Glifosat-bazlı herbisitler dünyada en yaygın olarak kullanılan tarım kimyasalları arasında yer almakta ve Roundup ticari ismi altında satılmaktadır. Seçicilik göstermeyen, geniş spektrumlu, filizlenme sonrası kullanılmaktadır. Pirinç, mısır, soya ile mera alanlarında geniş yapraklı yabancı otların kontrolünde kullanılmaktadır (Druart vd., 2017). Glifosat, diğer birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de de toplam kullanılan herbisit miktarının tamamına yakını glifosat içerikli Roundup oluşturmaktadır (Gerişlioğlu vd., 2010).

Glifosat kullanımının yaygınlaşması, araştırmacıları glifosata-dirençli bitkileri araştırmaya itmiştir. Genetiği değiştirilmiş bitkiler sadece bitki verimini artırmakla kalmamış aynı zamanda hayvan ve insanlarda daha fazla glifosat kalıntısı birikimine yol açmıştır (Šiviková ve Dianovský, 2006). Glifosat bazlı formülasyonlar tarım ve bahçe alanlarında bulunan bitkileri, zararlı ve istenilmeyen bitkilerin olumsuz etkisinden korunmak için tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünyada yaygın olarak kullanılan pestisitlerin çoğu oksidatif stres mekanizmaları yolu ile toksik etkilerini göstermektedirler. Glifosat bazlı bileşikler oksijen veya azot türevli reaktif metabolitlerin üretiminde artışa yol açarak hem antioksidan düzeyini hem de temizleyici sistemlerinin aktivitesini etkileyerek

aktivite göstermektedirler (Astiz vd., 2009). Roundup, glifosat ve aktif madde olarak polioksietilenaminden oluşmuştur (El-Shenawy ve Nahla, 2009).

Pestisitlerin kalıntıları veya indirgenme ürünlerinin ana bileşikten daha güçlü toksisite gösterdiğini destekleyen kanıtlar bulunmaktadır. Herbisit formülasyonlarına herbisitlerin etkisini artırmak amacıyla adjuvan ve surfaktan olarak adlandırılan aktif yardımcı maddeler eklenmektedir. Bir surfaktan olan polioksietilenamin, bitkinin bünyesine glifosat bazlı bileşiğin girmesini arttırmaktadır. Ne yazık ki, bu ilave maddeler çoğu zaman tek başına glifosata göre daha toksik olduğu ortaya çıkmıştır. Glifosatın ticari formülasyonlarının sahip oldukları aktif maddeler, glifosattan daha yüksek toksisite göstermektedir. Daha öncede belirtildiği gibi, örneğin Roundup tipi herbisit formülasyonları glifosattan daha toksittir (Carlisle ve Trevors, 1988; Cox, 1999; Giesy vd., 2000).

Bu durumun temel nedeni herbisitinin özelliklerini değiştirmek amacıyla kullanılan surfaktan olarak adlandırılan aktif bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Literatürlere göre, glifosat formülasyonlarının insan embriyo ve plasenta hücrelerinin ölümüne neden olduğu, sıçan testis hücrelerinde apoptozis ve nekrozisi indüklediği ortaya çıkmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda glifosata maruz kalma ile bazı kanser türlerinin görülme sıklığı arasında bir ilişkinin bulunduğu gösterilmiştir (Bernardını, 2014).

İnsanlar glifosata, uygulama yapılmış toprakla temas ederek, kontamine olmuş su ve besinleri tüketerek maruz kaldıkları gibi, çeşitli tarımsal uygulamalara bağlı olarak da maruz kalabilirler. Glifosat kullanımındaki artışa bağlı olarak, insan ve hayvanlar kontamine olmuş besinler yolu ile daha fazla glifosat kalıntısına maruz kalmaktadırlar (Gerişlioğlu vd., 2010). Marul, havuç ve arpada glifosat kalıntıları tespit edilmiş ve bu kalıntıların marulda uygulamada 5 ay sonra, arpada ise 4 ay sonra bile varlığını koruduğu saptanmıştır (Sivikova ve Dianovsky, 2006). Her ne kadar glifosatın düşük dozlarının memeliler üzerinde toksik etkisinin olmadığı ifade edilse de, özellikle tarımsal uygulamalarda kullanılan dozlarından çok daha düşük dozları bile memeli hayvanların gebelik döneminde hem anne hem de fetüs için toksik etkilere sahip olduğu ifade edilmiştir. Hamilelik döneminde glifosat içerikli herbisitlere maruz kalan kadın işçilerde düşük oranının arttığı ve erken doğum gibi problemlerin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Parvez vd., 2018).

Glifosatın gebelik döneminde neden olduğu problemlerin, tarımsal uygulamalarda kullanılan dozlarından daha düşük dozlarda gösterdiği ifade edilmiştir (Gerişlioğlu, vd., 2010). Glifosatın çevresel olarak güvenli olduğu öne sürülse de (Bain vd.,1994), yapılan

Çalışmalarda glifosata maruz kalmaya bağlı olarak üzerinde toksik etkiler gösterdiği ve bir takım metabolik anormalliklere sebep olduğu ifade edilmiştir (Cattani, 2013).

Memelilerde reme sistemi üzerine tarım kimyasallarının etkisine yönelik yapılan deneysel çalışmaların sayısı son yıllarda artmış ve toksisite için bazı olası mekanizmalar ne sürülmüştür. zerinde en çok durulan mekanizma ise pestisitlerin etkilerine bağlı olarak eř zamanlı bir şekilde organizmada antioksidan savunma sisteminin aktivitesinin değişmesi ile hormonal bozulmanın olduğu ifade edilmektedir. İnsanlar, toksik bileşiklerin etkilerine her geçen gün daha fazla maruz kalabilmektedirler. Küresel ölçekte gıda üretimi için tarım kimyasallarının yoğun olarak kullanılmaları sonucunda hem bitkisel ve hayvansal kaynaklı gıdalarda hem de hava ve suda bu kimyasalların kalıntıları yoğun olarak bulunmaktadır (Cassault-Meyer vd.,2014; Astiz vd., 2013; Gasnier vd., 2009)

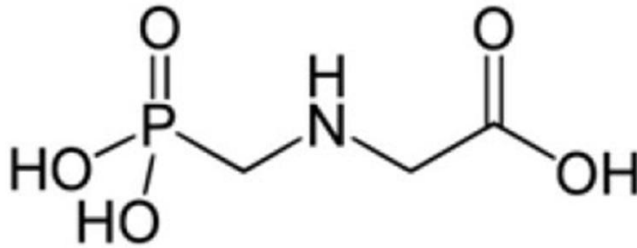
Yaygın olarak kullanılan pestisitlerin birçoğunun, memeli canlıların hücrelerinde oksijen ve azot kökenli reaktif metabolitlerin oluşumunda artışa yol açtığı aynı zamanda bu hücrelerin antioksidan potansiyelini azalttığı ifade edilmiştir. İnsanlarda ve evcil hayvanlarda glifosatın östrojen benzer bir bileşik gibi hareket ederek cinsel farklılaşmayı bozucu etkileri olduğu, erkeklerde sperm anomalilerine, kadınlarda da bir takım gebelik sorunlarına yol açtığı bildirilmiştir (Cassault-Meyer vd., 2014). Son zamanlarda, çevresel bir nörotoksin olan glifosatın parkinson hastalığının patolojisinde rol oynadığı ayrıca, olgu sunumlarında olasılıkla parkinson hastalığının glifosata maruz kalma ile bağlantılı olduğu ifade edilmiştir. Glifosata maruz bırakılan hayvanlarda mitokondriyal transmembran potansiyelinde kayıpların olduğu aynı zamanda karaciğer ve beyin dokusunda oksidatif stres düzeyinin arttığı saptanmıştır (Xu vd.,2012).

Pestisitlere maruz kalmanın, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROT, RNT) aşırı üretimine yol açtığı bu durumun da doku hasarına neden olduğu gösterilmiştir. Neyse ki organizmada bu reaktif metabolitlere karşı çeşitli koruyucu mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmaların bir kısmı superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz ve glutatyon-s-transferaz gibi enzimatik mekanizmalardan oluşurken bir kısımda glutatyon (GSH) ve tokoferol gibi su ve yağda çözünen antioksidan bileşiklerden oluşmaktadır. Normal koşullar altında, organizmanın sahip olduğu antioksidan savunma sistemi, hücresel hasarı en aza indirebilmektedir, ama oksidatif stres oluştuğu zaman bu reaktif maddelerin üretimi hücrenin antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aştığında hücresel hasar ortaya çıkabilmektedir (Larsen vd., 2012).

Ana bileşiği glifosat olan Roundup formülasyonunun öldürücü olmayan dozlarının uygulandığı sıçanların karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA) düzeyinin arttığı gözlenmiştir (El-Shenawy, 2009). Bir başka çalışmada ise subkronik (subakut dönem ile kronik dönem arasındaki devre) glifosat uygulanmış sıçanların beyin, böbrek, karaciğer ve plazmalarında MDA düzeyinin arttığı ve aynı zamanda antioksidan enzim fonksiyonlarında değişikliklerin olduğu bildirilmiştir (Astiz vd., 2009). Tarımda herbisit olarak kullanılan glifosatın insan embriyo ve plasenta hücreleri için toksik olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda glifosat ve onun ticari formunun bir takım metabolik sorunlara neden olduğu rapor edilmiştir (Thongprakaisang vd., 2013). Bu çalışmamızda kullanımı çok yaygın olan glifosat toksitesine karşı fenolik asitlerden rosmarinik asit ile vanilik asitin etkileri incelenecektir.

1.1. Glifosat (Glyphosate) ve Roundup

Glifosat, N-(phosphonomethyl) glycine (Kidd ve James, 1991), karbon ve fosfat içeren zayıf bir organik asit olup, organofosfatlı bir herbisittir. $C_3H_8NO_5P$ ($HO-CO_2NHCH_2P(=O)(OH)_2$) formülünde olup, renksiz katı kristaller halinde bulunmaktadır. (Knuuttila ve Knuuttila, 1979). Glifosat berrak görünüm de olup formu granül yani serbest akışlı, tozsuz, higroskopiktir. Hafif kokuludur. Yanma noktası yoktur, yanıcı katı madde olarak sınıflandırılmaz. Erime noktası $185^{\circ}C$ dir. Buhar basıncı $<10^{-5}$ ($25^{\circ}C$) olup partikül çapı $700\ \mu m$ dir. Molekül ağırlığı 169,1, toz yoğunluğu $0,70\ g/cm^3$, sudaki çözünürlüğü ise $10,1\ g/L$ ($20^{\circ}C$) dir. Asidik yapıdadır, pH değeri 3,6'dır.(Şekil 1.1)



Şekil 1.1. Glifosatın kimyasal yapısı

Polar yapılı olan glifosat, suda çözünebilen fakat organik çözücülerde çözünmeyen bir kimyasaldır (Estévez vd., 2005). Glifosatın ana molekülü olan aminometilfosfonik asit

(AMPA)'in de polaritesi yüksektir. Sürfaktan içeren birçok ticari glifosat ürünleri, glifosatın suda çözünürlüğü fazla olan izopropilamin veya trimetilsülfonyum tuzları ile formüle edilmektedir. Bitki hücrelerine girişi kolaylaştıran sürfaktan madde olan polioksietilen amin içeren Roundup formulasyonlarında farklı oranlarda bulunmaktadır (Arnett vd., 1988).

Organofosfatlı bir herbisit olan glifosat; tarım alanlarında, bahçe bakımında ve ormanlık alanlarda istenmeyen bitkilerden kurtulmak amacı ile uygulanmış olup büyük başarı sağlamıştır (Chan ve Mahler, 1992). Seçici olmayıp geniş spektrumludur. Yüksek aktiviteye sahip olan glifosat tek ve çok yıllık bitkilerde çok etkilidir. Roundup ilk glifosatlı herbisit olup 1970'lerin başında ABD'ndeki kimyasal şirket Monsanto tarafından üretilmiştir (Greuter vd., 2000). Avrupa ve ABD ülkelerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Glifosat Roundup'un aktif bileşeni olup 1991-2001 yılları arasındaki dünya pazarındaki satışını 3 katına çıkarmıştır (Barry, 2001). Avrupa birliğinde glifosat kullanım oranı %129'a çıkmıştır (Madigan vd., 1997). 1991-1995 yılları arasında, öteki herbisitlere göre daha az toksisitesinin kabul edildiği glifosatın herbisite dirençli olarak üretilen transgenik bitkilerin de bu herbisiti kolayca kaldıracağı belirtilmiş ve piyasaya sürülen bu transgenik bitkilerle beraber ABD 'nde 1997 yılından itibaren glifosat kullanımı çok fazla artmıştır (Vollenhofer vd., 1999). İngiltere'de ise 487,21 ton glifosat 1996 yılında tarım alanlarına uygulanmış, yaklaşık 571,673 mha alanda glifosat uygulaması yapılmıştır (Bender vd., 1996).

ABD'nde Roundup'a genetiği değiştirilmiş dayanıklı ürünlerin ekilmesi, genel tüketimden daha fazla glifosat uygulamasına ve dolayısıyla glifosat kirliliğinde artışa sebep olmuştur. ABD'nde glifosat tüketimi 1995 yılından 2000 yılına kadar yaklaşık 9 kat artmıştır (Song vd., 2005). ABD'nde sadece soya fasulyelerine 2004 yılında 26 milyon kg'dan fazla glifosat uygulanmıştır (Greuter vd., 2000). 2004 döneminde Arjantin'de kullanılan Roundup miktarı yaklaşık 160 milyon litredir (Song vd., 2005).

Soya fasulyesi, pamuk ve mısır gibi ürünlere herbisite karşı direnç geni aktararak genetiği değiştirilmiş olup; bunların glifosatla birlikte kullanılmasıyla tozlaşma ile birlikte direnç geninin yabancı bitkilere geçmesiyle glifosata dirençli harika yabancı otların ortaya çıkabileceği konusunda uyarılar giderek artmaktadır. İddia edilenin tersine, herbisite karşı direnç geni aktarılan soyaların zaman içinde herbisit kullanımında artışa yol açtığı bildirilmiştir (Mellon vd., 2001). Glifosat kullanımındaki artış, hayvanların ve insanların besinler yoluyla daha çok glifosat kalıntısına maruz kalmalarına sebep olmaktadır (Cessna vd., 2002).

Glifosat kullanımı sonucunda kalıntılar havuç, marul ve arpada ortaya konulmuş ve kalıntıların marulda tüketiminden 5 ay sonra, arpada ise 4 ay sonra ortaya çıktığı belirtilmiştir (Shah vd., 1990). Glifosat kalıntısı soya fasulyesinin yapraklarında ve köklerinde, 1,9'dan 1,8mg/kg'a kadar, tohumlarında ise 0,1'den 1,8mg/kg'a kadar tespit edilmiştir. Glifosat ürün verme döngüsünde birkaç kez tekrarlandığında, kalıntıda artış gözlenmiştir (Willamowski vd., 2004).

Seralarda glifosat genellikle gen aktarımından hemen önce, toprakta mantar varlığında yabancı ot çoğalmasını önlemek için lifli sebzelere uygulanmaktadır. Glifosat uygulamasından 15 gün sonra seralarda domateslerin lifleri üzerinde biyokütle birikiminin azalmasına neden olacak glifosat kalıntısı bulunmuştur (Gilreath ve Santos, 2004). Sığır ve kümes hayvanları 100mg/kg glifosatlar günlük beslendikten sonra karaciğer ve böbreklerinde önemli derecede glifosat kalıntısına rastlanmıştır. Hayvanların süt, yumurta ve etlerinde ise çok az miktarda saptanmıştır (Kanis, 1994).

Glifosat polar, suda çözünürlüğü yüksek (12 g/L), organik çözücülerde ise çözünmeyen bir kimyasaldır (Fonseca ve Fleming, 1993). Ana metaboliti olan aminometilfosfonik asit (AMPA)'ın da polaritesi yüksektir. Birçok ticari glifosat ürünleri, glifosatın suda çözünürlüğü yüksek olan izopropilamin veya trimetilsülfonyum tuzları ile formüle edilmekte ve sürfaktan içermektedir. Glifosatın en çok kullanılan ticari formu Roundup da formülasyonunda farklı oranlarda, bitki hücrelerine girişi kolaylaştıran sürfaktan madde olan polioksietilenamin (POEA) içerir (Azzam ve Bashara, 1987).

Glifosat toksisitesi aktif madde ile birlikte kullanılan sürfaktan maddeyle ilişkilidir. Sürfaktan madde tek başına glifosata göre daha az toksik olmasına rağmen, diğer bileşenlerle birlikte Roundup'ın toksisitesini arttırmaktadır (Carlisle ve Trevors, 1988). Glifosat ile birlikte kullanılan sürfaktan madde ise daha toksik özellikte olup, fareler ve tavşanlar için oral uygulamada, akut glifosat LD50 değeri 4-6 g/kg (Atkinson, 1985) iken, fareler için POEA'nin LD50 değeri 1-2 g/kg olarak belirlenmiştir (Usuku vd.,1988). Farelerde glifosatın gelişim toksisitesi 1000 mg/kg, oral LD50 değeri 5000 mg/kg, LC50 değeri ise 3,18 mg/L olarak belirlenmiştir (Walpole ve Leader-Williams, 2002).

