



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PESTİSİT MARUZİYETİNE CEVABEN OLUŞABİLECEK DNA METİLASYON
DEĞİŞİMİNİN IN VITRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

HACER ERGÜN

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Akın ÇAYIR

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2017



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PESTİSİT MARUZİYETİNE CEVABEN OLUŞABİLECEK DNA METİLASYON
DEĞİŞİMİNİN IN VITRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

HACER ERGÜN

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Akın ÇAYIR

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2016-799 sayılı karar ile desteklenmiştir.**

ÇANAKKALE-2017

TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Tıbbi Sistem Biyolojisi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Sistem Biyolojisi
Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Hacer ERGÜN
Tez Başlığı : Pestisit Maruziyetine Cevaben Oluşabilecek DNA Metilasyon
Değişiminin *In Vitro* Koşullarda Araştırılması
Sınav Yeri : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi
Sınav Tarihi : 25.08.2017

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Sınav Jürisi

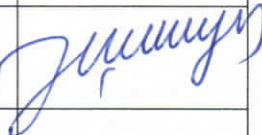


Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Doç. Dr. Akın ÇAYIR	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Çanakkale Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)		
Doç. Dr. Önder KILIÇ	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi	
Doç. Dr. Nihal KILINÇ	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences
Programme Name : Biology of Medical System
Programme Level : Master of Science (X) Doctor of Philosophy ()
Department : Biology of Medical System
Student Name and Surname: Hacer ERGÜN
Title of the Thesis : Investigation of DNA Methylation Alterations in Response to
Pesticide Exposure *in Vitro* Condition
Examination Place : Çanakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine
Examination Date : 25.08.2017

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science / Doctor of Philosophy Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Doç. Dr. Akın ÇAYIR	Çanakkale Onsekiz Mart University Çanakkale Health Services Vocational School	
Members of Examination Jury (Titles and Names)		
Doç. Dr. Önder KILIÇ	İstanbul University Faculty of Science	
Doç. Dr. Nihal KILINÇ	Çanakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated and numbered

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8’de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

Tarih:

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Hacer ERGÜN

İmza:

TEŞEKKÜR SAYFASI

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bilgi, sabır ve desteğini benden esirgemeyen; öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Danışman Hocam Doç. Dr. Akın ÇAYIR'a katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Sistem Biyolojisi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mahmut COŞKUN'a ve eşi Öğretim Görevlisi Münevver COŞKUN'a katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Nihal KILINÇ'a katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarında yardımını ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Yüksek Lisans öğrencisi Güner Begüm ÇILGIN'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans öğrenimine başlamam konusunda beni yüreklendiren, her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen, bana cesaret ve güç veren başta Selma ÖZ TINMAZ ve Tülay TOKSÖZ olmak üzere tüm dostlarıma teşekkür ederim.

Doğduğum andan bugüne beni özveriyle yetiştiren, maddi ve manevi destek sağlayan, her zaman yanımda olan canımdan çok sevdiğim annem Nefise ERGÜN'e, desteğiyle beni güçlendiren kardeşim Hakan ERGÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatta olmasa da her zaman yanımda olduğunu hissettiğim canım babam Muharrem ERGÜN'e ithafen.

“Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: 2016/799”

Hacer ERGÜN

İÇİNDEKİLER	Sayfa
İÇ KAPAK	II
TEZ ONAY FORMU	III
TEZ ONAY FORMU (İNGİLİZCE)	IV
BEYAN FORMU	V
TEŞEKKÜR SAYFASI	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	X
TABLO LİSTESİ	XII
ŞEKİL LİSTESİ	XIII
RESİM LİSTESİ	XV
ÖZET	XVI
ABSTRACT	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epigenetik Mekanizmalar	4
2.1.1. DNA Metilasyonu	6
2.1.2. S-Adenozil Metiyonin (SAM)	9
2.1.3. Histon Modifikasyonu	10
2.1.4. MikroRNA (miRNA)	13
2.2. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser	14
2.3. Epigenetik Mekanizmalar ve Diğer Hastalıklar	16
2.4. Çevresel Kirleticiler ve Epigenetik Mekanizmalar	18
2.4.1. Metaller	18
2.4.2. Hava Kirliliği	20
2.4.3. İçme Suyundaki Kimyasallar	20
2.5. Pestisit Maruziyeti ve Kanser	21

2.6. Pestisit Maruziyeti ve Epigenetik Değişimler	23
2.7. Glyphosate İle İlgili Yapılan Toksikite Çalışmaları	25
2.8. Tetrachlorvinphos İle İlgili Yapılan Toksikite Çalışmaları	27
2.9. Çeşitli Pestisitlerle İlgili Yapılan Genotoksikite Çalışmaları	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Araştırma Türü	31
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Özellikleri	31
3.2.1. Glyphosate	31
3.2.2. Tetrachlorvinphos	32
3.2.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler	33
3.3. Sterilizasyon	33
3.4. Hücre Kültürü	33
3.4.1. Donmuş Hücreleri Kültüre Etme Prosedürü	35
3.4.2. Hücre Kültürünün Devamlılığı ve Pasaj	35
3.5. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid] Yöntemi	35
3.6. Hücrelerin 5mC Değişimi için Pestisitler ile Muamele Edilmesi	37
3.6.1. DNA İzolasyonu	38
3.6.2. DNA Miktarının Belirlenmesi	38
3.7. Hücrelerin 5mC Değişimi için Pestisitler ile Muamele Edilmesi	38
3.7.1. DNA Metilasyon (5mC) Miktarının Belirlenmesi	39
4. BULGULAR	41
4.1. Glyphosate ile ilgili yapılan MTT çalışmaları (12 saat muamele)	41
4.2. Glyphosate ile ilgili yapılan MTT çalışmaları (24 saat muamele)	43
4.3. Tetrachlorvinphos ile ilgili yapılan MTT çalışmaları (12 saat muamele)	45
4.4. Tetrachlorvinphos ile ilgili yapılan MTT çalışmaları (24 saat muamele)	47
4.5. Glyphosate'in 12 Saatlik Muamelesi Sonrası Oluşan % 5-Metil Sitozin Değişimi	49
4.6. Glyphosate'in 24 Saatlik Muamelesi Sonrası Oluşan % 5-Metil Sitozin Değişimi	51
4.7. Tetrachlorvinphos'un 12 Saatlik Muamelesi Sonrası Oluşan % 5-Metil Sitozin Değişimi	52

4.8. Tetrachlorvinphos'un 24 Saatlik Muamelesi Sonrası Oluşan % 5- Metil Sitozin Değişimi	53
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
6.1. Sonuç	59
6.2. Öneriler	59
KAYNAKLAR	60
EKLER	76
Ek-1. Etik Kurul Karar Formu	76
Ek-2. Spiralli Tez Kontrol Formu	77
Ek-3. Spiralli/Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi	78
Ek-4. Özgeçmiş	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ac: Asetilasyon

ADP: Adenozindifosfat

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

Alu: Kısa Serpiştirilmiş Nüleotid Elementleri

BHMT: Betain Homosistein Metiltransferaz Enzimi

ChE: Kolinesteraz

CpG: Sitozin Fosfat Bağı Guanin

CBS: Sistasyon Beta Sentaz

DDT: Diklorodifeniltriokloroetan

DNMT: DNA Metiltransferaz Enzimi

DMSO: Dimetil Sülfoksit

EPA: US Environmental Protection Agency (Çevre Koruma Ajansı)

GDO: Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar

IARC: The International Agency for Research on Cancer

(Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)

KOAH: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı

LD₅₀: Ortalama Öldürücü Doz

LINE: Long Interspersed Elements (Serpiştirilmiş Uzun Tekrar Dizileri)

miRNA: Mikro RNA

MS: Metiyonin Sentaz

MTHFR: Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Enzimi

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-Difenil Tetrazolium Bromid Yöntemi

NK: Negatif Kontrol

PK: Pozitif Kontrol

PM: Partikül Madde

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SAM: S-Adenozil Methiyonin

SAH: S-Adenozil Homosistein

SS: Standart Sapma

TCMA: 2,4,5-Trikloromandelikasıit

TCVP: Tetrachlorvinphos

WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

5mC: 5-Metil Sitozin

5 Metil THF: 5 Metiltetrahidrofolat

5,10 Metilen THF: 5,10 Metilen Tetrahidrofolat

bp: Baz Çifti

kb: Kilo Baz

μ M: Mikro Molar

TABLO LİSTESİ

Tablo-1. Glyphosate'in MTT ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi (12 saat muamele)	42
Tablo-2. Glyphosate'in MTT ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi (24 saat muamele)	44
Tablo-3. Tetrachlorvinphos'un MTT ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi (12 saat muamele)	46
Tablo-4. Tetrachlorvinphos'un MTT ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi (24 saat muamele)	48
Tablo-5. 12 Saat Glyphosate Muamelesi Sonucu Oluşan Global DNA Metilasyon Değişimi	50
Tablo-6. 24 Saat Glyphosate Muamelesi Sonucu Oluşan Global DNA Metilasyon Değişimi	51
Tablo-7. 12 Saat Tetrachlorvinphos Muamelesi Sonucu Oluşan Global DNA Metilasyon Değişimi	53
Tablo-8. 24 Saat Tetrachlorvinphos Muamelesi Sonucu Oluşan Global DNA Metilasyon Değişimi	54

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1. Epigenetik Süreçler	5
Şekil-2. Sitozinin Metilasyonu	7
Şekil-3. DNA'daki Kovalent Modifikasyonlar	8
Şekil-4. DNA Metilasyon Mekanizması	10
Şekil-5.a) Epigenetik Modifikasyonların Şematik Gösterimi	12
Şekil-5.b) Gen Ekspresyonunu Etkileyen Kromatindeki Reversibl Değişiklikler	12
Şekil-6. Epigenetik Düzeyde Transkripsiyonel Düzenleme	13
Şekil-7. Glyphosate	32
Şekil-8. Tetrachlorvinphos	32
Şekil-9. Glyphosate 12 Saat Muamele	42
Şekil-10. Glyphosate ile 12 Saat Muamele Edilen A549 Hücrelerindeki Canlılık Değişimi	43
Şekil-11. Glyphosate 24 Saat Muamele	44
Şekil-12. Glyphosate ile 24 Saat Muamele Edilen A549 Hücrelerinin Canlılık Değişimi	45
Şekil-13. Tetrachlorvinphos 12 Saat Muamele	46
Şekil-14. Tetrachlorvinphos ile 12 Saat Muamele Edilen A549 Hücrelerinin Canlılık Değişimi	47
Şekil-15. Tetrachlorvinphos 24 Saat Muamele	49
Şekil-16. Tetrachlorvinphos ile 24 Saat Muamele Edilen A549 Hücrelerinin Canlılık Değişimi	49
Şekil-17. Glyphosate 12 Saat Muamele	50
Şekil-18. Glyphosate 24 Saat Muamele	52

Şekil-19. Tetrachlorvinphos 12 Saat Muamele

53

Şekil-20. Tetrachlorvinphos 24 Saat Muamele

54



RESİM LİSTESİ

Resim-1. Hücre Kültür Ortamında Kullanılan Cihazlar	34
Resim-2. MTT Sonrası Renk Değişimi (Glyphosate)	36
Resim-3. MTT Sonrası Renk Değişimi (Tetrachlorvinphos)	37
Resim-4. 5mC Ölçümü için DNA Örneklerinin Ölçümü	40



ÖZET

PESTİSİT MARUZİYETİNE CEVABEN OLUŞABİLECEK DNA METİLASYON DEĞİŞİMİNİN IN VITRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI

On yılı aşkın süredir gerçekleştirilen bilimsel çalışmalar, çevresel kirleticilerin genom ve/veya epigenom düzeyinde değişmelere neden olduğunu göstermiştir. Artan veriler çevresel kirleticilerin epigenetik modifikasyonları değiştirebildiğini göstermiştir. Epigenom düzeyinde meydana gelen değişmelerin başta kanser olmak üzere birçok hastalığın etiolojisinde tek başına ve/veya başka mekanizmalarla birlikte rol oynayabileceği bilinmektedir. Bu bağlamda, çevresel kirleticilerin epigenetik mekanizmaları değiştirerek/etkileyerek bazı hastalık süreçlerini değiştirebileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC - The International Agency for Research on Cancer) tarafından insanda karsinojen potansiyeli yüksek olarak ilan edilen 2 adet pestisit in vitro koşullarda epigenetik modifikasyonlardan total DNA 5 metilsitozin (5mC) miktarını değiştirip değiştirmediği araştırılmıştır. Bu amaçla, Glyphosate ve Tetrachlorvinphos pestisitlerinin çeşitli konsantrasyonları ile A549 hücreleri in vitro koşullarda muamele edilmiştir. 12 ve 24 saat muamelelerin sonunda izole edilen DNA örnekleri ELISA yöntemine dayalı kit yardımıyla total 5mC miktarı belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre Glyphosate ile 12 ve 24 saat muamele sonucunda total 5mC miktarı artmıştır. 24 saatlik muamelede, total 5mC miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Araştırılan konsantrasyonlar, sitotoksik olmayan dozlardır. Diğer taraftan, Tetrachlorvinphos ile muameleden sonra ölçülen total 5mC miktarı negatif kontrole göre artmıştır. Bu artışlar konsantrasyon artışı ile birlikte olup, en yüksek konsantrasyonların neden olduğu 5mC miktarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

Bu çalışma ile karsinojenik olduğu bildirilen iki pestisit, DNA metilasyon miktarlarını değiştirdiği belirlenmiştir. Total 5mC miktarı, bu iki pestisit için birer maruziyet biyomarkırı olabileceği gibi karsinojenite için de bir etki mekanizması olabileceği önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Epigenetik, 5mC, Kanser, Pestisit, Glyphosate, Tetrachlorvinphos.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF DNA METHYLATION ALTERATIONS IN RESPONSE TO PESTICIDE EXPOSURE IN VITRO CONDITION

Scientific studies performed over a decade showed that environmental pollutants cause changes at the genome and / or epigenome level. Increased data have shown that environmental pollutants can alter epigenetic modifications. It is known that alteration occurring at the epigenome level can play a role in the etiology of many diseases, especially cancer, alone and / or with other mechanisms. In this context, it is thought that environmental pollutants can change some disease processes by changing / affecting the epigenetic mechanisms. In the thesis study, it was investigated whether the amount of total DNA 5 methylcytosine-5mC was changed as epigenetic modifications in response to two pesticides in vitro conditions, which were declared high human carcinogenic potential by the International Agency for Research on Cancer (IARC). For this purpose, A549 cells were treated with various concentrations of Glyphosate and Tetrachlorvinphos pesticides in vitro. At the end of 12 and 24 hour treatments, total 5mC amount of DNA samples were determined by using kit based ELISA method.

According to the results obtained, total amount of 5mC was increased as a result of treatment with Glyphosate for 12 and 24 hours. Treatment for 24 hours, total amount of 5mC was found statistically significant. The concentrations investigated are non-cytotoxic doses. On the other hand, the total amount of 5mC measured after treatment with Tetrachlorvinphos was increased relative to the negative control. These increases were accompanied by concentration increases, and the amount of 5mC caused by the highest concentrations was not found to be statistically significant.

In this study, two pesticides reported to be carcinogenic changed DNA methylation quantities. The total amount of 5mC is suggested to be an action mechanism for carcinogenicity as well as exposure biomarkers for these two pesticides.

Key Words: Epigenetic, 5mC, Cancer, Pesticide, Glyphosate, Tetrachlorvinphos.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada her yıl 13 milyondan fazla ölümün sebebi çevresel kirleticilerdir. Önleyici tedbirlerin alınmasına rağmen hastalıkların yaklaşık % 24'ünün sebebi çevresel kirleticilere maruz kalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Prüss-Üstün ve Corvalán, 2006). Amerika Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından yapılan bir taramada, Amerikan popülasyonunda kanda ve idrarda 148 farklı çevresel kimyasal madde tespit edilmiştir. Bu durum, insan popülasyonunun çevresel kimyasallara ne kadar geniş ölçekte maruz kaldığının en iyi göstergelerinden birisidir (Bollati ve Baccarelli, 2010).

Bitki hastalıkları, haşereler ve yabancı otların tarım ürünlerinde meydana getireceği zararı en aza indirmek için kullanılan yöntemlerin başında kimyasal mücadele gelmektedir. Bu yöntem, hem uygulanabilme olanağı hem de etkili cevap alınabilmesi bakımından yaygın olarak kullanılmaktadır (Bolognesi 2003). Haşereler, yabancı otlar ve bitki hastalıklarına neden olan zararlıların etkisini durduran veya azaltan, zararlıyı öldüren veya ortamdan uzaklaştırılması için tasarlanmış madde veya madde karışımları "Pestisit" olarak tanımlanmaktadır (EPA 2009). Pestisitlerin kullanımı, bitkilerin haşerelerden korunması için en etkili ve en çok kabul gören bir yöntem olması nedeni ile tarımsal verimliliğin artırılmasına önemli katkı sağlamaktadır (Bolognesi 2003).

Pestisitler çevremizde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Weichenthal ve ark., 2010). Bu bileşiklerin çoğu kalıcılık özelliklerinden dolayı doğada uzun yıllar kalabilecek potansiyele sahiptirler (Bolognesi 2003). Üretimi arttırmak ve üretilmiş olan ürünü uzun süre korumak amacıyla kullanılan pestisitlerin, pestisiti doğrudan kullananlar veya pestisite dolaylı olarak maruz kalanlar üzerinde zararlı etkileri olduğu görülmüştür. Halk sağlığı ve tarımsal programlarda pestisitlerin yaygın kullanımı ciddi çevre kirliliğine ve potansiyel sağlık tehlikelerine neden olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) pestisitleri, potansiyel sağlık risklerine göre sınıflandırmıştır.

Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency-EPA) bir pestisit formülasyonunu, aktif madde ve inert içeriğin bir kombinasyonu olarak tanımlamaktadır. İnaktif olan içeriklerin pestisit etkisi gösterme gibi bir yeteneği olmamasına rağmen biyolojik olarak aktif olabilecekleri, bazen de bir pestisit formülünün en toksik bileşeni olabilecekleri bildirilmiştir (Bolognesi 2003). Amerika'da yaklaşık 890 tane aktif içerik pestisit olarak kayıtlıdır. Günümüzde bu aktif içerikler 20700 pestisit ürününün içinde pazarlanmaktadır (US EPA Pesticide Industry Sales and Usage: 1996 and 1997 Market Estimates). Amerika'da satılan pestisitler, EPA tarafından yürütülen genotoksisite ve mutajenite testleri gibi

kanserojenite tarama testlerini geçmiş olsalar da hayvanlar üzerinde yapılan deneyler bu pestisitlerden bazılarının kanserojenik olduğunu göstermiştir. Çiftçiler ve pestisit üretiminde çalışanlar üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ise bazı pestisitlerin çeşitli kanser türleriyle ilişkili olduğu görülmüştür (Alavanja ve Bonner 2005, Alavanja ve ark., 2007, Bassil ve ark., 2007, Koutros ve ark., 2010, Waggoner ve ark., 2010).

Pestisitlerin dünya üzerindeki kullanımının yaygınlaşmasıyla sağlık üzerindeki etkileri de hızla artmaktadır. Pestisitlere maruziyet ve farklı kanser tipleri, diyabet, nörodejenaratif hastalıklar; Parkinson Alzeheimer, amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi, doğum kusurları ve üreme bozuklukları gibi kronik hastalıklar arasında pozitif ilişki olduğunu gösteren çok sayıda kanıt vardır. Ayrıca pestisitlere maruz kalma astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı KOAH gibi solunum problemleri, kronik nefropatiler, otoimmün hastalıklar sistemik lupus eritomatous ve romatid artirit gibi kronik hastalıkları ile kronik yorgunluk sendromu ve yaşlanma gibi durumlarla da ilişkili olduğuna dair belirleyici kanıtlar vardır. Kronik bozuklukların ortak özelliği pestisitlerin hücrel homeostazda, iyon kanallarında, enzimlerde, reseptörlerde karışıklığa sebep olabileceği veya temel aktivitesinin ana mekanizmadan başka diğer yollara aracılık etmesini indükleyebileceği bildirilmiştir (Mostafalou ve Abdollahi, 2013).

Genotoksisite testleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Günümüze kadar çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik potansiyelerini değerlendirmek için birçok farklı genotoksisite yöntemleri kullanılmıştır (Bedir ve ark., 2004). Bu testlerle, çeşitli çevresel maruziyetler sonucu oluşan hasarlar tespit edilmiştir (Choy 2001, Vural 1996, Zeiger 2004). Bu yöntemler kullanılarak, tarım ilaçları, radyasyon, sigara, çeşitli ilaçlar gibi birçok ajanın potansiyelinin belirlenmesinin yanında, bu ajanların neden oldukları hasarların hastalıklarla olan ilişkileri de değerlendirilmiştir (Albertini ve ark., 2000, Anderson ve Zeiger 1997, Brusick 1980, Carrano ve Natarajan 1988, Choy 2001, Hrelia ve ark., 1994, Jena ve ark., 2002, Kirkland 1993, Mateuca ve ark., 2006, Preston ve ark., 1981, Wassom 1989, Zeiger 1998). Şimdiye kadar, genotoksisite testleri kullanılarak pestisitlerle yapılan çalışmalar, birçok pestisit genotoksik olduğunu ortaya koymuştur (Çayır ve ark., 2014). Ayrıca, pestisitlere maruz kalan populasyonlar ile ilgili yapılan genotoksisite çalışmalarında ise çoğunlukla DNA hasarının (farklı yöntemlerle ölçülmüş) istatistiksel olarak daha fazla olduğu görülmüştür (Coskun ve ark., 2011).

Günümüzde kullanılan pestisitler, birçok genotoksisite, mutajenite ve kanser ile ilgili testlerden onay alındıktan sonra kullanılmalarına izin verilmektedir. Ancak, bu testler çoğu zaman yeterli olamamaktadır. Örneğin, kullanılmalarına izin verilen birçok pestisit,

karsinojenik potansiyeli de olduğu kullanılmalarından yıllar sonra anlaşılmış ve daha sonra birçoğu yasaklanmıştır. Ayrıca, epidemiyolojik çalışmalarda pestisitlerin çok kullanıldığı toplumlarda bazı kanser türlerinin yaygın olduğunu ve kanserli birey sayısının sağlıklı toplumlara göre daha fazla olduğunu göstermiştir. Tüm bunlar, pestisitlerin önemli bazı mekanizmalar bakımından araştırılmadığını göstermektedir. Bunların başında epigenetik mekanizmalar gelmektedir. Günümüzde, pestisit güvenliği için uygulanan testler arasında epigenetik mekanizmaların araştırıldığı testler yer almamaktadır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, karsinojen potansiyeli yüksek olan pestisitlerin epigenetik mekanizmalar bakımından değerlendirilmesi, alınacak tedbirler ve politikalar bakımından belirleyici olacaktır. Ayrıca, karsinojen pestisitlerin moleküler epigenetik mekanizmaları tam olarak bilinmediğinden, bu çalışma önem arz etmektedir.

Tez çalışmasında değerlendirdiğimiz Glyphosate ve Tetrachlorvinphos pestisitleri Uluslararası Kanser Araştırmaları Merkezi (The International Agency for Research on Cancer-IARC) tarafından yapılan sınıflamada 2A ve 2B karsinojen sınıfında yer almıştır (Guyton ve ark., 2015). Karsinojen potansiyeli yüksek bu iki pestisitinin epigenom düzeyinde moleküler mekanizmalarının araştırılmadığı görülmüştür.

Bu çalışmanın amacı, Glyphosate ve Tetrachlorvinphos pestisitlerinin DNA'da total 5-metilsitozin (5mC) modifikasyonunu etkileyip etkilemediği dolayısı ile 5mC DNA modifikasyonunun karsinojen potansiyeli yüksek olan pestisitlerde yeni bir biyomarkır olup olmadığını ortaya koymak için in vitro hücre kültüründe organofosfat grubu iki pestisitinin meydana getirdiği etkileri araştırmaktır. Pestisitlerin oluşturdukları sitotoksosite ile ilgili bilgiler elde edilerek muamele edilen bu iki kimyasalın değişik konsantrasyonları ile oluşan DNA metilasyon değişimi incelenerek olası doz-cevap ilişkisini belirlemektir.

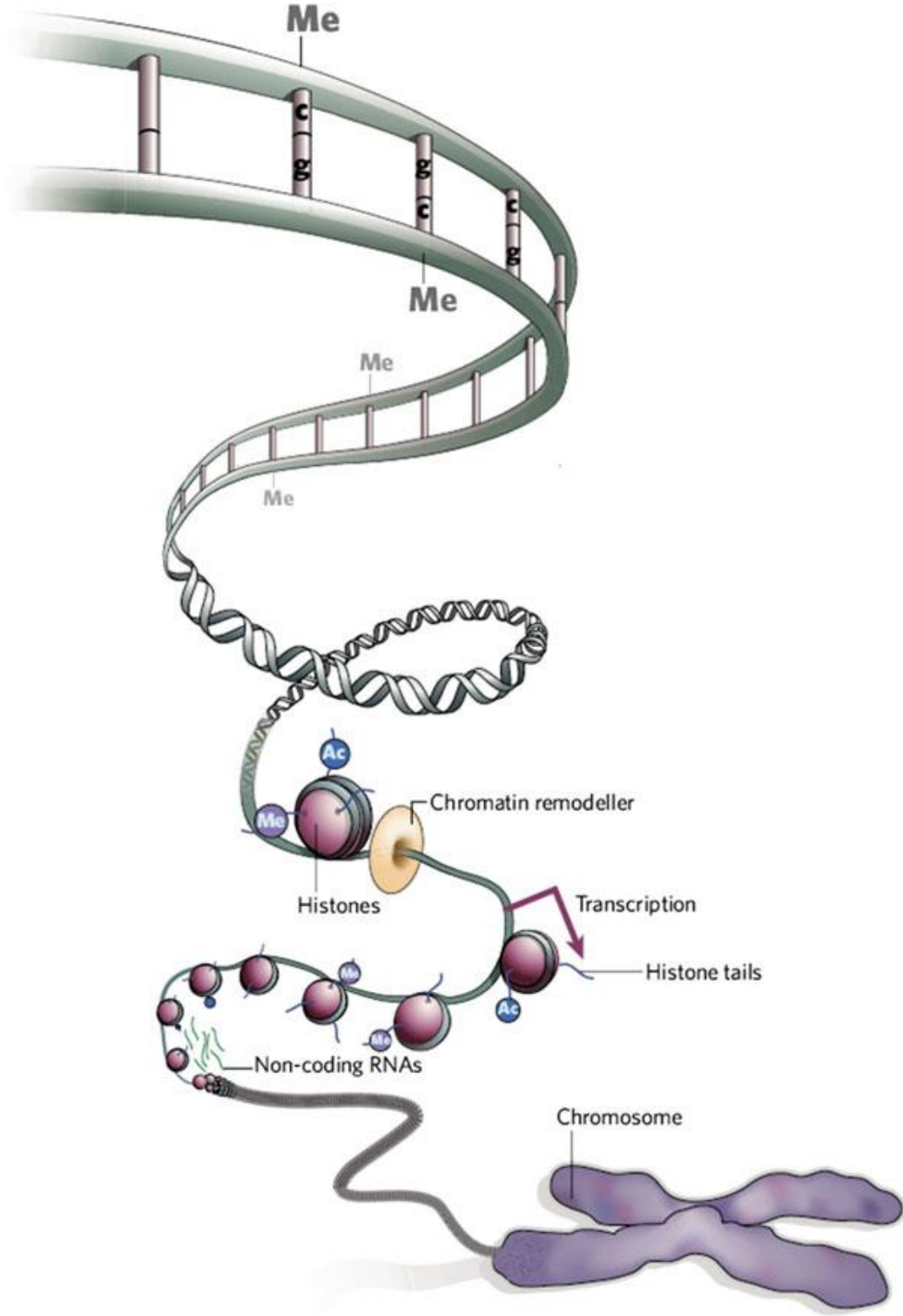
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik Mekanizmalar

İlk olarak, 1940'larda Conrad Waddington tarafından önerilen Epigenetikterimi genlerin çevreyle etkileşimi sonucunda fenotipin etkilenmesini tanımlarken (Waddington 2011), günümüzde DNA yapısında değişme meydana gelmeden, gen anlatımı yolu ile etkisini gösteren mekanizmalar olarak tanımlanmaktadır (Holliday 2006, Martin ve Zhang 2007).

