

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PROLİNİN L929 FİBROBLAST HÜCRELERİNDE GLİFOSAT BAZLI
HERBİSİT TOKSİSİTESİNE KARŞI KORUYUCU ETKİSİ**

Hasret Pınar TİPİOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

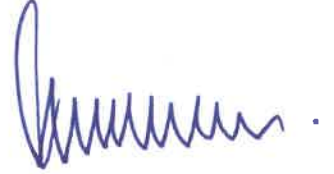
**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hasret Pınar TİPİOĞLU tarafından hazırlanan “Prolinin L929 Fibroblast Hücrelerinde Glifosat Bazlı Herbisit Toksisitesine Karşı Koruyucu Etkisi” adlı tez çalışması 14/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri:

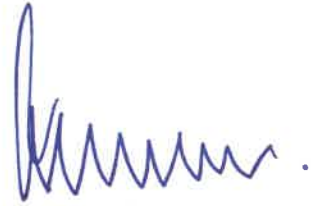
Başkan: Prof. Dr. Suna CEBESOY
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Fatma Gökçe APAYDIN
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

14/01/2020



Hasret Pinar TİPİOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PROLİNİN L929 FİBROBLAST HÜCRELERİNDE GLİFOSAT BAZLI HERBİSİT TOKSİSİTESİNE KARŞI KORUYUCU ETKİSİ

Hasret Pınar TİPİOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Bu çalışmada, L929 fibroblast hücrelerinde glifosat bazlı herbisit kullanılarak oluşturulan toksisiteye karşı prolinin koruyucu etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. L929 hücreleri herbisit 5 farklı konsantrasyonuna ve prolinin 3 farklı konsantrasyona 24, 48 ve 72 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Sitotoksosite için 24, 48 ve 72 saat boyunca glifosata maruz bırakılan hücrelere MTT testi uygulanmış ve absorbansları ölçülmüştür. Apoptozun tespiti için kaspaz 3 aktivitesine bakılmıştır. 24, 48 ve 72 saat için IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Glifosatın 210 µM konsantrasyonunda kontrole göre sadece 24 saatte çok az hücre canlılığı gözlenmiştir. 48 ve 72 saatlerde ise hücre canlılığı gözlenmemiştir. Ancak uygulanan diğer glifosat konsantrasyonlarında kontrole göre 24, 48 ve 72 saat için hücre canlılığında artış gözlenmiştir. Glifosat konsantrasyonları pozitif veya negatif kontrole göre değil de kendi içinde değerlendirildiğinde; glifosat konsantrasyonu artışı ile birlikte genel olarak kaspaz 3 aktivitesinde de artış gözlenmiştir. Prolin tek uygulandığında hücrelerde proliferasyon gözlenmiştir. Glifosat ve prolin birlikte uygulandığında ise tek başına glifosat uygulanan gruplara göre hücre canlılığında doza bağlı olarak değişimler gözlenmiştir. Prolin ve glifosat uygulanan gruplarda ise hem tek başına glifosat uygulanan gruplara göre hem de pozitif ve negatif kontrole göre kaspaz 3 aktivitesinde artış gözlenmiştir. L929 hücrelerine glifosatın yüksek konsantrasyonda toksik etki, düşük konsantrasyonlarda ise proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda proliferatif etkinin hücrenin apoptoz mekanizmasını bozarak kanser oluşumuna neden olabileceği düşünülmüştür. Prolinle birlikte glifosat uygulanan gruplardaki kaspaz 3 aktivitesindeki artışın ise bozulan apoptoz mekanizmasını tekrar harekete geçirmiş olabileceği düşünülmüştür.

Ocak 2020, 50 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Prolin, Glifosat Bazlı Herbisit, L929, Toksisite, Roundup Star, Apoptoz

ABSTRACT

Master Thesis

PROTECTIVE EFFECT OF PROLINE AGAINST GLYPHOSATE BASE HERBICIDE TOXICITY IN L929 CELLS

Hasret Pınar TİPİOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

The aim of this study is to evaluate the protective effect of proline against glyphosate based herbicide induced toxicity in L929 fibroblast cells. L929 cells were exposed to 5 different concentrations of herbicide and 3 different concentrations of proline for 24, 48 and 72 hours. For cytotoxicity, MTT test was performed on cells exposed to glyphosate for 24, 48 and 72 hours and their absorbance was measured. For apoptosis caspase 3 activity was examined. The IC₅₀ value was calculated for 24, 48 and 72 hours. Very little cell viability was observed at a concentration of 210 µM of glyphosate in only 24 hours. No cell viability was observed at 48 and 72 hours. However, an increase in cell viability was observed at other glyphosate concentrations for 24, 48 and 72 hours. In general, increased caspase 3 activity was accompanied by increased glyphosate concentration, when the results are evaluated on their own rather with respect to the controls. Proliferation was observed in cells when treated with proline alone. When glyphosate and proline were treated with together, dose-dependent changes in cell viability was observed. In proline and glyphosate treated groups, caspase 3 activity increased. It was determined that glyphosate showed toxic effect in high concentrations and proliferative effect in low concentrations in L929 cells. It is thought that proliferative effect at low concentrations may disrupt the apoptosis mechanism of the cell and cause cancer. Increased caspase 3 activity in glyphosate-treated groups with proline is thought to re-activate the impaired apoptosis mechanism.

January 2020, 50 pages

Key Words: Proline, Glyphosate Base Herbicide, L929, Toxicity, Roundup Star, Apoptose

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisansımı yaparken karşılaştığım sorunların çözümünde her zaman olumlu bakarak bana yardımcı olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyerek bana inanan danışman hocam Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü), her daim güler yüzüyle desteğini esirgemeyen ve tez çalışmamdaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Atila YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve tez çalışmama katkılarından dolayı Prof. Dr. Nuray YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü), bana laboratuvarını açarak hem tez çalışmamın deney kısmını yapmamı sağlamış hem de laboratuvarında çalışma izni vererek aynı zamanda pratik yapmama da vesile olmuş Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü), laboratuvar çalışmalarım sırasında bana pratik ve teknik bilgisini aktararak hem öğretmenlik yapan hem de deneylerime yardımcı olan Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'nin öğrencilerinden Özge TOPRAK'a, zor zamanımda bana yardımcı olarak laboratuvar çalışmalarımın destek veren Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'nin öğrencilerinden Serdar KORPAYEV'e ve laboratuvar çalışmalarımın yardımcı olan Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'nin öğrencilerinden Yaren AKDAĞ ile,

Hem yüksek lisansım boyunca hem de hayatımın her anında bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyerek her zaman yanımda olan canım aileme en çok da annem ve kız kardeşime çok teşekkür ederim.

Hasret Pınar TİPİOĞLU
Ankara, Ocak 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Glifosat.....	3
2.1.1 Glifosatın kimyasal yapısı ve genel özellikleri.....	3
2.1.2 Glifosatın etki mekanizması.....	4
2.1.3 Glifosat ve glifosat bazlı herbisitlerin toksik etkileri.....	6
2.2 Prolin.....	9
2.2.1 Prolinin kimyasal yapısı ve genel özellikleri.....	9
2.3 Apoptoz.....	12
2.3.1 Apoptoz tanımı.....	12
2.3.2 Apoptoz mekanizması.....	14
2.3.3 Apoptoz oluşumu.....	17
2.3.4 Apoptozla ilişkili proteinler.....	17
2.3.4.1 Bcl-2 ailesi.....	17
2.3.4.2 P53.....	18
2.3.4.3 Kaspazlar.....	18
2.3.5 Apoptoz tayin yöntemleri.....	19
2.3.5.1 Morfolojik görüntüleme yöntemleri.....	19
2.3.5.2 İmmünohistokimyasal yöntemler.....	19
2.3.5.3 Biyokimyasal yöntemler.....	19
2.3.5.4 İmmünolojik yöntemler.....	19
2.3.5.5 Moleküler biyoloji yöntemleri.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1 Materyal.....	21

3.1.1 Hücre hattı	21
3.1.2 Roundup star (glifosat bazlı herbisit).....	21
3.1.3 Prolin.....	21
3.2 Yöntem	22
3.2.1 Hücre kültürü hazırlanması	22
3.2.2 Hücre pasajlama işlemi.....	22
3.2.3 Hücre dondurulması.....	23
3.2.4 Hücre sayımı.....	23
3.2.5 Glifosat ve prolin çözeltilerinin hazırlanması.....	23
3.2.6 Hücrelere glifosat ve prolin uygulanması.....	24
3.2.6.1 Deney grupları.....	25
3.2.7 MTT analizi (sitotoksosite analizi).....	26
3.2.8 Kolorimetrik kaspaz-3 ölçümü.....	27
3.2.9 İstatistiksel analiz.....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1 Kontrol ve Glifosat Konsantrasyonları MTT Absorbansları.....	29
4.2 Glifosat Konsantrasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	32
4.3 Prolin Konsantrasyonlarının Glifosatla Birlikte Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	34
4.4 Kaspaz 3 Aktivitesi.....	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER DİZİNİ

BJAB	Burkitt's Lenfoma Hücre Hattı
°C	Santigrat Derece
CO ₂	Karbondioksit
D formu	Amino Asidin Yapay Formu
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HEK 293	İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı
HeLa	Servikal Kanser Hücre Hattı
Hep-2	HeLa Türevli Hücre Hattı
HEPG2	Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattı
Jurkat	İnsan T lenfosit Hücre Hattı
L formu	Amino Asidin Doğal Formu
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
Mg	Mili gram
µg	Mikro gram
µL	Mikro litre
µM	Mikro Molar
mL	Mili litre
mM	Mili Molar
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
N	Azot
p53	Tümör Protein 53
pH	Hidrojen İyonları Gücü
rpm	Dakikada Devir
T hücresi	T Lenfosit
3T3-L1	Fare Embriyo Fibroblastı

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
ALT	Alanine Aminotransferaz
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
Apaf-1	Apoptoz Proteaz Aktivasyon Faktörü-1
Apo-1	Apoptoz Antijen 1
Apo2L	Apo 2 Ligand
Apo3L	Apo 3 Ligand
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adonezin Trifosfat
Bad	Bcl-2 İlişkili Ölüm Organizatörü
Bak	Bcl-2 Homolog Antagonisti
Bax	Bcl-2 İlişkili Protein
Bcl-2	B-hücre Lenfoması 2 Proteini