Araştırmacılarca yapılan anafaz-telofaz soğan testinde, Roundup'ın glifosata göre daha toksik olduğu saptanmıştır (Fonseca ve Fleming, 1993; Rank vd., 1993). Akut toksisite üzerine yapılan çalışmalarda da, glifosat ve sürfaktanın birlikte bulunduğu ticari ürünlerintoksik etkisinin, glifosatın tek başına olan toksik etkisinden daha fazla olduğu saptanmıştır (Adams vd., 1997; Dallegrave vd.,2003). Roundup'ın farelerin ölümüne neden

olduğu doz, glifosatın tek basına ölüme neden olduğu dozun 1/3'i kadardır (Brown vd., 1991). Glifosatın çevresel olarak güvenli olduğu savunulsa da, yapılan çalışmalarda sub-kronik maruziyette glifosatın gebe farelere toksik olduğu ve yetersiz kemikleşmeye neden olabildiği belirtilmektedir (Brown, vd.,1991; Chan ve Mahler, 1992; Potts vd., 1994).

1.2. Glifosatın Kullanım Alanları

Birçok ülkede karasal ve akuatik ortamda glifosat etkin olarak kullanılmaktadır (Worthing, 1987). Yabancı otların kontrolünde Türkiye'de sadece narenciye, elma, armut, erik, zeytin ve muz bahçelerinde kullanılmaktadır (Özer, 1997). Dar ve geniş yapraklı bitkilere karşı; turuncgillerde ve fındıklarda 1000 ppm, meyvelerde 700-1200 ppm'de nehir, göl kenarlarında, kamış ve sazlıkların kurutulmasında, sulama kanallarının yabancı otlardan korunmasında, fabrika ve demir yollarının kenarlarındaki otların ortadan kaldırılmasında kullanılmaktadır (Silverman ve Keller, 1992).

1976 döneminde glifosat ABD'de başlıca tarım ürünlerinde, arpa, buğday, mısır, soya fasulyesinde kullanılmış, 1980 yılında 502'nin üzerindeki tarım ürünleri ile endüstri bölgelerinde kullanılmıştır (Henis ve Tripodi, 1980).

1.3. Glifosatın Bitkilerde Etki Mekanizması

Bitkilerde etkisini glifosat fenilalanin, trozin, triptofan gibi aromatik amino asitlerin oluşumu için şart olan enzim 5-enolpiruvil-şikimat-3-fosfat sentaz sentaz enzimini (EPSPS) inhibe ederek gösterir. Yapılan araştırmalarda bitkilerde P-450 enzim sistemini etkilediği bulunmuştur (Jonker vd.,1998).

Glifosat bakteri ve mantarlarda da protein sentezini engellemektedir. Glifosat hektara 4 kg'dan daha fazla uygulandığı zaman topraktaki serbest bakterilerin nitrojen fiksasyonunda inhibisyona neden olmasının yanı sıra, solunumu etkileyerek hücre boyutunda küçülmeye neden olduğu bulunmuştur (Bentley ve Haslam, 1990; Santos ve Flores, 1995). Memelilerde şikimat metabotolik yolu olmadığından memelilerde glifosatın toksik etkisinin daha düşük olabileceği ileri sürülmüştür (Atkinson, 1985; Santos vd., 2007).

1.4. Glifosatın Çevresel Yayılımı

Çoğalan glifosat kullanımıyla beraber spreyleme esnasında glifosatın havada yayıldığını göz önünde bulundurursak, glifosatın hedef olmayan ürünlere ulaşp bu ürünleri hasara uğrattığı gözlemlenmiştir. Üreticiler lifli sebzeler üzerinde glifosatın sebep olacağı zararları gözlemlemişlerdir. Bu hasarlar, çok belirgin olmayan klorotik terminal tomurcuk ve yapraklarda geniş yayılım gösteren nekrozlar kaydedilmiştir (Gilreath, 2000). Glifosatın uygulama sırasında rüzgârdan dolayı sürüklenbildiği, dolayısıyla çevresel yayılımının ve birikiminin söz konusu olabildiği tespit edilmiştir (Daruich vd., 2001).

Glifosat kalıntıları ve metabolitleri besin zincirine karışabilir ve toprakta birikebilir (AMPA ve formaldehit). Fazla glifosat kullanımına bağlı olarak da suda ve uygulama alanlarına yakın bölgelerde yüksek glifosat tespit edildiği gibi, glifosat metabolitleri de toprak ve nehirlerde tespit edilmiştir (Neer vd., 1994).

Toprakta bulunan glifosat yağın yağmurla birlikte sulara karışarak akıntılar ile uygulandığı bölgeden farklı bölgelere taşınarak akıntı yönünde kirliliğe neden olmaktadır (Peruzzo vd., 2008).

1.5. Glifosatın Toprakta Kalıcılığı

Glifosatın biyolojik olarak yararlanımında ve hareketliliğinde, topraktaki kalıcılığı için toprak yüzeyindeki mineral bileşenlerin adsorpsiyonu ve mikrobiyal enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar önemlidir (Rueppel vd., 1977; Forlani vd., 1999; Busse vd., 2001; Araujo vd., 2003; Haney vd., 2003; Gimsing vd., 2004; Kools vd.,2005).

Glifosatın mineralleşme hızı topraktaki mikroorganizmaların aktivitesine ve biyokütlesine bağlıdır. Glifosatın mineralleşme hızını etkileyen faktörler aynı zamanda glifosatın topraktaki kalıcılığını da etkilemektedir (Wirén-Lehr vd.,1997).

Mikrobiyal parçalanma süreci, oksijensiz ortamda oksijenli ortama göre daha yavaş olmaktadır ve bu süreç, herbisitlerin topraktaki kalıcılığını belirleyen en önemli faktördür (Hill vd., 1991; De Souza vd.,1999). Topraktaki mikroorganizmaların genel aktivitesine göre indirgenme hızı değişim göstermektedir, glifosatın C-N bağının ayrılması ile biyolojik parçalanma gerçekleşmektedir ve parçalanma sonucu AMPA oluşmaktadır ve aynı zamanda su, CO₂ ve fosfat açığa çıkmaktadır. Toprakta uzun süre biriken AMPA'nın bozunma hızı glifosata göre daha yavaştır (Rueppel vd., 1977; Roy ve Kailath, 1989; Gimsing vd., 2004).

Glifosat toprakta parçalanması kolay olan bir maddemolekül yapısına sahip olmuş olsa da yarı ömrü organo-mineral komplekslere absorpsiyonuna bağlı olarak birkaç günden birkaç aya kadar değişebilmektedir (Santos ve Flores, 1995). Araştırmalar sonunda glifosatın topraktaki yarı ömrünün 30-90 gün kadar olduğu bulunmuştur (Roy ve Kailath, 1989). Silikatlar, metal oksitler, kristalize olmayan materyaller ve organik maddeler ile glifosat bağ kurarak toprakta sıkı bir biçimde tutunur ve bu şekilde toprakta kalıcılığı 174 günden fazla devam edebilir (Rolls vd., 2003).

Yapılan araştırmalarda çeşitli toprak tiplerine 32 günlük glifosat uygulamaları sonucu, AMPA'nın çok fazla glifosatın az olduğunu tespit etmişlerdir (Haney ve Bahar, 2014). Glifosatın topraktaki kalıcılığını; kimyasal parçalanma ve fotoliz de etkilemektedir. Yapılan çalışmada, glifosatın toprakta mineralizasyon hızını arttırdığını bulmuştur (Rueppel vd., 1977).

Serbest glifosatın parçalanmasının adsorbe olmuş glifosata göre hızlı olması, onun topraktaki kalıcılığını azaltır (Fonseca ve Fleming, 1993). Glifosat ve parçalanma ürünü AMPA'nın toprakta hızlı bir şekilde 30 cm derinliğe kadar indiği gözlenmiş ve bu derinlikte biyolojik aktivitenin yüzeye (0-20cm) göre düşük olmasına bağlı olarak daha yavaş indirgendikleri tespit edilmiştir (Göksu vd., 2003). Uygulandığı toprakta tespit edilen glifosat miktarı, bu alanda yapılan glifosat miktarı ile doğru orantılıdır (Gerişlioğlu, 2010).

1.6. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler ya da bir diğer ismiyle polifenoller; bir veya birden fazla sayıda hidroksil grubunun bağlanmış olduğu bir benzen halkasından oluşmaktadır. En az bir aromatik halka ve bu halkada çok miktarda hidroksil substitüenti bulunduran bileşiklerin hepsine fenolik bileşikler denir (Bravo, 1998).

Kimyasal olarak aromatik benzen halkası içeren maddeler ve türevleridir. -OH grubu içeren benzen "fenol" olarak adlandırılır. En basit fenolik bileşik; 1 tane -OH grubu içeren benzen, yani fenoldür. Fenolik bileşikler, bitkinin çevresel stres koşullarına (UV radyasyon, patojenler vb) karşı savunma mekanizmasının sonucunda oluşan sekonder metabolitlerdir (Kafkas vd., 2006).

Fenolik bileşikler insan ve hayvan beslenmesinde yer alan bitki içerisindeki yapılardır. Hidroksi benzen grubu içeren maddeler vitaminler ve mineraller gibi en geniş göze çarpan diyet gruplarıdır. Günümüzde sekiz binden fazla polifenol türevli madde ortaya çıkarılmıştır.

Bitki yapılarında bulunan fenolik bileşiklerin en basit fenol grubundan tutunda en kompleks yapıları olan fenol grupları bulunmaktadır. Polifenoller bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunmaktadır (Bilaloğlu vd., 1999; Cemeroğlu, 2004; Coşkun, 2006).

Son dönemlerdeki yapılan araştırmalarda polifenollerin kanser ve geriatric bozuklukların önlenmesinde önemli rol oynadıkları bulunmuştur. Son yıllarda yeni türler olarak tanımlanan fenolik bileşiklerin hayvan hücre sistemi içerisinde antioksidan, anti-inflamator, anti-östrojenik, anti-mutajenik, anti-kanserojenik etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Lynnette, 2001). Ayrıca bazı çalışmalarla da fenolik bileşiklerin, serbest radikallerin kaynağına ve yoğunluğuna bağlı olarak hem antioksidan hem de prooksidan olarak rol oynadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte diyet fenolik bileşiklerinin belli koşullarda sitotoksik ve prooksidan özellikler sergilediği rapor edilmiştir (Sakihama vd., 2002).

Epidemiyolojik veriler; kalp-damar hastalıkları ve felcin oluş sıklığı ile fenolik bileşikçe zengin besinleri (meyveler, sebzeler, kakao içeren çikolata vs.) veya içeceklerin (üzüm suyu, çay vs.) kullanımı arasında negatif bir ilişkinin olduğunu göstermiştir (Miyagi vd., 1997; Rein vd., 2000).

Fenolik bileşikler, bitkiler âleminin en yağın ve en çok bulunan bileşik sınıfıdır (Ryan vd., 2002). Fenolik bileşikler bitkilerde, çiçek, yaprak, meyve renkleri, bazı bitkilere koku vermeye beraber bitkileri böcek ve mikroorganizma saldırılarına karşı koruma gibi vazifeleri de vardır (Bohm, 1998; Griesbach, 2005; Buer ve Djordjevic, 2010). Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Cemeroğlu, 2004).

Flavonoidler, bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Fenolik bileşiklerin bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında, özellikle ağızda acılık ve burukluk gibi iki önemli tat unsurunun oluşmasında etkilidirler. Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadırlar. Meyve ve sebzelerin işlenmelerinde enzimatik esmerleşme gibi değişik sorunlara da neden olmaktadır. Fenolik bileşiklerin oksidasyonuna neden olan bu reaksiyonları katalize eden enzimlere genel olarak polifenoloksidaz enzimleri (PPO) adı verilmektedir. Gıdalarda enzimatik esmerleşme, genellikle kalite kaybı olarak değerlendirilmekte ve bu nedenle meyve ve sebzelerin işlenmeleri sırasında fenolik maddelerin oksidasyonları çeşitli yöntemlerle önlenmeye çalışılmaktadır. Fenolik bileşikler endüstride; patlayıcı madde, farmasötik, plastik, kâğıt,

boya, ilaç, pestisit ve antioksidanların üretimi gibi birçok yerde kullanılmaktadır (Wang vd., 2000; Arakawa vd., 2002).

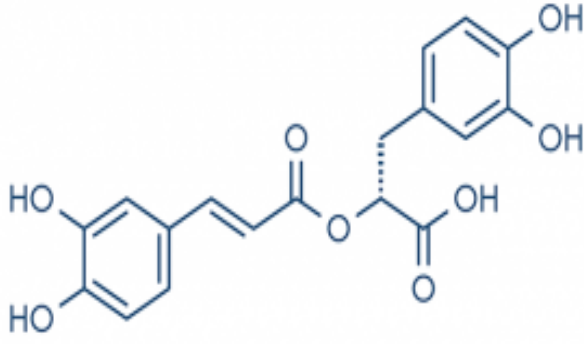
1.6.1. Fenolik Bileşiklerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Günümüzde fenolik maddeler esansiyel olmamakla beraber besin değeri de olmayan bileşik olarak düşünülmektedir. Fakat insan sağlığı üzerine faydaları da olduğu bilinmektedir (Hollman vd., 1996). Polifenollere, beslenme fizyolojisi açısından pozitif etkilerinden dolayı biyoflavonoidler adı da verilir (Saldamlı, 2007; Cemeroğlu, 2004).

Flavonoidlerinen önemli biyolojik özelliği olarak, antioksidatif etkiye sahip olmaları gösterilmektedir. Meyve ve sebzelerin içerdiği antioksidan özelliğin C ve E vitaminleri ile α -karotenden çok flavon, izoflavon, antosiyanin, kateşin ve izokateşin gibi flavonoidlerden dolaydır (Wang vd., 1996). Fenolik bileşiklerin kalp sağlığı üzerinde de olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Örneğin, siyahçay, soğan ve elmadaki flavonoidlerin fazla miktarlarda alınmasının yaşlılarda kalp hastalıklarına bağlı ölümleri azalttığı bildirilmiştir (Langseth, 1995).

1.6.2. Rosmarinik Asit

Artemisia capillaris, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* gibi birçok bitkide bulunan rosmarinik asit (RA) doğal polifenolik bir bileşiktir. Bugüne kadar çeşitli dokularda yapılan araştırmalar sonucunda rosmarinik asitin antioksidan, antiviral ve anti-inflamatuar etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu özellikleri göz önünde bulundurularak nörodejeneratif süreçlerdeki moleküler değişimlere etki ederek koruyucu olabileceği ileri sürülmüştür. Nitekim rosmarinik asitin sivrisinek kaynaklı viral bir hastalık olan Japon ensefalitinde anti-inflamatuar etki gösterdiği bulunmuştur (Durak vd., 1999). Rosmarinik asitin kimyasal yapısı Şekil 1.2. de görülmektedir.

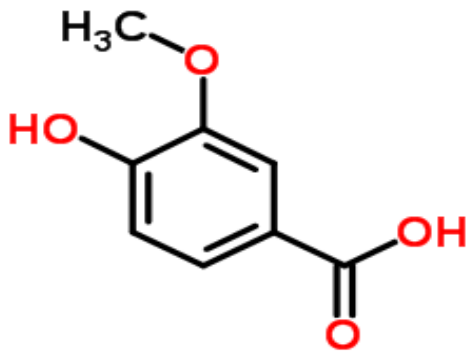


Şekil 1.2. Rosmarinik asitin kimyasal yapısı

Biberiye bitkisinden elde edilen rosmarinik asidin antioksidan aktivitesini ölçüp, C ve E vitaminlerinden daha etkili olduğu belirlenmiştir. Rosmarinik asitin 0,49µM derişiminin DPPH radikalini %50 oranında süpürdüğü bulunmuştur (Chawla vd., 2002).

1.6.3. Vanilik Asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit)

Birçok bitkide yüksek oranda bulunan vanilik asit geleneksel tıpta kullanılır. Vanilik asit fenolik karboksil grubu içermesinden dolayı antioksidan bir bileşiktir (Poo, 2010). Vanilik asitin kimyasal yapısı Şekil 1.3’de görölmektedir.



Şekil 1.3. Vanilik asitin kimyasal yapısı

İnsan hastalıkları tedavisinde kapsamlı bir şekilde vanilik asit kullanılmıştır. Yiyeceklere koruyucu madde olarak katılan vanilik asit aynı zamanda gıda, eczacılık, kozmetik gibi endüstri alanlarında da antiseptik madde olarak kullanılmasına sebep olmuştur (Vurucu, 2006).