Epigenetik mekanizmalar, bireyin tüm yaşamı boyunca gözlemlenen, bu değişimlerle birlikte gen anlatımının da değiştiği olaylardır. Epigenetik mekanizmalarla kromatinin farklı şekilde paketlenmesinin yakın ilişkisi bulunmaktadır (Orcan 2006).

Son yıllarda epigenetik alanındaki hızlı gelişmeler birçok sürece farklı bakış açısı kazandırmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen güvenilir sonuçlar hastalıkların patogeneğinde mutasyon ve kromozomal değişmeler gibi genetik faktörlerin tek başlarına etken olmadığını göstermiştir. Tek yumurta ikizleri identik DNA sekanslarına sahip olmalarına rağmen ileri yaşlarında bazı hastalıklara yatkınlıkları farklı olabilmektedir (Huang ve ark., 2012). Bu durum aynı genotiplerin farklı fenotipler yansıtabileceğini ifade etmektedir. Dolayısı ile başka faktörlerin bu durumu etkileyebileceği düşünülmektedir. Kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanan ve DNA sekansında bir değişikliğe neden olmayan değişmeler epigenetik modifikasyonlar olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve miRNA gibi değişimleri içermektedir (Baccarelli ve Bollati, 2009).



Şekil-1. Epigenetik Süreçler (Jones ve ark., 2008).

Canlı hücrelerdeki DNA, memeli çekirdeğinin yapısal sınırlarına sığacak şekilde proteinlere ve RNA'ya uygun kompleks bir yapıdır. Nükleosomlarda daha çok DNA bulunur. Bir histon oktameri etrafına sarılmış yaklaşık 146 bp (baz çifti) DNA içermektedir. Basit

palindromik CpG dizisindeki metil gruplarının sitozin kaynaklarına uygulanması ile DNA modifiye edilebilmektedir. Histon kuyrukları ve bazı iç amino asit kalıntıları, posttransyonal modifikasyonlardır ve transkripsiyon yeterliliğinin belirlenmesi bakımından önemlidirler (Jones ve Liang, 2009).

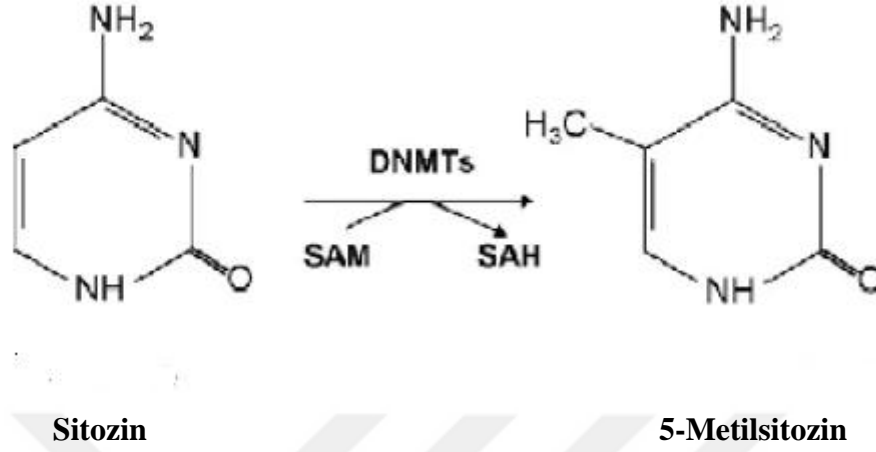
2.1.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu en çok çalışılan (Baccarelli ve Bollati, 2009) ve insanlarda gözlenen temel epigenetik modifikasyondur (Nephew ve Huang, 2003, Paluszczak ve Baer-Dubowska, 2006). DNA metilasyonu; DNA metiltransferaz (DNMT) katalizinde bir CpG dinükleotidindeki sitozin halkasının 5. karbonuna metil grubunun kovalent olarak bağlanmasıyla oluşmakta ve sonuçta 5-metilsitozin (5mC) meydana gelmektedir (Reamon-Buettner ve ark., 2008). CpG dinükleotidleri tüm genom boyunca karışık bir şekilde dağılmıştır. Fakat CpG adaları olarak bilinen bölgelerde yoğun olarak bulunurlar (Paluszczak ve Baer-Dubowska, 2006). CpG adaları 500 bp' den daha uzun olan G+C içeriği eşit veya % 55'ten fazla olan CpG kümelerinden oluşur. Tüm genlerin hemen hemen yarısı promotör bölgelerinde CpG dizilerini bulundurur (Gronbek ve ark., 2007). İnsan genomunda yaklaşık 29000 CpG adası olduğu düşünülmektedir. Sağlıklı insan hücrelerinde CpG adası dışındaki CpG dinükleotidlerinin % 70-80'i aşırı derecede metillenmişken, CpG adaları içindeki CpG dinükleotidleri metillenmemiştir (Nephew ve Huang, 2003).

DNA metilasyonu, embriyonik gelişim sırasında genlerin anlatım yapıp yapmamasında, transkripsiyonda, kromozom stabilitesinde, X kromozomu aktivasyonunda ve genomik imprintingde önemli rol oynamaktadır (Esteller 2007, Robertson 2005).

DNA sentezinden sonra S-adenozil metiyonin (SAM)'den bir metil grubunun sitozin halkasının 5' pozisyonuna bağlanmasıyla insan DNA'sındaki sitozin kaynaklarının yaklaşık %1'i metilenmiş hale gelir. DNA'nın kopyasının ayrılmasından saatler sonra meydana gelen bazı metilasyonlar vardır ki bu modifikasyon DNA senteziden çok kısa bir süre sonra ortaya çıkmaktadır (Liang ve ark., 2002). DNA metilasyon modellerinin kurulmasında, korunmasında ve sürdürülmesinde görevli en az üç enzim vardır. DNA metiltransferaz 3A (DNMT3A) ve DNA metiltransferaz 3B (DNMT 3B) enzimlerinin erken gelişimde görevli olduğu, hemimetil ve metillenmemiş DNA (bir zinciri metilenmiş diğer zincir metillenmemiş) için metil gruplarını kullandığı düşünülmektedir. DNMT1'in öncelikle bir "onarım enzimi" olarak hareket ettiği düşünülmektedir (Holliday ve Pugh, 1975). Aslında hemimetillenmiş

DNA için tercih edilmektedir ve DNMT1 somatik hücrelerde en aktif DNA metiltransferazdır (Ooi ve ark., 2007).



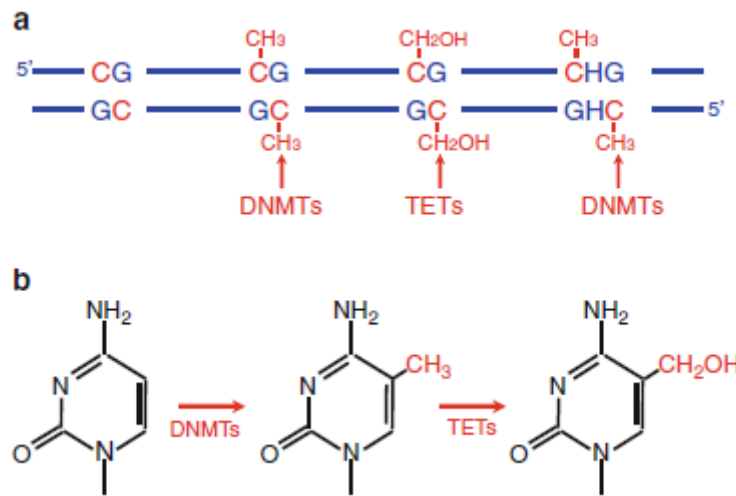
Şekil-2. Sitozinin Metilasyonu (Lafon-Hughes ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalar farklı DNA metilasyon şekillerinin olduğunu göstermiştir. DNA metilasyonundaki değişiklikler global (genel) hipometilasyon ve bölgesel hipermetilasyonu içerir (Paluszczak ve Baer-Dubowska, 2006). Tüm genom düzeyinde oluşan ve global hipometilasyon olarak tanımlanan metilasyon şekli bunlardan bir tanesidir. Bu değişimde DNA metillenme miktarı tüm genom boyunca azalmıştır (Bird 2002). Global metilasyon genomik instabilite ve mutasyonların artmasıyla ilişkilidir (Laird 2005). Normalde insan genomunda yaklaşık olarak 1,4 milyon Alu tekrarlayan element ile 1,5 milyon uzunluğunda aralara serpiştirilmiş nükleotid elementleri vardır (Houck ve ark., 1979). Yapılan çalışmalar bu iki yapının normalden çok daha fazla metillendiğini göstermiştir. DNA metilasyonunun 3'te 1'inden fazlası tekrar elementlerinden oluşmaktadır (Yang ve ark., 2004). Genom boyunca yaygın olmasından dolayı LINE-1 ve Alu elementleri kanser dokularının genomik DNA metilasyonunun tahmini için global biyo-markırlar olarak kullanılmışlardır (Weisenberger ve ark., 2005, Yang ve ark., 2004, Zhu ve ark., 2010). Ancak periferik kan gibi normal dokularda global DNA metilasyonunun olup olmadığı ile ilgili yeterli veri yoktur (Choi ve ark., 2009).

Global metilasyon değişimleri dışında gen düzeyinde de metilasyon değişimleri meydana gelebilmektedir. Yapılan çalışmalar çevresel kirleticiler nedeni ile gen spesifik hipo ve hiper metilasyon değişimlerinin meydana geldiğini göstermiştir (Anier ve ark., 2010, Deshmukh ve ark., 2011, Grönniger ve ark., 2010). Bu değişimlerin potansiyel olarak gen transkriptinde

önemli rol oynadığı görülmüştür. DNA metilasyon değişiklikleri genlerin promotor bölgelerinde bulunan CpG adacıklarında meydana gelmekte ve gen anlatımını doğrudan etkilemektedir. Son kanıtlar çeşitli kanser dokularında CpG adacıkları olarak tanımlanan bölgelerde farklı şekillerde metillenmenin meydana geldiği ve bu bölgelerin transkripsiyon başlangıç bölgesinden 2 kb uzakta olduğu tespit edilmiştir (Irizarry ve ark., 2009). Normal hücrelerin CpG adası içeren gen promotor bölgeleri genellikle metillenmemiştir ve de novo metilasyona karşı dirençlidir (Bestor ve ark., 1992). Kanser gelişimi sırasında CpG adalarındaki sitozinlerin metilasyonu kromatin sıkıştırılması yoluyla genlerin susturulmasına sebep olmaktadır (Paluszczak ve Baer-Dubowska, 2006).

Somatik hücre DNA'sındaki sitozin kalıntılarının metilasyonlarının neredeyse tamamı basit palindromik CpG dizisi şeklinde meydana gelir (Şekil 3a). DNA modifikasyonu ile ilgili çalışmaların çoğu metil gruplarının kovalent eklenme üzerine yapılmıştır. İnsan embriyonik kök hücrelerindeki geniş genom çalışmaları erken gelişim evresindeki insan DNA'sının belli bölgelerindeki non-CpG metilasyonunu göstermiştir (Lister ve ark., 2009).



Şekil-3. DNA'daki Kovalent Modifikasyonlar (Jones ve Liang, 2009).

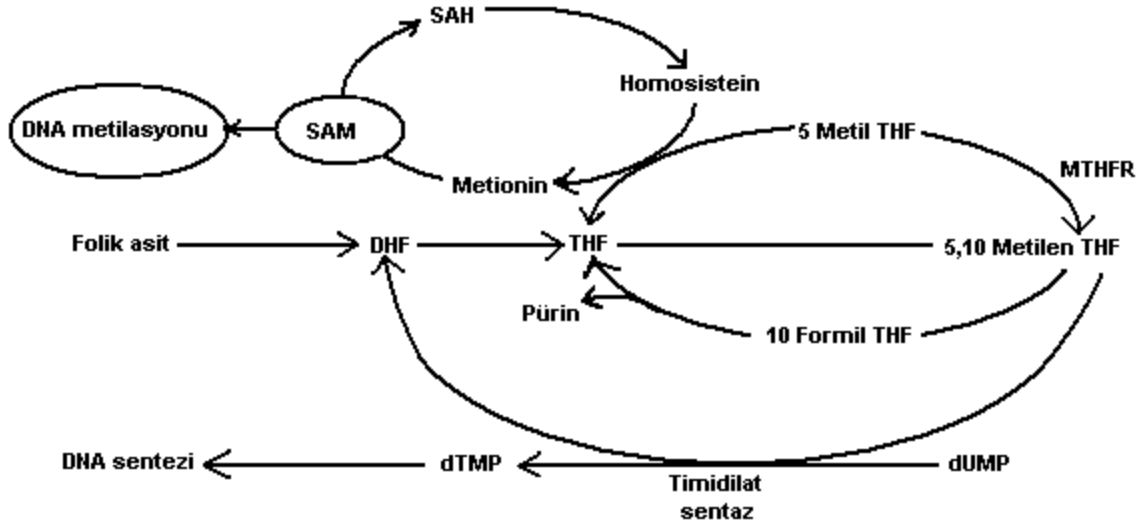
İnsan DNA'sındaki sitozin metilasyonunun neredeyse tamamı basit palindrom CpG şeklinde oluşur. Bu şekil dizilenmede, her iki sitozin de metillenir. Yakın zamanda ispatlanan DNA'daki 5-hidroksi metilsitozinin, bu sitelerin belirli bir kısmının yukarıda Şekil-3a'da gösterildiği gibi TET proteinleri tarafından da modifiye edilebileceğini önermiştir. Yakın zamanda CHG (H burada G'den farklı herhangi bir bazı temsil eder) sekansında metillenmemiş CpG insan embriyonik kök hücrelerinde gözlenmiştir. Son bulguların karmaşıklığı gen kontrolünde 5-metilsitozinin rolünün daha ileri derecede araştırılması ve epidemiyolojik çalışmalarda dikakate alınması gerektiğini göstermiştir. DNA'daki sitozin kaynakları S-adenozinmethiyoninden bir metil grubunun sitozin halkasının 5' konumuna bağlanmasıyla modifiye edilmiştir. Son zamanlarda TET proteinlerinin 5-metilsitozini, 5-hidroksimetilsitozine daha fazla modifiye ettiğini göstermiştir (Şekil-3b) (Jones ve Liang, 2009).

Yakın zamana kadar insan DNA'sında sadece temel değişimin 5-metilsitozin olduğuna inanılıyordu fakat 5-hidroksimetilsitozinin (5-hmC) beyin hücre DNA'sında ve lösemi hücresinde tespit edilmesi heyecan verici bir gelişme olarak kaydedilmiştir (Tahiliani ve ark., 2009).

TET (10-11 Translokasyon) proteinleri demetilasyonu aktive edebilmek için ya da bilinmeyen fizyolojik işlevi yerine getirmek için 5-metilsitozini, 5-hidroksimetilsitozine oksitleyebilmektedir (Şekil 3b).

2.1.2. S-Adenozil Metiyonin (SAM)

Homosistein metabolizmasının ilk basamağını oluşturan SAM, metil vericisi olarak görev yapan moleküldür. SAM, metiyonin aminoasidinden meydana gelir ve S-adenozil homosisteine (SAH) çevrilir (Şekil-4). DNA'nın metillenmesinde temel görev alan bu mekanizmada farklı bileşikler rol almaktadır (İzmirli ve ark., 2009).



Şekil-4. DNA Metilasyon Mekanizması (İzmirli ve ark., 2009).

SAM: S-Adenozil Metiyonin

SAH: S-Adenozil Homosistein

5 Metil THF: 5 Metiltetrahidrofolat

5,10 Metilen THF: 5,10 Metilen Tetrahidrofolat

MTHFR: Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Enzimi

BHMT: Betain Homosistein Metiltransferaz Enzimi

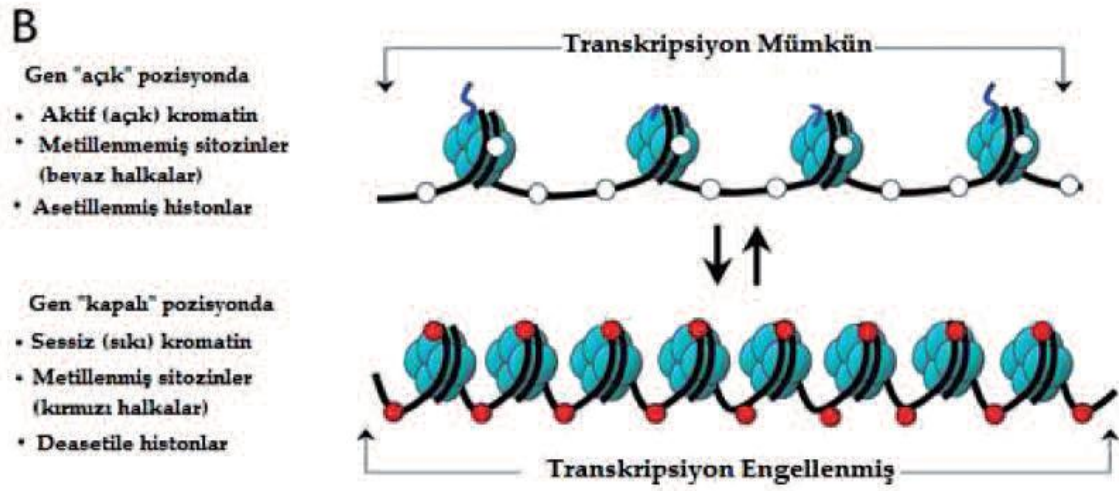
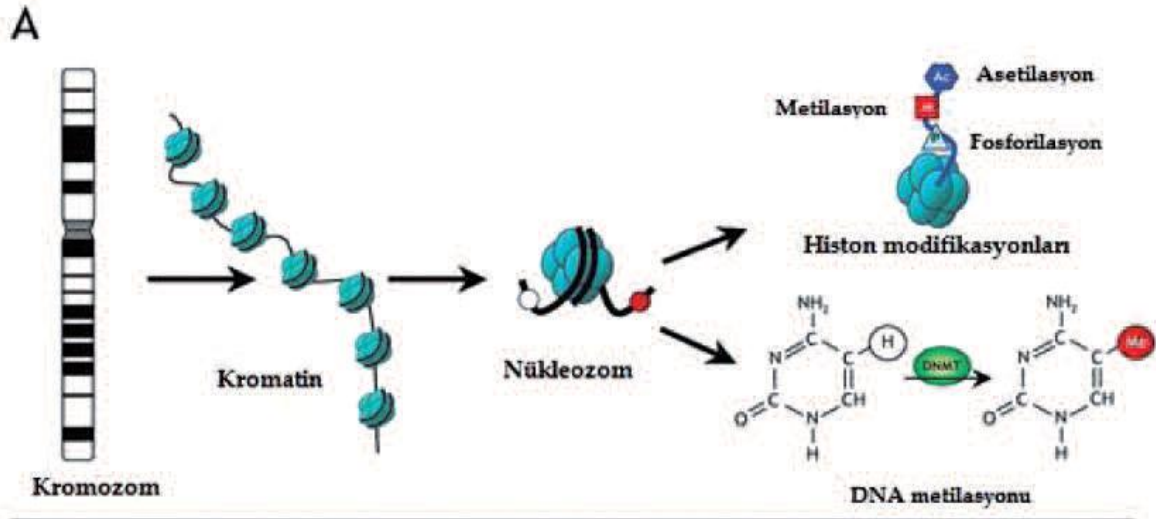
2.1.3. Histon Modifikasyonu

Genetik bilginin saklı olduğu DNA molekülü, çekirdekte bulunan histon ve non-histon proteinlerden oluşan ve kromatin adı verilen bir nükleoprotein kompleksidir (Ellis ve ark., 2009). Küçük molekül ağırlıklı bazik proteinlere de histon adı verilir. İki molekül histon H2A, H2B, H3 ve H4 proteinlerinin çevresini 146 baz çifti DNA'nın iki kez sarması ile meydana gelen nükleosomlar, kromatinin en küçük fonksiyonel birimidir (Brait ve Sidransky 2011, Dawson ve Kouzarides 2012, Kanwal ve Gupta 2012).

İnsanların genetik materyallerinin korunması, paketlenmesi, DNA transkripsiyon düzenleme, replikasyon ve tamir, histon proteinleri tarafından gerçekleştirilir (Shahbazian ve

Grunstein, 2007). Histonlar kovalent olarak asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, glikozilasyon, sumolasyon, ubikitasyon ve adenzindifosfat (ADP) ribozilasyon tarafından modifiye edilebilen nükleer küresel proteinlerdir (Kouzarides 2007, Luger ve ark., 1997, Shahbazian ve Grunstein 2007, Suganuma ve Workman 2008, Zheng ve ark., 2008). Bu Şekilde kromatin yapısını ve histon modifikasyonlarını etkiler. En yaygın histon modifikasyonları değişik çevresel kimyasallar tarafından gösterilen H3 ve H4 histonunun amino terminalindeki lizin kalıntılarının asetilasyonu ve metilasyonudur (Cress ve Seto 2000, Gluzak ve Seto 2007, Sterner ve Berger 2000). Histonların metilasyonu, lizin kalıntı durumuna bağlı olarak transkripsiyonun baskı veya aktivasyonu ile ilişkilidir (Yan ve Boyd, 2006).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonunun her ikisi de gelişim sırasında gen baskılama modellerinin kurulmasında yer alır. Bazı metilasyon formları lokal heterokromatin oluşumuna neden olurlar ki bunlar kolaylıkla geri dönüşümlüdür. Oysa DNA metilasyonu istikrarlı uzun süreli baskıya yol açar. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu yolaklarının birbirine bağımlı olduğu ve bu yolakların karıŐması SET alanı histon metil transferazlar ve DNA metil transferazlar arasındaki biyokimyasal etkileŐimlerden kaynaklanabildiği yakın zamanda anlaŐılmıŐtır. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu arasındaki iliŐkiler hem somatik hücre yeniden programlama hem de t m r genesis yanında normal gelişimi anlamada etkileri vardır (Cedar ve Bergman, 2009).



Şekil-5. a) Epigenetik Modifikasyonların Şematik Gösterimi.

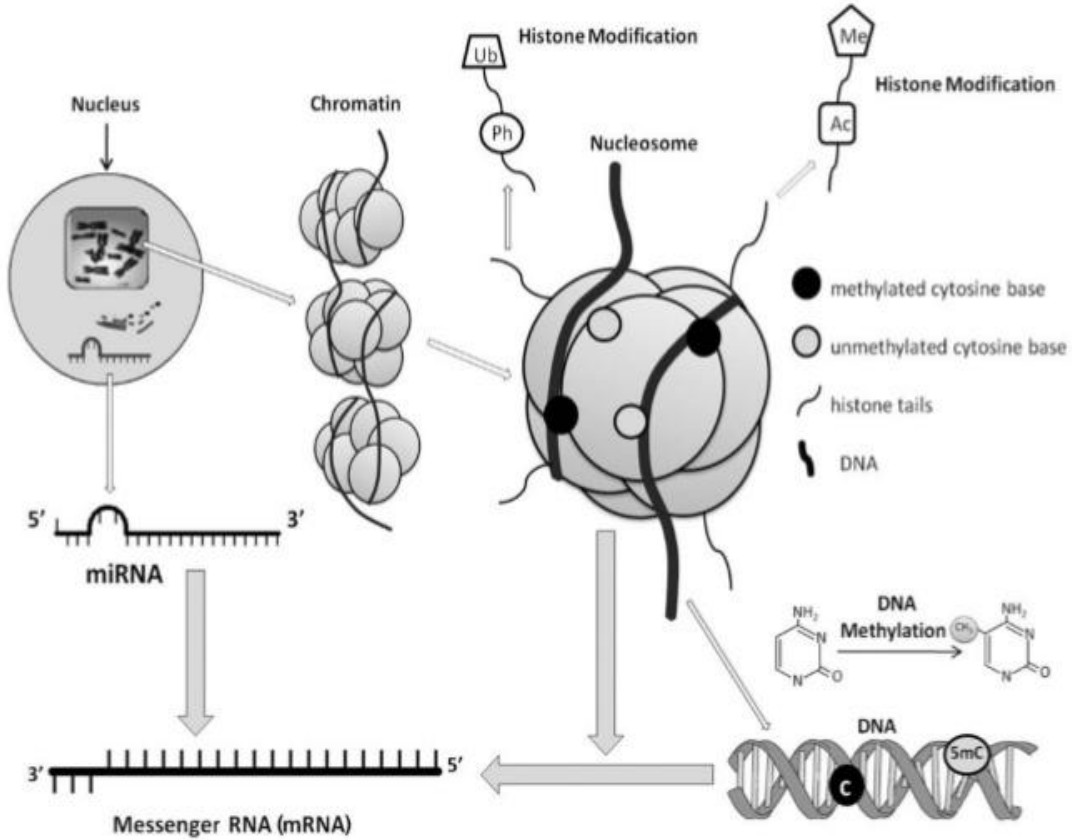
DNA dalları nükleozomu oluşturmak üzere histon oktamerlerinin etrafına sarılmıştır.

Şekil-5. b) Gen Ekspresyonunu Etkileyen Kromatindeki Reversibl Değişiklikler.

Kromatin aktif durumda iken genler eksprese edilir, kromatin sıkı durumda iken genler eksprese olmaz (Gürel ve ark., 2016).

2.1.4. Mikro RNA (miRNA)

miRNA'lar genomdan kodlanan, yaklaşık olarak 20-24 nükleotid uzunluğunda kısa tek sarmallı RNA molekülleridir. DNA tarafından tanımlanırlar fakat proteinlere çevrilmezler. miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3' okunmamış bölgelerine bağlanmasıyla transkripsiyon sonrasında hedef genlerin ekspresyonunu olumsuz olarak düzenlerler (Singh ve ark., 2008). Her bir olgun miRNA çoklu hedef mRNA'ların kısmen tamamlayıcısıdır ve hedef mRNA'ların inaktivasyonlarını belirlemek için RNA kaynaklı susturma kompleksini (RISC) yönlendirirler (Matkovich ve ark., 2010). miRNA'lar kromatin yapısının değişiminde kilit role sahiptirler ve genom düzeninin korunmasına katılırlar. Hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması, apoptoz ve metabolizma gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik olayları düzenlerler (Backes ve ark., 2010, Guil ve Esteller 2009, Singh ve ark., 2008). miRNA'lar normal hücre fizyolojisi için hayati önem taşımaktadırlar. miRNA'ların yanlış ekspresyonları kanser dahil birçok hastalık ile ilişkilidir (Kanwal ve Gupta, 2010). Günümüzde, kanser türlerinin sınıflandırılmasında miRNA profilleri kullanılmaktadır (Iorio ve ark., 2010).



Şekil-6. Epigenetik Düzeyde Transkripsiyonel Düzenleme (Zhang ve ark. 2012).

Günümüzde önem arz eden DNA 5mC metilasyonu, histon modifikasyonu ve miRNA'lar kromatin konformasyonunu ve gen anlatımını düzenlerler. CpG bölgelerindeki DNA metilasyonu genellikle gen ekspresyonunu baskılar. Histonlar, posttranslasyonel modifikasyon maruziyetiyle, Ac, metilasyon ve fosforilasyon gibi, kromatin yapısını ve gen ekspresyonunu etkileyen küresel proteinlerdir. Aktif genler genellikle düşük DNA metilasyonu ve yüksek oranda asetillenmiş kromatin oluşturmasını karakterize ederler ve transkripsiyon faktörlerine erişimi sağlarlar. miRNA'lar, protein kodlamayan RNA'ların küçük bir grubudur. Hedef miRNA'ların çevrilemeyen 3' bölgeleri için hedef genlerin posttranskripsiyonel düzeye bağlanmasıyla ekspresyonu negatif yönde düzenler (Zhang ve ark., 2012).

