



### Effect of vanillic acid against oxidative stress induced by glyphosate in *Saccharomyces cerevisiae*

Gözde ÖZCAN<sup>1</sup>, Ersin DEMİR<sup>\*1</sup>, Ökkeş YILMAZ<sup>1</sup>, Figen ERDEM ERİŞİR<sup>1</sup>, Hatayi ZENGİN<sup>3</sup>  
ORCID: 0000-0002-7676-5953; 0000-0002-8276-4498; 0000-0002-0499-9339; 0000-0002-8148-4056

<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Elazığ, Türkiye

<sup>2</sup> Düzce Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Düzce, Türkiye

<sup>3</sup> Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Sivas, Türkiye

#### Abstract

Glyphosate is a widely used broad-spectrum herbicide. Vanilic acid is a phenolic acid found naturally in many plants. In this study, the effect of vanilic acid against oxidative stress induced by glyphosate in *Saccharomyces cerevisiae* was investigated. *S. cerevisiae* was proliferated and developed in YEDP medium. Both glyphosate and vanilic acid were added to the development environment of *Saccharomyces cerevisiae* to be 200, 400 and 800 mg per liter. At the end of the experiment, *Saccharomyces cerevisiae* samples (Reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), Malondialdehyd (MDA), fatty acid, E, D, K vitamins and phytosterol) were analyzed in HPLC and GC devices. Antioxidant potential of vanillic acid was also identified. In this study, the effect of vanillic acid against oxidative stress and toxicity caused by glyphosate in *S. cerevisiae* was investigated for the first time. In *S. cerevisiae* administered glyphosate, there were statistically significant changes in MDA, GSH, GSSG, protein, fatty acid, E, D, K vitamins and phytosterol levels, but the vanilic acid applied was detected statistically significantly reduced the changes in these parameters. As a result of analysis by gas chromatography, the yeast cell of octanoic acid (8: 0), lauric acid (12: 0), myristic acid (14: 0), palmitic acid (16: 0), palmitoleic acid (16:1 n-7), stearic acid (18: 0), oleic acid (18:1 n-9) and linoleic acid (18:2 n-6) acids were observed. Vitamin D, E and K were analyzed with HPLC device. As a result of this analysis, molecules such as K<sub>2</sub>, δ-tocopherol, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, α-tocopherol, ergosterol, K<sub>1</sub>, stigmasterol, β-sitosterol were identified. Biochemical analysis showed that cell density in culture medium containing 800 mg per liter of glyphosate decreased. It was found that vanilic acid showed beneficial effects against oxidative stress caused by glyphosate in *Saccharomyces cerevisiae*.

**Key words:** glyphosate, vanilic acid, oxidative stress, fatty acid and phytosterol, *Saccharomyces cerevisiae*

----- \* -----

#### Glifosatın *Saccharomyces cerevisiae*'da indüklediği oksidatif strese karşı vanilik asidin etkisi

#### Özet

Glifosat, yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir herbisittir. Vanilik asit, pek çok bitkide doğal olarak bulunan fenolik asittir. Bu çalışmada, glifosatın *Saccharomyces cerevisiae*'da indüklediği oksidatif strese karşı vanilik asidin etkisi araştırılmıştır. *S. cerevisiae* YEDP besiyerinde çoğaltılmış ve geliştirilmiştir. Hem glifosat hem de vanilik asit *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına litrede 200, 400 ve 800 mg olacak şekilde eklendi. Deney sonunda *Saccharomyces cerevisiae* örneklerinin analizleri (İndirgenmiş glutatyon (GSH), yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), Malondialdehyd (MDA), yağ asidi, E, D, K vitamin ve fitosterol) HPLC ve GC cihazlarında yapıldı. Ayrıca vanilik asidin antioksidan potansiyeli de tespit edildi. Bu çalışmada glifosatın *S. cerevisiae*'da oluşturduğu toksisite ve oksidatif strese karşı vanilik asidin etkisi ilk kez incelenmiştir. Glifosat uygulanan *S. cerevisiae*'da MDA, GSH, GSSG, protein, yağ asidi, E, D, K vitamin ve fitosterol düzeyinde istatistiksel olarak önemli değişikliklerin olduğu, fakat uygulanan vanilik asidin bu parametrelerde oluşan değişiklikleri istatistiksel olarak önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Gaz kromatografisi ile yapılan analiz sonucunda, maya hücrelerinde 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) asitlerinin bulunduğu tespit

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903805412294/2637; Fax.: +903805412294; E-mail: ersncan.dmr@gmail.com

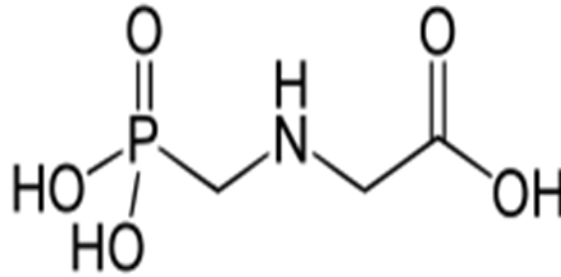
edildi. D, E ve K vitamin miktarlarının analizi ise HPLC Cihazı ile yapıldı. Bu analiz sonucunda, K<sub>2</sub>, α-tokoferol, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, δ-tokoferol, ergosterol, K<sub>1</sub>, stigmasterol, β-sitosterol gibi moleküller tanımlandı. Biyokimyasal analizler sonucunda litrede 800 mg glifosat içeren kültür ortamındaki hücre yoğunluğunun azaldığı belirlendi. Glifosatın *Saccharomyces cerevisiae*'de oluşturduğu oksidatif strese karşı vanilik asidin faydalı etkiler gösterdiği tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** glifosat, vanilik asit, oksidatif stres, yağ asidi ve fitosterol, *Saccharomyces cerevisiae*

## 1. Giriş

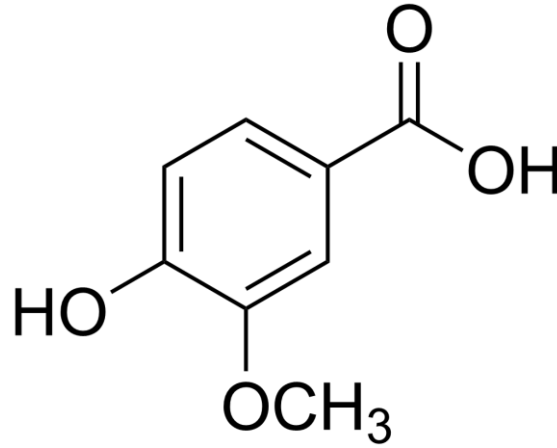
Tarım alanlarında yabancı ot kaynaklı verim kayıpları önemli bir sorundur. Bu sorunun çözümü için farklı alternatifler bulunmakla birlikte son yıllarda kimyasal savaş yöntemleri (herbisitler) kullanılarak yürütülen mücadele yöntemleri ön plana çıkmıştır [1]. Glifosat, dünya genelinde yaygın olarak kullanılan yabancı ot ilaçlarının en önemlisidir. Bu herbisit aynı zamanda kentsel ve evsel ortamlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanıma bağlı olarak yiyecek ve içme sularında glifosat kalıntıları tespit edilmiştir. Bu herbisit bu denli yaygın olarak kullanılması çevre ve insan sağlığı konusunda birtakım riskler hakkında endişelere yol açmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Avrupa genelinde toplanan insan idrar örneklerinin % 44'ünde glifosat izlerine rastlanılmıştır. Araştırmalar, glifosat'a maruz kalan organizmalarda, özellikle oksidatif strese bağlı olarak geniş bir yelpazede olumsuz biyolojik etkilerin oluşabileceği gösterilmiştir. Her ne kadar glifosatın hedef etki mekanizması bitkilere özgü olsa da, omurgalı ve omurgasız canlılarda da bir dizi toksikolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Hem glifosatın hem de Roundup'un (glifosatın ticari şekli), canlı sistemde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu attırdığı ve antioksidan sistemin aktivitesini baskılayarak hücrel oksidatif stresi indüklediği rapor edilmiştir [2].