Bcl-XL	Ekstra Büyük B-hücre Lenfoması 2 Proteini
BclXs	Bcl-2 Protein Ailesi Üyesi
Bid	BH3 Etkileşim Bölgesi Ölüm Agonisti
Bim	Apoptozo Destekleyen Bcl-2 Ailesi Üyesi
CAD	Kaspaz Bağımlı DNaz
CD95	Ölüm Reseptörü
DD	Ölüm Bölgesi
DDT	Dikloro difenil Trikloroethan (İnsektisit)
DIABLO	Düşük pI ile direkt IAP bağlayıcı protein
DISC	Ölüm Sinyal Kompleksi
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco'nin Fosfat Tampon Tuzu
DR3	Ölüm Reseptörü 3
DR4	Ölüm Reseptörü 4
DR5	Ölüm Reseptörü 5
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi
Endo-G	Endonülez-G
FADD	Fas İlişkili Ölüm Bölgesi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
Fas	Tip 2 Transmembran Protein / Reseptör
FasL	Fas Ligand
FasR	Fas Reseptör
FBS	Fetal Bovine Serum
G1	1/200.000 glifosat konsantrasyonu uygulanan grup
G2	1/100.000 glifosat konsantrasyonu uygulanan grup
G3	1/50.000 glifosat konsantrasyonu uygulanan grup
G4	1/25.000 glifosat konsantrasyonu uygulanan grup
G5	1/10.000 glifosat konsantrasyonu uygulanan grup
Granzim B	Serin Esteraz Enzimi
Htr/Omi	Mitokondriyal Serin Proteaz
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IC ₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
ICAD	Kaspazla Aktifleşen DNaz İnhibitörü
IL-2	İnterlökin-2
IPA	İzopropil Alkol
Kaspaz	Sistein Aspartat Spesifik Proteazlar
Mcl-1	İndüklenmiş Miyeloid Lösemi Hücre Farklılaşma Proteini
Mdm2	E3 Ubikitin-Protein Ligaz
MTT	Metiltiazol Difenil Tetrazolyum
NGF	Nöron Büyüme Faktörü
NK	Doğal Öldürücü (Naturel Killer)
Noxa	Bcl2 Protein Ailesine Ait Pro-Apoptotik Gen
P1	1 mM Prolin Konsantrasyonu Uygulanan Grup
P2	3 mM Prolin Konsantrasyonu Uygulanan Grup
P3	5 mM Prolin Konsantrasyonu Uygulanan Grup

PI	Propidium İyodür
pNA	p-nitroanilin
Puma	p53 Upregüle Apoptoz Modülatörü
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Smac	İkincil Mitokondriden Türetilmiş Kaspaz Aktivatörü
SPSS	İstatistik Programı
TCI	Tokyo Kimyasal Endüstri
TNFa	Tümör Nekroz Faktör
TNFR-1	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü 1
TRADD	TNFR-1 İlişkili Ölüm Bölgesi
TUNEL	<i>in situ</i> DNA Uç İşaretleme Yöntemi
UV	Ultra Viyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Glifosatın kimyasal formülü.....	4
Şekil 2.2 Glifosatın etki mekanizması.....	5
Şekil 2.3 L-Prolinin kimyasal formula.....	10
Şekil 2.4 Glutamattan Prolin sentezi.....	10
Şekil 2.5 Apoptoz ve Nekroz arasındaki farklar.....	13
Şekil. 2.6 Apoptotik süreç.....	14
Şekil 2.7 Apoptoz mekanizmaları.....	16
Şekil 4.1 Glifosat konsantrasyonları (G1, G2, G3, G4ve G5) ve Kontrol grubunun 24 saat, 48 saat ve 72 saat MTT absorbans değerlerinin karşılaştırması.....	31
Şekil 4.2 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca glifosat konsantrasyonları ve kontrol grubunun MTT absorbans değişimi.....	31
Şekil 4.3 Glifosat konsantrasyonu artışının 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca değişimi.....	32
Şekil 4.4 Glifosat konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, 24 saat.....	33
Şekil 4.5 Glifosat konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, 24 saat.....	33
Şekil 4.6 Glifosat konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, 24 saat.....	34
Şekil 4.7 1mM prolinin (P1) ve glifosatın hücre canlılığı grafiği.....	35
Şekil 4.8 3 mM prolinin (P2) ve glifosatın hücre canlılığı grafiği.....	36
Şekil 4.9 5mM prolinin (P3) ve glifosatın hücre canlılığı grafiği.....	37
Şekil 4.10 Glifosat gruplarındaki kaspaz 3 aktivitesi.....	39
Şekil 4.11 84 µM glifosat ve prolinin kaspaz 3 aktivitesi.....	40
Şekil 4.12 168 µM glifosat ve prolinin kaspaz 3 aktivitesi.....	41
Şekil 4.13 Uygulanan tüm gruplarda (84 µM, 168 µM glifosat ve prolin grupları) kaspaz 3 aktivitesi.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 24 saat boyunca L929 hücre hattına uygulanan glifosat konsantrasyonları ile kontrol hücrelerinin MTT absorbans değerleri ve standart sapma değerleri.....	29
Çizelge 4.2 48 saat boyunca L929 hücre hattına uygulanan glifosat konsantrasyonları ile kontrol hücrelerinin MTT absorbans değerleri ve standart sapma değerleri.....	30
Çizelge 4.3 72 saat boyunca L929 hücre hattına uygulanan glifosat konsantrasyonları ile kontrol hücrelerinin MTT absorbans değerleri ve standart sapma değerleri.....	30
Çizelge 4.4 Deneydeki tüm grupların standart sapmalarıyla birlikte MTT absorbans ortalama değerleri.....	38

1. GİRİŞ

Tüm dünyada tarımsal alanda herbisit kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Herbisitlerin iş gücünü azaltarak istenmeyen otlardan arazilerin temizlenmesini kolaylaştırmasının yanı sıra ekosisteme verdiği zararlar göz ardı edilmektedir. Birçok herbisit güvenilirliği ve zararsızlığı kanıtlanmadan kullanıma sunulmakta ve yıllarca kullanımı sürdürülmektedir. Örneğin DDT kendisini bulan kişiye Nobel ödülü kazandırmış bir pestisit olsa da zararının anlaşılıp kullanımının tamamen yasaklanması 20 yılı bulmuştur. Yasaklanana kadar ise insan ve diğer birçok canlı toksisitesine maruz kalmış, en iyi ihtimalle metabolizmalarında bozulmalar olmuş nihayetinde ise ölümlerle sonuçlanmıştır.

Günümüzde güvenilirliği büyük tartışmalara yol açan ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılan, bununla birlikte her yıl bir önceki yıla oranla kullanım miktarı hızlı bir artış gösteren bir herbisit de glifosattır. Herbisidal etkisi keşfedildiği 1970 yılından itibaren tüm dünyada Amerika'dan Avrupa'ya Asya'dan Avustralya'ya kadar yaygın ve artan miktarda kullanılmaktadır.

Glifosatın memeliler için güvenilir olduğu düşüncesi etki mekanizmasının memelilerde bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Bu etki mekanizması memelilerde bulunmamasına rağmen, arkeler, bakteriler, algler, mantarlar, prokaryotlar ve bitkilerde aromatik amino asit sentezini sağlayan şikimat yolağıdır. Sonuçta glifosat şikimat yolağına sahip canlıların ölümüne neden olmaktadır (Samsel ve Seneff 2013).

Yapılan in vivo ve in vitro birçok çalışmada glifosat ve glifosat bazlı herbisitlerin birçok akut ve kronik toksik etki gösterdiği bulunmuştur. Glifosatın bu toksik etkilerini tek hücreli organizmaların yanı sıra çok hücreli organizmalarda da (insanlar dahil) görülmüştür. İnsanlarda genotoksisite, sitotoksisite, nörotoksisite, endokrin bozucu etki, kromozomal hasar ve DNA hasarı gibi toksikolojik etkiler gözlenmiştir.

WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) tarafından yayınlanan raporda, bazı vaka kontrol çalışmalarında Hodgkin'in lenfomalarından sorumlu olduğunu kanıtlanmıştır (Gill vd. 2018).

Prolin halkasal yapıya sahip esansiyel olmayan bir amino asittir. Protein yapısına katılmasının yanı sıra hücresel metabolizmada önemli görevler üstlenmektedir. Prolinin tüm bitkilerde ve alglerde tuz, metal ve dehidratasyon stres koşulları altında; ROS (Reaktif Oksijen Türleri) oluşumunu etkin bir şekilde inhibe edici etkisi vardır (Gill ve Tuteja 2010). Osmotik basınca ve oksidatif strese karşı korumada, protein şaperonlaşmasında, hücre sinyalleşmesinde, apoptozda, besin adaptasyonunda ve hücre sağ kalımında da görev almaktadır (Szabados ve Savoure 2010, Wu vd. 2011, Natarajan vd. 2012, Rejeb vd. 2014).

Oksidatif strese karşı prolinin etkisinin araştırıldığı memeli hücre kültürleri üzerine yapılan bir çalışmada prolin seviyesi yüksek olan hücrelerin sağ kalım oranları kontrol hücrelerine göre daha yüksek bulunmuştur. Böylece prolinin sadece bitki hücrelerinde değil hayvan hücrelerinde de oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir (Krishnan vd. 2008).

Bu çalışmada; L929 hücre hattında glifosat bazlı herbisit kullanılarak oluşturulan sitotoksitenin değerlendirilmesi ve L929 hücre hattında oluşturulan sitotoksiteye karşı prolin uygulanarak, prolinin hücre canlılığı ve koruyucu etkisinin, MTT testi ve Kaspaz 3 kiti kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

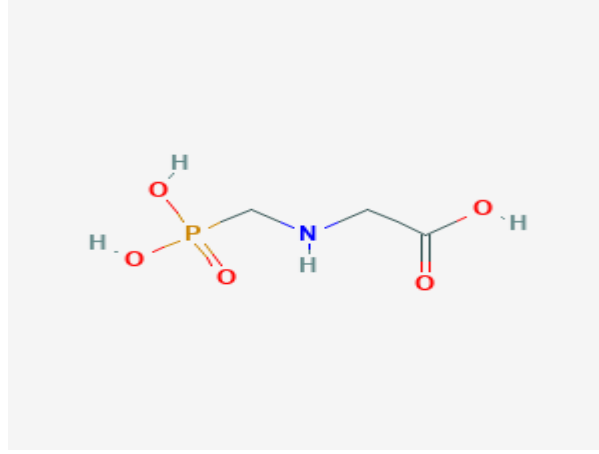
2.1 Glifosat

2.1.1 Glifosatın kimyasal yapısı ve genel özellikleri

Glifosat; N-fosfonometil glisin yapısında, geniş spektrumlu, seçici olmayan, sistemik bir herbisittir (Sarıaltın ve Çoban, 2016). 1950 yılında sentezlenmişse de herbisit olarak kullanımı 1970'lerde başlamıştır (Szekacs ve Darvas 2012). Bu tarihten itibaren ABD ve Avrupa başta olmak üzere tüm dünyada kullanımı, güvenli olduğu düşüncesiyle ve zamanla yabancı otların herbisite direnç kazanmasıyla giderek artmıştır. Glifosata dirençli genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretimi de glifosatının kullanımını artırmıştır. 1970'lerden günümüze glifosat kullanımı yaklaşık olarak 100 kat artmıştır (Myers vd. 2016).

Glifosat suda çözünen bir herbisittir, bu nedenle besin zincirine girdiği zaman su ve toprakda birikir. Yapılan çalışmalar glifosatın kalıntılarının su ve toprağın yanı sıra hava, birçok gıda (un, yulaf, ekmek, bal, bira, makarna) ve yaygın kullanılan çocuk bezi, tıbbi gazlı bez ile kadın pedlerinde de bulunduğunu göstermektedir (Torretta vd. 2018).

