TUĞRUL MEHTİYEV

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra eğer basılacak ise yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

DOKTORA TEZİ

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2023

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

GLİFOSAT VE METABOLİTİ AMPA'NIN ÇEŞİTLİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE OKSİDATİF HASAR, APOPTOZ VE EPİGENETİK MEKANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TUĞRUL MEHTİYEV

DANIŞMAN
PROF. DR. SİBEL ÖZDEN

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Kızlarım Deniz ve Firuze'ye ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Her konuda desteğini esirgemeyen, üzerimde çok fazla emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Sibel Özden'e teşekkürü bir borç bilirim.

Desteklerinden dolayı İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gül Özhan'a ve Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve yardımcılarına,

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Rovshan Mehtiyev'e, annem Firuza Aliyeva'ya, eşim Nuray Mehtiyev'e, ablam Mehriban Hasanlı'ya, kardeşim Arif Mehtiyev'e ve eşimin ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-37807.

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER V
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Glifosat 3
2.1.1. Glifosatın Kimyasal Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri 3
2.2. Glifosata Maruziyet 4
2.3. Glifosatın Toksikokinetik Özellikleri 5
2.4. Glifosatın Bitkiler Üzerindeki Etki Mekanizması 7
2.5. Glifosatin Toksik Etki Mekanizmaları 8
2.6. Glifosatın Toksik etkileri 10
2.6.1. Akut Toksisite 10
2.6.2. Kronik Toksisite 11
2.6.3. Karsinojenik Etki 11
2.6.4. Nörotoksik Etkiler 12
2.6.5. Teratojenik Etki 12
2.7. Glifosat ile İlgili Yasal Düzenlemeler 13
2.8. Epigenetik 15
2.8.1. DNA Metilasyonu 17
2.8.2. Histon Modifikasyonları 18
2.8.2.1. Histon Asetilasyonu 18
2.8.2.2. Histon Metilasyonu 20
2.8.2.3. Histon Modifikasyonu ve Kanser ilişkisi 21

2.8.2.4. Histon Modifikasyonunda Rol Oynayan Genler 22
2.8.3. Glifosatın Epigenetik Modifikasyonlar Üzerine Etkileri üzerine yapılan çalışmalar 25
2.9. Apoptoz Mekanizmaları 27
2.9.1. Glifosatın Apoptoz ve Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri 29
3. GEREÇ VE YÖNTEM 31
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler 31
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar 32
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler 34
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları 35
3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği 35
3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini 35
3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler 35
3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması 36
3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama) 36
3.4.6. Hücrelerin Sayılması 37
3.5. Glifosat ve AMPA Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanışı. 37
3.6. Sitotoksisite Testleri 38
3.6.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması 38
3.6.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanışı 39
3.6.3. Glifosat ve AMPA'nın Hücre Kültürüne Maruziyeti 40
3.6.4. MTT Testi 42
3.7. Glifosat ve AMPA'nın Hücre Dizilerine Maruziyeti 44
3.8. DNA Metilasyonunun Analizi 45
3.8.1. DNA İzolasyonu 45
3.8.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini 46
3.8.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini 46
3.8.3.1. 5-mC'nin Eliza Kit ile Tayini 47
3.9. Gen EkspresyonlarınınTayini 49
3.9.1. Total RNA İzolasyonu 49
3.9.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini 50
3.9.3. cDNA Sentezi 51
3.9.4. Gen Ekspresyonunun Real-Time PCR ile Tayini 52

3.10. Histon Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Tayini 55
3.10.1. Histon Proteinlerinin İzolasyonu 55
3.10.2. Proteinlerin Miktar Tayini 56
3.10.3. Histon Modifikasyonlarının Western Blot Tekniği ile Tayini 57
3.11. Annexin V-FITC/PI Testi ile Apoptoz Tayini 60
3.12. İstatistiksel Değerlendirme 64
4. BULGULAR 65
4.1. Sitotoksisite Sonuçları 65
4.2. Glifosat ve AMPA Maruziyeti Sonrası HepG2 Hücre Dizisinden İzole Edilen DNA ve RNA'ların Miktarları ve Saflıkları 67
4.3. DNA Metilasyonu Sonuçları 69
4.3.1. Global DNA Metilasyonu Sonuçları 69
4.3.2. Global DNA Metilasyonunda Rol Oynayan Genlerin Ekpsreyonunda Değişiklikler 70
4.4. Protein Miktar Tayini Sonuçları 73
4.5. Western Blot Tekniği ile Global Histon Modifikasyonları Sonuçları 73
4.5.1. Kromatin Modifiye Eden Enzimleri Kodlayan Genlerin Ekspresyonunda Değişiklikler 75
4.6. Annexin V- FITC/PI Analizi ile Apoptoz Sonuçları 79
4.6.1. Apoptoz İle İlişkili Genlerin ifadesindeki değişiklikler 81
5. TARTIŞMA 84
KAYNAKLAR 93
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 122
ÖZGEÇMİŞ 123

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Glifosatın ve AMPA'nın fizikokimyasal özellikleri. (Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2014). 4

Tablo 2-2: Glifosatın gıdalarda belirlenen en yüksek kalıntı limitleri (Resmi Gazete No: 29899, 25 Kasım 2016) 14

Tablo 2-3: Glifosat, glifosat bazlı herbisitler (GBH) ve AMPA'nın epigenetik mekanizmalar üzerine etkisi 26

Tablo 3-1: Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile tayininde kullanılan primer dizileri. 53

Tablo 3-2: RT-PCR protokolü. 54

Tablo 4-1: MTT testi ile 24 saat 0,31-10 mM konsantrasyonlarda glifosat ve 0,31-10 mM konsantrasyonlarda AMPA maruziyeti gerçekleştirilen HepG2 hücre dizisinde % ölüm ve standart sapma değerleri. 66

Tablo 4-2: 0-250 µM konsantrasyonlarda 24 saat glifosata maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları. 67

Tablo 4-3: 0-500 µM konsantrasyonlarda 24 saat AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları. 68

Tablo 4-4: 24 saat 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinde relatif %5-mC ve standart sapma değerleri. 70

Tablo 4-5: Glifosatın HepG2 hücrelerinde 50-250 µM konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri. 79

Tablo 4-6: AMPA'nın HepG2 hücrelerinde 50-500 µM konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri. 80

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Glifosatın, metabolitleri AMPA ve glioksilatın kimyasal yapısı. (Swanson ve ark., 2016) 3
Şekil 2-2: Glifosatın bakterilerde biyotransformasyon basamakları (Rojano-Delgado ve ark., 2012). 6
Şekil 2-3: Glifosatın EPSPS (5-enol-piruvil-şikimat-3-fosfat-sentaz) enzimine etki ederek aminoasit sentezini inhibe ettiği şematik yol (Williams ve ark., 2000). 8
Şekil 2-4: Epigenetik modifikasyonlar (Laura, 2008). 15
Şekil 2-5: A. Nükleozom yapısı; B. Kromatin yapısı. 16
Şekil 2-6. A. Heterokromatin; B. Ökromatin. 16
Şekil 2-7: HAT enzimi aracılığıyla histon asetilasyonu ile HDAC enzimi aracılığıyla histon deasetilasyonu 19
Şekil 2-8: Histon asetilasyonu ile ilişkili açık ve kapalı gen ifadesi 20
Şekil 2-9: Lizin rezidülerinin mono-, di- ve trimetilasyonu 21
Şekil 2-10: Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik mitokondrial yolağı (Obeng, 2021). 29
Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikroplakaya hücre ekimi. 39
Şekil 3-2: Glifosat ve AMPA'nın 1/2 oranında seyreltilmesi. 40
Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikroplaka düzeni. 41
Şekil 3-4: 5-mC DNA ELISA kitinin esası. 47
Şekil 3-5: Histon proteinlerinin izolasyon basamakları 55
Şekil 3-6: FSC/SSC grafiğinde hücre kapılanmasının gösterimi 62
Şekil 3-7: Nokta alan grafiği (Mutlu ve Gültekin, 2016). 63
Şekil 3-8: Flowsitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi. 64
Şekil 4-1: 24 saat 0,31-10 mM konsantrasyonlarda glifosat ve AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinde MTT test sonuçları. 66
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. 66
Şekil 4-2: 5-mC standartlarına ait kalibrasyon eğrisi 69
Şekil 4-3: 24 saat 0-250 µM glifosat (a) ve 0-500 µM AMPA (b)'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinde % 5-mC seviyeleri. 70

Şekil 4-4: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde DNMT1 geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 71
Şekil 4-5: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *DNMT3A* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 71
Şekil 4-6: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *DNMT3B* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 72
Şekil 4-7: Protein standart ölçü eğrisi. 73
Şekil 4-8: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinde global histon modifikasyonları için western blot membran görüntüleri. 73
Şekil 4-9: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde H3K27me3 global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri. 74
Şekil 4-10: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde H3K9me3 global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri. 74
Şekil 4-11: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde H3K9ac global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri. 75
Şekil 4-12: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *G9A* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 76
Şekil 4-13: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *EZH2* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 76
Şekil 4-14: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *SETD1B* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 77

Şekil 4-15: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *HAT1* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 77
Şekil 4-16: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *SIRT1* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 78
Şekil 4-17: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *SUV39H1* geninde ait relatif ekspresyon seviyeleri. 78
Şekil 4-18: HepG2 hücre dizisine 50-250 µM konsantrasyon aralığında glifosat maruziyetinin erken apoptoz ve geç apoptoz etkisi 79
Şekil 4-19: HepG2 hücre dizisine 50-500 µM konsantrasyon aralığında AMPA maruziyetinin erken apoptoz ve geç apoptoz üzerine etkisi. 80
Şekil 4-20: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *p53* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 81
Şekil 4-21: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *BAX* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 82
Şekil 4-22: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *CASP-3* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 82
Şekil 4-23: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *CASP-9* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 83
Şekil 4-24: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *BCL-2* geninde relatif ekspresyon seviyeleri. 83

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
5-mC	5-metilsitozin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Actb	β-aktin geni
Annexin V	İnsan vasküler antikoagülan protein 5
ADI	Kabuledilebilr günlük alım miktarı
ADP	Adenozin difosfat
AMPA	Aminometil fosfonik asit
ATCC	Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu
Atm	Atmosfer (Basıç birimi)
BSA	Sığır serum albumini
CAD	Kaspaz aktive edici DNaz
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
CMF-PBS	Kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi
CO_2	Karbondioksit
dk	Dakika
DMBA	7,12-Dimetilbenz[a]antrasen
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri
DMEM/F12	Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri /F12
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonukleaz
ECHA	Avrupa Kimyasallar Ajansı
EDTA	Etilendiamşn tatra asetik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi

ELISA	Enzime bağlı immunosorbent deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EPA	Amerikan Çevre Koruma Ajansı
FBS	Fetal sığır serumu
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FSC	İleri dağılım (Forward scatter)
g	Gram
GC	Hücre büyüme kontrolü
GBH	Glifosat bazlı herbisit
HCl	Hidroklorür
HEK293	İnsan böbrek kanseri hücreleri
HepG2	Hepatoselüler Karsinom Hücresi
HRP	Horseradish peroksidaz enzimi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (‘International Agency for Research on Cancer’)
IAP	Apoptoz inhibitör faktörü
IC_{50}	%50 oranında hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon
ICAD	İnaktif kaspaz aktive edici Dnaz
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IU	Uluslararası Ünite
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
L	Litre
LD_{50}	Medyan letal doz
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
m-RNA	Mesajcı ribonukleik asit
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil etrazolyum bromür
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre

NOAEL	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen değer (‘No Observed Adverse Effect Level’)
O_2	Oksijen
PANC1	Pankreas kanseri hücre dizisi
PBMC	Periferik kan mononükleer hücresi
PBS	Fosfat tamponlu salin
PC	Pozitif kontrol grubu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
REACH	Kimyasal Maddelerin Onayı, Kısıtlanması ve Kaydı
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
RT-PCR	Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SC	Çözücü kontrol grubu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sn	Saniye
SSC	Yan dağılım (Side scatter)
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TBST	Tuzlu ve Tween 20’li tris tamponu
UV	Ultraviyole (Mor ötesi)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (‘World Health Organization’)

ÖZET

Mehtiyev, T. (2023). Glifosat ve Metaboliti AMPA'nın Çeşitli Hücre Kültüründe Oksidatif Hasar, Apoptoz ve Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Glifosat (N-fosfonometil glisin), yabani otların yok edilmesinde kullanılan bir herbisit olup, yüksek su çözünürlüğü nedeniyle toprak ve su ekosistemlerini kolayca kirletebilir. Bu nedenle çevre kirliliğine ve canlıların sağlığını tehdit etme riski taşımaktadır. Doktora tez çalışmasında glifosat ve metaboliti aminometilfosfonik asit (AMPA)'nın epigenetik modifikasyonlar ve apoptoz üzerine etkisi HepG2 hücrelerinde incelenerek toksik etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. 24 saat glifosat ve AMPA maruziyeti sonucu HepG2 hücrelerinde MTT testi ile IC_{50} değeri glifosat için 6,19 mM; AMPA için ise 8,13 mM olarak belirlendi. Global DNA metilasyonu seviyelerinde 24 saat 250 µM glifosat maruziyeti ile 1,62 kat; 100 µM ve 250 µM konsantrasyonlarda AMPA maruziyeti ile 1,43-1,6 kat anlamlı artış gözlenirken, DNA metiltransferaz (*DNMT1, DNMT3A, DNMT3B*) genlerinin ekspresyon seviyelerinde de anlamlı derecede değişikliklerin olduğu gösterildi. Ayrıca, 24 saat 50-250 µM konsantrasyonlarda glifosat ve 50-500 µM konsantrasyonlarda AMPA maruziyetinin western blot tekniği ile global histon modifikasyonları (H3K27me3, H3K9me3, H3K9ac) üzerinde anlamlı değişikliklere neden olduğu ve histon modifikasyonlarında rol oynayan genlerin (*G9a, EZH2, SUV39H1, SETD1B, HAT1, SIRT1)* ekspresyon seviyelerinde de anlamlı değişikliklere neden olduğu gözlendi. HepG2 hücrelerinde 24 saat 50-250 µM glifosat maruziyeti sonrası geç apoptozda %70-145; 50-500 µM 24 saat AMPA maruziyeti sonrası ise erken apoptozda %116, geç apoptozda %41-151 oranında kontrole kıyasla anlamlı farklılıklar gözlenmiş olup, apoptoz ile ilişkili genlerin (*p53, BAX, CASP-3, CASP-9*) ekspresyonlarında da değişikliklerin olduğu gösterildi. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, glifosatın ve metaboliti AMPA'nın toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glifosat; AMPA; epigenetik mekanizmalar; apoptoz; HepG2 hücreleri.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-37807.

ABSTRACT

Mehtiyev, T. (2023). Investigation of the Effects of Glyphosate and its Metabolite AMPA on Oxidative Damage, Apoptosis and Epigenetic Mechanisms in Various Cell Cultures. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctorate Thesis. Istanbul.

Glyphosate (N-phosphonomethyl glycine) is an herbicide utilized for the eradication of foreign weeds, and due to its high water solubility, it has the potential to readily contaminate soil and aquatic ecosystems. Hence, it poses a risk of environmental pollution and a threat to the health of living organisms. In doctorate thesis, the effects of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) on epigenetic modifications and apoptosis were examined in HepG2 cells and the toxic effect mechanisms were tried to be elucidated. According to the MTT test, the IC50 value for glyphosate was determined as 6.19 mM, while for AMPA, it was 8.13 mM. While a significant increase was observed in global DNA methylation levels by 1.62-fold with 250 μM glyphosate exposure for 24 hours and 1.43-1.6-fold with AMPA exposure at 100 μM and 250 μM concentrations, it was shown that DNA methyltransferase (*DNMT1, DNMT3A, DNMT3B*) genes significantly changed the expression levels. It was observed that 24 hour exposure to glyphosate at 50-250 μM concentrations and AMPA at 50-500 μM concentrations caused significant changes on global histone modifications (H3K27me3, H3K9me3, H3K9ac) by western blot technique. Additionally, it was demonstrated that exposure has significantly changed the expression levels of genes involved in histone modifications (*G9a, EZH2, SUV39H1, SETD1B, HAT1, SIRT1*). In HepG2 cells for 24 hours, after 50-250 μM glyphosate exposure, late apoptosis was 70-145%, and after 50-500 μM AMPA exposure, early apoptosis was 116%, late apoptosis was 41-151% significant differences were observed compared to control. It was also observed that there were changes in the expression of genes related to apoptosis (*p53, BAX, CASP-3, CASP-9*). The results from the thesis study are expected to contribute to a better understanding of the key molecular mechanisms involved in the toxicity of glyphosate and its metabolite AMPA.

Key Words: Glyphosate; AMPA; epigenetic mechanisms; apoptosis; HepG2 cells.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TDK-2021-37807.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glifosat (N-fosfonometil glisin), tarım ve ormanlık bölgelerdeki istenmeyen bitkilerin kontrolü amacıyla kullanılan organofosfat grubuna ait geniş spektrumlu bir herbisittir (Chan ve Mahler, 1992). Türkiye ve dünyanın çeşitli ülkelerinde tarım alanlarındaki yabani otların temizlenmesi amacıyla geniş çapta kullanılmaktadır (Dallegrave ve ark., 2007). Glifosat, büyük arazi alanlarında genellikle başka herbisitlerle dönüşümsüz bir şekilde, sürekli olarak kullanılır. Glifosatın sürekli kullanımı, yabani bitkilerde glifosata karşı direnç gelişmesine yol açarak, bu herbisidin etkinliğinde azalmaya neden olmuştur. (Kolpin ve ark., 2006). Tarımsal üretimi artırmak için, glifosat bazlı herbisitler diğer herbisitlerle birlikte yoğun bir şekilde kullanılmakta ve ancak bu kimyasalların kullanımı da çevre kirliliğine yol açmaktadır. Bu maddeler, uygulandıkları bitkilerde, toprakta ve su ortamında uzun süre kalabilir ve canlı organizmalarda birikimine neden olabilir (Ortiz ve ark., 2004). Glifosata maruziyet, insanlar için uygulanan toprakla doğrudan temas etmeleri veya kontamine olmuş su ve besinleri tüketmelerinin yanı sıra çeşitli tarım faaliyetlerine bağlı olarak da gerçekleşebilir.(Gerişlioğlu ve ark., 2010). Glifosat kullanımının artması, aynı zamanda olası toksisite ve insan sağlığına ilişkin endişelerin artmasına neden olmuştur. Yapılan araştırmalarda, glifosatın farklı hücre kültürlerinde oksidatif hasara neden olduğu, hücresel hasar, nörotoksisite, üreme ve gelişim toksisitesi açısından toksik etkileri olabileceği gözlenmiştir (Gholami-Seyedkolaei ve ark., 2013; IARC, 2015; Le Du-Carrée ve ark., 2021; Lushchak ve ark., 2009; Roy ve ark., 2016; Topal ve ark., 2015; Zheng ve ark., 2021). Glifosatın aynı zamanda kanser oluşturma potansiyeli ile ilişkili çalışmalar da bulunmaktadır (Chang ve Delzell, 2016; Schinasi ve Leon, 2014). Uluslararası Kanser Araştırmaları Enstitüsü (‘International Agency for Research on Cancer’, IARC) tarafından glifosat insanlar için muhtemel karsinojen (Grup 2A) grubunda sınıflandırılmıştır (IARC, 2015). 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü (‘World Health Organization’, WHO) tarafından da glifosat ile ilgili yapılan çalışma sonuçları ve farklı kanser türlerinde risk değerlendirme raporları yayınlanmıştır (WHO, 2016).

Glifosatın DNA ve kromozomal hasara neden olan genotoksik mekanizmalar üzerine toksik etkilerinin olduğu (Guyton ve ark., 2015; IARC, 2015) ancak non-genotoksik mekanizmaların da toksik etkisinde rol oynayabileceği bildirilmektedir

(Rossetti ve ark., 2021). Glifosat ve metaboliti AMPA'nın *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda çeşitli epigenetik mekanizmalar aracılığıyla tümör oluşumunu tetiklediğine dair çalışmalar mevcuttur (Duforestel ve ark., 2019; Gaudet ve ark., 2003; Hervouet ve ark., 2010; Pacaud ve ark., 2014).

Karaciğer, vücudun birçok önemli metabolik ve detoksifikasyon işlevini yerine getiren kritik bir organ olup, ksenobiyotik metabolizmasında başlıca hedef organlardan biridir. Glifosatın yaygın kullanımı sonucu özellikle karaciğer üzerine ciddi toksik etkiler (Milic ve ark., 2018; Qi ve ark., 2023) göstermesinden dolayı tez çalışmasında insan karaciğer kanser hücre dizisi (HepG2) kullanılmıştır. Tez çalışmasında glifosat ve metaboliti aminometil fosfonik asit (AMPA)'in toksik etkilerinde epigenetik mekanizmaların ve apoptozun rolünün karaciğer kanser hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, tez çalışmasında HepG2 hücre dizisinde glifosat ve metaboliti AMPA'nın, global DNA metilasyonu global histon modifikasyonları, epigenetik modifikasyonlarda rol oynayan genlerin ifadesinin tayini ve apoptoz mekanizmaları üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma bulguları, glifosat ve AMPA'nın karaciğer HepG2 hücrelerindeki etkilerini, epigenetik modifikasyonlar ve apoptoz açısından değerlendirerek, bu maddelerin toksik etki mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sunacaktır. Tez çalışması gelecekteki çalışmalar ve regülasyonların geliştirilmesi süreçleri için önemli bir temel oluşturacak olup, toksik maddelerin kullanımının sürdürülebilirliği ve insan sağlığı üzerine etkileri açısından daha iyi bir şekilde değerlendirilmesine katkıda bulunacaktır.

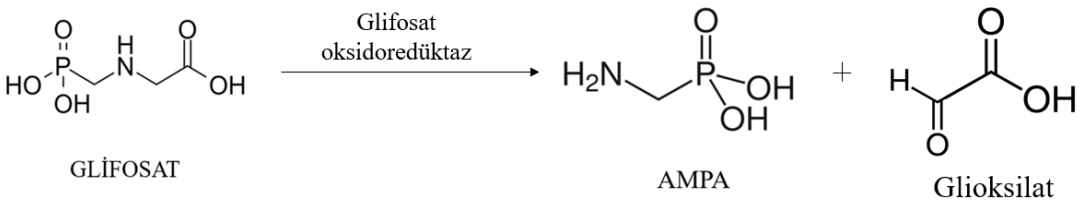
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glifosat

Glifosat, dünya çapında tarım alanlarında sık kullanılan geniş spektrumlu bir herbisittir. 2014 yılında, dünya genelinde yaklaşık 825.000 ton glifosat içeren formülasyonların 400 milyon hektarlık bir alana uygulandığı bildirilmiştir (Benbrook, 2016). Son yıllarda glifosatın yoğun biçimde kullanılmasıyla ortaya çıkan çevresel birikim, glifosatın ve onun metaboliti AMPA'nın bitki, hayvan ve insan sağlığı üzerinde potansiyel zararlı etkilere dair artan endişelere yol açmıştır. (Battaglin ve ark., 2014; Séralini ve ark., 2014).

2.1.1. Glifosatın Kimyasal Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Glifosat (N-[fosfonometil]-glisin), suda kolayca çözünen, polar özellik gösteren ve organik çözücülerde çözünmeyen asidik bir herbisittir. (Veiga ve ark., 2001). Glifosat hayvanlarda oksidoredüktaz enzimi tarafından temel metabolit olan AMPA'ya metabolize olur (Molin, 1998). Glifosatın metaboliti AMPA da yüksek polariteye sahiptir. Glifosat içeren ticari ürünler genellikle glifosat tuzlarıyla formüle edilir ve membran geçirgenliğini artırmak amacıyla yüzey aktif maddeler eklenerek pazarlanır. (Mitchell ve ark., 1987). Glifosat formülasyonları arasında en yaygın kullanılan glifosatın izopropilamin tuzudur (Tomlin, 2006). Glifosatın ve AMPA'nın açık formulü Şekil 2-1'de gösterilmektedir. Glifosatın ve AMPA'nın bazı önemli fizikokimyasal özellikleri Tablo 2-1'de gösterilmektedir.



Şekil 2-1: Glifosatın, metabolitleri AMPA ve glioksilatın kimyasal yapısı. (Swanson ve ark., 2016)

Tablo 2-1: Glifosatın ve AMPA'nın fizikokimyasal özellikleri. (Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2014).

Genel Adı:	**Glifosat**	**AMPA**
IUPAC adlandırması:	2-(fosfonometilamino) asetik asit	aminometilfosfonik asit
CAS numarası:	1071-83-6	1066-51-9
Görünüş:	Fiziksel hali: Karı; Renk: beyaz	Fiziksel hali: Katı; Renk: beyaz
Koku:	Uygun veri yoktur	Uygun veri yoktur
Kimyasal formülü:	C3H8NO5P	CH6NO3P
Moleküler ağırlığı:	169.073 g/mol	111.04 g/mol
pH (su içinde % 1 çözelti):	2,5	2,8

2.2. Glifosata Maruziyet

Genellikle glifosata maruziyet, glifosat kalıntılarını içeren gıdaların tüketilmesi, glifosat içeren herbisitlerin doğrudan kullanımı, orman, peyzaj ve tarım alanlarında, aynı zamanda glifosat içerikli ürünlerin üretildiği veya kullanıldığı iş yerlerinde inhalasyon ve deri teması yoluyla gerçekleşir (EPA, 2009). Glifosat uygulanan bölgelere yakın evlerin toz örneklerinde glifosat kalıntıları tespit edilmiştir (Curwin ve ark., 2005). Ekvador'un kuzeyinde glifosat uygulanan bir bölgede yaşayan nüfusun glifosat maruziyeti değerlendirilmiş ve 24 kişinin kan örneklerinde DNA hasarı tespit edilmiştir (Paz-y-Miño ve ark., 2007).

Tarım sektöründe herbisit kullanımı oldukça yaygındır, bu nedenle tarım işçileri glifosata daha fazla maruz kalırlar. Özellikle ilaçlama mevsiminde tarım işçilerinin idrar örneklerinde glifosat konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir (Abdelghani, 1995). Yapılan bazı çalışmalarda, çocukların vücut sıvılarında yetişkinlere kıyasla daha yüksek düzeyde glifosat seviyeleri tespit edilmiştir (Curwin ve ark., 2007; Jauhiainen ve ark., 1991; McGuire ve ark., 2016). Bu farkın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, kontamine gıda ve suyun daha yüksek oranda tüketilmesi, metabolizma ve eliminasyon farklılıklarının olabileceği düşünülmüştür (Landrigan ve Goldman, 2011).Dermal maruziyet sonrası yapılan bir çalışma, yaklaşık %0,8-2,2 oranında perkutan emilim olduğunu göstermiştir. Bu nedenle hijyen kurallarına uyulduğunda, glifosatın ciltten uzaklaştırılarak deri yoluyla emiliminin engellenebileceği belirtilmektedir (Wester ve ark., 1991).

Glifosat uygulanan marul, havuç ve arpa tarlalarında uygulamadan 4-5 ay sonra sonra bile glifosat kalıntıları saptanmıştır (Šiviková ve Dianovský, 2006).

2.3. Glifosatın Toksikokinetik Özellikleri

Absorbsiyon: Hayvan çalışmaları, glifosatın oral maruziyet sonrası %30-36 arasında absorbsiyonunun olduğunu göstermektedir (Brewster ve ark., 1991; Williams ve ark., 2000). Glifosatın dermal emilimi düşüktür (EPA, 1993). İnsan deri hücresinde gerçekleştirilen *in vitro* bir deneyde uygulanan glifosatın maksimum %2.2'sinin emildiği gösterilmiştir ve absorbsiyon uygulamadan 8 saat sonra en yüksek düzeye ulaşmıştır (Wester ve ark., 1991).

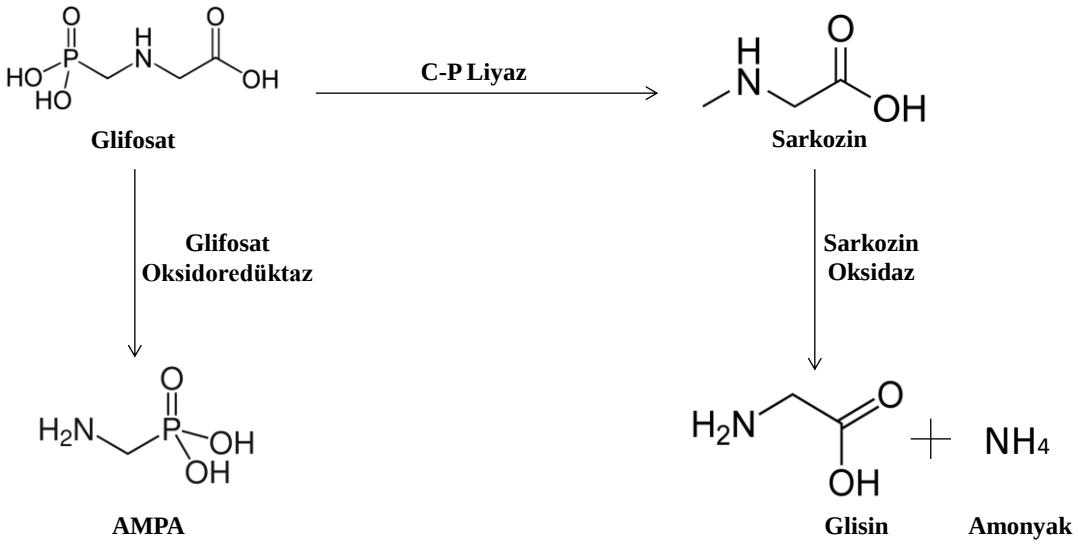
Glifosatın solunum yoluyla absorbsiyonu ile ilgili yapılan bir araştırmada, 48 çiftçi üzerinde yapılan bir araştırma sonucunda tarım alanına glifosat içeren herbisit uygulamasının ardından çiftçilerin idrar örneklerinde glifosat düzeylerinin gözlendiği ve solunum yoluyla glifosatın emilebileceği gösterilmiştir. Uygulama esnasında eldiven kullanmayan çiftçilerin (14/48) ortalama idrar glifosat konsantrasyonunun eldiven kullananlara kıyasla daha yüksek olması ise dermal absorpsiyonun da söz konusu olduğunu göstermiştir (Acquavella ve ark., 2004).

Oral, intravenöz ve intraperitoneal yoldan erkek sıçanlarda 5.6-56 mg/kg dozda glifosat (%99) uygulandığı bir çalışmada glifosatın %30'unun emildiği ve sadece oral yoldan uygulanan 56 mg/kg dozun daha yüksek oranda (%34) emildiği gösterilmiştir (Chan ve Mahler, 1992).

Dağılım: Oral yoldan emilen glifosat, herhangi bir dokuda önemli birikime uğramadan kolaylıkla dağılır ve hızla elimine olur. 5,6 ve 56 mg/kg glifosat dozu uygulanan erkek F344/N sıçanlarda, uygulamadan 1 ve 2 saat sonra maksimum kan konsantrasyonuna ulaştığı ve ortalama maksimum kan konsantrasyonunun doza bağlı olarak doğru orantılı değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. 5,6 mg/kg glifosat uygulamasından 3, 6, 12, 24 ve 96 saat sonra uygulanan dozun sırasıyla yaklaşık %12, %11,7, %5,5, %0,9 ve %0,1'i kanda tespit edilmiştir. Uygulama sonrası en yüksek glifosat konsantrasyonu ince bağırsakta izlenmiştir (uygulamadan 6 saat sonra uygulanan dozun %10'u). Uygulamadan 24 saat sonra ise uygulanan dozun %1'inden daha az miktarda diğer dokularda tespit edilmiştir (Chan ve Mahler, 1992). Anadón ve ark. (2008) yaptığı araştırmada sıçanlara 400 mg/kg dozda glifosatın oral

uygulanmasıyla 2,29 saatlik bir absorpsiyon yarılanma ömrü bildirmiştir. 4,62 µg/mL'lik maksimum kan konsantrasyonuna uygulamadan 5,16 saat sonra ulaşılmıştır.

Metabolizma: Glifosat, genellikle çevrede mikroorganizmalar tarafından başlıca AMPA ve karbondioksite dönüştürülür. (Jacob ve ark., 1988; Müller ve ark., 1981; Rueppel ve ark., 1977; Sprankle ve ark., 1975). Araştırmalar, glifosatın bakterilerde (*pseudomonas sp.* suşunda) glisin olarak da metabolize olabileceğini göstermektedir (Jacob ve ark., 1988) (Şekil 2-2). Kasıtlı olarak glifosat bazlı herbisitin yutulduğu bir intihar vakasında, glifosat ve metaboliti olan AMPA'nın serum ve idrarda tespit edildiği bildirilmiştir. Alımdan 16 saat sonra, glifosat ve AMPA serum seviyeleri 4.4 ve 0.03 µg/mL olarak ölçülmüştür (Hori ve ark., 2003). İnsan karaciğer hücre dizisinde, dört farklı glifosat bazlı formülasyon ile maruziyet sonucu CYP3A4 ve CYP1A2 seviyelerinin arttığı, glutatyon transferaz seviyelerinin ise azaldığı gösterildi (Gasnier ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada erkek Wistar sıçanlarına oral yoldan 400 mg/kg glifosat uygulamıştır. Uygulamadan 5.16 saat sonra maksimum plazma glifosat konsantrasyonu 4.62 µg/mL olarak ölçülmüştür. Maksimum plazma AMPA konsantrasyonu ise uygulamadan 2.42 saat sonra 0.416 µg/mL olarak ölçülmüştür. AMPA intravenöz enjeksiyon yoluyla glifosat uygulanan sıçanlarda tespit edilmemiştir. Dolayısıyla, AMPA oluşumunun gastrointestinal sistemde (mikroflora tarafından) meydana geldiği düşünülmektedir (Anadón ve ark., 2008).



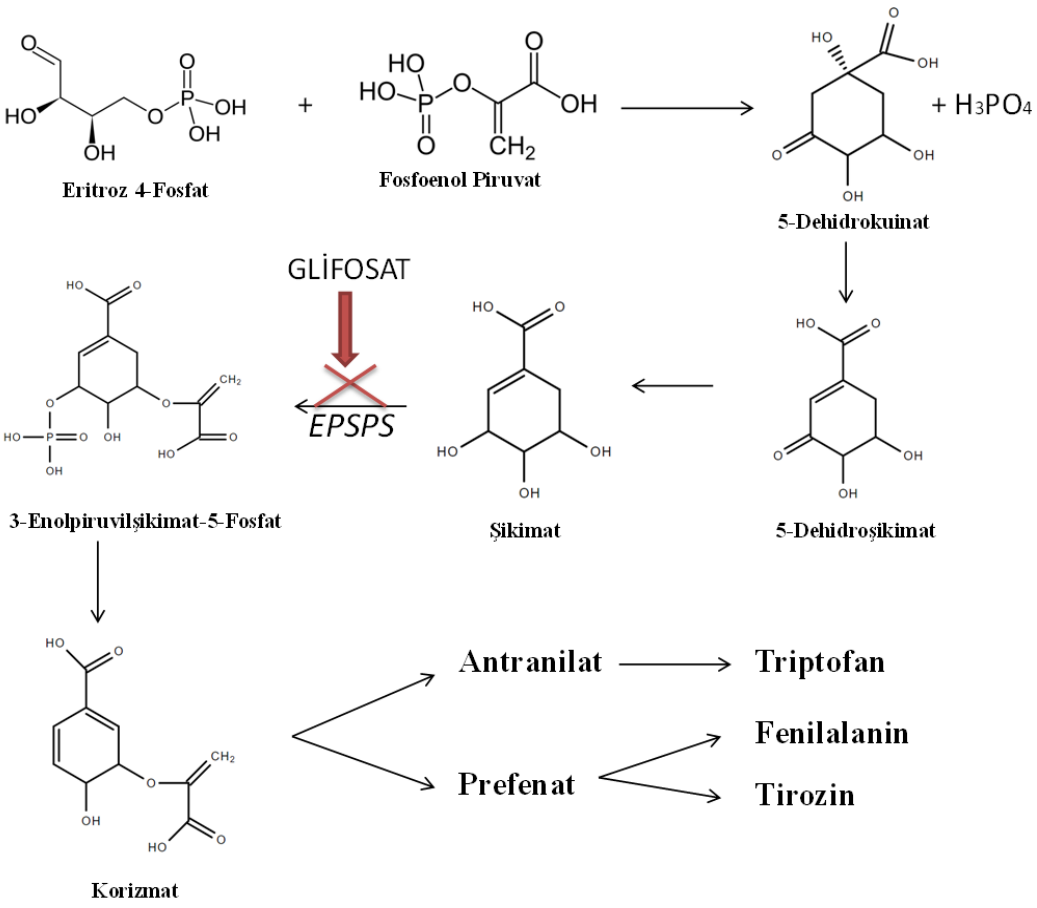
Şekil 2-2: Glifosatın bakterilerde biyotransformasyon basamakları (Rojano-Delgado ve ark., 2012).

Atılım: Hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre glifosata oral maruziyet sonrası başlıca eliminasyon yolları olarak dışkı ve idrar olduğu gözlenmiştir. 10 mg/kg glifosat uygulanan Sprague-Dawley sıçanların dışkısında uygulanan dozun ortalama %65'i tespit edilmiştir. Uygulanan glifosatın %99'unun dışkı ve idrarla atıldığı HPLC analizi uygulanarak tespit edilmiştir (IPCS, 1994).

Glifosatın inhalasyon yoluyla maruziyetinin insanlarda atılımı ile ilgili sınırlı bilgi mevcuttur. Yapılan çalışmada, 48 çiftçinin glifosat içeren herbisit uygulanmasından önce, uygulamanın hemen ardından ve uygulamadan sonraki 3 gün boyunca idrar glifosat düzeyleri değerlendirilmiştir. Çiftçilerin %15'inde (7/47) uygulamadan önce, %60'ında (29/48) uygulamadan hemen sonra ve %27'sinde (13/48) uygulamadan 3 gün sonra idrarlarında glifosat saptandığı rapor edilmiştir (Acquavella ve ark., 2004). Kasıtlı olarak glifosat içeren herbisit yutmuş olan bir hastada kandan glifosatın eliminasyonu değerlendirildiğide yarılanma ömrünün 3-4 saat olduğu gözlenmiştir (Roberts ve ark., 2010).