Pestisitler oksidatif hasar bağlı olarak dokularda hücre homeostazın bozulmasına neden olurlar. Canlı sistemde pestisitler, ROS üretimini teşvik ederek protein, nükleik asit ve lipid gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara yol açarlar [3]. Sık kullanılan pestisitlerin birçoğu toksik etkilerini oksidatif stres mekanizmaları vasıtası ile ortaya koymaktadırlar [4]. Glifosat bazlı herbisitler, glifosata karşı genetiği değiştirilmiş ürünlerin geliştirilmesine paralel olarak geliştirilmişlerdir. Özellikle, tarımda artan kullanım ile birlikte bu kimyasalın canlı yaşamında önemli yeri olan hava, su ve besin maddelerinde kalıntı problemi kamuoyunda endişeleri arttırmıştır. Sonuçta, hedef olmayan organizmalar daha çok glifosata maruz kalmakta, buda canlılarda bir takım sağlık sorunlarına neden olmaktadır [5]. İnsanların glifosata maruz kalmaları neticesinde, karaciğerde mitokondriyal oksidatif fosforilasyonunun azaldığı, proton ve kalsiyum iyonları için mitokondriyal membran geçirgenliğinin arttığı ve süksinat dehidrojenazın inhibe edilmesiyle mitokondriyal fonksiyonunun etkilendiği bildirilmiştir. Glifosat özellikle eritrosit ve lenfosit hücre membranlarında, lipid, protein ve DNA'da oksidatif hasara neden olabilmektedir. Glifosat, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi glutatyon, aromataz ve antioksidan enzim aktivitesini etkileyebilmekte ve asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe edebilmektedir. Kemirgenlerde yapılan kısa süreli çalışmalarda glifosatın belirgin toksik etki göstermediği, lakin glifosata kronik maruz kalma sonucunda karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu ve toksisite, hamile sıçanlarda fetal ossifikasyondaki eksiklikler, büyük ölçüde artmış kanser riski ve kısa ömürlülük ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yine glifosata maruz kalan sıçanlarda idrar ve organ biyokimyasal parametrelerinin yanı sıra proteomik ve metabolomik profilde de değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir [39].



Glifosatın moleküler yapısı (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>)

Antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyebilen, oksidatif stres kaynaklı hasarın azaltmasına yardımcı olan ve ayrıca hücrel redoks dengesini koruyan maddelerdir. Son zamanlarda, pestisit kaynaklı oksidatif stres ve oksidatif hasarın önlenmesine yönelik antioksidanların terapötik kullanımına ilgi artmıştır. Vanilik asit (VA), antioksidan potansiyeli ön planda olan bir moleküldür. VA'nın serbest radikal temizleme ve lipid peroksidasyonunu engelleme özelliğinin bulunduğu ifade edilmiştir. Ayrıca vanilik asidin antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antioksidan özellikler gösterdiği tespit edilmiştir [6]. Vanilik asidin ayrıca anti-mutajenik ve anti-tümör özelliklerinin bulunduğu, bu nedenle nutrasötik bir molekül olduğu kabul edilmiştir. Yenilebilen birçok bitki ve meyvede bulunan vanilik asit, fenolik bir bileşiktir. Diyabet üzerinde de yararlı özellikler gösterdiği belirlenmiştir [7].



Vanilik asidin moleküler yapısı (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8468>)

Bu çalışmada;

- S. cerevisiae* (ekmek mayası), oksidatif stres, ksenebiyotik ve diğer toksik maddelerin etkilerinin incelenmesinde iyi bir ökaryotik hücre modeli olarak görülmektedir [18]. Bundan dolayı *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlarda glifosatın oluşturduğu oksidatif strese karşı vanilik asidin koruyucu etkisi incelenmiştir.
- Yine bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlarda glifosat ve vanilik asidin yağ asidi, fitosterol, D vitamini,  $\alpha$ -tokoferol ve K vitamini biyosentezi üzerindeki etkileri de incelenmiştir.

Bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlarda glifosatın oksidatif stres ve yukarıda belirtilen bazı biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisi ile bu etkilere karşı vanilik asidin etkisi ilk kez değerlendirilmiştir..

## 2. Materyal ve yöntem

### 2. 1. Vanilik asidin DPPH Temizleme Aktivitesi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. DPPH radikal süpürme kapasitesi analiz yöntemleri doğal ekstraktların antioksidan kapasitesini ölçmede çok sık kullanılan bir metottur. Bu yöntem de temel olarak antioksidan tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbansın azalmasına neden olur [36]. Vanilik asidin  $\alpha,\alpha$ -Diphenyl-b-picrylhydrazyl (DPPH) serbest radikal temizleme aktivitesi test edildi. DPPH, metanolde hazırlandı [8]. Vanilik asit (100 mg), 10 mL dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözünerek hazırlandı. Azalan absorbans değeri, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi olarak kabul edildi. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Vanilik Asit}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

### 2. 2. In Vitro Maya Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Bu amaçla; öncelikle deneyde kullanılacak olan *S. cerevisiae*'nin (Ekmek mayası) gelişimi ve çoğalması için YEDP (100 mL için 1 g maya ekstraktı, 2 g baktopepton, 2 g glukoz) besi yeri hazırlandı. Her grup için tekrar sayısı altıdır. Besi yeri hazırlandıktan sonra aşağıdaki gruplar oluşturuldu:

**Kontrol grubu (K):** *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2000 mg maya ekstraktı, 4000 mg baktopepton ve 4000 mg glikoz içeren besiyeri hazırlandı

**Glifosat grubu (G):** *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2000 mg maya ekstraktı, 4000 mg baktopepton ve 4000 mg glikoz içeren besiyeri hazırlandı. Sonra bu besiyerine 40, 80 ve 160 mg glifosat eklendi. Her doz ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü.

**Vanilik asit Grubu (VA):** *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2000 mg maya ekstraktı, 4000 mg baktopepton ve 4000 mg glikoz içeren besiyeri hazırlandı. Sonra bu besiyerine 40, 80 ve 160 mg VA eklendi. Her doz ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü.

**Glifosat+Vanilik Asit Grubu (G+VA):** Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2000 mg maya ekstraktı, 4000 mg baktopepton ve 4000 mg glikoz içeren besiyeri hazırlandı. Sonra bu besiyerine 40, 80 ve 160 mg ayrı ayrı VA ve G eklendi. Her doz ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü. *S. cerevisiae*'da hem G (40, 80 ve 160 mg) hem de VA'nın (40, 80 ve 160 mg) aynı miktardaki dozlarının etkisi araştırılmıştır.