Bitki gıdalarının önemli bir kısmını oluşturan vanilik asitin anti oksidan özelliğinden dolayı ateroskleroz ve kanser gibi çağımızın hastalıklarının önlenmesinde önemli bir rolü vardır (Mattila ve Kumpulainen, 2002). Vanilik asit (4-hidroksi-3 metoksibenzoik asit), yenilebilir sebze ve meyvelerden elde edilen fenolik bir bileşik türevidir. Vanilik asitin; antibakteriyel, antimikrobiyal, anti-filarial ve hepatoprotektif özellikte etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır (Sinha vd., 2009). Ayrıca, geleneksel tıpta şeker hastalığı, hemorajikenflamasyon, hipertansiyon, ülser ve ateşte de kullanılır (Ohashi vd.,1995).

1.7. Antioksidanlar

Antioksidanlar genellikle yapısında fenolik fonksiyon taşıyan moleküller olup; serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya ortamda bulunan radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engeller (Kahkonen vd.,1999). Antioksidanlar ,yükseltgenebilen substratlara oranla daha düşük konsantrasyonlarda,substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu önemli derecede engeller ya da geciktirir. İnsan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler antioksidanların şunlardır: antioksidanların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir (Kaur ve Kapoor 2001).

Antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretildiği gibi besinler aracılığıyla da alınabilmektedir. Besinlerde bulunan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler , karotenoidler, ve fenolik bileşiklerdir. Birçok araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki vardır (Topaloglu vd., 2009).

Antioksidanların en önemlileri fenolik bileşikler ve bunların türevlerinden oluşmaktadır. Bu fenolik bileşikler oksidatif sistemde farklı biçimlerde davranabilirler. Örneğin; singlet oksijeni sönmeye uğratarak oksijen yoğunluğunu düşürebilirler. Metal iyon katalizörlerini bağlayarak, hidoksil radikalleri gibi birincil radikalleri tutma özelliğini kullanarak zincir reaksiyonlarının başlamasını önlerler (Stiglitz ve Shahid,1996). Yükseltgenebilen maddeler olduğundan antioksidanlar zincir reaksiyonlarını koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar (Güçlü vd., 2009).

Bu yüzden antioksidanlar yükseltgenebilen maddeyi sadece sınırlı bir vakit içinde koruyabilirler ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeyi sürdürür. Antioksidanların hidrojen veya elektron donör araçları olarak

indirgeme potansiyelleri başka bir ifadeyle kimyasal aktiviteleri genellikle onların serbest radikal tutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile belirtilir (Topaloglu vd., 2009). Antioksidan aktivitenin zincir koparıcı etkisinin değerlendirilmesinde antioksidanın hem molekül başına verebildiği elektron ya da giderebildiği serbest radikal sayısı, hem de reaksiyonun hızı önemlidir (Rice-Evans vd., 1997).

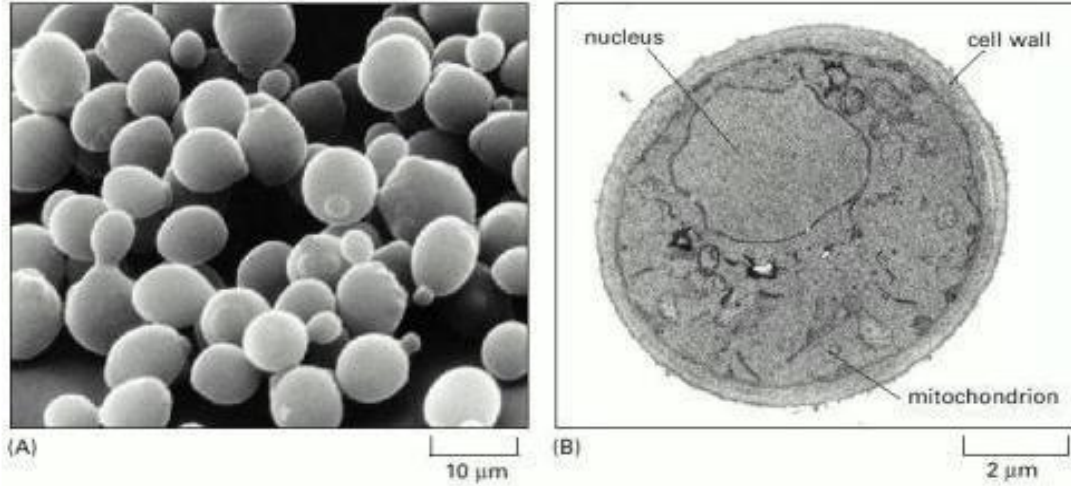
Bir antioksidanın aktivitesi şu faktörler ile belirlenir:

1. Hidrojen veya elektron donör aracı olarak gösterebildiği reaktivite (Genelde indirgeme potansiyeline bağlıdır).
2. Antioksidandan türeyen radikalın akıbeti.
3. Diğer antioksidanlarla etkileşim yeteneği.
4. Geçiş metali şelatlama potansiyeli (Rice-Evans vd., 1997)

1.8. Maya Hücresi (*Saccharomyces cerevisiae* L.)

Saccharomyces cerevisiae L., ekmek ya da bira mayası olarak da isimlendirilen fungus alemine ait bir maya türüdür (Barnett ve Robinow, 2002). Boyu 10 -30 µm ve eni 2 -6 µm olan maya hücresinin boyutu bakterilerden daha büyük olup genellikle elips şeklinde olan canlılardır (Şekil 1.4), (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2010).

Canlı veya kuru olarak *S.cerevisia* L., % 20-40 oranında karbonhidrat içermektedir. Mayaların büyük çoğunluğunun hücre duvarı beta-glukan ve mannan polisakkaritlerini içermesi bakımından önemlidir. Bu polisakkaritleri önemli kılan özelliği bağışıklık sisteminde ve sindirim sisteminde patojenik bakterilerin oluşumunu engellemesidir. Kolay ulaşılabilir ve besin değerinin yüksek olmasından dolayı hayvanların besin kaynağı olarak çok tercih edilmektedir (Yağmur, 2006).



Şekil 1.4. A. *S.cerevisiae* 'nın taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Albert vd., 2002),
B. *S.ceravisiae* 'nın transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü (Albert vd., 2002)

Mayaların insanlar ve hayvanlar için zengin protein kaynağı olduğu, yapısında %50'den fazla protein içerdiği yapılan deneysel araştırmalarla belirlenmiştir (Rose, 1979). Maya proteinlerinin %80-90 oranında absorpsiyonunun ve sindiriminin gerçekleştiği görülmüştür. Mayalarda lizin amino asiti yüksek oranda bulunmuştur (Köksal, 1980). Mayaların vitamin B kompleksi bakımından oldukça zengindir (Thiamin, Riboflavin, Niasin, Pantotenik asit ve Inositol). Çok iyi bir besin kaynağı olduğunu sterol yapan D vitamininde içermesiyle ispatlamıştır. Yapısında bulunan maddeler bağışıklığını güçlendirmekte olup enfeksiyonlara karşı direnci artırmaktadır (Yağmur, 2006).

Biyokimya, genetik ve molekülerbiyoloji gibi alanlarda yapılan araştırmalarda en çok kullanılan eukaryotik hücre modelleri içinde yer almaktadır. *S. cerevisia* L.; biyolojik mekanizmaların ortaya çıkarılmasında hayvanlar, bitkiler ve mantarlar üzerinde yapılan genomik, proteomik ve metabolik çalışmalarda en önemli organizmadır (Braconi vd., 2006; Braconi vd., 2015).

1.9. Daha Önceden Yapılmış Çalışmalar

Nicolai ve arkadaşları (2016)'nın yaptıkları çalışmada medikal bitkilerinin etanollü ekstretelerinin ultrason destekli antioksidan aktiviteleri rosmarinik asitle incelenmiştir. Bu çalışmada sonikasyon altında elde edilen etanolik bitki ekstretelerinden adaçayında en yüksek oranda antioksidan bulunmuştur. 0.1 mg/mL özütte DPPH yöntemiyle sırasıyla, % 92.7, % 95.2 ve % 94.7 ölçülmüştür. 270nm'de HPLC ile yapılan analizde yüksek

konsantrasyonlu ultrason destekli etanollü ekstratlar asit içeriği 2,76 Mm ,% 10.1 (w/w) rosmarinik asite karşılık gelmiştir. Bu yöntemle göre limon, biberiye, adaçayı özleri sırasıyla % 0.8 , %5,1, %4,3 konsantrasyonlara sahip olmuştur. Yapılan bilimsel araştırma sonucunda bilim ve teknolojiyle birlikte geleneksel olarak kullanılan bitkilerin yüksek oranda antioksidan içerdiği görülmektedir. Deneysel araştırmada HPLC yönteminin kullanılması ve rosmarinik asitin antioksidan özelliğinin bulunması araştırmayı daha ilgi çekici hale getirmektedir.

Gerişlioğlu (2010) yaptığı çalışmada glifosatın sıçanlar üzerindeki toksik ve teratojenik etkilerini incelemiştir. Bu araştırmada gebe sıçanlara, gebeliklerinin 1. gününden itibaren akut oral LD50 dozu 5600 mg/kg olan Roundup (% 78,5 glifosat, % 18 POEA)'ın LD50 dozunun 1/10'u (560 mg/kg/gün) ve 1/5'i (1120 mg/kg/gün) uygulanarak, Roundup'ın anne ve fetüste oluşturacağı teratojenik etkileri araştırılmıştır. Bu nedenle gebeliğin ilk gününden 20. gününe kadar her gün her bir sıçanın tükettiği yem ve su miktarları ölçülüp kaydedilmiştir; aynı zamanda uygulama gubu olanlarda gözlemlenmiştir. Anne ve fetüsün her gün vücut ağırlıkları, böbrek ve karaciğer ağırlıkları; fetüsün ekstremiteler uzunlukları, fetüsün boyu, plesanta ağırlıkları ölçülmüştür. Annenin kan serumu ölçülmüş, karaciğer enzimleri ALT, AST ve LDH değerleri ile böbrek fonksiyonlarının ölçümünde temel alınan BUN ve CRE değerleri ölçülmüştür. Karaciğer ve böbrekleri histopatolojik yönden değerlendirilmiştir. Gerişlioğlu'nun (2010) çalışmasında gebe sıçanlara uygulanan glifosatın yem ve su tüketiminde azalma olduğu tespit edilmiştir. Gebe olan sıçanlarda zayıflama tespit edilmiştir. Buda kullanılan glifosattan kaynaklanmaktadır. Son yıllarda yapılan birçok araştırmada ticari olarak kullanılan glifosat ve türevleri benzer etkiyi göstermektedir.

1.10. Çalışmamızın Amacı

Çalışmamızda *Saccharomyces cerevisiae* L. kültür ortamında glifosat toksisitesine karşı rosmarinik ve vanilik asitlerinin antioksidan ve biyokimyasal etkileri araştırılması amaçlandı. Glifosatın tarım alanlarında sıkça kullanılması nedeniyle toksik etkisinin nasıl en aza düşürülebilir çalışmanın amacını oluşturdu. *Saccharomyces cerevisiae* L. kültür ortamına düşük, orta ve yüksek dozda glifosat, aynı zamanda düşük, orta, yüksek dozda rosmarinik ve vanilik asitlerde uygulanarak yağ asidi, vitamin, GSSG ve MDA düzeyleri incelendi.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kullanılacak Kimyasallar ve Organik Çözücüler

Tris-HCl baz ve metanol, asetonitril, n-hekzan, n-heptan, izopropanol, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , butilhidroksitoluen (BHT), etil alkol, sodyum klorür, potasyum bikarbonat, yağ asidi metil esteri (doymuş ve doymamış türleri), ergosterol, beta sitosterol, stigmasterol, α - tokoferol, K_2 vitamini, K_1 vitamini, EDTA, glutatyon (GSH ve GSSG), trikloroasetik asit (TCA), 5,5'ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB), sodyum sitrat, bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sodyum potasyum tartarat, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, folin reaktifi, albumin standardı, metafosforik asit (MPA).

2.2. Fenolik Asitlerin DPPH Temizleme Aktivitesi

Rosmanirik asit ve vanilik asitlerin DPPH, serbest radikal temizleme aktivitesi, Brand-Williams vd. (1995) tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. Serbest radikal olarak 25 mg/L α, α -Diphenyl-b-picrylhydrazyl (DPPH) metanolde hazırlanılıp kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla DPPH çözeltisinden 4 ml ilave edilerek ve daha sonra 20, 40, 80, 120, 240 μL . flavonoid çözeltileri ilave edilip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiş olunulup ve inkübasyon sonunda absorbansları 517 nm'de blanka (metanol) karşı spektrofotometre de okundu. Azalan absorbans değeri DPPH miktarı serbest radikal giderme aktivitesi olarak belirlendi. Sonuçlar formüle göre hesaplandı: $\% = \frac{\text{Kontrol ABS} - \text{Sample ABS}}{\text{Kontrol ABS}} \times 100$. Konsantraasyon % olarak belirlendi.

2.3. *In Vitro* Maya Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Bu amaçla; öncelikle deneyde kullanılacak olan *S. Cerevisiae* L. (Ekmek mayası) gelişimi ve çoğalması için YEDP (100 mL için 1 g yeast ekstrakt, 2 g bactopecton, 2 g glukoz) besi yeri ortamı hazırlanmıştır. Besi yeri ortamı hazırlandıktan sonra aşağıdaki gruplara ayrıldı:

2.3.1. Kontrol grubu (K)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* L. hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g yeast ekstraktı, 4 g baktepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlandı.

2.3.2. Glifosat grubu (G)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* L. hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 4 g baktepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı içerisine 40, 80 ve 160 mg konsantrasyonlarda glifosat içerecek şekilde gruplar hazırlandı. Her konsantrasyon ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü.

2.3.3. Rosmarinik asit (RA)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* L. hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2g maya ekstraktı, 4g baktepton ve 4g glukoz içeren besiyeri ortamı içerisine 40, 80, 160 mg konsantrasyonlarda RA içerecek şekilde gruplar hazırlandı. Her konsantrasyon ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü.

2.3.4. Vanilik asit (VA)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* L. hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2g maya ekstraktı, 4g baktepton ve 4g glukoz içeren besiyeri ortamı 40, 80 ve 160 konsantrasyonlarda VA içerecek şekilde gruplar hazırlandı. Her konsantrasyon ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü.

2.3.5. Glifosat+Rosmarinik Asit Grubu (RA+G)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* L. hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2g maya ekstraktı, 4g baktepton ve 4g glukoz içeren besiyeri ortamı içerisine 40, 80 ve 160 mg konsantrasyonlarda ayrı ayrı RA ve G içerecek şekilde gruplar hazırlandı. Her konsantrasyon ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü.

2.3.6. Glifosat+Vanilik Asit Grubu (VA+G)

Bu gruptaki *S. cerevisiae* L. hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 4 g baktopepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı içerisine 40, 80 ve 160 mg konsantrasyonlarda ayrı ayrı VA ve G içerecek şekilde gruplar hazırlandı. Her konsantrasyon ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü.

Bütün gruplar 30 °C’de 72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, hücrelerin yoğunluğu 600 nm’de spektrofotometrede ölçülerek belirlendi. Bu işlemde hemen sonra her kültür ortamındaki hücreler steril falkon tüplerine alınarak 6000 rpm’de ve +4°C’de santrifüj edilerek hücre peletleri toplandı. Daha sonra hücre peletleri % 0,9’luk NaCl çözelti ile yıkanarak kültür sıvısı atıklarından temizlendi. Hücre peletlerinin yıkama işleminden sonra yaş ağırlıkları belirlenerek fosfat ve TRIS-ETDA tamponu (pH=7.4) ile homojenize edildikten sonra, total protein, GSH ve GSSG ölçümü, vitamin C düzeyi, glutatyon S transferaz enziminin aktivitesi belirlendi. Ayrıca, n-hekzan/izopropil alkol karışımı (3/2, v/v) kullanılarak homojenize edildikten sonra membran lipidleri, steroller ve α - tokoferol ve K vitaminleri gibi lipofilik moleküller ile yağasitlerinin ölçümleri yapıldı.

2.4. Protein, GSH, GSSG, MDA ve GST Ölçümü için Hücre Peletinin Ekstraksiyonu

Hücre peletleri % 0,9’luk NaCl ile yıkandıktan sonra, yaş ağırlıkları belirlendi ve 10 mL 50 mM Tris-20 mM EDTA (pH= 7,40) tampon karışımı ile soğuk ortamda homojenize edildi. Bu işlemde sonra +4°C’de 9000 rpm’de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst süpernatant kısım alınarak total protein (Lowry yöntemi), GSH ile GSSG, MDA ve GST aktivitesi ölçüldü.

2.5. GSH ve GSSG Miktarının HPLC Cihazında Ölçümü

GSH ve GSSG miktarlarının ölçümü HPLC cihazı ile analiz edildi (Klejdus vd., 2004; Yılmaz vd., 2009). Kısaca, 1 mL homejanat alınarak üzerine 1 mL % 10’luk PCA ilave edilerek deprotenize edildi ve 6000 rpm’de santrifüj işleminden sonra 1 mL otosampler viallerine alındı. Analiz için Shimadzu marka HPLC cihazı kullanıldı. Analiz için 214 nm dalga boyu kullanıldı. Cihazda pompa olarak LC-10 AD VP, UV-visible detektör olarak

SPD-M10A VP, PDA dedektörü, kolon fırını olarak CTO-10AS VP, otosampler olarak SIL-10AD VP, degasser ünitesi olarak DGU-14A ve Class VP6.26 işletim programı kullanıldı (Shimadzu, Kyota Japan). Mobil faz olarak % 0,1 TFA ve metanol (% 94/% 6, v/v) karışımı kullanıldı. Ayırma işlemi ODS-3 HPLC kolonunda yapıldı. Hesaplama işlemi standartkarışımlardan hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre Class VP 6,26 programı ile hesaplandı (Shimadzu, Kyota Japan) .