2.2. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser

Memeli genomunda bulunan bütün sitozinlerin %2-5'i 5-metilsitozin (5mC) şeklinde ve çoğunlukla CpG şeklinde bulunmaktadır (Beck ve Olek, 2006). Genomda bazı bölgelerde CpG çiftleri daha çok bulunmakta, bu bölgelere CpG adaları denilmektedir. Sağlıklı hücre gen-promotor bölgelerindeki CpG adaları genel olarak metillenmemişlerdir. Buna karşın tekrarlı genomik bölgeler aşırı miktarda metillenmişlerdir. Abarrent DNA metilasyonu, global DNA hipometilasyonu ve gen spesifik hipometilasyonu veya hipermetilasyonu şeklinde meydana gelmektedir. Global veya gen-spesifik DNA metilasyon paterninde meydana gelen değişimler (hipometilasyon ve hipermetilasyon) birçok kanser tipinde gözlenmiştir (Lubbert ve ark., 1992). Epigenetik değişiklikler kalıtsal ve geri dönüşümlüdür. Normal gelişim için önemli olan bu mekanizmaların bozulması malignan hücreye dönüşümüne yol açabilir (Ducasse ve Brown, 2006).

Son yıllardaki gelişmeler kanserin başlama, gelişim ve ilerlemesinde genetik faktörlerin yanında epigenetik modifikasyonların da etkin olduğu bir hastalık olduğunu göstermiştir (Reamon-Buettner ve ark., 2008). Kanser hücrelerinde birçok gen, epigenetik değişimlere uğramakta ve bundan dolayı epigenetik modifikasyonların karsinogenezis sürecinin önemli bileşenleri oldukları kabul görülmektedir (Esteller 2006, Jones ve Baylin 2007).

Genel olarak kanserin, onkogen ve tümör supresör genlerinde oluşan bir dizi mutasyon(lar)un sonucu olarak meydana geldiği düşünülmektedir (Feinberg ve ark., 2006). Kanser araştırması genomdaki değişikliklerle kanserojen sürecin bağlantılı olduğunu kanıtlamıştır (Hanahan ve Weinberg, 2011). DNA metilasyon sistemindeki partiküler modifikasyonlar ve değişiklikler; çevresel maruziyetler ve kanser gelişimi arasındaki ilişki

için mükemmel bir değerlendirme sunmaktadır (Ballestar ve Esteller, 2002). Aslında epigenetik değişikliklerin, tümör gelişimi ve ilerlemesi sırasında hemen hemen her aşamasında rol aldığı kesinleşmiştir (Herceg 2007). Bu bulgular sonucunda giderek kabul gören görüş epigenetiğin karsinogenezde temel bir rol oynadığıdır (Laird 2005).

Son zamanlarda DNA metilasyonu ve kanser gelişimi arasındaki bağlantıyı açıklamaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Aslında anormal DNA metilasyon desenlerinin güçlü tanı ve risk değerlendirme biyomarkırları olarak hizmet edebileceğine inanılmaktadır (Laird 2005).

DNA hipometilasyonu, kromatin hipoasetilasyonu, gen spesifik hipometilasyon ve hipermetilasyonları kanser başlama ve gelişim sürecinde rol alan epigenetik değişimlerden bazılarıdır (Reamon-Buettner ve ark., 2008). Havyan modellemeleri ve insanlarla yapılan çalışmalarda global DNA metilasyonunun katı ve hematolojik kaynaklı tümörlerin ortak bir özelliği olduğu ve farklı genomik sekanslarda meydana gelebildiği ifade edilmiştir. Diğer taraftan DNA metilasyonunda meydana gelen değişimlerin kanserle ilintili olan genlerin ifadelerinde değişikliklere ve daha sonra genomik kararsızlığa neden olduğu bildirilmiştir (Gaudet ve ark., 2003, Holm ve ark., 2005).

İnsan genomunun farklı yerlerinde meydana gelen metilasyon değişimlerinin birçok kanser hücrelerinin ortak özelliği olduğu görülmüştür. Başta tümör supresör ve proto-onkogenler olmak üzere özellikle bazı genomik bölgelerin daha fazla metillendiği veya daha az metillendiği görülmüştür. İnsan genomunda yaklaşık olarak 4 milyon Alu tekrarlı dizileri ve yarım milyon uzunluğunda araya serpiştirilmiş nukleotid (LINE-1) dizilerinin var olduğu dolayısı ile bu yapılardaki metilasyon derecelerinin global DNA metilasyonunu temsil ettiği kabul görmektedir (Weisenberger ve ark., 2005, Yang ve ark., 2004). İnsan genomundaki Alu ve LINE-1 tekrarlı dizilerin aşırı miktarda metillendiği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2004). LINE-1 ve Alu elementlerinde meydana gelen demetilasyon bu elementlerin retrotransposon aktivitelерinde artışa neden olmakta, bu durum insersiyon ve/veya homolog rekombinasyon ile genomik kararsızlıkla sonuçlanmaktadır (Ostertag ve Kazazian Jr, 2001). Bununla birlikte global DNA hipometilasyonunun gen transkripsiyonunda de-regulasyona neden olduğu bildirilmiştir (Han ve ark., 2004). Son yıllarda farklı malignitelerde global DNA metilasyonunda azalmaların olduğu ifade edilmiştir. Gama Sosa ve arkadaşları farklı tümörlerle yaptıkları çalışmada hipometilasyonun tümörün ilerlemesi ile ilintili olduğunu göstermişlerdir (Gama-Sosa ve ark., 1983). Proto-onkogenlerde meydana gelen hipometilasyon özellikle akciğer tümörleri ve lösemide görülmüştür. Akciğer tümörleri ile yapılan çalışmalarda c-fos, c-myci, Ha-ras ve Ki-ras gibi proto-onkogenlerde DNA

metilasyonunda azalmaların meydana geldiği gösterilmiştir. Bununla birlikte farklı lösemi tipleri ile yapılan çalışmada Erb-A1 ve bcl-2 proto-onkogenlerinde hipometilasyon tespit edilmiştir (Rao ve ark., 1989). DNA hipometilasyonu gastrik kanserlerde R-RAS ve MAPSIN, kolon kanserinde S-100 ve melanomada MAGE (melanoma-associated antigen) gibi büyüme teşvik edici genlerin aktivasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Wilson ve ark., 2007).

Özetle DNA hipometilasyonu farklı mekanizmalar aracılığı ile kodlanmayan bölgeler ve genlerin aktivasyonuna neden olarak kanser gelişimine ve ilerlemesine katkı sağlamaktadır. Kanser hücrelerinde tümör supresör genlerin promotor bölgelerinde meydana gelen hipermetilasyon gen anlatımında azalmaya neden olan yaygın bir olaydır (Reamon-Buettner ve ark., 2008). Hipermetilasyon ile bahsedilen genlerin transkripsiyonlarında inaktivasyona ve hücre fonksiyonlarının kaybolmasına neden olmaktadır. Örneğin p16 ve MLH1 gibi birçok gende meydana gelen hipermetilasyon, tümör supresör genlerinin susturulmasına neden olmaktadır (Herman ve Baylin, 2003). Farklı tümörlerle yapılan çalışmalarda 3p, 11p ve 17p kromozomlarının bazı bölgelerinde hipermetilasyon tespit edilmiştir. In vivo koşullarda bu bölgelerde metilasyon görülmezken, kanserli dokularda metillendiği gösterilmiştir (Jones ve Baylin, 2007). Tüm bu sonuçlar, kanserin başlaması ve ilerlemesi gibi aşamalarda farklı genom bölgelerinde meydana gelen DNA metilasyon değişimlerinin doğrudan etkili olduğunu göstermektedir.

2.3. Epigenetik Mekanizmalar ve Diğer Hastalıklar

Epigenetik, biyolojinin hızla gelişen alanlarından biridir (Portela ve Esteller, 2010). Epigenetik mekanizmaların insanlar üzerindeki etkilerinin kanıtlanması, hastalıklarla ilişkisinin anlaşılmasını da kolaylaştırmıştır (Jiang ve ark., 2004). Birçok hastalığın sebebinin, epigenetik mekanizmanın düzgün çalışmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Robertson 2005). Epigenetik mekanizmalardaki değişiklikler hastalıkların oluşmasında önemli bir role sahiptir (Tsankova ve ark., 2007).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar epigenetik değişikliklerle nörodejeneratif ve nörolojik hastalıklar arasındaki ilişkiye ışık tutmuştur. Nörolojik hastalıkların büyük bir bölümünde DNA metilasyon modellerinde sapmalar, hiper ve hipo metilasyon görülmüştür. Rapor edilen hipermetilasyon promotor vakaları arasında Alzheimer hastalarında neprilysin (akut lenfoblastik lösemi antijeni, NEP, MME olarak da bilinir.), Friedreich atak hastalarında FXN ve omurga kas atropisi hastalarında SMN2 yer almaktadır (Urduingio ve ark., 2009).

Parkinson hastalarının substantia nigrasında (beynin, latince 'siyah cisim' anlamına gelen kısmı, rengini ve ismini nöromelanin denen pigmentten alır) tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) promotor hipometilasyonuna bağılı olarak nöronal hücrelerin apoptozunu indüklediğı bildirilmiştir (Pieper ve ark., 2008). Multipl skleroz hastalarının PADI2 promotor bölgesinde hipometilasyon görülmüştür (Gibbs ve ark., 2010). DNA metilasyon modellerindeki değişiklikler sadece gen promotorlerini etkilemekle kalmaz aynı zamanda nöro genetik hastalıklardan, Prader Wili ve Angelman sendromlarına neden olabilir. Her iki hastalıkta da anormal DNA metilasyonu 15q11-q13 kontrollü bölgesinde baskı oluşturur (Robertson 2005). Nörolojik hastalıklarda histon modellerinde değişiklikler görülmüştür. Histon hipoasetilasyonu en sık olanıdır. Histon hipoasetilasyonuna iyi bir örnek, amyotrofik lateral skleroz (ALS)'dir (Gibbs ve ark., 2010). Nörolojik hastalıklarda diğer hipoasetilasyon örnekleri ise Parkinson ve Huntington hastalıkları (Urduingio ve ark., 2009) ve Friedreich atağıdır (Herman ve ark., 2006).

Otoimmünite bozuklukları ve epigenetik değişikliklerle ilgili pek çok araştırma DNA metilasyon değişikliklerini merkezine almıştır. En iyi bilinen otoimmün hastalıklardan biri olan ICF (immün yetmezlik, sentromerik kararsızlık ve yüz anomalileri) sendromunun nedeni DNMT3B'deki heterozigot mutasyonlardır. Diğer otoimmün hastalıklar global hipometilasyona sahip olan sistemik lupus eritematosus (SLE) ve romatid artiritir (Javierre ve ark., 2008). Otoimmün hastalıklarda histon değişikliklerinin rolü hakkında çok şey bilinmiyor olsa da romatit artirit ve tip 1 diyabette rolü olduğunu gösteren araştırmalar vardır (Miao ve ark., 2008).

Merkezi sinir sistemi, insandaki en karmaşık sistemlerden biridir. Bir organdaki farklı ekspressiyon modellerini farklı bölgeler yapmaz fakat aynı hücre tipi organın lokasyonuna bağılı olarak farklı transkripsiyonel düzenlemeye sahiptir (Gibbs ve ark., 2010). Mitotik çıkış, sinirsel hücreler multipotansiyelini kaybettiğinde sinir sistemi gelişiminde önemli bir adımdır, transkripsiyonel programın çok hassas bir şekilde ayarlanmasını gerektirir (Urduingio ve ark., 2009). Epigenetik faktörler bu düzenlemede kilit rol oynar. Epigenetik genlerdeki genetik mutasyonlar bazı nörogelişimsel hastalıklara da neden olurlar. Rett sendromu X'e bağılı MBD proteininin MeCP2'de nokta mutasyonlarının neden olduğu nörolojik bir hastalıktır. MeCP2 kromatin yapısında mRNA'nın eklenmesini düzenlemede önemli bir role sahiptir (Urduingio ve ark., 2009). Rubinstein Taybi sendromu otozomal dominant ve Coffin Lowry sendromu nörogelişimsel, histon modifikasyonlarının indüklediğı bozukluklardır (Clayton ve ark., 2000).

Epigenetik mekanizmalar obezitenin gelişmesinde de önemli rol oynamaktadır (Friedman 2003). Gebeliği sırasında açlık yaşayan annelerin, doğan çocukları yetişkin olduklarında obezite ve insülin direnci göstermeye yatkın olduğu, bu özelliklerini de daha sonraki nesillere aktardıkları ve bu sürecin epigenetik değişikliklerle mümkün olabileceği düşünülmektedir (Ravelli ve ark., 1976).

2.4. Çevresel Kirleticiler ve Epigenetik Mekanizmalar

Hayvan modelleme ve insan popülasyonları ile yapılan çalışmalar çevresel kirleticilerden kaynaklı maruziyetlerin DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve miRNA gibi epigenetik değişimlere neden olduğunu göstermiştir (Baccarelli ve Bollati 2009, Bollati ve Baccarelli 2010). Son yıllarda elde edilen bilimsel veriler, erken dönemde dahi çevresel kirleticilere maruz kalmanın doğum anomalilerinin yanı sıra bireylerin kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve obezite gibi hastalıklara yatkınlıklarını arttırdığını göstermiştir (Dolinoy ve ark., 2007a, Dolinoy ve ark., 2007b, Jirtle ve Skinner 2007). Prenatal ve postnatal evrelerdeki maruziyetten sonra edinilen bu duyarlılığın epigenetik modifikasyonlarla ilintili olduğu, çevresel maruziyetten sonra meydana gelen epigenetik değişimlerin jenerasyonlar arası kalıtılabildiği bildirilmiştir (Cropley ve ark., 2006). Yapılan çalışmalar çevresel kaynaklı kirleticilerin gen anlatımı üzerine etkili epigenetik değişimler aracılığı ile hastalıklara neden olabileceğini göstermiştir. Tüm bunlar epigenetik mekanizmaların hastalıkların etiyolojisinde büyük öneme sahip olduğunu göstermektedir (Hou ve ark., 2011). Dinamik kromatin biçimlenmesi gen transkripsiyonunun ilk aşaması için gereklidir. Bunun için gen promotor bölgeleri ve düzenleyici bölgelere ulaşılabilirliğinin sağlanması gerekmektedir (Vaissière ve ark., 2008). miRNA'lar, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu içeren epigenetik değişimler bu düzenleyici süreçlere katılır böylece gen anlatımı kontrol edilir (Grewal ve Moazed 2003, Reik ve ark., 2001). Epigenetik mekanizmalardaki değişikliklerin çeşitli çevresel kirletici maruziyeti tarafından değiştirildiği ve meydana gelen bu değişimlerden bazılarının ise farklı hastalıklarla bağlantılı olduğu görülmüştür (Baccarelli ve Bollati 2009, Heightman 2011).

2.4.1. Metaller

Ağır metaller yaygın çevresel kirleticilerdendir ve kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar ve otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Hu 2002). Bazı

çalışmalar, metallerin biyolojik makro moleküllerin bozulmasında oksidatif katalizör olarak görev yaptığını göstermiştir (Galaris ve Evangelou, 2002). Metal iyonlarının reaktif oksijen türlerini (ROS) indüklediği ve böylece serbest radikallerin oluşmasına yol açtığı saptanmıştır (Galaris ve Evangelou, 2002, Leonard ve ark., 2004). ROS birikimi epigenetik faktörleri etkilediği görülmüştür (Babar ve ark., 2008, Donaldson ve ark., 2003, Galaris ve ark., 2008, Gilmour ve ark., 2003, Leonard ve ark., 2004, Monks ve ark., 2006, Sakano ve ark., 2004). Yapılan çalışmalar aracılığıyla metaller ve DNA metilasyonu arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır (Valko ve ark., 2005).

Arsenik maruziyeti sonucunda belirli genlerin global ve promotor bölgelerinde DNA metilasyonunun değiştiği kanıtlanmıştır. İnorganik arsenik insan vücuduna girdikten sonra detoksifikasyonu metillemiştir (Reichard ve ark., 2007). Arsenik toksisitesi miRNA ekspresyonundaki değişikliklerle de ilişkilendirilmiştir (Marsit ve ark., 2006). Sodyum arsenit ile muamele edilen insan lenfoblastoid hücrelerinin miRNA profillerinde değişiklikler olduğu görülmüştür. Arseniğin ilginç bir şekilde karbon mekanizmasıyla ilişkili spesifik miRNA'ların ekspresyonunu da değiştirdiği gözlemlenmiştir (Marsit ve ark., 2006).

Uranium kronik maruziyetin (askeri operasyonlarda genel olarak kullanılan radyoaktif ağır metal) anormal DNA hipometilasyonu ve lökomogenez ile ilişkili olduğu görülmüştür. (Sakano ve ark., 2004).

Nikel, kromatin yoğunluğunu arttırarak yaşlılık veya tümör baskılayıcı genler gibi önemli genlerde de novo DNA metilasyonunu başlatabileceği önerilmiştir. Nikel'in histon modifikasyonlarını da etkileyerek hastalık sebebi olabileceği kanıtlanmıştır (Lee ve ark., 1995).

Kadmiyumun, global DNA metilasyonunu değiştirdiği belirlenmiştir. Kadmiyumun in vitro ortamda DNMT'leri inhibe edip ve başlangıç global DNA hipometilasyonunu indüklediği görülmüştür. Kadmiyum, proto-onkogenlerde onkogen ekspresyonuna ve bunun sonucunda hücre poliferasyonuna neden olan DNA metilasyonunu inhibe edebileceği saptanmıştır (Huang ve ark., 2008, Takiguchi ve ark., 2003).

Civa, çeşitli çevresel ortamlarda ve yiyeceklerde insanları ve hayvanları olumsuz etkileyebilecek düzeyde mevcuttur. Kutup ayılarının beyin hücrelerindeki DNA hipometilasyonu civa maruziyetiyle ilişkilendirilmiştir (Richard Pilsner ve ark., 2010). Metil civa, deniz mahsüllerinde bulunan potansiyel nörotoksik bir ajan ve çevresel kirleticidir. Doğum öncesi metil civa maruziyeti, farelerde öğrenme ve motivasyon davranışlarında kalıcı değişikliklere neden olmuştur (Onishchenko ve ark., 2008).

Kroma maruz kalan akciğer kanser dokularında, krom maruziyeti yaşamayan akciğer kanser dokularına kıyasla ölçülen p16 hipermetilasyonunu etkilediği görülmüştür (Kondo ve ark., 2006).

2.4.2. Hava Kirliliği

Hava kirliliğine neden olan partikül madde maruziyeti kardiyovasküler ve solunum hastalıklarıyla ilgili artan morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Baccarelli ve ark., 2008, Jardim ve ark., 2009). Siyah karbon, araç trafiğinde üretilen partikül maddelerin bir bileşenidir ve Boston bölgesindeki 1097 yaşlı erkek kan DNA'sı örneğinde LINE-1 tekrarlayan elementlerinde DNA metilasyonunun azalmasıyla bağlantılı olmuştur (Tarantini ve ark., 2009). Bir çelik fabrikasındaki işçilerin araştırmasından DNA metilasyonu üzerinde PM (partikül madde) etkileri için iyi karakterize edilmiş çapları 10 mikrometreden küçük (PM₁₀) partikül madde maruziyeti, ek delil olmuştur. Gen promotor bölgesindeki indüklenmiş nitrik asit sentezinin metilasyonu, dökümhanedeki 3 günlük çalışmadan sonraki kan örneklerindeki bireysel maruziyet PM₁₀ bazal olarak karşılaştırıldığında azalmıştır. Aynı çalışmada, LINE-1 ve Alu'nun metilasyonunun, uzun süreli PM₁₀ maruziyetiyle negatif ilişkili olduğu bulunmuştur (Tarantini ve ark., 2009). Bunun aksine, bir çelik fabrikasından toplanan hava partiküllerine maruz kalan fareler üzerindeki hayvan deneyi, spermin genomik DNA'sında global hipometilasyonu göstermiş ve çevresel maruziyetin kaldırılmasından sonra değişiklik devam etmiştir (Yauk ve ark., 2008). Solunum yoluyla alınan dizel egzoz partikül maruziyeti burun içi *Aspergillus Fumigatus*'a farede IL-4 promotorünün CpG sitesinde interferon gama (IFN γ) promotor ve hipometilasyonun bazı sitelerinin hipermetilasyonuna neden olmuştur. Her iki gen promotorlerinin değişen metilasyonu IgE düzeyi değişiklikleri ile ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark., 2007, Perera ve ark., 2009).

2.4.3. İçme Suyundaki Kimyasallar

Suyun pek çok kimyasal çözme ve tutma yeteneği vardır; organik materyaller, endüstriyel atıklar, petrol türevleri, tarımsal sentetik gübreler, deterjanlar, radyonükleidler, pestisitler, inorganik tuzlar, kimyasal ve organik sentetik materyaller gibi (Calderon 2000).

İçme suyundaki doğal kirlilik birçok faktörden kaynaklanır. Kar ve yağmur suyu partiküller mineraller ve atmosferdeki gaz olan kirleticileri içerir ve bunlar içme suyunun saflık derecesini etkiler (Weiner 2010).

Klorlama yan ürünleri, kirlenmeyi önleme amaçlı suyun klorlamasının bir sonucu olarak oluşmaktadır. İçme suyundaki çeşitli klorlama yan ürünleri; trietiltin, kloroform ve trihalometanlar gibi, sağlık için olumsuz potansiyel etkileri sorgulanmıştır (Coffin ve ark., 2000, Mages ve ark., 1989, Pereira ve ark., 2001). Bu kimyasalların bazı epigenetik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. İçme suyundaki trietiltin ile kronik maruziyet sonucu kendinden geçen farelerde, fosfatiletanolamin-N-metiltransferaz aktivitesinin artmasıyla birlikte beyin ödemi gelişimi gözlenmiştir. Metilasyondaki bu artış, trietiltin tarafından uyarılan zar hasarlarına karşı korumak için telafi edici bir mekanizma olabilir (Mages ve ark., 1989). Kloroform, dikloroasetikasit (DCA) ve trikloroasetik asit (TCA), üçü de karaciğer ve böbrek kanserojenleridir ve içme suyunda bulunan klorin dezenfeksiyon yan ürünleridir. DCA, TCA ve kloroform uygulanan farelerde global hipometilasyon ve c-myc'nin expressiyonunda artış gözlenmiştir (Pereira ve ark., 2001). Trihalometanlar (kloroform, bromdiklor metan, klordibrommetan ve bromform) klorlu içme suyundaki organik kirleticileri düzenlemiştir. Dişi B6C3F1 fare karaciğerinde trihalometanlar kanserojenik aktivite göstermiştir. Kloroform ve bromdiklorometan hepatik DNA'da 5-metilsitozin derecesini düşürmüştür. C-myc geninin promotör bölgesindeki metilasyonu, kanserojenik aktivitesiyle uyumlu trihalometanlar tarafından azaltılmıştır (Coffin ve ark., 2000).

2.5. Pestisit Maruziyeti ve Kanser

Kronik hastalıklar yavaş ilerlerler ve uzun vadede ortaya çıkarlar ve günümüzde ölüm sebebi olarak lider konumdadırlar. Ölümlerin %60'nın üzerindeki sebebi kronik hastalıklardır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) raporuna göre 2008 yılında kronik hastalıklar sebebi ile 36 milyon insanın öldüğü rapor edilmiştir. Bunların 9 milyonu 60 yaşın altında ve erken ölümlerin %90'ı düşük ve orta gelirli ülkelerde olduğu bildirilmiştir (Orantes ve ark., 2014).

Dünyada pestisit geniş alanda kullanımıyla birlikte sağlık üzerindeki etkilerinin hızla artması kaygı vericidir. Pestisit maruziyeti ve kronik hastalıkların (farklı kanser türleri, diyabet, farklı nörodejeneratif hastalıklar Parkinson Alzhemier gibi ve amiyotrofik lateral sclorosis (ALS) doğum kusurları ve üreme bozuklukları) oranlarının artışı arasında büyük bir ilişki vardır. Pestisit maruziyeti ile diğer bazı kronik hastalıkların (solunum problemleri özellikle astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (COPD), kardiyovasküler hastalıklar ateroskleroz ve kronik arter hastalığı, kronik nefropatiler, otoimmün hastalıklar gibi sistemik lupus eritematöz ve romatizmal arterit kronik yorgunluk sendromu ve yaşlanma) ikinci derece

ilişki kanıtları vardır. Kronik hastalıkların genel özelliği hücrel iç dengede bir rahatsızlık olmasıdır pestisitler aracılığı ile birincil perbutasyon eylemleri iyon kanalları, enzimler reseptörler gibi indüklenebilir ya da ana mekanizmanın dışında ara yollara aracılık edebilir (Mostafalou ve Abdollahi 2012, Souza ve ark., 2011).

Kanserle pestisitlerin ilişkisine dair ilk raporlar 50 yıl önce üzüm yetiştiriciliğinde böcek öldürücü olarak kullanan çiftçilerde cilt ve akciğer kanserinin yüksek prevalansı ile ilgilidir (Jungmann 1966, Thiers ve ark., 1967). Geçen yarım yüzyılda geniş bir yelpazede yapılan populasyon tabanlı başlıca çalışmaların bu konuda yürütülen önemli bir ilerleme pestisitlerin farklı malignite tiplerinin insidansı ile ilişkisini anlamak olmuştur (Penel ve Vansteene, 2007). IARC, yaşamı boyunca bir şekilde pestisitlere maruz kalan kişilerde kanser insidansı üzerine kohort çalışmaları gerçekleştirmiştir (Baldi ve Lebailly, 2007). Pestisit maruziyetiyle ilgili epidemiyolojik ve tarımsal sağlık çalışmalarına dayalı artan kanıtlar meme, prostat, akciğer, kolorektal, testis, pankreas, yemek borusu, mide, cilt kanseri ve non-Hodkin lenfoma gibi farklı neoplazma türleri rapor edilmiştir (Alavanja ve Bonner 2012, Jaga ve Dharmani 2005). Van Maele-Fabry ve ark. (2006, 2007, 2008), pestisit imalat işçilerinde meta analiz risk tahminleriyle pestisit maruziyetinin prostat kanseri ve lösemi için olası risk faktörü olduğunu işaret etmişlerdir. Bir dizi tarım sağlık çalışmalarında Lee ve ark. (2004), kanser insidansı (kemik iliği lenf kanserleri için alaklor, akciğer kanseri için klorpirifos ve kolorektal kanser için alacarb) ve pestisit maruziyeti arasında ilişki bulmuşlardır. Günümüzde pestisitlerin düşük doz kronik maruziyeti kanserin gelişmesi için önemli bir faktör olarak kabul edilir. Bu nedenle karsinojenite testleri pestisitlerin kanserojen potansiyelini tespit etmek için pazarlanmasına izin verilmeden önce uygulanır. Kanserojenite testleri, kemirgenin her iki cinsiyetin iki farklı türü kullanılarak yapılan uzun vadeli (yaklaşık 2 yıl) biyoanalizdir. 2010 yılında EPA Pestisit Programı tarafından yayınlanan listede, kimyasalların kanserojen potansiyeli değerlendirilen 70'den fazla pestisit muhtemel veya mümkün karsinojen olarak sınıflandırıldı. Bu sınıflandırma hayvan çalışmalarından, metabolizma çalışmalarından diğer kanserojenlerle yapısal ilişkilerinden (epidemiyolojik bulgular insanda mevcutsa) elde edilen bilgilere göre gerçekleştirilmiştir.