2.4. Glifosatın Bitkiler Üzerindeki Etki Mekanizması

Glifosatın başlıca etki mekanizması bitkilerde metabolik bir yolak olan şikimat yolağında yer alan 5-enol-piruvil-şikimat-3-fosfat-sentazın inhibisyonudur (Şekil 2-3). Glifosat bitki büyümesi için gerekli aromatik amino asitler fenilalanin, tirozin ve triptofanın üretimine müdahale eder. Şikimat yolu yalnızca bitkilerde ve mikroorganizmalarda mevcut olduğundan, glifosat uzun zamandır insanlar için güvenli kabul edilmekte idi (de María ve ark., 2006). Yabani otlarda gelişen direnç nedeniyle daha yüksek dozlara ihtiyaç duyulması, glifosatın son on yılda kullanımında ciddi derecede artışa sebep olmuştur. Bu sürekli kullanım sonucunda (Duke ve Powles, 2009) toprakta, yer altı sularında ve nehirlerde yüksek miktarda herbisit konsantrasyonu ciddi sorunları da beraberinde getirmiştir (IFEN, 2006).



Şekil 2-3: Glifosatın EPSPS (5-enol-piruvil-şikimat-3-fosfat-sentaz) enzimine etki ederek aminoasit sentezini inhibe ettiği şematik yol (Williams ve ark., 2000).

2.5. Glifosatin Toksik Etki Mekanizmaları

Glifosatın toksik etkileri, 1980'lerden bu yana bilinmektedir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada, 15 mg/kg glifosatın, karaciğer hücrelerinde mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu olumsuz etkilediğini göstermiştir. (Olorunsogo ve ark., 1979). Glifosat maruziyeti sonrasında elektron mikroskobu ile hepatositlerde yapılan incelemelerde hücresel solunumun ve mitokondrial DNA transkripsiyonunun olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür (Malatesta ve ark., 2008).

Günümüzde yaygın pestisit kullanımının, oksidatif stres oluşumuyla canlı hücrelerde toksik etki oluşturması önemli bir sorun haline gelmiştir (Mansour ve Mossa, 2010). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi ve antioksidan sistemlerin yetersiz kalması nedeniyle hücrelerde oluşan oksidatif hasar, hücresel proteinlere, lipidlere ve DNA'ya zarar verebilir ve apoptotik yolları aktive edebilir (Mattson, 2006). Yapılan bir araştırmada glifosat 5 mM ve AMPA 10 mM konsantrasyonda maruziyeti sonrası insan

nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde maruziyet süresiyle doğru orantılı olarak malondialdehit (MDA) ve ROS seviyelerinde anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir (Martinez ve ark., 2020). Glifosatın ve AMPA'nın ROS oluşumnu tetikleyerek karaciğer hasarı ve çeşitli hematolojik bozukluklara da neden olabileceği bildirilmiştir (Jasper ve ark., 2013).

Glifosatın genellikle hayvanlarda düşük toksisiteye sahip olduğu düşünülmektedir (Gill ve ark., 2018). Ancak yapılan araştırmalarda, glifosatın oksidatif stres, hücresel hasar, kanser, nörotoksisite, üreme ve gelişim toksisitesi açısından toksik etkileri olabileceği gözlenmiştir (Gholami-Seyedkolaei ve ark., 2013; IARC, 2015; Le Du-Carrée ve ark., 2021; Lushchak ve ark., 2009; Roy ve ark., 2016; Topal ve ark., 2015; Zheng ve ark., 2021).

Bazı *in vitro* çalışmalarda çeşitli hücre kültürlerine glifosatın maruziyeti sonucu hücrelerde DNA hasarı gözlenmiştir (Alvarez-Moya ve ark., 2014; Lueken ve ark., 2004; Mañas ve ark., 2009; Mladinic ve ark., 2009; Monroy ve ark., 2005). 2015 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), glifosatın memeli kromozomlarında ve DNA'sında hasara ve oksidatif stres indüksiyonuna neden olduğu çalışmalara dayanarak glifosatı genotoksisite ve oksidatif hasara bağlı grup 2A karsinojen bir ajan olarak sınıflandırmıştır (Guyton ve ark., 2015; IARC, 2015).

2017 yılında yapılan bir *in vitro* çalışmada, comet testi ve global DNA metilasyon testi sonucunda glifosatın periferik kan mononükleer hücre dizisinde (PBMC) 0,1-10 mM konsantrasyon aralığında 24 saat maruziyetinin DNA hasarı ve aynı zamanda DNA metilasyon seviyelerinde değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir (Kwiatkowska ve ark., 2017). Glifosatın genotoksik olduğu gösterilmesine rağmen epigenetik mekanizmaların da toskisitesi ile ilişkisinin olabileceği gösterilmistir. (Rossetti ve ark., 2021).

2.6. Glifosatın Toksik etkileri

Yıllar içinde glifosat tüketiminin artması, bu herbisitin olası toksik etkileri ve insan sağlığı üzerindeki olası olumsuz sonuçları konusunda artan endişeleri de beraberinde getirmiştir. Bu nedenle, son yıllarda glifosatın insan sağlığı üzerindeki etkileri üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Herbistit endüstrisinin en çok satan ürünlerinden biri olmasına rağmen glifosatın güvenilirliği ve sağlık üzerindeki etkileri konusunda tartışmalar devam etmektedir (Soares ve ark., 2021).

Glifosatın toksisitesiyle ilgili artan endişeler nedeniyle, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) 2015 yılında glifosat kullanımıyla ilişkili risk değerlendirmesini laboratuvar çalışmalarına dayanarak tanımlanmıştır (EFSA, 2015).Aşağıda belirlenen toksikolojik limitleri verilmiştir:

- Gözlenebilen Hiçbir Yan Etki Göstermeyen Doz (NOAEL): 100 mg/kg/gün
- Kabul Edilebilir Günlük Maksimum Doz (ADI): 0,5 mg/kg/gün
- Kabul Edilebilir Uygulayıcı Maruziyet Seviyesi (AOEL): 0.1 mg/kg/gün

2.6.1. Akut Toksisite

EFSA, 2015 yılında glifosatın hem oral hem de dermal olarak maruziyette LD_{50} değerini 2000 mg/kg'ın üzerinde belirlemiştir (EFSA, 2015). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2016 yılında, oral yol için 5600 mg/kg'ın üzerinde ve dermal yol için 2000 mg/kg'ın üzerinde LD_{50} değeri belirlemiştir (WHO, 2016). Glifosat tarım alanlarına püskürtme yöntemi ile uygulandığı için (Van Bruggen ve ark., 2018), deney hayvanlarının %50'sinin ölümüne neden olan letal konsantrasyon (LC_{50}) EFSA tarafından belirlenmiş olup, inhalasyon yoluyla 4 saatlik bir maruziyet süresi için LC_{50} değerini 5 mg/L'den büyük olarak tanımlamıştır (EFSA, 2015) .

Glifosat bazlı herbisit uygulayan işçiler üzerinde yapılan gözlemsel çalışmalar, glifosatın ciddi göz irritasyonuna ve orta düzeyde deri irritasyonuna neden olduğunu göstermektedir. (EFSA, 2015; WHO, 2016). Avrupa Kimyasallar Ajansı (ECHA),glifosatı ciddi göz hasarına neden olan irritan olarak sınıflandırmaktadır (ECHA, 2021).

Glifosat bazlı herbisitlerin kazara veya kasıtlı olarak tüketilmesi sonucunda akut toksisite vakalarında kilo kaybı, gastrointestinal, pulmoner, böbrek ve karaciğer bozukluklarının geliştiği gözlenmiştir (WHO, 2016).

Zebra balığı ile yapılan çalışmada 8.5 mg/L konsantrasyonda glifosat maruziyetinde kardirotoksisite (72 saatlik maruziyet), artmış mortalite ve malformasyon gelişimi gözlenmiştir (Gaur ve Bhargava, 2019; Lanzarin ve ark., 2019). Diğer bir çalışmada, Zebra balıklarında 72 saat 1-700 ng/mL konsantrasyonlarda glifosat ve AMPA maruziyeti sonrası en düşük konsantrasyonlarda bile kardirotoksisite gözlendiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2021).

2.6.2. Kronik Toksisite

Son yıllarda, glifosatın hedef organlardaki toksisitesini değerlendirmek için birçok çalışma yapılmıştır. Glifosat maruziyetinin çölyak hastalığı riski ve çeşitli gastrointestinal problemler ile ilişkili olabileceği ortaya konmuştur (Rueda-Ruzafa ve ark., 2019). Uzun dönem glifosat maruziyeti sonrasında insanlarda elektrokardiyogramda anormallikler, özellikle QT segmentinin uzaması ve ritim bozuklukları gibi kardiyotoksik etkiler görülmüştür (Brunetti ve ark., 2020; Gress ve ark., 2015).

Birçok çalışma glifosatın oksidatif stresi tetikleyebildiğini ve artmış oksijen serbest radikallerin özellikle karaciğere zarar verebileceğini göstermiştir (IARC, 2015; Mesnage ve ark., 2015b). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada düşük konsantrasyonda (4 ng/kg) glifosatın 2 yıl süre ile kronik maruziyetinin hepatotoksik etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Mesnage ve ark., 2017). Yine farelerde yapılan bir çalışmada glifosatın insan renal proksimal tübül (HK-2) hücre dizisine 0, 20, 40 ve 60 μm konsantrasyonlarda kronik maruziyeti sonucunda nefrotoksik olduğu ve tübüler hücre kaybına apoptoz yoluyla neden olduğu gösterilmiştir (Gao ve ark., 2019). Ayrıca, son yıllarda, glifosatın çok yoğun kullanıldığı Sri Lanka bölgelerinde bilinmeyen etiyolojiye sahip kronik böbrek hastalığı vakaları ortaya çıkmıştır. Glifosatın bu hastalığa neden olduğu şüphesi olmakla birlikte, henüz bu ilişkiyi gösteren bir çalışma bulunmamaktadır (Gunarathna ve ark., 2018).

2.6.3. Karsinojenik Etki

Son yıllarda birçok uluslararası kuruluş tarafından glifosatın karsinojenik etkisi ile ilgili değerlendirmeler yapılmıştır. IARC, 2015 yılında glifosatı 2A grubuna, yani

insanlarda olası karsinojen olarak sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırmaya göre glifosatın hayvanlarda kanser oluşturmasına dair yeterli kanıt olmasına rağmen insanlarda yeterli kanıt olmadığı kabul edilmektedir. Ancak, glifosat maruziyeti ile non-hodgkin lenfoma arasında pozitif bir ilişki olduğunu gösteren önemli çalışmalar bulunmaktadır (Guyton ve ark., 2015; IARC, 2015). Ayrıca, glifosatın, potansiyel olarak metabolik bozukluklar ve endokrin bozucu etkilere sahip olabilileceği ve tümör oluşumunu teşvik edici bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Ramos ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2019).

George ve ark. (2010) 25 mg/kg 130 gün boyunca glifosat uygulanan fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada, glifosatın cilt kanseri oluşturma potansiyeli olduğu gözlenmiştir.

2.6.4. Nörotoksik Etkiler

Glifosatın sinir sistemi üzerinde potansiyel etkileri, nörotransmitter sistemlerinde bozukluklar, oksidatif stres, nöronlarda inflamasyon ve nöron ölümü gibi sonuçlara yol açabileceği düşünülmektedir. Bu toksik etkiler aynı zamanda davranışsal ve motor bozuklukları şeklinde de ortaya çıkabilir (Gui ve ark., 2012).Yapılan araştırmalar, glifosatın normal sinir hücresi gelişimini etkileyerek farklılaşma, büyüme ve miyelinizasyon süreçlerinde bozukluklara neden olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, glifosatın sinir sistemi üzerinde toksik etkiler gösterdiği başka bir mekanizma da glutamat salınımını arttırarak ve geri alımını azaltarak olabileceği belirtilmiştir (Ait Bali ve ark., 2017; Baier ve ark., 2017).

İnsan eritrositlerinde yapılan *in vitro* çalışmada glifosatın ve AMPA'nın 0,01-5 mM konsantrasyonlarda maruziyetinin asetilkolinesterazın aktivitesini azalttığı ve buna bağlı olarak nörolojik bozuklukların ortaya çıkmasına neden olabileceği gösterilmiştir (Kwiatkowska ve ark., 2014).

2.6.5. Teratojenik Etki

Yapılan birçok araştırmada farklı organizma türlerinin glifosata ve glifosat bazlı herbisitlere maruz kalmasının teratojenik açıdan sonuçları araştırılmıştır. Bu çalışmalarda glifosat maruziyeti sonrası su piresi olarak da bilinen *cladocera'*larda üremenin gecikmesi (Lares ve ark., 2022; Reno ve ark., 2014) *Daphnia,* deniz kerevitleri (Avigliano ve ark., 2014), amfibiler (Avigliano ve ark., 2014; Flach ve ark., 2022; Paganelli ve ark., 2010) ve balıklarda (Lanzarin ve ark., 2019; Panetto ve ark., 2019; Sulukan ve ark., 2017; Zebral ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2017) da anormal

embriyonik gelişimler rapor etmiştir. Babalola ve ark. (2019) tarafından *Xenopus laevis* cinsi kurbağası üzerinde glifosatın farklı 3 ticari ürününün teratojenik açıdan test edilmesi sonucu önemli teratojenik bulgular tespit edilmiştir.

Richard ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada glifosatın insan plasenta hücrelerinde toksik etkisinin olduğunu ve östrojen sentezinden sorumlu olan aromataz aktivitesini bozabileceğini göstermiştir. Çalışma ayrıca, glifosat içeren bir ticari ürün olan Roundup'ın, glifosattan daha toksik olduğunu vurgulamıştır.

Güney Amerikada yapılan epidemiyolojik çalışmada, glifosatın yüksek oranda kullanımı olan bölgelerde fetüslerde artan sayıda malformasyon rapor edilmiş ve bu herbisidin teratojenik potansiyeli vurgulanmıştır (Antoniou ve ark., 2012).

2.7. Glifosat ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Glifosat ile ilgili yasal düzenlemeler ülkeden ülkeye farklılık gösterebilir. Ancak, genel olarak glifosatın kullanımı ve satışı bir dizi düzenleme ile kontrol altına alınmaktadır. Avrupa Birliği'nde glifosatın kullanımı ve onayı, 1107/2009 sayılı Kimyasal Maddelerin Onayı, Kısıtlanması ve Kaydı (REACH) Yönetmeliği kapsamında düzenlenmiştir. EFSA ve diğer bilimsel kurumlar tarafından yapılan risk değerlendirmeleri sonucunda, glifosatın onayı yenilenmiş veya kısıtlamalar getirilmiştir. 27 Eylül 2018'de glifosatın ve metabolititi olan AMPA'nın risk değerlendirmelerinin yeniden gözden geçirildiği ve kalıntı limitlerinin belirlendiği bir çalışma yayınlanmıştır (EFSA, 2018).

Amerika Birleşik Devletleri'nde de glifosat ile ilgili düzenlemeler Amerikan Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından düzenlenir. EPA, glifosatın kullanımına ilişkin kuralları belirllemekte ve risk değerlendirmesini yapmaktadır. Bu doğrultuda da gıdalarda, yem ürünlerinde, içme sularında glifosat kalıntı limitlerini belirllemekte ve yayınlamaktadır. EPA, aynı zamanda IARC'ın glifosatın muhtemelen insanlar için karsinojen sınıflandırmasını geçerli kabul etmemekte ve daha çok çalışmanın gerekli olduğunu vurgulamaktadır (EPA, 2017).

Türkiye'de 11/6/2010 tarihli ve 5996 sayılı "Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu"nun 21, 22, 23, 24, 31, 32 ve 34. maddelerine dayanılarak hazırlanan "Türk Gıda Kodeksi" "Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği" (Resmi Gazete No: 29899, 25 Kasım 2016) Avrupa Birliği'nin ilgili

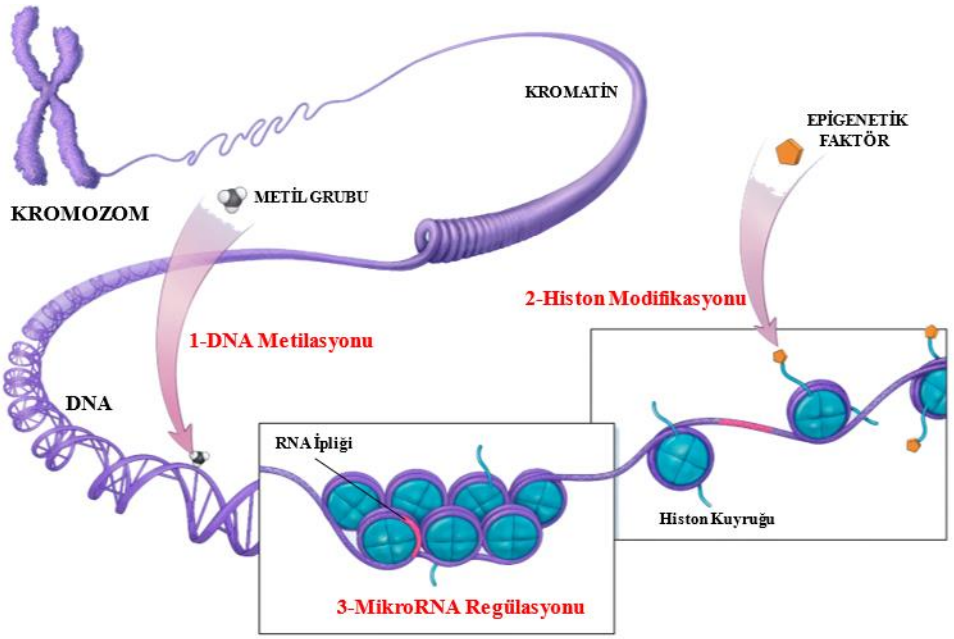
mevzuatı dikkate alınarak hazırlanmıştır. Bu yönetmeliğe göre, glifosatın gıdalarda belirlenen en yüksek kalıntı limitleri Tablo 2-2'te verilmektedir.

Tablo 2-2: Glifosatın gıdalarda belirlenen en yüksek kalıntı limitleri (Resmi Gazete No: 29899, 25 Kasım 2016)

Gıda Çeşitleri	Miktar (ppm)
Turunçgiller:	
— greyfurt, limon, misket limonu	0,1
— portakal, mandarin/ mandalina	0,5
Sert kabuklu meyveler:	
— badem, fıstık, kaju	0,1
Yumuşak çekirdekli meyveler:	
— elma, armut, ayva	0,1
Sert çekirdekli meyveler:	
— kayısı, kiraz, erik	0,1
Üzümsüler ve küçük meyveler:	
— üzüm	0,5
— çilek	0,1
— kamışsı meyveler (böğürtlen, ahududu,karabüken, yaban mersini)	0,1
Çeşitli meyveler:	
— kabuğu yenebilenler (hurma, incir, kumkuat)	0,1
— zeytin	1
Köklü ve yumrulu sebzeler:	
— patates	0,5
— pancar, havuç, kereviz	0,1
Soğanlı sebzeler:	
— soğan, sarımsak, arpacık soğanı	0,1
Patlıcangiller:	
— domates, biber, patlıcan, bamya	0,1
Kabakgiller:	0,1
Tatlı mısır:	3
Baklagil sebzeleri (taze):	
— fasulye (kabuklu), fasulye (kabuksuz), bezelye (kabuklu)	0,1
Mantarlar, Yapraklı kara yosunları ve likenler:	
— kültür mantarı	0,1
— yabani mantar	50
— yapraklı kara yosunları ve likenler	0,1
Baklagiller:	
— fasulye	2
— mercimek, bezelye acı bakla	10
— diğerleri	0,1
Yağlı tohumlar:	
— keten tohumu	10
— yerfıstığı	0,1
— haşhaş tohumu	0,1
— susam tohumu	0,1
— ayçiçeği tohumu	20
— kolza tohumu	10
— soya fasulyesi	20
— hardal tohumu	10
— pamuk tohumu	10
— kabak çekirdeği	0,1
Hayvansal ürünler:	
— et	0,05
— yağ	0,05
— karaciğer	0,2
— böbrek	2
— Süt	0,05

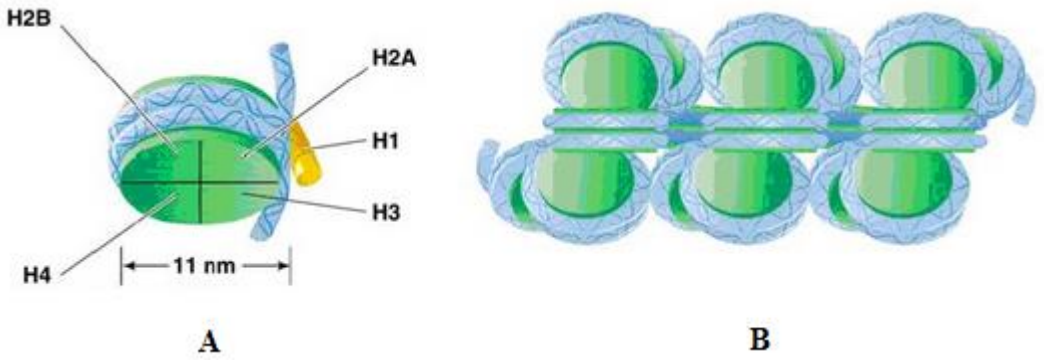
2.8. Epigenetik

DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtımsal olarak aktarılan gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim dalı 'Epigenetik' olarak adlandırılmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA'ların (miRNA) regülasyonu olmak üzere başlıca üç temel mekanizma ile açıklanmaktadır (Şekil 2-4) (Laura, 2008).



Şekil 2-4: Epigenetik modifikasyonlar (Laura, 2008).

Ökaryotik hücrelerde, DNA histon proteinlerine bağlanarak kromatin adı verilen bir yapı oluşturur. Kromatin, hücre çekirdeğinde DNA, histon ve histon olmayan proteinlerin karmaşık bir yapısal düzenlemesidir (Tsankova ve ark., 2007). Nükleozom olarak adlandırılan temel yapı birimi, H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden oluşan bir histon oktomerinin etrafına sarılı 146 baz çifti DNA'dan oluşur (Conley ve ark., 2006). Bu protein yapıları, birbirlerini H1 histonlarıyla birleştirerek stabil bir şekilde tutarlar (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: A. Nükleozom yapısı; B. Kromatin yapısı.

Gen ifadesi hücrelerde nükleozomlar kullanılarak kontrol edilir. Kromatin yapısındaki değişiklikler, transkripsiyonu düzenleyici komplekslerin DNA'ya ulaşabilirliğini etkileme yolu ile gen ifadesini kontrol eder. Kromatinin sıkılaşıp yoğunlaşmış hali inaktif iken (heterokromatin), gevşek hali (ökromatin) aktiftir (Şekil 2-6).



Şekil 2-6. A. Heterokromatin; B. Ökromatin.

Epigenetik mekanizmalar, DNA ve histonlar arasındaki ilişkiyi düzenleyerek genlerin transkripsiyonel olarak aktif veya inaktif olmalarını sağlarlar. Bu mekanizmaların herhangi birinde meydana gelen modifikasyonlar, gen ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik hasarlara yol açabilir. Bu değişiklikler, DNA'nın dizi yapısından ziyade mitoz veya mayoz bölünme yoluyla nesilden nesile aktarılır. Kromatin yapısında gerçekleşen başlıca epigenetik modifikasyonlar arasında DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları yer alır.

2.8.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, CpG dinükleotidinde bulunan sitozin bazının 5. karbonuna bir metil grubunun eklenmesiyle gerçekleşir ve 5-metilsitozin (5-mC) oluşumuna yol açar (Herman ve Baylin, 2003). Bu süreç, DNMT (DNA metiltransferaz) enzimleri tarafından kontrol edilir. *DNMT3A* ve *DNMT3B, de novo* metilasyon için gereklidir, *DNMT1* hücre bölünmesi sırasında metilasyon kalıplarının korunmasını sağlar. Genomun genelindeki CpG dinükleotidlerinin yaklaşık %70'i metillenmiştir. CpG adaları ise özellikle dokularda sürekli ifade edilen bazı genlerin promoter bölgelerinde ve ilk ekzonlarında bulunur ve genellikle metillenmemiştir (Jones ve Takai, 2001). DNA metilasyonu, genlerin promotör bölgelerindeki CpG adalarında, kromatin yapısının organizasyonunda ve gen ifadesinin kontrolünde önemli bir rol oynar. Aktif kromatin yapısı, metillenmemiş CpG dinükleotidlerini içeren promotör bölgelerinde transkripsiyon faktörlerinin ve diğer koaktivatörlerin bağlanabildiği bir yapıya sahiptir. Bununla birlikte, inaktif kromatin yapısı, promotör bölgelerinde metillenmiş CpG dinükleotidlerini içerir ve transkripsiyon faktörlerinin promotöre bağlanmasını engeller (Esteller, 2007). Genin metillenme derecesi ile ifade edilme derecesi arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. Farklı dokularda farklı genlerin ifade edilmesi, hücre farklılaşmasıyla birlikte bu düzenlemeye dayanır. Ancak, genom çapında normal şartlarda metile halde bulunan CpG dinükleotidlerinin global hipometilasyonu da söz konusu olup bu da genomik karasızlığa ya da susturulmuş parazitik dizilerin ifade bulmasına neden olarak karsinojeneze zemin hazırlar (Esteller, 2007).

Genom boyunca çoğunlukla tekrarlayan genomik bölgelerde bulunan CpG dinükleotidlerinin %70-80'i metile haldedir. Kanserin erken aşamasında sitozin metilasyonunda global bir azalma gösterilmiştir. Hipometilasyon kromozomal instabiliteye, retrotranspozon[1] aktivasyonu ve bazı protoonkogenlerin ekspresyonunda artışa sebep olmaktadır (Das ve Singal, 2004). DNA metilasyonu DNA'nın sıkı bir şekilde paketlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sıkı paketlenmeden dolayı örneğin, transpozonların genom içerisinde hareket etmeleri engellenmiş olmaktadır. Ancak, metilasyon kaybı ile DNA sıkı bir şekilde paketlenemeyeceğinden transpozonlar genomda rahatlıkla hareket ederek kromozomal instabiliteye neden olmaktadır. Ayrıca,

[1] Hareket edebilen genetik elemanlar

DNA onarım genlerindeki anomaliler de kromozomal instabiliteye neden olmaktadır (Singal ve Ginder, 1999).

2.8.2. Histon Modifikasyonları

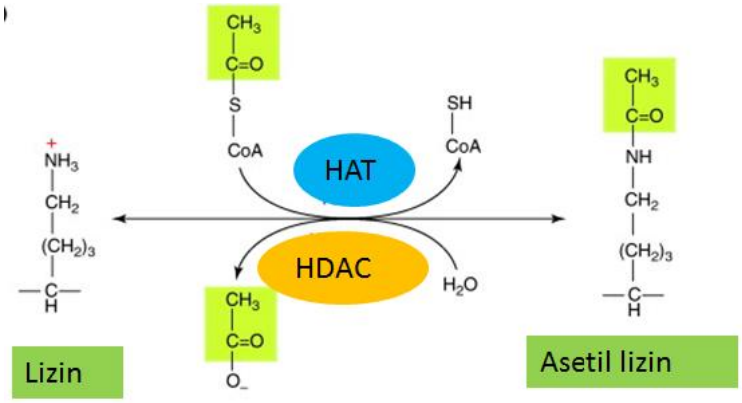
Histonlar, ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde bulunan bazik proteinlerdir ve DNA'nın sıkıştırılmasını sağlarlar. Histonlar, lizin ve arjinin gibi amino asitler bakımından zengindirler ve çeşitli kimyasal değişikliklere uğrayabilirler. Özellikle nükleozom adı verilen yapıların dışına çıkan histon proteinlerinin amino uçlarında gerçekleşen bu kimyasal modifikasyonlar, kromatin yapısının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve bu fenomen histon kodu hipotezi olarak adlandırılır.

Histon modifikasyonları, enzimlerin yardımıyla histon proteinlerine başka kimyasal grupların eklenmesi veya çıkarılması yoluyla meydana gelir. Örneğin, histonların lizin kalıntılarının amino uçlarına asetil, metil, fosfat, ubikitin, ADP-riboz veya sumo gibi çeşitli kimyasal gruplar eklenir veya bunlar çıkarılır. Bu değişiklikler histon proteinlerinin işlevlerini ve etkileşimlerini değiştirerek gen ifadesini kontrol etme yeteneklerini etkiler. Bu nedenle histon modifikasyonları, hücrenin genetik bilginin kullanımını düzenlemesinde kritik bir rol oynar ve epigenetik düzenlemeyi sağlar (Tsankova ve ark., 2007). Bu modifikasyonlar, birbirleriyle etkileşim içinde ve belirli bir sırayla gerçekleşir. Örneğin, histon H3 proteinindeki 10. serin amino asidin fosforilasyonu, 14. lizin asetilasyonunu teşvik edebilirken, 14. lizin deasetilasyonu da 9. lizin metilasyonuna yol açabilir. Bu kimyasal değişiklikler, histonların elektriksel yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirir ve protein kompleksleri için tanıma bölgeleri oluşturabilir. Bu şekilde, histonlar ile DNA arasındaki etkileşim ve histonlar arasındaki etkileşim değişir, bu da DNA'nın paketlenmesi, replikasyonu, onarımı ve gen ifadesinin kontrolü gibi bir dizi biyolojik sürecin düzenlenmesini mümkün kılar. Bu süreçler, gen ifadesinin düzenlenmesi ve hücresel işlevlerin hassas bir şekilde kontrol edilmesi için önemlidir (Grant, 2001; Iizuka ve Smith, 2003; Peterson ve Laniel, 2004; Strahl ve Allis, 2000).

2.8.2.1. Histon Asetilasyonu

Histonların, N-uçlarındaki lizin rezidülerine asetil-koA'dan alınan asetil grubunun eklenerek ε-N-asetil lizin'e dönüşmesi olayına histon asetilasyonu denir. Histon asetiltransferazlar (HAT) bu reaksiyonu katalizleyen enzimlerdir. Günümüze kadar HAT aktivitesine sahip, substrat özgüllügü olan 30 protein gösterilmiştir.

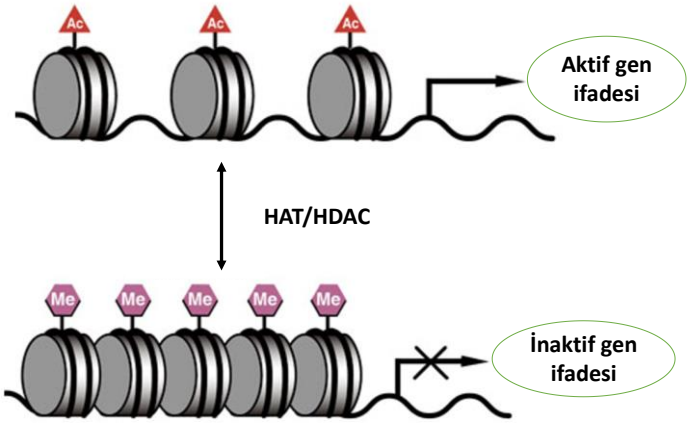
Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bir olay olup; histon de-asetilasyonu ise, histon deasetilaz (HDAC) enzimleri ile gerçekleştirilen asetil grubunu lizinden koptuğu reaksiyonlardır (Şekil 2-7). Bugüne kadar 18 insan HDAC enzimi tanımlanmıştır.



Şekil 2-7: HAT enzimi aracılığıyla histon asetilasyonu ile HDAC enzimi aracılığıyla histon deasetilasyonu

Histon asetilasyonu, transkripsiyonel aktivasyonla (açık kromatin-ökromatin oluşumu) ilişkilidir. Asetilasyon; histonlardaki pozitif yüklü amin gruplarını nötral amid bağlarına dönüştürür. HAT, artı yüklü histon ve eksi yüklü DNA omurgası arasındaki güçlü bağı zayıflatarak DNA'nın transkripsiyon faktörleri tarafından ulaşılabilir hale gelmesine yardımcı olur. Bu olduğunda transkripsiyonel faktörler DNA'ya bağlanabilir hale gelir. DNA'nın açılması ve RNA polimeraz gibi enzimlere maruz kalması gen ifadesini başlatır.

Histon kuyruklarında asetile edilecek olan lizinin yakınındaki aminoasit dizisinin, asetilasyon enzimlerinin özgül bağlanmasında rolü vardır. Asetilasyon her zaman aynı aminoasitlerden gerçekleştirilmektedir. Örneğin, histon H3 özellikle K9, K14, K18 ve K23; histon H4 ise; K5, K8, K12 ve K16 pozisyonlardaki lizin aminoasitlerinden asetillenmektedir. Genel olarak, histon H3 veya H4 histonlarının lizin rezidülerinin asetilasyonu açık kromatin yapısına, transkripsiyon faktörlerinin kolay ulaşılabilirliğine ve dolayısıyla aktif gen ifadesine yol açmaktadırlar. Deasetilasyonu ise, inaktif gen ifadesi ile ilişkili olup ve genel olarak metilasyon ile korelasyon göstermektedir (Şekil 2-8) (Baguet ve Bix, 2004; Berger, 2007; Tanaka ve ark., 2011).

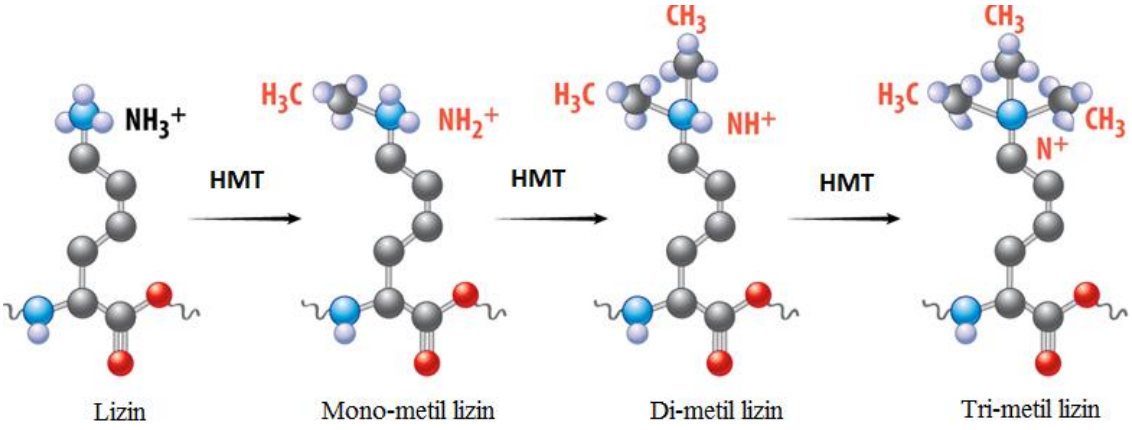


Şekil 2-8: Histon asetilasyonu ile ilişkili açık ve kapalı gen ifadesi

HDAC, lizin rezidülerindeki asetil gruplarının ayrılmasını katalizler ve bu aktivite genellikle transkripsiyonel baskılanma ile sonuçlanır (Takai ve ark., 2004). HDAC inhibitörleri, histon asetilasyonunda artışa yol açarak transkripsiyonu ve kromatin yapısını düzenleyen yeni bir sınıfın üyeleridir (Richon ve O'Brien, 2002).

2.8.2.2. Histon Metilasyonu

Histonlarda lizin ve arjininin azot atomlarında lizin metiltransferaz (HKMT) ve arginin metiltransferaz (HRMT) enzimleri ile gerçekleşen post-translasyonel kovalent bir modifikasyondur. Histon metiltransferaz (HMT) enzimleri, metil gruplarını S-adenozil-L-metiyonin (SAM)' den alarak, histonların lizin ve arginin rezidülerine eklerler. Günümüzde, proteomda 90'dan fazla HMT bilinmektedir. Histon demetilaz (HDM) enzimleri ise, metil gruplarını lizin ve arginin rezidülerinden uzaklaştıran enzimlerdir. Lizin rezidüleri, mono-, di- ve trimetile olabilirken (Şekil 2-9), arginin rezidüleri yalnızca mono- veya dimetile olmaktadır (Greer ve Shi, 2012). Modifikasyona uğramış rezidünün konumuna bağlı olarak lizin metilasyonu son zamanlarda en çok çalışılan olaylardan biridir; çünkü gen ifadesinde önemli bir aktivatör veya inhibitör olarak rol almaktadır. (Schlesinger ve ark., 2007).



Şekil 2-9: Lizin rezidülerinin mono-, di- ve trimetilasyonu

En çok çalışılan lizin metilasyonları, histon H3'ün K4, K9, K27, K36 ve K79 rezidülerinde ve Histon H4'ün K20 rezidüsünde olmaktadır. Özellikle, histon H3 kuyruğu metilasyonunun epigenetik düzenlemede merkezi bir rolü vardır. Histon H3'ün -amino terminalindeki K9 ve K27 lizin rezidülerinin di- ve trimetilasyonu (H3K9me2, H3K9me3, H3K27me2, H3K27me3) ile H4'ün K20 lizin rezidisünün trimetilasyonu (H4K20me3) heterokromatik bölgelerde yaygındır (Jorgensen ve ark., 2013). Diğer yandan, histon H3'ün K4 lizin rezidüsünün di- ve trimetilasyonu (H3K4me2, H3K4me3) ile K36 lizin rezidisünün trimetilasyonu (H3K36me3) ökromatik bölgelerde yaygındır (Baguet ve Bix, 2004; Berger, 2007; Tanaka ve ark., 2011). Bu nedenle bu modifikasyonlar, kanser ve diğer birçok hastalıkta patojenik rollere sahip olabilen proteinleri oluşturan biyokimyasal ve biyolojik bilginin kontrolünde ve gen ifadelerinde çok önemlidir (Jones ve Baylin, 2007; Schneider ve ark., 2002).

Kanser hücrelerinde, histonlardaki lizinlerin asetilasyonunda ve metilasyonunda artış ve azalmalar olmaktadır. Farklı kanser tiplerinde, hatta aynı kanser tipinin değişik evrelerinde farklı histon modifikasyonları gözlenir.