Ekosistemde kirliliğe neden olarak hem toprak hem de sucul ekosistemini olumsuz etkiler. Bakteriler, sucul yaşamdaki birçok tür (alg, balık, deniz kestanesi), bal arıları, kuşlar ve memeliler de dahil olmak üzere ekosistemde yaşayan birçok canlı üstünde glifosatın olumsuz etkileri gözlemlenmektedir (Gill vd. 2018).



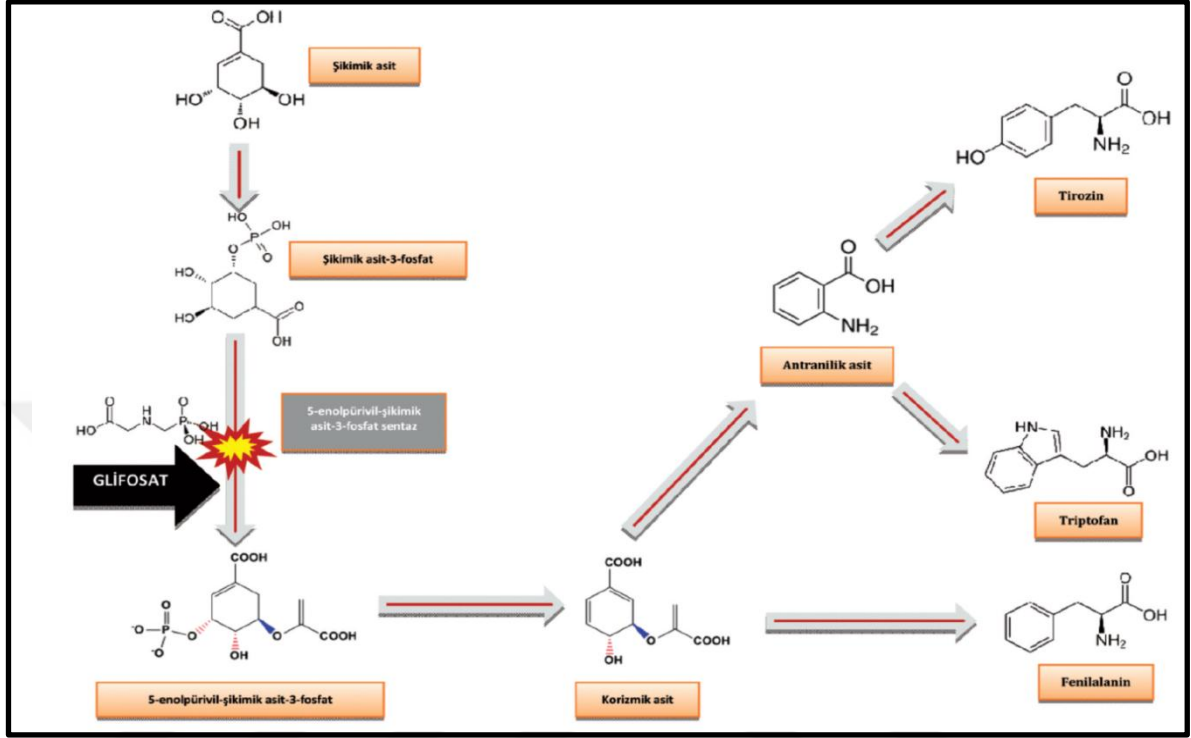
Şekil 2.1 Glifosatin kimyasal formülü (Anonim 2019)

Glifosat bazlı herbisitler aktif madde olan glifosatin yanı sıra birçok farklı kimyasal içermektedir. Bu kimyasallar surfaktan etki gösterip herbisit bitkiye penetrasyonunu artırmaktadır, böylece glifosatin herbisit etkisi de artmış olur. Bu yardımcı maddeler inert olarak kabul edildiğinden yapılan birçok toksisite çalışmasında hesaba katılmazlar. Glifosat bazlı herbisitlerin toksisitesi ve olumsuz etkisini değerlendirmek üzere yapılan çalışmalarda; literatüre baktığımızda çoğunlukla tek başına glifosat toksisitesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Buna rağmen glifosat bazlı herbisitlerde ise her zaman glifosatin yanında farklı maddelerde bulunduğu için, literatürdeki çalışmalar yetersiz ve eksiktir. Bununla birlikte insan hücreleri üzerine yapılan çalışmada glifosat bazlı herbisitlerin tek başına glifosattan çok daha toksik olduğu görülmüştür. Günümüzde ticari olarak birçok glifosat bazlı herbisit olmasına rağmen pazar payı en yüksek ve en yaygın kullanılanı Monsanto tarafından satılan Roundup isimli herbisittir (Mesnage vd. 2013).

2.1.2 Glifosatin etki mekanizması

Glifosat arkeler, bakteriler, algler, mantarlar, prokaryotlar ve bitkilerde bulunan şikimat yolağındaki 5-enolpürivil şikimik asit-3-fosfat sentazı inhibe etmektedir. Bu inhibisyon sonucunda fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik amino asitlerin sentezi azalmaktadır. Böylece glifosat maruziyeti; arkeler, bakteriler, algler, mantarlar, prokaryotlar ve bitkilerde ölümle sonuçlanmaktadır. Bu biyokimyasal yolak

omurgalılarda bulunmadığından genel olarak glifosatın insanlar dahil memeliler için güvenli olduğu varsayılmıştır (Samsel ve Seneff 2013, Sarıaltın ve Çoban 2016).



Şekil 2.2 Glifosatın etki mekanizması (Sarıaltın ve Çoban 2016)

Glifosatın bitkilerde inhibe ettiği şikimat yolağının insanlarda ve memelilerde bulunmaması; glifosatın insan ve memelilere zararı olmadığı anlamını taşımamaktadır. Günümüzde bağırsak mikrobiyotasının insan metabolizmasında önemli ve etkin bir rol oynadığı bulunmuş ve görülme sıklığı artmış olan eskiden nadir görülen birçok hastalıkla bozuk bağırsak mikrobiyotası ilişkilendirilmiştir.

Glifosatın bağırsak mikrobiyotasını bozarak birçok hastalığın oluşmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Çünkü bu yolak günümüzde önemi kavranmış olan bağırsak bakterilerinde bulunur. Bağırsak mikrobiyotası sindirimin yanı sıra, vitamin sentezinde, ksenobiyotik detoksifikasyonunda ve bağışıklık sistemi homeostazında etkin rol oynar. Glifosatın bağırsak mikrobiyotası üzerindeki olumsuz etkisinin günümüzde

giderek yaygınlaşan birçok hastalığın oluşmasında katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bunlara enflamatuar bağırsak hastalığı, obezite, otizm, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, depresyon, karaciğer hastalıkları, ALS (Amyotrofik lateral skleroz), multiple skleroz, kısırlık ve kanser dahildir.

Bunun yanı sıra D vitamini, sülfür ve çinko gibi metabolizmada kritik rol oynayan besinlerin yetersizliğine de neden olur. Toksik olmadığı düşüncesiyle kullanım miktarı gün geçtikçe artan ve yaygınlaşan glifosatın hastalık oluşumuna tek başına neden olduğu tam olarak söylenemese de çevresel birçok toksinle birlikte; bu hastalıkların artışında başrol oynadığı düşünülmektedir (Samsel ve Seneff, 2013).

2.1.3 Glifosat ve glifosat bazlı herbisitlerin toksik etkileri

Literatürde glifosat ve glifosat bazlı herbisitlerle ilgili (çoğunlukla Monsanto'nun Roundup isimli herbisiti) birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları deney hayvanlarında in vivo, bazıları çeşitli hücre kültürlerinde in vitro, bazıları ise insanda glifosat veya glifosat bazlı herbisit maruziyetini incelemektedir.

Glifosat ve glifosat bazlı herbisitlerin genotoksisiteye neden olduğu yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Glifosat bazlı herbisitle spreylenen Ekvador'un kuzeyindeki bireylerde kan hücrelerinde DNA hasarında (DNA iplik kopması) artış gözlenmiştir (Paz-y-Mino vd. 2007).

Glifosatın; Hep-2 hücrelerinde (Manas vd. 2009) ve lenfositlerde (Mladinic vd. 2009, Alvarez-Moya vd. 2014) DNA zinciri kırıklarına neden olduğu bulunmuştur. Hem in vitro insan lenfosit kültürü hem de in vivo fareler üzerinde yapılan çalışmada glifosat ve Roundup herbisitinin; kardeş kromatit değişimlerine neden olduğu gözlenmiştir (Bolognesi vd. 1997).

Bunun yanı sıra IARC (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı) (2015) raporunda memeli olmayan diğer birçok canlıda da (balık, kurbağa, salyangoz gibi) glifosat bazlı herbisitlerin DNA zinciri kırıklarına neden olduğu çalışma belirtilmiştir.

Toksik maddelerin detoksifikasyonu ve birikimi karaciğer tarafından sağlandığından; glifosat ve glifosat bazlı herbisitlerin karaciğer metabolizması üzerine etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Sıçanlarda yetmiş beş gün boyunca oral glifosat maruziyeti alanine aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) enzimlerinde artışa, Kupffer hücrelerinde çoğalmaya, hepatositlerde geri dönüşümsüz hasarlara ve karaciğerde fibrozise neden olmuştur (Benedetti vd. 2004).

Sıçanlarda 13 hafta boyunca Roundup herbisitine maruziyetin, histopatolojik bulgularda karaciğer hasarına neden olabileceği bildirilmiştir (Çağlar ve Kolankaya 2008). Farelerde glifosat maruziyetinin incelendiği başka bir çalışmada da AST, ALT, kreatinin ve üre miktarında artma, karaciğer ve böbrekte indüklenen oksidatif hasar sonucunda ise malondialdehit miktarında artma, glutasyon miktarında ise azalma gözlenmiştir (Çavuşoğlu vd. 2011).

Glifosatın; daha önce yapılan bazı çalışmalarda kanserojen olmadığı belirtilmişse de WHO ve FAO tarafından yayınlanan son bir raporda, bazı vaka kontrol çalışmalarında Hodgkin'in lenfomalarından sorumlu olduğu kanıtlanmıştır (Gill vd. 2018).

Genel organofosfat sınıfının bir üyesi olan glifosatın nörotoksositeye işaret eden spesifik bir kimyasal grubunun bulunmaması (glifosatın fosfor atomunda sülfür veya tiyosiyanat grubu gibi) nedeniyle nörotoksik etkiye neden olmadığı varsayılmaktadır. Organofosfatlı pestisitlerin ise nöromusküler kavşakta asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe ettikleri bilinmektedir.