2008 yılı istatistiklerine göre dünya genelinde 12,7 milyon kanser vakasının görüldüğü ve 7,6 milyon kişinin kanserden dolayı öldüğü bildirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde 2020 yılına kadar her yıl 16 milyon yeni vakanın görüleceği öngörülmektedir (Torre ve ark., 2015). Birçok çalışma bireylerin yaşam şekillerinin dışında genetik faktörlerin, beslenme şekilleri ve çevresel kirleticilerin kanser riskini arttırdığını göstermiştir. Her yıl 13 milyon kişinin çevresel kaynaklı kirleticilerden dolayı öldüğü ve hastalıkların %24'ünün çevresel kirleticilere

maruziyetten kaynaklandığı vurgulanmıştır (Prüss-Üstün ve Corvalán, 2006). Amerika’da yapılan bir çalışmada insanların kan ve idrar örneklerinde 148 farklı çevresel kaynaklı kimyasalın bulunduğunu göstermiştir (Bollati ve Baccarelli, 2010).

Bu durum canlıların çevresel kaynaklı kirleticilerden ne kadar çok etkilendiğinin iyi bir göstergesidir. Yapılan birçok epidemiyolojik çalışma farklı çevresel kirleticiler (ağır metal, pestisit, toksik organik kirleticiler, radyoaktif maddeler) ile kanser riski arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Pestisitler oldukça toksik, biyolojik olarak yıkıma uğramayabilen dolayısı ile çevrede uzun süre kalıcılığı olabilen kimyasal karışımlardır. Birçok pestisiti olası karsinogen veya karsinogen olarak sınıflandırmışlardır (Bolognesi 2003). Pestisitlere maruz kalan bireyler ile ilgili son yıllarda birçok epidemiyolojik çalışma yapılmış, bu çalışmalar sonucunda pestisit maruziyeti ile hematopoetik, prostat, pankreas, beyin, akciğer ve diğer organ kanserleri arasında ilişki olduğu görülmüştür. Doğrudan veya dolaylı olarak pestisitlere maruz kalan çocuklarda ise lösemi, non-Hodgkin lenfoma, beyin tümörü, Wilt tümörleri ve Ewing sarkoma risklerinin arttığı görülmüştür (Dich ve ark., 1997). Önerilen çalışmada değerlendirilecek olan pestisitler ve insan hayatında kullanılan diğer pestisitler, kullanılmalarına onay verilmeden önce birçok genotoksisite, mutajenite ve kanser ile ilgili testlerden geçmektedirler. Bu testlerden elde edilen verilere göre bu pestisitler kullanılmaktadırlar. Ancak epidemiyolojik çalışmalar pestisitlerin çok kullanıldığı toplumlarda bazı kanser türlerinin yaygın olduğunu ve kanserli birey sayısının sağlıklı toplumlara göre daha fazla olduğunu göstermiştir.

2.6. Pestisit Maruziyeti ve Epigenetik Değişimler

Epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve miRNA’ları içermektedir (Chuang ve Jones, 2007). Son yıllarda in vitro ve in vivo şartlarda yapılan çalışmalar pestisit maruziyetinin epigenetik modifikasyonlara neden olduğunu göstermiştir (Jones ve Baylin 2007, Markowitz ve Bertagnoli 2009). DNA metilasyon sistemi yüksek dozlardaki metilcivaklorid veya poliklorfenil gibi organoklorin pestisitlere maruz kalmasıyla etkilenebilir. Bu kimyasallara maruziyet sonucunda yapılan Piro sekans metilasyon analizi, tümör baskılayıcı gen p16 (INK4a)’nın CpG bölgelerinin promotör metilasyonun yüksek doz gruplarında azaldığını gösterdi (Desaulniers ve ark., 2009). Paraquat yaygın olarak kullanılan bir herbisittir ve organoklorin insekisi olan Dieldirin, potansiyel Parkinson hastalığıyla ilişkili çevresel kimyasallar arasındadır. Histon asetilasyonu nörotoksik etki sırasında dopaminerjik nöral hücrelerdeki anahtar epigenetik değişimi temsil eder. Paraquat maruziyeti

zamana bağlı olarak histon H3 asetilasyonunu indüklemiş ve toplam histon deasetilaz aktivitesini azaltmıştır. Mezensefalik dopaminerjik nöronal hücrelerde, Dieldirin maruziyeti zamana bağlı olarak H3 ve H4 histon çekirdeğinin asetilasyonunu arttırmıştır. Ayrıca fare modellerinde uzun süreli Dieldirin maruziyeti sitriatum ve substantia nigra da histon hiperasetilasyonunu indüklemiştir (Song ve ark., 2011).

Hayvan modelleme çalışmalarında vinclozolin ve methoxyclor gibi pestisitlerin germ hücrelerinde DNA metilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu değişmenin testislerde fonksiyon bozukluğu ve ovaryum fonksiyonu ile ilintili olduğu vurgulanmıştır (Anway ve ark., 2005, Anway ve ark., 2006, Guerrero-Bosagna ve ark., 2010). Benzer şekilde dichloro ve trichloroasetikasite maruz bırakılan farelerde c-jun ve c-myc genlerinin promotor bölgelerinde dimetilasyon gözlenmiştir (Tao ve ark., 2000). Yine deney hayvanları ile yapılan toksisite çalışmasında dichlorovos pestisitinin birçok dokuda DNA metilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Proctor ve ark., 2004). Arktik bölgede yaşayan Inuit'larla yapılan çalışmada tekrarlı elementlerdeki DNA metilasyonunun artan plazma pestisit ve kalıcı organik kirleticilerin kalıntı miktarları ile azaldığı tespit edilmiştir (Rusiecki ve ark., 2008). Benzer bulgular Kore'de yapılan bir çalışmada elde edilmiştir (Kim ve ark., 2010). Ayrıca yapılan çalışmalar, pestisit maruziyetinin metilasyon dışında histon modifikasyonuna da neden olduğunu göstermiştir. Dieldrin yaygın olarak kullanılan bir organoklorin pestisittir. Dieldrin maruziyetinin zamana bağlı olarak H3 ve H4 histonlarının asetilasyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir (Song ve ark., 2010). Tüm bu çalışmalar, farklı gruplarda yer alan pestisitler için yapılmıştır.

Tetraklormetan ve klorofoslara maruziyet kromatin yapısına zarar verebilir ve bu etki bir fitosteroid prepatı olan BTK-8L enjeksiyonuyla önlenabilir. Bu hazırlık histon proteinlerinin kromatine bağlanmasıyla ve nükleoprotein kompleks yapısıyla ilgilidir. Bunun sonucunda kromatin fraksiyon bileşenlerine tetraklor metan ve klorofosun zararlı etkisi azalır (Levitskii ve ark., 1996).

Propoxur, N-metilkarbamat insektisit sınıfının bir üyesidir. Subtropikal ölkelerde popüler böcek öldürücü ajanlar arasındadır. Kuo ve ark. Tarafından (2008)' de insan gastirik hücre hattı kullanılarak bu bileşiğin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerine ulaşmak için araştırma yapılmıştır. Histon H2AX fosforilasyon ekspresyonunun analizinde N-nitroso Propoxurun hücresel hasarı indüklediği doğrulanmıştır (Kuo ve ark., 2008).

Pestisitlerin neden olduğu epigenom üzerindeki etkiler miRNA ekspresyon profilinde değişikliğe neden olabilir. Böylece gen düzenlemedeki değişikler bu kimyasalların insan sağlığı üzerindeki zararlı etkilerini açıklayabilir. Triadimefon, propikanozol ve miklobütanil

önemli tarımsal fungusit sınıfı olan kanazollerdir. Triadimefon ve propikanazol fare karaciğerinde tümör oluşumuna neden olurken miklobütanilin böyle bir etkisi yoktur. Ross ve ark. (2010), konazolların (Triadimefon, propikanazol ve miklobütanil) tümörüjenite etkilerini ve moleküler belirleyicileri anlamak için fareleri konazollarla muamele ettiler. miRNA'lar karaciğerden izole edildi ve analizi yapıldı. Tümör oluşturan kanazoller tümör oluşturmeyen kanazollere göre daha fazla miRNA ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu anlaşıldı.

2.7. Glyphosate ile İlgili Yapılan Toksikite Çalışmaları

Kimyasal kirletici karışımlarının gerçek etkileri halk sağlığı için endişe verici boyuttadır (Monosson 2005). İnsanlar her gün yüzlerce bileşene maruz kalmaktadırlar. Ticarileştirilmiş kombinasyonlar ilk kaygı konusu olabilir. Genetiği ile oynanmış tarımsal organizmalar (GDO'lar) dünya genelinde sürekli olarak artmakta ve bunların dikkatli olarak değerlendirilmesi gerekmektedir (Séralini ve ark., 2009, Séralini ve ark., 2011). Pestisitlerin kombine etkileri üzerine yapılan çalışmalar toksikoloji için bir zorluk teşkil etmektedir. Yeni nesil genetiği ile oynanmış bitkilerin yeni yetiştirme durumu, Glyphosate temelli herbisit (Roundup gibi) kalıntıları, Roundup toleranslı yenilebilir bitkilerde (özellikle mısır) bulunur ve genetiği ile oynanmış bitkiler tarafından modifiye edilmiş Bt intektisit toksinleri ile karıştırılır. Mesnage ve ark. (2011), tarafından kombine edilmiş pestisitlerin insan hücreleri üzerindeki yan etkileri araştırılmış, ilk kez Cry1Ab ve CryAc, Bt toksinleri (10 ppb ile) ve bunun yanında onların kombine edildikleri Roundup'la birlikte 24 saat insan embriyonik böbrek hücre hattı 293 üzerinde test edilmiş, hücre ölümüne neden olan üç biyolojik belirteç; mitokondrial süksinat dehidrojenaz, mebran değişikliklerine neden olan adenilat kinaz salınımı ve kaspaz 3/7 indükasyonları ölçülmüştür. Cry1Ab, 100 ppm de hücre ölümüne neden olmuştur. Cry1Ac için bu koşullar altında herhangi bir etki tespit edilememiştir. 1 ile 20000 ppm arasında tek başına test edilen Roundup 50 ppm'de nekrotik ve apoptotiktir; tarımsal seyreltmelerin çok altındadır (%50 ölümcül konsantrasyon 57,5 ppm). Ölçülen tek anlamlı etki, Cry1Ab ve Cry1Ac'nin Roundup tarafından indüklenen kaspaz 3/7 etkileşimlerinin azalttığıdır. Bu, apoptozun aktivasyonunu etkileyebilir. Diğer belirteçler içinde aynı eğilim vardır. Bu sonuçlar içinde modifiye Bt toksinlerinin hedeflenmeyen insan hücrelerinde, inert olmadığını ve genetiği değiştirilmiş bitkilere özgü diğer pestisit kalıntıları ile birlikte kombine yan etkileri olabileceği bildirilmiştir (Séralini ve ark., 2011).

Glyphosate dünya çapında en çok satılan herbisittir. En yaygın formülasyonlar (Roundup) ana yüzey aktif madde olarak polioksietilenamin içerir. Son bulgular Glyphosate

maruziyetinin DNA hasarına ve insanlarda kansere neden olabileceğini göstermiştir. Solunum yoluyla herbisite maruz kalan işçiler üzerinde bukkal epitel hücre hattında (TR146) Glyphosate ve Roundup'ın sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Roundup'ın 40 mg/l den büyük dozları 20 dakikadan sonraki akut sitotoksik etkileri olarak mitokondrial fonksiyonlarının bozulması ve membran hasarı gözlenmiştir. Glyphosate ile hücre dışı endaktif laktat dehidrojenaz salınımı membran hasarında artış 80 ml/l den büyük dozlarda arttığı gözlenmiştir. Glyphosate ve Roundup'ın her ikisi de 20 ml/l den büyük dozlarda tek hücreli jel elektroforezinde DNA migrasyonuna neden olmuştur. Ayrıca DNA hasarının yansıtan nükleer sapsmalarda artış gözlenmiştir. 10 ile 20 mg/l'a 20 dakikadan fazla maruz kalınmasıyla mikronükleus ve nükleer tomurcuklanma frekanslarında artış olmuştur. Nükleoplazmik köprüler ise yalnızca Roundup'ın en yüksek doz olan 20 mg/l'de artmıştır. Roundup her koşulda Glyphosate'in aktif maddesinden daha aktiftir. İç organların epitel hücrelerinden lenfositler ve hücrelerle yapılan daha önceki çalışmaların sonuçlarına göre herbisit ve formülasyonlarının sitotoksik ve DNA'ya zarar veren özelliklerinin daha duyarlı olduğu çıkmıştır. Tarımda kullanılan 450 kez seyreltilmiş konsantrasyonlara tekabül eden spreylere kısa maruziyet sonrasında genotoksik etkilere ve teneffüs eden bireylerde DNA hasarına neden olabileceği bulunmuştur (Koller ve ark., 2012).

Knasmüller ve ark. (2004), tarafından yapılan çalışma, dünya genelinde başlıca herbisit olarak kullanılan R (roundup)'ın dört formülasyonunun insan karaciğer hücre hattı (HepG2) üzerindeki toksik etkileri ve ksenebiyotiklerin davranışları ile ilgili uygun bir modeldir. Çünkü karaciğer ilk detoksifikasyon organıdır ve diyet kirleticilerine karşı çok hassastır. Bu çalışmada alt tarımsal seyreltmeler test edilmiştir. 5 ppm'deki ilk toksik etkiler ve 0,5 ppm'deki ilk endokrin bozucu etkiler kayıt edilmiştir. Bu, bazı gıdalarda ve yemlerde izin verilen seviyeden 800 kat daha düşüktür.

Tüm parametreler, formülasyonların alt tarımsal dozlarında 24 saat içinde bozulmuştur. Bu etkiler formülasyondan çok Glyphosate'in konsantrasyonuna bağımlı olduğu görülmüştür (Gasnier ve ark., 2009). İnsan plesanta ve embriyonik hücre hattında ve taze göbek kordonu embriyonik hücrelerinde G (glyphosate) bazlı herbisitlerin potansiyel toksik etkiyi arttırdığı ve geliştirdiği görülmüştür. Onların mitokondri, plazma zarı, kapsazlar 3/7 ve DNA parçalanması üzerindeki mekanik zamanı ve doza bağımlı etkileri gösterilmiştir (Gasnier ve ark., 2009). Celine Gasnier ve ark. (2009)'da sadece embriyonik ya da yeni doğan hücrelerinde değil, aynı zamanda genç ve yetişkin insan hücre dizilerinde (HepG2, VeMDA-MB453-kb2) adjuvanların doğasını G (glyphosate)'den daha fazlası toksisiteyi değiştirdiğini

teyit etmişler, G (glyphosate) bazlı herbisitinin insan hücre hattı üzerindeki DNA hasarını ilk kez göstermişlerdir.

2.8. Tetrachlorvinphos ile İlgili Yapılan Toksikite Çalışmaları

Organofosfor insektisiti olan Tetrachlorvinphos (TCVP) çiftlik hayvanlarında, sığır ve atlar dahil, larva öldürücü olarak yaygın şekilde kullanılır. Kandaki (genellikle plazma veya tam kanda) kolinesteraz (ChE) etkinliği, hayvanlarda organofosforlu insektisit zehirlenmesini değerlendirmek için sıklıkla kullanılır. İnsanlardaki gibi iyi sonuç verir. İnsanlar ve atlar da dahil olmak üzere pek çok türün plazması baskın olarak butirikolinesteraz içerir. Hâlbuki bütün türlerin kırmızı kan hücreleri sadece asetilkolinesterazı ifade eder. Subramanya ve Carey (2003)'te TCVP ile kan ChE'lerinin farklı türlerde etkileşimini karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. At, inek ve sıçan plazma ve eritrositlerdeki ChE aktivitesinin in vitro duyarlılığını karşılaştırmışlardır. At plazma ChE en duyarlı (IC_{50} , 30 dak., 30 C'de 97 nM), buna karşılık at eritrosit ChE aktivitesi en az duyarlılık göstermiştir ($IC_{50}>1$ mM). Buna karşılık TCVP ile inhibasyonda inek plazma ChE'ı (IC_{50} 784 uM), inek eritrosit ChE'ye (IC_{50} 216 micM) göre en düşük duyarlılık göstermiştir. Sıçan plazma ve eritrosit ChE aktiviteleri TCVP'ye karşı benzer duyarlılık göstermiştir (sırasıyla IC_{50} 54 micM ve 78micM). Bu sonuçlar at, inek ve sıçan plazma ve eritrosit ChE'nin belirgin türlerin ve kan fraksiyonunun TCVP 'ye karşı değişen ve farklı duyarlılık göstermiştir. Kan ChE aktivitelerinin TCVP'ye karşı duyarlılığında farklılıklar olabileceği görülmüştür (Karanth ve Pope, 2003).

Pireler, evcil hayvanlarda kontrol önlemlerinin uygulanmasını gerektiren sürekli bir sorundur. Bu nedenle ev sahipleri tarafından pire kontrolü için pestisit kullanımı yaygındır ve bu çocuklar ve yetişkinler için pestisit maruziyetini arttırabilir. Farklı ırk ve ağırlıktaki 55 köpekte (23'ü çalışma 1, 22'si çalışma 2) Tetrachlorvinphos içeren pire tasmaları kullanılmıştır. Çalışma 1 de, pamuk eldiven kullanılarak 5 dakika sürtme ile köpeklere yapılan post-collar uygulaması sonrasında köpeklerin kürkünde TCVP kalıntıları izlenmiştir. Tedavi uygulanan köpeklere plazma kolinesteraz (ChE) aktivitesi de ölçülmüştür. Boyun kürkünden (tasmanın sürtmesi) ve eldivenle yapılan 3 günlük TCVP sırt uygulamasıyla transfer edilen TCVP'nin ortalama miktarı sırasıyla 23700 ± 2100 ve 260 ± 50 mg/eldiven olmuştur. Plazma ChE aktivitesinde herhangi bir inhibasyon gözlenmemiştir. Çalışma 2 de, pamuk eldiven kullanılarak 5 dakika sürtme ile köpeklere yapılan post-collar uygulaması sırasında TCVP kalıntıları izlenmiştir. TCVP kalıntıları çocuklar tarafından giyilen t-şörtlerde ve ilk sabah çocuk ve yetişkinlerden alınan idrar örneklerinde izlenmiştir. Boyun kürkünden

(tasmanın sürmesi) ve eldivenle yapılan 5 günlük TCVP sırt uygulamasıyla transfer edilen TCVP'nin ortalama miktarı sırasıyla 22400 ± 2900 ve 80 ± 20 mg/eldiven olmuştur. Çocuklar tarafından 7-11 günlerinde giyilen tişörtlerde tişört başına $1,8 \pm 0,8$ mg TCVP/g içerdiği görülmüştür. Yetişkin ve çocuklardan alınan idrar örneklerinde 2,4,5-Trikloromandelikasit (TCMA) seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Bununla birlikte, tüm TCMA artıkları (yetişkinler ve çocuklar) işlem öncesi konsantrasyonlarından anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($\alpha=0,05$). Köpeklerde ChE inhibasyonunun olmaması ve TCVP'nin düşük akut toksisite seviyesi (4-5g/kg sıçan oral LD50), TCVP'nin hızlı bir şekilde detoksifiye edildiğini ve atıldığını göstermiştir. Bu nedenle büyük tortulara rağmen çok düşük toksikolojik bir tehlike oluşturduğu görülmüştür (Davis ve ark., 2008).

Parker ve ark. (1985), tarafından yapılan bir çalışmada 80 erkek ve 80 dişi B6C3F1 farelerinden oluşan gruplara Tetrachlorvinphos (TCVP)'un 17,5, 64, 320, 1600, 8000 ve 160000 ppm konsantrasyonlarını içeren diyet 103 hafta uygulanmıştır. Daha önceki bir çalışmada 80 erkek ve 80 dişi fareden oluşan başka bir gruba 16000 ppm TCVP verilmiştir. 160 erkek ve 160 dişi fare kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 10 kere muamele edilen ve 20 kontrol faresi /cinsiyet/grup 6, 12 ve 18. aylarda öldürülmüştür. Araştırmanın maksimum tolerans dozunun sırasıyla 8000 ve 16000 ppm doz gruplarında üç ve altı katını aştığı tahmin edilmiştir. Sonuç olarak bu maruziyetler karaciğer ve böbreklerde cinsiyet hormonal dengesizlik ve metabolik aşırı yüklenme ile ilişkilendirilen sitotoksik ve yeni yapılanma değişiklikleri meydana getirmiştir. 8000 ve 16000 ppm TCVP verilen farelerde vücut ağırlığında belirgin bir azalma (%15-40) gözlenmiştir. Bu muamele grubundaki fareler çalışma sırasında kilo alamamıştır. Çalışma boyunca azaltılmış kalorili gıda tüketimi muhtemelen 8000 ve 16000 ppm TCVP verilen farelerde sağ kalmayı arttırmış ve spontan neoplazi insidansını azaltmıştır. Bu yüksek doz gruplarında gözlenen patolojik lezyonların sınıflaması, çalışma ve danışman patoloğları arasında farklılık göstermiştir. Patoloğlar yaptıkları incelemeler sonucunda, karaciğer ve böbrek değişikliklerinin nedensel olarak hepatosellüler hiperplazi ve renal tübüler adenom ile ortaya çıkan aşırı toksisiteye bağlı olduğu sonucuna varmıştır. Sınıflamasına göre çalışma patoloğu, 16000 ppm TCVP ile beslenen erkek farelerdeki hepatosellüler karsinom, hepatosellüler adenom veya karsinom ve renal tübüler karsinomda istatistiksel olarak anlamlı artışlar bulmuştur. İstatistiksel olarak önemli olmasına rağmen, 8000 ve 16000 ppm TCVP alan dişi farelerde danışman patoloğ tarafından değerlendirilen karaciğer neoplazmi insidansı, geçmiş dişi kontrollerle karşılaştırıldığında biyolojik önemi şüpheli bulunmuştur. Danışman patoloğ tarafından gözlemlenen istatistiksel olarak anlamlı bulgu, 16000 ppm TCVP ile beslenen erkek farelerin

renal tübüler adenom ve renal tübüler adenom veya karsinom insidansında artış olmuştur. Bu yüksek doz gruplarından alınan sonuçların kullanımı, 8000 ve 16000 ppm TCVP'yi besleyen fareleri etkileyen birçok tehlikeli faktör nedeniyle kontrendikedir. TCVP'nin, maksimum tolere edilen dozun aşılmadığı doz seviyelerinde B6C3F1 farelerde onkojenik olmadığı bulunmuştur (Parker ve ark., 1985).

2.9. Çeşitli Pestisitlerle Yapılan Genotoksisite alışmaları

Pestisitler, zararlı veya istenmeyen canlı türlerini kontrol etmek için kullanılan kimyasallardır (Baxter ve ark., 2010). Bu nedenle tarımda kullanım alanı bulurlar. Pestisitler kimyasal yapılarına göre sınıflandırılabilir; karbamatlar, organofosfatlar, organoklorinler ve piretroitler gibi. Pestisitlerin hedefi etki mekanizmalarıdır. Pestisitlerin sınıflandırılması toksisitelerine dayanmaktadır. WHO yaptığı toksisite sınıflandırması LD₅₀ düzeylerine dayanır. IARC'ın yaptığı toksisite sınıflandırması kanserojen kanıtlara dayanır.

Endokrin düzenleyici olarak kullanılan metoksiklor n sıçanın; sperm, karaciğer, iskelet kası ve yumurtalık doku ve hücrelerinde yapılan çalışmalarda DNA metilasyonuna neden olduğu görülmüştür (Perroud ve ark., 2011, Zama ve Uzumcu, 2009). Yine endokrin düzenleyici olarak kullanılan vinclozoinin fare embriyosunun; plasenta, yolk kesesi, amnio, kafa, vücut, kalp, karaciğer, akciğer, mide ve bağırsak dokularında yapılan çalışmalarında DNA metilasyonuna neden olduğu görülmüştür (Kang ve ark., 2011).

Kalıcı organik kirleticilerden diklorodifeniltrikloretan (DDT) fare hipotalamusunda; DNA metilasyonuna neden olmuştur (Shutoh ve ark., 2009). Kalıcı organik kirleticilerden DDT, DDE,  -BHC, oksiklordan,  -klordan, mirex ve PCB'ler insan kan dokusunda DNA metilasyonuna neden olmuştur (Rusiecki ve ark., 2008). Kalıcı organik kirleticilerden organoklorin pestisitleri insan kan dokusunda DNA metilasyonuna neden olmuştur (Kim ve ark., 2010).

Arsenik kullanılarak yapılan in vitro çalışmalarda sıçan akciğer epitel hücreleri, fare akciğer dokusu ve V79-C13 in hemstir hücreleri ve ASO hücreleri üzerinde çalışılmış DNA metilasyonu gözlenmiştir (Chen ve ark., 2004, Zhao ve ark., 1997). Yine insan lenfoblastoid hücreleri ve insan kan dokusunda arsenikle yapılan çalışmalarda DNA metilasyonu ve mikro RNA ekspresyonu görülmüştür (Chanda ve ark., 2005, Pilsner ve ark., 2007).

Parakuat ve Dieldirin herbisitleriyle sıçan immortalize mezensefalik dopaminerjik hücreleri (N27 hücreleri) ve mezensefalik dopaminerjik nöral hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalarda histon modifikasyonları görülmüştür (Song ve ark., 2010).

Propoxur ve Diklorvos insektisitleri ile mide hücreleri ve domuzun böbrek epitel hücreleri üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda histon modifikasyonları ve mikroRNA ekspresyonu görülmüştür (Kuo ve ark., 2008, Li ve ark., 2011). Yine fibronil ve triazphos insektisitleri ile zebra balığının tüm vücut homojenatında yapılan çalışmada mikroRNA ekspresyonu görülmüştür (Mass ve Wang, 1997).

Triadimefon, propikonazol ve miklobütanil fungusitleri ile fare karaciğer dokusunda yapılan araştırmada mikroRNA ekspresyonu görülmüştür (Ross ve ark., 2010).

Pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki zararlı etkileri geçen yüzyılda yaygın olarak araştırılmıştır. Pestisite maruz kalan işçiler üzerindeki gözlemsel çalışmalar (Damalas ve Eleftherohorinos, 2011), pestisitlerin toksisitesinin hayvan modelleri (Vandegheuchte ve Janssen, 2011), sağlık üzerindeki zararlı etkilerinden bu kimyasalların sorumlu olabileceğini göstermiştir.

Diklorodifeniltrikloreten (DDT) maruziyeti genç erkek sıçanların hipotalamusundaki metilasyon modelini değiştirmiştir. Shutoh ve ark. (2009), tarafından yapılan deney, altı CpG adasında (Sst, Gal, Arf1, Ttr, Msx1 ve Grifin genleri) kontrollerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde hipometillendiğini göstermiştir. DNA metilasyonu mekanizma bozuklukları oksidatif stresin düşük seviyelerinin altında spesifik gen bölgelerinin metilasyonunun tamamlanmamasına yol açmıştır.

DNA metilasyon sistemi yüksek dozdaki organoklorin pestisitleri, metilcivaklorid veya poliklorlufenillere maruz kaldığında etkilenebilir. Zama ve Üzümcü (2009), rahim içi ve doğum sonrası, pestisitlerle muamele edilmiş sıçanların karaciğerlerinden alınan örneklerde metilasyon modellerinin değiştiğini rapor etmişlerdir. Pirodizi metilasyon analizi yüksek doz gruplarında tümör baskılayıcı gen p16 (INK4a) promotorundaki CpG adalarının metilasyonunun azaldığını ortaya çıkarmıştır (Desaulniers ve ark., 2009).

Zhang ve ark. (2012), K562 hücrelerini diazinonun farklı konsantrasyonları (0.001, 0.01, ve 0.1 μ M) ile farklı zaman dilimlerinde (12, 24, 48 ve 72 saat) muamele etmişlerdir. 984 genin 1069 CpG adasında 0,1 M 'lık diazinon maruziyetine cevaben (hiper 918 ve 66 hipometillenmiş gen) 2 misli metilasyon değişiklikleri tespit etmişlerdir. Bu genlerin bazıları kanser gelişimi veya biyolojik yolu olarak ilişkilendirilmiştir ve bazı işlevleri bilinmemektedir.

1. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Türü

Tez çalışması, deneysel türde bir çalışma olup Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanan rapor çerçevesinde yürütülmüştür. Bu çalışmada insan akciğer karsinom epitel hücre hattı olan A549 hücreleri kullanılmıştır. Çalışmada % 99.9 saflıkta satın alınan Glyphosate herbisiti ile Tetrachlorvinphos insektisiti test edilmiştir.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Özellikleri

A549 hücrelerinde DNA metilasyon değişiminin ölçülmesi amacıyla yapılan deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri aşağıda verilmiştir.

3.2.1. Glyphosate

Glyphosate, çeşitli ortamlarda ve uzun yıllardır kullanılan bir herbisittir. 1974 yılından beri kullanılmaktadır (Carlisle ve Trevors, 1988). Glyphosate, bitki, mantar ve prokaryotlarda bulunan şikimik asitin metabolik yolundaki 5-enolpiruvil şikimik asit-3-fosfat (EPSP) sentaz enziminin aktivitesini inhibe ederek; aromatik aminoasitlerin, hidroksi fenolik bileşiklerin ve klorofilin sentezinde inhibisyon meydana gelmekte ve devamında da protein sentezi ve büyümede azalma ile hücre ölümleri görülmektedir (Duke ve Hoagland, 1981).

Kimyasal İsmi: n-(fosfonometil) glisin

Genel İsmi: Glyphosate

Kimyasal Sınıfı: Organofosfat

EPA Kimyasal Kodu: 084229

Kimyasal Tanıtım Servis Numarası (CAS): 1071-83-6

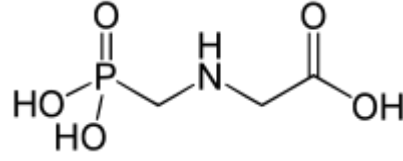
Moleküler Formül: $C_3H_8NO_5P$

Moleküler Ağırlığı: 169,07 g/mol

İlk Kaydedilme Tarihi: 1974

Pestisit Tipi: Herbisit

Üretici Firma: Monsanto



Şekil-7. Glyphosate

3.2.2. Tetrachlorvinphos

Avrupa Birliği ülkelerinde yasaklanmasına rağmen Amerika'da kullanılmaya devam edilen Tetrachlorvinphos hayvanlarda pire tasmaları dahil insektisit olarak kullanılmaya devam edilmektedir. Tetrachlorvinphos, bir fenil organofosfat grubu insektisitidir ve ilk kez 1966'da ticari olarak Amerika'da tanıtılmış ve kullanılmıştır.

Kimyasal İsmi: (Z)- 2- kloro-1-(2,4,5-triklorofenil)vinil dimetil fosfat

Genel İsmi: Tetrachlorvinphos

Kimyasal Sınıfı: Organofosfat

EPA Kimyasal Kodu: 083701

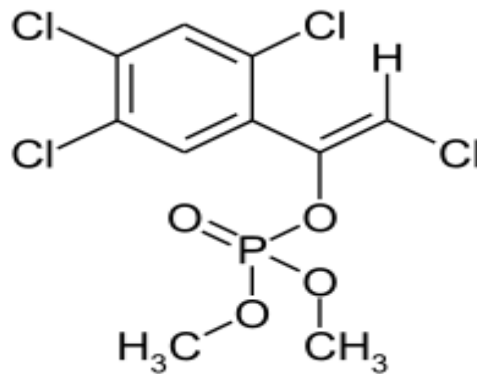
Kimyasal Tanıtım Servis Numarası (CAS): 22248-79-9

Moleküler Formül: C₁₀H₉Cl₄O₄P

Moleküler Ağırlığı: 366 g/mol

İlk Kaydedilme Tarihi: 1966

Pestisit Tipi: İnektisit



Şekil-8. Tetrachlorvinphos

3.2.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler

A549 hücre kültürü sırasında aşağıdaki malzemeler kullanılmıştır.

- ✓ DMEM/F12 (Dulbecco's Modification of Eagles Medium) (Life Technology, 11320033)
- ✓ Fetal Bovenie Serum (Gibco, 10270106)
- ✓ Antibiyotik (Penicillin-Streptomycin) (Life Technology, 0015140148)
- ✓ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Sigma, 56064C)
- ✓ 0.25% Trypsin-EDTA (Life Techonology, 0025200056)
- ✓ Dimethyl Sülfoksit (DMSO) (Santacruz, SC-358801)

3.3. Sterilizasyon

Deneysel süreçlerde gerektiğinde kullanılmak üzere küvetler, ara stok hazırlamak için gerekli olan şişeler, DPBS ve distile su NÜVE marka otoklavda deney öncesi steril edilmiş ve sterilizasyon şartlarına uygun olarak saklanmıştır. Hücre kültürü yapılmadan önce, laboratuvarda kullanılan bütün yüzeyler %70'lik etilalkol ile zemin ise sodyum hipoklorit ile temizlenmiştir. Steril kabindeki ultraviyole (UV) lambalar 5-6 saat süre ile açık bırakılarak gerekli sterilizasyon şartları sağlanmıştır.

3.4. Hücre Kültürü

Tez çalışması, hücre kültürünün yapıldığı bir laboratuvar, hücre kültürü için ön hazırlıkların yapıldığı bir oda ve diğer işlemlerin yapıldığı bir laboratuvar bölümünde gerçekleştirilmiştir.



Steril Çalışma Kabini



CO₂ İnkübatörü yada CO₂ Tankı



İnkübatör



İnvert Mikroskopu

Resim-1. Hücre Kültür Ortamında Kullanılan Cihazlar.

3.4.1. Donmuş Hücreleri Kültüre Etme Prosedürü

Tez çalışmasında, uygun şekilde dondurulmuş hücreler, daha önce 37 °C'ye ısıtılmış distile su banyosunda eritilmiş ve bu hücreler steril koşullarda hızlı bir şekilde daha önce hazırlanmış medyuma aktarılmışlardır. Hücreler, tam tutunduktan sonra, üst medyuları yenisi ile değiştirilmiştir.

3.4.2. Hücre Kültürünün Devamlılığı ve Pasaj

Hücrelerin kültür kabında %70 oranında konflue olmaları durumunda pasaj yapılmıştır. Pasaj durumuna gelen hücrelerin medyum kısmı atılmış ve daha sonra DPBS ile hücreler yıkanmıştır. Hücreler daha sonra tripsin ile muamele edilerek yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Toplanıp santrifüj edilen hücrelerin bir kısmı yeniden ekilmiş, geri kalan hücreler ise deneysel amaçlı kullanılmıştır.

3.5. MTT Yöntemi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid]

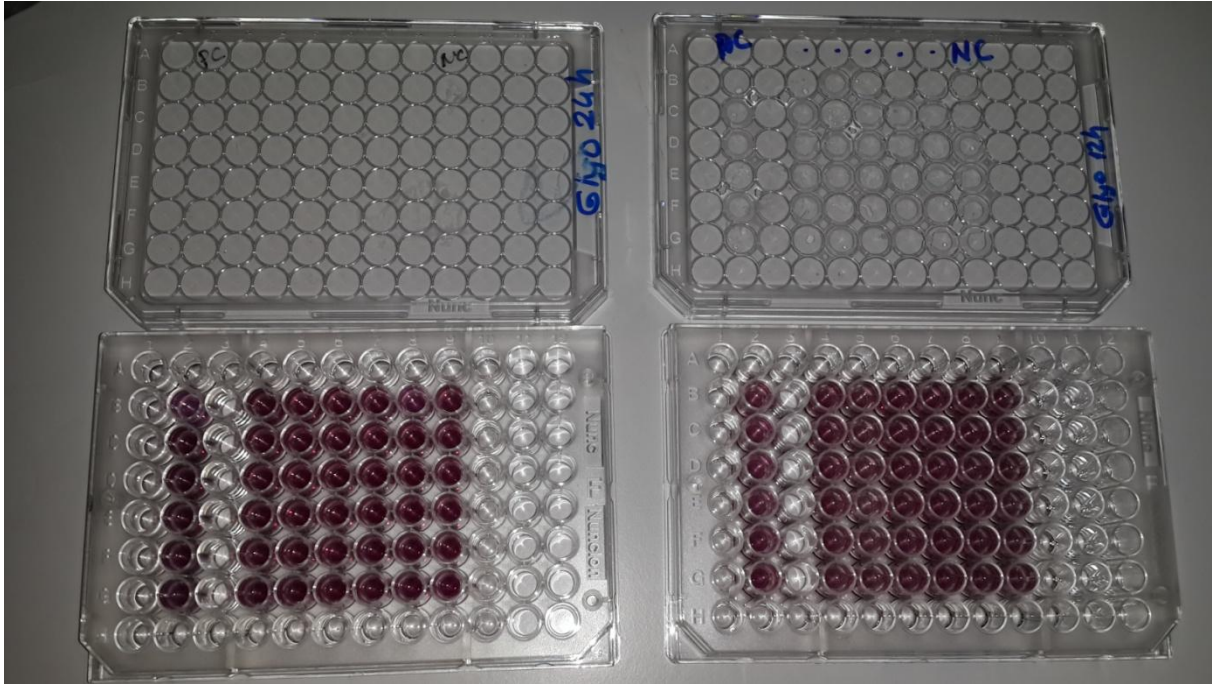
MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Denizot ve Lang, 1986). MTT yöntemi, sahip olduğu bazı özellikleri nedeni ile örneğin; basit oluşu, kesin sonuç vermesi, tekrarlanabilirliği gibi, en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Yöntemin temelinde mitokondrinin MTT'yi alıp formazon kristallerine çevirmesi temeline dayanmaktadır. Canlı hücrelerde oluşan bu formazon kristalleri, daha sonra eklenen bazı çözücülerle (DMSO, SDS gibi) birlikte çözünmekte ve oluşan renk değişimi ELISA okuyucu ile değerlendirilmektedir (Denizot ve Lang, 1986).

İnkübatörde bekletilen ve pasaj durumuna gelen hücrelere öncelikle hücre pasajı prosedürü uygulanmıştır. Bu aşamada medyum uzaklaştırılarak steril DPBS ile hücreler yıkanmıştır. Daha sonra tripsin eklenerek inkübatörde 2-3 dakika beklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda yüzeyden kaldırılan hücrelerin üzerine hücre medyumunu eklenerek tüpe alınmış ve santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmış ve 1 ml medyum içerisindeki hücreler süspansiyon edilerek hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı yapılarak, MTT için gerekli hücre miktarları belirlenmiştir. Bu çalışmada MTT yöntemi Nikolof (2011), önerdiği şekli modifiye edilerek yapılmıştır. %1'lik triton ile muamele edilmiş hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Glyphosate ana stok medyumda

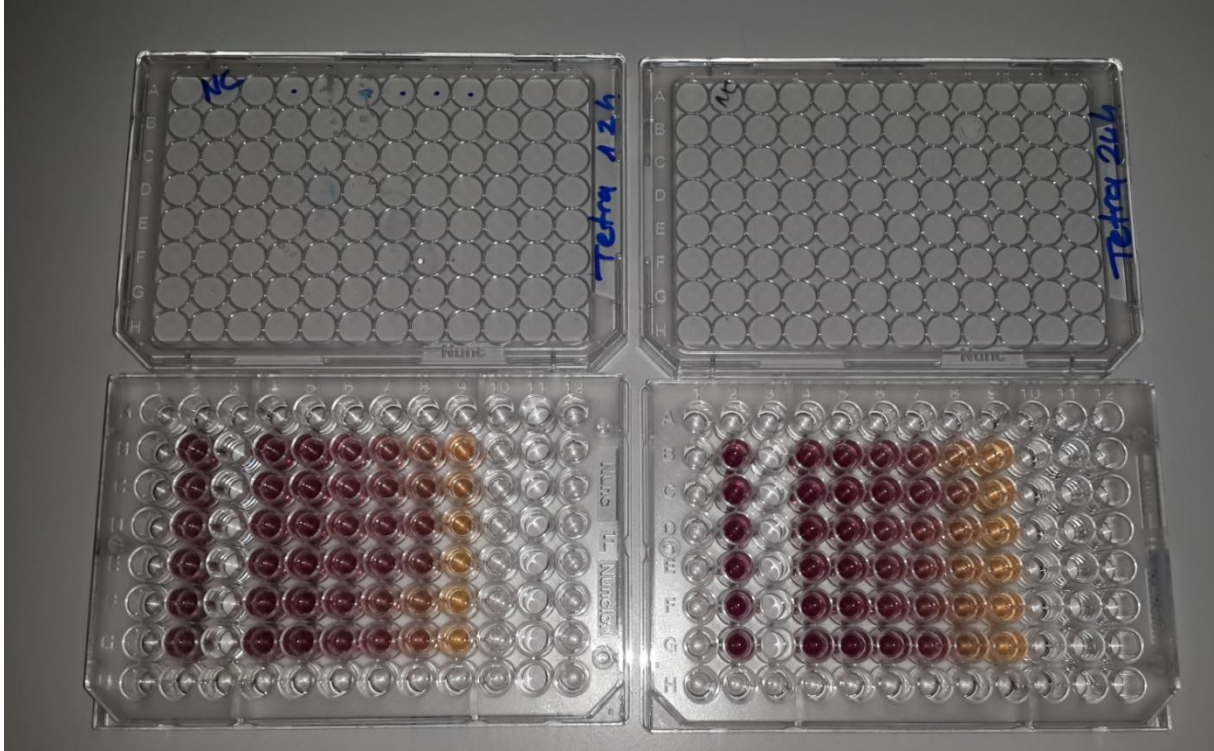
çözüldüğü için medyum negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Tetrachlorvinphos ana stok DMSO’da çözüldü. Dolayısı ile DMSO (<%1) negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

MTT için yeterli miktarda hücre süspansiyonu hazırlandıktan sonra 96 kuyucuklu plaklara ekim yapılmıştır. Her bir kuyuya 100 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde 10000 hücre ekilmiştir ve 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. 2. gün hücrelerin üzerindeki ortam atılarak 100 µl medyum eklenmiştir. Glyphosate’in hücre kültüründeki konsantrasyonu 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM ve 1500 µM olacak şekilde madde eklenmiştir. Tetrachlorvinphos için 0,1 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM ve 500 µM konsantrasyonlarında madde eklenmiştir. Gerekli süreler beklendikten sonra (12 ve 24 saat, ayrı ayrı) hücrelerin üzerindeki pestisit medyum uzaklaştırılmıştır. Hücreler DPBS ile yıkanarak üzerlerine 100 µl medyum eklenmiştir. Karanlık ortamda her bir kuyuya 10 µl MTT eklenerek plaka alüminyum folyoya sarılarak 4 saat inkübatörde bekletilmiştir. 4 saatin sonunda 100 µl SDS eklenmiş ve 16-20 saat inkübatörde bekletilmiştir. 4. gün meydana gelen renk değişikliği 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile absorban ölçümü yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için 3 bağımsız deney kurulmuş ve 3’er defa ölçüm yapılmıştır. Canlılık aşağıdaki şekilde ölçülmüştür.

Canlılık= (Muamele Abs.- Blank Abs./Negatif Kont. Abs.- Blank Abs.)x100



Resim-2. MTT Sonrası Renk Değişimi (Glyphosate).



Resim-3. MTT Sonrası Renk Değişimi (Tetrachlorvinphos).

3.6. Hücrelerin 5mC Değişimi için Pestisitler ile Muamele Edilmesi

Hücreler tam kültür medyumunda yetiştirilerek kültüre edilmişlerdir. Tam hücre kültürü, %90 DMEM/F12 ve %10 fetal boven serum karışımından oluşturulmuş ve içerisine %1 penisilin-streptomisin ilave edilmiştir. Her muamelede 10^6 hücrenin ekimi için 6 kuyucuklu kültür kapları kullanılmıştır. Her bir kuyuya 1 ml medyum içerisinde ve 300000 hücre süspansiyonu eklenmiş ve sırayla 12 ile 24 saat inkübatörde büyümeleri sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda hücrelerin üzerindeki ortam atılarak 2 ml taze medyum eklenmiştir. Bu aşamada kirleticilerin uygun miktarları eklenmiştir. Glyphosate'in hücre kültüründeki konsantrasyonları 250 μ M, 500 μ M ve 1500 μ M olacak şekilde madde eklenmiştir. Tetrachlorvinphos için ise 1 μ M, 5 μ M, 25 μ M ve 50 μ M olacak şekilde hücre kültürüne madde eklenmiştir. Her bir pestisit için farklı konsantrasyonları ve negatif kontrol değerlendirilmiştir; hücreler 12 ve 24 saatlik periyotlarda kirleticilerle muamele edilmiştir. Muamele süresinin sonunda hücreler DPBS ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve -80 $^{\circ}$ C'de saklanmışlardır.

3.6.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu; QIAamp® DNA Mini Kiti kullanılarak yapılmıştır. Verilen yönerge takip edilerek, DNA izolasyonu yapılmış ve DNA miktarının belirlenmesine geçilmiştir.

-80 °C’de saklanan hücreler oda sıcaklığında çözünene kadar bekletilmiştir. Eriyen hücre süspansiyonu 300xg’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve dikkatli bir şekilde hücre pelletine zarar vermeden süpernatant atılmıştır. Ependorf tüplerine yaklaşık 1’er ml PBS eklenmiş, 300xg’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Dikkatli bir şekilde hücre pelletine zarar vermeden süpernatant atılmış, son hacim 200 µl olana kadar PBS eklenmiştir. 20 µl proteinaz K ve 200 µl Buffer AL eklenmiş, 15 saniye karıştırılmıştır. 56 °C’de 10 dakika ısıtılmış, tüpün kapağındaki damlacıkların düşmesi için kısa süreli santrifüj yapılmıştır. 200 µl %96-100’lük etanol eklenmiş ve 15 saniye karıştırılmıştır. Kısa süreli santrifüj yapıldıktan sonra tüpteki hücre süspansiyonu QIAamp Mini Spin tüpüne aktarılmıştır. Tüpün kapağı kapatılıp 6000xg (8000 rpm) de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süzüntü atılmıştır. 500 µl Buffer AW1 eklenip, 6000xg (8000 rpm)’de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Süzüntü atıldıktan sonra 500 µl Buffer AW2 eklenmiştir. 20000xg (14000 rpm)’de 3 dakika santrifüj yapılmıştır. Süzüntü atıldıktan sonra tüp değiştirilmiştir. 1 dakika santrifüj yapıp değiştirilen tüp atılmıştır. Üzeri önceden yazılan yeni mikrosantrifüj tüpü takılıp, 150-200 µl Buffer AE eklenmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 6000xg (8000 rpm)’de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Kitin filtreli kısmı atılmıştır. Süzüntünün bulunduğu tüpler tüplüğe konulduktan sonra DNA miktarının belirlenmesi işlemine geçilmiştir.

3.6.2. DNA Miktarının Belirlenmesi

Total DNA miktarı, Qubit 2.0 cihazı ve Qubit™ DNA dsHS Assay Kiti kullanılarak her bir örnekteki DNA miktarları belirlenmiştir. Verilen yönerge takip edilerek, DNA miktarları hesaplanmış ve 5mC ölçümüne geçilmiştir.

3.7. Hücrelerin 5mC Değişimi için Pestisitler ile Muamele Edilmesi

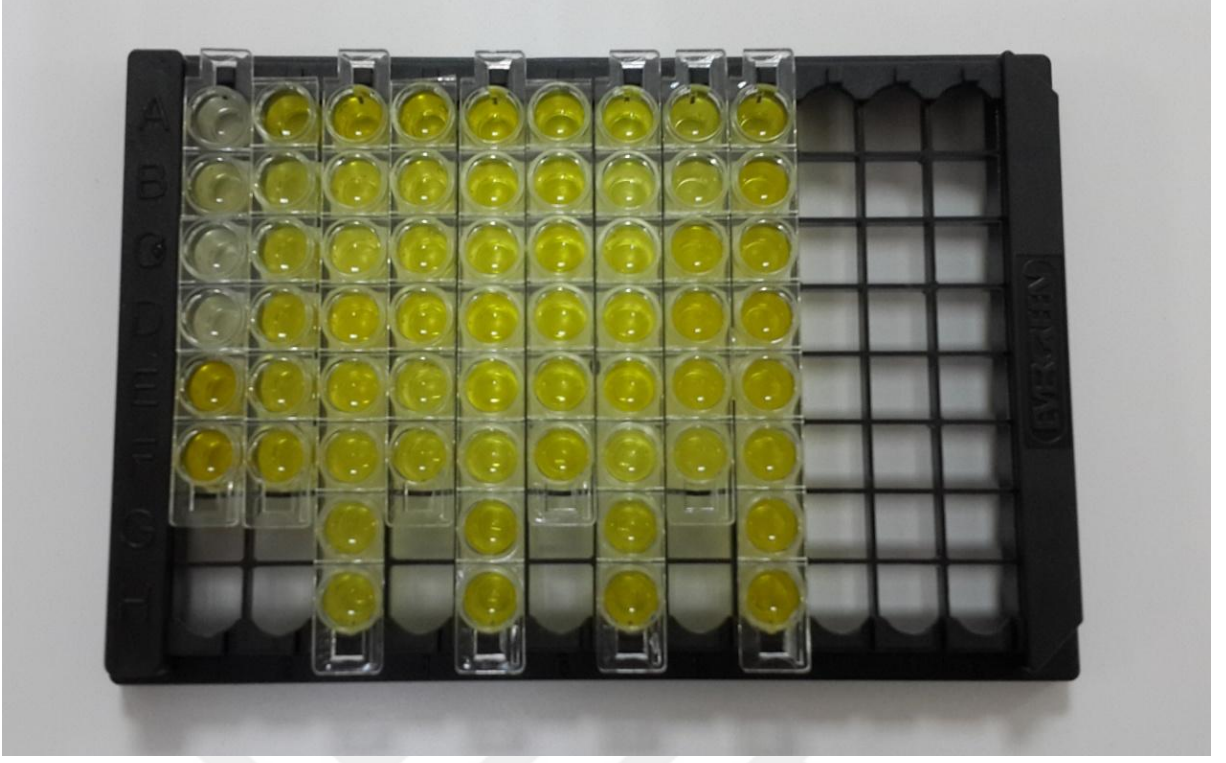
Hücreler tam kültür medyumunda yetiştirilerek kültüre edilmişlerdir. Tam hücre kültürü, %90 DMEM/F12 ve %10 fetal boven serum karışımından oluşturulmuş ve içerisine %1 penisilin-streptomisin ilave edilmiştir. Her muamelede 10⁶ hücrenin ekimi için 6’lı kültür kapları kullanılmıştır. Her bir kuyuya 1 ml medyum içerisinde ve 300000 hücre süspansiyonu

eklenmiş ve 24 saat inkübatörde büyümeleri sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda hücrelerin üzerindeki ortam atılarak 2 ml taze medyum eklenmiştir. Bu aşamada pestisitlerin uygun miktarları eklenmiştir. Her bir pestisit için farklı konsantrasyonları ve negatif kontrol değerlendirilmiş, hücreler 12 ve 24 saatlik periyotlarda pestisitlerle muamele edilmiştir. Glyphosate'in hücre kültüründeki konsantrasyonları 250 μ M, 500 μ M ve 1500 μ M olacak şekilde madde eklenmiştir. Tetrachlorvinphos için ise 1 μ M, 5 μ M, 25 μ M ve 50 μ M olacak şekilde hücre kültürüne uygun miktarlar eklenmiştir. 12 ve 24 saat inkübatörde bekletildikten sonra hücrelerin üstü atılmış ve herbir kuyudaki hücreler 1 ml DPBS ile yıkanmıştır. Tripsin ile kaldırılan ve pestisitler ile muamele edilmiş hücreler kaldırılarak DNA izolasyonu için kullanılmışlardır.

3.7.1. DNA Metilasyon (5mC) Miktarının Belirlenmesi

Total DNA Metilasyon miktarı, Methyl Flash Global DNA Metilasyon (5mC) ELISA Easy Kiti kullanılarak belirlenmiştir. Kit içinde bulunan yönerge doğrultusunda öncelikle çalışma tamponu (WB), pozitif kontrol (PK) ve negatif kontrol (NK) hazırlanmıştır.

Kitin içerisindeki özel plakaya kontrol ve örnekler dikey olarak sıralanmıştır. Negatif kontrol kuyularına 100 μ l BS ve 2 μ l NK eklenmiştir. Pozitif kontrol kuyularına 100 μ l BS ve farklı konsantrasyonlardaki PK'dan 2 μ l eklenmiştir. DNA miktarları belirlenen örneklerden hesaplanan μ l hacimleri kuyulara eklenmiştir. Plaka sarsılarak solusyonun kuyuların dibini tamamen kaplaması sağlanmıştır. Plakanın üzeri parafilm ile kaplanmış ve 37 $^{\circ}$ C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin son 10 dakikasında 5mC belirleme solusyonu hazırlanmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyudaki BS uzaklaştırılmış sonra her bir kuyu 150 μ l seyreltilmiş WB ile 3 kere yıkanmıştır. Herbir kuyuya 5mC belirleme solusyonundan 50 μ l eklenip plakanın üzeri parafilm ile kaplanmış ve oda sıcaklığında 50 dakika beklenmiştir. Sürenin sonunda her bir kuyudaki 5mC belirleme solusyonu uzaklaştırılıp her bir kuyu 150 μ l seyreltilmiş WB ile 5 kere yıkanmıştır. Sonra çoklu pipet yardımı ile her bir kuyuya 100 μ l DS eklenmiştir. Plaka düz bir yüzey üzerinde sarsılmış ve 3-4 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. %5'lik PK bulunan kuyuların rengi koyu maviye döndüğünde enzim reaksiyonunu durdurmak için çoklu pipet yardımı ile 100 μ l SS eklenmiştir. Plaka düz bir yüzey üzerinde sarsılmış ve 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kuyuların rengi sarı olunca 450 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile absorbans ölçümü yapılmıştır.



Resim-4. 5mC Ölçümü için DNA Örneklerinin Ölçümü.

4. BULGULAR

4.1. Glyphosate ile İlgili Yapılan MTT Çalışmaları (12 saat muamele)

Çalışmada, test edilen maddelerin sitotoksik potansiyelleri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla uygulanan yöntemde, 96'lık plakalara ekilen hücreler 24 saat süre ile beklendikten sonra, Glyphosate'in farklı konsantrasyonları eklenmiş ve 12 saat süre ile muamele edilmiştir. Bu muamelenin sonunda hücreler DPBS ile yıkanmış ve tekrar hücre medyumunu ile birlikte MTT eklenmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazon kristallerinin çözünmesi için SDS eklenmiş ve renk değişimi 570 nm'de mikropilaka okuyucuda ölçülerek absorbansları belirlenmiştir. 12 saatlik muamele süresi için 3 tekrarlı 3 farklı deney hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için elde edilen absorbans değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Elde edilen canlılık oranlarına Kruskal Wallis ve daha sonra Dunn's çoklu karşılaştırma testi uygulandığında, göz önüne alınan konsantrasyonlar ile negatif kontrol arasında istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0,05$).