Bütün gruplar 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, hücrelerin yoğunluğu 600 nm'de spektrofotometrede ölçülerek belirlendi. Daha sonra her kültür ortamındaki hücreler steril tüplere alınarak santrifüj edildi, hücre peletleri toplandı. Daha sonra hücre peletleri % 0,9'luk sodyum klorür (NaCl) çözelti ile yıkanarak kültür sıvısı atıklarından temizlendi. İşlem basamakları;

2. 3. *Protein, GSH, GSSG ve MDA Ölçümü için Hücre Peletinin Ekstraksiyonu*: Elde edilen hücre peletleri % 0,9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra, yaş ağırlıkları belirlendi ve Tris-HCl, Trisbase ve EDTA (pH:7,4) tamponunda soğuk ortamda homojenize edildi. Sonra örnekler santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısım total protein, GSH, GSSG ve MDA analizlerinde kullanıldı.

2. 4. *GSH ve GSSG Miktarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazında Ölçümü*: GSH, GSSG ve MDA oksidatif stres çalışmalarında oksidatif stresin tespiti ile şiddetinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan parametrelerdir. Bu çalışmada, canlı sistemde glifosat, oksidatif stres aracılığı ile hasar oluşturduğu için MDA, GSH ve GSSG gibi oksidatif stres parametreleri çalışılmıştır. Analiz için elde edilen süpernatanttan 1,0 mL alınarak üzerine 1,0 mL % 10'luk perklorik asit ilave edilerek deprotenize edildi ve santrifüj edildikten sonra 1,0 mL numune alınarak Shimadzu marka HPLC'de analizi yapıldı [9,10]. Ölçümler 214 nm dalga boyunda yapıldı. Cihazda pompa olarak LC-10 AD VP, UV-visible detektör olarak SPD-M10A VP, PDA dedektörü, kolon firması olarak CTO-10AS VP, otosampler olarak SIL-10AD VP, degasser ünitesi olarak DGU-14A ve Class VP 6.26 işletim programı kullanıldı (Shimadzu, Kyota Japan). Mobil faz olarak % 0,1 mL trikloroasetik asit (TCA) ve metanol (%94/%6,v/v) karışımı kullanıldı. Ayırma işlemi ODS-3 HPLC kolonunda yapıldı. Hesaplama işlemi standart karışımlardan hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre Class VP 6,26 programı ile hesaplandı (Shimadzu, Kyota Japan).

2. 5. *Lipid Peroksidasyon(MDA) Düzeyinin Ölçümü*: Analiz için elde edilen süpernatanttan 1,0 mL alınarak % 10'luk perklorik asit ile muamale edilerek proteinler çöktürüldü ve karışım 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra 1,0 mL numune otosampler viallere alınarak Shimadzu marka HPLC'de analizi yapıldı [11]. Mobil faz olarak 30 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve metil alkol karışımı [12] (% 82,5-% 17,5, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 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'de belirlendi. Hesaplama işlemi standart karışımlardan hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre Class VP 6,26 software ile hesaplandı (Shimadzu, Kyota Japan).

2. 6. *Lipidlerin Ekstraksiyonu*: Hücre peletinden lipidlerin ekstraksiyonu Hara ve Radin (1978) tarafından tanımlanan metoda göre yapıldı. Bunun için; hücre peleti 3/2, (v/v) heksan/izopropil alkol karışımında homojenize edildi ve daha sonra bu karışım santrifüj edilerek süpernatant elde edildi [13].

2. 7. *Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması*: Metil esteri hazırlamak için elde edilen süpernatant fazı içindeki lipid ekstraktının üzerine % 2'lik metanolik sülfürik asit ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Bu karışım 55 °C'de 15 saat süre ile metilasyona bırakıldı [14]. Daha sonra tüpler oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve % 5'lik sodyum klorür (NaCl) ilave edilerek karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri n-heksan ile ekstre edildi ve heksan fazı üstten pipetle alınarak % 2'lik potasyum bikarbonat (KHCO<sub>3</sub>) ile muamele edildi. Fazların ayrılması için bir süre bekletildi. Daha sonra metil esterini içeren bu karışımın, 45 °C'de ve azot gaz akımı altında çözücüsü uçurulduktan sonra kalan tortu 1,0 mL heptanda çözüldü (Christie, 1992) ve gaz kromatografisinde analizi yapıldı [14].

2. 8. *Yağ Asidi Miktarının Gaz Kromatografisi (GC) Cihazında Analizi*: Analizler, Shimadzu GC 17 gaz kromatografisinde yapıldı. Analiz için, SP-2560, 25m x 0,25mm i.d., 0,20 µm (Supelco, Sigma, USA) özelliklere sahip kapiller kolon kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 120–220 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutuldu ve kolon sıcaklık programı 120 °C'den 215 °C'ye kadar ayarlandı. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örnekler için 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 örnekler için yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı [15]. Yağ asidi metil esterlerinin hesaplaması Class GC 2.00 işletim programı ile her bir yağ asidinin toplam yağ asidi içindeki miktarı yüzde olarak (%) hesaplandı.

2. 9. *Alfa-Tokoferol ve Ergosterol'ün HPLC Yöntemi ile Analizi*: Analiz için ayrılan numunelere metanolde çözülmüş potasyum hidroksit (%5'lik KOH) çözeltisinden ilave edildi ve 85 °C'de 15 dk bekletildi. Oda sıcaklığına kadar soğuyan numunelere distile su ilave edilerek karıştırıldı. Sabunlaşmayan lipofilik moleküller 2x5 mL heksan ile ekstrakte edilerek azot gazı altında çözücü uçuruldu. Daha sonra 1,0 mL (%50+%50/v/v) asetonitril/metanol karışımında çözülmüş otosampler viallere alınıp analiz yapıldı. Mobil faz olarak asetonitril/metanol (%60+% 40/v/v) karışımı kullanıldı, mobil faz akış hızı 1,0 mL/dakika'dır. Analiz için PDA-UV dedektör kullanıldı ve kolon olarak da Supelcosil LC 18 (15x4,6 cm, 5 µm; Sigma, USA) kolonu kullanıldı. Analizler 202 nm dalga boyunda yapıldı [16,17].

2. 10. *İstatistiksel analizler:* Elde edilen verilerin istatistiksel analiz için, SPSS (IBM SPSS versiyon 15) paket programı kullanıldı. Gruplar arası farklılıkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Parametreler için grupların ikili karşılaştırmalarında *post hoc* analizi olarak LSD testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $P < 0.05$  olarak kabul edildi. Veriler aritmetik ortalama ve standart hata olarak verildi.

### 3. Bulgular

Vanilik asidin, 4 mg konsantrasyonda en yüksek DPPH giderme aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (95,23), konsantrasyon 10 mg kadar çıkarıldığında DPPH temizleme aktivitesinde önemli değişimlerin olmadığı görülmüştür (Tablo 1).