Memeli olmayan türlerdeki çalışmalar, asetilkolinesterazın glifosat tarafından inhibe edildiğini göstermiştir. *Cyprinus carpio* (Cattaneo vd. 2011), *Prochilodus lineatus* (Modesto ve Martinez 2010), amfibik kurbağalar (Lajmanovich vd. 2011), *Leporinus*

obtusidens (Gluszczak vd. 2006) ve gümüş yayın balığı (Gluszczak vd. 2007) türlerinde glifosat bazlı herbisit maruziyetinin asetilkolin esterazı inhibe ettiği görülmüştür.

Glisin ve glutamat gibi diğer aminoasitler nörotransmitter olarak işlev görmekte ve beyin fonksiyonları üzerinde önemli rol oynamaktadır. N-fosfonometil glisin yapısındaki glifosatın, glisin tüketimine neden olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir (Li vd. 2013). Hücre içi glisinin temel kaynağı olan serin hidroksimetiltransferaz enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Ayrıca yapı olarak glutamat reseptör agonist 2-amino-3- fosfonopropiyonik aside yapısal benzerliği nedeniyle glifosatın nörotransmitter benzeri etki ettiği düşünülmektedir (Mesnage vd. 2015).

Garry vd. (2002), glifosat uygulaması yapan çiftçilerin çocuklarına yönelik yaptıkları çalışmada, çocuklarda dikkat eksikliğinde ve hiperaktivitede artış olduğu bildirilmiştir.

Glifosat bazlı herbisit maruziyeti ile annelerde ise nöral tüp defektleri görülmüştür (Rull vd. 2006).

Glifosata oral maruziyet sonucu wistar sıçanların beyin bölgelerinde serotonin, dopamin, norepinefrin ve bu nörotransmitterlerin metabolitlerinin de seviyelerinde doza bağımlı olarak anlamlı istatistiksel değişiklikler gözlenmiştir (Martinez vd. 2018).

Wistar sıçanlar üzerine yapılan başka bir araştırmada hamilelik ve emzirme dönemi boyunca içme suları ile glifosat bazlı herbisite maruz kalan sıçanların yavrularında nörotransmitter değişimleriyle merkezi sinir sisteminin etkilendiği gözlenmiştir (Gallegos vd. 2016).

İn vitro indüklenmiş pluripotent kök hücreler üzerine akut glifosat maruziyetinin kan beyin bariyeri üzerine yapılan bir araştırmada, 24 saat glifosat maruziyetinin kan beyin

bariyerinin fonksiyonunu bozmasının yanı sıra kan beyin bariyerinden geçerek bariyerin geçirgenliğinde de artış gözlenmiştir (Martinez ve Al-Ahmad 2019).

Glifosat maruziyetinin nöronal gelişimde bozukluklara neden olduğunu açıklayan bir çalışmada kültüre alınmış nöronların farklılaşmadan kaldıklarını, bazılarının polarize olmalarına rağmen kısa ve dalsız aksonlar oluşturduklarını ve kontrole kıyasla daha az kompleks dendritik yapılar oluşturdukları görülmüştür (Coullery vd. 2016).

2.2 Prolin

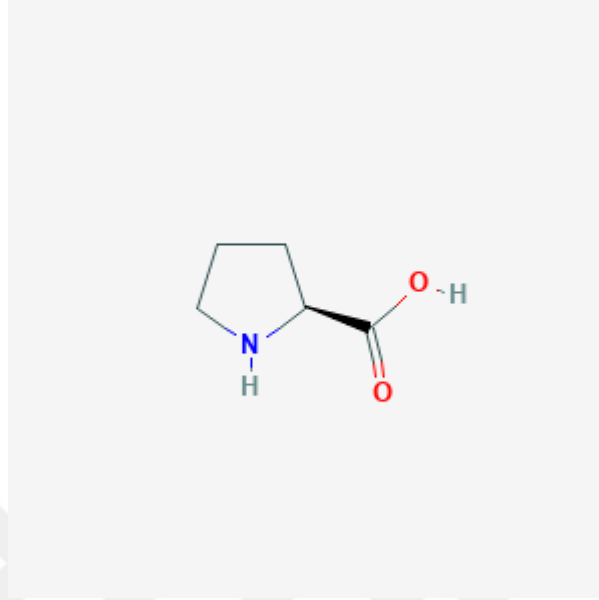
2.2.1 Prolinin kimyasal yapısı ve genel özellikleri

Prolin; protein yapısına katılan 20 adet amino asitten biridir. Glutamat üstünden sentezlenebildiği için (glukojenik amino asit) esansiyel olmayan amino asitlerdendir. Doğadaki bütün aminoasitler birincil amin grubu bulundurur. Fakat prolinin yan zincirindeki üç karbon atomu bir halka oluşturarak peptid bağındaki azot atomuna bağlanır böylece diğer amino asitler gibi birincil amin grubu bulundurmaz. Prolinde bulunan azot ikincil amin grubudur. Bu yüzden prolin aslında bir imino asittir.

Prolin hidroksiprolin ve hidroksilislin aminoasitlerinin yapımında kullanılır. Kollajen cilt, tendon, kemik, kıkırdak ve bağ dokuda bulunan bir proteindir. Tüm amino asitlerde olduğu gibi prolinin de iki formu bulunmaktadır. Bu formlar L ve D formlarıdır. L formu canlı organizmalarca üretilip kullanılan formdur. Bitkisel ve hayvansal proteinlerin yapısında amino asitlerin L formu bulunur. D formu ise bakteri hücre duvarında bulunur.

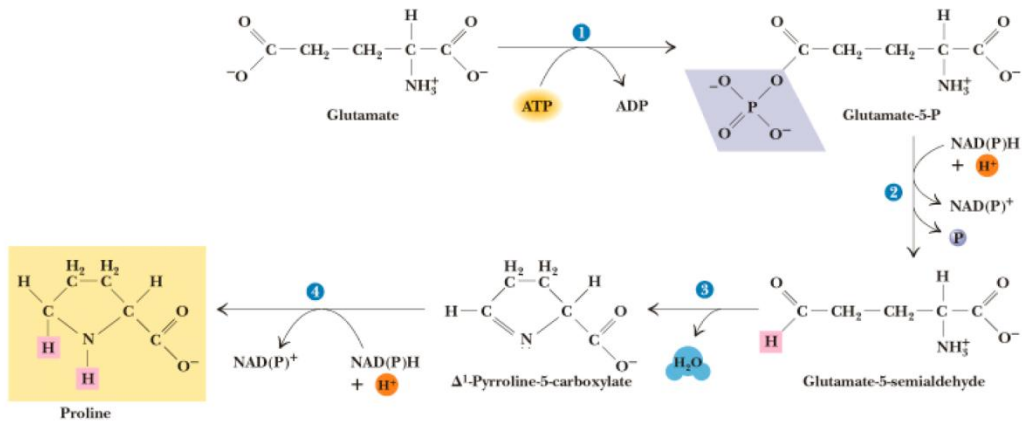
Prolin metabolizmada amino asitlerin yapısına katılmanın yanı sıra farklı görevler de üstlenmiştir. Bu güne dek yapılan çalışmalarda özellikle yüksek bitkilerde birçok farklı stres koşullarında prolin birikimi dikkat çekmektedir. Kuraklıkta, yüksek tuz konsantrasyonunda, ağır metal varlığında, aşırı ışık ve UV radyasyonu altında oluşan

biyotik strese karşı koymak üzere oluşturulan metabolik cevapta prolin birikimi olduğu gözlenmektedir (Szabados ve Savoure 2010).



Şekil 2.3 L-Prolinin kimyasal formülü (Anonim 2019)

Prolinin ozmoza karşı koruyucu etkisi ilk defa bakterilerde keşfedilmiş olup, bakterilerdeki tuz toleransına karşı prolin birikimi arasındaki ilişkinin fark edilmesiyle açıklanmıştır (Csonka ve Hanson 1991).



Şekil 2.4 Glutamattan Prolin sentezi (Elçin 2019)

Prolin miktarı kuraklığa dirençli pirinç cinslerinde yüksekken, bazı bitkilerde stres koşulları altındayken düşüktür. Fakat transgenik bitkiler veya mutantlar kullanılarak yapılan birçok kapsamlı çalışma, bazı olumsuz çevresel koşullara karşı tolerans sağlayabilmek için prolin birikiminin önemli olduğunu göstermektedir (Hong vd. 2000, Szekely vd. 2008).

90'lı yıllardan bu yana; prolinin ozmotik stres altındaki hücrelerde hücre içi yapıları ve makromolekülleri koruyan inert bir osmolit olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Csonka ve Hanson 1991, Hare ve Cress 1997). Prolinin protein agregasyonunun önlenmesi, ağır metal maruziyeti, ozmotik stres altında nitrat redüktazın korunması, arsenat maruziyetinde ribonükleaz ve proteazların stabilizasyonu sağladığı bildirilmiştir. Böylece prolin moleküler şaperon olarak iş görmektedir; protein bütünlüğünün korunmasında ve enzim stabilizasyonunda görev almaktadır (Szabados ve Savoure 2010).

Birçok çalışmada, prolinin antioksidan özellikte olup ROS miktarını azalttığı gösterilmiştir (Matysik vd. 2002). Chen ve Dickman (2005) tarafından yapılan çalışmada prolinin ROS miktarını azaltarak ROS'a bağlı apoptozu önleyebileceği gösterilmiştir.

Prolinle ilgili çalışmalar çoğunlukla bitki ve bakteriler üzerine yapılmış olmakla birlikte memeli hücreleri üzerine de çalışmalar bulunmaktadır. Prolinin memeli hücre hatlarında ROS miktarı ve apoptoz ilişkisi üzerine yapılan çalışmada; hücre içi prolin seviyeleri farkı prolin metabolik enzimlerinin ekspresyonuyla karşılaştırılmıştır. Çalışmada HEK 293 hücreleri (insan embriyonik böbrek hücre hattı), HeLa hücreleri (servikal kanser hücre hattı), HepG2 hücreleri (hepatoselüler karsinoma hücre hattı), Jurkat hücreleri (insan T lenfosit hücre hattı) ve BJAB hücreleri (Burkitt's lenfoma hücre hattı) kullanılmış; oksidatif stres için H₂O₂ (Hidrojen peroksit) uygulanmıştır. Buna göre prolin biyosentez enzimlerinin aşırı ekspresyonuyla prolin miktarı 2 katına çıkmış ve ROS miktarı önemli derecede azalmıştır. Böylece kontrol hücrelerine nazaran prolin miktarı 2 katına çıkmış hücrelerde hayatta kalım oranında artma görülmüştür. Prolin oksitleyen mitokondriyal bir enzim olan prolin dehidrogenazın aşırı ekspresyonu ise

hücre içi prolin miktarı 6 kat düşüşe sebep olmuştur. Bu da kontrol hücrelerine nazaran prolin miktarı 6 kat düşmüş olan hücrelerde hayatta kalım oranında ise azalma görülmüştür. Bu çalışma ile memeli hücrelerinde prolinin ROS miktarı üzerine antioksidan etki göstererek oksidatif strese karşı koruduğunu ve ROS'a bağlı apoptozu engelleyerek hücre hayatta kalım oranında olumlu yönde bir artış sağladığı bulunmuştur (Krishnan vd. 2008).