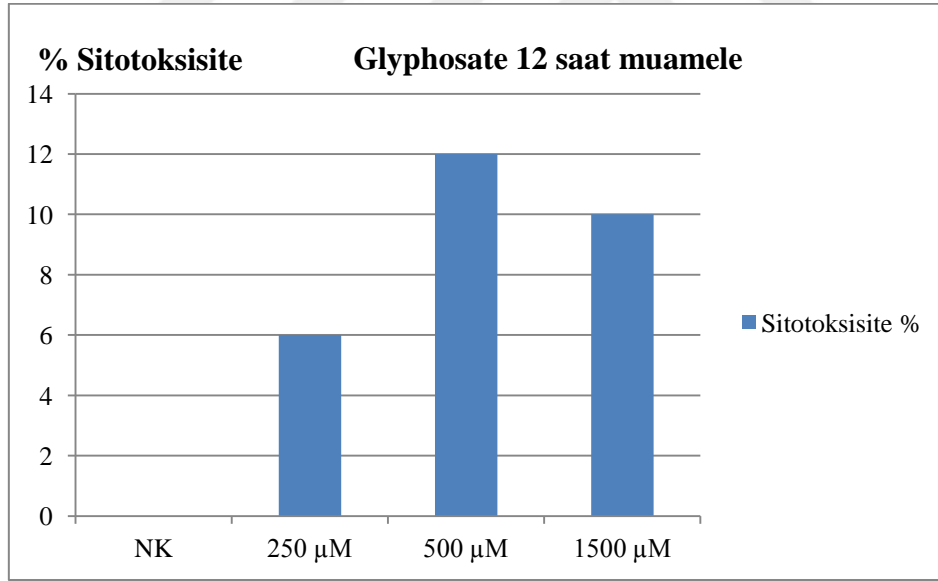
Glyphosate'in farklı konsantrasyonları (250 μ M, 500 μ M ve 1500 μ M) ile muamele edilmesinden sonra elde edilen canlılık değerleri ve negatif kontrolün (NK) canlılık değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek sitotoksitenin %10 ve altında olduğu görülmüştür. Yapılan 3 tekrarlı 3 farklı deneyin % canlılık ortalaması incelendiğinde en düşük konsantrasyon olan 250 μ M Glyphosate muamelesi A549 hücreleri üzerinde 12 saatte %6 oranında sitotoksik etki gösterirken, en yüksek doz olan 1500 μ M Glyphosate muamelesinin A549 hücreleri üzerinde 12 saatte %10 sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır.

Glyphosate'in A549 hücreleri ile 12 saat muamelesi sonucunda yüksek miktarda hücre ölümü meydana gelmediği için çalışılan konsantrasyonlardan herhangi biri elimine edilmedi. Glyphosate ve A549 hücrelerinin 12 saat muamelesi için NK ve 250 μ M, 500 μ M ve 1500 μ M konsantrasyonlarında çalışılmasının uygun olacağı anlaşıldı.

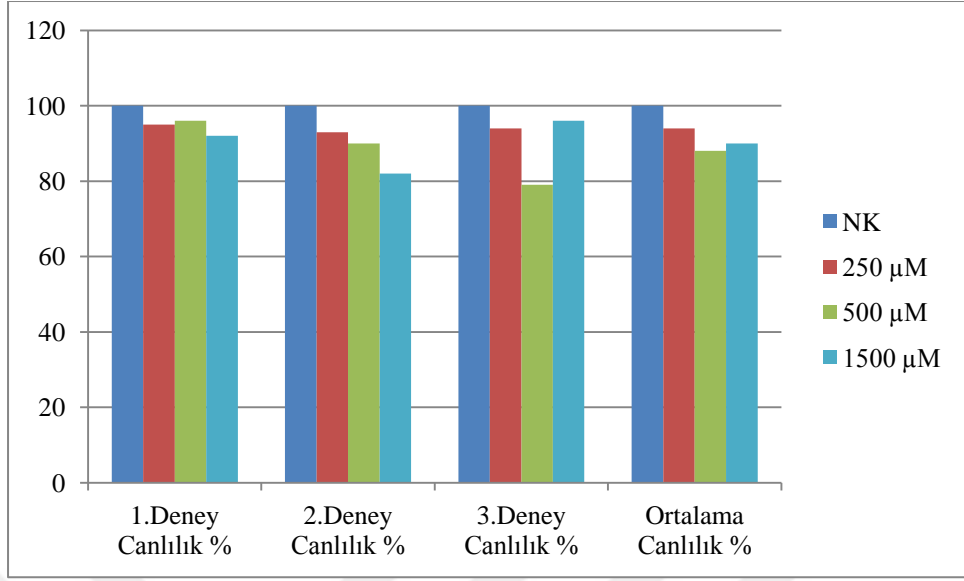
Tablo-1. Glyphosate'in MTT ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi (12 saat muamele)

	NK	250 µM	500 µM	1500 µM
1. Deney	0,972	0,973	0,967	0,934
	0,937	0,885	0,872	0,839
	0,967	0,867	0,922	0,878
Canlılık %	-	0,95	0,96	0,92
2. Deney	0,992	0,927	0,929	0,784
	0,983	0,935	0,928	0,831
	1,039	0,946	0,858	0,865
Canlılık %	-	0,93	0,90	0,82
3. Deney	0,858	0,844	0,710	0,829
	0,770	0,798	0,642	0,826
	0,816	0,773	0,679	0,826
Canlılık %	-	0,94	0,79	0,96
Ortalama Canlılık %±SS	-	0,94±0,01	0,88±0,09	0,90±0,07

NK: Negatif kontrol, µM: mikromolar, SS: Standart sapma



Şekil-9. Glyphosate 12 Saat Muamele.



Şekil- 10. Glyphosate ile 12 Saat Muamele Edilen A549 Hücrelerindeki Canlılık Değişimi.

4.2. Glyphosate ile İlgili Yapılan MTT Çalışmaları (24 saat muamele)

Çalışmada, Glyphosate'in 24 saat süre ile A549 hücreleri ile muamele edilmelerinden sonra ölçülen absorbans değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Elde edilen sitotoksikite oranlarına Kruskal Wallis ve daha sonra Dunn's çoklu karşılaştırma testi uygulandığında, göz önüne alınan konsantrasyonlar ile negatif kontrol arasında istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0,05$). Glyphosate'in farklı konsantrasyonları (250µM, 500 µM ve 1500 µM) ile muamele edilmesinden sonra elde edilen canlılık değerleri ve NK canlılık değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek sitotoksikitenin %5'in altında olduğu görülmüştür. Yapılan 3 tekrarlı 3 farklı deneyin % canlılık ortalaması incelendiğinde en düşük konsantrasyon olan 250µM Glyphosate muamelesi A549 hücreleri üzerinde 24 saatte %3 sitotoksik etki gösterirken, en yüksek konsantrasyon olan 1500 µM Glyphosate'in %4 sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

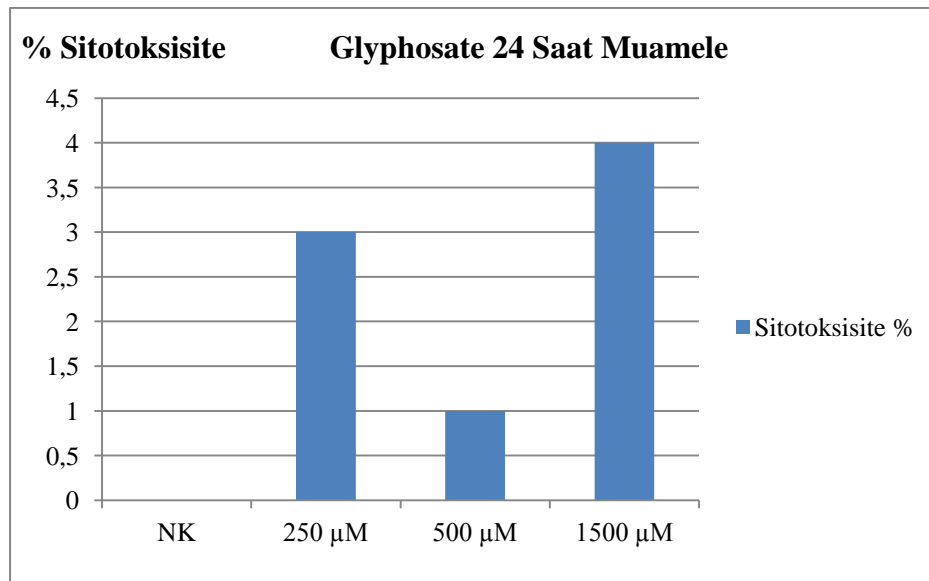
Glyphosate'in A549 hücrelerinin 12 ve 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen bütün veriler değerlendirildiğinde; Glyphosate'in farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde A549 hücreleri üzerinde önemli bir sitotoksik etkiye yol açmadığı ortaya çıkmıştır. Konsantrasyon ve uygulama süresi artışı da önemli bir sitotoksik etki oluşturmamıştır.

Glyphosate'in A549 hücreleri ile 24 saat muamelesi sonucunda yüksek miktarda hücre ölümü meydana gelmediği için çalışılan konsantrasyonlardan herhangi biri elimine edilmedi. Glyphosate ve A549 hücrelerinin 24 saat muamelesi için NK ve 250 µM, 500 µM ve 1500 µM konsantrasyonlarında çalışılmasının uygun olacağı anlaşıldı.

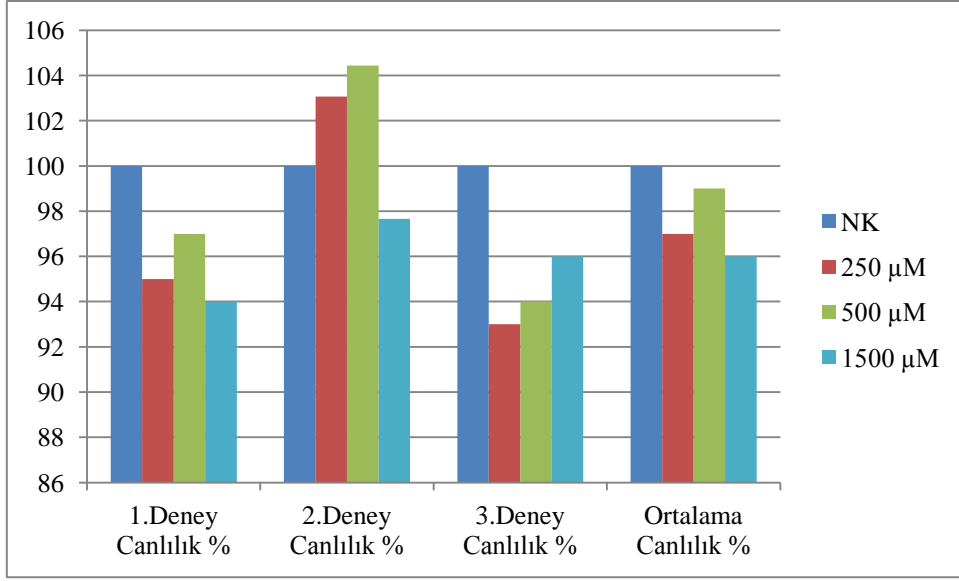
Tablo-2. Glyphosate'in MTT ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi (24 saat muamele)

	NK	250 µM	500 µM	1500 µM
1. Deney	1,364	1,336	1,372	1,364
	1,500	1,377	1,420	1,308
	1,472	1,408	1,412	1,396
Canlılık %	-	0,95	0,97	0,94
2. Deney	1,375	1,454	1,481	1,413
	1,372	1,420	1,490	1,333
	1,426	1,426	1,387	1,329
Canlılık %	-	1,030	1,044	0,976
3. Deney	1,394	1,548	1,586	1,720
	1,560	1,516	1,554	1,645
	1,337	1,509	1,587	1,576
Canlılık %	-	0,93	0,94	0,96
Ortalama Canlılık %±SS	-	0,97±0,05	0,99±0,05	0,96±0,02

NK: Negatif kontrol, µM: mikromolar, SS: Standart sapma



Şekil-11. Glyphosate 24 Saat Muamele.



Şekil-12. Glyphosate ile 24 Saat Muamele Edilen A549 Hücrelerinin Canlılık Değişimi.

4.3. Tetrachlorvinphos ile İlgili Yapılan MTT Çalışmaları (12 saat muamele)

Tetrachlorvinphos'un farklı konsantrasyonları (1µM, 5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, NK'ün) ile A549 hücreleri 12 saat süre ile muamele edilmiştir. Bu muamelenin her bir konsantrasyon için elde edilen absorbans değerleri Tablo 3'de verilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden hesaplanan sitotoksikite oranlarına Kruskal Wallis ve daha sonra Dunn's çoklu karşılaştırma testi uygulandığında, göz önüne alınan konsantrasyonlar ile negatif kontrol arasında istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0,05$). Yapılan 3 tekrarlı 3 farklı deneyin % canlılık ortalaması incelendiğinde en düşük konsantrasyon olan 1 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 12 saatte %6 sitotoksik etki gösterirken, 5 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 12 saatte gözlenen sitotoksik etki azalmış ve %4 olmuştur. 25 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 12 saatte %14 sitotoksik etki gösterirken 50 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 12 saatte %16 sitotoksik etki göstererek arttığı belirlenmiştir. 100 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 12 saatte %78 sitotoksik etki gösterirken 200 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 12 saatte %82 sitotoksik etki göstererek arttığı belirlenmiştir.

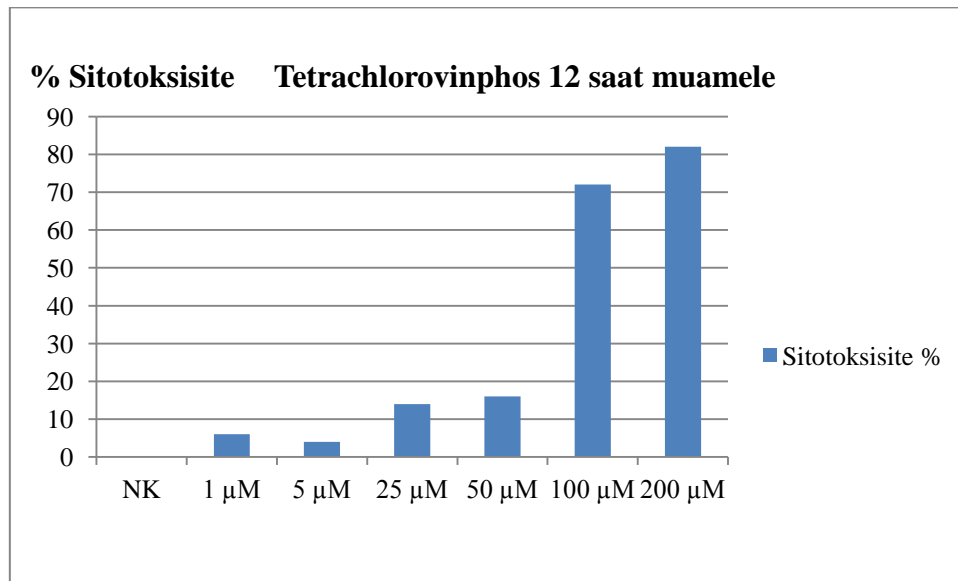
Tetrachlorvinphos'un A549 hücreleri ile 12 saat muamelesi sonucunda yüksek miktarda hücre ölümünün meydana geldiği konsantrasyonlar elimine edildi ve en fazla %16

sitotoksosite oluşturan doz en yüksek doz olarak seçildi. Tetrachlorvinphos ve A549 hücrelerinin 12 saat muamelesi için negatif kontrol, 1 µM, 5 µM, 25 µM ve 50 µM konsantrasyonlarında çalışılmasının uygun olacağı anlaşıldı.

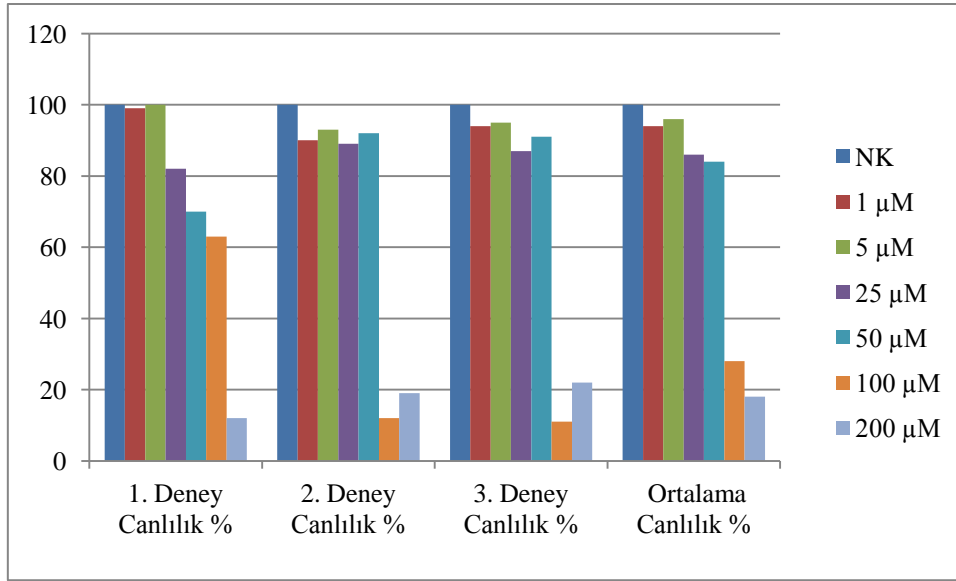
Tablo-3. Tetrachlorvinphos'un MTT ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi (12 saat muamele)

	NK	1 µM	5 µM	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM
	0,796	0,740	0,786	0,594	0,513	0,396	0,099
1. Deney	0,724	0,748	0,737	0,639	0,521	0,510	0,091
	0,753	0,752	0,750	0,640	0,549	0,517	0,094
Canlılık %	-	0,99	1,00	0,82	0,70	0,63	0,12
	1,022	0,951	0,968	0,899	0,955	0,111	0,321
2. Deney	1,078	0,865	1,020	0,940	0,950	0,145	0,166
	1,089	1,065	0,965	1,001	1,032	0,112	0,120
Canlılık %	-	0,90	0,93	0,89	0,92	0,12	0,19
	0,988	0,984	0,954	0,954	0,918	0,113	0,276
3. Deney	1,013	0,994	0,947	0,788	0,897	0,112	0,268
	1,013	0,870	0,961	0,883	0,942	0,108	0,107
Canlılık %	-	0,94	0,95	0,87	0,91	0,11	0,22
Ortalama Canlılık %±SS		0,94±0,04	0,96±0,04	0,86±0,03	0,84±0,13	0,28±0,30	0,18±0,05

NK: Negatif kontrol, µM: mikromolar, SS: Standart sapma



Şekil-13. Tetrachlorvinphos 12 Saat Muamele.



Şekil-14. Tetrachlorvinphos ile 12 Saat Muamele Edilen A549 Hücrelerinin Canlılık Değişimi.

4.4. Tetrachlorvinphos ile İlgili Yapılan MTT Çalışmaları (24 saat muamele)

Tetrachlorvinphos'un farklı konsantrasyonlarının (1 µM, 5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM ve NK'ün) A549 hücreleri ile 24 saat muamele edilmesinden sonra absorbans değerleri ölçülmüştür. Herbir konsantrasyon için elde edilen absorbans değerleri Tablo 4'de verilmiştir. Elde edilen canlılık oranlarına Kruskal Wallis ve daha sonra Dunn's çoklu karşılaştırma testi uygulandığında, göz önüne alınan konsantrasyonlar ile negatif kontrol arasında istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0,05$).

Tetrachlorvinphos'un 24 saatlik muamelesi sonucunda konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık oranların azaldığı görülmüştür. Yapılan 3 tekrarlı 3 farklı deneyin % canlılık ortalaması incelendiğinde en düşük konsantrasyon olan 1 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 24 saatte %6 sitotoksik etki gösterirken, 5 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 24 saatte gözlenen sitotoksik etki artmış ve %10 olmuştur. 25 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 24 saatte %28 sitotoksik etki gösterirken 50 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 24 saatte %49 sitotoksik etki göstererek arttığı belirlenmiştir. 100 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 24 saatte %71 sitotoksik etki gösterirken 200 µM Tetrachlorvinphos muamelesi A549 hücreleri üzerinde 24 saatte %90 sitotoksik etki göstererek arttığı belirlenmiştir. Bu veriler düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona

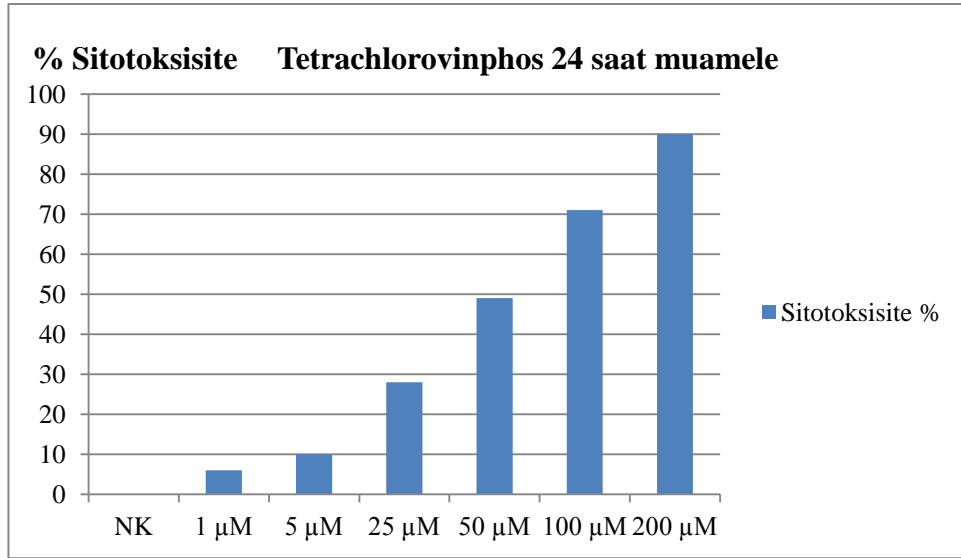
doğru 24 saatlik Tetrachlorvinphos muamelesinin sitotoksik etkisinde arttığı yani pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4 ve şekil 15).

Tetrachlorvinphos'un A549 hücreleri ile 24 saat muamelesi sonucundayüksek miktarda hücre ölümünün meydana geldiği konsantrasyonlar elimine edildi ve en fazla %49 sitotoksikite oluşturan doz en yüksek doz olarak seçildi. Tetrachlorvinphos ve A549 hücrelerinin 24 saat muamelesi için NK ve 1 µM, 5 µM, 25 µM ve 50 µM konsantrasyonlarında çalışılmasının uygun olacağı anlaşıldı.

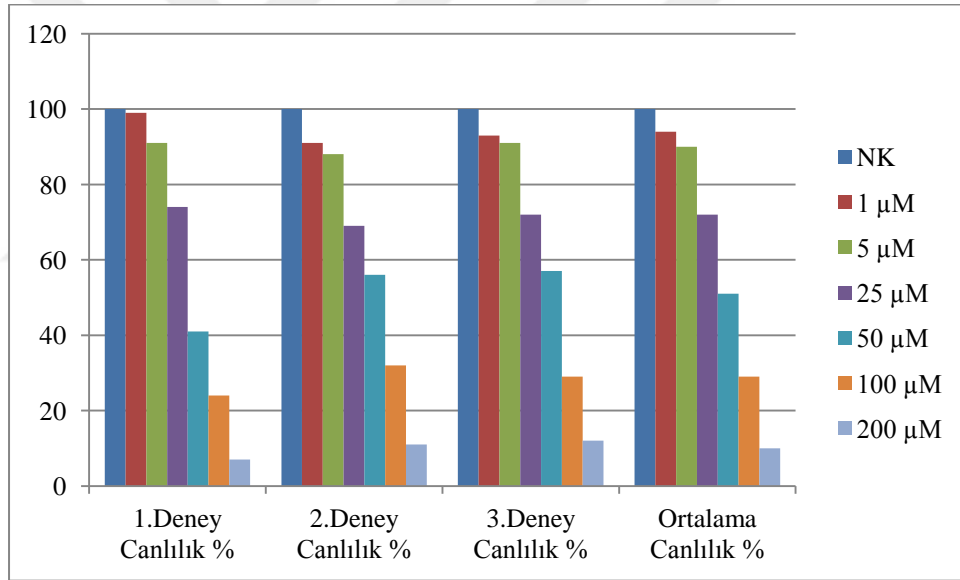
Tablo-4. Tetrachlorvinphos'un MTT ile Sitotoksitesinin Belirlenmesi (24 saat muamele)

	NK	1 µM	5 µM	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM
1. Deney	1,232	1,199	1,090	0,990	0,471	0,185	0,080
	1,214	1,174	1,003	0,901	0,484	0,334	0,085
	1,222	1,243	1,250	0,834	0,537	0,370	0,089
Canlılık %	-	0,99	0,91	0,74	0,41	0,24	0,07
2. Deney	0,991	0,879	0,866	0,678	0,514	0,234	0,108
	0,980	0,930	0,897	0,793	0,667	0,426	0,105
	1,006	0,888	0,863	0,597	0,488	0,295	0,101
Canlılık %	-	0,91	0,88	0,69	0,56	0,32	0,11
3. Deney	0,964	0,878	0,831	0,637	0,514	0,263	0,118
	0,993	0,916	0,872	0,667	0,526	0,294	0,109
	0,983	0,950	0,964	0,817	0,642	0,303	0,112
Canlılık %	-	0,93	0,91	0,72	0,57	0,29	0,12
Ortalama Canlılık%±SS		0,94±0,04	0,90±0,02	0,72±0,02	0,51±0,09	0,29±0,04	0,10±0,02

NK: Negatif kontrol, µM: mikromolar, SS: Standart sapma



Şekil-15. Tetrachlorvinphos 24 Saat Muamele.



Şekil-16. Tetrachlorvinphos ile 24 Saat Muamele Edilen A549 Hücrelerinin Canlılık Değişimi.

4.5. Glyphosate'in 12 Saatlik Muamelesi Sonrası Oluşan %5mC Değişimi

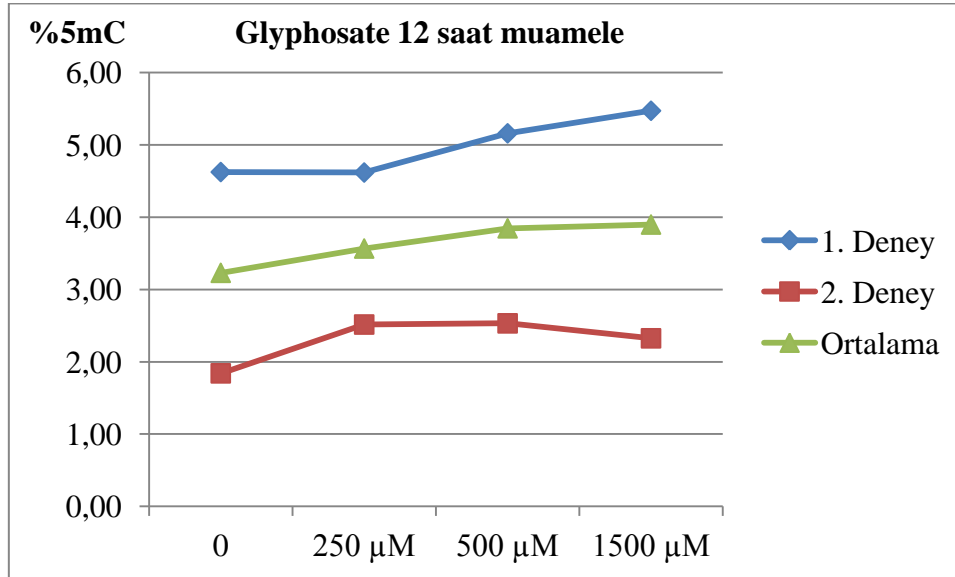
Glyphosate'in farklı konsantrasyonlarının 12 saat süre ile A549 hücrelerinden meydana getirdiği total DNA 5mC değişimine ilişkin veriler Tablo 5'de verilmiştir. Paralel olarak gerçekleştirilen iki deneyde, total DNA metilasyon miktarının konsantrasyon artışı ile arttığı görülmüştür. Bu durum her iki deneyde de tespit edilmiştir. Glyphosate'in A549 hücreleri ile

muamele edilmesinden sonra %5mC ortalaması incelendiğinde negatif kontrolde %3,26 oranında 5mC ölçülmüşken, en yüksek doz olan 1500 µM Glyphosate muamelesinin A549 hücrelerinde 12 saatte %3,90 DNA metilasyonu oluşturduğu gözlenmiştir. %5mC miktarı, konsantrasyon artışı ile artmasına rağmen, bu artışın lineer bir artış olmadığı görülmüştür ($R^2=0,63$ $P>0,05$). Uygulanan istatistiki yöntem, meydana gelen artışların anlamlı olmadığını göstermiştir ($P>0,05$). Ortalama veriler dikkate alındığında, en yüksek konsantrasyon olan 1500 µM'in negatif kontrole göre 1,2 kat daha fazla metillendiği görülmüştür. Genel eğilim olarak, konsantrasyon artışına bağlı olarak hipermetilasyon görülmüştür.