2.6. Lipid Peroksidasyon(MDA) Düzeyinin Ölçümü

MDA miktarlarının ölçümü HPLC cihazının kullanıldığı analiz metodu ile yapıldı (Karataş vd., 2002). Tris tamponu ile homojenize edilen süpernatantdan 1 mL alınarak % 10'luk perklorik asit (PCA) ile muamale edilerek proteinler çöktürüldü ve karışım 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım otosampler viallerine alınarak HPLC'de analizi yapıldı. Analiz için Shimadzu marka HPLC cihazı kullanıldı (Shimadzu, Kyota Japan).

Mobil faz olarak 30 mmol KH₂PO₄ ve metil alkol karışımı (Karatepe vd., 2004) (%82,5- %17,5, H₃PO₄ ile pH=4.0) kolon olarak da ODS-3 HPLC kolonu (150 mm x 4,6- 5 µm)kullanıldı. Mobil faz akış hızı 1 mL/dk ve PDA dedektörünün dalga boyu 254 nm'debelirlendi. Hesaplama işlemi standart karışımlardan hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre Class VP 6,26 software ile hesaplandı (Shimadzu, Kyota Japan).

2.7. Lipidlerin Ekstraksiyonu

Hücre peletinden lipidlerin ekstraksiyonu 3:2 (v/v) hekzan-izopropil alkol karışımının kullanıldığı Hara ve Radin (1978) metoduna göre yapıldı. Bunun için; hücre peletleri üzerine 10 mL hekzan/izopropil alkol karışımı 3/2,(v/v) ilave edilerek 11000 rpm'de 1 dakika süre ile homojenize edildi ve daha sonra 6000rpm'de santrifüj edilerek üst süpernatant kısım eşit olarak iki kısma ayrıldı. Ayrılan bir kısım ile peletlerdeki yağ asidi bileşimi ve diğer kısmı ile de α-Tokoferol, ergosterol ile diğer fitosterollerin miktarları belirlendi.

2.8. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Metil esteri hazırlamak için hekzan/izopropanol fazı içindeki lipit ekstraktı 25 mL'lik deney tüplerine alınarak üzerine %2'lik metanolik sülfürik asitten 5 mL ilave edilecek ve vorteks ile iyice karışmaları sağlandı. Bu karışım 55 °C'lik etüvde 15 saat süre ile metilasyona bırakıldı. Dahasonra, tüpler etüvden çıkarıldı oda sıcaklığına kadar soğutulup ve 5 mL % 5'lik NaCl ilave edilerek karışmaları sağlandı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri 5 mL n-hekzanile ekstre edilip ve hekzan fazı üstten pipetle alınarak 5 mL %-2'lik KHCO₃ ile muamele edildi. Bu karışım fazların ayrılması için 4 saat bekletilecek. Daha sonra metil esterlerinin içeren karışım, 45 °C'de ve azot akımı altında çözücüsü buharlaştırılarak 1 mLheptanda çözüldü. 2 mL'lik ağzı kapaklı otosampler vialleri içine alınarak gaz kromatogafisinde analizi yapıldı (Christie, 1990).

2.9. Yağ Asidi Düzeylerinin Gaz Kromatogafik Analizi:

Lipid ekstraktı içindeki yağasitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra Shimadzu GC 17 gaz kromatografisi ile analiz edildi. Bu analiz için, SP-2560, 25 m x 0,25 mm i.d., 0,20 µm (Supelco, Sigma,USA) özelliklere sahip kapiller kolon kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı120–220 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutuldu vekolon sıcaklık programı 120 °C'den 215 °C'ye kadar ayarlandı. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemden sonra gerekli programlama yapılarak örneklere ait yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı. Yağ asidi metil esterlerinin hesaplaması Class GC 2.00 işletim program ile her bir yağ asidinin toplam yağ asidi içindeki yüzdesi (%) ve µg/g pelet miktarı hesaplandı.

2.10. Alfa-Tokoferol ve Ergosterol'ün HPLC Yöntemi ile Analizi:

5 mL süpernatant 25ml'lik ağzı kapaklı tüpler içine alınarak üzerine % 5'lik KOH çözeltisi ilave edildi ve vortekslelendikten sonra 85 °C'de 15 dk bekletildi. Tüpler çıkartılarak oda sıcaklığına kadar soğutulup ve üzerine 5 mL distile su ilave edilerek karıştırıldı. Sabunlaşmayan lipofilik moleküller 2x5 mL hekzan ile ekstrakte edilerek azot gazı altında

çözücü uçuruldu. Daha sonra 1mL (%50 + % 50/v/v) asetonitril/metil alkol karışımında çözülerek otosampler viallerine alınıp analiz yapıldı. Mobil faz olarak asetonitril/metil alkol (% 60 + % 40/v/v) karışımı kullanıldı, mobil faz akış hızı 1 mL/dakika'dır. Analiz için PDA-UV dedektör kullanıldı ve kolon olarak da Supelcosil LC 18 (15×4,6 cm, 5 µm; Sigma, USA) kolonu kullanıldı. E vitamini ile diğer vitaminler ve fitosterollerin analizi 202 nm boyu kullanılarak yapıldı (Katsanidis ve Addis, 1999; López-Cervantes vd., 2005; Karpińska vd.,2006).

2.11. Glutasyon-S- Transferaz Enzim Aktivitesi

Glutasyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesi Habig vd. (1974) metoduna göre yapıldı. Bu ölçüm için, 1_mM 1-chloro- 2,4-dinitrobenzene (CDNB), 1mM GSH ve 0,1M fosfat (pH= 6,5) tamponu kullanıldı. Enzim aktivitesi 340 nm'de spektrofometrik olarak belirlendi. Reaksiyon karışımı 0,1 mL GSH ve 0,1 mL CDNB ilave edilerek fosfat tamponu ile hacmi 2,9 mL'ye tamamlandı ve 0,1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon başlangıcından sonra her 15 saniyede absorbans değişimi distile su blank'ine karşı 340 nm'de ölçüldü. Bu ölçüm 3 dakika içinde tamamlanarak kaydedildi.

2.12. Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deney sonucunda elde edilen veriler SPSS 15.0 istatistik programı ile değerlendirildi. Kontrol grubu ile diğer grupların ortalamaları arası farklar önce tek yönlü ANOVA ile daha sonra da her bir grubun diğerinden olan farklılıklar LSD testi yapılarak belirlendi. Deney sonuçları tablolar ve grafikler halinde verildi ve değerler ortalama ± standart hata olarak (mean±SEM.) belirtildi. İstatistik yönden önemli bulunan farklar tablolar içinde değişik harfler ile gösterilecek ve ayrıca metin içinde de istatistiksel P (p>0,05, p<0,05, p<0,01, p<0,001) değerleri şeklinde ifade edilmiştir. Deney sonuçlarının değerlendirilmesi kontrol grubuna göre yapılmıştır.

3. BULGULAR

DPPH radikali ile yapılan çalışmada 100 mg RA 10 mL DMSO'da çözünmüş ve belirli konsantrasyonlarda denenmiş 50 µL-200 µL (0.5 mg - 2 mg) aralığındaki konsantrasyonda maksimum temizleme aktivitesi gözlenmiştir (95,58), daha yukarı konsantrasyonlarda aktivitenin gittikçe azaldığı gözlenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Rosmarinik asitin (RA) değişik konsantrasyonlarda DPPH• radikalini temizleme aktivitesi (%)

Sıra no	Konsantrasyon(µL)	DPPH temizleme etkisi (%)	ABS ortalamaları(λ)
1	50	95,58±0,11	0,03±0,00
2	100	95,13±0,15	0,33±0,15
3	150	94,10±0,17	0,04±0,17
4	200	93,66±0,09	0,04±0,09
5	250	92,53±0,05	0,05±0,05
6	300	92,33±0,22	0,05±0,22
7	350	90,36±0,40	0,06±0,040

*:0.1 g (100 mg) Rosmarinik asit 10 mL Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözünerek hazırlandı

Vanilik asit (VA) ile yapılan DPPH deneyinde 400 µL (4 mg) konsantrasyonda maksimum temizleme aktivitesi gözlenmiştir (95,23), daha aşağı konsantrasyonlarda aktivitenin gittikçe azaldığı gözlenmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Vanilik asitin değişik konsantrasyonlarda DPPH radikalini temizleme aktivitesi(%)

Sıra no	Konsantrasyon(µL)	DPPH temizlemeEtkisi (%)	ABS ortalamaları(λ)
1	50	56,98±4,42	0,29±4,42
2	100	76,45±1,60	0,15±1,60
3	200	91,24±0,55	0,05±0,55
4	400	95,23±0,29	0,02±0,29
5	600	94,19±1,60	0,03±1,60
6	800	94,44±0,42	0,03±0,42
7	1000	94,78±0,38	0,03±0,38

*:0,1 g (100 mg) Vanilik asit (VA) 10 mL Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözünerek hazırlandı

40 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamında, K₂ vitamini G+RA ve G+VA gruplarında kısmen azaldığı (p<0,05). G grubunda ise kontrol grubuna göre değişim gözlenmedi. δ -Tokoferol G+RA kısmın yüksek bulundu (p<0,05), diğer gruplarda ise farklılık gözlenmedi. α -Tokoferol miktarı G grubunda düşük bulunmasına rağmen (p<0,05), G+RA grubunda yüksek olduğu gözlemlendi (p<0,05). D₂ vitaminini G grubunda azalmasına rağmen RA+G ve G+VA gruplarında yüksek olduğu belirlendi (p<0,05). D₃ vitamini ise G grubunda önemli düzeyde yüksek bulundu (p<0,01), G+RA grubunda kısmen azalmıştı (p<0,05). Ergosterol düzeyi, G ve G+RA gruplarında belirgin düzeyde azalırken (p<0,05), G+VA grubunda yükselmişti (p<0,01). Stigmasterol düzeyi G grubunda önemli düzeyde azaldığı halde (p<0,01), G+RA ve G+VA gruplarında kısmen azalmıştı (p<0,05). β -Sitosterol, kontrol grubu dışında diğer gruplarda yüksek bulundu (p<0,05; p<0,001) (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Kültür ortamına 40 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki ADEK vitaminleri ve sterollerin miktarının değişimi (μ g/g hücre peleti)

Vitaminler	K	G	G+RA	G+VA
K ₂	0,30 $\pm$ 0,05 ^a	0,28 $\pm$ 0,06 ^a	0,24 $\pm$ 0,05 ^b	0,24 $\pm$ 0,07 ^b
δ -Tokoferol	0,30 $\pm$ 0,05 ^a	0,33 $\pm$ 0,08 ^a	0,78 $\pm$ 0,03 ^c	0,28 $\pm$ 0,04 ^a
D ₂	0,88 $\pm$ 0,08 ^a	0,48 $\pm$ 0,06 ^c	0,78 $\pm$ 0,07 ^a	1,18 $\pm$ 0,05 ^b
D ₃	0,37 $\pm$ 0,06	0,83 $\pm$ 0,07 ^c	0,25 $\pm$ 0,03 ^b	0,37 $\pm$ 0,06 ^a
α -Tokoferol	0,26 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,01 ^b	0,38 $\pm$ 0,03 ^b	0,22 $\pm$ 0,04 ^a
Ergosterol	114,12 $\pm$ 10,11	26,70 $\pm$ 2,76 ^d	32,67 $\pm$ 3,32 ^d	156 $\pm$ 11,45 ^c
K ₁	0,39 $\pm$ 0,04 ^a	0,38 $\pm$ 0,06 ^a	1,03 $\pm$ 0,11 ^d	0,27 $\pm$ 0,09
Stigmasterol (mg/g)	2,04 $\pm$ 0,23	1,63 $\pm$ 0,12 ^c	1,88 $\pm$ 0,21 ^b	1,70 $\pm$ 0,12 ^b
β -Sitosterol	3,60 $\pm$ 0,54	4,37 $\pm$ 0,42 ^b	8,01 $\pm$ 0,67 ^d	11,14 $\pm$ 0,88 ^d

a: p>0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: p< 0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: p<0.01 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: p <0.001 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

K= Kontrol grubu

G=Glifosat grubu

RA= Rosmarinik grubu

VA= Vanilik grubu

G+RA= Glifosat ve Rosmarinik asit grubu

G+VA= Glifosat ve Vanilik asit grubu

Tablo 3.4. Kültür ortamına 80 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki ADEK vitaminleri ve sterollerin miktarının değişimi ($\mu\text{g/g}$ hücre peleti)

	K	G	RA	VA	RA+G	VA+G
Vitamin K ₁	0.15 $\pm$ 0.04 ^a	0.35 $\pm$ 0.06 ^d	0.25 $\pm$ 0.01 ^c	0,20 $\pm$ 0,01 ^b	0.26 $\pm$ 0.01 ^c	0,27 $\pm$ 0,02 ^c
Vitamin K ₂	0.11 $\pm$ 0.03 ^a	0.08 $\pm$ 0.01 ^a	0.11 $\pm$ 0.05 ^a	0,26 $\pm$ 0,04 ^c	0.21 $\pm$ 0.05 ^b	0,56 $\pm$ 0,04 ^d
α -Tokoferol	0.28 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.01 ^b	0.18 $\pm$ 0.03 ^b	0,31 $\pm$ 0,06 ^a	0.43 $\pm$ 0.03 ^b	0,56 $\pm$ 0,03 ^d
δ -Tokoferol	0.27 $\pm$ 0.05 ^a	0.53 $\pm$ 0.08 ^b	0.19 $\pm$ 0.03 ^b	0,30 $\pm$ 0,03 ^a	0.32 $\pm$ 0.03 ^b	0,56 $\pm$ 0,06 ^d
Vitamin D ₂	0.73 $\pm$ 0.08	0.78 $\pm$ 0.06 ^a	0.48 $\pm$ 0.07 ^d	0,48 $\pm$ 0,04 ^d	0.58 $\pm$ 0.07 ^b	0,63 $\pm$ 0,09 ^b
Vitamin D ₃	0.23 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.07 ^c	0.24 $\pm$ 0.03 ^a	0,39 $\pm$ 0,01 ^c	0.15 $\pm$ 0.03 ^b	0,35 $\pm$ 0,03 ^b
Ergosterol	53.61 $\pm$ 2.11	16.70 $\pm$ 2.76 ^d	46.67 $\pm$ 3.32 ^b	77,90 $\pm$ 4,56 ^b	15.67 $\pm$ 3.32 ^d	41,17 $\pm$ 2,89 ^c
Stigmasterol (mg/g)	0.38 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.02 ^c	0.47 $\pm$ 0.01 ^b	0,71 $\pm$ 0,04 ^d	0.57 $\pm$ 0.02 ^b	0,74 $\pm$ 0,03 ^d
β -sitosterol	4.76 $\pm$ 0.54	8.37 $\pm$ 0.42 ^c	3.07 $\pm$ 0.67 ^c	3,07 $\pm$ 0,36 ^c	2.32 $\pm$ 0.67 ^d	3,82 $\pm$ 0,45 ^c

a: $p > 0.05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: $p < 0.05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: $p < 0.01$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: $p < 0.001$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

80 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamında, K₁ vitamini kontrol grubuna göre G grubunda belirgin düzeyde artış gösterirken ($p < 0,01$), diğer gruplarda değişik oranlarda artış gözlenmiştir ($p < 0,05$, $p < 0,01$). K₂ vitamini kontrol grubuna göre G ve RA gruplarında farklılık göstermesine rağmen ($p > 0,05$), VA, RA+G ve VA+G gruplarında yüksek bulundu ($p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,001$). α -Tokoferol düzeyi kontrol grubuna göre G ve VA+G gruplarında kısmen yüksek bulunurken ($p < 0,05$), RA+G grubunda belirgin düzeyde yükselmisti ($p < 0,05$). RA grubunda ise kontrol grubuna göre kısmen azalmisti ($p < 0,05$). δ -Tokoferol düzeyinde kontrol grubuna göre G ve VA+G gruplarında belirgin düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,001$). Kontrol grubuna göre RA grubunda kısmen azalırken ($p < 0,05$), VA grubunda farklılık bulunmadı. D₂ vitamininin kontrol grubuna göre G grubunda farklılık gözlenmediği halde, diğer gruplarda farklı oranlarda azalmisti ($p < 0,001$, $p < 0,05$).