2.3 Apoptoz

2.3.1 Apoptoz tanımı

Homeostaz tüm organizmalarda canlılığın devamlılığının sağlanması için elzemdir. Homeostazın sağlanması içinse hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin sağlanması gerekmektedir. Bu dengenin bozulması sonucu ise kanser, otoimmün ve dejeneratif hastalıklar görülmektedir. Apoptoz bu yüzden organizmada çok önemli olan homeostazın sağlanmasında görev almaktadır.

Apoptoz, eski Yunanca olan apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşmuştur. Yaprak dökümü anlamına gelmektedir. Apoptozis terimi Kerr, Wyllie ve Currie tarafından ilk defa 1972'de bir makalede kullanılmıştır (Kerr vd.1972).

Apoptozis embriyonun gelişimi, homeostaz, yenilenme, tamir olayları ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarında kritik öneme sahiptir. Devamlı yapım yıkım geçiren deri hücreleri, sindirim sistemi hücreleri (bağırsak ve mide) ve kan hücrelerinde hücre ölümü apoptoz ile sağlanmaktadır. Bunun yanı sıra apoptoz bağışıklık sisteminde de görev alır. Virüsle enfekte hücrelerin ve toksik ajanlarca hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılması da apoptoz ile olur (Balkan 2012).

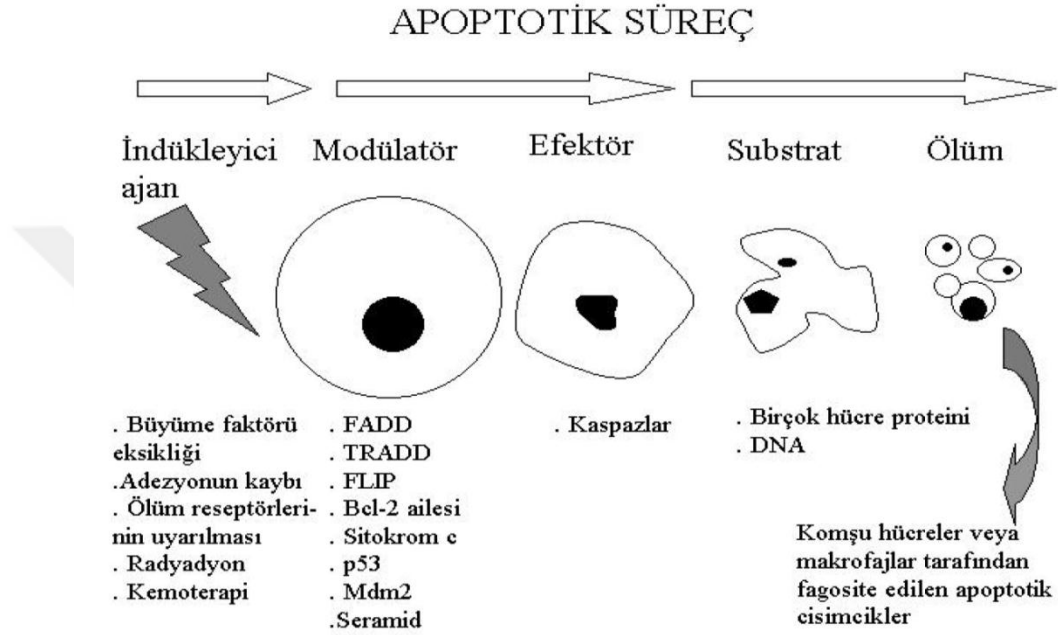
Hücre ölümü ise apoptoz ve nekroz olarak iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Hem apoptoz hem de nekrozda hücrede kendine has belirli biyokimyasal ve morfolojik değişimler olmaktadır (Öniz 2004, Akşit ve Bildik 2008).

Özellik	Apoptoz	Nekroz
<u>Patolojik</u>		
Ölüm şekli	Dokuda dağınık olarak tek tek hücrelerde	Komşu hücre gruplarında
Hücre büyüklüğü	Azalıp (büzülme) Fragmanlara ayrılma	Artar (şişme)
Hücre zarı	Devamlılık korunur Tomurcuklanma Zar yüzeyinde fosfolipidlerin Erken parçalanma	Düzleşme
Mitokondri	Zar geçirgenliğinde artma Sitoplazma içine sitokrom-c, Apaf-1 salınımı Yapı göreceli olarak korunur	Şişme Yapıda bozulma
Organel şekli	Kontrakte Apoptotik cisimler	Şişme Bozulma
DNA parçalanması	Fragmente, İnternükleozomal bölünme, Serbest 3' sonları, Elektroforezde merdiven görünümü Sitoplazmada DNA görülmesi	Yaygın ve rasgele
Hücre temizlenmesi	Fagositoz İnflamasyon yok	İnflamasyon Makrofaj invazyonu
<u>Mekanizmalar</u>		
Genel uyarı	Gelişimsel programlar Endojen sinyaller Hücrelerarası sinyaller Hastalık süreçleri	Hastalık süreçleri
Spesifik uyarı	Büyüme faktörü eksikliği (NGF,IL-2) Ölüm aktivatörleri Yüzey reseptörlerine bağlanma Sitokinler Lenfokinler Toksik hormonlar, radyasyon, orta derecede iskemi, oksidanlar, artmış DNA hasarı	Toksik Ağır iskemi Radyasyon
Hücresel süreçler	Programlı reaksiyonlar dizisi kaspaz aktivasyonu, internükleozomal endonükleazlar, transglutaminaz aktivasyonu Gerekenler yeni RNA transkripsiyonu, protein sentezi, ATP	Protein sentezi yok RNA transkripsiyonu yok Enerjiden bağımsız ATP azalması

Şekil 2.5 Apoptoz ve Nekroz arasındaki farklar (Öniz 2004)

Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyarı ve koşullar vardır. Bu uyarı ve koşullara cevap apoptozda nekrozun tersine tüm hücrelerin ölümü ile değil tek tek hücrelerin ölümü ile gerçekleşmektedir. Apoptozu tetikleyebilen fizyolojik ve patolojik çok çeşitli uyarı ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücrelerin

aynı uyarana yanıt olarak mutlaka ölmesi gerekmez. Örneğin ışınlama veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde p53 bağımlı bir yoldan apoptotik hücre ölümüne yol açan DNA hasarına sebep olur. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, timositlerde apoptoza neden olurken başka hücreleri etkilemez (Elmore 2007).



Şekil 2.6 Apoptotik süreç (Ulukaya 2003)

2.3.2 Apoptoz mekanizması

Apoptoz mekanizması ATP bağımlı karmaşık moleküler kaskadlar dizinidir. Yapılan araştırmalar iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir. Her iki yolda da kaspazlar görev almaktadır:

- Ölüm Reseptörleri Aracılı Yolak (Ekstrinsik Yolak)
- Mitokondri Aracılı Yolak (İntrinsik Yolak)
- Ölüm Reseptörleri Aracılı Yolak (Ekstrinsik Yolak): Ölüm sinyalleri hücre dışından gelir. Bu ölüm sinyalleri büyüme faktörü yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu,

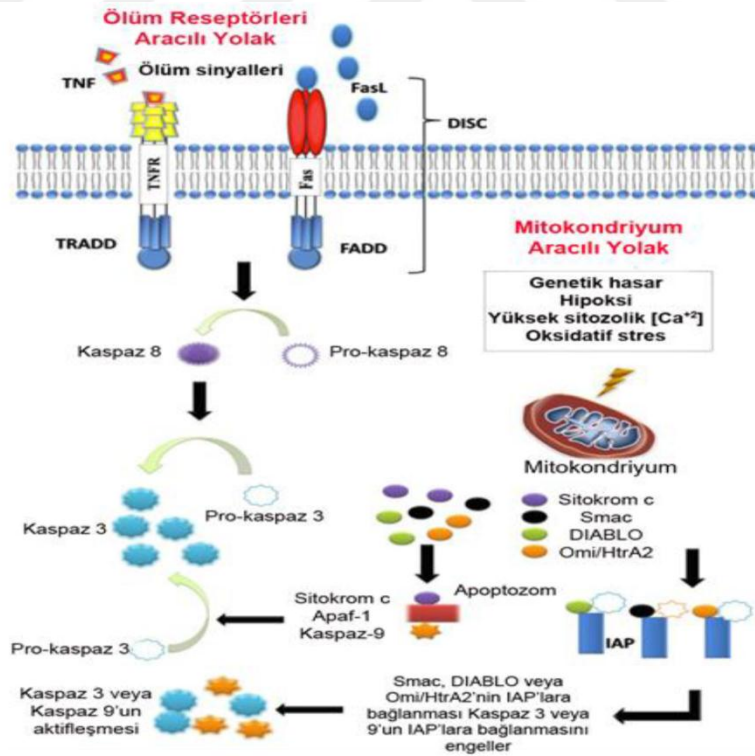
toksinler, radyasyon, UV ve sitotoksik T hücresidir. Hücre membranında bulunan hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen FasR (CD95/Apo-1), TNFR-1 (tümör nekroz faktör reseptörü), ve DR5 (ölüm reseptörü) 'e ölüm sinyallerinin (ligandlarının) bağlanmasıyla apoptoz indüklenir. Bu reseptörler TNF reseptörü familyasının üyeleri olup, benzer sistein zengini ekstraselüler bir bölgeye ve ölüm bölgesi (death domain-DD) olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik sitoplazmik bir bölgeye sahiptirler. Bu ölüm bölgesi, ölüm sinyalini hücre membranından hücre içi sinyal yolağına aktarmada kritik bir rol oynar. Fas sinyalinin (ligandının) Fas reseptörüne bağlanması ile FADD (Fas associated death domain-Fas ilişkili ölüm bölgesi) adaptör proteini ve TNF sinyalinin TNF reseptörüne bağlanması ise TRADD (TNFR-1 associated death domain- TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi) adaptör proteini etkileşir ve DISC (death inducing signaling complex-ölüm sinyal kompleksi) oluşur. İnaktif olan prokaspaz-8 DISC'e bağlanarak aktif kaspaz-8'e dönüşür. Apoptozun uygulama fazı kaspaz-8'in aktivasyonu ile başlar. Aktif kaspaz-8 direk ve indirek olmak üzere prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3'e dönüştürür. Ya direk kaspaz-8 prokaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek indirek instrinsik yolakda prokaspaz-9'u aktive ettikten sonra prokaspaz-3'ü aktive eder. Böylece hücrede proteinler ve DNA parçalanır. Bazen ölüm reseptörleri aracılı yolak ile mitokondri aracılı yolak birlikte çalışabilir. DISC kaspaz-8'i aktive edemediğinde mitokondri aracılı yolağın tetiklenmesi sağlanır (Wu vd. 2001, Elmore 2007, Coşkun ve Özgür 2011, Kayacan 2015).

Ulukaya (2003) "bugüne kadar, en iyi karakterize edilmiş ölüm sinyalleri ve karşılık gelen ölüm reseptörleri, FasL / FasR, TNFa / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5'dir" şeklinde ifade etmektedir. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. FasL sitotoksik T hücrelerinde ve "natural killer" hücrelerinde bulunur (Ulukaya 2003, Elmore 2007).