2.8.2.3. Histon Modifikasyonu ve Kanser ilişkisi

Kanser hücrelerinde, histonlardaki lizinlerin asetilasyonunda ve metilasyonunda artış ve azalmalar olmaktadır. Örneğin, bazı kanser hücrelerinde HDAC enzimlerinde normalin üzerinde gen ifadesi gözlenir, histonların hipoasetilasyonu kapalı kromatin yapısına sebep olur ve bu transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına engel olur. Promotör DNA hipermetilasyonu ve histon deasetilasyonu ile tümör baskılayıcı genlerin anormal şekilde susturulması kanser patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Histon

lizin metilasyonu ise, asetilasyonun tersine, hangi rezidüde olduğuna göre aktivasyon ya da inaktivasyonla sonuçlanabilir (Egger ve ark., 2004).

Meng ve ark. (2007) çalışmasında insan mide kanser hücre dizisinde tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgesinde DNA hipermetilasyonu ile histon modifikasyonları arasındaki ilişkinin tanımlanması amaçlanmıştır. *p16* ve *MHL1* genlerindeki sessizleşmenin, DNA hipermetilasyonu, histon H3K9 hipoasetilasyonu, histon H3K9 hipermetilasyonu ve histon H3K4 hipometilasyonu ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Bu tümör baskılayıcı genlerin promotör CpG adalarında meydana gelen DNA hipermetilasyonunun inaktif gen ifadesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mide kanser hücrelerinde, promotör gen bölgelerinde oluşan histon H3K9 hipermetilasyonu DNA metilasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte, histon H3K9 hipoasetilasyonu ve H3K4 hipometilasyonu DNA metilasyonu ile ters ilişki içinde bulunmuştur. DNA metilasyonundaki değişimlerin histon modifikasyonlarını etkilediği gösterilmiştir.

Meng ve ark. (2011) başka bir çalışmasında ise; yumurtalık kanserinde DNA metilasyonunun ve histon H3K9 asetilasyonunun p16, hMLH1 ve MGMT genlerinin sessizleşmesine olan katkısının incelenmesi amaçlanmıştır. Gen ifadesi aktif olan hücrelerin promotör gen bölgelerinde genel olarak hipometile DNA ve asetile H3K9, sessiz gen bölgelerinde ise hipermetile DNA ve hipoasetile H3K9 mevcut olduğu belirtilmiştir.

Kondo ve ark. (2007) çalışmasında hepatoselüler karsinomada *p16*, *RASSF1A*, progesteron reseptörü (PGR) ve östrojen reseptör α (ERα) genlerinin promotör bölgelerinde DNA metilasyonu, bu genlerde, histon H3K4, H3K9 ve H3K27 modifikasyonları ve DNA metiltransferaz enzimleri (*DNMT1* and *DNMT3B*) ve histon metiltransferaz enzimlerinin (*SUV39H1*, *G9a* ve *EZH2*) de ifadeleri araştırılmıştır. p16 ve *RASSF1a* genlerindeki sessizleşmenin DNA metilasyonu ve histon H3K9 dimetilasyonuna bağlı olduğunu ve *PGR* ve *ERα* genlerindeki sessizleşmenin ise, DNA metilasyonundan daha çok H3K27 trimetilasyonuyla ilgili olduğu gösterilmiştir.

2.8.2.4. Histon Modifikasyonunda Rol Oynayan Genler

Glifosat ve metaboliti AMPA'nın epigenetik modifikasyonlar üzerine etkilerini incelemek amacıyla, histon modifikasyonları ile ilişkili genler seçilmiş olup, gen ifadeleri analiz edilmiştir. Aşağıda bu genlerin işlevleri hakkında bilgi verilmiştir.

G9a ('euchromatic histone lysine methyltransferase 2') geni: *G9a*, genellikle transkripsiyonel gen susturma ile ilişkilendirilen histon H3 lizin 9 (H3K9) mono- (H3K9me1) ve dimetilasyonunu (H3K9me2) katalizleyen histon lizin metiltransferazıdır (HMT) (Collins ve Cheng, 2010; Estève ve ark., 2006; Milner ve Campbell, 1993; Nakanishi ve ark., 2008). *G9a*, histon metilasyonunun yanı sıra bu modifikasyonu tanıyabilme özelliğine de sahiptir ve kromatin üzerinde bir iskelet görevi görür (Shahbazian ve ark., 2005). *G9a*'nın, özofagus skuamöz hücreli karsinom, hepatoselüler karsinom, agresif akciğer kanseri, beyin kanseri, multipl miyelom ve agresif over karsinomu dahil olmak üzere birçok kanser türünde aşırı ekspresyonu gözlenmiştir (Gao ve ark., 2013; Hua ve ark., 2014; Lehnertz ve ark., 2014; Wozniak ve ark., 2007). Daha yüksek *G9a* ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 2010; Huang ve ark., 2010; Wozniak ve ark., 2007; Zhong ve ark., 2015). Yüksek *G9a* seviyeleri genellikle yüksek metilasyon seviyeleri ile ilişkilendirilmiş olup önemli tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasına yol açmaktadır.

EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) geni: *EZH2* bir HMT enzimi olan ve genellikle histon H3 üzerinde lizin 27 pozisyonuna (H3K27) metil grupları ekleyerek kromatin yapısını etkileyen bir proteindir. Bu metilasyon (H3K27me3) kromatinin düzenlenmesinde ve gen ifadesinin kontrolünde önemli bir rol oynar. (Viré ve ark., 2006). *EZH2*, histon H3K27'ye metil gruplarının eklenmesini SAM koenzimi kullanarak katalizler (Cao ve ark., 2002). *EZH2* geninde meydana gelen mutasyon veya genin aşırı ekspresyonu tümör gelişimini baskılayan genleri inhibe eder ve meme kanseri (Yoo ve Hennighausen, 2012), prostat kanseri (Varambally ve ark., 2002), melanom (Zingg ve ark., 2015) ve mesane kanseri (Arisan ve ark., 2005) gibi birçok kanser türüyle ilişkilendirilmiştir . *EZH2* genindeki mutasyonlar aynı zamanda nadir bir konjenital bozukluk olan Weaver (kemiklerin aşırı büyümesine neden olan genetik bir bozukluk) sendromuyla ilişkilendirilmiştir (Gibson ve ark., 2012).

SUV39H1 (Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1) geni: *SUV39H1* geni, insanlarda SUV39H1 proteininin üretiminden sorumludur. *SUV39H1*, bir HMT enzimidir ve histon H3 üzerinde lizin 9 pozisyonuna (H3K9) metil grup ekleyerek kromatin yapısını etkiler. (Rea ve ark., 2000). *SUV39H1*, histon H3K9 metilasyonuyla ilişkilidir ve metil gruplarının eklenmesini katalizleyerek kromatin yapısını değiştirir ve buna bağlı olarak gen ekspresyonunu etkiler. H3K9 metilasyonu, heterokromatin

yapısında ve fonksiyonunda bozunmaya yol açar (Djeghloul ve ark., 2016). *SUV39H1*'in aşırı ekspresyonunun yaşlanma ile ilişkili olduğunun ve yaşlanmaya bağlı gelişen miyeloid malignite açısından risk oluşturduğu düşünülmektedir (Sun ve ark., 2014).

SETD8 (SET Domain Containing 8) geni: *SETD8*, bir HMT enzimidir ve histon H4 üzerinde lizin 20 pozisyonuna (H4K20) metil grup ekleyerek kromatin yapısını etkiler. Bu metilasyon (H4K20me1) kromatinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. (Brustel ve ark., 2011; Z. Wang ve ark., 2015). *SETD8* geni, normal hücrelerde ifade edilir ve çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynar. Özellikle DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi gibi hücresel işlevlerde önemli görev alır (Al Temimi ve ark., 2019; Nishioka ve ark., 2002; Tardat ve ark., 2010). *SETD8*'nin düzensiz ifadesi veya mutasyonları prostat, meme, mesane, akciğer, papiller tiroid, pankreas, hepatoselüler karsinom ve glioma gibi çeşitli kanser türlerinin gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Hou ve ark., 2016; Lazarus ve ark., 2018; Liao ve ark., 2018; Ma, 2018; Milite ve ark., 2016; Nikolaou ve ark., 2015; Takawa ve ark., 2012; Wu ve ark., 2020; Yang ve ark., 2012; Yao ve ark., 2014).

SETD1B (SET domain containing 1B) geni: *SETD1B*, bir HMT enzimidir ve genellikle histon H3 üzerinde lizin 4 pozisyonuna (H3K4) metil grup ekleyerek kromatin yapısını etkiler. Bu metilasyon H3K4me1, H3K4me2 ve H3K4me3 olarak adlandırılır. *SETD1B* geni, kromatin yapısını etkileyen çeşitli mekanizmalara katılarak gen ifadesini düzenler. DNA transkripsiyonu, hematopoezi, nörolojik fonksiyonları ve DNA onarımını düzenlemektedir (Kranz ve Anastassiadis, 2020; Roston ve ark., 2021).

HAT1 (histone acetyl transferase 1) geni: *HAT1* geni H4K5, H4K12, H3K9, H3K18 ve H3K27 gibi birden fazla histon bölgesinin asetillenmesini düzenleyen histon asetiltransferazdır (Nagarajan ve ark., 2013; Shahbazian ve Grunstein, 2007). Yapılan bir çalışmada *HAT1*'in histon H3'ün lizin 27 bölgesine bir süksinil grubunun eklenmesini sağlayarak gen ifadesinde değişikliğe neden olduğu gözlenmiştir. *HAT1* aracılığıyla gerçekleşen bu değişiklik HepG2 ve PANC1 (pankreas kanseri hücre dizisi) hücrelerinde tümörojenezi tetiklediği görülmüştür (Yang ve ark., 2021).

SIRT1 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-1) geni: Sirtuin (SIRT) protein ailesinin üyesi olup, üçüncü sınıf histon deasetilaz (HDAC III) olarak bilinir. Sirtuinler, histonlar ve histon dışı proteinlerin NAD+ bağımlı bir şekilde deasetilasyonunu sağlarlar (Sauve ve ark., 2006). *SIRT1* aracılı deasetilasyon, hücresel yaşlanma (C. Xu

ve ark., 2020), apoptoz (He ve ark., 2021), şeker (Huang ve ark., 2021) ve lipid (Qiang ve ark., 2011) metabolizması, oksidatif stres (Liang ve ark., 2020; Rada ve ark., 2018) ve enflamasyon (Rada ve ark., 2018) gibi birçok biyolojik süreci direkt etkiler. Bu nedenle, *SIRT1* ekspresyonu ve işlevinde küçük değişiklikler bile hücresel yanıtları önemli ölçüde etkileyebilir.

2.8.3. Glifosatın Epigenetik Modifikasyonlar Üzerine Etkileri üzerine yapılan çalışmalar

DNA diziliminde değişikliğe neden olmaksızın gen ekspresyonunu etkileyebilen epigenetik modifikasyonlar çevresel toksinlere maruziyet sonucunda da ortaya çıkabilmektedir (Feil ve Fraga, 2012). Glifosatın genotoksik etkileri gösterilmesine rağmen tam olarak açıklanamayan tosisite mekanizmalarında epienetik mekanizmaların da rolünün olabileceği düşünülmektedir.

Kubsad ve ark. (2019), glifosatın sıçanlarda epigenetik modifikasyonlar ile oluşturduğu patolojilerin F2 ve F3 nesillerinde belirgin bir artış göstererek kalıtımsal olarak aktarıldığını göstermektedir. Bir diğer çalışmada da glifosat maruziyeti sonucunda sıçanlarda epigenetik modifikasyonlardan kaynaklı hastalıkların sonraki nesillere aktarıldığı gözlenmiştir (Ben Maamar ve ark., 2021). Bu çalışmalar, sperm hücrelerindeki histon modfikasyonlarının epigenetik olarak nesiller arası kalıtımda rol oynadığını göstermiştir. Glifosatın ve AMPA'nın, insanlarda global DNA metilasyondaki değişikliklerle ilişkili olarak epigenetik modifikasyonlara neden olabileceği ileri sürülmüştür (Benedetti ve ark., 2018; Kwiatkowska ve ark., 2017; Wozniak ve ark., 2020). Ayrıca, Glifosat ve AMPA'nın PBMC hücre dizisinde tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerindeki global DNA metilasyonunu önemli ölçüde değiştirdiği ve böylece apoptoz mekanizmalarının etkilendiği gösterilmiştir(Wozniak ve ark., 2020).

Tablo 2-3'de glifosat, AMPA ve glifosat bazlı herbisitlerin epigenetik etkileri üzerine yapılan çalışmaları özetlenmiştir.

Tablo 2-3: Glifosat, glifosat bazlı herbisitler (GBH) ve AMPA'nın epigenetik mekanizmalar üzerine etkisi

Madde	Hücre	Epigenetik değişiklikler	Kaynak
Glifosat	PBMC	-Global 5-metil sitozin seviyesinde azalma -*p53* promotörünün metilasyonunda artış	Kwiatkowska ve ark. (2017)
Glifosat	PBMC	-Global 5-metil sitozin seviyesinde azalma -*p21* ve *p53* promotörlerinin metilasyon seviyelerinde değişiklik -Hücre döngüsünün (*CCND1, p16, p21 ve p53)* ve apoptozun (*BCL2*) düzenlenmesinde yer alan genlerin ekspresyonunda değişiklikler	Wozniak ve ark. (2020)
Glifosat	MCF10A Hücre dizisi	-TET yolu ile meydana gelen DNA hipometilasyonu -Farelerin %50'sinde glifosat maruziyeti sonrası miRNA 182-5p kaynaklı tümör gelişimi	Duforestel ve ark. (2019)
AMPA ve Glifosat	PBMC	-Glifosat ve AMPA maruziyeti sonucu *DNMT1* ve *HDAC3* gen ifadelerindeki değişiklikler -Glifosat maruziyeti sonucu *DMNT3A* gen ifadesinde değişiklik	Wozniak ve ark. (2021)
AMPA	PBMC	-Global 5-metil sitozin seviyesinde azalma -*p21* ve *p53* promotörlerinin metilasyon seviyelerinde değişiklik *CCND1* gen ifadesinde artış	Wozniak ve ark. (2021)
GBH	Sıçan meme dokusu	-Meme bezi gelişiminde değişiklikler -ERa proteini ve mRNA ifadesinde azalma -Ergenlik sonrası hayvanlarda ERa promotörlerinin metilasyon seviyelerinde değişiklikler	Gomez ve ark. (2019)
Glifosat	Sıçan spermi	-F2 ve F3 nesillerinde patolojilerde görülen artış (prostat, yumurtalık ve böbrek hastalıkları, obezite, doğum anormallikleri ve tümör gelişimi) -Spermdeki DNA metilasyon bölgeleri (DMRs)	Kubsad ve ark. (2019)
Glifosat	Sıçan spermi	-Sperm diferansiyel histon tutulum bölgeleri (DHRs)	Ben Maamar ve ark. (2021)

2.9. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz, fonksiyonunu kaybetmiş, hasar görmüş, organizma için zararlı olabilecek hücrelerin ortadan kaldırıldığı, doğuştan gelen genetik olarak kontrol edilen bir süreçtir (Kam ve Ferch, 2000; Saikumar ve ark., 1999; Schulze-Osthoff ve ark., 1998). Apoptozu çeşitli fizyolojik ve patolojik uyaranlar başlatabilir. Ekstrinsik ve instrinsik (mitokondrial) olmak üzere 2 yolla gerçekleşir.

Eksrtinsik yolakta apoptoz sürecini başlatan iki ana sinyal yolundan biri FasL-Fas sistemi, diğeri ise TNF ligandı (TRAIL)- TNF sistemidir. Bu sinyal yolları, hücrelerin ölümüne yönelik sinyallerin iletilmesinde önemli rol oynar. (Goldar ve ark., 2015; Liu ve ark., 2017; Shlyakhtina ve ark., 2017). Bu süreçte ölüm reseptörlerinin ligandlarla oluşturduğu kompleks FAS ilişkili ölüm proteinine (FADD), ve TNF ilişkili ölüm proteinine (TRDD) bağlanarak trimerik bir yapı oluşur. Bu trimerik yapı başlatıcı kaspaz 8 ile birleşerek ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) adı verilen aktifleştirilmiş bir kompleks oluşturur. Oluşan DISC kompleksi Kaspaz 8'in aktivasyonunu baskılayan c-FLIP adı verilen inhibitör protein tarafından regüle edilir (Wajant, 2002). Oluşan kompleks inaktif kaspaz8'i aktif kaspaz8'e dönüştürür (Şekil 2-10). Aktif kaspaz-8 ise direk kaspaz-3'ü aktif hale getirir ve aktive edilmiş kaspaz-3 aracılığıyla hücrenin apoptoza uğraması gerçekleşir (Adams ve Cory, 2001; Curtin ve Cotter, 2003; Spierings ve ark., 2004).

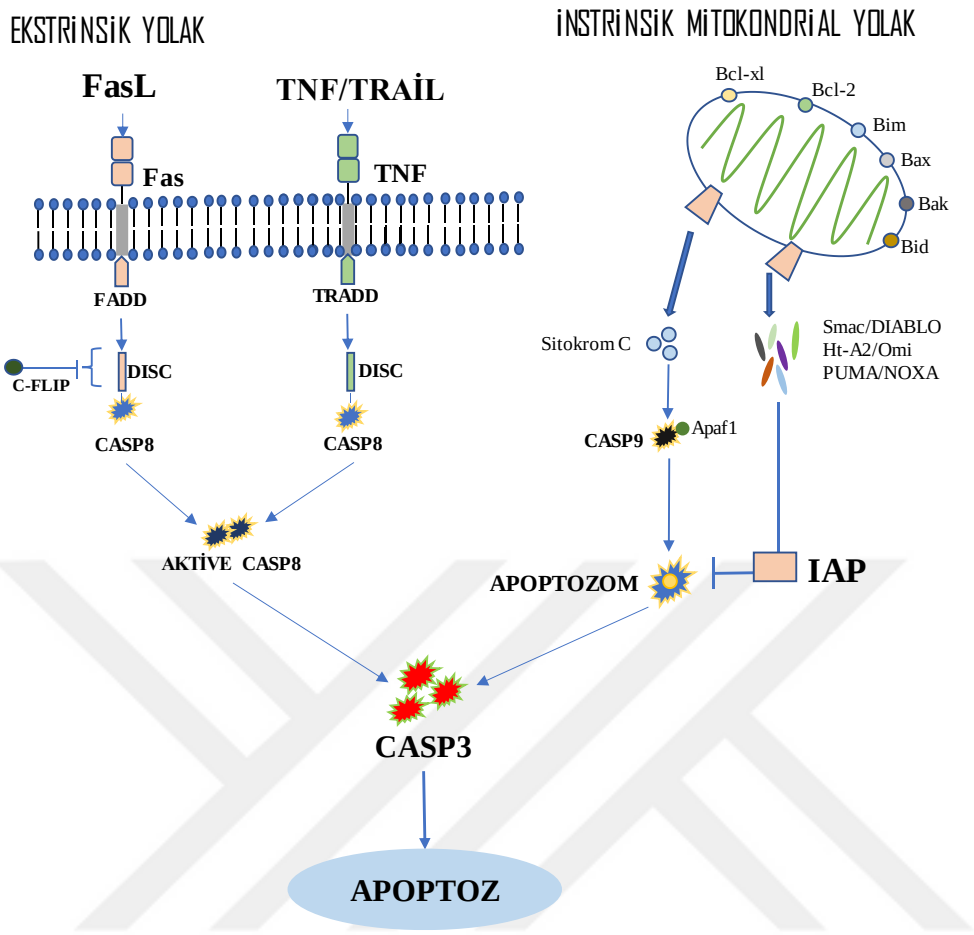
İnstrinsik mitokondriyal yolak mitokondri içinde meydana gelen bir dizi hücre içi olayı içerir. Mitokondrinin zar geçirgenliğinin bozulmasına yol açan hormonlar, radyasyon, toksinler, hipoksi, viral enfeksiyonlar ve hipertermi gibi bir takım faktörler bu yolu tetikleyebilir. Bu süreç ayrıca proapoptotik proteinlerin intermembranlardan sitozole salınmasına da yol açar (Saelens ve ark., 2004; Xu ve ark., 2015). Sitozole salınan sitokrom c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur (Hassan ve ark., 2014; Kroemer ve ark., 2007).

Apoptozda görev alan proteinler, proapoptotik proteinler (Bak, BAX, Bid, Bim) ve anti-apoptotik proteinler (BCL-2, Bcl-xl) olarak birbirine zıt 2 gruptan oluşur. Bu proteinler mitokondriyal membranın geçirgenliğini artırıp (proapoptotik proteinler aracılığıyla) veya azaltıp (anti-apoptotik proteinler aracılığıyla) sitokrom C salınımının düzenlenmesinde rol oynarlar. Smac/DIABLO, Ht-A2/Omi, PUMA ve NOXA

proteinleri apoptoz inhibitör faktörünü (IAP) engellemede görev alan proapoptotik proteinleridir. (Elmore, 2007; Lomonosova ve Chinnadurai, 2008; Schuler ve Green, 2001).

Apoptotik uyarı sinyali alan hücrede proapoptotik protein olan Bid antiapoptotik protein olan BCL-2'yi inaktive eder ve BAX ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen BAX ve Bak mitokondri membranında geçirgenliğini artırır. Böylelikle mitokondri porlarından sitokrom-c ve SMAC salınımı gerçekleşir. SMAC, IAP'ı inhibe eder ve apoptoz oluşumu ivme kazanır. IAP'ın ortamda bulunması kaspaz-3 aktivasyonunu engeller. Mitokondriyal membran porlarından salınan sitokrom-c, Apaf-1 ve kaspaz9 ile birleşerek Apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur (Şekil 2-10) (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001; Strasser ve ark., 2000). Apoptozom inaktif prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir ve aktive kaspaz-3 aracılığıyla hücrenin apoptoza uğraması gerçekleşir (Adams ve Cory, 2001; Palmer ve ark., 2000; Smaili ve ark., 2000).

p53 geni, onkojenik strese yanıt olarak apoptotik hücre ölümünü indükleyen bir tümör baskılayıcı proteindir. Hücrede oluşan DNA hasarına karşı hücre bölünmesinin G1 fazında bölünmeyi aksatarak hücre içinde DNA tamir mekanizmalarının devreye girmesini sağlar ve oluşan hasar giderilmeye çalışılır. Oluşan hasar geri dönüşümsüz ise BAX, Apaf-1 ve Fas oluşumunu hızlandırarak ve BCL-2 ve Bcl-xl'yi baskılayarak hücreyi apoptoza sürükler (Vousden ve Lu, 2002).



Şekil 2-10: Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik mitokondrial yolağı (Obeng, 2021).

2.9.1. Glifosatın Apoptoz ve Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

Apoptoz proapoptotik ve anti-apoptotik proteinler tarafından enerjiye bağlı, genetik olarak kontrol edilen programlanmış hücre ölümü sürecidir. Bu proteinler arasında, BCL-2 proteini hücre ölümünü bastırma, BAX proteini ise hücre ölümünü tetikleme yönünde görev alır. BAX/BCL-2 indeksi, hücre apoptozu için önemli bir prognostik faktör olarak gösterilmektedir (Gazzaniga ve ark., 1996). PC12 hücre dizisinde yapılan çalışmada, glifosatın 40 mM konsantrasyonda maruziyeti sonrası maruziyet süresiyle doğru orantılı yüksek BAX ve düşük BCL-2 protein ekspresyonu gözlenmiş ve glifosatın PC12 hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Gui ve ark., 2012).

Bir diğer çalışmada, glifosatın 1 - 10000 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda 48 saatlik maruziyetinin sertoli ve germ hücreleri karma kültürlerinde apoptozu teşvik

ettiği gösterilmiştir (Clair ve ark., 2012). Adjuvanlarla karıştırılan glifosat formulasyonlarının maruziyeti sonucunda ise mitokondriyal hasar ve hücresel harabiyet söz konusu olabileceğinden hücrelerin apoptoz değil nekroz yoluyla öldüğü düşünülmüştür (Okada ve Mak, 2004). PBMC hücrelerinde yapılan bir araştırmada sadece yüksek dozlarda (0,5 mM, 5mM) AMPA ve glifosat maruziyeti sonucunda apoptotik aktivitede artış gözlenmiştir (Kwiatkowska ve ark., 2020). Başka bir çalışmada Annexin V ve PI boyaları kullanılarak flow sitometri analizi sonucu C4-2B ve PC-3 hücre dizisinde 24, 48 ve 72 saat 50 mM AMPA maruziyeti sonucunda maruziyet süresiyle doğru orantılı olarak apoptozda istatistiksel olarak %40'ın üzerinde anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (Li ve ark., 2013). Martini ve ark. (2012), yaptığı çalışmada Annexin-V ve PI kullanarak 3T3-L1 hücre dizisinde (fibroblastlar) 1.55 mM konsantrasyonda glifosat içeren ticari bir ürünün, kontrole kıyasla apoptotik hücrelerin sayısında anlamlı bir artışa neden olduğunu bulmuşlardır.

İnsan embriyonik böbrek hücre dizisinde (HEK293) yapılan araştırmada, düşük konsantrasyonlarda (0,6-18 µM) glifosatın hücrelerin çoğalmasını uyardığı gösterilmektedir (Jeon ve ark., 2020). HepG2 hücre dizisinde CCK8 ('Cell Counting Kit-8') hücre proliferasyon testi kullanılarak ölçülen sonuçlara göre test edilen konsantrasyonlarda, glifosatın HepG2 hücre proliferasyonunu uyardığını göstermektedir (Kašuba ve ark., 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

%10 Tris-glisin poliakrilamit jel	Bio-Rad 4561034
%40 Akrilamit/bis çözeltisi (37,5: 1)	Serva 10681.01
2-Merkaptoetanol	Merck 8057400250
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT)	Biomatik A3338
5-mC DNA elisa kit	Epigentek P-1034-96
AMPA (%99)	Sigma-Aldrich 324817
Absolu alkol	Sigma-Aldrich 32221
Adhezif kaplama kağıtları	Thermo Scientific™AB-0558
Amonyum persülfat (>%98) (APS)	Sigma-Aldrich A3678
Anti-asetil histon H3K9 antikoru	Milipore 07-352
Anti-histon 3 (H3) antikoru	Abcam ab61251
Anti-mouse IgG, HRP-bağlı antikor	Santa Cruz Biotechnology SC-2005
Anti-rabbit IgG, HRP-bağlı antikor	Santa Cruz Biotechnology SC-2357
Anti-trimetil histon H3K27 antikoru	Milipore 07-449
Anti-trimetil histon H3K9 antikoru	Milipore 07-442
Apoptoz hasar tespit kiti (Annexin V FTIC/PI)	Biolegend (640914)
Ayırma jeli tamponu, 1,5 M Tris HCltamponu, pH 8,8	Bio-Rad 161-0798
cDNA sentez kiti	Roche Life Science05091284001
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Biomatik A2424
DNA izolasyon kiti	Roche Life Science 11796828001
Dubelco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri/F12besiyeri (DMEM/F12)	Wisent-Multicell 319010CL
Etilendiamin tetra asetik asid (EDTA)	Sigma E5134
Fetal sığır serumu (FBS)	Wisent-Multicell 080110
Fosfat tamponu (kalsiyum ve magnezyumsuz) (PBS-CMF) (10x)	Wisent-Multicell 311012CL

Gen ekspresyonu primerleri	Sentromer DNA TeknolojileriLtd. Şti.
Gen ekspresyonu sybr green master karışımı (SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit)	Bioline BIO-98020
Glasiyel asetik asit	Riedel-de Haen 27225
Glifosat (%99)	Sigma-Aldrich 45521
Glisin	Wisent-Multicell 800-045-LG
Ön ayırma jeli tamponu, 0,5 M Tris tamponu, pH 6,8	Wisent-Multicell 809-230-LL
Örnek indirgeyici ajan (Laemmli 2x)	Sigma-Aldrich S3401-10VL
Protein standardı (10-250 kDa)	Thermo Scientific™ 26619
Protein standardı (40-300 kDa)	Thermo Scientific™ 26625
Penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) çözeltisi	Wisent-Multicell 450201EL
RNA izolasyon kiti	Roche Life Science 11828665001
Sığır serum albumini (BSA)	Applichem A7906
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich L5750
Sodyum klorür (NaCl)	J. T. Baker 0278
Tetrametiletilenediamin (TEMED)	Biomatik A4008
Total histon ekstraksiyon kiti	Epigentek OP-0006
Tripan mavisi	Fluka 93595
Tripsin (1:250)	Biomatik A4027
Tris baz	Wisent-Multicell 600-127-LG
Tris hidroklorür (Tris HCl)	Applichem A3452
Tween 20	Applichem A49640
Western blot görüntüleme çözeltisi ECL	Santa Cruz BiotechnologySC-2048

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (0,5-10 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (30-300 µL)	Eppendorf
MilliQ su cihazı	Millipore Gradient
Blok ısıtıcı (5 mL tüpler için)	Stuart SBH130D

Blok ısıtıcı (0,5 µL mikrotüpler için)	Techne Dri-Block DB-2D
Blok ısıtıcı (96 kuyucuklu mikroplaka)	EuroClone Dry Bath EMK20
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik 5231 NFY
CO_2'li inkübatör	Thermo-Scientific Heracell150i
Çalkalamalı blok ısıtıcı (2 mL tüp)	Biosan TS-100C
Çalkalamalı blok ısıtıcı (96 kuyucuklu mikroplaka)	EuroClone T-Shaker EMS100
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2041 D
Derin dondurucu (-80 °C)	Daihan-Scientific Wisecry
Dikey elektroforez jel tankı	Bio-Rad Mini Protean®Tetra Cell 1658040EDU
Elektronik hassas terazi	Precisa XB 220 A
Etüv	Nüve
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus CKX4
Flow sitometri	Acea-Novocyte
Real-time PCR', RT-PCR	Roche Life ScienceLightcycler 480-II
Kemiluminesans Görüntüleme cihazı	Vilber Lourmat Fusion Fx
Görüntüleme cihazı yazılım programı	ImageJ
Güç cihazı	Bio-Rad PowerPac™ BasicPower Supply 1645050
Hassas terazi	Mettler H20
Laminar kabin (Biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek Epoch
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 120
Mini orbital çalkalayıcı	Stuart SSMI
Otomatik pipetör	Eppendorf
Otomatik hücre sayımı cihazı	Luna Automated Cell Counter(Logos model: L10001)
Otoklav	Hirayama HV-50L
pH metre	Hanna HI 1131 B
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich Micro 200R
Soğutmalı santrifüj	Hettich Micro Universal 32R

Spin santrifüj	Labnet C1301B
Su banyosu	Memmert WB14
Vorteks	NC 28405-Ika

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Dikey elektroforez jel kaseti, büyük	Bio-Rad Mini Protean®1653311
Dikey elektroforez jel kaseti, küçük	Bio-Rad Mini Protean®1653308
DNA saklama kutusu	Greiner Bio-One
Enjektör (10 mL; 50 mL)	Set inject
Enjektör ucu steril filtre (0,22 µm naylon)	Sartorius-Minisart
Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner Bio-One
Filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Hücre kültürü flaskı (25 cm^2; 75 cm^2)	Nest
İnce duvarlı PCR tüpü (0,2 mL)	Greiner Bio-One
Kriyo vial (2 mL)	Greiner Bio-One
Lateks eldiven	Broche
Mikroplaka (6; 24; 96 kuyucuklu)	Nest
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner Bio-One
Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner Bio-One
Nitril eldiven	Broche
Otoklav bandı	Sussex
Otoklavlanabilir schott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Pastör pipeti (2 mL)	Greiner Bio-One
Pipet ucu (0,1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Nest
Serolojik pipet (10 mL; 50 mL)	Greiner Bio-One

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği

Cam malzemeler musluk altında 7-8 defa bol su ile çalkalandı ve sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren distile su dolu kovada 1 gece bekletildi. Ertesi gün tekrar musluk altında 7-8 defa yıkanarak çamaşır suyunun malzemelerden tamamen uzaklaştırılması sağlandı ve 1 gece distile su içeren kovada bekletildi. 65°C'lik etüvde kurutulan cam malzemeler, 165°C'de 2 saat süre ile kuru-sıcak hava sterilizasyonuna tabi tutuldular. Isıya dayanıklı pipet uçları, mikrotüpler, schott şişelerin kapakları gibi plastik malzemelerin ve hazırlanan çözeltilerin sterilizasyonu 121 °C'de 3 atm basınçta 15 dk. otoklavda gerçekleştirildi. Besiyeri ve serum gibi ısıya dayanıksız çözeltiler ise 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek steril edildi.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışma alanları ve laminar kabinin içi %70'lik alkol ile düzenli olarak temizlendi. Çalışma öncesi ve sonrasında belli süreler ile hücre kültürü laboratuvarı ve laminar kabinin UV lambaları açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Hücre kültürü laboratuvarında çalışırken tek kullanımlık galoş ve eldiven kullanıldı, laboratuvar önlüklerinin ise başka çalışmalarda kullanılmamasına özen gösterildi.

3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini

İnsan hepatoselüler karsinoma hücreleri (HepG2) Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri kriyo vialler içerisinde -196ºC'de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Tripsin/EDTA çözeltisi (%0,2 / %0,04): 0,2 g tripsin ve 0,04 g EDTA tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü. 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi. 15 mL'lik falkonlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

Fetal sığır serumu (FBS): Hazır inaktive edilmiş FBS kullanıldı. Ancak, FBS inaktive edilmemiş ise; 56 ºC'de 30 dk. inkübe edilerek inaktive edildi. 15 mL'lik falkonlara bölünerek -20 ºC'de saklandı. Çalışma günü 37 ºC'de çözündürülerek kullanıldı. FBS, besiyerine eklenmeden önce 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi.

Antibiyotik çözeltisi [penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) %10]: 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) ana stok çözeltisinden alınır, 10 mL'ye CMF-PBS ile tamamlanır.

Hücre dondurma çözeltisi: 10 mL DMSO, 10 mL FBS ve 1 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi hücreler için uygun besiyeri ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

HepG2 hücresi için besiyeri: DMEM/F12 besiyerine 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 10 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi eklenerek 100 mL olacak şekilde hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde 15 dk.inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37 °C'lik su banyosunda 1-2 dk. çözülene kadar bekletildi. Vial kapağının su ile temas etmemesi için dikkat edildi. Vial %70'lik alkol ile silindi ve laminar kabin içine alındı. Hücreler, %10 FBS içeren besiyeri bulunan 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı, besiyerinde süspande edildi ve 1500 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti besiyerinde tekrar süspande edildi ve DMSO'nun toksik etkisinden kurtulmak amacıyla işlem tekrar edildi. Daha sonra, hücre pelletine 1 mL besiyeri eklendi, yavaşça pipetleme yapılarak hücreler süspande edildi ve 7-10 mL besiyeri içeren 25 cm^2'lik ya da 75 cm^2'lik flasklara ekildi. Flasklar 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)

Hücre kültür flasklarının tüm yüzeyini kaplamış halde bulunan yoğunlaşmış hücreler için 'konfluent durumda' ifadesi kullanılır. Hücreler konfluent duruma geldiğinde pasajlandı. Pasajlama için flask inkübatörden alındı, laminar kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Hücrelerin yüzeyi 2 mL CMF-PBS çözeltisi ile yıkandı. Bu adım, tripsin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntılarını uzaklaştırmak amaçlı yapılır. Yıkama işleminden sonra CMF-PBS döküldü ve 2 mL tripsin/EDTA çözeltisi ilave edildi, flask 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde 5-10 dk. bekletildi. Tripsin ile hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücrelerin tripsin içinde gereğinden fazla beklememesi için mikroskop ile yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmelidir. Tripsin aktivasyonunu durdurmak amacıyla flaska 2-3 mL serumlu besiyeri eklendi, pipetleme yapıldı ve hücreler 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 3

dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet 2 mL besiyeri ile süspande edildi. Hücreler hemasitometrede sayılarak, yaklaşık 10^5 hücre/mL olacak şekilde içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekildi. Flasklar, %90 bağıl nem, 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edildi. Hücre dizisinin devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi ortalama haftada 2-3 kez yapıldı.

3.4.6. Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımı tripan mavisi testi ile yapıldı. Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, ölü hücrelerin bozulmuş hücre membranlarından boyayı hücre içerisine alabilmeleri esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

Hücre sayımı otomatik hücre sayım cihazı (Luna Automated Cell Counter, L10001) ile gerçekleştirildi. Ayrıca, kontrol etme amacıyla hücre sayımı Thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm^2 alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4×16 küçük kareden oluşan özel sayım lamları (Thoma lamı) kullanılarak da ışık mikroskobunda gerçekleştirildi. 4×16 küçük kareye düşen tüm hücreler sayıldı. Hücre süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Formül 3-1):

Toplam hücre sayısı/mL = (Hücre sayısı/4) × 104 × Seyreltme faktörü

(Formül 3-1)

3.5. Glifosat ve AMPA Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanışı.

100 mM Glifosat çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 16,907 mg glifosat 1 mLdistile suda çözülerek ana stok çözeltisi hazırlandı.

10 mM Glifosat çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 100 mM glifosat çözeltisinden 50 µL alınarak distile su ile 500 µL'ye tamamlandı.

1 mM Glifosat çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 10 mM glifosat çözeltisinden 50 µL alınarak distile su ile 500 µL'ye tamamlandı.

100 mM AMPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 11,104 mg AMPA 1mL distile suda çözülerek ana stok çözeltisi hazırlandı.

10 mM AMPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 100 mM AMPA çözeltisinden 50 µL alınarak distile su ile 500 µL'ye tamamlandı.

1 mM AMPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 10 mM AMPA çözeltisinden 50 µL alınarak distile su ile 500 µL'ye tamamlandı.

3.6. Sitotoksisite Testleri

Glifosat ve AMPA'ya maruz bırakılan hücrelerin canlılığının tespiti MTT testi uygulanarak gerçekleştirildi.