D₃ vitamini G, VA ve VA+G gruplarında yüksek bulunduğu halde ($p < 0,01$, $p < 0,05$), RA+G E grubunda kısmen azalmış ($p < 0,05$), RA grubunda ise farklılık gözlenmemisti. Ergosterol miktarı kontrol grubuna göre G ve RA+G grubunda belirgin düzeyde azaldığı halde ($p < 0,001$), RA ve VA+G gruplarında daha az oranda azalma meydana gelmişti ($p < 0,05$, $p < 0,01$). VA grubunda ise kısmen yükselme gözlendi ($p < 0,05$). Stigmasterol düzeyi kontrol grubuna göre diğer gruplarda değişik oranlarda yüksek olduğu saptandı

($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). Betasitosterol kontrol göre grubuna G grubunda önemli düzeyde yüksek bulunduğu halde ($p<0,01$), diğer gruplarda azalmıştı ($p<0,01$, $p<0,001$) (Tablo 3.4).

Tablo 3.5. Kültür ortamına 160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki ADEK vitaminleri ve sterollerin miktarının değişimi ($\mu\text{g/g}$ hücre peleti)

	K	G	RA	VA	RA+G	VA+G
Vitamin K ₁	0.46±0.04 ^a	0.88±0.06 ^d	0.56±0.01 ^b	0,44±0,03 ^a	0.33±0.01 ^c	0,60±0,03 ^c
Vitamin K ₂	0.11±0.01 ^a	0.08±0.01 ^a	0.09±0.01 ^a	0,16±0,01 ^a	0.21±0.02 ^c	0,15±0,02 ^a
α -Tokoferol	0.39±0.02 ^a	0.39±0.01 ^a	0.21±0.03 ^b	0,23±0,02 ^b	0.31±0.03 ^a	0,26±0,03 ^b
δ -Tokoferol	0.30±0.05 ^a	0.27±0.08 ^a	0.28±0.03 ^a	0,31±0,02 ^a	0.18±0.03 ^c	0,23±0,02 ^b
Vitamin D ₂	0.78±0.08 ^a	0.75±0.06 ^a	0.84±0.07 ^a	1,40±0,09 ^d	0.38±0.07 ^c	0,46±0,06 ^c
Vitamin D ₃	0.35±0.06 ^a	0.61±0.07 ^c	0.23±0.03 ^b	0,38±0,02 ^a	0.33±0.03 ^a	0,19±0,01 ^c
Ergosterol	84.88±10.11	16.63±2.76 ^d	58.07±3.32 ^c	47,95±3,67 ^c	59.64±3.32 ^c	63,11±367 ^b
Stigmasterol (mg/g)	0.41±0.03	0.38±0.02 ^a	0.26±0.03 ^b	0,38±0,02 ^a	0.33±0.02 ^b	0,32±0,03 ^b
β -Sitosterol	5.77±0.44	2.87±0.32 ^d	6.22±0.47 ^b	4,26±0,34 ^b	3.42±0.37 ^d	7,16± 0,23 ^b

a: $p>0,05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: $p<0,05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: $p<0,01$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: $p<0,001$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamında, K₁ vitamini ve α -Tokoferol miktarı kontrol grubuna göre kısmen azalırken ($p<0,05$), diğer gruplarda daha yüksek oranda azalma gözlemlendi ($p<0,001$). δ -Tokoferol düzeyi VA grubunda belirgin düzeyde yüksek olduğu halde ($p<0,001$), RA+G grubunda azalmıştı. D₂ vitamini VA grubunda belirgin düzeyde yüksek olduğu halde, diğer gruplarda azalmıştı ($p<0,001$). Ergosterol düzeyi kontrol grubuna göre bütün gruplarda azalmıştı ($p<0,001$). Stigmasterol kontrol grubuna göre VA ve RA gruplarında kısmen yüksek olduğu halde, diğer gruplarda azalmıştı ($p<0,05$). β -Sitosterol düzeyi de kontrol grubuna göre belirgin düzeyde artarken ($p<0,001$), diğer gruplarda azalmıştı ($p<0,01$) (Tablo 3.5).

Tablo 3.6. Kùltür ortamına 40 mg madde ilavesi yapılan hücre kùltür ortamındaki yağ asitlerinin değışimi (%)

Yağ asitleri	K	G	RA	VA	RA+G	VA+G
C8:0	2.39±0.12	3.45±0.16 ^c	3.52±0.17 ^c	2.70±0.03 ^a	2.68±0.01 ^a	2.65±0.02 ^a
C10:0	1.07±0.01 ^a	0.93±0.01 ^a	0.98±0.03 ^a	0.94±0.01 ^a	0.63±0.01 ^c	1.03±0.01 ^a
C12:0	5.79±0.15 ^a	6.56±0.12 ^b	6.97±0.11 ^b	5.71±0.09 ^a	6.95±0.11 ^b	6.94±0.06 ^b
C14:0	2.90±0.11 ^a	2.95±0.12 ^a	3.40±0.11 ^b	3.10±0.03 ^b	3.22±0.16 ^b	3.20±0.01 ^b
C16:0	42.71±2.67	23.71±1.89 ^d	30.87±2.04 ^b	31.21±0.28 ^b	20.19±1.78 ^d	20.18±0.07 ^d
C16:1n-7	4.63±0.11 ^a	5.03±0.13 ^b	4.47±0.14 ^a	2.61±0.12 ^d	4.41±0.16 ^a	2.52±0.25 ^d
C17:0	1.81±0.02	1.47±0.04 ^b	1.32±0.09 ^b	5.16±0.03 ^d	2.38±0.12 ^b	4.75±0.02 ^d
C18:0	25.38±2.15 ^a	23.94±2.22 ^a	23.89±2.30 ^a	24.77±0.23 ^a	19.58±1.05 ^b	21.39±1.34 ^a
C18:1n-9	9.71±0.87	3.24±0.67 ^d	3.73±0.56 ^d	8.29±0.08 ^b	2.76±0.43 ^d	4.27±0.09 ^d
C18:2 n-6	3.61±0.04	1.68±0.08 ^d	1.89±0.07 ^d	1.48±0.01 ^d	1.76±0.05 ^d	1.80±0.01 ^d

a: p>0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: p< 0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: p<0.01 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: p <0.001 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

40 mg madde ilavesi yapılan hücre kùltür ortamından elde edilen hücre peletlerinin yağ asidi değışimlerine bakıldığında, C8:0 kontrol grubuna göre G ve RA gruplarında önemli düzeyde arttığı (p<0.01), diğer gruplarda ise istatistiksel farklılık olmadığı gözlemlendi (p>0.05). C10:0 kontrol grubuna göre RA+G grubu dışında diğer gruplar arasında farklılık olmadığını belirlendi (p>0.05). RA+G grubunda ise azaldı (p<0,01). C12:0 kontrole göre VA grubunda istatistiksel farklılık gözlenmediği halde (p>0.05), diğer gruplarda kısmen yüksek olduğu gözlemlendi (p<0,05). C14:0 miktarı kontrol grubuna göre G grubu dışında diğer gruplarda kısmen yüksek olduğu gözlemlendi (p<0.05). C16:0 kontrol grubuna göre bütün gruplarda farklı oranlarda azaldığı belirlendi (p<0,05, p<0.001). C16:1 n-7 kontrol grubuna göre G grubunda kısmen arttığı halde (p<0,05), VA ve VA+G grubunda belirgin düzeyde azaldığı (p<0,001), RA ve RA+G gruplarında istatistiksel farklılığın olmadığı saptandı. C17:0 kontrol grubuna göre VA ve VA+G gruplarında anlamlı düzeyde azaldığı (p<0.001), RA ve RA+G gruplarında farklılık olmadığı belirlendi. C18:0 miktarının gruplar arasında farklılık göstermediği tespit edildi (p>0.05). C18:1 n-9 ve C18:2 n-6 miktarlarının kontrol grubuna göre azaldığı saptandı (p<0,05, p<0,001) (Tablo 3.6).

Tablo 3.7. Kültür ortamına 80 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki yağ asitlerinin değişimi (%)

Yağ asitleri	K	G	RA	VA	RA+G	VA+G
C8:0	3.53±0.13	8.13±0.27 ^d	5.31±0.28 ^c	2.77±0.05 ^b	4.04±0.16 ^b	4.04±0.15 ^b
C10:0	0.27±0.02 ^a	0.28±0.01 ^a	0.29±0.01 ^a	0.60±0.01 ^d	0.40±0.01 ^c	0.43±0.07 ^c
C12:0	7.69±0.17 ^a	8.49±0.27 ^b	8.93±0.32 ^b	8.09±0.21 ^b	7.45±0.21 ^a	7.52±0.25 ^a
C14:0	4.33±0.17	4.75±0.21 ^a	4.29±0.22 ^a	3.59±0.16 ^b	4.19±0.19 ^a	4.15±0.20 ^a
C16:0	43.61±1.37	41.58±1.45 ^b	45.57±1.67 ^b	42.34±0.84 ^a	45.12±1.74 ^b	43.37±0.83 ^a
C16:1n-7	4.23±0.13	5.30±0.14 ^b	5.31±0.13 ^b	5.45±0.15 ^b	5.72±0.14 ^b	5.72±0.16 ^c
C17:0	3.18±0.16	2.41±0.13 ^b	2.25±0.19 ^b	2.62±0.13 ^b	2.21±0.25 ^b	2.29±0.30 ^b
C18:0	16.46±1.11	13.21±0.93 ^c	13.75±1.01 ^c	19.18±0.13 ^c	17.83±1.15 ^b	17.52±0.19 ^b
C18:1n-9	4.35±0.65 ^a	2.11±0.32 ^d	3.22±0.44 ^c	4.56±0.61 ^a	3.19±0.35 ^c	3.17±0.14 ^c
C18:2 n-6	1.41±0.06	1.21±0.02 ^a	1.32±0.05 ^a	2.11±0.32 ^b	1.52±0.08 ^b	3.44±0.17 ^c

a: $p > 0.05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: $p < 0.05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: $p < 0.01$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: $p < 0.001$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

80 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamından elde edilen hücre pelletlerinin yağ asidi değişimlerine bakıldığında, C8:0 kontrol grubuna göre VA grubu dışında diğer gruplarda farklı oranlarda arttığı ($p < 0.001$, $p < 0.05$), VA grubunda ise kısmen azaldığı gözlemlendi ($p > 0.05$). C10:0 kontrol grubuna göre VA, RA+G ve VA+G gruplarında belirgin düzeyde yüksek olduğu halde ($p < 0.001$), kontrol ile diğer gruplar arasında farklılık olmadığını belirledi ($p > 0.05$). C12:0 kontrol grubuna göre RA+G ve VA+G gruplarında istatistiksel farklılık gözlenmediği halde ($p > 0.05$), diğer gruplarda kısmen yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). C14:0 miktarı kontrol grubuna göre VA grubu dışında diğer gruplarda farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$). VA grubunda ise kısmen azaldı ($p < 0.05$). C16:0 kontrol grubuna göre G grubunda kısmen azaldığı halde RA ve RA+G grubunda kısmen yüksekti ($p < 0.05$). Diğer gruplarda ise kontrol grubuna göre farklılık gözlenmedi. C16:1 n-7 kontrol grubuna göre diğer gruplarda kısmen yüksek bulundu ($p < 0.05$). Fakat VA+G grubundaki artış daha yüksek olduğu saptandı ($p < 0.01$). C17:0 kontrol grubuna göre d gruplarında diğer gruplarda kısmen azaldığı belirlendi ($p < 0.001$). C18:0 miktarı kontrol grubuna göre G ve RA grubunda önemli düzeyde azalırken ($p < 0.01$), VA, RA+G ve VA+G gruplarında yükseldiği tespit edildi ($p < 0.05$, $p < 0.01$). C18:1 n-9 miktarı kontrol grubuna göre G, RA, RA+G ve VA+G gruplarında azaldığı halde ($p < 0.01$, $p < 0.001$), VA grubunda farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$). C18:2 n-6 miktarları kontrol grubuna VA, RA+G ve VA+G

gruplarında yüksek olduğu halde ($p<0,01$), G ve RA grubunda farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 3.7).

Tablo 3.8. Kültür ortamına 160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki yağ asitlerinin değişimi (%)

Yağ asitleri	K	G	RA	VA	RA+G	VA+G
C8:0	3.49±0.11 ^a	3.35±0.08 ^a	3.65±0.13 ^a	3.98±0.01 ^b	4.26±0.12 ^b	4.43±0.10 ^b
C10:0	0.64±0.01 ^a	0.78±0.02 ^a	0.77±0.01 ^a	1.02±0.01 ^b	1.04±0.01 ^b	1.14±0.05 ^b
C12:0	6.37±0.11	7.86±0.21 ^b	8.87±0.32 ^b	7.15±0.03 ^b	7.94±0.35 ^b	9.07±0.08 ^b
C14:0	3.51±0.18 ^a	3.68±0.15 ^a	4.84±0.11 ^b	2.81±0.03 ^b	3.64±0.1 ^a	3.04±0.02 ^b
C16:0	40.35±1.18 ^a	42.60±1.05 ^b	42.73±1.57 ^b	38.32±0.11 ^a	39.91±0.98 ^a	37.13±0.41 ^a
C16:1n-7	2.43±0.02 ^a	2.33±0.06 ^a	3.59±0.04 ^c	4.80±0.01 ^d	4.03±0.01 ^d	4.91±0.01 ^d
C17:0	1.19±0.08 ^a	1.33±0.02 ^a	1.09±0.02 ^a	1.87±0.02 ^b	1.89±0.02 ^b	1.86±0.02 ^b
C18:0	20.99±1.18 ^a	22.91±1.14 ^b	21.43±1.15 ^a	25.75±0.22 ^c	21.22±1.27 ^a	20.59±0.05 ^a
C18:1n-9	4.82±0.20	3.96±0.21 ^b	2.65±0.11 ^d	2.45±0.12 ^d	1.22±0.06 ^d	5.62±0.19 ^c
C18:2 n-6	1.04±0.02	0.54±0.05 ^d	0.58±0.01 ^d	2.45±0.01 ^d	0.66±0.01 ^d	2.88±0.09 ^d

a: $p>0,05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: $p<0,05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: $p<0,01$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: $p<0,001$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamından elde edilen hücre peletlerinin yağ asidi değişimlerine bakıldığında, C8:0 ve C10:0 miktarları kontrol grubuna göre VA, RA+G ve VA+G gruplarında kısmen yükseldiği halde ($p<0,05$), diğer gruplarda farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). C12:0 kontrol grubuna göre RA+G ve VA+G gruplarında istatistiksel farklılık gözlenmediği halde ($p>0,05$), diğer gruplarda kısmen yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). C14:0 miktarı kontrol grubuna göre RA, VA ve VA+G gruplarında azaldığı halde ($p<0,05$), diğer gruplarda farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). C16:0 kontrol grubuna göre G ve RA gruplarında kısmen yüksekti ($p<0,05$). Diğer gruplarda ise kontrol grubuna göre farklılık tespit edilmedi. C16:1 n-7 kontrol grubuna göre G grubunda farklılık tespit edilmediği halde ($p>0,05$), diğer gruplarda yüksek bulundu ($p<0,01$, $p<0,001$). C17:0 kontrol grubuna göre G ve VA gruplarında istatistik farklılık saptanmadığı halde, VA, RA+G ve VA+G gruplarında kısmen yüksek olduğu belirlendi ($p<0,05$). C18:0 miktarı kontrol grubuna göre G ve VA grubunda yüksek olduğu halde ($p<0,05$, $p<0,01$), RA, RA+G ve VA+G gruplarında istatistik farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$). C18:1 n-9 miktarı kontrol grubuna göre G, RA, VA, RA+G ve VA+G gruplarında azaldığı belirlendi ($p<0,05$; $p<0,01$, $p<0,001$). C18:2 n6

miktarı kontrol grubuna VA grubu dışında diğer gruplarda belirgin düzeyde azalmıştı ($p<0,01$ (Tablo 3.8)).

40 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamından elde edilen hücre peletlerinde kontrol grubu ile RA ve VA ile glifosat uygulanan gruplar arasında istatistik farklılık bulunmadığı halde ($p>0,05$). Glifosat uygulanan grubun MDA düzeyinin belirgin düzeyde yüksek olduğu saptandı ($p<0,001$). Glifosat uygulanan *S.cerevisiae* L.kültürüne rosmarinik asit ilave edilmesi MDA düzeyini belirgin düzeyden ($p<0,001$), daha az düzeye doğru azalmasını sağlamıştır ($p<0,01$) (Tablo 3.9). Protein miktarının ise kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlendi.

80 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamından elde edilen hücre peletlerinde kontrol grubu ile RA ve VA uygulanan gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Kontrol grubuna göre glifosat grubundaki MDA düzeyi çok yüksek düzeyde arttığı saptandı ($p<0,001$). Rosmarinik asit, vanilik asit uygulaması glifosatın MDA oluşturma etkisini kısmen azaltsa da yine de MDA düzeyi kontrol grubuna göre yüksekti ($p<0,001$) (Tablo 3.9).