Tablo 1. Vanilik asidin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini temizleme aktivitesi

Konsantrasyon (mg)	DPPH temizleme etkisi (%)	ABS ortalamaları ( $\lambda$ )
0,5	56,98 $\pm$ 4,42	0,29 $\pm$ 4,42
1	76,45 $\pm$ 1,60	0,15 $\pm$ 1,60
2	91,24 $\pm$ 0,55	0,05 $\pm$ 0,55
4	95,23 $\pm$ 0,29	0,02 $\pm$ 0,29
6	94,19 $\pm$ 1,60	0,03 $\pm$ 1,60
8	94,44 $\pm$ 0,42	0,03 $\pm$ 0,42
10	94,78 $\pm$ 0,38	0,03 $\pm$ 0,38

Tablo 2. *Saccharomyces cerevisiae*'nın gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki Glifosat ve Vanilik asidin (40, 80 ve 160 mg) hücre peletinde total protein, MDA, GSH ve GSSG düzeyine etkisi (Gerekli açıklama materyal ve yöntem de 2.2. *In Vitro* Maya Kültür Ortamlarının Hazırlanması kısmında açıklanmıştır)

Gruplar	Total protein (mg/g hücre pelleti)	MDA (nmol/g hücre pelleti)	GSH	GSSG
<b>Glifosat/ Vanilik asit 40 mg</b>				
Kontrol	6,55 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	75.79 $\pm$ 1.58 <sup>a</sup>	416.32 $\pm$ 9.56 <sup>a</sup>	49.55 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>
Glifosat	11,08 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	151.27 $\pm$ 7.34 <sup>d</sup>	486.42 $\pm$ 12.47 <sup>d</sup>	109.92 $\pm$ 4.43 <sup>d</sup>
Vanilik asit	11,37 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	85.76 $\pm$ 5.83 <sup>a</sup>	425.88 $\pm$ 18.36 <sup>a</sup>	45.40 $\pm$ 8.22 <sup>a</sup>
Glifosat+Vanilik asit	15,14 $\pm$ 0,27 <sup>d</sup>	71.48 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	491.17 $\pm$ 31.69 <sup>b</sup>	58.69 $\pm$ 3.26 <sup>b</sup>
<b>Glifosat/ Vanilik asit 80 mg</b>				
Kontrol	6,41 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	76.53 $\pm$ 1.14 <sup>a</sup>	503.00 $\pm$ 7.70	39.19 $\pm$ 0.97
Glifosat	8,10 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	198.64 $\pm$ 11.66 <sup>d</sup>	800.91 $\pm$ 45.61 <sup>d</sup>	108.46 $\pm$ 2.11 <sup>d</sup>
Vanilik asit	10,43 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	99.61 $\pm$ 6.99 <sup>b</sup>	541.12 $\pm$ 47.28 <sup>b</sup>	41.29 $\pm$ 4.08 <sup>a</sup>
Glifosat+Vanilik asit	12,35 $\pm$ 0,15 <sup>d</sup>	181.01 $\pm$ 23.67 <sup>d</sup>	648.57 $\pm$ 61.33 <sup>c</sup>	108.03 $\pm$ 15.77 <sup>d</sup>
<b>Glifosat/ Vanilik asit 160 mg</b>				
Kontrol	5,21 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	84.03 $\pm$ 3.00 <sup>a</sup>	432.12 $\pm$ 15.54 <sup>a</sup>	40.32 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>
Glifosat	5,87 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	231.76 $\pm$ 19.48 <sup>d</sup>	610.60 $\pm$ 38.94 <sup>d</sup>	122.92 $\pm$ 3.82 <sup>d</sup>
Vanilik asit	10,39 $\pm$ 0,11 <sup>d</sup>	78.02 $\pm$ 4.68 <sup>a</sup>	336.30 $\pm$ 11.87 <sup>c</sup>	30.79 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>
Glifosat+Vanilik asit	9,45 $\pm$ 0,16 <sup>d</sup>	167.82 $\pm$ 4.71 <sup>c</sup>	445.51 $\pm$ 13.23 <sup>a</sup>	87.21 $\pm$ 7.42 <sup>c</sup>

a:  $p > 0.05$  gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz

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

c:  $p < 0.01$  gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan çok önemli

d:  $p < 0.001$  gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan oldukça çok önemli

*S. cerevisiae* kültüründe (40 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda MDA artmıştır ( $p < 0.001$ ). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda MDA azalmıştır ( $p < 0.001$ ). K grubu ile karşılaştırıldığında G ve G+VA gruplarında total protein düzeyi artmıştır ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (80 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda MDA artmıştır ( $p < 0,001$ ). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda MDA kısmen azalmıştır. Fakat MDA, K grubuna göre yüksektir ( $p < 0,001$ ) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (160 mg), K grubuna göre G grubunda MDA artmıştır ( $p < 0,001$ ). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda MDA azalmıştır. Fakat MDA, K grubuna göre yüksektir ( $p < 0,001$ ) (Tablo 2). K grubu ile karşılaştırıldığında G ve G+VA gruplarında total protein düzeyi artmıştır ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ) (Tablo 2).

*S. cerevisiae* kültüründe (40 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda GSH ve GSSG artmıştır ( $p < 0.001$ ). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda GSSG düzeyi azalmış ( $p < 0,05$ ), GSH artmıştır ( $p > 0.05$ ) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (80 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda GSH ve GSSG artmıştır ( $p < 0.001$ ). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda GSH azalmıştır ( $p < 0.05$ ). GSSG düzeyinde istatistiksel farklılık yoktur ( $p > 0.05$ ) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (160 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda GSH ve GSSG artmıştır ( $p < 0,001$ ). G grubuna göre G+VA grubunda GSH ve GSSG azalmıştır ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (80 mg), K grubuna göre G grubunda  $\alpha$ -tokoferol artmıştır ( $p < 0,05$ ). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda  $\alpha$ -tokoferol artmıştır ( $p < 0,05$ ). K grubuna göre G grubunda ergosterol azalmıştır ( $p < 0,001$ ). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda ergosterol artmıştır ( $p < 0,001$ ). K grubuna göre G grubunda stigmasterol artmıştır ( $p < 0,05$ ). G grubu

ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda stigmasterol artmıştır ( $p<0,05$ ). K grubuna göre G grubunda  $\beta$ -sitosterol artmıştır ( $p<0,01$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda  $\beta$ -sitosterol azalmıştır ( $p<0,01$ ) (Tablo 3).

Tablo 3. *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki Glifosat ve Vanilik asidin (80 ve 160 mg) hücre peletinde vitamin D, vitamin E, vitamin K ve fitosterol düzeyine etkisi ( $\mu\text{g/g}$  hücre peleti)