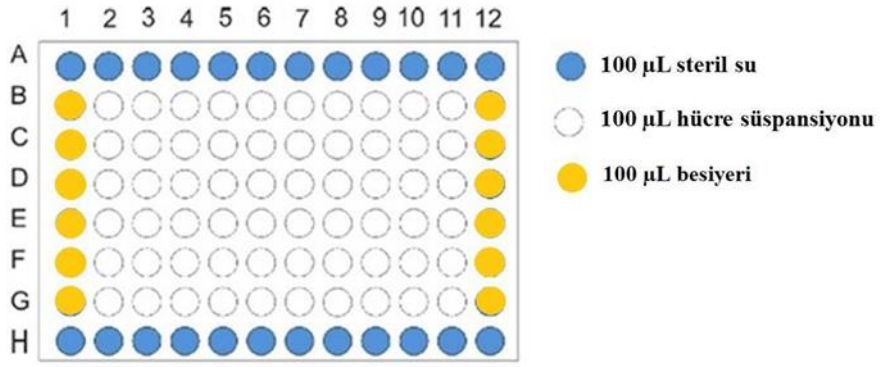
3.6.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Hücre kültürlerinin mikroplakalara uygulanması esnasında kuyucuklarda düzensiz hücre yoğunluğu gerçekleşebilir. Hücre süspansiyonunun homojen olduğundan emin olunmalı ve hücre topaklarının oluşumu engellenmelidir. Aynı zamanda, testin uygun hassasiyette olması için test esnasında hücrelerin yakın bitişiklikte olması gerekir. Hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları mikroskopta incelenmelidir. Hücre kültürleri aşağıda belirtildiği şekilde 96 kuyucuklu mikroplakalarda hazırlandı:

1. Bir rezervuar içerisine steril bidistile su konuldu ve inkübasyon sırasında kültür besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla 96 kuyucuklu mikroplakanın A ve H sıralarındaki her bir kuyucuğa 100 µL su dağıtıldı. 96 kuyucuklu mikroplakanın 1 ve 12 sütununun B-G sıralarındaki her bir kuyucuğuna ise100 µL besiyeri dağıtıldı (Şekil 3-1).

2. Her bir kuyucukta 1×10^4 hücre 100 µL besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakanın diğer kuyucuklarına hücreler şu şekilde dağıtıldı: $6{,}5\times10^5$ hücre 6,5 mL besiyerinde süspande edildi ve steril rezervuar içerisine hücre süspansiyonu konuldu. 96 kuyucuklu mikroplakalara Şekil 3-1'de gösterildiği şekilde 100 µL hücre süspansiyonu dağıtıldı

3. 96 kuyucuklu mikroplakadaki hücre süspansiyonu 37 ºC'de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi.



Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikroplakaya hücre ekimi.

3.6.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanışı

Sitotoksisite testleri için glifosat ve AMPA çözeltisi: Bölüm 3.5'de gösterildiği şekilde 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı.

%1'lik SDS ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 0,1 g SDS, PBS ile 10 mL'ye tamamlandı.

%0,1'lik SDS çalışma çözeltisinin hazırlanışı: %1'lik SDS ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek hücrelere 0,1 mg/mL konsantrasyonunda SDS (~IC50) pozitif kontrol olarak uygulandı (ISO-10993-5) ve çözelti içindeki PBS konsantrasyonunun da %1 olması sağlandı.

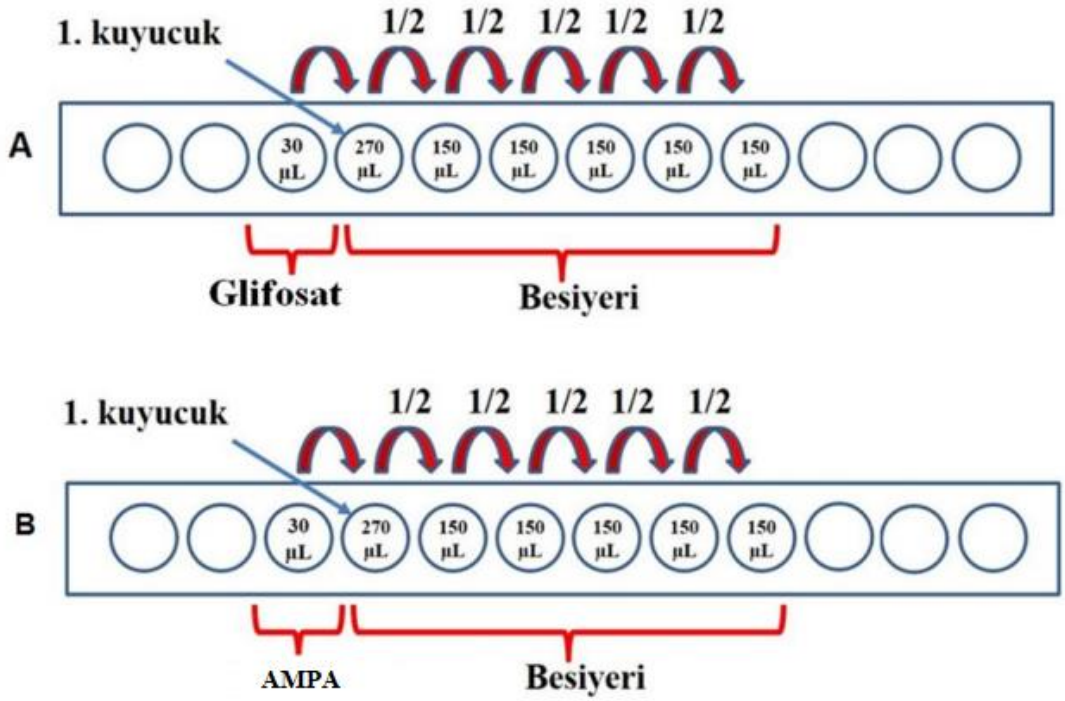
Glifosat ve AMPA çözeltisinin seyreltilmesi: Stok çözeltiler 96 kuyucuklu seyreltme mikroplakasında 1/10 oranında besiyeri ile seyreltildi. Daha sonra hazırlanan bu çözeltilerden 1/2 oranında seyreltme yapılarak toplam 6 konsantrasyonda standart çözeltileri hazırlandı. Basamaklar her iki madde için de ayrı ayrı yapıldı. Seyreltme işlemi için uygulanan plaka düzeni Şekil 3-2'de gösterildi:

1. A sırasındaki 1. kuyucuğa 270 µL besiyeri 2.-6. kuyucuklara 150 µL besiyeri konuldu.

2. A sırasındaki 1. kuyucuğa Glifosatın ve AMPA'nın distile su içinde hazırlanan çözeltisinden 30 µL konuldu ve iyice karıştırıldı.

3. kuyucuktan 150 µL alınarak 2. kuyucuğa aktarıldı (1/2 oranında seyreltme), iyice karıştırıldı ve bu kuyucuktan 150 µL alınarak 3. kuyucuğa aktarıldı. Bu işlem 5. kuyucuk da dahil olmak üzere yapıldı. En son 6. kuyucuktaki fazla olan 150 µL atıldı.

Bu şekilde toplam 6 konsantrasyonda olmak üzere Glifosat ve AMPA seyreltmeleri hazırlanmış oldu.



Şekil 3-2: Glifosat ve AMPA'nın 1/2 oranında seyreltilmesi.

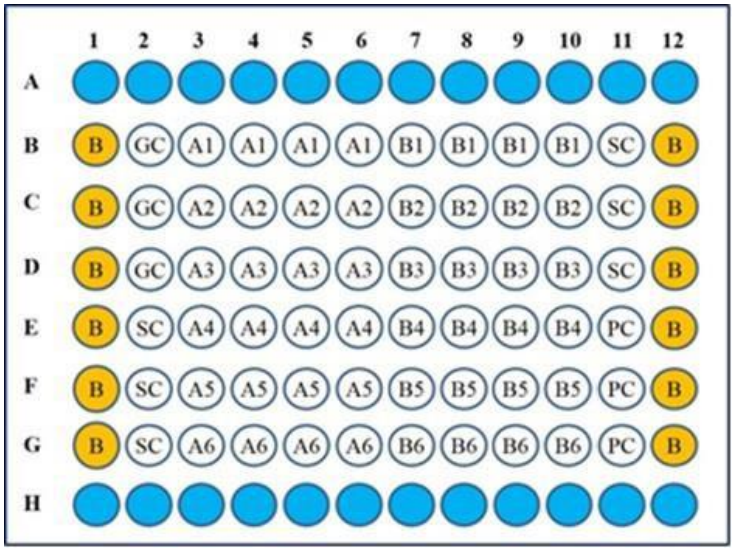
3.6.3. Glifosat ve AMPA'nın Hücre Kültürüne Maruziyeti

1. Bölüm 3.6.1'de belirtilen 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücre kültür mikroplakasındaki kuyucuklardan (A ve H sırası hariç) 8 kanallı pipet kullanılarak kültür besiyeri uzaklaştırıldı.

2. Bu kuyucuklara 50 µL PBS (1x) ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi (kuyucuk yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin kazınmamasına, zarar görmemesine dikkat edilmelidir).

3. Vakit kaybetmeden her bir kuyucuğa 90 µL taze hücre kültürü besiyeri eklendi (hücre katmanının kurumasından dolayı oluşabilecek hücre ölümü veya stresini engellemek için hızlı yapılmalıdır).

4. Maruziyet mikroplakası Şekil 3-3'te gösterildiği şekilde düzenlendi:



Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikroplaka düzeni.

A + H sıraları:	Steril bidistile su
B:	Kültür besiyeri + hücre yok (blank, negatif kontrol)
GC:	Kültür besiyeri + hücre (hücre büyüme kontrolü)
SC:	Kültür besiyeri + hücre + distile su (çözücü kontrolü)
PC:	Kültür besiyeri + hücre + SDS (0,1 mg/mL) (pozitif kontrol)
A1, A2,……..	A6: Kültür besiyeri + hücre + Glifosat'ın 6 farklı konsantrasyonu
B1, B2, ...	B6: Kültür besiyeri + hücre + AMPA'nın 6 farklı konsantrasyonu

5. 1 ve 12. Sütunların B-G kuyucuklarına 100 µL besiyeri konuldu (blank, negatif kontrol).

6. B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 10 µL hücre kültürü besiyeri konuldu (hücre büyümesi kontrolü, GC).

7. E2, F2, G2, B11, C11 ve D11 kuyucuklarına 10 µL distile su çözeltisi konuldu (çözücü kontrolü, SC).

8. E11, F11 ve G11 kuyucuklarına 10 µL %0,1'lik SDS çözeltisi konuldu (pozitif kontrol, PC).

9. Bölüm 3.6.2'de belirtildiği üzere A1-A6 şeklinde yazılmış kuyucuklara seyreltmeleri yapılmış Glifosat standart çözeltilerinden, B1-B6 şeklinde yazılmış kuyucuklara seyreltmeleri yapılmış AMPA standart çözeltilerinden 10'ar µL tatbik edildi (6 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı). Her test 1 mikroplakada 24 saatlik maruziyet için hazırlandı. Aynı düzende 2. farklı bir günde çalışılmak üzere toplam her konsantrasyon için 6 tekrar yapıldı.

10. 96 kuyucuklu mikroplaka 37 ºC'de, %5 CO2'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

3.6.4. MTT Testi

MTT bileşiğinin tetrazolyum halkasının hücredeki (canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış) mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır (Alley ve ark., 1988; Mosmann, 1983). Canlı hücrede soluk sarı renkli MTT, enzim ile tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu koyu mavi-mor renkli çözünmeyen formazan ürününe dönüşür. Böylece canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Hücreler organik çözücü (örn. isopropanol, DMSO) ile çözündürüldükten sonra, oluşan formazan çözeltisine ait rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm'de (670 nm referans dalga boyuna karşı) ölçülür. MTT'nin redüksiyonu sadece metabolik olarak aktif olan hücrelerde meydana gelir ve bu aktivitenin seviyesi hücrelerin canlılıklarıyla ölçülür (Alley ve ark., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Mosmann, 1983; van Meerloo ve ark., 2011).

MTT Testi Protokolü

MTT çözeltisinin hazırlanışı: 5 mg MTT, 1 mL CMF-PBS (1x) içinde çözündürüldü. Çözelti +4 ºC'de karanlıkta saklandı.

Deney Protokolü

1. Bölüm 3.6.3'te anlatıldığı gibi Glifosat ve AMPA ile inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikroplakanın her kuyucuğuna 20 µL MTT çözeltisi eklendi.

2. 150 rpm'de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.

3. 37 °C'de %5 CO2'li inkübatörde 3 saat inkübe edildi.

4. Kuyucuklardaki üstteki sıvı atıldı ve kuyucuklara 100 µL %100'lük DMSO ilave edildi.

5. 150 rpm'de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.

6. Oluşan rengin şiddeti 590 nm'de (670 nm referans dalga boyuna karşı) mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

Sonuçların Değerlendirilmesi

1. Çözücü kontrol grubundan (SC) elde edilen absorbans değeri %100 canlılığı ifade eder. Örneklerde canlı hücre oranı, çözücü kontrol grubunun (SC) absorbans değeri ile kıyaslanarak % cinsinden hesaplandı.

2. Çözücü kontrollerinin (SC) 96 kuyucuklu mikroplakanın sağ ve sol kenarında bulunması sistematik hataların belirlenmesini sağlar. Testin anlamlı olabilmesi için, sağ ve sol taraftaki çözücü kontrollerin ortalamaları ile tüm çözücü kontrollerin ortalamaları arasında %15'ten fazla fark olmaması gerekir.

3. Hücre büyüme kontrolleri (GC) çözücünün etkisini belirlemeyi sağlar. Eğer çözücü kontrollerin değerleri hücre büyüme kontrolleri ile belirgin bir fark gösterirse, test bileşiklerinin inhibisyon değerleri dikkatle yorumlanmalı, mümkünse farklı bir çözücü seçilmelidir.

4. Testin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla her maruziyet mikroplakasına SDS çözeltisi (son konsatrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde) eklenerek pozitif kontrol grubu (PC) oluşturuldu. Çalışılan koşullarda, SDS çözeltisine (0,1 mg/mL) ait hücre ölümünün yaklaşık %50 olması gerekir (ISO-10993-5).

5. Her çözücü kontrol (SC) ve örnek absorbans değerlerinden, blank (B) değerlerine ait ortalama absorbans değeri çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edildi.

6. Düzeltilmiş çözücü kontrol (düzeltilmiş OD_{SC}) ve örnek (düzeltilmiş $OD_{Örnek}$)absorbans değerlerinin ortalaması alındı.

7. % Relatif inhibisyon (% hücre ölümü) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Formül 3-2):

$$\%\ \text{Relatif inhibisyon} = 100 - (\text{düzeltilmiş ort. } OD_{Örnek} \times 100 / \text{düzeltilmiş ort. } OD_{SC})$$

(Formül 3-2)

8. X ekseninde maruziyet konsantrasyonu, Y ekseninde % relatif inhibisyon (% hücre ölümü) olacak şekilde excel programı kullanılarak konsantrasyona karşı % inhibisyon (% hücre ölümü) eğrisi çizildi.

9. Eğriden %50 inhibisyona (hücre ölümüne) karşılık gelen konsantrasyon hesaplanarak çalışılan maddelerin IC50 (%50 oranında hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon) değeri belirlendi.

3.7. Glifosat ve AMPA'nın Hücre Dizilerine Maruziyeti

Her bir 25 cm^2'lik flaska 1×10^6 hücre 5 mL besiyeri içinde ekildi. CO_2'li inkübatörde 24 saat bekletildi. Flaskın içindeki besiyeri döküldü ve tekrar 5 mL taze besiyeri konuldu. Aşağıda belirtildiği şekilde Glifosat ve AMPA maruziyetleri gerçekleştirildi:

Kontrol grupları: 5 µL distile su, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

50 µM glifosat maruziyeti: 5 µL 50 mM glifosat çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

100 µM glifosat maruziyeti: 5 µL 100 mM glifosat çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

250 µM glifosat maruziyeti: 5 µL 250 mM glifosat çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

50 µM AMPA maruziyeti: 5 µL 50 mM AMPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

100 µM AMPA maruziyeti: 5 µL 100 mM AMPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

250 µM AMPA maruziyeti: 5 µL 250 mM AMPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

500 µM AMPA maruziyeti: 5 µL 500 mM AMPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

Bu şekilde Glifosat ve AMPA yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerine uygulandı ve 24 saat boyunca 37°C'lik %5 CO2'li inkübatörde inkübe edildi. Aynı ortam koşullarında kontrol grupları da oluşturuldu. Her bir maruziyet konsantrasyonu için 5'er adet flaska ekim yapıldı ve deneyler 2. farklı bir günde tekrar edildi. En son maruziyet süreleri tamamlandıktan sonra Glifosat ve AMPA'ya maruz bırakılan hücreler pasajlandı ve sayıldı. Besiyeri içindeki hücreler 4 ^oC'de 1000 x g'de 5

dk. santrifüj edildi, üstteki besiyeri atıldı ve hücreler PBS (1x) ile yıkanarak 4 ºC'de 1000 x g'de 5 dk. tekrar santrifüj edildi. Hücreler PBS (1x)'te süspande edildi ve DNA, RNA, ve histon proteinlerinin izolasyonunu yapabilmek amacıyla yaklaşık 1×10^6 sayıda hücre 200 µL PBS (1x) içinde olacak şekilde kısımlara ayrıldı.

3.8. DNA Metilasyonunun Analizi

3.8.1. DNA İzolasyonu

Hücre kültüründen genomik DNA izolasyonu 'High Pure PCR Template Preparation Kit' (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Bağlama tamponu: 6 M Guanidin HCl / 10 mM üre / 10 mM Tris HCl / %20 Triton-X 100 (v/v) (pH 4,4).

Proteinaz K: Liyofilize proteinaz K, 4,5 mL bidistile su ile çözündürüldü. -20ºC'de saklandı.

İnhibitör temizleme: 5 M Guanidin HCl / 20 mM Tris HCl / alkol (pH 6,6).

Yıkama tamponu: 2 mM Tris HCl / alkol (pH 7,5).

Elüsyon tamponu: 4 M üre / 200 mM Tris / 20 mM NaCl / 200 mM EDTA (pH 7,4).

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1. Bölüm 3.7'de belirtildiği üzere maruziyeti yapılan 1×10^6 hücre 200 µl PBS içinde süspande edildi.

2. Üzerine 200 µL bağlama tamponu, 40 µL proteinaz K eklendi. Hemen karıştırıldı ve 70 ºC'de 10 dk. inkübe edildi.

3. Üzerine 100 µL isoproponal eklendi ve iyice karıştırıldı

4. Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.

5. Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

6. Filtreli tüpe 500 µL inhibitör temizleme tamponu eklendi ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

7. Filtreli tüpe 500 µL yıkama tamponu eklendi ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

8. Yıkama tamponunun kalıntılarını temizlemek üzere bir kez daha 10 sn. santrifüj edildi.

9. Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp 1,5 mL'lik mikrotüp içine yerleştirildi.

10. Önceden 70 °C'ye getirilmiş elüsyon tamponundan 100 µL filtreli tüpe eklendi. 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.

11. Elde eldilen DNA'lar daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C'de buzdolabında saklandı.

3.8.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

50, 100, 250 µM konsantrasyonlarda glifosat ve 50, 100, 250, 500 µM konsantrasyonlarda AMPA maruziyeti sonrasında HepG2 hücrelerinden izole edilen DNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm'de ölçülen absorbans değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng ya da µg düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. 260 nm dalga boyunda okunan değer ile 280 nm ve 230 nm dalga boylarında ölçülen değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi verir. Saflaştırılmış DNA'da A260/A280 ve A260/A230 oranı yaklaşık 1,75- 1,8 üzerinde olmalıdır.

3.8.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini

5-metilsitozin (5-mC) içeriğinin tayini, global olarak DNA metilasyonundaki değişiklikleri tayin etmede hızlı ve kullanışlı bir parametredir (Christman, 1982; Fuke ve ark., 2004; Ramsahoye, 2002). Bu amaçla, DNA'da 5-mC'nin tayini 5-mC DNA Eliza kit (Zymo Research) ve 5-hmC'nin tayini de 5-hmC DNA Eliza kit ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

3.8.3.1. 5-mC'nin Eliza Kit ile Tayini

Kit İçeriği

5-mC Kaplama tamponu (15 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

5-mC Eliza tamponu (250 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

Anti-5-metilsitozin monoklonal antikoru (1 µg/µL, 30 µL): - 20°C'de saklanmalıdır.

Sekonder antikor (1 µg/µL, 30 µL): 4°C'de saklanmalıdır.

HRP geliştirici (15 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

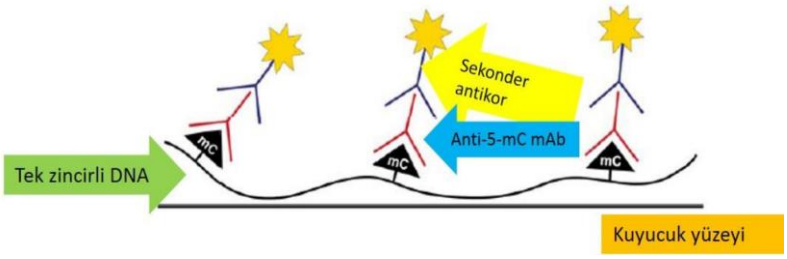
Negatif kontrol (100 ng/µL, 50 µL): - 20°C'de saklanmalıdır.

Pozitif kontrol (100 ng/µL, 50 µL): - 20°C'de saklanmalıdır.

96-kuyucuklu mikroplaka: Oda sıcaklığında saklanmalıdır.

Deneyin esası

5-mC DNA Eliza kitinin temeli dolaylı eliza tekniğidir. Denatüre, tek zincirli DNA örnekleri 5-mC kaplama tampon içinde mikroplaka kuyucuk yüzeylerine kaplanır. Anti-5mC monoklonal antikoru ve HRP bağlı sekonder antikor 5-mC Eliza tamponunda hazırlanır ve kuyucuklara eklenir. HRP geliştiricinin eklenmesi sonucu oluşan rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile 5-mC tayini gerçekleştirilir (Şekil 3-4) .



Şekil 3-4: 5-mC DNA ELISA kitinin esası.

Deney protokolü

Bölüm 3.8.1'de izole edilen ve Bölüm 3.8.2'de miktarı tespit edilen DNA örnekleri 100 ng konsantrasyonda olacak şekilde 100 µL 5-mC kaplama tampon içinde hazırlandı.

DNA örnekleri ile birlikte kit ile tedarik edilen negatif kontrol (100 ng/100 µL) ve pozitif kontrollerin (100 ng/100 µL) karışımıyla hazırlanan metilasyon standartları (% 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 oranında 5-mC) da parallel olarak çalışıldı. Blank olarak herhangi bir DNA örneği içermeyen 100 µL 5-mC kaplama tamponu kullanıldı.

DNA bağlama

1. Gerektiği kadar kuyucuk standart ve örnekler için mikroplakadan ayrıldı

2. 0,2 µL'lik PCR tüpüne 100 ng örnek DNA'ları ve negatif ve pozitif DNA'lar konuldu ve üzerine 100 µL 5-mC kaplama tamponu eklendi.

3. DNA'lar 98°C'de 5 dk. denatüre edildi ve denatürasyondan sonra hızlıca 10 dk. buzda bekletildi.

4. Denatüre edilmiş DNA'lar kit ile tedarik edilen mikroplaka kuyucuklarına eklendi ve üzeri mikroplaka filmi ile kapatıldı. Mikroplaka 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

Bloklama

5. Kuyucuklardaki tampon uzaklaştırıldı ve tüm kuyucuklar 200 µL 5-mC Eliza tamponu ile 3 kez yıkandı.

6. Kuyucuklara 200 µL 5-mC Eliza tamponu eklendi ve üzeri mikroplaka filmi ile kapatıldı. Mikroplaka 37°C'de 30 dk. inkübe edildi.

Antikor eklenmesi

7. Kuyucuklardaki tampon uzaklaştırıldı.

8. Antikor karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı (18 kuyucuk için):

5-mC Eliza tamponu	2000 µL
Anti-5-metilsitozin	1 µL
Sekonder antikor	2 µL

9. Kuyucuklara antikor karışımından 100 µL eklendi ve üzeri mikroplaka filmi ile kapatıldı. Mikroplaka 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

Renk gelişimi

10. Antikor karışımı kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve tüm kuyucuklar 200 µL 5- mC Eliza tamponu ile 3 kez yıkandı.

11. Kuyucuklara 100 µl HRP geliştirici eklendi. Mikroplaka oda sıcaklığında renk gelişimi için 20 dk. bekletildi.

12. Oluşan rengin şiddeti 405 nm'de mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

Sonuçların değerlendirilmesi

Metilasyon standardları (%0, %5, %10, %25, %50, %75, %100) ile hazırlanan ölçü eğrisi yardımıyla DNA örneklerindeki metilasyon oranı % olarak belirlendi.

3.9. Gen EkspresyonlarınınTayini

3.9.1. Total RNA İzolasyonu

Hücre kültüründen total RNA izolasyonu 'High Pure RNA Isolation Kit' (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Lizis/Bağlama tamponu: 4,5 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, %30 Triton X100 (ağırlık/hacim) (pH 6,6). 25°C'de saklandı.

DNaz I (rekombinant, liyofilize): 10 KU liyofilize DNaz I. Çözündürüldükten sonra porsyonlarak -20°C'de saklandı.

DNaz inkübasyon tamponu: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,0). 25°C'de saklandı.

Yıkama tamponu I: 5 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl (pH 6,6). 25°C'de saklandı.

Yıkama tamponu II: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl (pH 7,5). 25°C'de saklandı.

Elüsyon tamponu: PCR kalitede su.

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1.Bölüm 3.7'de belirtildiği üzere hazırlanan $1x10^6$ hücre 200 µL PBS içinde süspande edildi.

2.Üzerine 200 µL bağlama tamponu eklendi ve 15 sn. vorteks ile karıştırıldı.

3.Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.

4.Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g'de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

5.Steril bir mikrotüpte her bir örnek için 90 µL DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz I eklendi ve karıştırıldı.

6.100 µL DNaz I çözeltisi filtreli tüpün üst yüzeyine konuldu. 15-25°C'de 15 dk. inkübe edildi.

7.Filtreli tüpe 500 µL Yıkama tamponu I eklendi ve 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

8.Filtreli tüpe 500 µL Yıkama tamponu II eklendi ve 8000 g'de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

9.Filtreli tüpe 200 µL Yıkama tamponu II eklendi ve en yüksek devirde (yaklaşık 13000 g) 2 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı.

10. Filtreli tüp 1,5 mL'lik mikrotüp içine yerleştirildi.

11. Elüsyon tamponundan 50 µL filtreli tüpe eklendi. 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.

Elde edilen RNA'lar, cDNA sentezi için -80°C'de saklandı.

3.9.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

Bölüm 3.7'de belirtilen konsantrasyonlarda Glifosat ve AMPA maruziyeti sonrasında HepG2 hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikroplaka okuyucu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm'deki ölçümler RNA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. RNA'nın saflığının belirlenmesinde kullanılan A260/A280 oranı ise yaklaşık 1,95± 0,1 olmalıdır.

3.9.3. cDNA Sentezi

cDNA tek veya çift sarmallı olabilir ve mRNA kalıbından ters transkriptaz enzimi kullanılarak sentezlenir. Eğer yapılan deney çift sarmallı cDNA gerektiriyorsa, bir başka DNA sentez basamağı ile gerçekleştirilebilir.

Ölçüm sonucunda elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi için total 1000 ng olacak şekilde 'iScript™ cDNA Synthesis Kit' (Bio-Rad) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

İScript reaksiyon karışımı (5x): 400 µL

İScript ters transkriptaz reaksiyon tamponu: 100 µL

PCR kalitede su: 1,5 mL

Deney protokolü

1. Steril, nükleaz içermeyen, ince duvarlı PCR tüpü buz içine konuldu ve içerisinde kalıp primer karışımı hazırlandı:

Toplam RNA: 1000 ng

İScript reaksiyon karışımı (5X): 4µL

İScript ters transkriptaz reaksiyon tamponu: 1 µL

PCR kalitede su: Reaksiyonun toplam hacmi 20µL olacak şekilde sueklendi.

Tüp içindeki maddeler dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve spin santrifüj yapıldı. Vorteks yapılmamalıdır.

2. Daha sonra ters transkriptaz karışımı sırasıyla 25 °C'de 5 dk. ve 46°C'de 20 dk. boyunca inkübe edildi.

3. Ters transkriptaz 95°C'de 1 dk. inkübe edilerek inaktif hale getirildi.

4. Tüp buz üstüne alınarak reaksiyon durduruldu

5. cDNA saflaştırmaya gerek olmaksızın PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.9.4. Gen Ekspresyonunun Real-Time PCR ile Tayini

p53, BAX, BCL2, CASP3, CASP9, G9a, EZH2, SUV39H1, SETD8, SETD1B, HAT1, SIRT1, MGMT, DNMT1, RIZ1, ve *β-aktin* genlerinin ekspresyonları primer ve SYBR Green karışımı kullanılarak RT-PCR ile gerçekleştirildi.

Kullanılan malzemeler

'SYBR® Green PCR Master Mix' karışımı,

Gene özgün primerler (Tablo 3-1'de deneylerde kullanılan primer dizileri gösterilmiştir.)

PCR kalitede su.

Tablo 3-1: Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile tayininde kullanılan primer dizileri.

Gen adı	Primer dizisi (5'-3')	Sıcaklık (°C)	Kaynak
p53	F: AGAGTCTATAGGCCCACCCC R: GCTCGACGCTAGGATCTGAC	61	Ali ve ark. (2017)
BAX	F: ACCAAGAAGCTGAGC GAGTATC R: ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC	61	Ali ve ark. (2017)
BCL2	F: TGTGGCCCAGATAGGCACC R: ACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG	66	Ali ve ark. (2017)
CASP3	F: GCTATTGTAGGCGGTTGT R: TGTTTC CCTGAGGTTTGC	53	Ali ve ark. (2017)
CASP9	F:ACCAGAGATTCGCAAACCAG R:TCACCAAATCCTCCAGAACC	59	de Souza Prestes ve ark. (2019)
G9a	F: TACACCACTCATTGGGGATG R: GGGAAGAGGGGAATGACTTT	57	Huang ve ark. (2017)
EZH2	F: TAATGTGCTGGAATCAAAGG R: TGGCTTCATCTTTATTGGTG	53	Doherty ve ark. (2010)
SUV39H1	F: GGCAACATCTCCCACTTTGT R: CAATACGGACCCGCTTCTTA	57	Lai ve ark. (2015)
SETD8	F: CCATGGCTAGAGGCAGGAAG R: TTCCGGCTAATGGTTTCCCC	60	Zhang ve ark. (2016)
SETD1B	F: CTGGGTCTACCATCCCTCCA R: CTTCCGGAACTTGAGCTGGT	60	Chen ve ark. (2019)
HAT1	F: GGTGATTCGTCCTTCCTCA R: GCCAGTTTCTTCTCCACTGC	58	Mahalingaiah ve ark. (2015)
SIRT1	F: TAGCCTTGTCAGATAAGGAAGGA R: ACAGCTTCACAGTCAACTTTGT	58	Y.-Q. Wang ve ark. (2015)
DNMT1	F: CCTCCAAAAACCCAGCCAAC R: TCCAGGACCCTGGGGATTTC	60	Ahmadnejad ve ark. (2017)
DNMT3A	F: GGTCACGCAAAACAGAACCC R: CCTTGGTGAAACCCTTTGCG	60	Gu ve ark. (2017); Lai ve ark. (2008)
DNMT3B	F: CTCTTCCTCAGCTGTGTGGG R: CTGTCGGCACTGTGGTTTTG	60	Gu ve ark. (2017)
RIZ1	F: AACATGTGCTGCGAGGACTT R: TTCTTCCCTTTCCGGCTCTT	57	Sasaki ve ark. (2002)
β -aktin	F: AACTACCTTCAACTCCAT R: TGATCTTGATCTTCATTGTG	48	Rosa ve ark. (2011)

Deney Protokolü

Aşağıdaki gösterildiği gibi uygun miktarlarda bileşenler ilave edilerek RT-PCR karışımı hazırlandı ve dikkatlice pipetleme yapıldı:

'SYBR® Green PCR Master Mix' karışımı:	10 µL
10 µM forward primer:	1 µL
PCR kalitede su:	3 µL
Toplam hacim:	15 µL

1. Hazırlanan PCR karışımından 15 µL mikroplakanın her kuyucuğuna ilave edildi.

2. cDNA örnekleri steril su ile 1:5 oranında seyreltildi.

3. Hazırlanan cDNA örneklerinden 5 µL her bir kuyucuğa eklendi ve mikroplakanın üzeri mikroplaka filmi ile kapatıldı.

4. Mikroplaka 1500 x g'de 2 dk. santrifüj edildi.

6. Mikroplaka LightCycler 480 RT-PCR cihazına konularak ölçüm yapıldı. RT-PCR protokolü Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: RT-PCR protokolü.

Program adı	Siklus	Sıcaklık ^{o}C	Süre
Polimeraz aktivasyonu	1	95	2 dk.
Denatürasyon	40	95	5 sn.
Primerlerin hedef DNA' ya bağlanması	40	48-66	10 sn.
Uzama	40	72	5-20 sn.
Uzama	1	72	1 dk

Sonuçların değerlendirilmesi

Tablo 3-2'de primer dizileri verilen genler ve referans gen olarak kullanılan β–aktin için spesifik RT-PCR kantitatif Ct değerleri belirlendi. Genlerin relatif ekspresyonu kontrol grubuna göre karşılaştırmalı Ct yöntemi ile değerlendirildi.

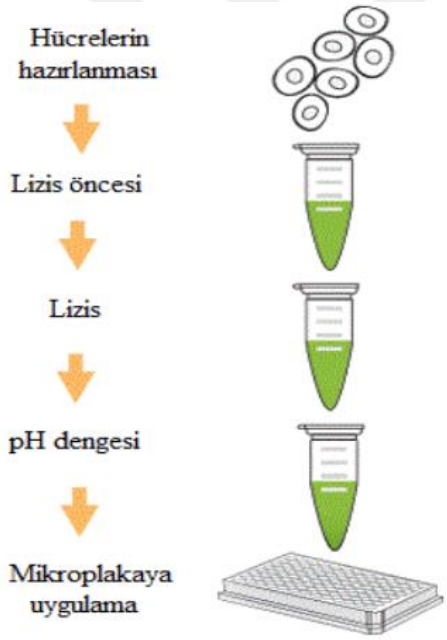
3.10. Histon Proteinlerin Western Blot Yöntemi ile Tayini

3.10.1. Histon Proteinlerinin İzolasyonu

Hücreden histon proteinlerinin izolasyonu EpiQuickTM toplam histon ekstraksiyon kiti (Epigentek) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi (Şekil 3-5).

Kit içeriği

10x ön-lizis çözeltisi	10 mL
Lizis çözeltisi	20 mL
Balans tamponu	8 mL
DTT çözeltisi	20 µL



Şekil 3-5: Histon proteinlerinin izolasyon basamakları

Deney protokolü

1. Bölüm 3.7'da belirtildiği üzere hazırlanan 1×10^6 hücre 200 µL PBS (1x) içinde süspande edildi.

2. PBS (1x) ile yıkanan hücreler 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücreler 4 oC'de 1000 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldı.

3. 10x ön-lizis çözeltisi, distile su ile 1: 10 oranında seyreltilerek 1X ön-lizis çözeltisi hazırlandı (1 mL 10x ön-lizis çözeltisi + 9 mL su şeklinde).

4. Hücre pelletine 200 µL 1x ön-liziz çözeltisi eklendi ve süspande edildi ve 10 dk. buz içinde nazikçe karıştırılarak lizis edildi.

5. Lizatlar 4 ºC' de 10000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı.

6. Hücre pelletine 200 µL lizis çözeltisi eklendi ve tekrar süspande edildi ve 30 dk. buz içinde inkübe edildi

7. Hücre süspansiyonu 4 ºC'de 12000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üstteki sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.

8. Balans tamponuna 1: 500 oranında DTT çözeltisi eklenerek balans-DTT tamponu hazırlandı (1 µL DTT çözeltisi + 500 µL balans tamponu şeklinde).

9. Üstteki sıvıya 60 µL (0,3 hacimde) balans-DTT tamponu eklendi.

10. Böylece histon proteinlerinin izolasyonu gerçekleştirildi ve protein konsantrasyonu ölçülmek üzere hazır hale getirildi.

11. Elde edilen histon proteinleri daha sonraki kullanımlar için 500 µL'lik tüplere bölündü ve -80 ºC'de saklandı.

3.10.2. Proteinlerin Miktar Tayini

İzole edilen histon proteinleri ekstrelerinde protein miktarları Bio-Rad protein tayini II kiti ile Bradford prensibine göre ölçüldü (Bradford, 1976).

Yöntemin esası

Bio-Rad protein tayini, Bradford prensibine dayanır, basit ve doğrusallığı yüksek bir yöntem olup çözünmüş proteinlerin konsantrasyonlarını tayin eder. Asidik 'coomassie® brilliant blue G-250 boyasının, eklendiği protein çözeltisinde özellikle arginin olmak üzere, esas olarak basit ve aromatik aminoasit rezidülerine bağlanması sonucu oluşan rengin şiddeti 465-595 nm'de mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır.

Kit içeriği

Protein tayini boya reaktifi konsantresi: 450 mL boya

Sığır serum proteini (BSA, standart): BSA standardı kit protokolüne uygun olarak 1,41 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 20 mL bidistile suda çözüldü.

BSA ana stok çözeltisi 500 µL'lik tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı.

Protein standart çözeltileri

BSA ana stok çözeltisinden konsantrasyonları 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 µg/mL olacak şekilde BSA standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler protein tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı. Standartlar 3'er kere tekrarlı çalışıldı.

Deney protokolü

1. 1 hacim konsantre boya reaktifi, 4 hacim distile su ile seyreltildi.

2. 10'ar µL standart çözeltiler ve protein örneklerinden 96 kuyucuklumikroplaka kuyucuklarına uygun konfigürasyonda konuldu.

3. Her kuyucuğa seyreltilmiş boya reaktifinden 200 µL eklendi.

4. Oda sıcaklığında en az 5 dk. inkübe edildi. Zaman geçtikçe absorbans artacağından dolayı örnekler 1 saatten fazla oda ısısında bekletilmemelidir.