Ayrıca enfekte hücreler ve tümör hücrelerinin öldürülmesi için kullanılan apoptotik yolağı Granzim-Perforin yolağı denilmektedir. Granzim B ve Perforinler; sitotoksik T hücrelerinin ve NK (Natural Killer) hücrelerinin salgı granüllerinde bulunan serin proteazlardır. Enfekte hücreye sitotoksik T hücresi bağlandığında perforinler salınarak

hücre yüzeyinde por oluştururlar. Böylece hücre içi kalsiyum miktarı artar. Granzim B ise serbest kalır. Kaspaz aktivasyonu ile apoptoz uygulama fazı başlar.

Mitokondri Aracılı Yolak (İntrinsik Yolak): Ölüm sinyalleri hücre içinden gelir. Bu ölüm sinyalleri DNA hasarı, hücrede kalsiyum birikimi, pH düşüşü, oksidatif stres ve hipoksidir. Bu sinyallerle proapoptotik protein olan Bid; Bcl-2 proteinini inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Böylece mitokondri membranında por oluşumu indüklenir. Mitokondriden sitoplazmaya; sitokrom-c, AIF (apoptoz indükleyici faktör), Endo-G (Endonükleaz-G), Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase)/DIABLO, Htr/Omi gibi pro-apoptotik proteinler salınır. Sitokrom-c, sitoplazmada adaptör protein Apaf-1 ile birlikte multimerik kaspaz aktifleştirici apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom prokaspaz-9'u aktifleştirir, kaspaz-9'da prokaspaz-3'ü aktifleştirir. AIF çekirdeğe taşınır ve Endo-G de DNA'yı parçalar. Böylece hücrede proteinler ve DNA parçalanır (Wu vd. 2001, Elmore 2007, Coşkun ve Özgür 2011, Kayacan 2015).



Şekil 2.7 Apoptoz mekanizmaları (Kayacan 2015)

2.3.3 Apoptoz oluşumu

Apoptoz hücrenin çeşitli metabolik ve fizyolojik işlemleri başlatıp sürdürdüğü; sonuçta hücreyi programlı ölüme götüren bir mekanizmadır. Apoptoz sinyali alan hücre komşu hücrelerle olan bağlantısını keser ve kondanase olur. Kromatini yoğunlaşarak piknotik bir hal alır. DNA'sı nükleozomlarından kesilir ve jel elektroforezinde tipik merdiven bant görünümü alır. Buna rağmen organellerin yapısal bütünlükleri korunur. Hücre zarında bulunan fosfatidil serin membranın sitoplazmaya bakan iç yüzünde bulunur. Apoptotik hücrelerde ise membranın iç yüzünden dış yüzüne geçiş yapar. Çekirdek küçülerek, parçalara ayrılır. Hücre membran bütünlüğü korunarak tomurcuklanır ve apoptotik cisimcikler oluşur. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından fagositoza uğrar, bu esnada hücre içi sıvısı ekstraselüler matrikse boşalmaz ve enflamasyon görülmez (Coşkun ve Özgür 2011, Ulukaya 2003).

2.3.4 Apoptozla ilişkili proteinler

2.3.4.1 Bcl-2 ailesi

Hücrede proapoptotik proteinler apoptozu artırır, antiapoptotik proteinler ise apoptoz inhibe eder. Proapoptotik proteinler Bax, Bad, Bak, Bid, BclXs, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler sitoplazmada bulunurlar. Sitokrom-c ve AIF salınımını artırarak apoptozu indüklerler.

Antiapoptotik proteinler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bu proteinler de çekirdek membranında, endoplazmik retikulumda ve mitokondrinin dış membranında bulunur.

Por oluşumunu indükleyip iyon akışını düzenlerler. Özellikle hücredeki kalsiyum miktarını kontrol ederler. Ayrıca prokaspazlarla AIF ve sitokrom-c salınımını durdurarak apoptozu inhibe ederler (Elmore 2007, Wu vd. 2001).

2.3.4.2 P53

Bir transkripsiyon faktörü olan P53 proteini; DNA hasarında tamir için hücre döngüsünü G1 fazında durdurur. DNA hasarı tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas'ı artırıp antiapoptotik olan Bcl-2'yi baskılar ve apoptozu başlatır (Wang 2005, Coşkun ve Özgür 2011).

2.3.4.3 Kaspazlar

Kaspazlar, proteinlerin aspartik asitten sonraki peptid bağına kıran sistein proteazlardır. Sitoplazmada inaktiftirler ve çeşitli uyanlarla aktifleşirler. Kaspaz kaskatı oluşturarak apoptozu sebep olurlar. Hücrede hem sitoplazmik hem de çekirdek proteinlerini parçalarlar. Memelilerde 14 farklı kaspaz bulunmaktadır. Apoptozdan sorumlu kaspazlar:

- Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10)
- Efektör kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7)
- Enflamatuar kaspazlar (kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-11, kaspaz-12, kaspaz-13, kaspaz-14)

Ölüm sinyalleri başlatıcı kaspazları aktifleştirir, başlatıcı kaspazlar da efektör kaspazları aktifleştirir. Hücrel yıkımdan sorumlu olanlar efektör kaspazlardır ve başlatıcı kaspazlar tarafından aktifleştirilir. Aktif kaspaz-3 birçok hücrel proteinin yıkımı ile apoptozun tamamlanmasında önemli rol oynar. Kaspaz-3, ICAD'i (kaspazla aktifleşen DNaz inhibitörü) serbestleştirir ve CAD (kaspaz bağımlı DNaz), kromatini internukleozom bölgelerinden kırarak çekirdekte apoptotik parçalanmayı sağlar. Apoptoz tayininde DNA'nın nukleozomal parçalar şeklinde ayrılması ile jel elektroforezinde DNA ladder (DNA merdiveni) oluşur. Kaspaz-6 ise çekirdeğin apoptotik parçalanmasını; çekirdek laminlerini yıkarak ve kromatini kondense ederek gerçekleştirir (Budihardjo vd. 1999, Fan vd. 2005, Wang 2005).

2.3.5 Apoptoz tayin yöntemleri

Aşağıdaki tayin yöntemleri Ulukaya (2003)'nin "Apoptozis ders notları"ndan alınmıştır.

2.3.5.1 Morfolojik görüntüleme yöntemleri

-Işık mikroskobu kullanımı

a. Hematoksilen boyama

b. Giemsa boyama

-Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı

a. Propidium İyodür (PI)

b. Hoechst Dye

-Elektron mikroskobu

-Faz kontrast mikroskobu

2.3.5.2 İmmünohistokimyasal yöntemler

-Anneksin V Yöntemi

-TUNEL Yöntemi

-M30 Yöntemi

-Kaspaz-3 Yöntemi

2.3.5.3 Biyokimyasal yöntemler

-Agaroz Jel Elektroforezi

-Western Blotting

-Flow Sitometri

2.3.5.4 İmmünolojik yöntemler

-ELISA

-Flourimetrik Yöntem

2.3.5.5 Moleküler biyoloji yöntemleri

-DNA Microarrays



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hücre hattı

Çalışmada kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşe Karakeçili'den temin edilmiştir.

3.1.2 Roundup star (glifosat bazlı herbisit)

Glifosat bazlı herbisit olarak Monsanto firmasının ürettiği Türkiye'de yaygın kullanılan Roundup Star isimli glifosat bazlı herbisit kullanılmıştır. Roundup Star'ın kimyasal formülünde aktif madde olarak glifosatın potasyum tuzu herbisit formülasyonunun toplam ağırlığının yaklaşık % 35,5'idir. Aktif maddenin yanı sıra adjuvan olarak kullanılan eter amin etoksilat formülasyonunun toplam ağırlığının yaklaşık % 6 'sıdır.

Roundup Star'da 441g/ L glifosat bulunmaktadır.

Glifosatın potasyum tuzu $M_A = 207,163\text{g/mol}$

$M_{\text{glifosat}} = 441\text{g}/207,163 \text{ g/mol}/1 \text{ L} = 2,1 \text{ M} = 2100 \text{ mM}$ (Roundup Star'da glifosatın molar konsantrasyonu)

Çalışmada kullanılan Roundup zirai ilaçlar satışı yapan bir işletmeden satın alınmıştır.

3.1.3 Prolin

Çalışmada kullanılan prolin; TCI (Tokyo Kimyasal Endüstri) üretimi %99 saflıktaki insan rekombinant L-prolin'i kullanılmıştır. Bitkisel ve hayvansal hücrelerin üretilip

metabolizmalarında kullandıkları amino asit formu L formu olduğu için prolin'in L formu kullanılmıştır.

Prolin $M_A = 115,13\text{g/mol}$

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre kültürü hazırlanması

Hücre kültüründe besi yeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içine % 10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 penisilin-streptomisin eklenmiştir. Hazırlanan stok besi yeri +4 °C'de saklanmıştır.

-80 °C'de saklanan L929 fare fibroblast hücre hattı çözündürülüp 75 cm² 'lik steril flasklara ekilmiştir. 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde iki gün inkübe edilmiştir. İnkübe edilen flasklar hem hücre hattı morfolojisi hem de confluent duruma karar vermek için inverted mikroskopta incelenmiştir.

3.2.2 Hücre pasajlama işlemi

Confluent (yaklaşık %80'lik yoğunluk) durumdaki hücre kültürüne pasajlama işlemi uygulanmıştır. Flaskta bulunan ve flask yüzeyine yapışık hücrelerin kaldırılması için tripsinasyon yapılmıştır. Öncelikle flastaki besi yeri uzaklaştırılmıştır. Flastın yüzeyini kaplayacak kadar DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra flastın yüzeyi kaplanacak kadar Tripsin-EDTA eklenmiştir (yaklaşık 5 mL). 5 dakika inkübe edilmiştir. Böylece hücreler flask yüzeyinden kaldırılmış olur. İnkübatörden alınan hücrelerin mikroskopik incelemesi yapılmıştır. Flaska yüzeyi yıkanarak besi yeri eklenmiştir. Böylece Tripsin-EDTA etkisi giderilmiş olur. Flast içeriği santrifüj tüplerine aktarılmış 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüpünde üstte kalan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüpte altta kalan hücreleri içeren kısma seyreltme yapılmış ve hücre sayımı yapılmıştır. Deney için 96 well plate

kullanılmıştır. Pasajlama işlemi için yaklaşık her well (kuyucuk)'e 5×10^4 kadar hücre ekimi yapılmıştır. Pasajlamadan sonra 96'lık well plate'ler 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki MTT analizi için 3 tane 96'lık well plate ekimi yapılmıştır.