160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamından elde edilen hücre peletlerinde, kontrol grubu ile RA ve VA uygulanan grupların MDA düzeyi daha düşüktü ($p>0,05$). Kontrol grubuna göre glifosat grubundaki MDA düzeyi çok yüksek düzeyde arttığı saptandı ($p<0,001$). Rosmarinik asit ve vanilik asit uygulaması glifosatın MDA oluşturma etkisini kısmen azaltsa da yine de MDA düzeyi kontrol grubuna göre yüksekti ($p<0,001$) (Tablo 3.9).

Protein değeri her grupta 40 mg ilave edilen vanilik asit ve rosmarinik asit uygulanan gruplarda artış göstermiştir ($p<0,01$, $p<0,001$). Farklılık gösterse de 80 ve 160 mg uygulamalarda da benzer sonuçlar gözlenmiştir ($p<0,05$, $p<0,01$) (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. Kültür ortamına 40, 80 ve 160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki hücre peletlerinde total protein ve MDA miktarının değişimi.

Gruplar	Total protein (mg/g hücre pelleti)	MDA (nmol/g hücre pelleti)
	40 mg	
K	6,55±0,16	75.79±1.58 ^a
G	11,08±0,17 ^c	151.27±7.34 ^d
RA	14,26±0,12 ^d	69.14±2.37 ^a
VA	11,37±0,14 ^c	85.76±5.83 ^a
G+RA	16,07±0,17 ^d	83.21±4.10 ^a
G+VA	15,14±0,27 ^d	71.48±4.9 ^a
80 mg		
K	6,41±0,22	76.53±1.14 ^a
G	8,10±0,15 ^b	198.64±11.66 ^d
RA	8,98±0,32 ^b	67.81±6.93 ^a
VA	10,43±0,11 ^c	99.61±6.99 ^b
G+RA	9,22±0,16 ^c	144.17±8.28 ^c
G+VA	12,35±0,15 ^d	181.01±23.67 ^d
160 mg		
K	5,21±0,17 ^a	84.03±3.00
G	5,87±0,28 ^a	231.76±19.48 ^d
RA	7,21±0,27 ^b	65.66±4.71 ^b
VA	10,39±0,11 ^d	78.02±4.68 ^a
G+RA	7,14±0,34 ^c	148.00±14.06 ^c
G+VA	9,45±0,16 ^d	167.82±4.71 ^c

a: p>0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: p< 0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: p<0.01 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: p <0.001 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

Tablo 3.10. Kültür ortamına 40, 80 ve 160 mg madde ilavesi yapılan hücre kültür ortamındaki hücre peletlerinde GSH VE GSSG miktarının değişimi (µg/ g hücre peleti)

Gruplar	GSH	GSSG
	40 mg	
K	416.32±9.56 ^a	49.55±1.15 ^a
G	486.42±12.47 ^d	109.92±4.43 ^d
RA	409.54±5.67 ^a	40.46±2.09 ^a
VA	425.88±18.36 ^a	45.40±8.22 ^a
G+RA	542.72±9.79 ^d	59.79±2.07 ^b
G+VA	491.17±31.69 ^b	58.69±3.26 ^b
80 mg		
K	503.00±7.70	39.19±0.97
G	800.91±45.61 ^d	108.46±2.11 ^d
RA	435.81±27.61 ^c	31.38±1.52 ^b
VA	541.12±47.28 ^b	41.29±4.08 ^a
G+RA	636.98±34.06 ^d	75.66±1.49 ^c
G+VA	648.57±61.33 ^c	108.03±15.77 ^d
160 mg		
K	432.12± 15.54 ^a	40.32±0.98
G	610.60± 38.94 ^d	122.92±3.82 ^d
RA	334.93± 19.11 ^c	33.32±1.87 ^b
VA	336.30± 11.87 ^c	30.79±0.92 ^b
G+RA	432.12± 20.83 ^a	65.00±0.82 ^c
G+VA	445.51± 13.23 ^a	87.21±7.42 ^c

a: p>0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: p< 0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: p<0.01 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: p <0.001 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

40 mg glifosat uygulamasında GSH miktarı, kontrol grubu ile RA ve VA grupları arasında istatistik farklılık bulunmadığı halde (p>0,05). Yalnızca glifosat uygulanan grubun GSH ve GSSG düzeyinin belirgin düzeyde yüksek olduğu saptandı (p<0.001). *S.cerevisiae* L. kültürüne rosmarinik asit ve vanilik asit ilave edilmesi sonucu GSSG düzeyini belirgin düzeyden (p<0.001), daha az düzeye doğru azalmasını sağlamıştır (p<0,05) (Tablo 3.10).

80 mg glifosat ve rosmarinik asit uygulaması sonucu kontrol grubuna göre rosmarinik asit uygulanan grupta GSH ve GSSG düzeyinde azalma gözlenirken (p>0,01), kontrol grubuna göre glifosat grubundaki GSH ve GSSG düzeyinin çok yüksek düzeyde arttığı saptandı (p<0,001). Rosmarinik asit uygulaması sonucu glifosatın etkisine karşı artan GSH

düzeyinde kısmen azalma meydana gelse de yine kontrol grubuna göre belirgin düzeyde yüksek düzeyde yüksek olduğu saptandı ($p<0.001$). GSSG düzeyinde de benzer sonuçlar gözlemlendi (Tablo 3.10).

160 mg glifosat ve rosmarinik asit uygulaması sonucu GSH düzeyinde kontrol grubu ile rosmarinik asit ve glifosat uygulanan gruplar arasında istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Kontrol grubuna göre glifosat grubundaki GSH düzeyi çok yüksek düzeyde arttığı saptandı ($p<0,001$). Rosmarinik asit uygulaması glifosatın etkisine karşı GSH düzeyinde artışa ihtiyaç azaltsa da, glifosat uygulanan grupta kontrol grubuna göre GSH düzeyinin belirgin düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). GSH düzeyi yalnızca rosmarinik asit uygulanan grupta da kontrol grubuna göre azalmıştı ($p<0,01$). GSSG düzeyinde de benzer sonuçlar gözlemlendi (Tablo 3.10).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, kimyasal olarak herbisitler içinde yer alan bir madde olan glifosatın farklı konsantrasyonlardaki toksik etkisine karşı rosmarinik asit ve vanilik asit moleküllerinin antioksidan etkisi incelendi. Hem glifosat hem de polifenolik asitler için düşük, orta ve yüksek doz olmak üzere üç farklı konsantrasyon kullanıldı. Hücre modeli olarak ekmek mayası olarak bilinen *Saccharomyces cerevisiae* L. hücreleri kullanıldı.

S. cerevisiae L. (ekmek mayası), ksenebiyotik ve diğer toksik maddelerin etkilerinin incelenmesinde en iyi ökaryotik hücre modeli olarak görülmektedir (Ribeiro vd., 2000; Cabral vd., 2003, 2004). Yapılan çalışmalarda, *S. cerevisiae* L., insanlar tarafından çok eski yıllardan beri ekmek ve şarap yapımında kullanıldığı belirtilmiştir (Kocaadam ve Acar , 2016).

Ayrıca, *S. cerevisiae* L. diğer maya hücreleri moleküler biyoloji, genetik, biyokimya ve metabolik çalışmalarda en fazla kullanılan ökaryotik hücre modelleri içinde yer almaktadır. *S. cerevisiae* L.; mantarlar, bitkiler ve hayvansal organizmalar üzerinde yapılan genomik, proteomik ve metabolik çalışmalarda muhtemel biyolojik mekanizmaların ortaya çıkarılmasında en iyi karakterize edilen organizma olarak kabul edilmektedir (Braconi vd.,2006). *S. cerevisiae* L., özellikle önemli patofizyolojik mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilen bir hücre modeli olarak görülmektedir.

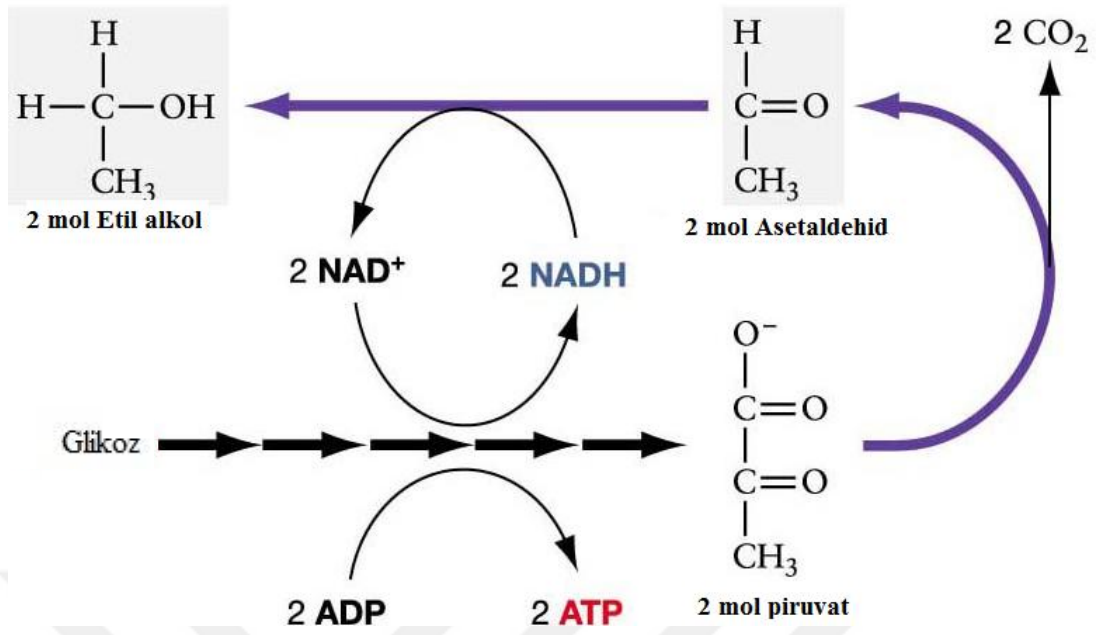
Birçok çalışmada *S. cerevisiae* L. mayasının strese verdiği tepkiler karakterize edilmiştir. En yaygın karakterize edilen stres durumlarının ısı, glukoz yokluğu, ağır metal veya yüksek etil alkol düzeyi gibi ciddi ozmotik ve oksidatif stres durumlarında verilen tepkilerin olduğu belirlenmiştir (Singh vd., 2013). Maya hücresinin strese karşı verdiği tepkilerin başında, hücresel yapıyı koruyan ve redoks tepkimelerinde görevli proteinlerin düzenlenmesiyle ilgili gen transkripsiyonundaki dramatik değişimler olduğu ileri sürülmüştür.

Maya hücresindeki, membran yapısı moleküler düzeyde etil alkole karşı maruz kalmaya veya hiperosmolariteye karşı koruyucu özellikte yapıdadır. Stres durumlarında membran yapısındaki doymamış yağ asitleri ile ergosterol sentezi düzenlenerek sıvı mozaik yapı korunmaktadır. İzolösin, metiyonin, fenilalanin gibi amino asitler ile inositolün membran yapısının güçlendirdiği ve etil alkol stresine karşı hücrenin korunmasını sağladığı düşünülmektedir (Singh vd., 2013).

Maya hücresi hem aerobik solunum hem de anaerobik solunum yapabilen bir hücredir. Daha çok anaerobik şartlarda kullanımı tercih edilir. Anaerobik şartlarda 1 mol glukoz molekülü hücre içine alınarak glikoliz yoluyla 2 mol ATP, 2 mol NADH+H ve 2 mol piruvat molekülü sentezlenir. Hücre metabolik faaliyetlerini devam ettirebilmek için net olarak elde ettiği ATP moleküllerini kullanır. Ortamda yeterli miktarda glukoz molekülü var ise yaşamsal faaliyetlerinin devam ettirebilmek için tekrar glukoz alması gerekir. Ancak bir önceki glikoliz olayından oluşan indirgen yapıda olan NADH+H molekülünü okside formu olan NADH molekülüne çevirmek zorundadır. Bunun için oluşan piruvat molekülleri ilk önce piruvat dekarboksilaz enzimi ile asetaldehide çevrilir (Voet vd., 1999; Nelson ve Cox, 2000)(Şekil 4.1).

Bu reaksiyon sırasında 1 mol CO₂ açığa çıkar. Oluşan asetaldehit maya hücresindeki alkol dehidrogenaz enzimi ile etil alkole dönüştürülür. Alkol dehidrogenaz enzimi koenzim ünitesi olarak NADH+H⁺ı kullanır ve bu molekülün hidrojenleri uzaklaştırılarak okside forma dönüştürülür ve hücre içerisine tekrar glukoz girişi sağlanır (Kruckeberg ve Dickinson, 2004; Barnet ve Entian, 2005). Ortamdaki monosakkaritler bitene kadar bu işlem devam eder. Bizim deney planımızda 30 ° C'de 72 saat içerisinde sonlanmaktadır. Bu süreç içinde oluşan hücrelerde kültür ortamına ilave edilen maddeler veya moleküller hücre yapısına etki etmektedir (Şekil 10.1).

Maya hücresi metabolizmasında ortama etil alkol salınımı gerçekleştiği için, maya hücresindeki, membran yapısı moleküler düzeyde etil alkole karşı veya hiperosmolariteye karşı koruyucu özellikte yapıdadır. Stres durumlarında membran yapısındaki doymamış yağ asitleri ile ergosterol sentezi düzenlenerek sıvı mozaik yapı korunmaktadır. İzolösin, metiyonin, fenilalanin gibi amino asitler ile inositol'un membran yapısını güçlendirdiği ve etil alkol stresine karşı hücrenin korunmasını sağladığı düşünülmektedir (Singh vd., 2013).



Şekil 4.1. Piruvatın etil alkole dönüşümü

Rosmarinik asit (RA), kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenilaktik asidin bir esteridir. RA en yaygın olarak Boraginaceae ve Lamiaceae'nin alt ailesi Nepetoideae türlerinde bulunur. Bununla birlikte, diğer yüksek bitki familyasına ait türlerde ve bazı fern ve hornwort türlerinde de bulunur. RA'nın antiviral, antibakteriyel, anti-enflamatuar ve antioksidan özellikler de dâhil olmak üzere yararlı biyolojik aktiviteleri olduğu bildirilmiştir (Tal Friedman, 2015).

Vanilik asit, bazı vanilya türlerinde ve diğer birçok bitki özünde bulunan bir fenolik asittir. Hoş, kremsi bir koku veren bir aroma ve koku maddesidir. Ferulik asidin vaniline iki aşamalı biyolojik dönüşümünde ara üründür. Bir klorojenik asit olan vanilik asit, oksitlenmiş bir vanilindir. Ayrıca vanilinin ferulik asit üretimindeki bir ara ürünüdür. Vanilik asit, kafeik asitin metabolik bir yan ürünüdür ve sıklıkla kahve, çikolata, çay ve vanilya aromalı şekerleme tüketen insanların idrarında bulunur. Vanilik asit seçici ve spesifik olarak 5'nükleotidaz aktivitesini inhibe eder.

Vanilik asit, bir aroma maddesi olarak kullanılan bir benzoik asit türevidir. Vanilinin ferulik aside dönüşümü sırasında üretilen bir oksitlenmiş vanilindir. Bitkilerde en yüksek miktarda vanillik asit, geleneksel olarak kullanılan *Angelica sinensis*'in köklerinde bulunmuştur. Çin tıbbında çeşitli çalışmalarda immün veya inflammatuar yanıtların yönetiminde vanilik asidin etkinliğine dair kanıtlar elde edilmiştir. Örneğin, vanilik asit insan periferik kan mononükleer hücrelerinde insan lenfosit proliferasyonunun ve interferon-

gamma salgılanmasının aktivitesini arttırmıştır. Bir başka çalışma, vanilik asitin, konkavalin A'nın neden olduğu karaciğer hasarı içinde immün aracılı karaciğer inflamasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi ile hepatoprotektif bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, vanilin asidin anti-kolitik etkiye sahip olup olmadığı belirtilmiştir. RA ve VA fenolik asitlerin DPPH üzerindeki antioksidan etkinliği karşılaştırıldığında RA'nın daha etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.1; Tablo 3.2).

Glifosatın, aromatik asitler fenilalanin, triptofan ve tirozin ve bir dizi başka maddenin biyosentezine yol açan şikimik asit yolunun bir enzimi olan 5-enolpiruvilüküdinat-3-fosfat sentezi (EPSPS) inhibe ettiği bilinmektedir. Bu yol sadece bitkilerde ve mikroorganizmalarda mevcut olduğundan, glifosatın insanlar ve hayvanlar için düşük toksisite olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, daha yeni araştırmalar, glifosatın hayvanlara ve insanlara daha önce beklenenden daha zararlı olabileceğine dair endişelerini dile getirmiştir (Myers vd., 2016).

Glifosat aynı zamanda mineraller için güçlü bir şelatör olarak da bilinir, onlarca yıl önce gözlenen bir özellik herbisit glifosat keşfedilmiştir (Komives ve Schröder, 2016). Eğer glifosat aslında esansiyel mineralleri etkili bir şekilde bağlarsa, uygulanması, arıtılmış bitkilerde ve potansiyel olarak bu tür bitkileri besleyen organizmalarda birçok biyolojik işlemde önemli ortak faktörler olan minerallerin yetersizliğine yol açabilir. Bu da, hastalığa karşı bitki direncini etkileyebilir ve insan ve hayvan sağlığını etkileyebilir. Şelatlama özellikleri iyi bilinmesine rağmen, bu potansiyel ek çevresel risk hiçbir zaman düzenleyici risk değerlendirmesinde dikkate alınmamıştır (EFSA 2015a, 2015b).