5. Oluşan rengin şiddeti 595 nm'de mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

Protein miktarının hesaplanması

Ölçülen her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine göre hesaplandı. Protein ve histon proteinleri için ekstrelerdeki proteinmiktarı ng/µL olarak hesaplandı.

3.10.3. Histon Modifikasyonlarının Western Blot Tekniği ile Tayini

İzole edilen histon proteinlerinde histon H3K9me3, H3K9ac ve H3K27me3 tayinleri western blot tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

Deneyin esası

Jelde ayırımı yapılmış proteinlerin membrana emdirilerek ilgilenilen proteinin işaretlenmiş spesifik antikor yardımıyla membrane üzerinde yarı kantitatif ya da kantitatif olarak belirlenmesidir.

Çözeltilerin hazırlanışı

%0,1'lik Tuzlu ve Tween 20'li Tris tamponu (TBST) çözeltisinin hazırlanışı:

7,88 g Tris hidroklorür (son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde) tartıldı ve üzerine 800 mL deiyonize su eklendi ve pH:7,5 olacak şekilde 1 M NaOH ile ayarlandı. Üzerine 8,766 g NaCI (son konsantrasyonu 150 mM olacak şekilde) ve 1 mL Tween 20 (%0,1) eklendi ve 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

%2,5'lik BSA çözeltisinin hazılanışı: 2,5 g BSA 100 mL %0,1'lik TBST çözeltisinde hazırlandı.

%1'lik BSA çözeltisinin hazılanışı: 1 g BSA 100 mL %0,1'lik TBST çözeltisinde hazırlandı.

%10'luk APS çözeltisi: 1 g APS, 10 mL deiyonize suda çözülerek hazırlandı. 500 µL'lik tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı.

%10'luk SDS çözeltisi: 1 g SDS, 10 mL deiyonize suda çözülerek hazırlandı.

5x yürütme tamponu: 15 g tris (son konsantrasyonu 0,025 M olacak şekilde), 72 g glisin (son konsantrasyonu 0,192 M olacak şekilde) tartıldı ve üzerine 800 mL deiyonize su eklendi. Çözündürüldükten sonra 5 g SDS eklenerek ve pH 8,3 olacak şekilde ile ayarlandı. 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

Deney esnasında kullanılmak üzere 1: 5 oranında deiyonize su ile seyreltilerek 1x yürütme tamponu hazırlandı

10x aktarım tamponu: 60 g tris, 144 g glisin tartıldı ve üzerine 800 mL deiyonize su eklendi. Çözündürüldükten sonra pH 8,3 olacak şekilde ile ayarlandı. 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

Hazırlanan aktarım tamponu deney esnasında kullanılmak üzere 1: 10 oranında deiyonize su ile 1x'e seyretildi. 100 mL 1x aktarım tamponuna, 200 mL HPLC kalitede metanol eklenerek deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Yükleme solüsyonu: 495 µL örnek indirgeyici ajana (Laemmli, 2x) 5 µL 2-merkaptoetanol eklenerek hazırlandı.

Primer antikor çözeltileri: Primer antikorlar her bir antikor için uygun seyreltme oranlarında (H3, 1: 1000; H3K27me3, 1: 1000; H3K9me3, 1: 500; H3K9ac,

1: 5000) (Örn: 1: 1000 seyreltme oranı için 5 µL antikor üzerine 5 mL %2,5'luk BSA çözeltisi) %2,5'luk BSA çözeltisi ile seyreltildi.

Sekonder antikor çözeltileri: Sekonder antikor 1: 5000 oranında (Örn: 1 µL antikor üzerine 5 mL %2,5'luk BSA çözeltisi) %0,1'lik BSA çözeltisi ile seyreltildi.

%12'lik SDS poliakrilamit jelin hazırlanışı

%12'lik 'resolving' jel (alt kısım):

Su:	4,309 mL
%40 Akrilamid/Bis çözeltisi (37,5: 1):	2,997 mL
'Resolving' tamponu (pH 8,8):	2 mL
%10 SDS:	80 µL
%10 APS:	80 µL
TEMED:	8 µL

%4'lük 'stacking' jel (üst kısım):

Su:	2,9 mL
%40 Akrilamid/Bis çözeltisi (37,5: 1):	0,75 mL
'Stacking' tamponu (pH 6,8):	1,25 mL
%10 SDS:	50 µL
%10 APS:	50 µL
TEMED:	7 µL

Deney Protokolü

1. Bölüm 3.10.1'de izole edilen histon proteinlerinin konsantrasyonu 2 µg olacak şekilde hesaplandı ve ince duvarlı PCR tüpüne aktarıldı.

2. Çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi.

3. Protein örneklerine 10 µL yükleme solüsyonu ilave edildi ve son hacim 35 µL olacak şekilde deiyonize su eklendi.

4. Protein örneklerine vorteks ve daha sonra spin yapıldı.

5. Örnekler blok ısıtıcıda 95 °C'de 5 dk. denatüre edildi.

6. Örnekler buz üzerine konuldu ve spin yapıldı.

7. %12'lik manuel olarak hazırlanan SDS poliakrilamit jel, dikey elektroforez tankına yerleştirildi. Tank hazırlanan 1x yürütme tamponu ile doldurulduldu.

8. Birinci kuyucuğa 7 µL protein standartı ve diğer kuyucuklara da 35'er µL protein karışımı yüklendi ve proteinlerin zarar görmemesi için tankın etrafı buzla

kaplandı. 300 mA sabit olacak şekilde 30 dk. 70 V; 45 dk. 100 V; 45 dk. 125 V kademeli yükseltilerek yürütüldü.

9. Jelde yürütülmüş proteinler, ıslak aktarım yöntemiyle 0,2 µm PVDF membranla sandviç modelinde kaset içinde hazırlanarak tanka yerleştirildi. Tank aktarım tamponuyla doldurularak 100 V 80 mA 720 dk. süre ile aktarım gerçekleştirildi. Aktarım işlemi 4 °C'de yapıldı.

10. Bloklama için membran küçük kap içerisinde 5 mL %2,5'luk BSA çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi ve %2,5'luk BSA çözeltisi döküldü.

11. 5 mL primer antikor içeren çözelti, içerisinde membran bulunan kaba konuldu ve 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Primer antikor içeren çözelti atıldı.

12. Membran art arda 2 kez 5 dk. ve 2 kez 10 dk. olmak üzere %0,1'lik TBST çözeltisi ile yıkandı.

13. 5 mL sekonder antikor içeren çözelti, içerisinde membran bulunan kaba konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda cihazında inkübe edildi. Sekonder antikor içeren çözelti atıldı.

14. Membran art arda 2 kez 5 dk. ve 2 kez 10 dk. olmak üzere %0,1'lik TBST çözeltisi ile yıkandı.

15. Membranlar asetat kağıtları arasına koyularak western blot görüntüleme (luminol) çözeltisi eklendi, 5 dk. bekletildi ve görüntüleme cihazında 5 dk. Sonrasında görüntüleme yapıldı.

16. Elde edilen bantlar, referans olarak kullanılan H3 histon proteinine göre kıyaslama yapılarak değerlendirilmiştir.

3.11. Annexin V-FITC/PI Testi ile Apoptoz Tayini

Annexin V-FITC/PI Testinin Esası

Normal şartlarda, negatif yüklü fosfatidilserin hücre membranının iç kısmında sınırlanmış durumda bulunmaktadır. Hücre apoptoza girdiğinde ise, fosfatidilserin birimleri hücre membranının dış yüzeyine doğru yer değiştirmektedir (Güleş ve Eren, 2008). Anneksin V, hücre membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserine bağlanma kabiliyeti olan bir proteindir, bu yüzden, fluoresein isotiyosiyanat (FITC) gibi floresan özellik gösteren bir molekül ile işaretlendiğinde, flow sitometri cihazı ile

apoptotik hücre yoğunluğu ölçülebilmektedir. Nekroza uğrayan hücrelerin membranlarında da Anneksin V-FITC bağlanması meydana gelebileceği için ikinci bir boya olarak vital olmayan bir boya olan propidyum iyodür (PI) eklenmektedir. Hücreler, anneksin V-FITC (yeşil floresans) ve PI (kırmızı floresans) ile eş zamanlı boyandığı zaman canlı hücreler (FITC–PI–), erken apoptoza giden hücreler (FITC+PI–), geç apoptoza giden hücreler (FITC+PI+) ve nekrotik hücrelerin (FITC–PI+) birbirinden ayırt edilmesi mümkün olabilmektedir (Güleş ve Eren, 2008; Overbeeke ve ark., 1998).

Annexin V-FITC/PI Testi Protokolü

Kit içeriği

Anneksin V-FITC	0,5 mL
PI	1 mL
Bağlayıcı tampon (10X)	30 mL

Deney Protokolü

1. HepG2 hücreleri, 2.5x10³/100 µL/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu mikroplakalara dağıtıldı ve 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 1 mL PBS (1x) ile yıkandı. Her kuyuya taze besiyeri eklenerek 'Unstained', 'PI' ve 'Anneksin' boyaları için hazırlanmış kontrol hücre kuyuları hariç son konsantrasyonlar 50, 100, 250 µM olacak şekilde glifosat ve 50, 100, 250, ve 500 µM olacak şekilde AMPA eklendi ve 24 saat inkübe edildi.

3. 24 saatlik maruziyetin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve her kuyu 1 mL PBS (1x) ile 2 defa yıkandı. Ardından, her kuyuya 0,5 mL %1'lik tripsin eklenerek hücreler tripsinize edildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüje alındı.

4. Elde edilen hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildikten sonra sonra hücre pelleti, 1 kez, 1 mL PBS (1x) ile yıkandı.

5. Elde edilen hücre pelleti 2 defa 200 µL soğuk hücre bağlayıcı tampon (Cell Staining Buffer) ile yıkanarak 1200 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edildi. Her yıkamadan sonra süpernatant atıldı.

6. Yıkamaların ardından elde edilen pellet üzerine 100 µL Anneksin V Binding Buffer eklendikten sonra hücreler süspande edildi.

7. ‘Unstained’ kontrol hücreleri hariç her maruizyet hücrelerine 5 µL FITC Anneksin V ve 10 µL PI boyaları eklendi. Anneksin V boyası için hazırladığımız hücrelere sadece Anneksin V, diğerine de sadece PI boyası eklendi.

8. Boya eklenen hücreler yavaşça yaklaşık 5 sn. vortekslendikten sonra 15 dk. süre ile karanlık ortam ve oda sıcaklığında bekletildi.

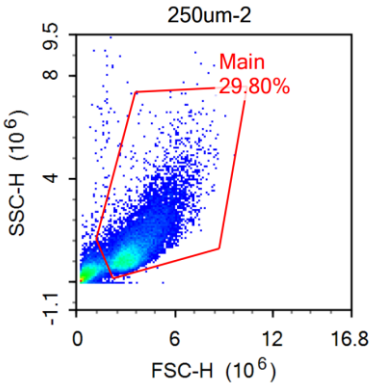
9. 15 dk. sonrasında her hücreye 200 µL ‘Anneksin V Binding Buffer’ eklendi.

10. Hücrelerin floresans yoğunluğu flow sitometride (ACEA NovoCyte) Annexin VFITC için Ex/Em: 494⁄518 nm, PI için Ex/Em: 535⁄617 nm dalga boyunda ölçüldü.

Deneyler, her konsantrasyon için en az 3 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı.

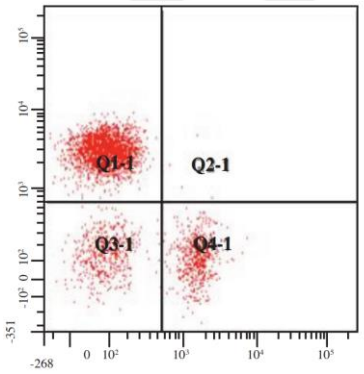
Sonuçların Değerlendirilmesi

Flow sitometri, akan bir sistem içinde floresan yoğunluğuna bağlı olarak hücre veya parçacık popülasyonunun fiziksel ve kimyasal özelliklerini tespit etmek ve ölçmek için kullanılan,süspansiyon şeklindeki hücrelerin incelendiği bir tekniktir (Kanev ve Muranlı, 2016). Bilgisayar Programı (NovoExpress Software) ile gerçekleştirilen veri analizi sonucu, hücreler FSC/SSC grafiğinde belirli bir alana düşmektedir. Bu grafik sayesinde, hücrelerde yer alan farklı popülasyonlar hücre büyüklüğüne ve granülaritesine ayırt edilebilmektedir. FSC/SSC grafiği üzerinde inceleme yapılacak hücreler bir çerçeve ile sınırlandırılır ve bu işleme‘kapılama’ veya ‘kapı alma’ (gating) denilmektedir (Mutlu ve Gültekin, 2016). Kapılama yapılan alan ‘Main’ olarak gösterilmektedir (Şekil 3-6)



Şekil 3-6: FSC/SSC grafiğinde hücre kapılanmasının gösterimi

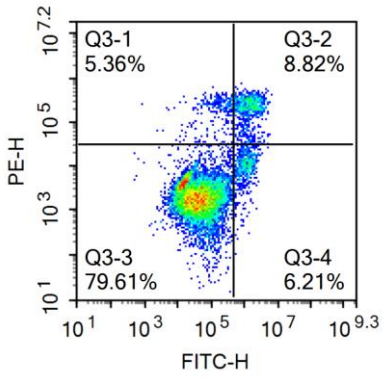
Verileri analiz etmek için, kapılanmış hücre alanı üzerinden analize devam edilmektedir (Mutlu ve Gültekin, 2016). Veriler birkaç farklı çizim türüyle görüntülenebilmektdir. Bunlar; histogramlardan nokta grafikleri, kontur ve yoğunluk grafikleri gibi 2 boyutlu grafiklere ve tomogram grafiği gibi 3 boyutlu grafiklere kadar uzanır (Adan ve ark., 2017). Grafikte, X ekseni, araştırılan parametrenin floresans yoğunluğunu gösterirken, Y ekseni ise belli bir sinyal yoğunluğundaki hücre sayısı göstermektedir (Mutlu ve Gültekin, 2016). M2 kapısı, hücre popülasyonunda analiz edilmek istenen tek bir parametreye ait hücre popülasyonunun yüzdesini ifade etmektedir. Bu yüzden, en sık tercih edilen grafik türü nokta alan grafiğidir (Şekil 3-7). Nokta grafiği iki parametreli bir veri gösterimi sağlar ve her nokta bir veya daha fazla olayı (parçacığı) temsil ederken yoğunluk grafiği bir frekans dağılımı olarak iki parametreyi gösterir (Adan ve ark., 2017). Nokta alan grafiğinde, iki farklı floresan antikoru taşıyan hücreler; her iki floresan antikoruna da bağlandıysa, grafiğin sağ üst kadranında; tek bir floresan antikoruna bağlandıysa, grafiğin sağ alt ve sol üst kadranında; her iki floresan antikorunu da bağlanmadıysa, grafiğin sol alt kadranında görüntülenmektedir (Taneli, 2007).



Şekil 3-7: Nokta alan grafiği (Mutlu ve Gültekin, 2016).

Apoptotik hücrelerin tayininde, grafiğin 4 bölgesine düşen hücrelerin her biri farklı özellikteki hücreleri göstermektedir (Şekil 3-7). Hücrelerin, aynı anda, Anneksin V-FITC ve PI ile boyanması canlı ve ölü hücrelerin ayrımını sağlamaktadır. Tez çalışmasında, Annexin V-FITC için Ex/Em: 494⁄518 nm, PI için Ex/Em: 535⁄617 nm kullanıldı. Analiz sonucunda, canlı hücreler $FITC^{-}$ PI^{-} (1.bölge), erken apoptotik hücreler FITC+ PI^{-} (2. bölge), geç apoptotik hücreler FITC+ PI+ (3. bölge), nekrotik hücreler ise $FITC^{-}$ PI+ (4. bölge) şeklindetespit edildi. Her bir analiz için, 'Main' kapısı

10^4 hücre olacak şekilde değerlendirildi. Başka bir ifade ile, her örnekte 'Main' kapısı içerisinde 10^4 hücre okutuldu (Şekil 3-8).



Şekil 3-8: Flowsitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi.

3.12. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler "ortalama ± standart sapma" olarak verildi. Verilerin istatistiksel olarak "SPSS 21.0 for Windows" paket programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm parametreler için öncelikle normalite testi ve varyansların homojenliği testi uygulandıktan sonra, normal dağılım gösteren veriler için 'Tek Yönlü Varyans' (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi) analizi ile çoklu karşılaştırma uygulandı. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksisite Sonuçları

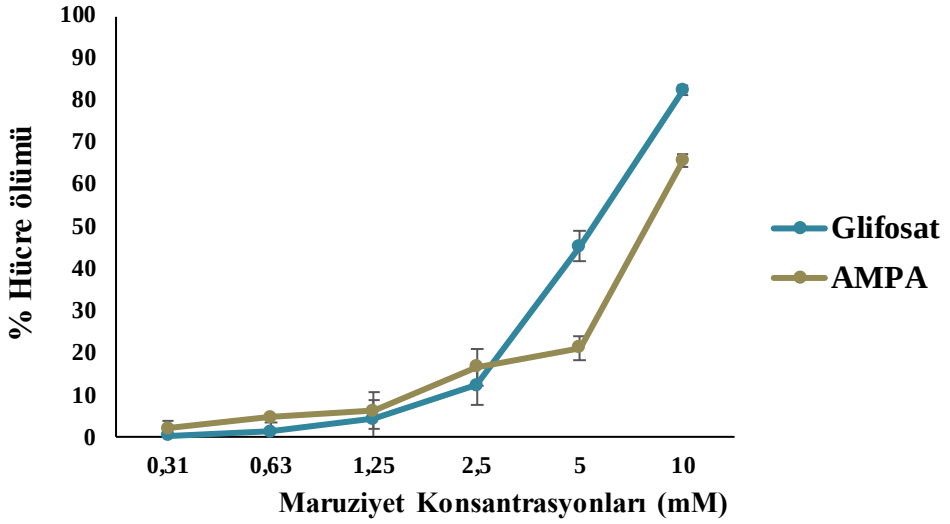
Glifosat ve AMPA'nın HepG2 hücrelerindeki sitotoksik etkisi, hücre canlılığının kantitatif ölçümüne dayanan MTT testi ile yapıldı. Glifosatın HepG2 Hücrelerinde Toksik Etkilerinin Araştırılması başlıklı Yüksek Lisans tez çalışmasında MTT testi ile HepG2 hücrelerine glifosat 5 mM'a kadar çeşitli konsantrasyonlarda uygulanmış ve uygulanan konsantrasyonlarda hücre ölümü gözlenmemiş ve IC_{50} değeri tespit edilememişti. Doktora tez çalışmasında ise daha yüksek konsantrasyonda çalışılarak HepG2 hücrelerinde IC_{50} değeri belirlendi. Hücreler, MTT testi için farklı günlerde iki defa tekrarlanan, 0,31-10 mM arasında altı farklı konsantrasyonda glifosat ve AMPA'ya üçer tekrarla maruz bırakıldı.

HepG2 hücrelerinde gerçekleştirilen MTT testi sonucunda 0,31 ila 10 mM konsantrasyon aralığındaki glifosat ve AMPA maruziyetinden elde edilen % hücre ölümü ve standart sapma sonuçları Tablo 4-1 ve Şekil 4-1'de gösterilmiştir. HepG2 hücrelerinde MTT sonucuna göre IC_{50} değeri glifosat için 6,19 mM; AMPA için ise 8,13 mM olarak belirlendi.

Tablo 4-1: MTT testi ile 24 saat 0,31-10 mM konsantrasyonlarda glifosat ve 0,31-10 mM konsantrasyonlarda AMPA maruziyeti gerçekleştirilen HepG2 hücre dizisinde % ölüm ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları	Glifosat	AMPA
	% Ölüm ± SD	% Ölüm ± SD
0,31 mM	0,35±3,62	2,21±0,13
0,63 mM	1,32±2,07	4,73±0,16
1,25 mM	4,36±4,54	6,28±4,35
2,5 mM	12,32±4,53	16,66±4,33
5 mM	45,35±3,58	21,26±2,81
10 mM	82,36±1,09	65,66±1,63

SD: Standart sapma ('standard deviation').



Şekil 4-1: 24 saat 0,31-10 mM konsantrasyonlarda glifosat ve AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinde MTT test sonuçları.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Sitotoksisite sonuçları ve daha önce tarafımızdan (Mehtiyev ve ark., 2023) gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde glifosat ve AMPA'nın HepG2 hücrelerine maruziyet konsantrasyonları sırasıyla 50-250 µM ve 50-500 µM olarak belirlendi.

4.2. Glifosat ve AMPA Maruziyeti Sonrası HepG2 Hücre Dizisinden İzole Edilen DNA ve RNA'ların Miktarları ve Saflıkları

HepG2 hücreleri 24 saat 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA'ya maruz bırakıldı. Daha sonra izole edilen DNA ve RNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü. HepG2 hücrelerine ait DNA ve RNA'ların miktarı ve saflığı glifosat için Tablo 4-2'de, AMPA için Tablo 4-3'te gösterilmiştir. İzole edilen DNA ve RNA'ların A260/A280 ve A260/A230 oranlarında saflıklarının iyi olduğu görüldü ve DNA ve RNA örnekleri ileri analizler için kullanıldı.

Tablo 4-2: 0-250 µM konsantrasyonlarda 24 saat glifosata maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları.

Maruziyet konsantrasyonları		RNA Örnekleri		DNA Örnekleri		
		A260/A280	Miktarı (ng/µL)	A260/A280	A260/A230	Miktarı (ng/µL)
Glifosat Kontrol	0 µM	2,031	128,524	1,816	1,819	119,34
	0 µM	2,012	201,326	1,95	1,918	182,103
	0 µM	1,998	213,236	1,972	1,801	281,224
	0 µM	2,05	169,265			
	0 µM	2,057	178,265			
Glifosat	50 µM	1,98	203,232	1,977	2,066	127,683
	50 µM	2,013	235,326	1,89	1,871	198,717
	50 µM	2,014	196,326	1,936	1,844	92,296
	50 µM	1,997	168,326			
	50 µM	2,032	186,983			
	100 µM	2,033	165,235	1,924	1,895	204,987
	100 µM	2,041	219,326	1,925	1,981	187,332
	100 µM	1,996	201,236	1,953	2,002	167,946
	100 µM	2,023	205,326			
	100 µM	2,019	197,364			
	250 µM	2,046	186,469	1,95	1,908	119,795
	250 µM	1,985	179,548	1,851	1,889	166,379
	250 µM	2,054	202,364	1,889	1,877	177,922
	250 µM	2,021	200,156			
	250 µM	2,025	196,665			

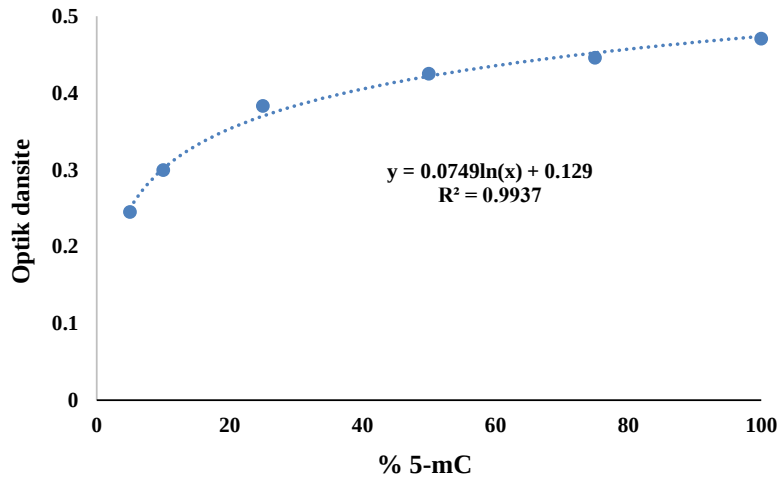
Tablo 4-3: 0-500 µM konsantrasyonlarda 24 saat AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları.

Maruziyet konsantrasyonları		RNA Örnekleri		DNA Örnekleri		
		A260/A280	Miktarı (ng/µL)	A260/A280	A260/A230	Miktarı (ng/µL)
AMPA Kontrol	0 µM	2,056	431,059	1,816	1,819	119,34
	0 µM	2,05	414,435	1,95	1,918	182,103
	0 µM	2,027	324,651	1,972	1,801	281,224
	0 µM	1,995	362,242			
	0 µM	2,069	309,815			
AMPA 24 saat	50 µM	2,049	361,531	1,967	1,836	194,888
	50 µM	2,051	341,193	1,911	1,910	286,973
	50 µM	2,057	397,104	1,903	1,834	187,295
	50 µM	2,048	310,074			
	100 µM	2,053	419,258	1,953	1,800	148,794
	100 µM	2,044	376,304	1,95	1,920	130,159
	100 µM	2,038	401,068	1,897	1,868	229,451
	100 µM	2,043	339,737			
	100 µM	2,038	291,253			
	250 µM	2,039	402,027	1,929	1,904	265,15
	250 µM	2,042	400,736	1,888	1,906	168,1
	250 µM	2,064	363,913	1,949	2,055	115,393
	250 µM	2,056	300,342			
	250 µM	2,046	403,688			
	500 µM	2,054	337,87	1,928	1,894	422,588
	500 µM	2,053	368,202	1,927	1,817	212,012
	500 µM	2,049	430,858	1,931	1,872	153,004
	500 µM	2,035	316,79			
	500 µM	2,036	348,042			

4.3. DNA Metilasyonu Sonuçları

4.3.1. Global DNA Metilasyonu Sonuçları

Global 5-mC içeriği, 5-mC Eliza kiti kullanılarak nicel olarak belirlendi. Bölüm 3.8.3.1'de açıklandığı şekilde elde edilen standartlarla oluşturulan standart eğri üzerinden %5-mC miktarı hesaplandı (Şekil 4-2).



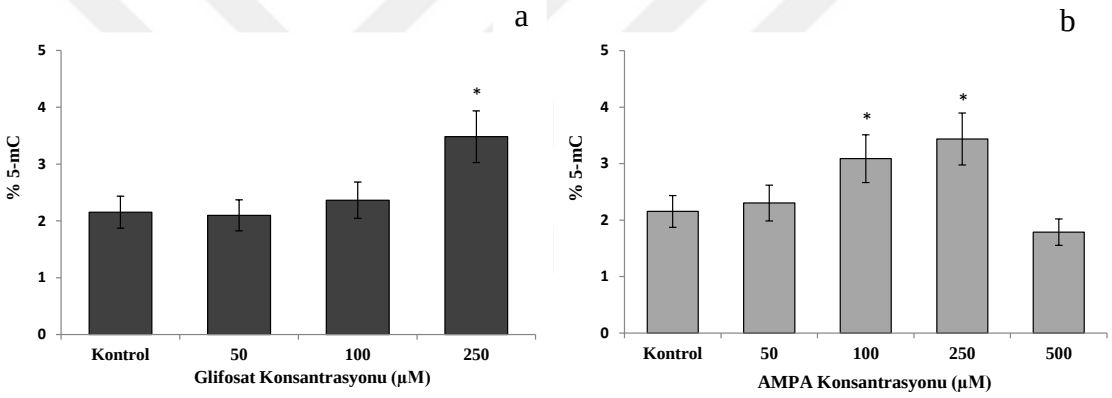
Şekil 4-2: 5-mC standartlarına ait kalibrasyon eğrisi

HepG2 hücreleri, 24 saat boyunca 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda glifosat ve 50, 100, 250, 500 µM konsantrasyonlarda AMPA'ya maruz bırakıldı. %5-mC seviyeleri, Tablo 4-4'te detaylı olarak gösterilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 250 µM glifosat maruziyeti olan hücrelerde %5-mC seviyelerinde %62 artış ($p<0,05$) gözlemlenirken, 100 µM ve 250 µM AMPA maruziyeti olan hücrelerde sırasıyla %43 ($p<0,05$) ve %60 ($p<0,05$) artış tespit edilmiştir (Şekil 4-3 a,b).

Tablo 4-4: 24 saat 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinde relatif %5-mC ve standart sapma değerleri.

Glifosat		AMPA	
Maruziyet konsantrasyonları	**%5-mC ± SD**	**Maruziyet konsantrasyonları**	**%5-mC ± SD**
Kontrol	2,15±0,28	Kontrol	2,15±0,28
50 µM	2,09±0,27	50 µM	2,30±0,32
100 µM	2,36±0,32	100 µM	3,08±0,42*
250 µM	3,48±0,45*	250 µM	3,44±0,46*
		500 µM	1,78±0,23

SD: Standart sapma ('standard deviation').Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=3). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *p<0,05; ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



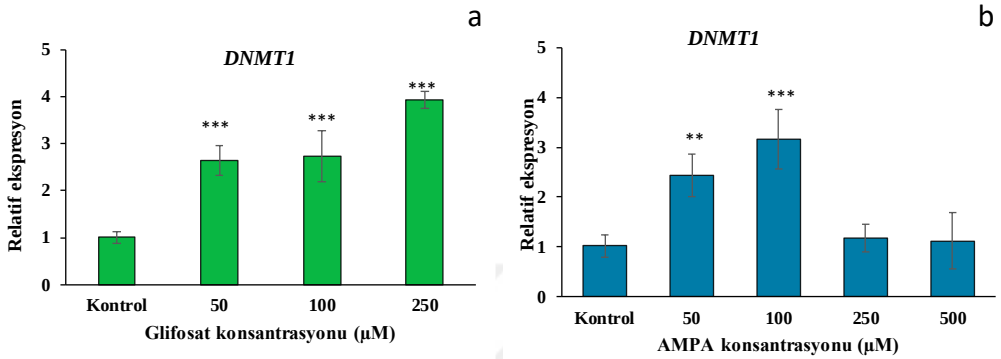
Şekil 4-3: 24 saat 0-250 µM glifosat (a) ve 0-500 µM AMPA (b)'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinde % 5-mC seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,05 (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.3.2. Global DNA Metilasyonunda Rol Oynayan Genlerin Ekpsreyonunda Değişiklikler

Tez çalışmasında 24 saat glifosat ve AMPA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde DNA metiltransferazlar (*DNMT1, DNMT3A, DNMT3B*)'ın gen ekspresyonları real-time PCR ile analiz edildi. *DNMT1*, *DNMT3A,* ve *DNMT3B* genlerinde glifosat ve AMPA maruziyet gruplarında kontrole kıyasla anlamlı değişiklikler gözlendi.

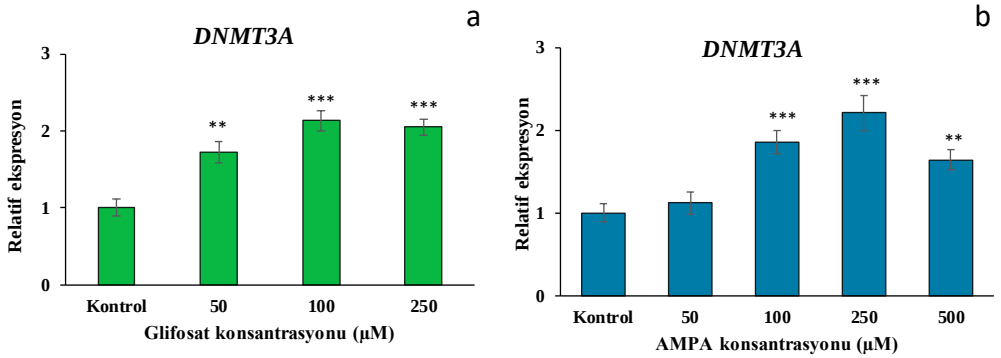
***DNMT1 geni*:** 50 µM, 100 µM ve 250 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 2,64 ($p<0,001$), 2,73 ($p<0,001$) ve 3,93 ($p<0,001$) kat anlamlı artış; AMPA'da 250 ve 500 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,19 ve 1,12 kat anlamlı olmayan artış, 50 ve 100 µM maruziyet konsantrasyonlarında ise sırasıyla 2,44 ($p<0,01$) ve 3,16 ($p<0,001$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-4 a, b).



Şekil 4-4: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde DNMT1 geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,01$;
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

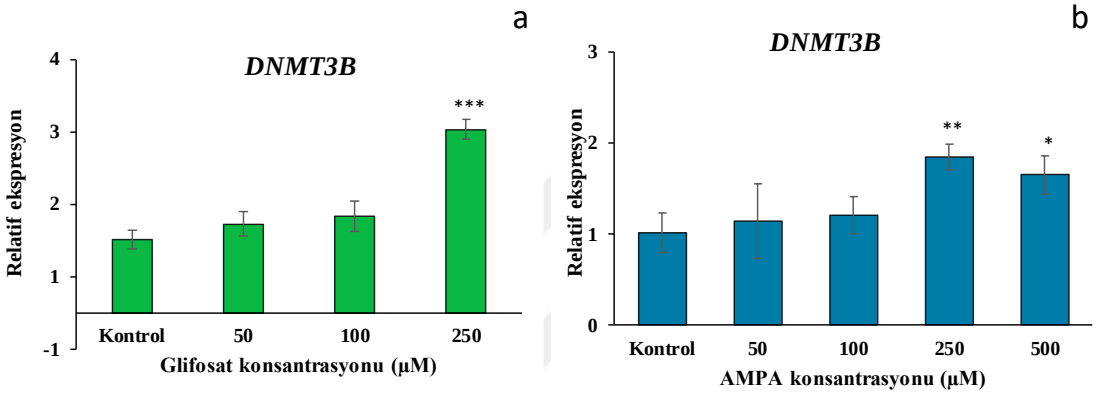
***DNMT3A geni*:** 50 µM, 100 µM ve 250 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,73 ($p<0,01$), 2,13 ($p<0,001$) ve 2,05 ($p<0,001$) kat anlamlı artış; AMPA'da 50 µM konsantrasyonda 1,12 kat anlamlı olmayan artış, 100 µM, 250 µM ve 500 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,86 ($p<0,001$), 2,21 ($p<0,001$) ve 1,65 ($p<0,01$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-5 a, b).



Şekil 4-5: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *DNMT3A* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,01$;
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

***DNMT3B geni*:** 50 µM, 100 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,22 ve 1,33 kat anlamlı olmayan artış, 250 µM maruziyet konsantrasyonunda 2,53 ($p<0,001$) kat anlamlı artış; AMPA'da 50 µM, 100 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,15 ve 1,21 kat anlamlı olmayan artış, 250 µM ve 500 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,85 ($p<0,01$), 1,65 ($p<0,05$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-6 a,b).

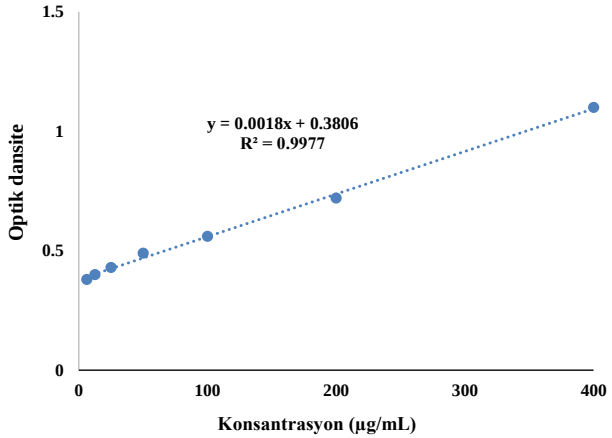


Şekil 4-6: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *DNMT3B* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$;
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,01$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.4. Protein Miktar Tayini Sonuçları

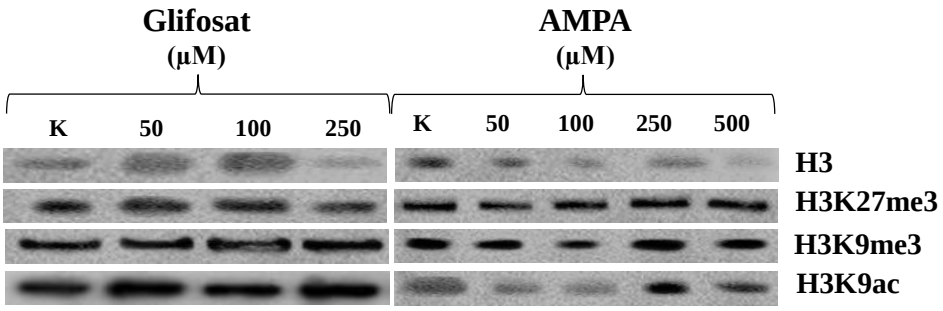
Histon proteinlerinin miktarı standart olarak BSA kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi üzerinden hesaplandı. Bölüm 3.10.2'te anlatıldığı şekilde hazırlanan konsantrasyonları 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 µg/mL olan BSA standart çözeltileri ile çizilen standart ölçü eğrisi Şekil 4-7'da verilmiştir.



Şekil 4-7: Protein standart ölçü eğrisi.

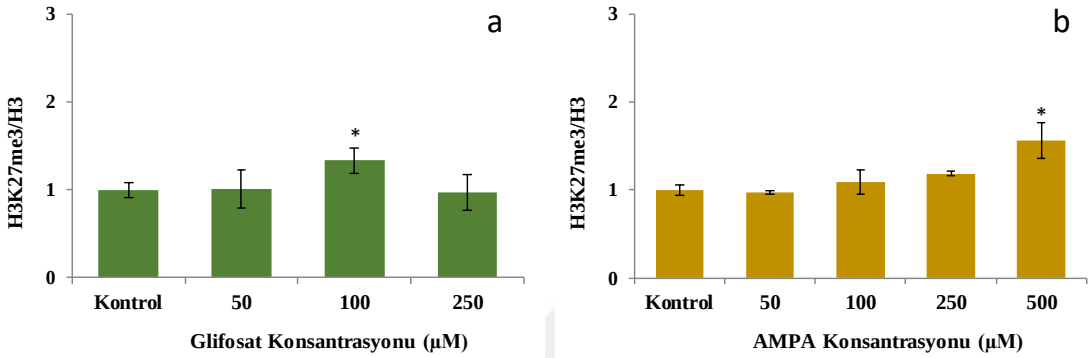
4.5. Western Blot Tekniği ile Global Histon Modifikasyonları Sonuçları

Glifosat ve AMPA maruziyeti sonucu H3K27me3, H3K9me3 ve H3K9ac için western blot yöntemi ile yapılan protein analizinden elde edilen membran görüntüleri Şekil 4-8'da verilmiştir.