Glifosat/ Vanilik asit 80 mg				
Gruplar	Kontrol	Glifosat	Vanilik asit	Glifosat+Vanilik asit
Vitamin K <sub>1</sub>	0.15±0.04 <sup>a</sup>	0.35±0.06 <sup>d</sup>	0,20±0,01 <sup>b</sup>	0,27±0,02 <sup>c</sup>
Vitamin K <sub>2</sub>	0.11±0.03 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>a</sup>	0,26±0,04 <sup>c</sup>	0,56±0,04 <sup>d</sup>
$\alpha$ -Tokoferol	0.28±0.02	0.38±0.01 <sup>b</sup>	0,31±0,06 <sup>a</sup>	0,56±0,03 <sup>d</sup>
$\delta$ -Tokoferol	0.27±0.05 <sup>a</sup>	0.53±0.08 <sup>b</sup>	0,30±0,03 <sup>a</sup>	0,56±0,06 <sup>d</sup>
Vitamin D <sub>2</sub>	0.73±0.08	0.78±0.06 <sup>a</sup>	0,48±0,04 <sup>d</sup>	0,63±0,09 <sup>b</sup>
Vitamin D <sub>3</sub>	0.23±0.06	0.43±0.07 <sup>c</sup>	0,39±0,0 <sup>c</sup>	0,35±0,03 <sup>b</sup>
Ergosterol	53.61±2.11	16.70±2.76 <sup>d</sup>	77,90±4,56 <sup>b</sup>	41,17± 2,89 <sup>c</sup>
Stigmasterol(mg/g)	0.38±0.03	0.56±0.02 <sup>c</sup>	0,71±0,04 <sup>d</sup>	0,74±0,03 <sup>d</sup>
$\beta$ -sitosterol	4.76±0.54	8.37±0.42 <sup>c</sup>	3,07±0,36 <sup>c</sup>	3,82±0,45 <sup>c</sup>
Glifosat/ Vanilik asit 160 mg				
Vitamin K <sub>1</sub>	0.46±0.04 <sup>a</sup>	0.88±0.06 <sup>d</sup>	0,44±0,03 <sup>a</sup>	0,60±0,03 <sup>c</sup>
Vitamin K <sub>2</sub>	0.11±0.01 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>a</sup>	0,16±0,01 <sup>a</sup>	0,15±0,02 <sup>a</sup>
$\alpha$ -Tokoferol	0.39±0.02 <sup>a</sup>	0.39±0.01 <sup>a</sup>	0,23±0,02 <sup>b</sup>	0,26±0,03 <sup>b</sup>
$\delta$ -Tokoferol	0.30±0.05 <sup>a</sup>	0.27±0.08 <sup>a</sup>	0,31±0,02 <sup>a</sup>	0,23±0,02 <sup>b</sup>
Vitamin D <sub>2</sub>	0.78±0.08 <sup>a</sup>	0.75±0.06 <sup>a</sup>	1,40±0,09 <sup>d</sup>	0,46±0,06 <sup>c</sup>
Vitamin D <sub>3</sub>	0.35±0.06 <sup>a</sup>	0.61±0.07 <sup>c</sup>	0,38±0,02 <sup>a</sup>	0,19±0,01 <sup>c</sup>
Ergosterol	84.88±10.11	16.63±2.76 <sup>d</sup>	47,95±3,67 <sup>c</sup>	63,11±367 <sup>b</sup>
Stigmasterol(mg/g)	0.41±0.03	0.38±0.02 <sup>a</sup>	0,38±0,02 <sup>a</sup>	0,32±0,03 <sup>b</sup>
$\beta$ -sitosterol	5.77±0.44	2.87±0.32 <sup>d</sup>	4,26±0,34 <sup>b</sup>	7,16± 0,23 <sup>b</sup>

a:  $p>0.05$  gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz

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

c:  $p<0.01$  gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan çok önemli

d:  $p<0.001$  gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan oldukça çok önemli

*S.cerevisiae* kültüründe (160 mg), K grubuna göre G grubunda  $\alpha$ -tokoferolde değişim yoktur ( $p>0.05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda  $\alpha$ -tokoferol azalmıştır ( $p<0.01$ ). K grubuna göre G grubunda ergosterol azalmıştır ( $p<0,001$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda ergosterol artmıştır ( $p<0,001$ ). K grubuna göre G grubunda stigmasterol azalmıştır ( $p<0,05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda stigmasterol azalmıştır ( $p<0,05$ ). K grubuna göre G grubunda  $\beta$ -sitosterol azalmıştır ( $p<0,01$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda  $\beta$ -sitosterol artmıştır ( $p<0,01$ ) (Tablo 3).

*S.cerevisiae* kültüründe (40 mg), K grubuna göre G grubunda C16:0 azalmıştır ( $p<0.001$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:0 azalmıştır. ( $p<0,05$ ). K grubuna göre G grubunda C16:1 n-7 artmıştır ( $p<0,05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:1 n-7 azalmıştır ( $p<0,001$ ). K grubuna göre G grubunda C18:0 azalmıştır ( $p>0.05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda azalmıştır ( $p>0.05$ ). K grubuna göre G grubunda C18:1n-9 azalmıştır ( $p<0,001$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:1n-9 artmıştır ( $p>0.05$ ). K grubuna göre G grubunda C18:2 n-6 azalmıştır ( $p<0,001$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:2 n-6 artmıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo 4).

*S.cerevisiae* kültüründe (80 mg), K grubuna göre G grubunda C16:0 azalmıştır ( $p<0,05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:0 artmıştır ( $p<0,05$ ). K grubuna göre G grubunda C16:1 n-7 artmıştır ( $p<0,05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:1 n-7 artmıştır ( $p<0,05$ ). K grubuna göre G grubunda C18:0 azalmıştır ( $p<0,01$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda artmıştır ( $p<0,01$ ). K grubuna göre G grubunda C18:1n-9 azalmıştır ( $p<0,01$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:1n-9 artmıştır ( $p<0,05$ ). K grubuna göre G grubunda C18:2 n-6 azalmıştır ( $p>0,05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:2 n-6 artmıştır ( $p<0,01$ ) (Tablo 4).

*S.cerevisiae* kültüründe (160 mg), K grubuna göre G grubunda C16:0 artmıştır ( $p<0,05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:0 azalmıştır ( $p<0,01$ ). K grubuna göre G grubunda C16:1 n-7 azalmıştır ( $p>0,05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:1 n-7 artmıştır ( $p<0,001$ ). K grubuna göre G grubunda C18:0 artmıştır ( $p<0,05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda azalmıştır ( $p<0,05$ ). K grubuna göre G grubunda C18:1n-9 azalmıştır ( $p<0,05$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:1n-9 artmıştır ( $p<0,01$ ). K grubuna göre G grubunda C18:2 n-6 azalmıştır ( $p<0,01$ ). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:2 n-6 artmıştır ( $p<0,01$ ) (Tablo 4).

Tablo 4. *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki Glifosat ve Vanilik asidin (40, 80 ve 160 mg) hücre peletinde yağ asidi kompozisyonuna etkisi (%)