3.2.3 Hücre dondurulması

Santrifüj tüpünde altta kalan hücrelerin bir kısmı pasajlanırken bir kısmı da başka çalışmalar için veya deneyi tekrarlayabilmek için dondurulmuştur. Dondurma işlemi için %80 serumsuz besi yerine %10 DMSO (dimetil sülfoksit) ve %10 FBS (Fetal Bovine Serum) eklenerek hazırlanan dondurma çözeltisi kullanılmıştır. Pasajlama işlemi için santrifüj edilen tüplerden altta kalan hücre kısımları kriyo tüplere aktarılmış ve hazırlanan dondurma çözeltisi eklenmiştir. Dondurma sırasında hücelere zararı azaltmak için öncelikle $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika tutulmuş daha sonra ise $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki derin dondurucuya aktarılmıştır. Böylece hücre hatları uzun süre genetik özelliği bozulmadan saklanabilmekte ve kullanımı sağlanmaktadır.

3.2.4 Hücre sayımı

Santrifüj edilen tüplerdeki hücelere seyreltme yapılmıştır. Bu hücre süspansiyonundan Neubauer Hemositemetri Lamı'nda $100\text{ }\mu\text{L}$ alınmıştır. Hemositometri lamında dört karedeki hücreler sayılıp toplamın ortalaması alınmıştır. Elde edilen sayı seyreltme faktörü ve 10^4 ile çarpılıp 1 ml 'deki hücre sayısı (hücre/ml) bulunmuştur.

3.2.5 Glifosat ve prolin çözeltilerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan Roundup Star (glifosat bazlı herbisit) ve prolinin belirlenen konsantrasyonları; 96 well plate'e ekimi yapılmış ve 24 saat inkübe edilmiş olan hücrelerin üzerine uygulanmıştır.

Öncelikle Roundup Star ve prolin'in stok çözeltisi hazırlanmış ve daha sonra seyreltmeler yapılarak uygulanacak konsantrasyonlar elde edilmiştir.

Roundup Star için 1/500'lük konsantrasyonda (4.2 mM glifosat) stok çözeltisi hazırlanmıştır. 30 µL Roundup Star'dan alınarak toplam hacim 15 mL olacak şekilde serumsuz DMEM eklenmiştir. Roundup Star asidik pH'a sahip olduğu için pH metre ile

NaOH (sodyum hidroksit) eklenerek fizyolojik pH aralığına getirilmiştir. Hazırlanan stok çözelti steril filtreden geçirilmiştir. Toplam besi yerinin %10'u kadar serum eklenmiştir.

Stok Roundup Star çözeltisinden 1/5.000, 1/12.500, 1/25.000, 1/50.000 ve 1/100.000 glifosat olacak şekilde 5 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır.

Prolin içinse 207,234 mg prolin hassas terazide tartılıp 15 mL serumsuz besi yerinde çözündürülmüştür. Steril filtreden geçirilip serum eklenmiştir. Böylece 120 mM'lık 15 mL stok prolin çözeltisi elde edilmiştir.

Stok prolin çözeltisinden 10 mM, 6 mM ve 2 mM olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda prolin çözeltisi hazırlanmıştır.

Hazırlanan hem glifosat hem de prolin konsantrasyonları çalışmada test edilen konsantrasyonların iki katı olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.6 Hücrelere glifosat ve prolin uygulanması

24 saat inkübe edilen 96'lık well plate'lerin inverted mikroskopta morfolojilerine bakılmıştır. Daha sonra her bir well'deki besi yeri mikropipet ile uzaklaştırılmıştır. Glifosat için son konsantrasyon 1/10.000 (210 µM - 44,1 µg/mL), 1/25.000 (84 µM - 17,64 µg/mL), 1/50.000 (42 µM - 8,82 µg/mL), 1/100.000 (21 µM - 4,41 µg/mL), 1/200.000 (10.5 µM - 2,205 µg/mL) olacak şekilde; prolin ise son konsantrasyon 1 mM (P1), 3 mM (P2) ve 5 mM (P3) olacak şekilde belirlenen well'ler glifosat ve prolin çözeltilerine maruz bırakılmıştır. Her bir deney grubu ve kontrol grubundan 3'er tekrar

olacak şekilde 3'er well'e uygulama yapılmıştır. Daha sonra 96 well plate'ler inkübatöre konularak 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübe edilmiştir.

3.2.6.1 Deney grupları

Prolin deney grubu:

1. 1 mM prolin konsatrasyonu (P1) uygulanan grup
2. 3 mM prolin konsatrasyonu (P2) uygulanan grup
3. 5 mM prolin konsatrasyonu (P3) uygulanan grup

Glifosat deney grubu:

1. 1/200.000 glifosat konsatrasyonu (G1) uygulanan grup
2. 1/100.000 glifosat konsatrasyonu (G2) uygulanan grup
3. 1/50.000 glifosat konsatrasyonu (G3) uygulanan grup
4. 1/25.000 glifosat konsatrasyonu (G4) uygulanan grup
5. 1/10.000 glifosat konsatrasyonu (G5) uygulanan grup

Glifosat ve prolin birlikte uygulanan deney grubu:

1. G1 ve P1 birlikte uygulanan grup
2. G1 ve P2 birlikte uygulanan grup
3. G1 ve P3 birlikte uygulanan grup
4. G2 ve P1 birlikte uygulanan grup
5. G2 ve P2 birlikte uygulanan grup
6. G2 ve P3 birlikte uygulanan grup
7. G3 ve P1 birlikte uygulanan grup
8. G3 ve P2 birlikte uygulanan grup
9. G3 ve P3 birlikte uygulanan grup
10. G4 ve P1 birlikte uygulanan grup
11. G4 ve P2 birlikte uygulanan grup
12. G4 ve P3 birlikte uygulanan grup
13. G5 ve P1 birlikte uygulanan grup
14. G5 ve P2 birlikte uygulanan grup

15. G5 ve P3 birlikte uygulanan grup

Kontrol grubu:

Glifosat veya prolin uygulanmayan sadece besi yeri eklenen grup

3.2.7 MTT analizi (sitotoksosite analizi)

MTT kalorimetrik bir metod olup; canlı hücrelerin MTT'yi formazana indirgemesine dayanır. İndirgeme sonucu renk değişikliği meydana gelir. Tetrazolyum halkası sadece aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk değişimi sadece canlı hücrelerde oluşur. Çalışmada prolinin glifosatın hücreler üzerine ve prolinin glifosat üzerine olan etkisinin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücrelölüm veya proliferasyon üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

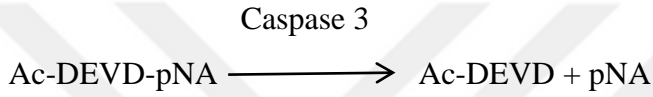
Glifosat ve proline maruz bırakılarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübe edilen 96'lık well plate'leri inkübatörden çıkarılmıştır. Daha sonra üzerlerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. Bundan sonra yapılan işlemler karanlıkta yapılmıştır. Her bir well'e 100 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. Hücreler 3 saat 37 °C'de ve %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. İnkübatörden alınan well'ler üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler üzerine 200 µL IPA (izopropil alkol) çözeltisi eklenmiştir. Well plate hafifçe sallanarak ve pipetaj yapılarak çözünme sağlanmıştır. 570nm'de spektrofotometrede okuma yapılmıştır (Okumada blank olarak IPA çözeltisi kullanılmıştır).

MTT ortalama absorbans sonuçlarına göre hücre canlılığı yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre canlılık oranı (\%)} = \frac{\text{Deney grubu}}{\text{Kontrol grubu}} \times 100$$

3.2.8 Kolorimetrik kaspaz-3 ölçümü

Hücrelerdeki apoptozun belirlenmesi için Sigma'nın kolorimetrik kaspaz 3 kitinden yararlanılmıştır. Kaspaz 3 kolorimetrik analiziyle, peptit substrat asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilidin (Ac-DEVD-pNA) kaspaz 3 enzimi tarafından hidrolizine dayanır ve sonuçta p-nitroanilin (pNA) kısmının salınmasına neden olur. Substrattan salınan pNA konsantrasyonu, 405 nm'deki absorbans değerlerinden veya tanımlanmış pNA çözeltileri ile hazırlanan bir kalibrasyon eğrisinden hesaplanır. Böylece kaspaz 3 aktivitesi belirlenmiş olur (Sigmaaldrich, 2019).



Çalışmada apoptozun belirlenmesi için kaspaz 3 kitinde kullanılan glifosat dozları aşağıda verilmiştir:

- 1/25.000 (84 µM)
- 1/20.000 (105 µM)
- 1/17.500 (120 µM)
- 1/15.000 (140 µM)
- 1/12.500 (168 µM)

Kaspaz 3 aktivitesi için 24 saat inkübe edilen 96'lık well plate inkübatörden alınarak her bir well'deki besi yeri mikropipet ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 96'lık well plate düz şekilde soğutucu üzerine konulmuştur. Her well'e 25 µL kit içindeki liziz tampondan eklenmiştir. 15-20 dakika soğukta inkübe edilmiştir. Her well'e yine kitte bulunan test tamponundan 200 µL eklenmiştir ve pipetajla iyice karışması sağlanmıştır. Böylece kaspaz 3 kolorimetrik kiti için kullanılacak hücre lizatları elde edilmiştir.

Başka bir 96'lık well plate'de kaspaz 3 ölçümü için ekim yapılır. Hücre lizatı eklenmesi gereken her well'e (negatif kontrol ve inhibitörü ile glifosat ve prolin konsantrasyonları uygulananlar ve bunların inhibitörleri) 5 µL hazırlanan hücre lizatından eklenmiştir.

Negatif kontrol (sadece hücre bulunan lizatlar) ve negatif kontrol inhibitör, glifosat ve prolin konsantrasyonları uygulananlar ve bunların inhibitörleri, kaspaz 3 pozitif kontrol ve kaspaz 3 pozitif kontrol inhibitör ile blank için 3 'er tekrar uygulanmıştır. Tüm well'lere kitteki substrattan 10 µL eklenmiştir. İnhibitörler içinse kitteki inhibitörden 10 µL eklenmiştir. Sadece kaspaz 3 pozitif kontrol ve inhibitörüne kitteki kaspaz 3'ten 5 µL eklenmiştir. Her well'deki toplam son hacim 100 µL olacak şekilde her well kitteki

test tamponu ile tamamlanmıştır. Alüminyum folyo ile kaplanan 96 well plate 37 °C'de 80 dakika inkübe edilmiştir. 405 nm'de spektrofotometrede absorbansı okunmuştur.