Şekil 4-8: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücre dizisinde global histon modifikasyonları için western blot membran görüntüleri.

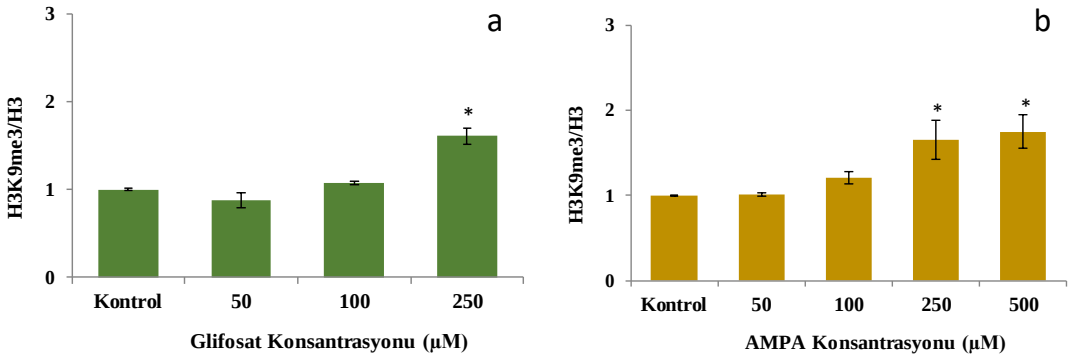
24 saat boyunca 50-250 µM glifosat ve 50-500 µM AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücrelerinde H3K27me3 seviyesinde kontrole kıyasla; glifosat maruziyetinde 100 µM maruziyet konsantrasyonunda 1,34 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi. AMPA'da ise 500 µM maruziyet konsantrasyonunda 1,56 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-9 a,b).



Şekil 4-9: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde H3K27me3 global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=4).
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$; (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

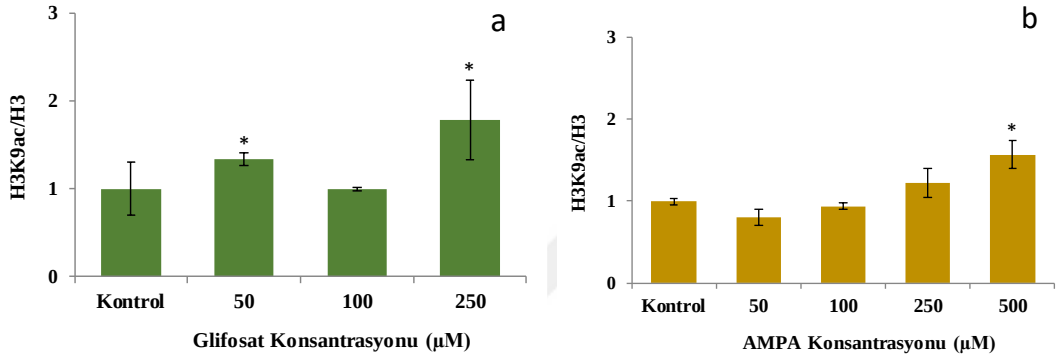
24 saat boyunca 50-250 µM glifosat ve 50-500 µM AMPA'ya maruz bırakılan HepG2 hücrelerinde H3K9me3 seviyesinde kontrole kıyasla; glifosat maruziyetinde 250 µM konsantrasyonda 1,61 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi. AMPA'da ise 250 ve 500 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,65 ($p<0,05$) ve 1,75 ($p<0,05$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-10 a,b).



Şekil 4-10: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde H3K9me3 global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=4).
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$; (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

24 saat 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarında glifosat ve 50, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında AMPA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K9ac seviyesinde kontrol grubuna kıyasla; glifosat maruziyetinde 50 ve 250 µM konsantrasyonda sırasıyla 1,33 kat ($p<0,05$) ve 1,78 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi. AMPA maruziyetinde ise 500 µM konsantrasyonda 1,57 kat ($p<0,05$) anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-11).



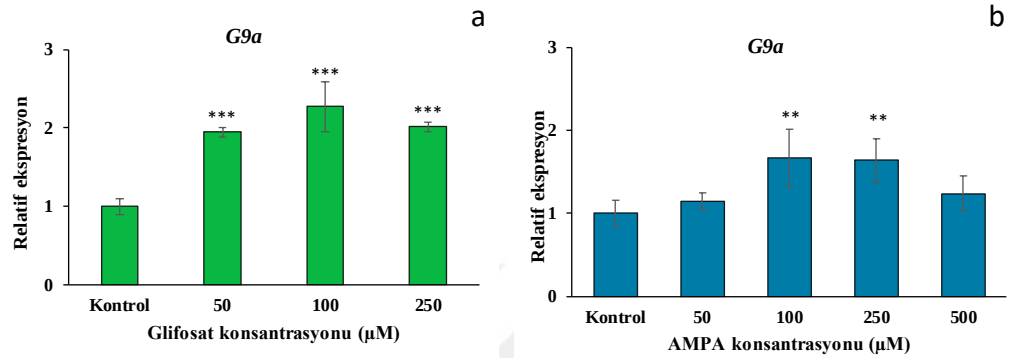
Şekil 4-11: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde H3K9ac global histon modifikasyonuna ait relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=4).
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$; (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.5.1. Kromatin Modifiye Eden Enzimleri Kodlayan Genlerin Ekspresyonunda Değişiklikler

Tez çalışmasında 24 saat glifosat ve AMPA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde kromatin modifiye eden enzimleri kodlayan genlerin (*G9a, EZH2, SETD1B, HAT1, SIRT1, SUV39H1, SETD8*) gen ekspresyonları real-time PCR ile analiz edildi. *SETD8* gen ekspresyonunda hem glifosat hem de AMPA maruziyetinde değişiklik gözlenmez iken, *SUV39H1* gen ekspresyonunda sadece glifosat maruziyetinde değişiklik gözlendi. *G9a, EZH2, SETD1B, HAT1* ve *SIRT1* genlerinde ise glifosat ve AMPA maruziyet gruplarında kontrole kıyasla anlamlı değişiklikler gözlendi.

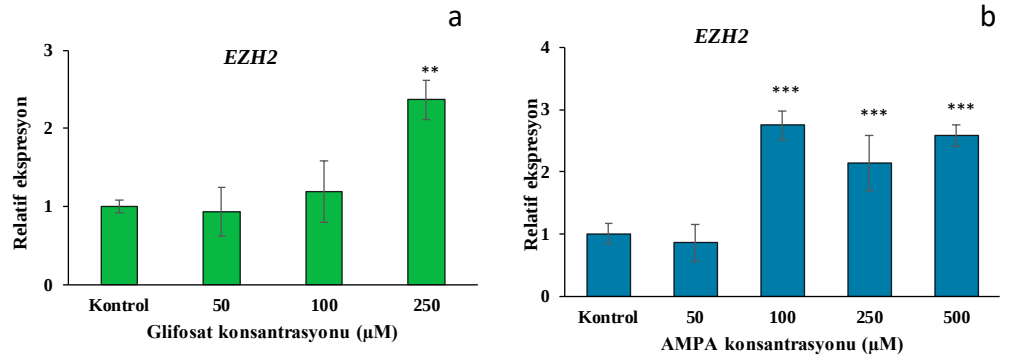
***G9a geni*:** 50, 100 ve 250 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,95 ($p<0,001$), 2,27 ($p<0,001$) ve 2,02 ($p<0,001$) kat, anlamlı artış; AMPA'da 50 ve 500 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,15 ve 1,24 kat anlamlı olmayan artış, 100 ve 250 µM maruziyet konsantrasyonlarında ise sırasıyla 1,67 ($p<0,01$) ve 1,64 ($p<0,01$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-12 a,b).



Şekil 4-12: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *G9A* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,01$;
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

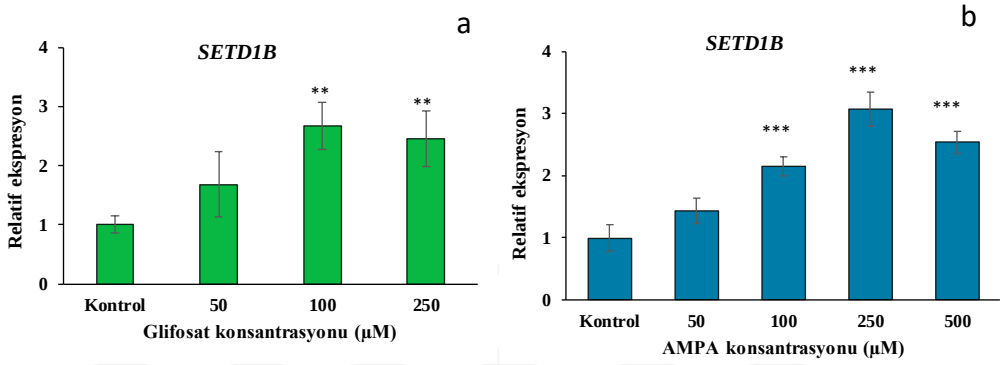
***EZH2 geni*:** 50 µM glifosat maruziyet konsantrasyonunda 0,93 kat anlamlı olmayan azalma, 100 µM maruziyet konsantrasyonunda 1,20 kat anlamlı olmayan artış, 250 µM maruziyet konsantrasyonunda 2,37 kat ($p<0,01$) anlamlı artış; AMPA'da 50 µM konsantrasyonda 0,86 kat anlamlı olmayan azalma, 100, 250 ve 500 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 2,75 ($p<0,001$), 2,14 ($p<0,001$) ve 2,59 ($p<0,001$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-13 a,b).



Şekil 4-13: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *EZH2* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,01$;
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

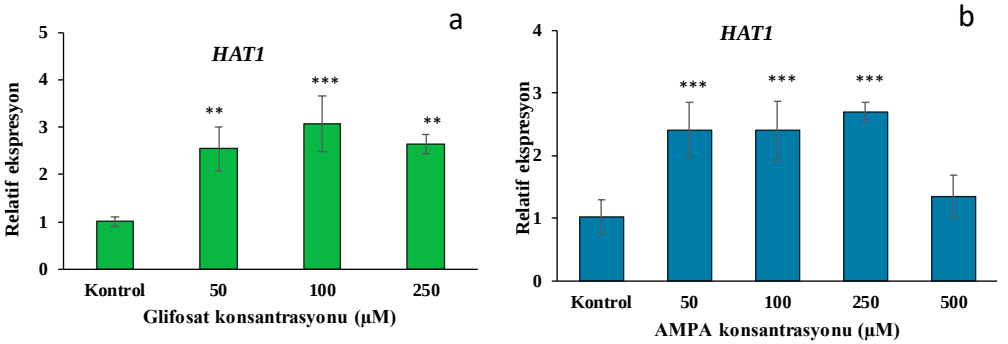
***SETD1B geni*:** 50 µM glifosat maruziyet konsantrasyonunda 1,69 kat anlamlı olmayan artış; 100 µM ve 250 µM maruziyet konsantrasyonunda sırasıyla 2,67 ($p<0,01$) ve 2,45 ($p<0,01$) kat anlamlı artış; AMPA'da 50 µM konsantrasyonda 1,43 kat anlamlı olmayan artış, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda sırasıyla 2,15 ($p<0,001$), 3,07 ($p<0,001$) ve 2,54 ($p<0,001$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-14 a,b).



Şekil 4-14: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *SETD1B* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,01;
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,001 (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

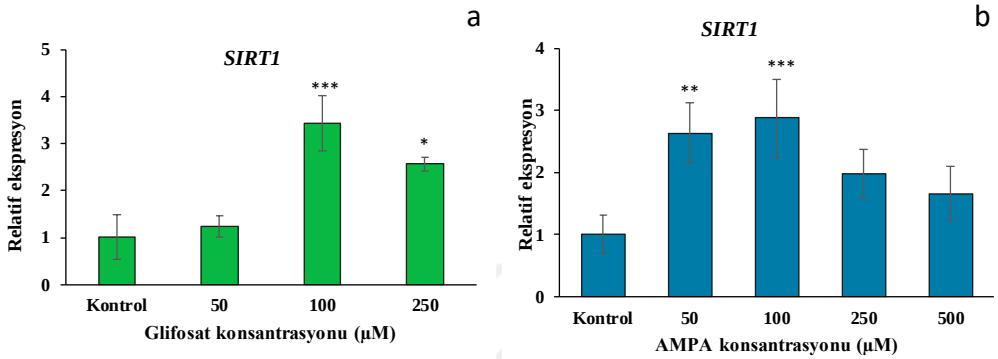
***HAT1 geni*:** 50 µM, 100 µM ve 250 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 2,54 ($p<0,01$), 3,06 at ($p<0,001$) ve 2,64 ($p<0,01$) kat anlamlı artış; AMPA'da 500 µM maruziyet konsantrasyonunda 1,35 kat anlamlı olmayan artış, 50, 100 ve 250 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 2,41 ($p<0,001$), 2,40 ($p<0,001$) ve 2,70 ($p<0,001$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-15).



Şekil 4-15: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *HAT1* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,01;
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,001 (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

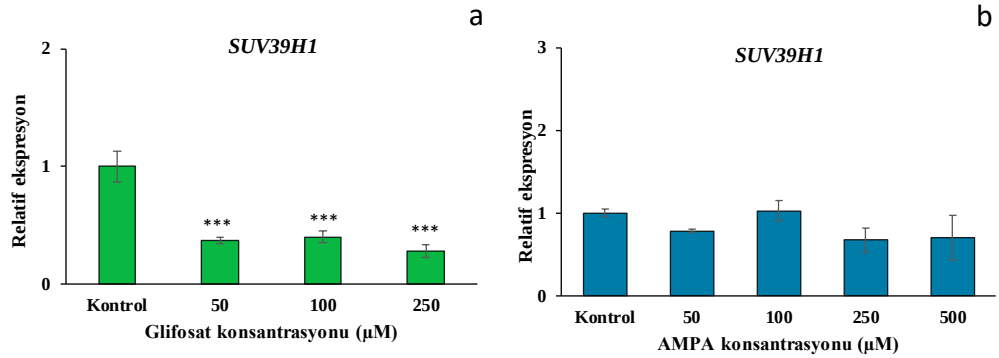
***SIRT1 geni*:** 50 µM glifosat konsantrasyonunda 1,25 kat anlamlı olmayan artış, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda sırasıyla 3,43 ($p<0,001$) ve 2,57 ($p<0,05$) kat anlamlı artış; AMPA'da 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda sırasıyla 1,98 ve 1,66 kat anlamlı olmayan artış, 50 ve 100 µM maruziyet konsantrasyonlarında ise sırasıyla 2,63 ($p<0,01$) ve 2,88 ($p<0,001$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *SIRT1* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$;
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,01$;
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

***SUV39H1 geni*:** 50 µM, 100 µM ve 250 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 0,37 ($p<0,001$), 0,40 ($p<0,001$) ve 0,28 ($p<0,001$) kat anlamlı azalma; AMPA'da 50, 250 ve 500 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 0,78 kat 0,67 kat ve 0,70 kat anlamlı olmayan azalma, 100 µM konsantrasyonda ise kontrole kıyasla ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmedi (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *SUV39H1* geninde ait relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.6. Annexin V- FITC/PI Analizi ile Apoptoz Sonuçları

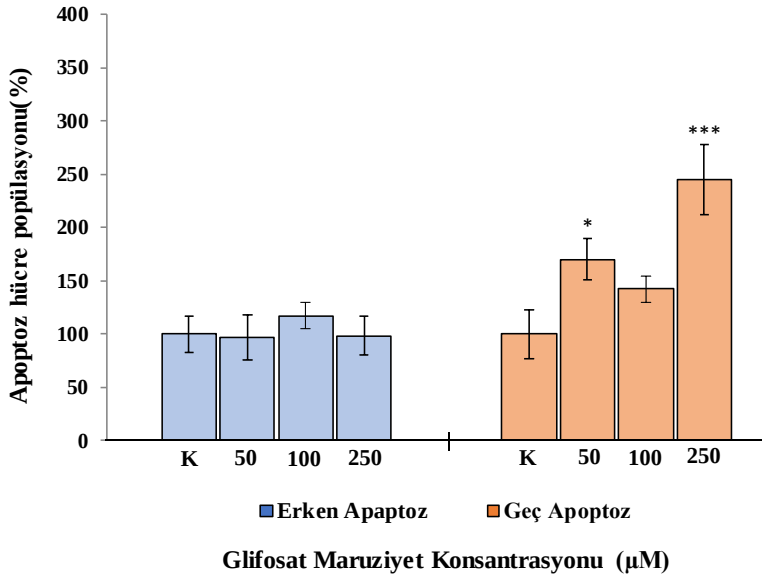
Glifosatın 50-250 µM konsantrasyon aralığında ve AMPA'nın 50-500 µM konsantrasyon aralığında HepG2 hücreleri üzerindeki apoptotik etki potansiyeli 24 saat süreli maruziyeti takiben Anneksin V-FITC/PI yöntemi ile değerlendirildi.

24 saat glifosat uygulanan HepG2 hücrelerinde erken apoptoz ve geç apoptoz görülmesi kontrol grubu ile kıyaslandığında; erken apoptozda maruziyet konsantrasyonlarında anlamlı değişiklik görülmemiş, geç apoptozda 50 ve 250 µM konsantrasyondaki maruziyet grubunda, sırasıyla, %70 ($p<0,05$) ve %145 ($p<0,001$) artış görülmüştür (Şekil 4-18) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Glifosatın HepG2 hücrelerinde 50-250 µM konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri.

Glifosat maruziyet konsantrasyonları	Annexin V-FITC$^+$/PI$^-$ (erken apoptoz)	Annexin V-FITC$^+$/PI$^+$ (geç apoptoz)
	% Apoptoz oranı ± SD	% Apoptoz oranı ± SD
Kontrol	100 ± 16,95	100 ± 21,56
50 µM	96,95 ± 23,13	170 ± 19,55*
100 µM	117,2 ± 15,33	142,3 ± 21,22
250 µM	98,2 ± 21,28	245,4 ± 21,06***

SD: Standart sapma ('standard deviation').Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *p<0,05; *** p<0,001; ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



Şekil 4-18: HepG2 hücre dizisine 50-250 µM konsantrasyon aralığında glifosat maruziyetinin erken apoptoz ve geç apoptoz etkisi

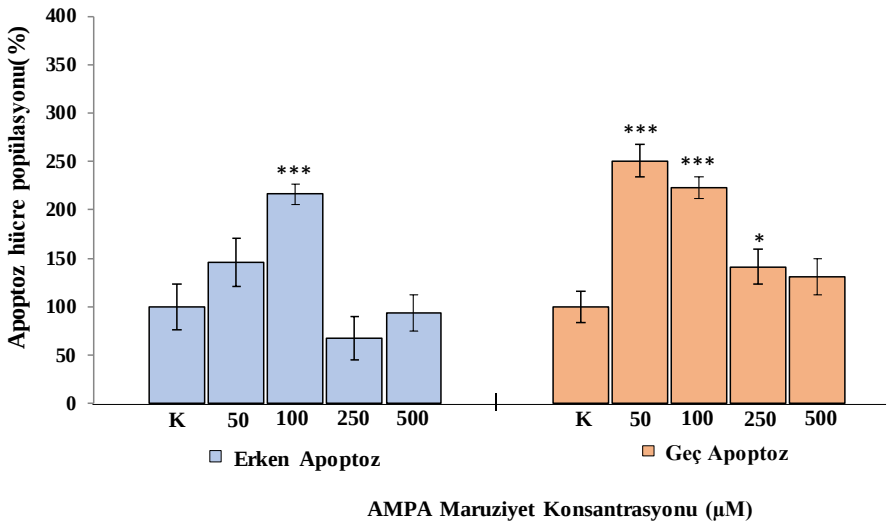
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=5). K: kontrol. (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *p<0,05; *** p<0,001; ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

24 saat AMPA uygulanan HepG2 hücrelerinde erken apoptoz ve geç apoptoz görülmesi kontrol grubu ile kıyaslandığında; erken apoptozda 100 µM konsantrasyondaki AMPA maruziyet grubunda, %116 ($p<0,001$) artış, geç apoptozda 50, 100 ve 250 µM konsantrasyondaki AMPA maruziyet grubunda, sırasıyla, %151 ($p<0,001$), %123 ($p<0,001$) ve %41 ($p<0,05$) artış görülmüştür (Şekil 4-19) (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: AMPA'nın HepG2 hücrelerinde 50-500 µM konsantrasyon aralığında Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkileri.

AMPA maruziyet konsantrasyonları	Annexin V-FITC$^+$/PI$^-$ (erken apoptoz)	Annexin V-FITC$^+$/PI$^+$ (geç apoptoz)
	% Apoptoz oranı ± SD	% Apoptoz oranı ± SD
Kontrol	100 ± 23,54	100 ± 24,98
50 µM	145,69 ± 16,36	250,96± 17,25***
100 µM	216,23 ± 13,25***	223,28 ± 20,89***
250 µM	67,25 ± 19,52	141,35 ± 35,47*
500 µM	93,15 ± 36,32	130,55 ± 14,05

SD: Standart sapma ('standard deviation').Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=5). (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *p<0,05; *** p<0,001; ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)



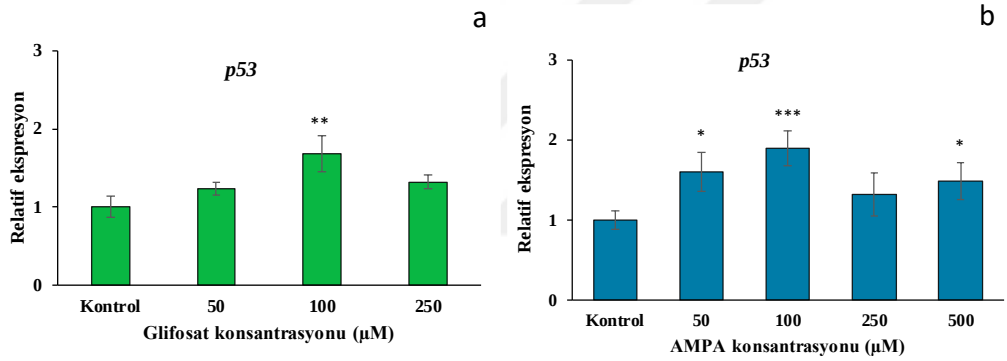
Şekil 4-19: HepG2 hücre dizisine 50-500 µM konsantrasyon aralığında AMPA maruziyetinin erken apoptoz ve geç apoptoz üzerine etkisi.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.(n=5). K: kontrol. (Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı: *p<0,05; ** p<0,01 *** p<0,001; ANOVA-Post Hoc Dunnet testi)

4.6.1. Apoptoz İle İlişkili Genlerin ifadesindeki değişiklikler

Tez çalışmasında 24 saat glifosat ve AMPA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde apoptoz ile ilişkili genlerin (*p53, BAX, BCL-2, CASP-3, CASP-9*) gen ekspresyonları real-time PCR ile analiz edildi. *BCL-2* gen ekspresyonunda hem glifosat hem de AMPA maruziyetinde değişiklik gözlenmez iken, *p53, BAX, CASP-3* ve *CASP-9* genlerinde ise glifosat ve AMPA maruziyet gruplarında kontrole kıyasla anlamlı değişiklikler gözlendi.

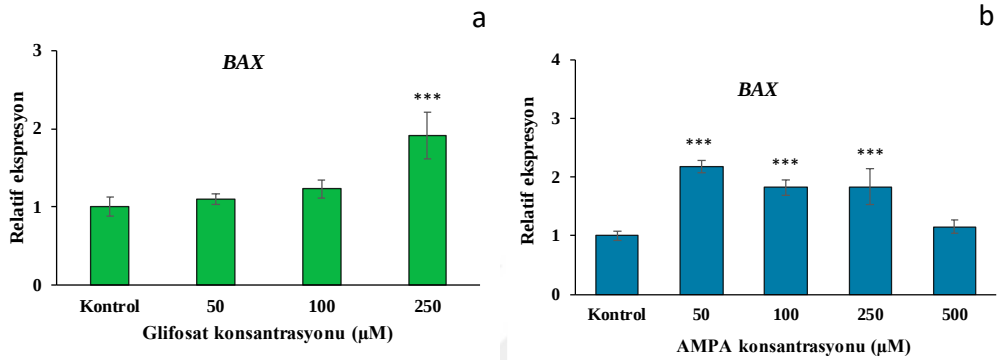
***P53 geni*:** 50 ve 250 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,23 ve 1,32 kat anlamlı olmayan artış, 100 µM maruziyet konsantrasyonunda 1,68 ($p<0,01$) kat anlamlı artış; AMPA'da 250 µM maruziyet konsantrasyonunda 1,32 kat anlamlı olmayan artış, 50, 100 ve 500 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,60 ($p<0,05$), 1,90 ($p<0,001$) ve 1,49 ($p<0,05$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-20).



Şekil 4-20: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *p53* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$;
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,01$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

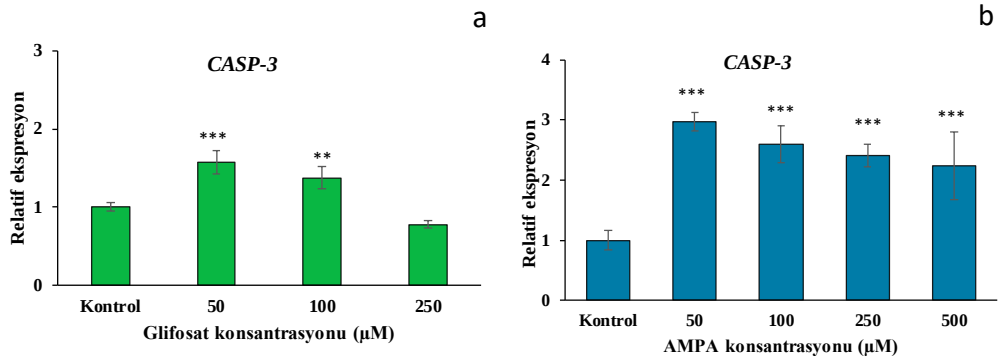
***BAX geni*:** 50 ve 100 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,10 ve 1,23 kat anlamlı olmayan artış, 250 µM maruziyet konsantrasyonunda 1,91 ($p<0,001$) kat anlamlı artış; AMPA'da 500 µM maruziyet konsantrasyonunda 1,15 kat anlamlı olmayan artış, 50, 100 ve 250 µM maruziyet konsantrasyonunda sırasıyla 2,18 ($p<0,001$), 1,82 ($p<0,001$) ve 1,83 ($p<0,001$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-21).



Şekil 4-21: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *BAX* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

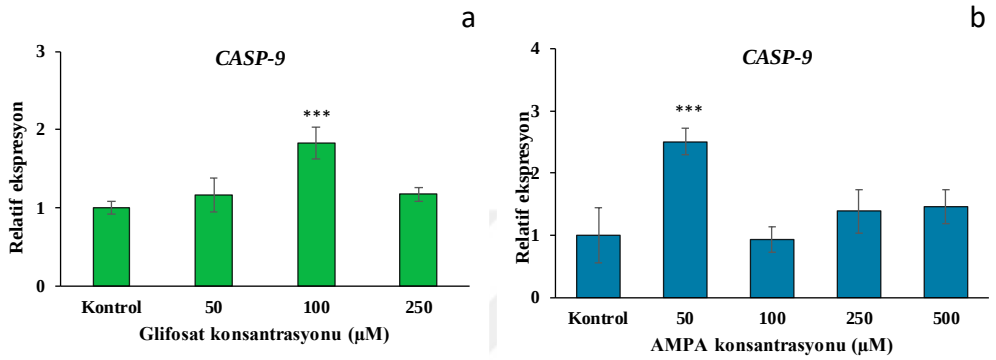
***CASP-3 geni*:** 250 µM glifosat maruziyet konsantrasyonunda 1,28 kat anlamlı olmayan azalma, 50 ve 100 µM maruziyet konsantrasyonlarında sırasıyla 1,57 ($p<0,001$), ve 1,37 ($p<0,01$) kat anlamlı artış; AMPA'da 50, 100, 250 ve 500 µM maruziyet konsantrasyonunda sırasıyla 2,97 ($p<0,001$), 2,60 ($p<0,001$), 2,40 ($p<0,001$) ve 2,24 ($p<0,001$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-22).



Şekil 4-22: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *CASP-3* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,01$;
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

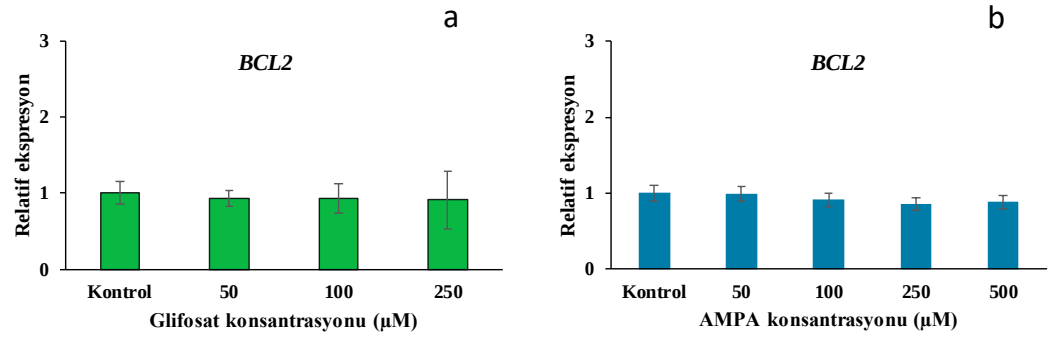
***CASP-9 geni*:** 50 ve 250 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında 1,17 kat anlamlı olmayan artış, 100 µM maruziyet konsantrasyonunda 1,83 ($p<0,001$) kat anlamlı artış; AMPA'da 100 µM maruziyet konsantrasyonunda 0,93 kat anlamlı olmayan azalma, 250 ve 500 µM maruziyet konsantrasyonlarında ise sırasıyla 1,39 kat ve 1,46 kat anlamlı olmayan artış tespit edildi. 50 µM maruziyet konsantrasyonunda 2,51 ($p<0,001$) kat anlamlı artış tespit edildi (Şekil 4-23).



Şekil 4-23: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *CASP-9* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).
*** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

***BCL-2 geni*:** 50, 100 ve 250 µM glifosat maruziyet konsantrasyonlarında ve 50, 100, 250 ve 500 µM AMPA maruziyet konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4-24).



Şekil 4-24: 24 saat boyunca 0-250 µM konsantrasyonlarda glifosat (a) ve 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA (b) maruziyeti sonucu HepG2 hücre dizisinde *BCL-2* geninde relatif ekspresyon seviyeleri.

5. TARTIŞMA

Glifosat tarım alanlarında yabani otların yok edilmesi için kullanılan geniş spektrumlu herbisittir (Webster ve ark., 2014). Glifosatın herbisit etkisi, Monsanto® şirketinden (St. Louis, MO, ABD) kimyager John Franz tarafından 1970 yılında keşfedilmiştir ve birkaç yıl sonra ilk glifosat bazlı herbisit olan Roundup® üretilmiştir (Davoren ve Schiestl, 2018). Günümüzde dünya çapında 100'den fazla ülkede farklı markalar altında yüzlerce glifosat bazlı herbisit ticari olarak satılmaktadır (Williams ve ark., 2000). Glifosat, dünya genelinde en çok kullanılan herbisittir (Benbrook, 2016). Yıllar içinde glifosat kullanımında meydana gelen hızlı artış, insan sağlığına olası olumsuz sonuçlar konusunda artan endişelere neden olmuştur. Bu nedenle, glifosatın insan sağlığı üzerindeki toksik etkileri hakkında yapılan çalışmaların sayısı son yıllarda artmıştır (Tarazona ve ark., 2017). Glifosat tarım alanlarında yoğun bir şekilde uygulanmakta ve kalıntıları sıkça bitkilerde, toprakta, suda, gıda ürünlerinde ve dolayısıyla maruziyet sonucu insan idrarında da tespit edilmektedir (Chiesa ve ark., 2019). Glifosatın çevre ve insanlar üzerindeki potansiyel etkilerini incelemek amacıyla farelerde yapılan kronik toksisite çalışmaları glifosatın karaciğer ve böbrek üzerinde toksik etkilerini ortaya çıkarmıştır (Myers ve ark., 2016). Ayrıca, Richard ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada glifosatın insan plasenta hücrelerinde toksik etkisinin olduğunu ve östrojen sentezinden sorumlu olan aromataz aktivitesini bozabileceğini göstermiştir. Çalışma ayrıca, glifosat içeren bir ticari ürün olan Roundup'ın, glifosattan daha toksik olduğunu vurgulamıştır.

Glifosatın insan sağlığı üzerindeki potansiyel zararlı etkileri konusunda devam eden bir tartışma olsa da, çalışmalar karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları, kanser, nörotoksisite, üreme ve gelişim toksisitesi gibi olumsuz etkileri göstermektedir (Gui ve ark., 2012; Guyton ve ark., 2015; Hao ve ark., 2019; Kwiatkowska ve ark., 2020). Dolayısıyla glifosatın insanlar ve çevre üzerindeki toksik etkilerinin tam olarak anlaşılabilmesi için toksisitede rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması ihtiyaç vardır.

Tez çalışmasında glifosat ve metaboliti olan AMPA'nın toksik etkilerinde epigenetik mekanizmaların ve apoptozun rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, tez çalışmasında HepG2 hücre dizisinde glifosat ve metaboliti olan AMPA'nın

belirli konsantrasyonlarda hücrelere maruziyeti sonucu; sitotoksik etkileri, global DNA metilasyonu, global histon modifikasyonları ve apoptoz üzerine etkileri araştırıldı. Ksenobiyotiklerin karaciğerde metabolize olmaları ve glifosatın da karaciğer üzerine toksik etkilerinin bulunması sebebiyle tez çalışmasında uygun bir hücre kültürü modeli olarak karaciğer hücreleri seçildi.

Daha önce yüksek lisans tezinde çalışılan glifosatın en yüksek konsantrasyonda (5 mM) IC_{50} değerine ulaşılamamıştır (Mehtiyev ve ark., 2023). Doktora tezi kapsamında daha yüksek konsantrasyonlar çalışılmıştır. Tez çalışmasında, 24 saat süre ile 0-10 mM konsantrasyon aralığında glifosat ve AMPA'nın HepG2 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmek için MTT testi uygulanmıştır. HepG2 hücrelerinde MTT testinde IC_{50} değerleri glifosat için sırasıyla 6,19 mM ve AMPA için ise 8,13 mM olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre glifosatın AMPA'ya göre daha sitotoksik olduğu gözlendi. Benzer bir çalışmada 48 saat süre ile 0,1-10 mM konsantrasyon aralığında MTT testi uygulanarak glifosat ve AMPA maruziyeti sonucu SH-SY5Y hücre dizisinde IC50 değeri sırasıyla 5,36 mM ve 9,93 mM bulunmuştur (Martinez ve ark., 2020). Yapılan diğer çalışmalarda, MTT testi ile belirlenen glifosat sitotoksisitesi, insan fibroblast hücrelerinde (IC_{50} değeri >75 mM) (Lueken ve ark., 2004), insan karaciğer HepG2 hücrelerinde (IC_{50} değeri >10 mM) (Gasnier ve ark., 2009) ve PC12 hücrelerinde (IC_{50} değeri >40 mM) (Gui ve ark., 2012) rapor edilmiştir. Glifosatın izopropilamin tuzunun 24 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda maruziyeti sonucunda SH-SY5Y hücre dizisinde IC50 değeri yaklaşık olarak 5,51 mM iken, aynı çalışmada HepG2 ve A549 hücre dizilerinde 14 mM'ın üzerinde bulunmuştur. (Hao ve ark., 2019). Glifosat ve AMPA'nın 500-2000 mg/L konsantrasyon aralığında *Vibrio fischeri* ve *Tetrahymena pyriformis* mikroorganizmaları üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmasında, glifosatın AMPA'ya göre daha toksik olduğu görülmüştür (Bonnet ve ark., 2007). Glifosat ve AMPA'nın sitotoksik etkilerini doğrulayan çok sayıda çalışma olmasına rağmen sitotoksik etkilerinin hücre tipine ve maruziyet süresine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği gözlenmektedir (Hao ve ark., 2019). Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ve yapılan çalışmalar glifosatın sitotoksisite potansiyelinin AMPA'ya göre daha fazla olduğunu göstermektedir.

DNA metilasyonu, memelilerde yoğun olarak çalışılan epigenetik modifikasyonlardan biridir. Normal hücrelerde, gen ekspresyonunun düzenlenmesini ve

gen susturmanın devamlılığını sağlar. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ile ilişkilidir ve bu epigenetik modifikasyonların etkileşimi, kromatin yapısını değiştirerek genomun işleyişini düzenlemek için kritiktir (Kulis ve Esteller, 2010). Global DNA metilasyonunun genetik ifadeyi düzenlemede önemli bir rol oynamakta ve metilasyon seviyelerinde oluşan değişikliklerin kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabileceği düşünülmektedir (Esteller, 2008). Tez çalışmasında, global DNA metilasyonu seviyelerini incelemek için HepG2 hücrelerine 24 saat glifosat ve AMPA maruziyeti sonucu; kontrol grubuna kıyasla glifosat 250 µM konsantrasyon maruziyet grubunda, AMPA'da ise 100 ve 250 µM konsantrasyon maruziyet gruplarında DNA metilasyonunda anlamlı artış gözlenmiştir. Ergun ve Cayir (2021) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada insan akciğer epitel hücrelerinde (A549) 1500 µM konsantrasyonda 24 saat glifosat maruziyeti sonucu global %5-mC oranında kontrole kıyasla >6 kat artış olduğu gösterilmiştir. Kubsad ve ark. (2019), sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada, gebeliğin 8-14 günleri arasında günlük 25 mg/kg glifosat uygulanan sıçanlarda F1 F2 ve F3 nesillerin sperm hücrelerinin DNA metilasyon seviyelerinde belirgin bir artış olduğu tespit edildi. Benzer bir çalışmada da 25 mg/kg glifosat uygulanan sıçanlarda sperm hücrelerinde DNA metilasyonu bölgelerinin gözlendiği ve F1 neslinden itibaren hastalıkların sonraki nesillere aktarıldığı gözlenmiştir (Ben Maamar ve ark., 2021). Bu çalışmalar aynı zamanda, sperm hücrelerindeki DNA metilasyonunun epigenetik olarak nesiller arası kalıtımda rol oynadığını göstermiştir.