Glifosat/ Vanilik asit 40 mg				
Gruplar	Kontrol	Glifosat	Vanilik asit	Glifosat+Vanilik asit
Kaprilik asit C8:0	2.39±0.12	3.45±0.16 <sup>c</sup>	2.70±0.03 <sup>a</sup>	2.65±0.02 <sup>a</sup>
Kaprinik asit C10:0	1.07±0.01 <sup>a</sup>	0.93±0.01 <sup>a</sup>	0.94±0.01 <sup>a</sup>	1.03±0.01 <sup>a</sup>
Laurik Asit C12:0	5.79±0.15 <sup>a</sup>	6.56±0.12 <sup>b</sup>	5.71±0.09 <sup>a</sup>	6.94±0.06 <sup>b</sup>
Miristik asit C14:0	2.90±0.11 <sup>a</sup>	2.95±0.12 <sup>a</sup>	3.10±0.03 <sup>b</sup>	3.20±0.01 <sup>b</sup>
Palmitik asit C16:0	42.71±2.67	23.71±1.89 <sup>d</sup>	31.21±0.28 <sup>b</sup>	20.18±0.07 <sup>d</sup>
Palmitoleik asit C16:1n-7	4.63±0.11 <sup>a</sup>	5.03±0.13 <sup>b</sup>	2.61±0.12 <sup>d</sup>	2.52±0.25 <sup>d</sup>
Margarik asit C17:0	1.81±0.02	1.47±0.04 <sup>b</sup>	5.16±0.03 <sup>d</sup>	4.75±0.02 <sup>d</sup>
Stearik asit C18:0	25.38±2.15 <sup>a</sup>	23.94±2.22 <sup>a</sup>	24.77±0.23 <sup>a</sup>	21.39±1.34 <sup>a</sup>
Oleik asit C18:1n-9	9.71±0.87	3.24±0.67 <sup>d</sup>	8.29±0.08 <sup>b</sup>	4.27±0.09 <sup>d</sup>
Linoleik asit C18:2 n-6	3.61±0.04	1.68±0.08 <sup>d</sup>	1.48±0.01 <sup>d</sup>	1.80±0.01 <sup>d</sup>
Glifosat/ Vanilik asit 80 mg				
Kaprilik asit C8:0	3.53±0.13	8.13±0.27 <sup>d</sup>	2.77±0.05 <sup>b</sup>	4.04±0.15 <sup>b</sup>
Kaprinik asit C10:0	0.27±0.02 <sup>a</sup>	0.28±0.01 <sup>a</sup>	0.60±0.01 <sup>d</sup>	0.43±0.07 <sup>c</sup>
Laurik Asit C12:0	7.69±0.17 <sup>a</sup>	8.49±0.27 <sup>b</sup>	8.09±0.21 <sup>b</sup>	7.52±0.25 <sup>a</sup>
Miristik asit C14:0	4.33±0.17	4.75±0.21 <sup>a</sup>	3.59±0.16 <sup>b</sup>	4.15±0.20 <sup>a</sup>
Palmitik asit C16:0	43.61±1.37	41.58±1.45 <sup>b</sup>	42.34±0.84 <sup>a</sup>	43.37±0.83 <sup>a</sup>
Palmitoleik asit C16:1n-7	4.23±0.13	5.30±0.14 <sup>b</sup>	5.45±0.15 <sup>b</sup>	5.72±0.16 <sup>c</sup>
Margarik asit C17:0	3.18±0.16	2.41±0.13 <sup>b</sup>	2.62±0.13 <sup>b</sup>	2.29±0.30 <sup>b</sup>
Stearik asit C18:0	16.46±1.11	13.21±0.93 <sup>c</sup>	19.18±0.13 <sup>c</sup>	17.52±0.19 <sup>b</sup>
Oleik asit C18:1n-9	4.35±0.65 <sup>a</sup>	2.11±0.32 <sup>d</sup>	4.56±0.61 <sup>a</sup>	3.17±0.14 <sup>c</sup>
Linoleik asit C18:2 n-6	1.41±0.06	1.21±0.02 <sup>a</sup>	2.11±0.32 <sup>b</sup>	3.44±0.17 <sup>c</sup>
Glifosat/ Vanilik asit 160				
Kaprilik asit C8:0	3.49±0.11 <sup>a</sup>	3.35±0.08 <sup>a</sup>	3.98±0.01 <sup>b</sup>	4.43±0.10 <sup>b</sup>
Kaprinik asit C10:0	0.64±0.01 <sup>a</sup>	0.78±0.02 <sup>a</sup>	1.02±0.01 <sup>b</sup>	1.14±0.05 <sup>b</sup>
Laurik Asit C12:0	6.37±0.11	7.86±0.21 <sup>b</sup>	7.15±0.03 <sup>b</sup>	9.07±0.08 <sup>b</sup>
Miristik asit C14:0	3.51±0.18 <sup>a</sup>	3.68±0.15 <sup>a</sup>	2.81±0.03 <sup>b</sup>	3.04±0.02 <sup>b</sup>
Palmitik asit C16:0	40.35±1.18 <sup>a</sup>	42.60±1.05 <sup>b</sup>	38.32±0.11 <sup>a</sup>	37.13±0.41 <sup>a</sup>
Palmitoleik asit C16:1n-7	2.43±0.02 <sup>a</sup>	2.33±0.06 <sup>a</sup>	4.80±0.01 <sup>d</sup>	4.91±0.01 <sup>d</sup>
Margarik asit C17:0	1.19±0.08 <sup>a</sup>	1.33±0.02 <sup>a</sup>	1.87±0.02 <sup>b</sup>	1.86±0.02 <sup>b</sup>
Stearik asit C18:0	20.99±1.18 <sup>a</sup>	22.91±1.14 <sup>b</sup>	25.75±0.22 <sup>c</sup>	20.59±0.05 <sup>a</sup>
Oleik asit C18:1n-9	4.82±0.20	3.96±0.21 <sup>b</sup>	2.45±0.12 <sup>d</sup>	5.62±0.19 <sup>c</sup>
Linoleik asit C18:2 n-6	1.04±0.02	0.54±0.05 <sup>d</sup>	2.45±0.01 <sup>d</sup>	2.88±0.09 <sup>d</sup>

a: p&gt;0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz

b: p &lt;0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli

c: p&lt;0.01 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan çok önemli

d: p&lt;0.001 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan oldukça çok önemli

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Bu çalışmada, dünya genelinde yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir herbisit olan glifosatın farklı konsantrasyonlardaki toksik etkisine karşı vanilik asidin etkisi değerlendirildi. Bu çalışmada hem glifosat hem de vanilik asit için düşük, orta ve yüksek doz olmak üzere üç farklı konsantrasyonun etkisi *Saccharomyces cerevisiae* L. hücrelerinde test edilmiştir. *S. cerevisiae* (ekmek mayası), oksidatif stres, ksenebiyotik ve diğer toksik maddelerin etkilerinin incelenmesinde iyi bir ökaryotik hücre modeli olarak görülmektedir [18].

Aktif içeriği Glifosat olan Roundup, 1974'te piyasaya sürüldü. Roundup, şu anda en yaygın kullanılan herbisit olup, kalıntıları gıda maddelerinde, içme sularında bulunmuştur. Kalıntı tespiti ile birlikte, bu kalıntıların çevre ve insan sağlığı üzerinde olası olumsuz etkiler endişeye neden olmuştur. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan rapora kadar, Roundup'un insanlar için güvenli olduğu düşünülüyordu fakat bu raporla birlikte Roundup ile kanser arasında bağlantı olduğu ortaya çıkmıştır. Roundup kullanan bazı tarım çalışanlarında, hamilelik sorunlarının olduğu belirlenmiştir. Yine Roundup'un, tarımsal uygulamalarda kullanılan dozundan daha düşük dozunun insan plasenta JEG3 hücreleri için toksik olduğu tespit edilmiştir. Son araştırmalar, insan idrarında bulunan düşük glifosat

seviyesinin, göğüs kanseri hücrelerinin büyümesini sağladığı ve bu herbisitın kanserojen potansiyele sahip olduğunu desteklediği ifade edilmiştir [19].

Oksidatif stres, canlı sistemde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilme hızı ile onları ortadan kaldıran antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ile oluşan bir durumdur. ROS düzeyi arttığında, antioksidan kapasite azaldığında canlı sistemi oluşturan biyomoleküllerde oksidatif hasar oluşmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ortaya çıkan bilgiler, herbisitlerin canlı sistemde ROS düzeyinin artmasını teşvik ederek canlı sistemde patolojik koşulların gelişimine zemin hazırladığını göstermektedir [19,20]. Glifosatın, canlı sistemin antioksidan aktivitesini bozduğu ve oksidatif stres parametrelerinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir [20,21]. Pestisitlerin glutatyon, sfingolipit ve sterol metabolizması üzerinde bozucu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir [22]. Çalışmamızda glifosat uygulanan grupta GSH düzeyi artmıştır. Olasılıkla pestisitlerin glutatyon metabolizmasını etkilemesinden dolayı GSH düzeyi yükselmiş olabilir [22,23] (Tablo 2).