Glifosatın farklı dozlarda hücre metabolizması üzerinde etkili olduğu ve maya hücresinin bu toksik etkiye karşı metabolik olarak karşı koyucu savunmaya geçtiği, hücrenin en önemli savunma sistemlerinden biri olan glutatyon (GSH) sentezini artırdığı belirlenmiştir (Tablo 3.9). Çünkü artan oksidatif stres düzeyine karşı glifosat verilen üç doz grubunda da MDA miktarı yükselirken GSH miktarı da yükselmiştir. Ayrıca, MDA ve GSH'ın okside formu olan GSSG miktarının da RA ve VA verilen gruplarda azaldığı saptanmıştır. GSH'ın RA ve VA verilen gruplarda azalmasının iki şekilde nedeni olabilir. 1. artan oksidatif stresin bu moleküller tarafından azaltılması ve GSH sentezine ihtiyaç duyulmaması, 2. ise bazı flavonoidlerin hücrelerdeki GSH sentezini engellemelerinden kaynaklanabilir. Bulgulara bakıldığında birinci ifadenin daha baskın olduğu görülmektedir.

Düşük dozda uygulanan glifosat ve diğer maddelerin verilmesi, palmitik asit (C16:0), oleik asit (C18:1, n-9) ve linoleik asit (C18:2 n-6) miktarını azaltmıştır. Bu sonuca göre

kültür ortamına ekstra madde ilavesinin toksik ya da farklı özellikte olsun hem yağ asidi sentataz aktivitesini hem de Δ^{12} desatüraz enzim aktivitelerini azalttığı belirlenmiştir. Çünkü palmitik asit yağ asidi sentetaz enzimi ile C18: ve C18:2 n-6 Δ^9 ile Δ^{12} desatüraz enziminin son ürünleridir (Watanabe vd., 2004; Tang vd., 2015). Bunlarda azalma gözlenmiştir.

Saccharomyces cerevisiae L., çeşitli pestisitlerin toksisitesini incelemek için bir ökaryotik model olarak kullanılmıştır (Kitagawa vd., 2002; Cabral vd., 2003). Glifosat, ekmek mayasındaki aromatik asit biyosentezini etkilemediği belirtilmiştir (Roisch ve Lingens, 1980) bu da bu konsantrasyonda toksik etkilerinin olmadığını göstermektedir. Bu nedenle mayanın detoksifikasyon mekanizmaları ile glifosat metabolizması olası bir bağlantı olduğu düşünülebilir.

Glifosat, 121 ° C'ye kadar sıcaklıklara ve 2 ila 10 arası pH ortamlarına maruz kaldığında bozunmaya karşı dirençlidir. Ancak, bu araştırma ilk kez glifosatın ekmek yapımının fermentasyon aşamalarında *S. cerevisiae* L. tarafından bozunmaya duyarlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, buğday unu içinde glifosat kalıntıları var ise, 1 saat boyunca mayalanmış hamurun prodüksiyonu, seviyeleri yaklaşık beşte bir oranında azaltacaktır. Bu, glifosatın bozunmasını katalize eden biyotik faktörlerin iyi bir örneğidir. Mayanın glifosatu indirgeme yeteneği, glifosatın bakteriyel bozulmaya karşı sorumlu olduğu bilgisi ile uyumludur (Low vd., 2005)

Bakteriyel bozulmaya paralel olarak, glifosat degradasyonunun neden olduğu ana parçalanma ürününün, aminometilfosfonik asit olduğu beklenmektedir. Radyoizotoplu glifosat molekülleri kullanarak bu olasılığı araştırmak için ileri çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Low vd., 2005).

Glifosatın düşük toksisitesi, buğdayda bulunan tortu düzeylerinin düşük toksikolojik öneme sahip olduğu anlamına gelir. Bu, buğdaydaki glifosat kullanımıyla ilgili endişeleri giderebilir ve hem ekmek endüstrisine hem de tüketicilere, tüketim için tüketilen veya yenen ekmek güvenli olduğu konusunda güven verir. Buğdayda veya ekmekte izin verilen maksimum seviyeler, tüketici güvenliğiyle ilgili olarak yeniden değerlendirilebilir. Bu şekilde, düzenleyici makamlar kamuya daha doğru bilgi yaymak için daha donanımlıdır.

Bizim yaptığımız çalışmada hem glifosat hem de flavonoid moleküller düşük, orta ve yüksek dozda kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda glifosat uygulaması üç dozda da MDA miktarında artış meydana gelirken GSH miktarında da artış gözlenmiştir. Ancak yağ asitleri ve diğer moleküllerin sentezinde aynı sonuçlar gözlenmemiştir. Literatür bilgilerinden de görüldüğü gibi glifosat oksidatif stresi artırıcı etkisinin varlığı belirlenmiştir.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, daha ileri düzeyde yeni araştırma yolları açmaktadır. Mevcut araştırmalar, herbisit ve parçalanma ürünlerinin daha düşük konsantrasyonlarda basit tespiti için radyoizotoplu glifosat kullanımına odaklanmaktadır. Bu çalışma ile birlikte, maya tarafından glifosat metabolizmasının kimyasını açıklamak için *in vitro* deneyler yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Mayanın diğer pestisitleri metabolize etme yeteneği üzerine nispeten az literatür bilgisi vardır ve bu bulgunun diğer pestisit modellerinde replike olup olmadığını görmek ilginç sonuç ortaya çıkaracaktır. Ayrıca, bu tür ekmeklerin yapıldığı unun daha yüksek glifosat seviyeleri içerebileceğinden, kepekli ve çok tahıllı ekmekleri analiz etmek ihtiyatlı olabilir. Glifosatın detoksifikasyondan sorumlu genleri indüklemeye kabiliyetini araştırmak da ilginç olacaktır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, daha ileri düzeyde yeni farklı araştırma yollarının açılmasına yön vermektedir. Bu araştırma ile birlikte, maya tarafından herbisitlerin metabolizmaları ile ilgili yeni *in vitro* deneyler yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Maya hücrelerinin diğer herbisitleri meabolizma etme yeteneği üzerine nispeten az literatür bilgisi vardır ve bu bulgunun diğer pestisit modellerinde nasıl sonuçlar meydana getireceğini görmek ilginç sonuçlar ortaya çıkaracaktır. Ayrıca bu tür ekmeklerin yapıldığı unun daha yüksek glifosat seviyeleri içerebileceğinden, kepekli ve çok tahıllı ekmekleri analiz etmek ihtiyatlı olabilir.

KAYNAKLAR

- Adams, R.D, Victor M., Ropper , A. H. ve Daroff, R. B.,** 1997. Principles of Neurology. 6th ed. New York:McGraw Hill.pp 1386- 1499.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.,** 2002. Molecular Biology of the Cell, Garland Science, New York, USA.
- Arakawa, H., Kanemitsu, M., Tajima, N. and Maeda, M.,**2002. Chemiluminescence Assay for Catechin Based on Generation ofHydrojen Peroxide in Basic Solution. *Analy. Chim. Acta*,**472**, 75-82.
- Araujo A.S.F., Monteiro R.T.R., Abarkeli, R.B.,** 2003. Effect of glyphosate on themicrobial activity of two Brazilian soils, *Chemosphere***52**, 799-804.
- Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., Mcshane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S., Medsger, T.A., Mitchell, D.M., Neustadt, D.H., Pinals, R.S., Schaller, J.G., Sharp, J.T., Wilder, R.L., Hunder, G.G.,** 1988. "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." *Arthritis & Rheumatology* **31**, 315-324.
- Astiz, M., María, J.T., Marra, C.A.,** 2009. "Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues." *Ecotoxicology and environmental safety***72**, 2025-2032.
- Atkinson, A.C.,**1985. *Plots, transformations and regression; an introduction to graphical methods of diagnostic regression analysis.* **4**, 273 - 278.
- Atkinson, D.,** 1985. Effects of some plant growth regulators on water use and the uptake of mineral nutrients by tree crops. In *V International Symposium on Growth Regulators in Fruit Production* **179**, 395-404.
- Azzam, R. M., Bashara, N. M.,** 1987. *Ellipsometry and polarized light.* North-Holland. sole distributors for the USA and Canada, Elsevier Science Publishing Co., Inc..
- Bain,G.,Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney,A.J., Roon, M.,** 1994. "E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements." *Cell* **79**, 885-892.
- Balkaya, N. ve Bayraklı, F.,** 2000."Atıksularda pestisit arıtım yöntemleri." *Tarımsal Çevre ve Su Kirliliği Semineri Tebliğler Kitabı*, 26-28.

- Barnett, JA. and Entian K.D.**, 2005. A history of research of yeast 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast*, **22**, 835-890.
- Barnett, JA. ve Robinow , CF.**, 2002 .A history of research on yeasts 4 : cytology part II ,1950-1990 . *Yeast*, **19**, 745 -772.
- Barry, G. F.**, 2001. The use of the Monsanto draft rice genome sequence in research. *Plant Physiology*, **125**, 1164-1165.
- Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R.M., Bhardwaj, N.**, 1996. "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood." *Journal of immunological methods* **196**, 121-135.
- Bentley, R. ve Haslam, E.**, 1990. The shikimate pathway—a metabolic tree with many branche. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **25**, 307-384.
- Berglöf, E. and Pajuste, A.**, 2003. "Emerging owners, eclipsing markets." *Corporate Governance and Capital Flows in a Global Economy* **1**, 267.
- Bernardini, L.**, 2014. "Le lettere di Jan Koziielewski, ovvero la figura di Jan Karski tra narrazione letteraria e documentazione storiografica." *PL. IT* **5**, 11-34.
- Bilaloğlu, G. V. and Harmandar, M.**, 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 334-354.
- Bohm, B.A.**, 1998. Introduction to flavonoids. Amsterdam, The Netherlands, Hardwood academic publishers, 365-394.
- Braconi, D., Bernardini, G., Santucci, A.**, 2015. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model in Ecotoxicological Studies: A Post-Genomics Perspective. *Journal of Proteomics*, **137**, 19-34.
- Braconi, D., Sotgi, M., Millucci, L., Paffetti, A., Tasso, F., Alisi, C., Martini ,S., Rappuoli, R., Lusini, P., Rosa ,A., Rossi, C., Santucci, A.**, 2006. Comparative analysis of the effects of locally used herbicides and their active ingredients on a wild-type wine (*Saccharomyces cerevisiae*) strain. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **54**, 3163 -3172.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.**, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* **28**, 25-30.
- Bravo, L.**, 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56**, 317–333.
- Brown, J. D., Martinez, E. A., York, J.W.**, 1991. Complex Kerr-Newman geometry and black-hole thermodynamics. *Physical review letters*, **66**, 2281.

- Buer, C.S., Imin, N., Djordjevic, M.A.,** 2010. Flavonoids: New roles for old molecules. *J. Integrative Plant Biol.* **52**, 98-111.
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J., Powers, R.F.,** 2001, Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* **33**, 1777-1789.
- Cabaroğlu, T. and Yılmaztekin, M.,** 2010. Aroma Biyoteknolojisi, içinde : Gıda Biyoteknolojisi, Ed. Aran N, Nobel Yayıncılık, Ankara.
- Cabral, M.G., Sá-Correia, I. and Viegas, C.A.,** 2004. Adaptive responses in yeast to the herbicide 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid at the level of intracellular pH homeostasis, *Journal of applied microbiology.* **96**, 603-612.
- Cabral, M.G., Viegas, C.A., Teixeira, M.C. and Sá-Correia I.,** 2003. Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population, *Chemosphere.* **51**, 47-54.
- Carlisle, S. M., ve Trevors, J.T.,** 1988. "Glyphosate in the environment." *Water, Air, & Soil Pollution* **39**, 409-420.
- Cassault-Meyer, E., Gress, S., Seralini, G.É., Galeraud-Denis, I.,** 2014. "An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **38**, 131-140.
- Cattani, D.,** 2013. "Mecanismos envolvidos na excitotoxicidade glutamatérgica induzida pela exposição aguda ou crônica ao Roundup® sobre o hipocampo de ratos imaturos."
- Cemeroğlu, B.,** 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları. **35**, Ankara, 77-88
- Cessna, M.H., Zhou, H., Sanger, W.G., Perkins, S.L., Tripp, S., Pickering, D., Daines, C., Coffin, C.M.,** 2002. "Expression of ALK1 and p80 in inflammatory myofibroblastic tumor and its mesenchymal mimics: a study of 135 cases." *Modern pathology* **15**, 931 -938.
- Chan, P. C. ve Mahler, J. F.,** 1992. NTP Technical Report on Toxicity Studies of Glyphosate.
- Chawla, N. V., Bowyer, K. W., Hall, L. O., Kegelmeyer, W. P.,** 2002. SMOTE: synthetic minority over-sampling technique. *Journal of artificial intelligence research*, **16**, 321-357.

- Christie, W.W.**, 1990. Gas chromatography and Lipids. The Oil Press. Glasgow.
- Chubykin, A.A., Atasoy, D., Etherton, M.R., Brose, N., Kavalali, E.T., Gibson, J.R., Südhof, T.C.**, 2007. "Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2." *Neuron*, **54**, 919-931
- Coşkun, F.**, 2006. Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, **2**, 27-33.
- Cox, C.**, 1999, Glyphosate (Roundup). In: Global Pesticide Campaigner. *Ellen Hickey (Ed.)*. **9**, 12-19 .
- Dallegrave, E., Mantese, F.D., Coelho, R.S., Pereira, J.D., Dalsenter, P.R., Langeloh, A.**, 2003. "The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats." *Toxicology Letters* **142**, 45-52.
- Daruich, J., Zirulnik, F., Gimenez, M. S.**, 2001. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environmental Research*, **85**, 226-231.
- De Souza, M.P., Huang, C.P.A., Chee, N., Terry, N.**, 1999. "Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants." *Planta* **209**, 259-263.
- Delen, D., Walker, G., Kadam A.**, 2005. Predicting breast cancer survivability: a comparison of three data mining methods. *Artif. Intell. Med.* **34**, 113–127.
- Dökmeci, İ.**, 1988. Toksikoloji, Akut zehirlenmelerde tanı ve tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 547.
- Druart, C., Gimbert, F., Scheifler, R., Vaufléury, A.**, 2017. "A full life-cycle bioassay with *Cantareus aspersus* shows reproductive effects of a glyphosate-based herbicide suggesting potential endocrine disruption." *Environmental Pollution* **226**, 240-249.
- Durak.İ., Köseoğlu, M.H., Kaçmaz, M., Büyükköçak, S., Çimen, B., Öztürk, H.S.**, 1999. Black grape enhances plasma antioxidant potential. *Nutr. Res.*, **19**, 973-977.
- EFSA (European Food Safety Authority)**, 2015a. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 2015;13(issue):NNNN, 35 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.NNNN
- EFSA (European Food Safety Authority)**, 2015b. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. Available at www.efsa.europa.eu

- El-Shenawy and Nahla, S.**, 2009. "Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **28**, 379-385.
- Estévez, E., Veiga, M.C., Kennes, C.**, 2005 "Biofiltration of waste gases with the fungi *Exophiala oligosperma* and *Paecilomyces variotii*." *Applied microbiology and biotechnology* **67**, 563-568.
- Fonseca, C. M. and Fleming, P. J.**, 1993. Genetic Algorithms for Multiobjective Optimization: Formulation Discussion and Generalization. In *Icga* **93**, 416-423.
- Forlani, G., Mangiacalli, A., Nielsen, E., Suardi, C.M.**, 1999, Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganism. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 991-997.
- Gasnier ,C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.,C., Séralini,G.,S.**, 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in humancell lines. *Toxicology*, **262**, 184-191.
- Gerişlioğlu, A., Güngörmüş, C., Korkmaz ,A., Kolankaya, D.**, 2010 . "Embryotoxic and teratogenic effects of Roundup® Max on rat development." *Toxicology Letters* **196**, 184-185.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R.**, 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **167**, 35-120.
- Gilreath, J. P. and Santos ,B.M.**, 2004."Methyl bromide alternatives for weed and soilborne disease management in tomato (*Lycopersicon esculentum*)."
Crop protection **23**,1193-1198.
- Gilreath, M. C.**,2000."Overview and Analysis of How the United Nations Model Law on Insolvency Would Affect United States Corporations Doing Business Abroad."
Bank. Dev. J. **16**, 399-503.
- Gimsing, A.L., Borggaard, O.K., Jacobsen, O.S., Aamand, J., Sorensen, J.**, 2004."Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils." *Applied Soil Ecology* **27**, 233-242.
- Göksu, M.Z.L. , Çevik, F. , Fındık, Ö., Sarıhan, E.**, 2003."Seyhan Baraj Gölü'ndeki aynalı sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758) ve sudak (*Stizostedion lucioperca* L., 1758)'larda Fe, Zn, Cd düzeylerinin belirlenmesi." *EU Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* **20**, 69-74.