Tablo-5. 12 Saat Glyphosate Muamelesi Sonucu Oluşan Global DNA Metilasyon Değişimi

Konsantrasyon (µM)	1.Deney %5mC	2. Deney %5mC	Ortalama %5mC±SS
NK	4,62	1,84	3,23±1,6
250	4,62	2,52	3,57±1,5
500	5,16	2,53	3,85±2,1
1500	5,47	2,33	3,90±1,0

SS: Standart Sapma



Şekil-17. Glyphosate 12 Saat Muamele.

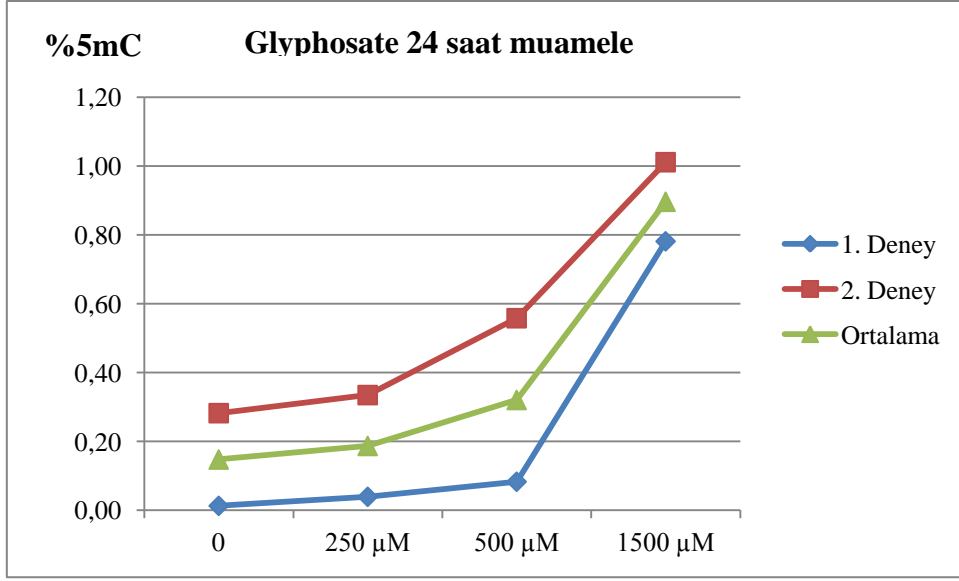
4.6. Glyphosate'in 24 Saatlik Muamelesi Sonrası Oluşan %5mC Değişimi

Glyphosate'in dört farklı konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen A549 hücrelerinde meydana gelen total DNA 5mC değişimi Tablo 6'da verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, genel olarak konsantayon artışı ile birlikte total DNA 5mC miktarının da arttığı görülmüştür (Şekil 18). Total DNA metilasyon miktarı ile konsantrasyonlar arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Glyphosate'in A549 hücreleri ile muamele edilmesinden sonra %5mC ortalaması incelendiğinde negatif kontrolde %0,15 oranında 5mC bulunmuşken, en yüksek doz olan 1500 µM Glyphosate muamelesinin A549 hücreleri üzerinde 24 saatte %0,90 oranında DNA metilasyonu oluşturmuştur. Paralel olarak yapılan her iki deneyde de total DNA metilasyon miktarının arttığı görülmüştür. Glyphosate'in konsantrasyon artışına bağlı olarak lineer bir DNA 5mC artışı olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Tekrarlı tek yönlü ANOVA analizi ve daha sonra Bonferroni çoklu karşılaştırma uygulandığında, negatif kontrol ile en yüksek konsantrasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($P<0,05$). En yüksek konsantrasyona cevaben metillenme miktarı negatif kontrole göre 6 kat daha fazladır.

Tablo-6. 24 Saat Glyphosate Muamelesi Sonucu Oluşan Global DNA Metilasyon Değişimi

Konsantrasyon (µM)	1. Deney %5mC	2. Deney %5mC	Ortalama %5mC±SS
NK	0,01	0,28	0,15±0,19
250	0,04	0,33	0,19±0,21
500	0,08	0,56	0,32±0,34
1500	0,78	1,01	0,90±0,16

SS: Standart Sapma



Şekil-18. Glyphosate 24 Saat Muamele.

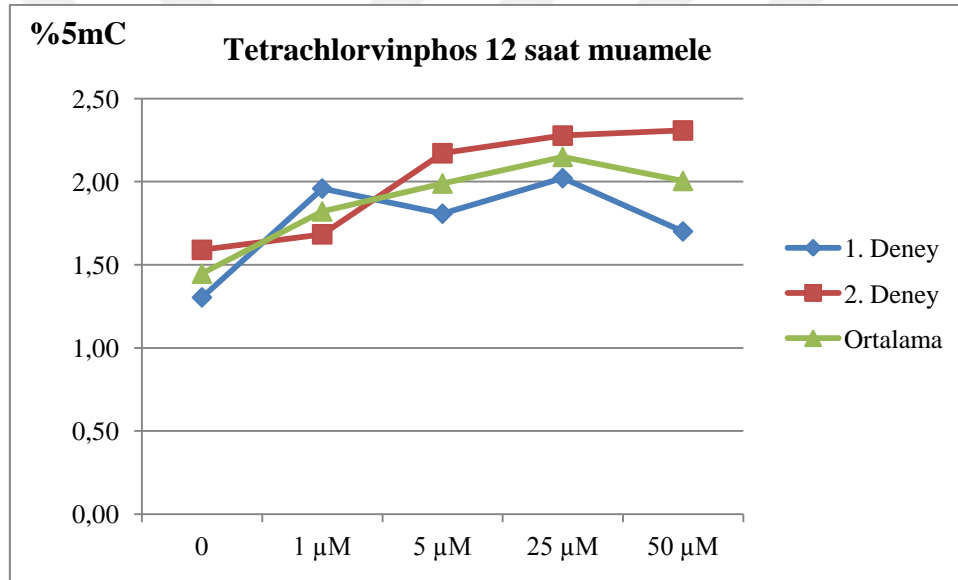
4.7. Tetrachlorvinphos'un 12 Saatlik Muamelesi Sonrası Oluşan %5mC Değişimi

A549 hücrelerinin Tetrachlorvinphos'un farklı konsantrasyonlarına 12 saat süre ile maruziyeti sonucu ölçülen total 5mC miktarları Tablo 7'de verilmiştir. Total DNA metilasyon miktarı ve konsantrasyon arasında dalgalanmalar olsa da genel olarak yüksek konsantrasyonlara maruziyet sonrası total DNA metilasyon miktarında yükselmeler görülmüştür. Farklı zamanlarda yapılan ölçümlerde benzer sonuçlar bulunmuştur. Tetrachlorvinphos'un A549 hücreleri ile muamele edilmesinden sonra %5mC ortalaması incelendiğinde negatif kontrolde 12 saatte %1,45 oranında DNA metilasyonu oluşturduken, en yüksek doz olan 50µM Tetrachlorvinphos muamelesinin A549 hücreleri üzerinde 12 saatte %2,00 DNA metilasyonu oluşturmuştur. Total olarak, en yüksek konsantrasyon, negatif kontrole göre 1,38 kat daha fazla DNA metilasyon görülmüştür. Genel eğilim olarak, konsantrasyon artışına bağlı olarak hipermetilasyon görülmektedir. Ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca doza bağımlı lineer bir artış sağlanmamıştır.

Tablo-7. 12 Saatlik Tetrachlorvinphos Muamelesi Sonucu Oluşan Global DNA Metilasyon Değişimi

Konsantrasyon (μM)	1.Deney %5mC	2. Deney %5mC	Ortalama %5mC \pm SS
NK	1,30	1,59	1,45 \pm 0,4
1	1,96	1,68	1,82 \pm 0,6
5	1,81	2,17	1,99 \pm 0,6
25	2,02	2,28	2,15 \pm 0,7
50	1,70	2,31	2,00 \pm 0,5

SS: Standart Sapma



Şekil-19. Tetrachlorvinphos 12 Saat Muamele.

4.8. Tetrachlorvinphos'un 24 Saatlik Muamelesi Sonrası Oluşan %5mC Değişimi

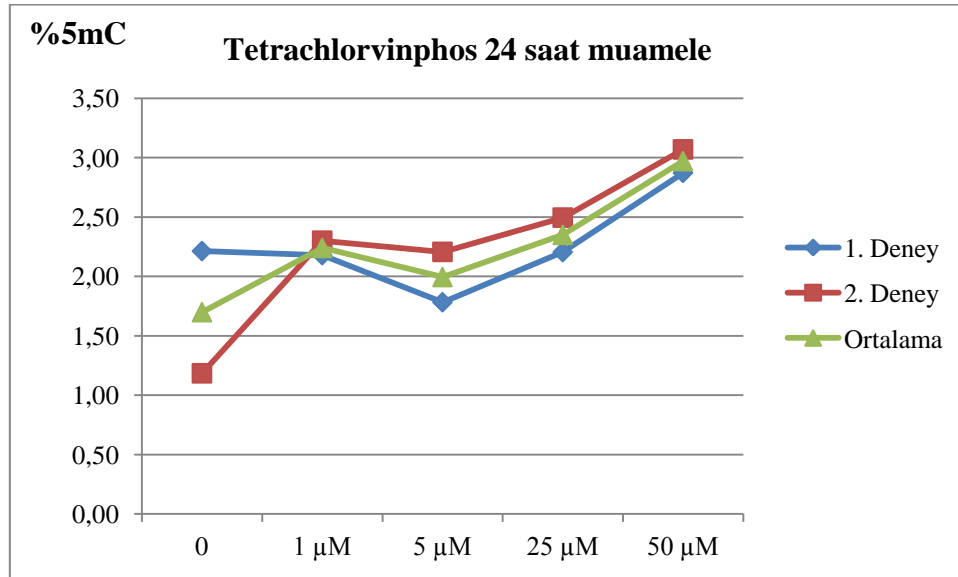
Tetrachlorvinphos ile 24 saat muamele edilen A549 hücrelerinde meydana gelen total 5mC değişimleri Tablo 8'de verilmiştir. Tetrachlorvinphos'un A549 hücreleri ile muamele edilmesinden sonra %5mC ortalaması incelendiğinde hiç bir muamelenin olmadığı A549 hücrelerinde 24 saatte %1,70 oranında DNA metilasyonu oluştururken, en yüksek doz olan 50 μM Tetrachlorvinphos muamelesinin A549 hücreleri üzerinde 24 saatte %2,97 DNA metilasyonu oluşturmuştur. Buna göre her iki deneyde de total DNA metilasyon miktarı

artmıştır. Bu artış, total olarak Tetrachlorvinphos'un en yüksek konsantrasyonu için 1,75 kat olarak tespit edilmiştir. Lineer regresyon analizi konsantrasyona bağlı artan lineer bir DNA metilasyon durumu olduğunu göstermiştir (P=0,03). Tetrachlorvinphos'un konsantrasyonunun artmasıyla birlikte muamele süresinde artması 5mC miktarını da arttırmıştır.

Tablo-8. 24 Saatlik Tetrachlorvinphos Muamelesi Sonucu Oluşan Global DNA Metilasyon Değişimi

Konsantrasyon (µM)	1.Deney %5mC	2. Deney %5mC	Ortalama %5mC±SS
NK	2,21	1,18	1,70±0,7
1	2,18	2,30	2,24±0,1
5	1,78	2,21	1,99±0,3
25	2,20	2,49	2,35±0,2
50	2,87	3,07	2,97±0,1

SS: Standart Sapma



Şekil-20. Tetrachlorvinphos 24 Saat Muamele.

5. TARTIŞMA

Tarım ilaçlarının insan sağlığı üzerine olan etkileri son yıllarda çok geniş ölçekte araştırılmıştır. Ancak gelinen aşamada, bazı açıklanamayan noktalar olduğu görölmüştür. Hayvan modellemeleri, hücre kültürü ve pestisitlere maruz kalan insan popölasyonlarından elde edilen bulgular bu kimyasalların ciddi etkileri olduğunu göstermiştir. Genel olarak; bilinçsiz kullanım ve dirençli zararlıların sayısının artması gibi nedenlerden dolayı kullanılan pestisit sayı ve çeşitleri her geçen gün artmıştır. Bundan dolayı, pestisitlerin çevredeki miktarları ve çeşidi artmakta, bundan dolayı insanlar sürekli olarak pestisitlere maruz kalabilmektedirler. Bununla birlikte; ilk zamanlarda üretilmiş ve kullanılmış daha sonra zararlı olduğu anlaşılan -örneğin DDT gibi- tarım ilaçları çevrede kalıcılığı uzun olan kimyasallardır. Kalıcılığının yüksek olması ve ekosistemi oluşturan birimler arasında hareket edip üst besin düzeylerinde birikebilme özelliklerinden dolayı hala bu tür kimyasal bileşiklere kronik bir maruziyet söz konusudur. Genel olarak bakıldığında, başta insanlar olmak üzere pestisitlerin düşük konsantrasyonlarına uzun süreli bir maruziyet olduğu söylenebilir. Bu durumun çok uzun yıllar boyunca devam edeceği aşikârdır. Dolayısı ile pestisitlere maruziyetin doğuracağı sonuçları önceden bilmek, alınması gereken önlem ve politikalar bakımından büyük önem arz etmektedir.

Son yıllarda, pestisitlerin insan sağlığı üzerine etkilerini ayrıntılı şekilde ortaya koyabilmek amacıyla gen anlatımını değiştirebilen epigenetik mekanizmaların rolü araştırılmaya başlanmıştır. Epigenetik değişimler, mekanizmaları nedeni ile daha önce aydınlatılmamış bazı moleküler mekanizmaların ortaya konulması bakımından önemli birer mekanizma olarak kabul görmektedirler. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar çevresel kirleticilerin epigenetik mekanizmaları değiştirdiği, epigenetik mekanizmaların hastalıklarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Portela ve Esteller, 2010). Dolayısı ile epigenetik mekanizmaların çevresel kirleticiler ile hastalıklar arasında aracılık yapıp yapmadığı önemli bir noktayı oluşturmaktadır. Tüm bu temel düşüncelerden yola çıkarak, tez çalışmasında karsinojen potansiyeli olan ancak mekanizmaları aydınlatılamamış iki pestisit total 5mC DNA metilasyon mekanizmasını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Tezde, böylelikle 5mC gibi yaygın ve önemli bir epigenetik mekanizmanın yüksek karsinojen sınıfına konulmuş pestisitler için bir mekanizma olup olmadığını belirleme konusuna açıklık getirmiş ayrıca böyle pestisitler için bir biyomarkır olup olmadığı da ortaya konulmuştur.

Tez çalışması kapsamında, iki farklı muamele süresi (12 ve 24 saat) için test edilen Glyphosate ve Tetrachlorvinphos'un negatif kontrole göre artan konsantrasyona bağlı olarak

total DNA 5mC miktarının arttığı görülmüştür. Bu artış, total bir durumu yansıtmaktadır. Spesifik olarak bir gen bölgesini yansıtmamaktadır. Çok yakın geçmişte, Glyphosate ile ilgili insan periferal lenfositlerinde yapılan bir çalışmada, total DNA 5mC ile gen spesifik DNA metilasyon analizi yapılmıştır. Bahsedilen çalışmada, Glyphosate'in 0.25 mM konsantrasyonunun total 5mC miktarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca p16 ve p53 genlerinden ise 5mC miktarının negatif kontrole göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür (Kwiatkowska ve ark., 2017). Ancak, Tetrachlorvinphos için böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Daha önce epigenom geniş ölçekli yapılan bir çalışmada, fonofos, parathion, ve terbufos gibi organofosfat grubu pestisitlere maruz bırakılan K562 hücrelerinde ayrıntılı şekilde 5mC değişimi incelenmiştir (Zhang ve ark., 2012). Fonofos, parathion ve terbufos pestisitlerinin her biri için 1551, 1482 ve 1357 adet gende metilasyon değişimi gözlemlenmiştir. Ayrıca bu belirlenen bölgelerin büyük bir kısmının ise ortak şekilde etkilendiği gösterilmiştir. Metilasyon değişimlerin meydana geldiği gen bölgeleri gen ontoloji analizi ile araştırıldığında, birçoğunun karsinogenezis ile ilintili bölgeler olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmeyen çok sayıda genom bölgelerinin de olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında değerlendirilen Tetrachlorvinphos IARC tarafından 2B sınıfta yer almıştır (Guyton ve ark., 2015). 2B sınıfı karsinojenite için deney hayvanlarında yeterli kanıt olan ancak insanda yeterli kanıt elde edilmemiş pestisitlerdir. Tetrachlorvinphos farelerde benign ve malign hepatosellular tümörlere neden olmaktadır. Ayrıca, erkek farelerde renal tübül tümörlere neden olduğu görülmüştür. Farelerde yapılan çalışmalarda sistematik olarak dağıldığı, metabolize edildiği ve ayrıca idrarla elimine edildiği görülmüştür. Bu bağlamda, Tetrachlorvinphos'un 12 ve 24 saat muameleleri sonucunda total 5mC miktarının kontrol gruba göre artması önem arz etmektedir. Dolayısı ile total 5mC miktarının karsinojenite için önemli bir mekanizma olduğu tahmin edilmektedir. Ancak, total DNA 5mC miktarından ziyade, epigenom geniş ölçekli analizlerin yapılması daha ayrıntılı sonuçlar verecektir.

2A sınıfta yer alan Glyphosate, insanda sınırlı kanıt olan (non-Hodgkin lymphoma) ancak deney hayvanlarında yeterli kanıt olan ve geniş ölçekte kullanılmış bir pestisittir. Amerika, Kanada ve İsviçre'de yapılan insan popülasyonu çalışmalarında, Glyphosate maruziyetine bağlı olarak non-Hodgkin lenfoma riskinin arttığı görülmüştür (Guyton ve ark., 2015). Deney hayvanlarında ise farklı tümörlerin geliştiği görülmüştür. Tez çalışmasında her iki muamele sürelerinde 5mC miktarının arttığı tespit edilmiştir. Bu artış, Glyphosate'in total

5mC miktarını değiştirebildiği sonucunu ortaya koymuştur. Bu noktada, 5mC'nin Glyphosate'in karsinojenitesi için önemli olduğu vurgusu yapılabilir. Diğer taraftan, bu çalışmada total DNA metilasyon miktarı incelenmiş, ancak epigenom ölçekli araştırma imkanı olmamıştır. Bu neri, daha spesifik olarak hangi genom bölgelerinin önemli olduğunu net Şekilde ortaya koyacaktır.

Pestisitler, birkaç hücresel sürecin sonucunda DNA metilasyon değişmelerine neden olabilirler. Bunlardan bir tanesi pestisitlerin meydana getirdiği oksidatif stres/reaktif oksijen türleridir (Fratelli ve ark., 2005, Yu ve ark., 2008). Diğeri, DNA metilasyon mekanizmasında rol alan DNA metil transferaz enzimlerini etkileyebilme potansiyelleri (Shepherd ve ark., 2006) ve bir diğeri ise immunotoksisitedir (Daniel ve ark., 2001).

Pestisitlerin oksidatif strese neden oldukları birkaç çalışma ile gösterilmiştir. Birçok çalışmanın derlenip sonuçlarının toplu Şekilde değerlendirildiği bir çalışmada, özellikle organofosfat grubu pestisitlerin potansiyel olarak oksidatif strese neden oldukları gösterilmiştir. Organofosfat grubu pestisitlerin hücre membranı peroksidasyonu, total antioksidan kapasitesinde azalma, total thiol gruplarının değişimi gibi yolaklarla oksidatif stres oluşturdukları gösterilmiştir (Soltaninejad ve Abdollahi, 2009). Ayrıca Glyphosate ile muamele edilen farklı organizmalarda, gerek ticari Şekli gerekse saf halde Glyphosate'in oksidatif stres oluşturduğu görülmüştür (El-Shenawy 2009). Ancak Tetrachlorvinphos'un oksidatif stres oluşturduğu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bir çalışmada, DNA metilasyon ile kümülatif oksidatif stres arasında pozitif ilişki olduğu, ayrıca reaktif oksijen türlerinin üretimi ile DNA metilasyon mekanizmasında rol alan genlerin anlatımları arasında bağlantılar bulunmuştur (Fratelli ve ark., 2005). Tüm bu bulgulardan yola çıkarak, tez çalışması kapsamında her iki karsinojenik pestisit oluşturabildiği oksidatif stres ile DNA metilasyonunu değiştirebileceği düşünülebilir.

Organofosfat grubu pestisitlerin değerlendirildiği bir çalışmada, DNA metilasyon mekanizmasında görevli olan DNMT3A gen metilasyonunun 3 farklı organofosfat pestisiti tarafından arttırıldığı gösterilmiştir. Aynı alışmada, DNMT3B geninin metilasyonunda da pestisit maruziyetine bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir (Zhang ve ark., 2012). Çalışmamızda, DNA metilasyon miktarındaki artmanın DNA metilasyon mekanizması ile ilgili gen anlatımları ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Daha sonraki çalışmalar için önerilebilecek bir noktadır.

Pestisitlerin DNA metilasyon mekanizmasını değiştirebileceği başka bir mekanizma ise, pestisitlerin neden olduğu immunotoksisitedir. Birçok çalışmanın derlendiği bir çalışmada, farklı kimyasalların yanında bazı pestisitlerin immunotoksik olduğu ifade edilmiştir (Veraldi

ve ark., 2006). Ayrıca bazı pestisitlerin ise sitokin seviyesinin artması ile ilgili oldukları belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise sirküler kanda artmış sitokin seviyesinin periferal kanda ölçülen tümör supressor genlerindeki hipermetilasyonla ilgili olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu yaklaşımlar, pestisitlerin sitokin metabolizmasını etkileyerek DNA metilasyon miktarını değiştirdiğini söyleyebiliriz. Dolayısı ile çalışmamızda artmış DNA metilasyonunun, pestisitlerin sitokinler aracılığı ile olabileceği söylenebilir. Ancak, bu konuda daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Bu tez çalışmasında çıkan sonuçlar;

1- Glyphosate'in her iki muamele süresi sonunda (12 ve 24 saat) DNA metilasyon miktarı artmıştır. 24 saatlik muamele süresi sonunda elde edilen artışlar anlamlı bulunmuştur. Bu artış, metilasyon mekanizmasının Glyphosate'in etki mekanizmalarından biri olabileceğini gösterebilir,

2- Tetrachlorvinphos'un her iki muamele süresi sonunda DNA metilasyon miktarında artışlara neden olmuştur. Bu artışlar Tetrachlorvinphos'un temel etki mekanizmaları arasında olabilir.

6.2. Öneriler

- 1- Bundan sonra, her iki pestisidin DNA metilasyon değiştirme mekanizmaları araştırılmalı,
- 2- Bu mekanizmalar olarak, oksidatif stres, DNA metilasyon mekanizmasındaki gen anlatım şekilleri ve immunotoksitedir,
- 3- İlgili konu ile ilgili populasyon düzeyinde meydana gelen değişimleri gözlemek amacıyla epidemiyolojik çalışmalar yapılmalı,
- 4- Tez çalışmasında her iki pestisit için sitotoksik olamayan konsantrasyonlar seçilmiştir. Bu bağlamda, ileriki çalışmalarda sitotoksik olan dozların değerlendirilmesi önerilmektedir.
- 5- Epigenom geniş ölçekli analizler yapılarak, hangi gen bölgelerinin etkilendiği ve bu gen bölgelerinin hangi hastalıklarla ilgili olabileceği araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Alavanja MC ve Bonner MR. Pesticides and human cancers. *Cancer Invest.* 2005; 23:700-711.
- Alavanja MC ve Bonner MR. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B.* 2012; 15:238-263.
- Alavanja MC, Ward MH ve Reynolds P. Carcinogenicity of agricultural pesticides in adults and children. *J Agromed.* 2007; 12:39-56.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan A, Norppa H, Shuker DE ve Tice R. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2000; 463:111-172.
- Anderson D ve Zeiger E. Human monitoring. *Environ Mol Mutagen.* 1997; 30:95-96.
- Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A ve Kalda A. DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2010; 35:2450-2461.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M ve Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science.* 2005; 308:1466-1469.
- Anway MD, Leathers C ve Skinner MK. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology.* 2006; 147:5515-5523.
- Babar IA, Slack FJ ve Weidhaas JB. miRNA modulation of the cellular stress response. 2008;
- Baccarelli A ve Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 2009; 21:243.
- Baccarelli A, Cassano P, Litonjua A, Park S, Suh H ve Sparrow D. Cardiac autonomic dysfunction: effects from particulate air pollution and protection by dietary methyl nutrients and metabolic polymorphisms *Circulation* 2008;117: 1802–1809. Find this article online.
- Backes C, Meese E, Lenhof H-P ve Keller A. A dictionary on microRNAs and their putative target pathways. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:4476-4486.
- Baldi I ve Lebailly P. Cancers and pesticides. *La revue du praticien.* 2007; 57:40-44.
- Ballestar E ve Esteller M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis.* 2002; 23:1103-1109.

- Bassil K, Vakil C, Sanborn M, Cole D, Kaur JS ve Kerr K. Cancer health effects of pesticides. *Can Fam Physician*. 2007; 53:1704-1711.
- Baxter PJ, Aw T-C, Cockcroft A, Durrington P ve Harrington JM (2010) *Hunter's diseases of occupations*. CRC Press,
- Beck S ve Olek A (2006) *The epigenome: Molecular hide and seek*. John Wiley & Sons,
- Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel BŞ ve Alvur M. DNA Hasarı Analizinde μ -FADU ve COMET Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 2004; 2:97-103.
- Bestor TH, Gundersen G, Kolstø A-B ve Prydz H. CpG islands in mammalian gene promoters are inherently resistant to de novo methylation. *Genet Anal: Biomol Eng*. 1992; 9:48-53.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002; 16:6-21.
- Bollati V ve Baccarelli A. Environmental epigenetics. *Heredity (Edinb)*. 2010; 105:105.
- Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2003; 543:251-272.
- Brait M ve Sidransky D. Cancer epigenetics: above and beyond. *Toxicol Mech Methods*. 2011; 21:275-288.
- Brusick D (1980) *Principles of genetic toxicology vol 279*. Springer,
- Calderon R. The epidemiology of chemical contaminants of drinking water. *Food Chem Toxicol*. 2000; 38:S13-S20.
- Carlisle S ve Trevors J. Glyphosate in the environment. *Water, Air, Soil Pollut*. 1988; 39:409-420.
- Carrano A ve Natarajan A. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1988; 204:379-406.
- Cedar H ve Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews Genetics*. 2009; 10:295.
- Chanda S, Dasgupta UB, GuhaMazumder D, Gupta M, Chaudhuri U, Lahiri S, Das S, Ghosh N ve Chatterjee D. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci*. 2005; 89:431-437.
- Chen H, Li S, Liu J, Diwan BA, Barrett JC ve Waalkes MP. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2004; 25:1779-1786.