Çalışmamızda glifosatın oksidatif stres parametresinde artışa neden olduğu ve antioksidan sistemin aktivitesini bozduğu ortaya çıkmıştır. Günümüzde tarım kimyasallarının kullanım miktarının arttığı ve bunların kalıntılarının besin maddeleri, su ve havada bulunduğu ve bunların insan sağlığına kötü yansımalarının olacağı bilinmektedir. Bundan dolayı insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan aktif maddelerin, tarım kimyasallarının canlı sistemde oluşturduğu toksisite üzerindeki etkilerinin araştırılması günümüz koşullarında öncelikli bir hal almıştır. Bu çalışmada sağlık üzerinde olumlu etkileri olan vanilik asidin (antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, anti-tümör ve hepatoprotektif) [24,25] glifosat kaynaklı oksidatif strese, oksidatif stres parametrelerinden olan MDA ve GSSG (gerekli düzeltmeler yapıldı) düzeyinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda tarım kimyasallarının oluşturduğu toksisiteye karşı aktif bileşiklerin olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir [26,21,5a]. Bu çalışma, vanilik asidin de bu özelliği taşıdığını göstermiştir. Çalışmalar vanilik asidin etkili bir antioksidan aktiviteye sahip olduğuna işaret etmektedir [7]. Bizim bulgularımızda bunu desteklemektedir (Tablo 1, Tablo 2). Bu çalışma glifosat toksisitesine karşı vanilik asidin etkisinin denendiği ilk çalışma özelliğini de taşımaktadır. Herbisitler kültür bitkileriyle simbiyotik olarak yaşayan mikorizal fungusların gelişimi ve faaliyetini olumsuz şekilde etkilediği bildirilmiştir [37]. Fare sıçanlarda yüksek doz glifosatın büyüme geriliğine, karaciğer ve böbrek hasarına, inflamasyona ve mide rahatsızlıklarına neden olduğu bildirilmiştir. Sucul bitkisel organizmalarda, glifosatın toksik etkiler gösterdiği, fotosentez, solunum ve esansiyel aromatik amino asitlerin sentezi ile ilgili hayati fonksiyonları değiştirerek etki ettiği ifade edilmiştir. Toprakta yaşayan bakterilerin, herbisitın olumsuz etkilerinden doğrudan etkilendiği düşünülmektedir. Yine glifosatın böcekler, kuşlar ve tozlaşma için oldukça önemli olan arılar üzerinde toksik etkiler gösterdiği ifade edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün uzmanlaşmış kanser ajansı (WHO, Cenevre, İsviçre) olarak adlandırılan bir kuruluş olan IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, Lyon, Fransa), insanlar için glifosatu "muhtemel kanserojen" olarak sınıflandırmıştır. EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu, Parma, İtalya), glifosatın insanlar için kanserojen olabileceğini ve insan sağlığı için riskler taşıdığını bildirmiştir [38].

Maya hücre zarının önemli bir bileşeni olan ergosterol, sadece bu canlıların büyüme ve gelişmesi için elzem olmasının yanında, aynı zamanda bu canlıların strese uyumu için de oldukça önemli hücrenel bir moleküldür [27]. Mayalarda ergosterol biyosentezinin inhibisyonu, membran akışkanlığı ve geçirgenliğini bozmaktadır. Aynı zamanda bu canlıların fermentasyon kabiliyetinin bozulmasına da sebep olmaktadır. Bu durum fermentasyon teknolojisine bağlı olarak besin maddelerinin üretimini olumsuz yönde etkilemektedir [22]. Ergosterol biyosentezi bozulan canlıların büyüme ve gelişmeleri olumsuz etkilenmekte sonuçta canlının ölmesi söz konusu olmaktadır [28]. Herbisitlerin maya hücrelerinde ergosterol sentezini bozduğu tespit edilmiştir [29]. Farklı tarım kimyasallarının mayalarda ergosterol biyosentezini bozduğu gösterilmiştir [22]. Çalışmamızda glifosat uygulamasının *S. cerevisiae* da ergosterol sentezini azalttığı, fakat yüksek doz vanilik asit uygulamasının *S. cerevisiae* da ergosterol sentezini artırarak fermentasyon kapasitesinde düzelmeye yol açtığı söylenebilir (Tablo 3).

Mayalarda 16:0, 18:0, 16:1, 18:1 ve 18:2 yağ asitlerinin yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir [29]. Pestisitlerin mayalarda yağ asidi bileşiminde değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir [29]. Maya hücrelerinde herbisitlerin doymuş ve doymamış yağ asidi metabolizmasını etkilediği belirlenmiştir [30]. Çalışmamız da glifosat uygulaması yapılmış *S. cerevisiae* da hücrelerinde yağ asidi bileşiminde önemli değişimlerin olduğu görülmüştür. Glifosat uygulanmış *S. cerevisiae* da hücrelerinde, vanilik asidin yağ asidi bileşimi üzerinde farklı etkiler gösterdiği görülmektedir (Tablo 4). Bu çalışmada hem glifosatın hem de vanilik asidin yağ asidi biyosentezini düzenleyen enzimlerin aktivitesini etkilemesinden dolayı yağ asidi bileşiminin değiştiğini söyleyebiliriz [31,32]. Mayalar üzerinde kimyasal maddelerin etkilerine yönelik yapılan çalışmalarda bu tarz etkileri gözlemlemekteyiz [29]. Herbisitlerin yağ asidi metabolizması üzerinde inhibitif etkiler sergiledikleri görülmektedir [29,30]. Herbisit uygulanan sıçanlarda oksidatif stres ve yağ asidi bileşiminde değişimlerin olduğu, bu sıçanlara uygulanan zeytinyağının oksidatif stres ve yağ asidi bileşiminde oluşan değişikliklere karşı olumlu sonuçlar sergilediği belirlenmiştir. Zeytinyağında bulunan aktif bileşiklerin oksidatif stres ve yağ asidi bileşiminde oluşan değişikliklere karşı koruyucu özellikler gösterdiği ifade edilmiştir [33]. Bitkilerde bulunan aktif bileşiklerin tarım kimyasallarına bağlı olarak oluşan toksik etkilere karşı olumlu etkilere sahip olduğu ifade edilmiştir [34,35b].

Sonuç olarak tarımsal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bazı tarım kimyasallarının canlı sistemde yağ asidi, vitamin ve sterol biyosentezi üzerindeki etkilerine yönelik çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir. Bu çalışmada glifosatın *S. cerevisiae*'da oluşturduğu toksisite ve oksidatif strese karşı vanilik asidin etkisi ilk kez



incelenmiştir. Elde edilen verilere göre, glifosatın oluşturduğu oksidatif strese karşı vanilik asidin faydalı etkiler gösterdiği söylenebilir.

### Teşekkür

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir. Katkılarından dolayı teşekkürler.