Pestisitlerin neden olduğu oksidatif stres ve oluşan serbest hidroksil radikalleri (OH^-) 5-hidroksimetilsitozin (5hmC) oluşturarak global DNA metilasyonunda değişikliklere neden olabilir. (Fratelli ve ark., 2005; Martinez ve ark., 2020; Solomon ve ark., 2007; Yu ve ark., 2008). Bunun dışında DNA metilasyon mekanizmasında yer alan DNA metiltransferaz enzimlerinin etkilenmesi sonucu (Shepherd ve ark., 2006), ve bazı immünotoksik etkiler (Daniel ve ark., 2001) DNA metilasyon mekanizmalarını etkileyebilir. Tez çalışmasında, global DNA metilasyonu ile ilişkili genlerin ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla: *DNMT1* geni için 50 µM, 100 µM ve 250 µM konsantrasyonlarda glifosat ≥2,64 kat, 50 µM ve 100 µM konsantrasyonda AMPA ≥2,44 kat anlamlı artışa; *DNMT3A* geni için 50 µM, 100 µM ve 250 µM konsantrasyonda glifosat ≥1,73 kat, 100 µM, 250 µM ve 500 µM konsantrasyonlarda AMPA ≥1,65 kat anlamlı artışa; *DNMT3B* geni geni için 250 µM konsantrasyonda glifosat 2,53 kat, 250 µM ve 500 µM konsantrasyonlarda AMPA ≥1,65 kat, anlamlı

artışa neden olduğu gösterildi. Wozniak ve ark. (2021) yaptığı çalışmada 24 saat boyunca PBMC hücrelerine 0,5, 10, 100 μM konsantrasyonlarda glifosat, 10 ve 250 μM konsantrasyonlarındaki AMPA maruziyeti sonucu kontrole kıyasla *DNMT1* gen ekspresyonunda hem glifosat hem de AMPA maruziyetinde, *DNMT3A* gen ekspresyonunda ise sadece glifosat maruziyetinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. *Oryzias latipes* balığı üzerinde yapılan çalışmada 15 gün boyunca 0,5 mg/L glifosat maruziyeti sonucu DNA metilasyon mekanizmasındaki değişiklikler tespit edilmiş ve *DNMT1* ve *DNMT3A* gen ekspresyonunda istatistiksel artış gözlenmiştir (Smith ve ark., 2019). Sıçanlara iki yıl boyunca günde 4 ng/kg konsantrasyonda oral yoldan maruziyet uygulanan bir çalışmada *DNMT3A* gen ekspresyonunun arttığı görüldü (Mesnage ve ark., 2015a). Başka bir çalışmada sıçanlara uygulanan 1500 μM konsantrasyonda glifosat formülasyonu (Roundup®) maruziyeti sonrasında karaciğer ve böbrek hücrelerinde *DNMT3B* ve *DNMT3A* ekspresyonunda artış gözlendi (Ergun ve Cayir, 2021).

Kimyasalların DNA'yı doğrudan veya dolaylı olarak transkripsiyon faktörlerini etkilemesi yoluyla kromatin yapısında epigenetik modifikasyonlar gözlenebilir. H3 proteininin H3K9me3 ve H3K27me3 şeklinde trimetil modifikasyonunun transkripsiyonel aktiviteyi ve heterokromatinin yoğunlaşmasını azalttığı gösterilmiştir. Asetilasyon ise nükleozomdan uzanan histon kuyruklarındaki lizin kalıntılarına negatif bir yük ekler. Bu negatif yükler, negatif yüklü DNA'yı iter ve sonuç olarak gevşek bir kromatin yapısı oluşur. Açık kromatin yapısı, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına ve gen ekspresyonunun önemli ölçüde artmasına olanak tanır. Asetil gruplar, histon H3 ve H4 lizin kalıntılarına histon asetiltransferazlar (HAT) tarafından eklenir ve deasetilazlar (HDAC) tarafından çıkarılır (Roth ve ark., 2001). Wozniak ve ark. (2021) tarafından PBMC hücrelerinde glifosat ve AMPA'nın 0.5 - 100 μM arasında değişen konsantrasyonlarda histon metilasyonu modifikasyonunda yer alan genlerin (*EHMT1, EHMT2*) ve histon deasetilasyon modifikasyonunda yer alan genlerin (*HDAC3, HDAC5*) gen ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre glifosat 0.5, 10 ve 100 μM konsantrasyonlarda, AMPA ise 250 μM konsantrasyonda *HDAC3* geninin ifadesini değiştirdiği görülmüştür. Sıçanlar üzerinde yapılan incelemede, histon modifikasyonları kromatin immunopresipitasyon yöntemi ile incelenmiş ve glifosat bazlı herbisitlere maruz kalan sıçanlarda H4 asetilasyonu ve H3K9 trimetilasyonu (H3K9me3) artış gösterirken H3K27 trimetilasyonunda (H3K27me3) azalma

gözlenmiştir (Lorenz ve ark., 2019). Tez çalışmasında ise, 24 saat 50-250 µM konsantrasyonlarında glifosat ve 50-500 µM konsantrasyonlarında AMPA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde H3K27me3, H3K9me3, H3K9ac seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla; H3K27me3 seviyesinde glifosat maruziyetinde 100 µM konsantrasyonda 1,34 kat anlamlı artış tespit edildi. AMPA maruziyetinde ise 500 µM konsantrasyonda 1,56 kat anlamlı artış tespit edildi. H3K9me3 seviyesinde glifosat maruziyetinde 250 µM konsantrasyonda 1,61 kat anlamlı artış tespit edildi. AMPA maruziyetinde ise 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda sırasıyla 1,65 kat ve 1,75 kat anlamlı artış tespit edildi. H3K9ac seviyesinde glifosat maruziyetinde 50 µM ve 250 µM konsantrasyonda sırasıyla 1,33 kat ve 1,78 kat anlamlı artış tespit edildi. AMPA maruziyetinde ise 500 µM konsantrasyonda 1,57 kat anlamlı artış tespit edildi. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre glifosat ve AMPA maruziyetinin karaciğer hücrelerinde global histon modifikasyonlara etkisinin olabileceği gösterilmiştir.

Histon modifikasyonları ile apoptoz arasındaki ilişkiye dair önemli çalışmalar bulunmaktadır. Konishi ve ark. (2003) histon proteinlerinin apoptotik sinyallerin çekirdekten mitokondriye iletilmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Lösemik hücrelerde erken apoptoz sırasında trimetillenmiş histon proteini ve internükleozomal olarak parçalanmış DNA'nın salınması, epigenetik olaylar ile apoptoz arasında bağlantılar sağlamaktadır (Boix-Chornet ve ark., 2006).

HMT geni olan *G9a*, histon H3 metilasyonu için önemli bir enzim olup, epigenetik modifikasyonlarda görev almaktadır (Kim ve ark., 2009; Shinkai ve Tachibana, 2011; Tachibana ve ark., 2002). *G9a*, kanser hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese olur ve kanser invazyonu ve metastaz gelişmesinde önemli bir rol oynar. İnvaziv akciğer kanseri hücrelerinde *G9a*'nın baskılanması, *in vitro* ve *in vivo* kanser invazyonunu ve metastazı inhibe ettiği görülmüştür (Chen ve ark., 2010). *G9a*'nın nöroblastom hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmış ve *G9a* inhibisyonunun apoptozu tetiklediği ve hücre proliferasyonunu düzenlenlediği görülmüştür (Lu ve ark., 2013). Tez çalışmasında, *G9a* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda glifosat maruziyeti sonrası ≥1,95 kat, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda AMPA maruziyeti sonrası ≥1,64 kat anlamlı artış bulunmuştur. PBMC hücrelerinde yapılan *in vitro* çalışmada, glifosat ve AMPA ile 24 saat boyunca maruziyet gerçekleştirilen hücrelerde *G9a* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığını rapor edilmiştir ancak glifosat ve

AMPA maruziyetinin *G9a* gen ifadesinde artış eğilimi gösterdiği gözlenmiştir (Wozniak ve ark., 2021). Tez çalışmasında, *EZH2* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 250 µM konsantrasyonda glifosat maruziyetinde 2,37 kat; 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda AMPA maruziyetinde ≥2,14 kat anlamlı artış bulunmuştur. Kanser hücrelerinde, *EZH2* geni genellikle aşırı ifade edilir. Bu aşırı ifade, H3K27me3'ün artmasına yol açar ve tümör baskılayıcı ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesini baskılayabilir (Zhang ve ark., 2014). Dolayısıyla, tez çalışmasında *G9a* ve *EZH2* ekspresyonundaki artışın kanser gelişimine katkısı olabileceği düşünülmekte ancak burada rol oynayan mekanizmaların apoptoz ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir.

En önemli H3K9 metiltransferazlardan biri de *SUV39H1*'dir. Histon 3 lizin 9'un trimetillenmesi (H3K9me3), gen promotorlarında gen ifadesini susturan önemli bir epigenetik mekanizmadır (Loyola ve ark., 2009). Yapılan bir araştırmada insan kolorektal karsinom hücresinde (CRC), FAS protein ifadesinin belirgin bir şekilde azalması, *SUV39H1* ifadesinin ise belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. *SUV39H1* seçici inhibitör (F5446) ajan kullanımı sonrasında ise, FAS promotorundaki H3K9me3 baskısı azaltılmış ve FAS ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Bunun dışında p53 aktivasyonu ile FAS ifadesi transkripsiyonel olarak etkinleştirebilir ve ekstrinsik yol aracılığıyla hücre apoptoza sürüklenebilir (Müller ve ark., 1998). Dolayısıyla in vitro koşullarda metastatik kolon karsinom hücrelerinde apoptozun tetiklendiği ve büyüme inhibisyonunun konsantrasyona bağlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Lu ve ark., 2020). Tez çalışmasında, *SUV39H1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 50 µM, 100 µM ve 250 µM konsantrasyonlarda glifosat maruziyeti sonrası 0,37 kat, 0,40 kat ve 0,28 kat anlamlı azalma tespit edildi.; 0-500 µM konsantrasyonlarda AMPA maruziyeti sonrası ise herhangi anlamlı değişiklik bulunamamıştır. *SETD1B* histon H3K4 metilasyonu için önemli bir enzim olup, epigenetik modifikasyonlarda görev almaktadır (Davie ve ark., 2015). Tez çalışmasında, *SETD1B* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda glifosat maruziyeti sonrası ≥2,45 kat; 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda AMPA maruziyeti sonrası ≥2,15 kat anlamlı artış bulunmuştur. *SETD1B*'nin aşırı ekspresyonu apoptozu tetikleyebilir. Bu durum, *SETD1B*'nin H3K4 metilasyonunun yanı sıra H3K9 metilasyonunda da görev alması ile ilişkili olabilir. H3K9'un metilasyonu, *p53* gibi apoptotik genlerin aktive olmasına neden olabilir. *p53*, hücre döngüsünü durduran ve apoptozu tetikleyen tümör baskılayıcı

genidir. Dolayısıyla, *p53* aktivasyonu hücrelerde apoptozu tetikleyebilir (Olcina ve ark., 2016).

Histon asetiltransferazların (*HAT*) FAS proteininin aşırı ifadesi ile ilişkili olduğuna dair bilgiler mevcuttur (Ren ve ark., 2015). Yapılan bir araştırmada insan akciğer kanser hücrelerinde HAT ailesinin bir üyesi olan *HAT1*'in ekspresyonunun FAS ekspresyonunu tetikleyerek apoptozu indüklediği gözlenmiştir (Han ve ark., 2017). Tez çalışmasında, *HAT1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda glifosat maruziyeti sonrası ≥ 2,54 kat, 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda AMPA maruziyeti sonrası ≥ 2,40 kat anlamlı artış bulunmuştur. *SIRT1* memelilerde keşfedilen ilk SIRT gen ailesinin üyesidir ve yaşam süresini arttırmada rol oynayan en kapsamlı şekilde çalışılmış bir SIRT proteinidir (Bonkowski ve Sinclair, 2016). *SIRT1* aracılı deasetilasyonun, hücresel yaşlanma, apoptoz, şeker, lipid metabolizması, oksidatif stres ve inflamasyon gibi birçok biyolojik süreçlerde önemli etkileri vardır. (He ve ark., 2021; Qiang ve ark., 2011; Rada ve ark., 2018; Caiyue Xu ve ark., 2020). Bu nedenle, *SIRT1* ekspresyonu ve fonksiyonunda meydana gelen küçük değişiklikler bile hücresel yanıt üzerinde önemli etkiye sahip olabilir. Tez çalışmasında, *SIRT1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda glifosat maruziyeti sonrası ≥2,57 kat; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda AMPA maruziyeti sonrası ≥ 2,63 kat anlamlı artış bulunmuştur.

Tez çalışmasında, 24 saat glifosat ve AMPA uygulanan HepG2 hücrelerinde Annexin V ve PI boyaları kullanılarak flow sitometri cihazı ile %apoptoz oranına bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarında değişiklikler gözlenmiş olup, erken apoptoz ve geç apoptoz oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler olduğu görülmüştür. HepG2 hücrelerinde 50-250 µM glifosat ve 50-500 µM AMPA maruziyeti sonrası kontrol grubu ile kıyaslandığında erken apoptozda; Glifosat maruziyet gruplarında değişiklik görülmemiş, AMPA, 100 µM maruziyet grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. Geç apoptozda; Gifosat 50 ve 250 µM maruziyet gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış, AMPA 50 100 ve 250 µM maruziyet gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. Yapılan bir araştırmada glifosat ve AMPA'nın 4 saat 0,01-5 mM maruziyet konsantrasyonlarında PBMC hücre dizisine maruziyeti sonucunda 0,5 ve 5 mM konsantrasyon grubunda glifosat ve 5 mM konsantrasyon grubunda AMPA maruziyeti sonucu kontrol grubuna kıyasla apoptozda anlamlı artış ($p<0,001$) olduğu görülmüştür (Kwiatkowska ve ark.,

2020). Yine aynı çalışmada *CASP3* ve *CASP9* aktivitelerinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir (Kwiatkowska ve ark., 2020). Başka bir çalışmada Annexin V ve PI boyaları kullanılarak flow sitometri analizi sonucu C4-2B ve PC-3 hücre dizisinde 24, 48 ve 72 saat 50 mM AMPA maruziyeti sonucunda maruziyet süresiyle doğru orantılı olarak apoptozda istatistiksel olarak %40'ın üzerinde anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (Li ve ark., 2013). Martini ve ark. (2012), yaptığı çalışmada annexin-V ve PI kullanarak 3T3-L1 hücre dizisinde (fibroblastlar) 1.55 mM konsantrasyonda glifosat içeren ticari bir ürünün, kontrole kıyasla apoptotik hücrelerin sayısında anlamlı bir artışa neden olduğunu bulmuşlardır.

BCL-2, hücrenin hayatta kalmasını teşvik eden ve apoptoza karşı koruyucu bir gen ailesidir. *BAX* geni ise mitokondriyal membran geçirgenliğini artırarak apoptozu teşvik eden pro-apoptotik bir sinyal olarak işlev görür (Goldblatt ve ark., 2021). Bir diğer apoptozu düzenleyen faktör olan kaspazlar ise bir grup sistein proteazıdır ve apoptozun gerçekleşmesinde görev alırlar. Özellikle *CASP3* ve *CASP9*'un aktivasyonu, apoptozu tetikleyen kritik faktördür (Zou ve ark., 1999). Apoptoz, hücre ölümüne yol açan süreçtir ve bu süreç mitokondri bütünlüğü ve ATP seviyesi ile ilişkili olarak şekillenmektedir. Yapılan bir araştırmada, Zebra balığı larvalarının glifosata maruz kalması sonrasında ATP seviyelerinin azaldığı ve glifosatın neden olduğu toksisitenin apoptoz ile ilişkili olabileceği gösterilmektedir (Lu ve ark., 2022). Bu araştırmada, 30, 60 ve 90 µg/ml konsantrasyonlarda 72 saat glifosata maruz kalan larvalarda *BAX* seviyelerinde artışlar ve *BCL-2* seviyelerinde azalmalar gözlenmiştir. Bununla birlikte glifosata maruz kalan larvalarda *CASP3* ve *CASP9* seviyelerinin arttığı gözlenmiştir (Lu ve ark., 2022). Diğer bir araştırmada 50-200 mg/kg glifosat ve glifosat bazlı bir herbisit formülasyonuna (Trop®) 5 gün boyunca maruz bırakılan farelerde karaciğer, akciğer ve böbrekte oksidatif stres belirteçlerinde ve aynı zamanda *p53, BAX ve BCL2* proteinlerinin ekspresyonunda anlamlı değişiklikler görülmüştür (Locatelli ve ark., 2022). Li ve ark. (2013) yaptığı çalışmada AMPA'nın, prostat kanseri hücrelerinde (C4-2B) *p53* protein seviyelerinin arttırdığını ve bunun da apoptoz ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Tez çalışmasında, apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla: *p53* geni için 100 µM konsantrasyonda glifosat 1,68 kat, 50, 100 ve 500 µM konsantrasyonda AMPA ise ≥1,49 kat anlamlı artışa; *BAX* geni için 250 µM konsantrasyonda glifosat 1,91 kat kat, 50, 100 ve 250 µM konsantrasyonlarda AMPA ise ≥1,82 kat anlamlı artışa; *CASP-3* geni geni için 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda

glifosat ≥1,37 kat, 50, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonda AMPA, ≥ 2,24 kat anlamlı artışa; *CASP-9* geni için ise 100 µM konsantrasyonda glifosat 1,83 kat, 50 µM konsantrasyonlarda AMPA, 2,51 kat anlamlı artışa neden olduğu gösterildi. Çalışılan konsantrasyon aralığında glifosat ve AMPA maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde apoptoz seviyelerindeki artış ile apoptoz ile ilşkili genlerinin mRNA seviyelerindeki artışın birbiriyle ve literatürle tutarlı olduğu gözlendi.

Sonuç olarak, tez çalışmasından elde edilen veriler de göz önüne alındığında HepG2 hücrelerindeki sitotoksik etki potansiyeleri kıyaslandığında glifosatın AMPA'ya kıyasla daha toksik olduğu gözlenmiştir. Glifosatın toksisitesinde epigenetik etkilerin rolünün incelenemesinde; global DNA metilasyonunda ve global histon modifikasyonlarında değişikliklerin gözlenmesi ve bu mekanizmalara etki eden genlerin gen ifadelerindeki değişiklikler önemli göstergeler olarak ortaya çıkmaktadır. Glifosatın ve AMPA'nın apoptozu tetiklediği ve apoptoz oluşumunda rol oynayan genlerin (*p53, BAX, CASP3, CASP9*) ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Bunun yanında, glifosat ve metaboliti AMPA'nın apoptoz ve epigenetik mekanizmalar üzerine etkileri değerlendirilmiş olup, bu mekanizmalar arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir. Özellikle hücre döngüsünün ve apoptozun kontrol edilmesinde kritik görevi olan p53 proteinin, HepG2 hücrelerinde bazı histon metil transferaz (*SUV39H1, SETD1B*) ve histon asetil transferaz (*HAT1*) enzimleri aracılığıyla dolaylı yoldan aktive edildiği ve böylece apoptozun başlatıldığı düşünülmektedir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, risk değerlendirme sürecinde glifosatın toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Abdelghani, A. (1995). Assessment of the exposure of workers applying herbicide mixtures (2, 4-D+ Roundup, Garlon-3A+ Roundup), toxicity and fate of these mixtures in the environment. *Tulane University. Department of Environmental Health Sciences*.

Acquavella, J. F., Alexander, B. H., Mandel, J. S., Gustin, C., Baker, B., Chapman, P., & Bleeke, M. (2004). Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. *Environ Health Perspect*, ***112*(3)**, 321-326.

Adams, J. M., & Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*, ***26*(1)**, 61-66.

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, ***37*(2)**, 163-176.

Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, ***26*(6)**, 390-397.

Ahmadnejad, M., Amirizadeh, N., Mehrasa, R., Karkhah, A., Nikougoftar, M., & Oodi, A. (2017). Elevated expression of DNMT1 is associated with increased expansion and proliferation of hematopoietic stem cells co-cultured with human MSCs. *Blood Research*, ***52*(1)**, 25-25.

Ait Bali, Y., Ba-Mhamed, S., & Bennis, M. (2017). Behavioral and immunohistochemical study of the effects of subchronic and chronic exposure to glyphosate in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, ***11***, 146.

Al Temimi, A. H., Amatdjais-Groenen, H. I., Reddy, Y. V., Blaauw, R. H., Guo, H., Qian, P., & Mecinović, J. (2019). The nucleophilic amino group of lysine is central for histone lysine methyltransferase catalysis. *Communications Chemistry*, ***2*(1)**, 112.

Ali, A. G., Mohamed, M. F., Abdelhamid, A. O., & Mohamed, M. S. (2017). A novel adamantane thiadiazole derivative induces mitochondria-mediated apoptosis in lung carcinoma cell line. *Bioorganic & medicinal chemistry*, ***25*(1)**, 241-253.

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., & Boyd, M. R. (1988).

Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research*, ***48*****(3)**, 589-601.

Alvarez-Moya, C., Silva, M. R., Ramírez, C. V., Gallardo, D. G., Sánchez, R. L., Aguirre, A. C., & Velasco, A. F. (2014). Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Genet Mol Biol*, ***37*****(1)**, 105-110.

Anadón, A., del Pino, J., Martínez, M. A., Caballero, V., Ares, I., Nieto, I., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2008). Neurotoxicological effects of the herbicide glyphosate. *Toxicology Letters***(180)**, S164.

Antoniou, M., Habib, M., Howard, C., Jennings, R. C., Leifert, C., Nodari, R., Robinson, C., & Fagan, J. (2012). Teratogenic effects of glyphosate-based herbicides: divergence of regulatory decisions from scientific evidence. *J Environ Anal Toxicol S*, ***4*****(006)**, 2161-0525.

Arisan, S., Buyuktuncer, E. D., Palavan-Unsal, N., Caşkurlu, T., Cakir, O. O., & Ergenekon, E. (2005). Increased expression of EZH2, a polycomb group protein, in bladder carcinoma. *Urol Int*, ***75*****(3)**, 252-257.

Avigliano, L., Alvarez, N., Loughlin, C. M., & Rodríguez, E. M. (2014). Effects of glyphosate on egg incubation, larvae hatching, and ovarian rematuration in the estuarine crab Neohelice granulata. *Environmental toxicology and chemistry*, ***33*****(8)**, 1879-1884.

Babalola, O. O., Truter, J. C., & van Wyk, J. H. (2019). Mortality, teratogenicity and growth inhibition of three glyphosate formulations using Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus. *Journal of Applied Toxicology*, ***39*****(9)**, 1257-1266.

Baguet, A., & Bix, M. (2004). Chromatin landscape dynamics of the Il4–Il13 locus during T helper 1 and 2 development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***101*****(31)**, 11410-11415.

Baier, C. J., Gallegos, C. E., Raisman-Vozari, R., & Minetti, A. (2017). Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. *Neurotoxicology and teratology*, ***64***, 63-72.

Battaglin, W. A., Meyer, M. T., Kuivila, K. M., & Dietze, J. E. (2014). Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, ***50*****(2)**, 275-290.

Ben Maamar, M., Beck, D., Nilsson, E. E., Kubsad, D., & Skinner, M. K. (2021). Epigenome-wide association study for glyphosate induced transgenerational sperm DNA methylation and histone retention epigenetic biomarkers for disease. *Epigenetics*, ***16*(10)**, 1150-1167.

Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, ***28*(1)**, 3-3.

Benedetti, D., Lopes Alderete, B., de Souza, C. T., Ferraz Dias, J., Niekraszewicz, L., Cappetta, M., Martínez-López, W., & Da Silva, J. (2018). DNA damage and epigenetic alteration in soybean farmers exposed to complex mixture of pesticides. *Mutagenesis*, ***33*(1)**, 87-95.

Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, ***447*(7143)**, 407-412.

Boix-Chornet, M., Fraga, M. F., Villar-Garea, A., Caballero, R., Espada, J., Nunez, A., Casado, J., Largo, C., Casal, J. I., & Cigudosa, J. C. (2006). Release of hypoacetylated and trimethylated histone H4 is an epigenetic marker of early apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, ***281*(19)**, 13540-13547.

Bonkowski, M. S., & Sinclair, D. A. (2016). Slowing ageing by design: the rise of NAD+ and sirtuin-activating compounds. *Nature reviews Molecular cell biology*, ***17*(11)**, 679-690.

Bonnet, J. L., Bonnemoy, F., Dusser, M., & Bohatier, J. (2007). Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria Vibrio fischeri and the ciliate Tetrahymena pyriformis. *Environ Toxicol*, ***22*(1)**, 78-91.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, ***72***, 248-254.

Brewster, D. W., Warren, J., & Hopkins II, W. E. (1991). Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundamental and applied toxicology*, ***17*(1)**, 43-51.

Brunetti, R., Maradey, J. A., Dearmin, R. S., Belford, P. M., & Bhave, P. D. (2020). Electrocardiographic abnormalities associated with acute glyphosate toxicity. *HeartRhythm Case Reports*, ***6*(2)**, 63-66.

Brustel, J., Tardat, M., Kirsh, O., Grimaud, C., & Julien, E. (2011). Coupling mitosis to DNA replication: the emerging role of the histone H4-lysine 20 methyltransferase PR-Set7. *Trends Cell Biol*, ***21*****(8)**, 452-460.

Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S., & Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, ***298*****(5595)**, 1039-1043.

Chan, P., & Mahler, J. (1992). NTP technical report on the toxicity studies of Glyphosate (CAS No. 1071-83-6) Administered In Dosed Feed To F344/N Rats And B6C3F1 Mice. *Toxic Rep Ser*, ***16***, 1-D3.

Chang, E. T., & Delzell, E. (2016). Systematic review and meta-analysis of glyphosate exposure and risk of lymphohematopoietic cancers. *J Environ Sci Health B*, ***51*****(6)**, 402-434.

Chen, D., Li, T., Wang, C., Lei, G., Wang, R., Wang, Z., Yu, L., Yan, J., Zhang, P., & Wang, X. (2019). High-level SETD1B gene expression is associated with unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Molecular medicine reports*, ***19*****(3)**, 1587-1594.

Chen, M. W., Hua, K. T., Kao, H. J., Chi, C. C., Wei, L. H., Johansson, G., Shiah, S. G., Chen, P. S., Jeng, Y. M., Cheng, T. Y., Lai, T. C., Chang, J. S., Jan, Y. H., Chien, M. H., Yang, C. J., Huang, M. S., Hsiao, M., & Kuo, M. L. (2010). H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM. *Cancer Res*, ***70*****(20)**, 7830-7840.

Chiesa, L. M., Nobile, M., Panseri, S., & Arioli, F. (2019). Detection of glyphosate and its metabolites in food of animal origin based on ion-chromatography-high resolution mass spectrometry (IC-HRMS). *Food Additives & Contaminants: Part A*, ***36*****(4)**, 592-600.

Christman, J. K. (1982). Separation of major and minor deoxyribonucleoside monophosphates by reverse-phase high-performance liquid chromatography: a simple method applicable to quantitation of methylated nucleotides in DNA. *Anal Biochem*, ***119*****(1)**, 38-48.

Clair, É., Mesnage, R., Travert, C., & Séralini, G.-É. (2012). A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicology in vitro*, ***26*****(2)**, 269-279.

Collins, R., & Cheng, X. (2010). A case study in cross-talk: the histone lysine methyltransferases G9a and GLP. *Nucleic acids research*, ***38*****(11)**, 3503-3511.

Conley, B. A., Wright, J. J., & Kummar, S. (2006). Targeting epigenetic abnormalities with histone deacetylase inhibitors. *Cancer*, ***107*****(4)**, 832-840.

Curtin, J. F., & Cotter, T. G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*, ***15*****(11)**, 983-992.

Curwin, B. D., Hein, M. J., Sanderson, W. T., Nishioka, M. G., Reynolds, S. J., Ward, E. M., & Alavanja, M. C. (2005). Pesticide contamination inside farm and nonfarm homes. *J Occup Environ Hyg*, ***2*****(7)**, 357-367.

Curwin, B. D., Hein, M. J., Sanderson, W. T., Striley, C., Heederik, D., Kromhout, H., Reynolds, S. J., & Alavanja, M. C. (2007). Pesticide dose estimates for children of Iowa farmers and non-farmers. *Environ Res*, ***105*****(3)**, 307-315.

Dallegrave, E., Mantese, F. D., Oliveira, R. T., Andrade, A. J., Dalsenter, P. R., & Langeloh, A. (2007). Pre-and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Archives of toxicology*, ***81***, 665-673.

Daniel, V., Huber, W., Bauer, K., Suesal, C., Mytilineos, J., Melk, A., Conradt, C., & Opelz, G. (2001). Association of elevated blood levels of pentachlorophenol (PCP) with cellular and humoral immunodeficiencies. *Arch Environ Health*, ***56*****(1)**, 77-83.

Davie, J. R., Xu, W., & Delcuve, G. P. (2015). Histone H3K4 trimethylation: dynamic interplay with pre-mRNA splicing. *Biochemistry and Cell Biology*, ***94*****(1)**, 1-11.

Davoren, M. J., & Schiestl, R. H. (2018). Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research. *Carcinogenesis*, ***39*****(10)**, 1207-1215.

de María, N., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I., Hernandez, A., De Felipe, M. R., & Fernandez-Pascual, M. (2006). New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: Role of shikimate accumulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, ***54*****(7)**, 2621-2628.

de Souza Prestes, A., Dos Santos, M. M., Ecker, A., de Macedo, G. T., Fachinetto, R., Bressan, G. N., da Rocha, J. B. T., & Barbosa, N. V. (2019). Methylglyoxal disturbs the expression of antioxidant, apoptotic and glycation

responsive genes and triggers programmed cell death in human leukocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, ***55***, 33-42.

Djeghloul, D., Kuranda, K., Kuzniak, I., Barbieri, D., Naguibneva, I., Choisy, C., Bories, J. C., Dosquet, C., Pla, M., Vanneaux, V., Socié, G., Porteu, F., Garrick, D., & Goodhardt, M. (2016). Age-Associated Decrease of the Histone Methyltransferase SUV39H1 in HSC Perturbs Heterochromatin and B Lymphoid Differentiation. *Stem Cell Reports*, ***6*(6)**, 970-984.

Doherty, L. F., Bromer, J. G., Zhou, Y., Aldad, T. S., & Taylor, H. S. (2010). In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Hormones & cancer*, ***1*(3)**, 146-155.

Duforestel, M., Nadaradjane, A., Bougras-Cartron, G., Briand, J., Olivier, C., Frenel, J. S., Vallette, F. M., Lelievre, S. A., & Cartron, P. F. (2019). Glyphosate Primes Mammary Cells for Tumorigenesis by Reprogramming the Epigenome in a TET3-Dependent Manner. *Front Genet*, ***10***, 885.

Duke, S., & Powles, S. B. (2009). Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. *AgBioforum*, ***12*(3,4)**, 346-357.

ECHA (European Chemicals Agency). (2021). Proposing Harmonised Classification and Labelling at EU Level of Glyphosate. https://echa.europa.eu/documents/10162/2f8b5c7f-030f-5d3a-e87e-0262fb392f3. Erişim tarihi: 10.09.2021.

EFSA (European Food Safety Authority). (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, ***13*(11)**, 4302.

EFSA (European Food Safety Authority). (2018). Review of the existing maximum residue levels for pencycuron according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal*, ***16*(12)**, 5518.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, ***429*(6990)**, 457-463.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, ***35*(4)**, 495-516.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (1993). Reregistration Eligibility Decision (RED): Glyphosate; EPA-738-R-93-014; Office of Prevention, Pesticides, and

Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2009). Memorandum: Updated review of glyphosate (103601) incident report. U.S. .

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2017). Revised Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential EPA's Office of Pesticide Programs.

Ergun, H., & Cayir, A. (2021). Exposure to glyphosate and tetrachlorvinphos induces cytotoxicity and global DNA methylation in human cells. *Toxicol Ind Health*, ***37*****(10)**, 610-618.

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, ***8*****(4)**, 286-298.

Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, ***358*****(11)**, 1148-1159.

Estève, P.-O., Chin, H. G., Smallwood, A., Feehery, G. R., Gangisetty, O., Karpf, A. R., Carey, M. F., & Pradhan, S. (2006). Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes & development*, ***20*****(22)**, 3089-3103.

Feil, R., & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature reviews genetics*, ***13*****(2)**, 97-109.

Flach, H., Lenz, A., Pfeffer, S., Kühl, M., & Kühl, S. J. (2022). Impact of glyphosate-based herbicide on early embryonic development of the amphibian Xenopus laevis. *Aquatic Toxicology*, ***244***, 106081.

Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, ***160*****(2)**, 171-177.

Fratelli, M., Goodwin, L. O., Orom, U. A., Lombardi, S., Tonelli, R., Mengozzi, M., & Ghezzi, P. (2005). Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, ***102*****(39)**, 13998-14003.

Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A., Sugimoto, J., Oda, T., Miura, K., Miyazaki, T., Ogura, C., Okazaki, Y., & Jinno, Y. (2004). Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet*, ***68*****(Pt 3)**, 196-204.

Gao, H., Chen, J., Ding, F., Chou, X., Zhang, X., Wan, Y., Hu, J., & Wu, Q. (2019). Activation of the N-methyl-d-aspartate receptor is involved in glyphosate-induced renal proximal tubule cell apoptosis. *Journal of Applied Toxicology*, ***39*(8)**, 1096-1107.

Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, ***6*(269)**, pl1.

Gasnier, C., Benachour, N., Clair, E., Travert, C., Langlois, F., Laurant, C., Decroix-Laporte, C., & Séralini, G.-E. (2010). Dig1 protects against cell death provoked by glyphosate-based herbicides in human liver cell lines. *Journal of occupational medicine and toxicology*, ***5*(1)**, 1-13.

Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M. C., & Seralini, G. E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, ***262*(3)**, 184-191.

Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H., & Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, ***300*(5618)**, 489-492.

Gaur, H., & Bhargava, A. (2019). Glyphosate induces toxicity and modulates calcium and NO signaling in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, ***513*(4)**, 1070-1075.

Gazzaniga, P., Gradilone, A., Vercillo, R., Gandini, O., Silvestri, I., Napolitano, M., Albonici, L., Vincenzoni, A., Gallucci, M., Frati, L., & Agliano, A. M. (1996). Bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low-grade urinary bladder cancer. *Int J Cancer*, ***69*(2)**, 100-104.

George, J., Prasad, S., Mahmood, Z., & Shukla, Y. (2010). Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: a proteomic approach. *J Proteomics*, ***73*(5)**, 951-964.

Gerişlioğlu, A., Güngörmüş, C., Korkmaz, A., & Kolankaya, D. (2010). Embryotoxic and teratogenic effects of Roundup® Max on rat development. *Toxicology Letters***(196)**, S184-S185.

Gholami-Seyedkolaei, S. J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., & Kosari, A. A. (2013). Effect of a glyphosate-based herbicide in Cyprinus carpio: Assessment of

acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, ***98***, 135-141.

Gibson, W. T., Hood, R. L., Zhan, S. H., Bulman, D. E., Fejes, A. P., Moore, R., Mungall, A. J., Eydoux, P., Babul-Hirji, R., An, J., Marra, M. A., Chitayat, D., Boycott, K. M., Weaver, D. D., & Jones, S. J. (2012). Mutations in EZH2 cause Weaver syndrome. *Am J Hum Genet*, ***90*(1)**, 110-118.

Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, ***16*(2)**, 401-426.

Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, ***16*(6)**, 2129-2144.

Goldblatt, Z. E., Cirka, H. A., & Billiar, K. L. (2021). Mechanical regulation of apoptosis in the cardiovascular system. *Annals of biomedical engineering*, ***49***, 75-97.

Gomez, A. L., Altamirano, G. A., Leturia, J., Bosquiazzo, V. L., Munoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2019). Male mammary gland development and methylation status of estrogen receptor alpha in Wistar rats are modified by the developmental exposure to a glyphosate-based herbicide. *Mol Cell Endocrinol*, ***481***, 14-25.

Grant, P. A. (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biol*, ***2*(4)**, REVIEWS0003.

Greer, E. L., & Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature reviews genetics*, ***13*(5)**, 343-357.

Gress, S., Lemoine, S., Séralini, G.-E., & Puddu, P. E. (2015). Glyphosate-based herbicides potently affect cardiovascular system in mammals: review of the literature. *Cardiovascular toxicology*, ***15***, 117-126.

Gu, H., Gao, J., Guo, W., Zhou, Y., & Kong, Q. (2017). The expression of DNA methyltransferases3A is specifically downregulated in chorionic villi of early embryo growth arrest cases. *Molecular medicine reports*, ***16*(1)**, 591-596.

Gui, Y. X., Fan, X. N., Wang, H. M., Wang, G., & Chen, S. D. (2012). Glyphosate induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms. *Neurotoxicol Teratol*, ***34*(3)**, 344-349.

Gunarathna, S., Gunawardana, B., Jayaweera, M., Manatunge, J., & Zoysa, K. (2018). Glyphosate and AMPA of agricultural soil, surface water, groundwater and

sediments in areas prevalent with chronic kidney disease of unknown etiology, Sri Lanka. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, ***53*****(11)**, 729-737.

Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol*, ***16*****(5)**, 490-491.

Güleş, Ö., & Eren, Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, ***19*****(2)**, 73-78.

Han, N., Shi, L., Guo, Q., Sun, W., Yu, Y., Yang, L., Zhang, X., & Zhang, M. (2017). HAT1 induces lung cancer cell apoptosis via up regulating Fas. *Oncotarget*, ***8*****(52)**, 89970.

Hao, Y., Zhang, Y., Ni, H., Gao, J., Yang, Y., Xu, W., & Tao, L. (2019). Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. *J Environ Sci Health B*, ***54*****(9)**, 737-744.

Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*, ***2014***, 150845.

He, F., Li, Q., Sheng, B., Yang, H., & Jiang, W. (2021). SIRT1 Inhibits Apoptosis by Promoting Autophagic Flux in Human Nucleus Pulposus Cells in the Key Stage of Degeneration via ERK Signal Pathway. *Biomed Res Int*, ***2021***, 8818713.

Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, ***349*****(21)**, 2042-2054.

Hervouet, E., Lalier, L., Debien, E., Cheray, M., Geairon, A., Rogniaux, H., Loussouarn, D., Martin, S. A., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2010). Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PloS one*, ***5*****(6)**, e11333.

Hori, Y., Fujisawa, M., Shimada, K., & Hirose, Y. (2003). Determination of the herbicide glyphosate and its metabolite in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. A case of poisoning by Roundup® herbicide. *Journal of analytical toxicology*, ***27*****(3)**, 162-166.

Hou, L., Li, Q., Yu, Y., Li, M., & Zhang, D. (2016). SET8 induces epithelial-mesenchymal transition and enhances prostate cancer cell metastasis by cooperating with ZEB1. *Mol Med Rep*, ***13*****(2)**, 1681-1688.

Hua, K.-T., Wang, M.-Y., Chen, M.-W., Wei, L.-H., Chen, C.-K., Ko, C.-H., Jeng, Y.-M., Sung, P.-L., Jan, Y.-H., & Hsiao, M. (2014). The H3K9 methyltransferase G9a is a marker of aggressive ovarian cancer that promotes peritoneal metastasis. *Molecular cancer*, ***13*****(1)**, 1-13.

Huang, J., Dorsey, J., Chuikov, S., Zhang, X., Jenuwein, T., Reinberg, D., & Berger, S. L. (2010). G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *Journal of Biological Chemistry*, ***285*****(13)**, 9636-9641.

Huang, Q., Su, H., Qi, B., Wang, Y., Yan, K., Wang, X., Li, X., & Zhao, D. (2021). A SIRT1 Activator, Ginsenoside Rc, Promotes Energy Metabolism in Cardiomyocytes and Neurons. *J Am Chem Soc*, ***143*****(3)**, 1416-1427.

Huang, T., Zhang, P., Li, W., Zhao, T., Zhang, Z., Chen, S., Yang, Y., Feng, Y., Li, F., Shirley Liu, X., Zhang, L., Jiang, G., & Zhang, F. (2017). G9A promotes tumor cell growth and invasion by silencing CASP1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cell death & disease*, ***8*****(4)**, e2726-e2726.

IARC (International Agency For Research On Cancer). (2015). Some organophosphate insecticides and herbicides: tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate. IARC working group. Mart 2015. IARC Monogr. Eval Carcinog Risks Chem Hum. ***112***, 1-92.

IFEN (Institut français de l'environnement). (2006). Report on pesticides in waters: In Dossier. ***5***, 15-20.

Iizuka, M., & Smith, M. M. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev*, ***13*****(2)**, 154-160.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). (1994). Glyphosate. Environmental Health Criteria. Geneva, Switzerland: World Health Organization. ISBN 92-4-157159-4., ***159***.

Jacob, G., Garbow, J., Hallas, L., Kimack, N., Kishore, G., & Schaefer, J. (1988). Metabolism of glyphosate in Pseudomonas sp. strain LBr. *Applied and environmental microbiology*, ***54*****(12)**, 2953-2958.

Jasper, R., Locatelli, G. O., Pilati, C., & Locatelli, C. (2013). Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. *Interdisciplinary Toxicology*, ***5*****(3)**, 133-140.

Jauhiainen, A., Räsänen, K., Sarantila, R., Nuutinen, J., & Kangas, J. (1991). Occupational exposure of forest workers to glyphosate during brush saw spraying work. *Am Ind Hyg Assoc J*, ***52*****(2)**, 61-64.

Jeon, S., Lee, S.-H., Roh, J., Kim, J.-E., & Bunch, H. (2020). Glyphosate influences cell proliferation in vitro. *All Life*, ***13*****(1)**, 54-65.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, ***128*****(4)**, 683-692.

Jones, P. A., & Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, ***293*****(5532)**, 1068-1070.

Jorgensen, S., Schotta, G., & Sorensen, C. S. (2013). Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res*, ***41*****(5)**, 2797-2806.

Kam, P. C., & Ferch, N. I. (2000). Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*, ***55*****(11)**, 1081-1093.

Kanev, M. O., & Muranlı, F. D. G. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, ***20*****(1)**, 33-38.

Kašuba, V., Milić, M., Rozgaj, R., Kopjar, N., Mladinić, M., Žunec, S., Vrdoljak, A. L., Pavičić, I., Čermak, A. M. M., Pizent, A., Lovaković, B. T., & Želježić, D. (2017). Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. *Environ Sci Pollut Res Int*, ***24*****(23)**, 19267-19281.

Kim, J. K., Esteve, P.-O., Jacobsen, S. E., & Pradhan, S. (2009). UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. *Nucleic acids research*, ***37*****(2)**, 493-505.

Kolpin, D. W., Thurman, E. M., Lee, E. A., Meyer, M. T., Furlong, E. T., & Glassmeyer, S. T. (2006). Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment*, ***354*****(2-3)**, 191-197.

Kondo, Y., Shen, L., Suzuki, S., Kurokawa, T., Masuko, K., Tanaka, Y., Kato, H., Mizuno, Y., Yokoe, M., & Sugauchi, F. (2007). Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatology research*, ***37*****(11)**, 974-983.

Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., & Skoultchi, A. I. (2003). Involvement of histone H1. 2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell*, ***114*****(6)**, 673-688.

Kranz, A., & Anastassiadis, K. (2020). The role of SETD1A and SETD1B in development and disease. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, ***1863*****(8)**, 194578.

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, ***87*****(1)**, 99-163.

Kubsad, D., Nilsson, E. E., King, S. E., Sadler-Riggleman, I., Beck, D., & Skinner, M. K. (2019). Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology. *Sci Rep*, ***9*****(1)**, 6372.

Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*, ***70***, 27-56.

Kwiatkowska, M., Michalowicz, J., Jarosiewicz, P., Pingot, D., Sicinska, P., Huras, B., Zakrzewski, J., Jarosiewicz, M., & Bukowska, B. (2020). Evaluation of apoptotic potential of glyphosate metabolites and impurities in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem Toxicol*, ***135***, 110888.

Kwiatkowska, M., Nowacka-Krukowska, H., & Bukowska, B. (2014). The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, ***37*****(3)**, 1101-1108.

Kwiatkowska, M., Reszka, E., Woźniak, K., Jabłońska, E., Michałowicz, J., & Bukowska, B. (2017). DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem Toxicol*, ***105***, 93-98.

Lai, J.-C., Cheng, Y.-W., Goan, Y.-G., Chang, J. T., Wu, T.-C., Chen, C.-Y., & Lee, H. (2008). Promoter methylation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase in lung cancer is regulated by p53. *DNA repair*, ***7*****(8)**, 1352-1363.

Lai, Y. S., Chen, J. Y., Tsai, H. J., Chen, T. Y., & Hung, W. C. (2015). The SUV39H1 inhibitor chaetocin induces differentiation and shows synergistic cytotoxicity with other epigenetic drugs in acute myeloid leukemia cells. *Blood cancer journal*, ***5***, e313-e313.

Landrigan, P. J., & Goldman, L. R. (2011). Children's vulnerability to toxic chemicals: a challenge and opportunity to strengthen health and environmental policy. *Health Aff (Millwood)*, ***30*****(5)**, 842-850.

Lanzarin, G. A., Felix, L. M., Santos, D., Venancio, C. A., & Monteiro, S. M. (2019). Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation–Roundup® UltraMax-on the early zebrafish embryogenesis. *Chemosphere*, ***223***, 514-522.

Lares, B. A., Vignatti, A. M., Echaniz, S. A., & Gutiérrez, M. F. (2022). Effects of glyphosate on cladocera: A synthetic review. *Aquat Toxicol*, ***249***, 106232.

Laura, B. (2008). Epigenomics: The new tool in studying complex diseases. *Nature Education*, ***1*****(1)**, 178.

Lazarus, K. A., Hadi, F., Zambon, E., Bach, K., Santolla, M. F., Watson, J. K., Correia, L. L., Das, M., Ugur, R., Pensa, S., Becker, L., Campos, L. S., Ladds, G., Liu, P., Evan, G. I., McCaughan, F. M., Le Quesne, J., Lee, J. H., Calado, D., & Khaled, W. T. (2018). BCL11A interacts with SOX2 to control the expression of epigenetic regulators in lung squamous carcinoma. *Nat Commun*, ***9*****(1)**, 3327.

Le Du-Carrée, J., Saliou, F., Cachot, J., Morin, T., & Danion, M. (2021). Developmental effect of parental or direct chronic exposure to environmental concentration of glyphosate on the larvae of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. *Aquatic Toxicology*, ***237***, 105894.

Lehnertz, B., Pabst, C., Su, L., Miller, M., Liu, F., Yi, L., Zhang, R., Krosl, J., Yung, E., & Kirschner, J. (2014). The methyltransferase G9a regulates HoxA9-dependent transcription in AML. *Genes & development*, ***28*****(4)**, 317-327.

Li, Q., Lambrechts, M. J., Zhang, Q., Liu, S., Ge, D., Yin, R., Xi, M., & You, Z. (2013). Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. *Drug Des Devel Ther*, ***7***, 635-643.

Liang, D., Zhuo, Y., Guo, Z., He, L., Wang, X., He, Y., Li, L., & Dai, H. (2020). SIRT1/PGC-1 pathway activation triggers autophagy/mitophagy and attenuates oxidative damage in intestinal epithelial cells. *Biochimie*, ***170***, 10-20.

Liao, T., Wang, Y. J., Hu, J. Q., Wang, Y., Han, L. T., Ma, B., Shi, R. L., Qu, N., Wei, W. J., Guan, Q., Xiang, J., Chen, J. Y., Sun, G. H., Li, D. S., Mu, X. M., & Ji, Q. H. (2018). Histone methyltransferase KMT5A gene modulates oncogenesis and lipid metabolism of papillary thyroid cancer in vitro. *Oncol Rep*, ***39*****(5)**, 2185-2192.

Liu, H., Su, D., Zhang, J., Ge, S., Li, Y., Wang, F., Gravel, M., Roulston, A., Song, Q., Xu, W., Liang, J. G., Shore, G., Wang, X., & Liang, P. (2017). Improvement of Pharmacokinetic Profile of TRAIL via Trimer-Tag Enhances its Antitumor Activity in vivo. *Sci Rep*, ***7*****(1)**, 8953.

Locatelli, C., Zancanaro, V., Bellaver, E., & Baratto, C. (2022). Glyphosate-Induced Oxidative Stress, Genotoxic Effect and Differential Expression of P53, Bax and Bcl2 in Different Mice Tissues.

Lomonosova, E., & Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, ***27 Suppl 1***, S2-19.

Lorenz, V., Milesi, M. M., Schimpf, M. G., Luque, E. H., & Varayoud, J. (2019). Epigenetic disruption of estrogen receptor alpha is induced by a glyphosate-based herbicide in the preimplantation uterus of rats. *Molecular and cellular endocrinology*, ***480***, 133-141.

Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J. P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S. Y., & Almouzni, G. (2009). The HP1α–CAF1–SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO reports*, ***10*(7)**, 769-775.

Lu, J., Wang, W., Zhang, C., Xu, W., Chen, W., Tao, L., Li, Z., Cheng, J., & Zhang, Y. (2022). Characterization of glyphosate-induced cardiovascular toxicity and apoptosis in zebrafish. *Science of the Total Environment*, ***851***, 158308.

Lu, Z., Tian, Y., Salwen, H. R., Chlenski, A., Godley, L. A., Raj, J. U., & Yang, Q. (2013). Histone lysine methyltransferase EHMT2 is involved in proliferation, apoptosis, cell invasion and DNA methylation of human neuroblastoma cells. *Anti-cancer drugs*, ***24*(5)**, 484.

Lueken, A., Juhl-Strauss, U., Krieger, G., & Witte, I. (2004). Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H2O2) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicol Lett*, ***147*(1)**, 35-43.

Lushchak, O. V., Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, ***76*(7)**, 932-937.

Ma, Z. (2018). Downregulation of SETD8 by miR-382 is involved in glioma progression. *Pathol Res Pract*, ***214*(3)**, 356-360.

Mahalingaiah, P. K. S., Ponnusamy, L., & Singh, K. P. (2015). Chronic oxidative stress causes estrogen-independent aggressive phenotype, and epigenetic inactivation of estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, ***153*(1)**, 41-56.

Malatesta, M., Perdoni, F., Santin, G., Battistelli, S., Muller, S., & Biggiogera, M. (2008). Hepatoma tissue culture (HTC) cells as a model for investigating the effects of low concentrations of herbicide on cell structure and function. *Toxicol In Vitro*, ***22*****(8)**, 1853-1860.

Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., Ovando, H. G., Weyers, A., Ugnia, L., Cid, M. G., Larripa, I., & Gorla, N. (2009). Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environ Toxicol Pharmacol*, ***28*****(1)**, 37-41.

Mansour, S. A., & Mossa, A.-T. H. (2010). Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, ***96*****(1)**, 14-23.

Martinez, M. A., Rodriguez, J. L., Lopez-Torres, B., Martinez, M., Martinez-Larranaga, M. R., Maximiliano, J. E., Anadon, A., & Ares, I. (2020). Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ Int*, ***135***, 105414.

Martini, C. N., Gabrielli, M., & Vila Mdel, C. (2012). A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicol In Vitro*, ***26*****(6)**, 1007-1013.

Mattson, M. P. (2006). Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal*, ***8*****(11-12)**, 1997-2006.

McGuire, M. K., McGuire, M. A., Price, W. J., Shafii, B., Carrothers, J. M., Lackey, K. A., Goldstein, D. A., Jensen, P. K., & Vicini, J. L. (2016). Glyphosate and aminomethylphosphonic acid are not detectable in human milk. *Am J Clin Nutr*, ***103*****(5)**, 1285-1290.

Mehtiyev, T., Karaman, E. F., & Ozden, S. (2023). Alterations in cell viability, reactive oxygen species production, and modulation of gene expression involved in mitogen–activated protein kinase/extracellular regulating kinase signaling pathway by glyphosate and its commercial formulation in hepatocellular carcinoma cells. *Toxicology and Industrial Health*, ***39*****(2)**, 81-93.

Meng, C. F., Su, B., & Li, W. (2011). DNA demethylation is superior to histone acetylation for reactivating cancer-associated genes in ovarian cancer cells. *Mol Med Rep*, ***4*****(6)**, 1273-1278.

Meng, C. F., Zhu, X. J., Peng, G., & Dai, D. Q. (2007). Re-expression of methylation-induced tumor suppressor gene silencing is associated with the state of histone modification in gastric cancer cell lines. *World J Gastroenterol*, ***13*(46)**, 6166-6171.

Mesnage, R., Arno, M., Costanzo, M., Malatesta, M., Séralini, G.-E., & Antoniou, M. N. (2015a). Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. *Environmental Health*, ***14***, 1-14.

Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2015b). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol*, ***84***, 133-153.

Mesnage, R., Renney, G., Séralini, G.-E., Ward, M., & Antoniou, M. N. (2017). Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Scientific reports*, ***7*(1)**, 39328.

Milic, M., Zunec, S., Micek, V., Kasuba, V., Mikolic, A., Lovakovic, B. T., Semren, T. Z., Pavicic, I., Cermak, A. M. M., Pizent, A., Vrdoljak, A. L., Valencia-Quintana, R., Sanchez-Alarcon, J., & Zeljezic, 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*(2)**, 154-168.

Milite, C., Feoli, A., Viviano, M., Rescigno, D., Cianciulli, A., Balzano, A. L., Mai, A., Castellano, S., & Sbardella, G. (2016). The emerging role of lysine methyltransferase SETD8 in human diseases. *Clin Epigenetics*, ***8***, 102.

Milner, C. M., & Campbell, R. D. (1993). The G9a gene in the human major histocompatibility complex encodes a novel protein containing ankyrin-like repeats. *Biochemical Journal*, ***290*(3)**, 811-818.

Mitchell, D. G., Chapman, P. M., & Long, T. J. (1987). Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bull Environ Contam Toxicol*, ***39*(6)**, 1028-1035.

Mladinic, M., Berend, S., Vrdoljak, A. L., Kopjar, N., Radic, B., & Zeljezic, D. (2009). Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen*, ***50*(9)**, 800-807.

Molin, W. T. (1998). Glyphosate, a Unique Global Herbicide. J. E. Franz, M. K. Mao, and J. A. Sikorski, ACS Monograph 189, 1997. 653 pp. *Weed Technology*, ***12*****(3)**, 564-565.

Monroy, C. M., Cortés, A. C., Sicard, D. M., & de Restrepo, H. G. (2005). [Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed in vitro to glyphosate]. *Biomedica*, ***25*****(3)**, 335-345. (Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato.)

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, ***65*****(1-2)**, 55-63.

Mutlu, E., & Gültekin, M. (2016). Akım sitometride veri analizi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Dergisi*, ***45*****(4)**, 155-159.

Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., & Oren, M. (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *The Journal of experimental medicine*, ***188*****(11)**, 2033-2045.

Müller, M. M., Rosenberg, C., Siltanen, H., & Wartiovaara, T. (1981). Fate of glyphosate and its influence on nitrogen-cycling in two Finnish agriculture soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, ***27***, 724-730.

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. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health*, ***15*****(1)**, 1-13.

Nagarajan, P., Ge, Z., Sirbu, B., Doughty, C., Agudelo Garcia, P. A., Schlederer, M., Annunziato, A. T., Cortez, D., Kenner, L., & Parthun, M. R. (2013). Histone acetyl transferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones H3 and H4. *PLoS Genet*, ***9*****(6)**, e1003518.

Nakanishi, S., Sanderson, B. W., Delventhal, K. M., Bradford, W. D., Staehling-Hampton, K., & Shilatifard, A. (2008). A comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation. *Nature structural & molecular biology*, ***15*****(8)**, 881-888.

Nikolaou, K. C., Moulos, P., Chalepakis, G., Hatzis, P., Oda, H., Reinberg, D., & Talianidis, I. (2015). Spontaneous development of hepatocellular carcinoma with cancer stem cell properties in PR-SET7-deficient livers. *Embo j*, ***34*(4)**, 430-447.

Nishioka, K., Rice, J. C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., Lis, J. T., Allis, C. D., & Reinberg, D. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell*, ***9*(6)**, 1201-1213.

Obeng, E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol*, ***81*(4)**, 1133-1143.

Okada, H., & Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, ***4*(8)**, 592-603.

Olcina, M., Leszczynska, K., Senra, J., Isa, N., Harada, H., & Hammond, E. (2016). H3K9me3 facilitates hypoxia-induced p53-dependent apoptosis through repression of APAK. *Oncogene*, ***35*(6)**, 793-799.

Olorunsogo, O. O., Bababunmi, E. A., & Bassir, O. (1979). Effect of glyphosate on rat liver mitochondria in vivo. *Bull Environ Contam Toxicol*, ***22*(3)**, 357-364.

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*(3)**, 179-185.

Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., & Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, ***3*(2)**, 115-121.

Pacaud, R., Brocard, E., Lalier, L., Hervouet, E., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2014). The DNMT1/PCNA/UHRF1 disruption induces tumorigenesis characterized by similar genetic and epigenetic signatures. *Scientific reports*, ***4*(1)**, 4230.

Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S. L., & Carrasco, A. E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical research in toxicology*, ***23*(10)**, 1586-1595.

Palmer, A. M., Greengrass, P. M., Cavalla, D., & Society for Medicines, R. (2000). The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News Perspect*, ***13*(6)**, 378-384.

Panetto, O. S., Gomes, H. F., Gomes, D. S. F., Campos, E., Romeiro, N. C., Costa, E. P., do Carmo, P. R., Feitosa, N. M., & Moraes, J. (2019). The effects of Roundup® in embryo development and energy metabolism of the zebrafish (Danio rerio). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, ***222***, 74-81.

Paz-y-Miño, C., Sánchez, M. E., Arévalo, M., Muñoz, M. J., Witte, T., De-la-Carrera, G. O., & Leone, P. E. (2007). Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics and Molecular Biology*, ***30***, 456-460.

Peterson, C. L., & Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, ***14*****(14)**, R546-R551.

Qi, L., Dong, Y. M., Chao, H., Zhao, P., Ma, S. L., & Li, G. (2023). Glyphosate based-herbicide disrupts energy metabolism and activates inflammatory response through oxidative stress in mice liver. *Chemosphere*, ***315***, 137751.

Qiang, L., Lin, H. V., Kim-Muller, J. Y., Welch, C. L., Gu, W., & Accili, D. (2011). Proatherogenic abnormalities of lipid metabolism in SirT1 transgenic mice are mediated through Creb deacetylation. *Cell Metab*, ***14*****(6)**, 758-767.

Rada, P., Pardo, V., Mobasher, M. A., García-Martínez, I., Ruiz, L., González-Rodríguez, Á., Sanchez-Ramos, C., Muntané, J., Alemany, S., James, L. P., Simpson, K. J., Monsalve, M., Valdecantos, M. P., & Valverde Á, M. (2018). SIRT1 Controls Acetaminophen Hepatotoxicity by Modulating Inflammation and Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, ***28*****(13)**, 1187-1208.

Ramos, A. T., Passoni, M. T., Romano, M. A., Romano, R. M., & Martino-Andrade, A. J. (2021). Controversies on Endocrine and Reproductive Effects of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides: A Mini-Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*, ***12***, 627210.

Ramsahoye, B. H. (2002). Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods*, ***27*****(2)**, 156-161.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, ***406*****(6796)**, 593-599.

Ren, Y., Luo, T., Li, J., Fu, J., Wang, Q., Cao, G., Chen, Y., & Wang, H. (2015). p28GANK associates with p300 to attenuate the acetylation of RelA. *Molecular Carcinogenesis*, ***54*(12)**, 1626-1635.

Reno, U., Gutierrez, M. F., Regaldo, L., & Gagneten, A. M. (2014). The impact of Eskoba, a glyphosate formulation, on the freshwater plankton community. *Water Environ Res*, ***86*(12)**, 2294-2300.

Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., & Seralini, G.-E. (2005). Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental health perspectives*, ***113*(6)**, 716-720.

Richon, V. M., & O'Brien, J. P. (2002). Histone Deacetylase Inhibitors: A New Class of Potential Therapeutic Agents for Cancer Treatment: Commentary re: V. Sandor et al., Phase I Trial of the Histone Deacetylase Inhibitor, Depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in Patients with Refractory Neoplasms. Clin. Cancer Res., 8: 718–728, 2002. *Clinical Cancer Research*, ***8*(3)**, 662-664.

Roberts, D. M., Buckley, N. A., Mohamed, F., Eddleston, M., Goldstein, D. A., Mehrsheikh, A., Bleeke, M. S., & Dawson, A. H. (2010). A prospective observational study of the clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self-poisoning. *Clinical Toxicology*, ***48*(2)**, 129-136.

Rojano-Delgado, A. M., Cruz-Hipolito, H., De Prado, R., Luque de Castro, M. D., & Franco, A. R. (2012). Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in Mucuna pruriens var. utilis plants. *Phytochemistry*, ***73*(1)**, 34-41.

Rosa, S. C., Rufino, A. T., Judas, F., Tenreiro, C., Lopes, M. C., & Mendes, A. F. (2011). Expression and function of the insulin receptor in normal and osteoarthritic human chondrocytes: modulation of anabolic gene expression, glucose transport and GLUT-1 content by insulin. *Osteoarthritis and cartilage*, ***19*(6)**, 719-727.

Rossetti, M. F., Canesini, G., Lorenz, V., Milesi, M. M., Varayoud, J., & Ramos, J. G. (2021). Epigenetic changes associated with exposure to glyphosate-based herbicides in mammals. *Frontiers in Endocrinology*, 576.

Roston, A., Evans, D., Gill, H., McKinnon, M., Isidor, B., Cogné, B., Mwenifumbo, J., van Karnebeek, C., An, J., & Jones, S. J. (2021). SETD1B-associated neurodevelopmental disorder. *Journal of Medical Genetics*, ***58*(3)**, 196-204.

Roth, S. Y., Denu, J. M., & Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry*, ***70*****(1)**, 81-120.

Roy, N. M., Carneiro, B., & Ochs, J. (2016). Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, ***42***, 45-54.

Rueda-Ruzafa, L., Cruz, F., Roman, P., & Cardona, D. (2019). Gut microbiota and neurological effects of glyphosate. *Neurotoxicology*, ***75***, 1-8.

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*****(3)**, 517-528.

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, ***23*****(16)**, 2861-2874.

Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*, ***107*****(5)**, 489-506.

Sasaki, O., Meguro, K., Tohmiya, Y., Funato, T., Shibahara, S., & Sasaki, T. (2002). Altered expression of retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene, RIZ, in human leukaemia. *British journal of haematology*, ***119*****(4)**, 940-948.

Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L., & Boeke, J. D. (2006). The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem*, ***75***, 435-465.

Schinasi, L., & Leon, M. E. (2014). Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health*, ***11*****(4)**, 4449-4527.

Schneider, R., Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2002). Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends Biochem Sci*, ***27*****(8)**, 396-402.

Schuler, M., & Green, D. R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*, ***29*****(Pt 6)**, 684-688.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., & Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, ***254*****(3)**, 439-459.

Séralini, G.-E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D., & de Vendômois, J. S. (2014). Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environmental sciences Europe*, ***26*****(1)**, 14-14.

Shahbazian, M. D., & Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, ***76***, 75-100.

Shahbazian, M. D., Zhang, K., & Grunstein, M. (2005). Histone H2B ubiquitylation controls processive methylation but not monomethylation by Dot1 and Set1. *Molecular cell*, ***19*****(2)**, 271-277.

Shepherd, K. R., Lee, E. S., Schmued, L., Jiao, Y., Ali, S. F., Oriaku, E. T., Lamango, N. S., Soliman, K. F., & Charlton, C. G. (2006). The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, ***83*****(3)**, 349-359.

Shinkai, Y., & Tachibana, M. (2011). H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes & development*, ***25*****(8)**, 781-788.

Shlyakhtina, Y., Pavet, V., & Gronemeyer, H. (2017). Dual role of DR5 in death and survival signaling leads to TRAIL resistance in cancer cells. *Cell Death Dis*, ***8*****(8)**, e3025.

Šiviková, K., & Dianovský, J. (2006). Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. *International journal of hygiene and environmental health*, ***209*****(1)**, 15-20.

Smaili, S. S., Hsu, Y. T., Youle, R. J., & Russell, J. T. (2000). Mitochondria in Ca2+ signaling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*, ***32*****(1)**, 35-46.

Smith, C. M., Vera, M. K. M., & Bhandari, R. K. (2019). Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (Oryzias latipes). *Aquat Toxicol*, ***210***, 215-226.

Soares, D., Silva, L., Duarte, S., Pena, A., & Pereira, A. (2021). Glyphosate Use, Toxicity and Occurrence in Food. *Foods*, ***10*****(11)**.

Solomon, K. R., Anadon, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A. L., Marshall, J., & Sanin, L. H. (2007). Coca and poppy eradication in Colombia: environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Rev Environ Contam Toxicol*, ***190***, 43-125.

Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H., & de Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem*, ***52*****(6)**, 821-831.

Sprankle, P., Meggitt, W., & Penner, D. (1975). Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science*, ***23*****(3)**, 229-234.

Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, ***403*****(6765)**, 41-45.

Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, ***69***, 217-245.

Sulukan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Işik, M., Atamanalp, M., & Ceyhun, S. B. (2017). An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (Daino rerio). *Chemosphere*, ***180***, 77-85.

Sun, D., Luo, M., Jeong, M., Rodriguez, B., Xia, Z., Hannah, R., Wang, H., Le, T., Faull, K. F., Chen, R., Gu, H., Bock, C., Meissner, A., Göttgens, B., Darlington, G. J., Li, W., & Goodell, M. A. (2014). Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell*, ***14*****(5)**, 673-688.

Swanson, N. L., Hoy, J., & Seneff, S. (2016). Evidence that glyphosate is a causative agent in chronic sub-clinical metabolic acidosis and mitochondrial dysfunction. *International Journal of Human Nutrition and Functional Medicine*, ***4***, 32-52.

T.C. Resmi Gazete, 25 Kasım 2016. Sayı: 29899. Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği.

Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., & Kato, H. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development*, ***16*****(14)**, 1779-1791.

Takai, N., Desmond, J. C., Kumagai, T., Gui, D., Said, J. W., Whittaker, S., Miyakawa, I., & Koeffler, H. P. (2004). Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clinical Cancer Research*, ***10*****(3)**, 1141-1149.

Takawa, M., Cho, H. S., Hayami, S., Toyokawa, G., Kogure, M., Yamane, Y., Iwai, Y., Maejima, K., Ueda, K., Masuda, A., Dohmae, N., Field, H. I., Tsunoda, T., Kobayashi, T., Akasu, T., Sugiyama, M., Ohnuma, S., Atomi, Y., Ponder, B. A., . . .

Hamamoto, R. (2012). Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression. *Cancer Res*, ***72*(13)**, 3217-3227.

Tanaka, S., Motomura, Y., Suzuki, Y., Yagi, R., Inoue, H., Miyatake, S., & Kubo, M. (2011). The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated Il4 transcription in TH2 cells. *Nature immunology*, ***12*(1)**, 77-85.

Taneli, F. (2007). Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, ***5*(2)**, 75-82.

Tarazona, J. V., Court-Marques, D., Tiramani, M., Reich, H., Pfeil, R., Istace, F., & Crivellente, F. (2017). Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Archives of toxicology*, ***91***, 2723-2743.

Tardat, M., Brustel, J., Kirsh, O., Lefevbre, C., Callanan, M., Sardet, C., & Julien, E. (2010). The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, ***12*(11)**, 1086-1093.

Tomlin, C. D. S. (2006). The Pesticide Manual: A World Compendium. *14th ed.; British Crop Protection Council: Hampshire, UK*, 545-548.

Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E. M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kılınç, N., Erdoğan, O., & Ceyhun, S. B. (2015). Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, ***111***, 206-214.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., & Nestler, E. J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, ***8*(5)**, 355-367.

Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G., Jr. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ*, ***616-617***, 255-268.

van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, ***731***, 237-245.

Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Rubin, M. A., & Chinnaiyan, A. M. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, ***419*(6907)**, 624-629.

Veiga, F., Zapata, J. M., Fernandez Marcos, M. L., & Alvarez, E. (2001). Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Science of the Total Environment*, ***271*****(1-3)**, 135-144.

Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J. M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y., & Fuks, F. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, ***439*****(7078)**, 871-874.

Vousden, K. H., & Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, ***2*****(8)**, 594-604.

Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, ***296*****(5573)**, 1635-1636.

Wang, Y.-Q., Cao, Q., Wang, F., Huang, L.-Y., Sang, T.-T., Liu, F., & Chen, S.-Y. (2015). SIRT1 Protects Against Oxidative Stress-Induced Endothelial Progenitor Cells Apoptosis by Inhibiting FOXO3a via FOXO3a Ubiquitination and Degradation. *Journal of cellular physiology*, ***230*****(9)**, 2098-2107.

Wang, Z., Dai, X., Zhong, J., Inuzuka, H., Wan, L., Li, X., Wang, L., Ye, X., Sun, L., Gao, D., Zou, L., & Wei, W. (2015). SCF(β-TRCP) promotes cell growth by targeting PR-Set7/Set8 for degradation. *Nat Commun*, ***6***, 10185.

Webster, T. M., Laing, L. V., Florance, H., & Santos, E. M. (2014). Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (Danio rerio). *Environmental Science & Technology*, ***48*****(2)**, 1271-1279.

Wester, R. C., Melendres, J., Sarason, R., McMaster, J., & Maibach, H. I. (1991). Glyphosate skin binding, absorption, residual tissue distribution, and skin decontamination. *Fundam Appl Toxicol*, ***16*****(4)**, 725-732.

WHO (World Health Organization). (2016). Pesticide Residues in Food Rome, Italy, .

Williams, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, ***31*****(2 Pt 1)**, 117-165.

Wozniak, E., Reszka, E., Jabłońska, E., Balcerczyk, A., Broncel, M., & Bukowska, B. (2020). Glyphosate affects methylation in the promoter regions of selected tumor suppressors as well as expression of major cell cycle and apoptosis drivers in PBMCs (in vitro study). *Toxicol In Vitro*, ***63***, 104736.

Wozniak, E., Reszka, E., Jablonska, E., Michalowicz, J., Huras, B., & Bukowska, B. (2021). Glyphosate and AMPA Induce Alterations in Expression of Genes Involved in Chromatin Architecture in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (In Vitro). *Int J Mol Sci*, ***22*****(6)**.

Wozniak, R., Klimecki, W., Lau, S., Feinstein, Y., & Futscher, B. (2007). 5-Aza-2′-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene*, ***26*****(1)**, 77-90.

Wu, J., Qiao, K., Du, Y., Zhang, X., Cheng, H., Peng, L., & Guo, Z. (2020). Downregulation of histone methyltransferase SET8 inhibits progression of hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*, ***10*****(1)**, 4490.

Xu, C., Wang, L., Fozouni, P., Evjen, G., Chandra, V., Jiang, J., Lu, C., Nicastri, M., Bretz, C., & Winkler, J. D. (2020). SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing. *Nature cell biology*, ***22*****(10)**, 1170-1179.

Xu, C., Wang, L., Fozouni, P., Evjen, G., Chandra, V., Jiang, J., Lu, C., Nicastri, M., Bretz, C., Winkler, J. D., Amaravadi, R., Garcia, B. A., Adams, P. D., Ott, M., Tong, W., Johansen, T., Dou, Z., & Berger, S. L. (2020). SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing. *Nat Cell Biol*, ***22*****(10)**, 1170-1179.

Xu, W., Jing, L., Wang, Q., Lin, C. C., Chen, X., Diao, J., Liu, Y., & Sun, X. (2015). Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. *Oncotarget*, ***6*****(30)**, 30017-30034.

Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., & Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *Embo j*, ***31*****(1)**, 110-123.

Yang, G., Yuan, Y., Yuan, H., Wang, J., Yun, H., Geng, Y., Zhao, M., Li, L., Weng, Y., Liu, Z., Feng, J., Bu, Y., Liu, L., Wang, B., & Zhang, X. (2021). Histone acetyltransferase 1 is a succinyltransferase for histones and non-histones and promotes tumorigenesis. *EMBO Rep*, ***22*****(2)**, e50967.

Yao, L., Li, Y., Du, F., Han, X., Li, X., Niu, Y., Ren, S., & Sun, Y. (2014). Histone H4 Lys 20 methyltransferase SET8 promotes androgen receptor-mediated transcription activation in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, ***450*****(1)**, 692-696.

Yoo, K. H., & Hennighausen, L. (2012). EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. *Int J Biol Sci*, ***8*(1)**, 59-65.

Yu, F., Wang, Z., Ju, B., Wang, Y., Wang, J., & Bai, D. (2008). Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Exp Toxicol Pathol*, ***59*(6)**, 415-423.

Zebral, Y. D., Lansini, L. R., Costa, P. G., Roza, M., Bianchini, A., & Robaldo, R. B. (2018). A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish Austrolebias nigrofasciatus. *Chemosphere*, ***196***, 260-269.

Zhang, J., Hou, W., Chai, M., Zhao, H., Jia, J., Sun, X., Zhao, B., & Wang, R. (2016). MicroRNA-127-3p inhibits proliferation and invasion by targeting SETD8 in human osteosarcoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, ***469*(4)**, 1006-1011.

Zhang, L., Rana, I., Shaffer, R. M., Taioli, E., & Sheppard, L. (2019). Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and supporting evidence. *Mutat Res Rev Mutat Res*, ***781***, 186-206.

Zhang, Q., Padi, S., Tindall, D., & Guo, B. (2014). Polycomb protein EZH2 suppresses apoptosis by silencing the proapoptotic miR-31. *Cell death & disease*, ***5*(10)**, e1486-e1486.

Zhang, S., Xu, J., Kuang, X., Li, S., Li, X., Chen, D., Zhao, X., & Feng, X. (2017). Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (Danio rerio). *Chemosphere*, ***181***, 270-280.

Zhang, W., Wang, J., Song, J., Feng, Y., Zhang, S., Wang, N., Liu, S., Song, Z., Lian, K., & Kang, W. (2021). Effects of low-concentration glyphosate and aminomethyl phosphonic acid on zebrafish embryo development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, ***226***, 112854.

Zheng, T., Jia, R., Cao, L., Du, J., Gu, Z., He, Q., Xu, P., & Yin, G. (2021). Effects of chronic glyphosate exposure on antioxdative status, metabolism and immune response in tilapia (GIFT, Oreochromis niloticus). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, ***239***, 108878.

Zhong, X., Chen, X., Guan, X., Zhang, H., Ma, Y., Zhang, S., Wang, E., Zhang, L., & Han, Y. (2015). Overexpression of G 9a and MCM 7 in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with poor prognosis. *Histopathology*, ***66*****(2)**, 192-200.

Zingg, D., Debbache, J., Schaefer, S. M., Tuncer, E., Frommel, S. C., Cheng, P., Arenas-Ramirez, N., Haeusel, J., Zhang, Y., Bonalli, M., McCabe, M. T., Creasy, C. L., Levesque, M. P., Boyman, O., Santoro, R., Shakhova, O., Dummer, R., & Sommer, L. (2015). The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. *Nat Commun*, ***6***, 6051.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., & Wang, X. (1999). An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, ***274*****(17)**, 11549-11556.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Glifosat Ve Metaboliti Aminometilfosfonik Asitin Karaciğer HepG2 Hücre Kültürlerinde Apoptoz ve Epigenetik Mekanizmalar "Üzerine Etkilerinin Araştırılması

ORİJİNALLİK RAPORU

%4	%4	%1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
3	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<%1
5	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Xianglin Cao, Chenyang Rao, Han Cui, Dandan Sun, Lulu Li, Suqi Guo, Jiameng Zhou, Rongjie Yuan, Shuai Yang, Jianjun Chen. "Toxic effects of glyphosate on the intestine, liver, brain of carp and on epithelioma papulosum cyprinid cells: Evidence from in vivo and in vitro research", Chemosphere, 2022 Yayın	<%1