- Choi J-Y, James SR, Link PA, McCann SE, Hong C-C, Davis W, Nesline MK, Ambrosone CB ve Karpf AR. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*. 2009; 30:1889-1897.
- Choy WN (2001) Genetic toxicology and cancer risk assessment. CRC Press,
- Chuang JC ve Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*. 2007; 61:24R.
- Clayton AL, Rose S, Barratt MJ ve Mahadevan LC. Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos-and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *The EMBO journal*. 2000; 19:3714-3726.
- Coffin JC, Ge R, Yang S, Kramer PM, Tao L ve Pereira MA. Effect of trihalomethanes on cell proliferation and DNA methylation in female B6C3F1 mouse liver. *Toxicol Sci*. 2000; 58:243-252.
- Coskun M, Coskun M, Cayir A ve Ozdemir O. Frequencies of micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Canakkale, Turkey. *Environ Int*. 2011; 37:93-96.
- Cress WD ve Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol*. 2000; 184:1-16.
- Cropley JE, Suter CM, Beckman KB ve Martin DI. Germ-line epigenetic modification of the murine Avy allele by nutritional supplementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103:17308-17312.
- Çayır A, Coskun M ve Coskun M. Micronuclei, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds induced in human lymphocytes by the fungicide signum and its active ingredients (boscalid and pyraclostrobin). *Environ Toxicol*. 2014; 29:723-732.
- Damalas CA ve Eleftherohorinos IG. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health*. 2011; 8:1402-1419.
- Daniel V, Huber W, Bauer K, Suesal C, Mytilineos J, Melk A, Conradt C ve Opelz G. Association of elevated blood levels of pentachlorophenol (PCP) with cellular and humoral immunodeficiencies. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 2001; 56:77-83.
- Davis MK, Boone JS, Moran JE, Tyler JW ve Chambers JE. Assessing intermittent pesticide exposure from flea control collars containing the organophosphorus insecticide tetrachlorvinphos. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 2008; 18:564.
- Dawson MA ve Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012; 150:12-27.

- Denizot F ve Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986; 89:271-277.
- Desaulniers D, Xiao G-h, Lian H, Feng Y-L, Zhu J, Nakai J ve Bowers WJ. Effects of mixtures of polychlorinated biphenyls, methylmercury, and organochlorine pesticides on hepatic DNA methylation in prepubertal female Sprague-Dawley rats. *Int J Toxicol*. 2009; 28:294-307.
- Deshmukh RS, Østrup O, Østrup E, Vejlsted M, Niemann H, Lucas-Hahn A, Petersen B, Li J, Callesen H ve Hyttel P. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed in vivo and produced by in vitro fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Epigenetics*. 2011; 6:177-187.
- Dich J, Zahm SH, Hanberg A ve Adami H-O. Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control*. 1997; 8:420-443.
- Dolinoy DC, Das R, Weidman JR ve Jirtle RL. Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. *Pediatr Res*. 2007a; 61:30R.
- Dolinoy DC, Weidman JR ve Jirtle RL. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reprod Toxicol*. 2007b; 23:297-307.
- Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP ve Brown DM. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM 10). *Free Radic Biol Med*. 2003; 34:1369-1382.
- Ducasse M ve Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer*. 2006; 5:60.
- Duke S ve Hoagland R. Effects of glyphosate on the metabolism of phenolic compounds: VII. Root-fed amino acids and glyphosate toxicity in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Weed Sci*. 1981:297-302.
- El-Shenawy NS. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009; 28:379-385.
- Ellis L, Atadja PW ve Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8:1409-1420.
- EPA U (2009) What is pesticide? Accessed 8 Augustos 2017
- Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*. 2006; 27:1121-1125.
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews Genetics*. 2007; 8:286.

- Feinberg AP, Ohlsson R ve Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews Genetics*. 2006; 7:21.
- Fratelli M, Goodwin LO, Ørom UA, Lombardi S, Tonelli R, Mengozzi M ve Ghezzi P. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:13998-14003.
- Friedman JM. A war on obesity, not the obese. *Science*. 2003; 299:856-858.
- Galaris D ve Evangelou A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002; 42:93-103.
- Galaris D, Skiada V ve Barbouti A. Redox signaling and cancer: the role of “labile” iron. *Cancer Lett*. 2008; 266:21-29.
- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW ve Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*. 1983; 11:6883-6894.
- Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon M-C ve Séralini G-E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*. 2009; 262:184-191.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H ve Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 2003; 300:489-492.
- Gibbs JR, van der Brug MP, Hernandez DG, Traynor BJ, Nalls MA, Lai S-L, Arepalli S, Dillman A, Rafferty IP ve Troncoso J. Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in human brain. *PLoS Genet*. 2010; 6:e1000952.
- Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K ve MacNee W. Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2003; 284:L533-L540.
- Glozak M ve Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*. 2007; 26:5420.
- Grewal SI ve Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*. 2003; 301:798-802.
- Gronbek K, Hother C ve Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS*. 2007; 115:1039-1059.
- Grönniger E, Weber B, Heil O, Peters N, Stäb F, Wenck H, Korn B, Winnefeld M ve Lyko F. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet*. 2010; 6:e1000971.

- Guerrero-Bosagna C, Settles M, Lucker B ve Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. *PLoS One*. 2010; 5:e13100.
- Guil S ve Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009; 41:87-95.
- Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H ve Straif K. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol*. 2015; 16:490.
- Gürel Ç, Nursal AF ve Yiğit S. Epigenetik ve Kanser. *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics*. 2016; 2:45-51.
- Han JS, Szak ST ve Boeke JD. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature*. 2004; 429:268.
- Hanahan D ve Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646-674.
- Heightman TD. Therapeutic prospects for epigenetic modulation. *Expert Opin Ther Targets*. 2011; 15:729-740.
- Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis*. 2007; 22:91-103.
- Herman D, Janssen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL ve Gottesfeld JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*. 2006; 2:551.
- Herman JG ve Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003; 349:2042-2054.
- Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 2006; 1:76-80.
- Holliday R ve Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975; 187:226-232.
- Holm TM, Jackson-Grusby L, Brambrink T, Yamada Y, Rideout WM ve Jaenisch R. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell*. 2005; 8:275-285.
- Hou L, Zhang X, Wang D ve Baccarelli A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol*. 2011; 41:79-105.
- Houck CM, Rinehart FP ve Schmid CW. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J Mol Biol*. 1979; 132:289-306.

- Hrelia P, Vigagni F, Maffei F, Morotti M, Colacci A, Perocco P, Grilli S ve Cantelli-Forti G. Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1994; 321:219-228.
- Hu H. Human health and heavy metals. *Life Support: The Environment and Human Health*; MIT Press: Cambridge, MA, USA. 2002:65.
- Huang D, Zhang Y, Qi Y, Chen C ve Ji W. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicol Lett*. 2008; 179:43-47.
- Huang N, Tan L, Xue Z, Cang J ve Wang H. Reduction of DNA hydroxymethylation in the mouse kidney insulted by ischemia reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 422:697-702.
- Iorio MV, Piovan C ve Croce CM. Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2010; 1799:694-701.
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M ve Webster M. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*. 2009; 41:178-186.
- İzmirli M, Alptekin D, Topçuoğlu M ve Güzel Aİ. Investigation of methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in coronary by-passed patients due to coronary atherosclerosis etiology. *Türkiye Klinikleri Cardiovascular Sciences*. 2009; 21:303-308.
- Jaga K ve Dharmani C. The epidemiology of pesticide exposure and cancer: A review. *Rev Environ Health*. 2005; 20:15-38.
- Jardim MJ, Fry RC, Jaspers I, Dailey L ve Diaz-Sanchez D. Disruption of microRNA expression in human airway cells by diesel exhaust particles is linked to tumorigenesis-associated pathways. *Environ Health Perspect*. 2009; 117:1745.
- Javierre BM, Esteller M ve Ballestar E. Epigenetic connections between autoimmune disorders and haematological malignancies. *Trends Immunol*. 2008; 29:616-623.
- Jena G, Kaul C ve Ramarao P. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian J Pharmacol*. 2002; 34:86-99.
- Jiang Y-h, Bressler J ve Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004; 5:479-510.

- Jirtle RL ve Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews Genetics*. 2007; 8:253.
- Jones PA, Archer TK, Baylin SB, Beck S, Berger S, Bernstein BE, Carpten JD, Clark SJ, Costello JF ve Doerge RW. Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Nature*. 2008; 454:711-715.
- Jones PA ve Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007; 128:683-692.
- Jungmann G. Arsenic cancer in vintagers. *Der Landarzt*. 1966; 42:1244.
- Kang E-R, Iqbal K, Tran DA, Rivas GE, Singh P, Pfeifer GP ve Szabó PE. Effects of endocrine disruptors on imprinted gene expression in the mouse embryo. *Epigenetics*. 2011; 6:937-950.
- Kanwal R ve Gupta S. Epigenetics and cancer. *J Appl Physiol*. 2010; 109:598-605.
- Kanwal R ve Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet*. 2012; 81:303-311.
- Karanth S ve Pope C. In vitro inhibition of blood cholinesterase activities from horse, cow, and rat by tetrachlorvinphos. *Int J Toxicol*. 2003; 22:429-433.
- Kim K-Y, Kim D-S, Lee S-K, Lee I-K, Kang J-H, Chang Y-S, Jacobs Jr DR, Steffes M ve Lee D-H. Association of low-dose exposure to persistent organic pollutants with global DNA hypomethylation in healthy Koreans. *Environ Health Perspect*. 2010; 118:370.
- Kirkland D. Genetic toxicology testing requirements: Official and unofficial views from Europe. *Environ Mol Mutagen*. 1993; 21:8-14.
- Knasmüller S, Mersch-Sundermann V, Kevekordes S, Darroudi F, Huber W, Hoelzl C, Bichler J ve Majer B. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*. 2004; 198:315-328.
- Koller VJ, Fürhacker M, Nersesyan A, Mišák M, Eisenbauer M ve Knasmueller S. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Arch Toxicol*. 2012; 86:805-813.
- Kondo K, Takahashi Y, Hirose Y, Nagao T, Tsuyuguchi M, Hashimoto M, Ochiai A, Monden Y ve Tangoku A. The reduced expression and aberrant methylation of p16 INK4a in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer*. 2006; 53:295-302.
- Koutros S, Alavanja MC, Lubin JH, Sandler DP, Hoppin JA, Lynch CF, Knott C, Blair A ve Freeman LEB. An update of cancer incidence in the Agricultural Health Study. *Journal of occupational and environmental medicine/American College of Occupational and Environmental Medicine*. 2010; 52:1098.

- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; 128:693-705.
- Kuo H, Shyu S ve Wang T. Genotoxicity of low dose N-nitroso propoxur to human gastric cells. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46:1619-1626.
- Lafon-Hughes L, Di Tomaso MV, Méndez-Acuña L ve Martínez-López W. Chromatin-remodelling mechanisms in cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2008; 658:191-214.
- Laird PW. Cancer epigenetics. *Human molecular genetics*. 2005; 14:R65-R76.
- Lee WJ, Hoppin JA, Blair A, Lubin JH, Dosemeci M, Sandler DP ve Alavanja MC. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to alachlor in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol*. 2004; 159:373-380.
- Lee Y, Klein C, Kargacin B, Salnikow K, Kitahara J, Dowjat K, Zhitkovich A, Christie N ve Costa M. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol*. 1995; 15:2547-2557.
- Leonard SS, Bower JJ ve Shi X. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Mol Cell Biochem*. 2004; 255:3-10.
- Levitskii EL, Gubskii I, Primak RG, Goriushko AG, Kholodova Iu D, Vistunova IE, Marchenko AN. Chromatin-protective action of the biologically active preparation BTK-8L in tetrachloromethane and chlorophos poisoning. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 68 (1996), pp. 76-84
- Li S, Ran XQ, Xu L ve Wang JF. microRNA and mRNA expression profiling analysis of dichlorvos cytotoxicity in porcine kidney epithelial PK15 cells. *DNA Cell Biol*. 2011; 30:1073-1083.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW ve Jones PA. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol*. 2002; 22:480-491.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z ve Ngo Q-M. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009; 462:315.
- Liu J, Ballaney M, Al-Alem U, Quan C, Jin X, Perera F, Chen L-C ve Miller RL. Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo. *Toxicol Sci*. 2007; 102:76-81.

- Lubbert M, Oster W, Ludwig W, Ganser A, Mertelsmann R ve Herrmann F. A switch toward demethylation is associated with the expression of myeloperoxidase in acute myeloblastic and promyelocytic leukemias. *Blood*. 1992; 80:2066-2073.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF ve Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angstrom resolution. *Nature*. 1997; 389:251.
- Mages F, Macovschi O, Prigent AF ve Fonlupt P. Increased Methylation of Chloroform Extractable Products and CTP: Cholinephosphate Cytidylyltransferase in Brain Membrane Preparations from Triethyltin-Intoxicated Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 1989; 65:302-305.
- Markowitz SD ve Bertagnolli MM. Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361:2449-2460.
- Marsit CJ, Eddy K ve Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res*. 2006; 66:10843-10848.
- Martin C ve Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol*. 2007; 19:266-272.
- Mass MJ ve Wang L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 1997; 386:263-277.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka P, Decordier I ve Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 2006; 88:1515-1531.
- Miao Z, Li C, Chen Y, Zhao S, Wang Y, Wang Z, Chen X, Xu F, Wang F ve Sun R. Dietary and lifestyle changes associated with high prevalence of hyperuricemia and gout in the Shandong coastal cities of Eastern China. *The Journal of rheumatology*. 2008; 35:1859-1864.
- Monks TJ, Xie R, Tikoo K ve Lau SS. Ros-induced histone modifications and their role in cell survival and cell death. *Drug Metab Rev*. 2006; 38:755-767.
- Monosson E. Chemical mixtures: considering the evolution of toxicology and chemical assessment. *Environ Health Perspect*. 2005; 113:383.
- Mostafalou S ve Abdollahi M. Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases. *Clin Exp Pharmacol*. 2012; 2:1000-1108.
- Mostafalou S ve Abdollahi M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 268:157-177.

- Nephew KP ve Huang TH-M. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett.* 2003; 190:125-133.
- Onishchenko N, Karpova N, Sabri F, Castrén E ve Ceccatelli S. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J Neurochem.* 2008; 106:1378-1387.
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin S-P ve Allis CD. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature.* 2007; 448:714.
- Orantes CM, Herrera R, Almaguer M, Brizuela EG, Núñez L, Alvarado NP, Jackeline Fuentes E, Bayarre HD, Amaya JC ve Calero DJ. Epidemiology of chronic kidney disease in adults of Salvadoran agricultural communities. *MEDICC Rev.* 2014; 16:23-30.
- Orcan S. Epigenetik ve Epigenomik. Erişim: http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_epigenetik.pdf Erişim Tarihi. 2006; 16:2013.
- Ostertag EM ve Kazazian Jr HH. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet.* 2001; 35:501-538.
- Paluszczak J ve Baer-Dubowska W. Epigenetic diagnostics of cancer—the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet.* 2006; 47:365-375.
- Parker C, Van Gelder G, Chai E, Gellatly J, Serota D, Voelker R ve Vesselinovitch S. Oncogenic evaluation of tetrachlorvinphos in the B6C3F1 mouse. *Fundam Appl Toxicol.* 1985; 5:840-854.
- Penel N ve Vansteene D. Cancers and pesticides: current data. *Bull Cancer.* 2007; 94:15-22.
- Pereira MA, Kramer PM, Conran PB ve Tao L. Effect of chloroform on dichloroacetic acid and trichloroacetic acid-induced hypomethylation and expression of the c-myc gene and on their promotion of liver and kidney tumors in mice. *Carcinogenesis.* 2001; 22:1511-1519.
- Perera F, Tang W-y, Herbstman J, Tang D, Levin L, Miller R ve Ho S-m. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One.* 2009; 4:e4488.
- Perroud N, Paoloni-Giacobino A, Prada P, Olié E, Salzman A, Nicastro R, Guillaume S, Mouthon D, Stouder C ve Dieben K. Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. *Translational psychiatry.* 2011; 1:e59.

- Pieper HC, Evert BO, Kaut O, Riederer PF, Waha A ve Wüllner U. Different methylation of the TNF-alpha promoter in cortex and substantia nigra: Implications for selective neuronal vulnerability. *Neurobiol Dis.* 2008; 32:521-527.
- Pilsner JR, Liu X, Ahsan H, Ilievski V, Slavkovich V, Levy D, Factor-Litvak P, Graziano JH ve Gamble MV. Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. *The American journal of clinical nutrition.* 2007; 86:1179-1186.
- Portela A ve Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010; 28:1057-1068.
- Preston RJ, Au W, Bender MA, Brewen JG, Carrano AV, Heddle JA, McFee AF, Wolff S ve Wassom JS. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the US EPA's Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology.* 1981; 87:143-188.
- Proctor NH, Hughes JP ve Hathaway GJ (2004) Proctor and Hughes' chemical hazards of the workplace. John Wiley & Sons,
- Prüss-Üstün A ve Corvalán C. Preventing disease through healthy environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease Geneva: World Health Organization. 2006;
- Rao P, Antony A, Rajalakshmi S ve Sarma D. Studies on hypomethylation of liver DNA during early stages of chemical carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis.* 1989; 10:933-937.
- Ravelli G-P, Stein ZA ve Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *The New England journal of medicine.* 1976; 295:349-353.
- Reamon-Buettner SM, Mutschler V ve Borlak J. The next innovation cycle in toxicogenomics: environmental epigenetics. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2008; 659:158-165.
- Reichard JF, Schnekenburger M ve Puga A. Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 352:188-192.
- Reik W, Dean W ve Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001; 293:1089-1093.
- Richard Pilsner J, Lazarus AL, NAM DH, Letcher RJ, Sonne C, Dietz R ve Basu N. Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the Luminometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife. *Mol Ecol.* 2010; 19:307-314.

- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature reviews Genetics*. 2005; 6:597.
- Ross JA, Blackman CF, Thai SF, Li Z, Kohan M, Jones CP ve Chen T. A potential microRNA signature for tumorigenic conazoles in mouse liver. *Mol Carcinog*. 2010; 49:320-323.
- Rusiecki JA, Baccarelli A, Bollati V, Tarantini L, Moore LE ve Bonefeld-Jorgensen EC. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ Health Perspect*. 2008; 116:1547.
- Sakano K, Inagaki Y, Oikawa S, Hiraku Y ve Kawanishi S. Copper-mediated oxidative DNA damage induced by eugenol: possible involvement of O-demethylation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2004; 565:35-44.
- Séralini G-E, De Vendômois JS, Cellier D, Sultan C, Buiatti M, Gallagher L, Antoniou M ve Dronamraju KR. How subchronic and chronic health effects can be neglected for GMOs, pesticides or chemicals. *Int J Biol Sci*. 2009; 5:438.
- Séralini G-E, Mesnage R, Clair E, Gress S, De Vendômois JS ve Cellier D. Genetically modified crops safety assessments: present limits and possible improvements. *Environmental Sciences Europe*. 2011; 23:10.
- Shahbazian MD ve Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*. 2007; 76:75-100.
- Shepherd KR, Lee E-SY, Schmued L, Jiao Y, Ali SF, Oriaku ET, Lamango NS, Soliman KF ve Charlton CG. 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*. 2006; 83:349-359.
- Shutoh Y, Takeda M, Ohtsuka R, Haishima A, Yamaguchi S, Fujie H, Komatsu Y, Maita K ve Harada T. Low dose effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on gene transcription and DNA methylation in the hypothalamus of young male rats: implication of hormesis-like effects. *The Journal of toxicological sciences*. 2009; 34:469-482.
- Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ ve Bhadra U. MicroRNAs—micro in size but macro in function. *The FEBS journal*. 2008; 275:4929-4944.
- Soltaninejad K ve Abdollahi M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med Sci Monit*. 2009; 15:RA75-RA90.
- Song C, Kanthasamy A, Anantharam V, Sun F ve Kanthasamy AG. Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in

- dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Mol Pharmacol*. 2010; 77:621-632.
- Song C, Kanthasamy A, Jin H, Anantharam V ve Kanthasamy A. Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. *Neurotoxicology*. 2011; 32:586-595.
- Souza Ad, Medeiros AdR, Souza ACd, Wink M, Siqueira IR, Ferreira MBC, Fernandes L, Loayza Hidalgo MP ve Torres ILdS. Evaluation of the impact of exposure to pesticides on the health of the rural population: Vale do Taquari, State of Rio Grande do Sul (Brazil). *Ciencia & saude coletiva*. 2011; 16:3519-3528.
- Sterner DE ve Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64:435-459.
- Suganuma T ve Workman JL. Crosstalk among histone modifications. *Cell*. 2008; 135:604-607.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR ve Aravind L. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009; 324:930-935.
- Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G ve Waalkes MP. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res*. 2003; 286:355-365.
- Tao L, Yang S, Xie M, Kramer PM ve Pereira MA. Effect of trichloroethylene and its metabolites, dichloroacetic acid and trichloroacetic acid, on the methylation and expression of c-Jun and c-Myc protooncogenes in mouse liver: prevention by methionine. *Toxicol Sci*. 2000; 54:399-407.
- Tarantini L, Bonzini M, Apostoli P, Pegoraro V, Bollati V, Marinelli B, Cantone L, Rizzo G, Hou L ve Schwartz J. Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environ Health Perspect*. 2009; 117:217.
- Thiers H, Colomb D, Moulin G ve Colin L. Arsenical skin cancer in vineyards in the Beaulonais (Fr.). *Ann Dermatol*. 1967; 94:133-158.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J ve Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65:87-108.
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A ve Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature reviews Neuroscience*. 2007; 8:355.
- Urdinguio RG, Sanchez-Mut JV ve Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *The Lancet Neurology*. 2009; 8:1056-1072.

- Vaissière T, Sawan C ve Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2008; 659:40-48.
- Valko M, Morris H ve Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005; 12:1161-1208.
- Vandegheuchte MB ve Janssen CR. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology*. 2011; 20:607-624.
- Veraldi A, Costantini AS, Bolejack V, Miligi L, Vineis P ve van Loveren H. Immunotoxic effects of chemicals: A matrix for occupational and environmental epidemiological studies. *Am J Ind Med*. 2006; 49:1046-1055.
- Vural N. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 1996; 73:342-373.
- Waddington CH. The epigenotype. *Int J Epidemiol*. 2011; 41:10-13.
- Waggoner JK, Kullman GJ, Henneberger PK, Umbach DM, Blair A, Alavanja MC, Kamel F, Lynch CF, Knott C ve London SJ. Mortality in the agricultural health study, 1993–2007. *Am J Epidemiol*. 2010; 173:71-83.
- Wassom JS. Origins of genetic toxicology and the Environmental Mutagen Society. *Environ Mol Mutagen*. 1989; 14:1-6.
- Weichenthal S, Moase C ve Chan P. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort. *Environ Health Perspect*. 2010; 118:1117.
- Weiner ER (2010) Applications of environmental chemistry: a practical guide for environmental professionals. CRC press,
- Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M ve Laird PW. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33:6823-6836.
- Wilson AS, Power BE ve Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2007; 1775:138-162.
- Yan C ve Boyd DD. Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. *Mol Cell Biol*. 2006; 26:6357-6371.
- Yang AS, Estéicio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH ve Issa JPJ. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32:e38-e38.
- Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, Berndt ML, Pogribny IP, Koturbash I ve Williams A. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an

- urban/industrial location. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105:605-610.
- Yu F, Wang Z, Ju B, Wang Y, Wang J ve Bai D. 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*. 2008; 59:415-423.
- Zama AM ve Uzumcu M. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology*. 2009; 150:4681-4691.
- Zeiger E. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1998; 28:85-95.
- Zeiger E. History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environ Mol Mutagen*. 2004; 44:363-371.
- Zhang X, Wallace AD, Du P, Kibbe WA, Jafari N, Xie H, Lin S, Baccarelli A, Soares MB ve Hou L. DNA methylation alterations in response to pesticide exposure in vitro. *Environ Mol Mutagen*. 2012; 53:542-549.
- Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP ve Waalkes MP. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94:10907-10912.
- Zheng YG, Wu J, Chen Z ve Goodman M. Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy. *Med Res Rev*. 2008; 28:645-687.
- Zhu Z-Z, Hou L, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L, Yang AS, Vokonas P, Lissowska J ve Fustinoni S. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. *Int J Epidemiol*. 2010; 41:126-139.

EKLER

Ek.1. Etik Kurul Karar Formu

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 18920478-050.01.04/E.19618
Konu : Başvuru İncelemesi

23.02.2016


Sayın Doç. Dr. Akın ÇAYIR

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Pestisit Maruziyetine Cevaben Oluşabilecek DNA Metilasyon Değişiminin in vitro Koşullarda Araştırılması" başlıklı 2011-KAEK-27/2016-E.8743 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 17/02/2016 tarih ve 03-04 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Karar Tarihi : 17.02.2016 14:00
Karar No : 2016-03

Karar-04)2011-KAEK-27/2016-E.8743 no'lu araştırma ile ilgili olarak, proje yürütücüsü Doç. Dr. Akın ÇAYIR'ın sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirilmenin okunması sonrasında yapılan oylamada **"ETİK KURUL ONAYINI ALIR."** kararı verilmiştir.

 e-imzalıdır

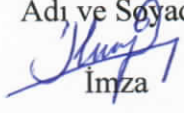
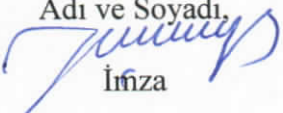
Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Başkan

Not: 5070 sayılı elektronik imza kanununu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Bilgi için: Faize OTURAN
Sekreter

Ek.2.**SPİRALLİ TEZ KONTROL FORMU**

	Evet	Hayır
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.	✓	
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.	✓	
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.	✓	
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.	✓	
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.	✓	
6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)	✓	
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.	✓	
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.	✓	
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.	✓	
10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır.	✓	
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlelerin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.	✓	
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.	✓	

Tarih: 25/08/2017 Hacer ERGÜN Öğrenci Adı ve Soyadı,  İmza	Tarih: 25/08/2017 Doç. Dr. Alişan ÇAYIR Danışmanın Adı ve Soyadı,  İmza
--	--

Ek.3.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİLTİ TEZ YAZIM KONTROL LİSTESİ

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	✓UYGUN	✓UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	✓UYGUN	✓UYGUN
Kapak sayfası düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
Onay sayfası düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
Teşekkür sayfası	✓UYGUN	✓UYGUN
Türkçe özet	✓UYGUN	✓UYGUN
İngilizce özet	✓UYGUN	✓UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	✓UYGUN	✓UYGUN
Şekiller dizini	✓UYGUN	✓UYGUN
Tablolar dizini	✓UYGUN	✓UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	✓UYGUN	✓UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	✓UYGUN	✓UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	✓UYGUN	✓UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	✓UYGUN	✓UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	✓UYGUN	✓UYGUN
Yöntem ve Gereç	✓UYGUN	✓UYGUN
Bulgular	✓UYGUN	✓UYGUN
Tartışma	✓UYGUN	✓UYGUN
Sonuç ve Öneriler	✓UYGUN	✓UYGUN
Kaynaklar	✓UYGUN	✓UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	✓UYGUN	✓UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	✓UYGUN	✓UYGUN
Tez planı	✓UYGUN	✓UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	✓UYGUN	✓UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	✓UYGUN	✓UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	✓UYGUN	✓UYGUN
Tarih: 25/08/2017 Hacer ERGÜN Öğrenci Adı ve Soyadı, İmza	Tarih: 25/08/2017 Doç. Dr. Şirin Çayır Danışmanın Adı ve Soyadı, İmza	

Ek.4. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı	HACER	Soyadı	ERGÜN
Doğum Yeri	BURSA	Doğum Tarihi	25.01.1981
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	10921961762
E-mail	hacergun@comu.edu.tr	Tel	05427943080

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	ÇOMÜ- Tıbbi Sistem Biyolojisi	2014-
Yüksek Lisans	ÇOMÜ- Kimya Öğretmenliği	2005
Lisans	Atatürk Üniversitesi- Sosyal Hizmetler Bölümü	2015
Lisans	Uludağ Üniversitesi- Kimya Bölümü	2003

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Memur/Bilgisayar İşletmeni	ÇOMÜ-Öğrenci İşleri Daire Başkanlığı	2012-Devam Ediyor
2.	Kimya Öğretmenliği	Zafer Dersanesi	2010-2011
3.	Kimya Öğretmenliği	Sınav Dersanesi	2009-2010
4.	Kimya Öğretmenliği	Zübeyde Hanım Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi	2008-2009
5.	Kimya Öğretmenliği	Malcılar Anadolu Lisesi	2007-2008
6.	Kimya Öğretmenliği	Abel Dersanesi	2005-2007

Yabancı Dil Sınav Notu#

KPDS	ÜD S	YDS	IELT S	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FC E	CA E	YÖK-DİL
		41,25							50

□ Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır □ KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English