### Kaynaklar

- [1] Yılmaz, S., Aslım, B., & Beyatlı, Y. (1997). Glifosat herbisidinin bazı laktik asit bakterilerinin gelişimi ve asit üretimine etkisi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 3(3), 70-77.
- [2] Uren Webster, T.M., & Santos, E.M. (2015). Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics*, 16:32. doi: 10.1186/s12864-015-1254-5.
- [3] Burella, P.M., Odetti, L.M., Simoniello, M.F., & Poletta, G.L. (2018). Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) exposed in ovo to pesticide formulations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 161, 437-443. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.006.
- [4] Gallegos, C.E., Baier, C.J., Bartos, M., Bras, C., Domínguez, S., Mónaco, N., ... & Minetti, A. (2018). Perinatal glyphosate-based herbicide exposure in rats alters brain antioxidant status, glutamate and acetylcholine metabolism and affects recognition memory. *Neurotox. Res.*, 34(3), 363-374. doi: 10.1007/s12640-018-9894-2.
- [5a] Turkmen, R., Birdane, Y.O., Demirel, H.H., Yavuz, H., Kabu, M., & Ince, S. (2019). Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 26(11), 11427-11437. doi: 10.1007/s11356-019-04585-5.
- [6] Amin, F.U., Shah, S.A., & Kim, M.O. (2017). Vanillic acid attenuates A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Sci. Rep.*, 7, 40753. doi: 10.1038/srep40753.
- [7] Vinothiya, K., & Ashokkumar, N. (2017). Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. *Biomed Pharmacother.*, 87, 640-652. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.134.
- [8] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- [9] Klejdus, B., Zehnálek, J., Adam, V., Petrek, J., Kizek, R., Vacek, J.,... & Kubán, V. (2004). Sub-picomole high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric determination of glutathione in the maize (*Zea mays* L.) kernels exposed to cadmium. *Analytica Chimica Acta*, 520, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.060>
- [10] Yılmaz, O., Keser, S., Tuzcu, M., Güvenç, M., Çetintaş, B., Irtegun, S.,... & 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.
- [11] Karatas, F., Karatepe, M., & Baysar, A. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 311(1), 76-9.
- [12] Karatepe, M. (2004). Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC/UV. *LC-GC North America*, 22(4), 362-365.
- [13] Hara, A., & Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.*, 90(1), 420-6.
- [14] Christie, W.W. (1989). *Gas chromatography and lipids*. Glasgow: The Oily Press Ltd.
- [15] Tvrzická, E., Vecka, M., Staňková, B., & Žák, A. (2002). Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography–flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta*, 465, 337-350.
- [16] Katsanidis, E., & Addis, P.B. (1999). Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. *Free Radic. Biol. Med.*, 27(11-12), 1137-40.
- [17] López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., & Ríos-Vázquez, N.J. (2006). High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *J. Chromatogr. A.*, 1105(1-2), 135-9.
- [18] Braconi, D., Bernardini, G., Fiorani, M., Azzolini, C., Marzocchi, B., Proietti, F.,... & Santucci, A. (2010). Oxidative damage induced by herbicides is mediated by thiol oxidation and hydroperoxides production. *Free. Radic. Res.*, 44(8), 891-906.
- [19] Luo, L., Wang, F., Zhang, Y., Zeng, M., Zhong, C., & Xiao, F. (2017). In vitro cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes. *J. Environ. Sci. Health B.*, 52(6), 410-417. doi: 10.1080/03601234.2017.1293449.
- [20] de Souza, J.S., Laureano-Melo, R., Herai, R.H., da Conceição, R.R., Oliveira, K.C., da Silva, I.D.C.G.,... & Giannocco, G. (2019). Maternal glyphosate-based herbicide exposure alters antioxidant-related genes in the brain and serum metabolites of male rat offspring. *Neurotoxicology*, 74, 121-131. doi: 10.1016/j.neuro.2019.06.004.
- [21] Gehin, A., Guyon, C., & Nicod, L. (2006). Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of vitamins C and E. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 22(1), 27-34. doi: 10.1016/j.etap.2005.11.003.

- [22] Kong, Z., Li, M., An, J., Chen, J., Bao, Y., Francis, F.,... & Dai, X. (2016). The fungicide triadimefon affects beer flavor and composition by influencing *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Sci. Rep.*, 6, 33552. doi: 10.1038/srep33552.
- [23] Peters, L.P., Carvalho, G., Martins, P.F., Dourado, M.N., Vilhena, M.B., Pileggi, M.,... & Azevedo, R.A. (2014). Differential responses of the antioxidant system of ametryn and clomazone tolerant bacteria. *PLoS One*, 9(11), e112271. doi: 10.1371/journal.pone.0112271.
- [24] Dianat, M., Radmanesh, E., Badavi, M., Mard, S.A., & Goudarzi, G. (2016). Disturbance effects of PM<sub>10</sub> on iNOS and eNOS mRNA expression levels and antioxidant activity induced by ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart: protective role of vanillic acid. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23(6), 5154-65. doi: 10.1007/s11356-015-5759-x.
- [25] Anbalagan, V., Raju, K., & Shanmugam, M. (2017). Assessment of lipid peroxidation and antioxidant status in vanillic acid treated 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J. Clin. Diagn. Res.*, 11(3), BF01-BF04. doi: 10.7860/JCDR/2017/23537.9369.
- [26] Avdatek, F., Birdane, Y.O., Türkmen, R., & Demirel, H.H. (2018). Ameliorative effect of resveratrol on testicular oxidative stress, spermatological parameters and DNA damage in glyphosate-based herbicide-exposed rats. *Andrologia*, 50(7), e13036. doi: 10.1111/and.13036.
- [27] Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y., & Zeng, B. (2017). Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian J. Microbiol.*, 57(3), 270-277. doi: 10.1007/s12088-017-0657-1.
- [28] Kagan, I.A., Michel, A., Prause, A., Scheffler, B.E., Pace, P., & Duke, S.O. (2005). Gene transcription profiles of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with plant protection fungicides that inhibit ergosterol biosynthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.02.002>
- [29] Bernat, P., Nykiel-Szymańska, J., Stolarek, P., Słaba, M., Szweczyk, R., & Różalska, S. (2018). 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced oxidative stress: Metabolome and membrane modifications in *Umbelopsis isabellina*, a herbicide degrader. *PLoS One*, 13(6), e0199677. doi: 10.1371/journal.pone.0199677.
- [30] Viegas, C.A., Cabral, M.G., Teixeira, M.C., Neumann, G., Heipieper, H.J., & Sá-Correia, I. (2005). Yeast adaptation to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid involves increased membrane fatty acid saturation degree and decreased OLE1 transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330(1), 271-8.
- [31] Tehlivets, O., Scheuringer, K., & Kohlwein, S.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1771(3), 255-70.
- [32] Kieliszek, M., Błażej, S., Bzducha-Wróbel, A., & Kot, A.M. (2019). Effect of selenium on lipid and amino acid metabolism in yeast cells. *Biol. Trace Elem. Res.*, 187(1), 316-327. doi: 10.1007/s12011-018-1342-x.
- [33] Nakbi, A., Tayeb, W., Grissa, A., Issaoui, M., Dabbou, S., Chargui, I.,... & Hammami, M. (2010). Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutr. Metab. (Lond.)*, 7:80. doi: 10.1186/1743-7075-7-80.
- [34] Saxena, R., Garg, P., & Jain, D.K. (2011). In vitro anti-oxidant effect of vitamin e on oxidative stress induced due to pesticides in rat erythrocytes. *Toxicol. Int.*, 18(1), 73-6. doi: 10.4103/0971-6580.75871.
- [35b] Turkmen, R., Birdane, Y.O., Demirel, H.H., Kabu, M., & Ince, S. (2019). Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes induced by sub-chronic oral glyphosate-based herbicide in rats. *Toxicol. Res. (Camb.)*, 8(2), 238-245. doi: 10.1039/c8tx00287h.
- [36] Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., & Deniz, İ. (2013). Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu Karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir odun dışı bazı bitkisel ürünler. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, 13(1), 48-59.
- [37] Kitiş, Y.E., Yazır, B., & Özkaya, H.Ö. (2016). The effects of some soil herbicides on root colonization and spore number of mycorrhizal fungi *Glomus intraradice*. *Biological Diversity and Conservation*, 9/2, 1-7.
- [38] Torretta, V., Katsoyiannis, I.A., Viotti, P., & Rada, E.C. (2018). Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain. *Sustainability*, 10, 950. doi:10.3390/su10040950.
- [39] Milić, M., Žunec, S., Micek, V., Kašuba, V., Mikolić, A., Lovaković B.T.,...& Želježić, D. (2018). Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 69, 154-168. doi: 10.2478/aiht-2018-69-3114

(Received for publication 25 September 2019; The date of publication 15 December 2019)