- Greuter, W., McNeill, J., Hawksworth, D.L. and Barrie, F.R.,** 2000. "International code of botanical nomenclature (Saint Louis Code): Sixteenth International Botanical Congress, St Louis, Missouri, USA, July-August 1999." *International code of botanical nomenclature (Saint Louis Code): Sixteenth International Botanical Congress, St Louis, Missouri, USA, July-August 1999.* International Association for Plant Taxonomy, **20**, 1-253.
- Griesbach, R.J.,** 2005. Biochemistry and genetics of flower color. *Plant Breed. Rev.* **25**, 89-114.
- Güçlü, K., Apak, R., Özyürek, M.,** 2009. Hidroksil ve Süperoksit Radikallerinin Süpürülmesine Dayalı Yeni Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi. Tübitak Proje, 1-114.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B.,** 1974. "Glutathione S-transferases: The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation" *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, 7130-7139.
- Haney, M.Ö. and Bahar, Z.,** 2014. "Çocuk Kalp Sağlığını Geliştirme Tutum Ölçeği'nin Geçerlik ve Güvenirliği." *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi* **7**, 2.
- Haney, S., Senseman, A., Hons, F.M.,** 2003, Effect of Roundup ultra on microbial activity and from biomass from selected soils. *Ag Professional* **9**, 44-46.
- Hara, A., Radin, N.S.,** 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, **90**, 420-426.
- Henis, J. M. and Tripodi, M. K.,** 1980. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. *U.S. Patent* **4**, 230-463.
- Hernández-Plate, E., Quiroz-Compeán, F., Ramírez-García, G., Barrientos, E.Y., Rodríguez-Morales, N.M., Flores, A., Wrobel, K., Wrobel, K., Méndez, I., Díaz-Muñoz, M., Robles, Martínez-Alfaro, M.,** 2015. "Melatonin reduces lead levels in blood, brain and bone and increases lead excretion in rats subjected to subacute lead treatment." *Toxicology letters* **233**, 78-83
- Hill, A.V.S., Allsopp, C.E.M., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J., Greenwood, B.M.,** 1991. "Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria." *Nature* **352**, 595-600.

- Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B.,** 1996. Analysis and effects of flavonoids. *Food Chemistry* **57**, 43-46.
- Jonker P.G., Wijnands, R., Klis, M., Psaltis, D., Kuulkers, E., Lamb, F.K.,** 1998. "Discovery of kilohertz quasi-periodic oscillations in the Z source GX 340+ 0." *The Astrophysical Journal Letters* **499**, 191
- Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., PaydaşKargı, S.,Cabaroğlu, T.,** 2006. BazıÜzümsü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri. II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Tokat, 309-312
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M.,** 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food chemistry*.**47**, 3954-3962.
- Kanis, J. A.,** 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. *Osteoporosis international*, **4**, 368-381.
- Karataş, F., Karatepe, M., Baysar, A.,** 2002. Determination of Free Malondialdehyde in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, **311**, 76-79.
- Karatepe, M.,** 2004. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC/UV. *LC-GC North Americana*, **22**, 362-5.
- Karpinska, J., Mikoluc, B., Motkowski, R., Piotrowska –Jastrzbska, J.,** 2006. HPLC method for simultaneous determination of retinol, alpha –tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* **42**, 232 -6.
- Katsanidis, E., Addis, P.B.,** 1999. Novel HPLC analysis of tocopherols and cholesterol in tissue. *Free Radical Biology Medicine*, **27**, 1137-1140.
- Kaur, C. and Kapoor, H. C.,** 2001. Antioxidants in fruits and vegetables–the millennium’s health. *International journal of food science & technology*, **36**, 703-725.
- Kidd, H. And James, D. R.,** 1991. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. RoyalSociety of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, (AsUpdated), 10-2.
- Kitagawa, E., Takahashi, J., Momose, Y., and Iwahashi, H.,** 2002. Environmental Science & Technology, **36**, 3908–3915.

- Klejduš, B., Zehnalek, J., Adam, V., Petrek, J., Kizek, R., Vacek, J., Trnkova, L., Rozik, R., Havel, L., Kuban, V.,** 2004. Sub-picomole High-Performance Liquid Chromatographic/Mass Spectrometric Determination of Glutathione in The Maize (*Zea mays* L.) Kernels Exposed to Cadmium. *Analitica Chimica Acta*, **520**, 117-124.
- Knuuttila, P. and Knuuttila, H.,** 1979. The crystal and molecular structure of N-(phosphonomethyl) glycine (glyphosate). *Acta Chemica Scandinavica*, **33**, 623-626.
- Kocaadam, B. ve Acar T., N.,** 2016. Ekmek, Bira, Şarap ve Yoğurdun Orijinleri ve Tarihsel Süreçleri. *Bes Diy Derg* **44**, 272-279.
- Komives, T. and Schroder, P.,** 2016. On glyphosate. *Ecocycles*, **2**, 1–8.
- Kools, S.A.S., van Roovert, M., van Gestel, A.M., van Straalen, N.M.,** 2005, Glyphosate degradation as a soil health indicator for heavy metal polluted soils. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 1303-1307.
- Köksal, O.,** 1980. Tek hücre proteininin insan beslenmesinde kullanılması, *Gıda Dergisi*, **4**, 89-94.
- Kruckeberg, A.L., Dickinson, J.R.,** 2004. Carbon metabolism. In: Dickinson, J.R., Schweizer, M.(eds) *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. CRC, London, 42–103
- Langseth, L.,** 1995. Oxidants, Antioxidants and Disease Prevention. ILSI Europe, Belgium.
- Larsen, K., Najle, R., Lifchitz, A., Virkel, G.,** 2012. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **34**, 811-818.
- López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Ríos-Vázquez, N.J.,** 2005. High-Performance Liquid Chromatography Method for The Simultaneous Quantification of Retinol, Alpha-Tocopherol, and Cholesterol in Shrimp Waste Hydrolysate. *Journal of Chromatography A*, **1105**, 135-139.
- Low, F. L., Shaw, I. C. and Gerrard, J. A.,** 2005. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the stability of the herbicide glyphosate during bread leavening. *Letters in Applied Microbiology*, **40**, 133–137.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.,** 1951. "Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent" *The Journal of Biological Chemistry*. **193**, 265-275.
- Lynnette, R.F.,** 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Muta. Res.*, **475**, 89-111.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.,** 1997. *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Prentice hall. **11**.
- Mattila, P. and Kumpulainen, J.,** 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3660-3667.
- Mellon, M., Benbrook, C., Benbrook, K. L.,** 2001. Hogging it. *Estimates of antimicrobial abuse in livestock*, 7-9.
- Miyagi, Y. Miwa, K. and Inoue, H.,** 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am. J. Cardiol.*, **80**, 1627-1631.
- Morsümbül, T., Solmaz. S., Üstün, G.E., Yonay, T.,** 2010. " Bitki Gelişim Düzenleyici (BGD)'lerin Çevresel Etkileri ve Çözüm Önerileri" *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, **15**, 1-11.
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., Vandenberg, L., Vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Benbrook, C.M.,** 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health* **15**, 19.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., Smith, T. F.,** 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, **371**, 297-300.
- Nelson, D. L., Cox, M. M.,** 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth publishers, Third Edition, New York, 1152.
- Nicolai, M., Pereira, P., Vitor, R.F., Reis, C.P., Roberto, A., Rijo, P.,** 2016. Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement*. **89**, 328-332
- Ohashi, K., Nagata, K., Toshima, J., Nakano, T., Arita, H., Tsuda, H., Mizuno, K.,** 1995. Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 22681-22684.

- Ortiz, R., Medina, H., Rodríguez, L., González-Márquez, H., Cortés, E.,** 2004. Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environmental and molecular mutagenesis*. **43**, 179-185.
- Özer, N.,**1997. "Electrochemical properties of sol-gel deposited vanadium pentoxide films." *Thin Solid Films*. **305**, 80-87.
- Parvez, S., Gerona, R.R., Proctor, C., Friesen, M., Ashby, J.L., Reiter, J.L., Lui Z., Winchester, P.D.,** 2018. Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: a prospective Indiana birth cohort study. *Environmental Health*.**17**, 23.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco,A.E.,** 2008. "Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina." *Environmental Pollution* **156**, 61-66.
- Pimentel D., Pimentel, M.,** 2008. Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. Food Energy and Society,Third Edition, CRC Press, Taylor & Francis USA, 161-183.
- Poo, M. C.,** 2010. Liquids in temple ritual. *UCLA Encyclopedia of Egyptology*,1.
- Potts, C., Takahashi, K., Anton, A. I.,**1994. Inquiry-based requirements analysis. *IEEE software*, **11**, 21-32.
- Rank, J., Jensen, A.G., Skov, B., Pedersen, L. H., and Jensen, K.,** 1993.Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test,Salmonella mutagenicity test, and allium anaphase-telophase test. *Mutat.Res.* **300**, 29-36.
- Rein, D., Paglieroni, T.G., Pearson, D.A., Wun, T., Schmitz, H.H., Gosselin, R., Keen, C.L.,**2000.Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J. Nutr.*, **130**, 2120-2126.
- Ribeiro, I.C., Veri'ssimio, I., Moniz, L., Cardoso, H., Sousa, M.J., Soares, A.M.V.M., Leaño, C.,** 2000. Yeasts as A Model for Assessing The Toxicity of The Fungicides Penconazol, Cymoxanil and Dichlofluanid. *Chemosphere*, **41**, 1637-1642.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G.,** 1997. Antioxidant properties of phenol8ic compounds. *Trends in plant science*, **2**, 152-159.

- Roisch, U. and Lingens, F.,** 1980. The mechanism of action of the herbicide N-(phosphonomethyl)glycine: its effect on the growth and the enzymes of aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli* (author's transl). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* **361**, 1049-1058.
- Rolls, E. T., Kringelbach, M. L., De Araujo, I. E.,** 2003. Different representations of pleasant and unpleasant odours in the human brain. *European Journal of Neuroscience*, **18**, 695-703.
- Rose, A.H.,** 1979. Microbial Biomass, In: Economic Microbiology, Ed. Rose, A.H., Academic Press, London. **1**, 29.
- Roy, R. and Kailath, T.,** 1989. "ESPRIT-estimation of signal parameters via rotational invariance techniques." *IEEE Transactions on acoustics, speech, and signal processing* **37**, 984-995.
- Rueppel, M. L., Brightwell, B.B., Schaefer, J., Marvel, J.T.,** 1977. "Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**, 517-528.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S.,** 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L., *Scientia Horticulturae*, **92**, 147-176.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H.,** 2002. Plant Phenolic Antioxidant and Prooxidant Activities: Phenolics -Induced Oxidative Damage Mediated by Metals in Plants. *Toxicol.*, **177**, 67-80.
- Saldamlı, İ.,** 2007. Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
- Santos, A. and Flores, M.,** 1995. "Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria." *Letters in Applied Microbiology* **20**, 349-352.
- Santos, B.M., Gilreath, J.P., Esmel, C.E., Siham, M.N.,** 2007, Effects of sub-lethal glyphosate rates on fresh market tomato. *Crop Protection* **26**, 89-91.
- Shah, D.M., Stephen G., Horsch R.B., Fraley, R.T.,** 1990. "Glyphosate-resistant plants." U.S. Patent No. **4**, 940 -835..
- Silverman, D. L. and Keller, N.,** 1992. *U.S. Patent No. 5,136,501*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Singh, A., Mahto, K.K., and Prasad, R.,** 2013. Lipidomics and *in vitro* azole resistance in *Candida albicans*. *OMICS*, **17**, 84-93.

- Sinha, R. A., Khare, P., Rai, A., Maurya, S. K., Pathak, A., Mohan, V., Bandyopadhyay, S.,** 2009. Anti-apoptotic role of omega-3-fatty acids in developing brain: perinatal hypothyroid rat cerebellum as apoptotic model. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **27**, 377-383.
- Šiviková, K. and Dianovský, J.,** 2006. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. *International journal of hygiene and environmental health*, **209**,15-20.
- Song, J.H., Atay, T., Shi, S.F., Urabe, H., Nurmikko, A.V.,** 2005. "Large enhancement of fluorescence efficiency from CdSe/ZnS quantum dots induced by resonant coupling to spatially controlled surface plasmons." *Nano letters* **5**, 1557-1561.
- Soulas, G., and Lagacherie, B.,** 2001. Modelling of microbial degradation of pesticides in soils. *Biology and fertility of Soils*.**33**, 551-557.
- Stiglitz, J. and Shahid Y.,**1996. ""The East Asian Miracle." *World Bank Research Observer. Trejos, JD* **11**, 151 -177.
- Tabrez S., Priyadarshini M., Priyamvada S., Shahnawaz Khan M., Arivarasu N.A., Kashif Zaidi S.,** 2014. Gene-environment interactions in heavy metal and pesticide carcinogenesis. *Mutation Research*,**760**,1–9
- Tal Friedman, ND.,** 2015. The Effect of Rosmarinic Acid on Immunological and Neurological Systems: A Basic Science and Clinical Review. *Journal of Restorative Medicine* 2015; **4**, 50.
- Tang, X., Lee, J., Chen, W. N.,** 2015. Engineering the fatty acid metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biofuel production. *Metabolic Engineering Communications* **2**, 58–66.
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, T., Suriyo, T., Satayavivad, J.,** 2013. "Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors." *Food and Chemical Toxicology* **59**, 129-136.
- Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S.,** 2010. Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri.Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. **26**, 154-169.
- Topaloglu, A. K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A. S., Kotan, L. D., Porter, K. M., Imamoglu, S.,** 2009. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nature genetics*, **41**, 354-358.

- Usuku, K., Sonoda, S., Osame, M., Yashiki, S., Takahashi, K., Matsumoto, M., Sawada, T., Tsuji, K., Tara, M., Igata, A.,** 1988. "HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy: Comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma." *Annals of Neurology* **23**, 143-150.
- Voet, D., Voet, J. G., Wiley, J., Pratt, C. W.,** 1999, Biochemistry, Sons Inc. New York.
- Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J., Kroath, H.,** 1999. "Genetically modified organisms in food screening and specific detection by polymerase chain reaction." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 5038-504.
- Vurucu, L.,** 2006, Co(II), Ni(II), Cu(II) ve Zn(II) geçiş metallerinin bazı n-baz karışık ligantlı vanilik asit komplekslerinin sentezi, spektroskopik ve termik özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun,8.
- Walpole, M. J. and Leader-Williams, N.,** 2002. Tourism and flagship species in conservation. *Biodiversity & Conservation*, **11**, 543-547
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L.,** 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 701-705.
- Wang, W., Heideman, L., Chung, C.S., Pelling, J.C., Koehler, K.J., Birt, D.F.,**2000. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines, *Mol. Carcinog.*,**28**,102–110
- Watanabe, K., Auro, T., Sakai, H. and Kajuvara, S.,**2004. Yeast 12 Fatty Acid Desaturase: Gene Cloning, Expression, and Function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,**68**, 721–727.
- Willamowski, J., Arregui, D., Csurka, G., Dance, C.R., Fan, L.,** 2004. Categorizing nine visual classes using local appearance descriptors. *illumination*, **17**, 21.
- Wirén-Lehr, S.V.,Komoßa, D.,Gläßgen, W.E.,Sandermann, H.,Scheunert, I.,** 1997. "Mineralization of [14C] glyphosate and its plant-associated residues in arable soils originating from different farming systems." *Pest Management Science* **51**, 436-442.
- Worthing, C. R.,** 1987. *The pesticide manual: a world compendium.* **6**,632 – 95.

- Xu, X., Hou, Y., Yin, X., Bao, L., Tang, A., Song, L., Li, F., Tsang, S., Wu, K., Wu, H., He, W., Zeng, L., Xing, M., Wu, R., Jiang, H., Liu, X., Cao, D., Guo, G., Hu, X., Gui, Y., Li, Z., Xie, W., Sun, X., Shi, M., Cai, Z., Wang, B., Zhong, M., Li, J., Lu, Z., Gu, N., Zhang, X., Goodman, L., Bolund, L., Wang, J., Yang, H., Kristiansen, K., Dean, M., Li, Y., Wang, J., 2012.**"Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor." *Cell* **148**, 886-895.
- Yağmur ,G., 2006 .**Mitokondriyal Mutantların Bira Fermantasyonu Üzerine Etkisi,Yüksek Lisans Tezi ,Çukurova Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Yılmaz, O., Keser, S., Tuzcu, M., Güvenç, M., Çetintaş, B., Irtegun, S., Taştan, H., Şahin, K., 2009.** “A Practical HPLC Method to Measure Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Glutathione Concentrations in Animal Tissues” *Journal of Animal Veterinary Advances*, **8**, 343-347.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Elazığ'da doğdum. İlköğretimi, ortaokulu ve liseyi Elazığ'da tamamladım. 2008 yılında kazandığım Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldum. 2010 -2012 yılları arasında Fırat Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nden tezsiz yüksek lisansımı tamamladım. 2014 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Zooloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. 2015 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Fakültesi'nde Hemşirelik Bölümü'nde okumaktayım.