3.2.9 İstatistiksel analiz

Çalışmamızda istatistiksel analiz için SPSS Statistics 22 programı kullanılmış olup tek yönlü ANOVA ve post hoc testlerinden yararlanılmıştır. Anlamlılık değeri için $p < 0.05$ kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Glifosat ve Kontrol Konsantrasyonları MTT Absorbansları

L929 hücre hattına 24 saat boyunca 10,5 μM ile 210 μM arasındaki 5 farklı konsantrasyonda uygulanan glifosat ile kontrol grubunun 3'er tekrar olacak şekilde MTT testi absorbansları, ortalama absorbansları ve standart sapma değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 24 saat boyunca L929 hücre hattına uygulanan glifosat konsantrasyonları ile kontrol hücrelerinin MTT absorbans değerleri ve standart sapma değerleri

Glifosat Konsantrasyonları	1. Absorbans	2. Absorbans	3. Absorbans	Ortalama Absorbans	Standart Sapma
Kontrol (0 μM)	0,141	0,152		0,147	0,008
G1 (10,5 μM)	0,121	0,186	0,290	0,199	0,085
G2 (21 μM)	0,074	0,178	0,192	0,148	0,064
G3 (42 μM)	0,074	0,185	0,245	0,168	0,087
G4 (84 μM)	0,178	0,258	0,411	0,282	0,118
G5 (210 μM)	0,000	0,000	0,060	0,020	0,035

Glifosatın (G5) 210 μM konsantrasyonunda hücrelerin neredeyse tümünde ölüm gerçekleşmiştir. Bu konsantrasyon L929 hücre hattı için glifosatın toksik konsantrasyonudur. Glifosatın diğer konsantrasyonlarında (G1, G2, G3 ve G4) ise kontrol grubuna göre MTT ortalama absorbans değerlerinde artış görülmektedir.

L929 hücre hattına 48 saat boyunca 10,5 μM ile 210 μM arasındaki 5 farklı konsantrasyonda uygulanan glifosat ile kontrol grubunun 3'er tekrar olacak şekilde MTT testi absorbansları, ortalama absorbansları ve standart sapma değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 48 saat boyunca L929 hücre hattına uygulanan glifosat konsantrasyonları ile kontrol hücrelerinin MTT absorbands değerleri ve standart sapma değerleri

Glifosat Konsantrasyonları	1. Absorbans	2. Absorbans	3. Absorbans	Ortalama Absorbans	Standart Sapma
Kontrol (0 µM)	0,329	0,232		0,281	0,069
G1 (10,5 µM)	0,570	0,533	0,984	0,696	0,250
G2 (21 µM)	0,831	0,643	0,593	0,689	0,125
G3 (42 µM)	0,414	0,503	0,600	0,506	0,093
G4 (84 µM)	0,561	0,471	0,318	0,450	0,123
G5 (210 µM)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

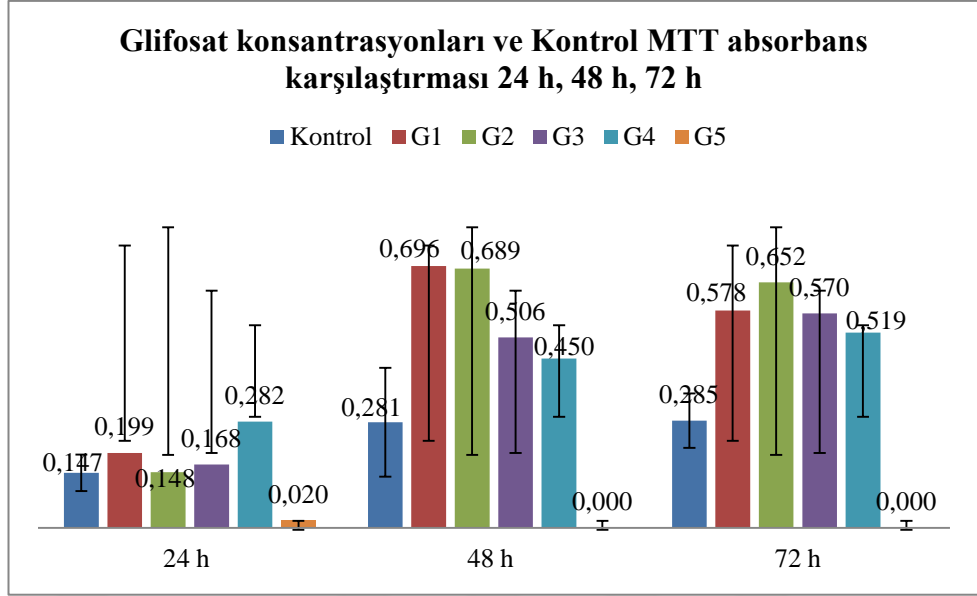
24 saat sonuçlarına benzer olarak glifosatın (G5) 210 µM konsantrasyonunda hücrelerin tümünde ölüm gerçekleşmiştir. Bu konsantrasyon L929 hücre hattı için glifosatın toksik konsantrasyonudur. Yine 24 saat sonuçlarına benzer olarak glifosatın diğer konsantrasyonlarında (G1, G2, G3 ve G4) ise kontrol grubuna göre MTT ortalama absorbands değerlerinde artış görülmektedir.

L929 hücre hattına 72 saat boyunca 10,5 µM ile 210 µM arasındaki 5 farklı konsantrasyonda uygulanan glifosat ile kontrol grubunun 3'er tekrar olacak şekilde MTT testi absorbandsları, ortalama absorbandsları ve standart sapması değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

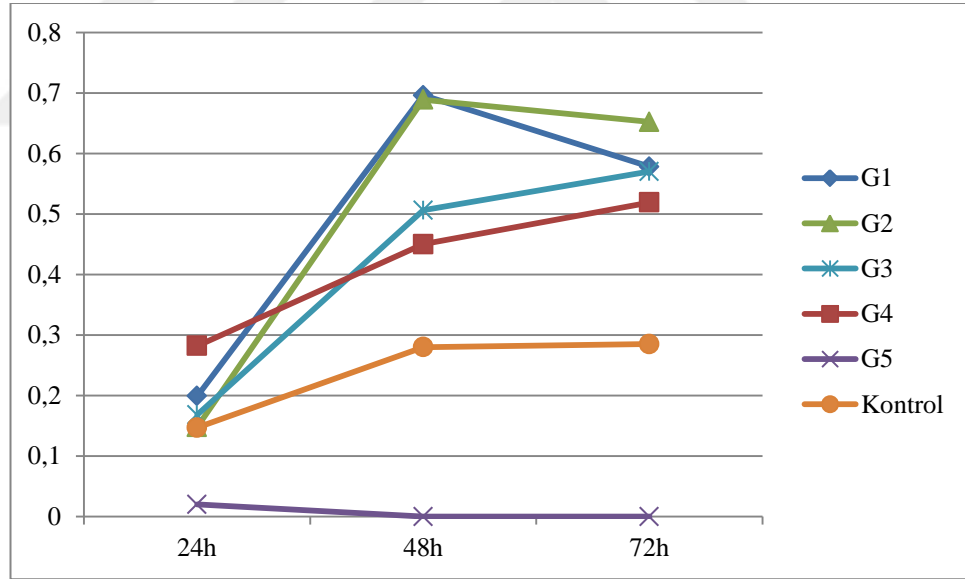
Çizelge 4.3 72 saat boyunca L929 hücre hattına uygulanan glifosat konsantrasyonları ile kontrol hücrelerinin MTT absorbands değerleri ve standart sapma değerleri

Glifosat Konsantrasyonları	1. Absorbans	2. Absorbans	3. Absorbans	Ortalama Absorbans	Standart Sapma
Kontrol (0 µM)	0,166	0,404		0,285	0,168
G1 (10,5 µM)	0,630	0,639	0,464	0,578	0,099
G2 (21 µM)	0,354	0,669	0,934	0,652	0,290
G3 (42 µM)	0,175	0,588	0,947	0,570	0,386
G4 (84 µM)	0,374	0,525	0,658	0,519	0,142
G5 (210 µM)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

24 ve 48 saat MTT sonuçlarına benzer olarak 72 saat glifosatın (G5) 210 µM konsantrasyonunda hücrelerin tümünde ölüm gerçekleşmiştir. Bu konsantrasyon L929 hücre hattı için glifosatın toksik konsantrasyonudur. Yine 24 ve 48 saat sonuçlarına benzer olarak glifosatın diğer konsantrasyonlarında (G1, G2, G3 ve G4) ise kontrol grubuna göre MTT ortalama absorbands değerlerinde artış görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Glifosat konsantrasyonları (G1, G2, G3, G4ve G5) ve Kontrol grubunun 24 saat, 48 saat ve 72 saat MTT absorbands değerlerinin karşılaştırması

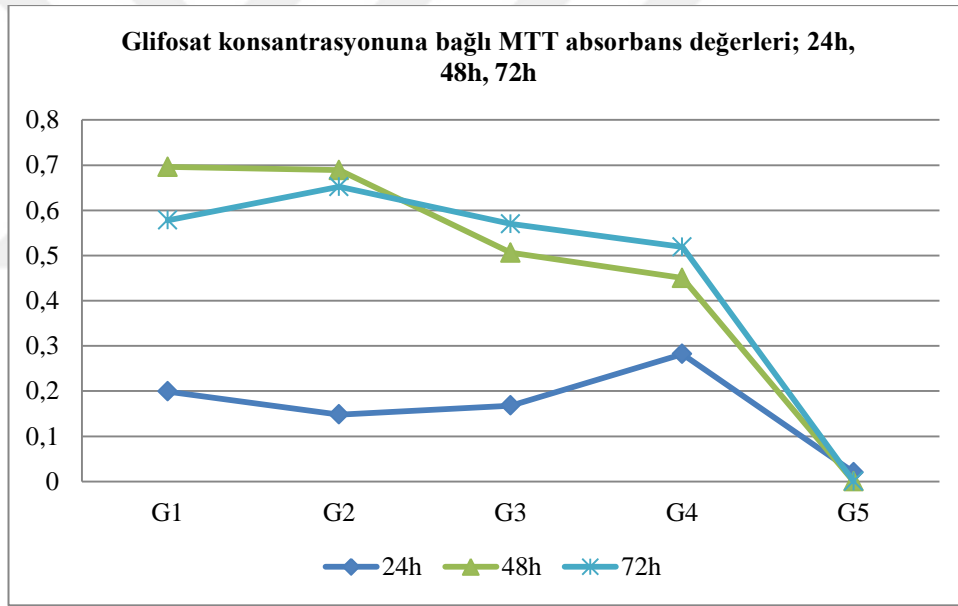


Şekil 4.2 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca glifosat konsantrasyonları ve kontrol grubunun MTT absorbands değişimi

Glifosatın G5 (210 μM) konsantrasyonu hariç diğer konsantrasyonlarında 24 saate göre 48 saatte MTT absorbands artışı görülmektedir. G1 (10,5 μM) ve G2 (21 μM)

konsantrasyonlarında ise 72 saatte 48 saate göre MTT absorbansında düşüş görülmektedir fakat G3 (42 μ M) ve G4 (84 μ M) konsantrasyonlarında ise 72 saatte 48 saate göre MTT absorbansında artış görülmektedir (Şekil 4.2).

Glifosatın 24 saatteki konsantrasyonları ve kontrol grubu arasındaki MTT absorbans değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Tukey testine göre 24 saatte G4 ve G5 grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Glifosatın 48 saatteki konsantrasyonları ve kontrol grubu arasındaki MTT absorbans değerleri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p<0,05$). Glifosatın 72 saatteki konsantrasyonları ve kontrol grubu arasındaki MTT absorbans değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Tukey testine göre 72 saatte G2 ve G5 grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.

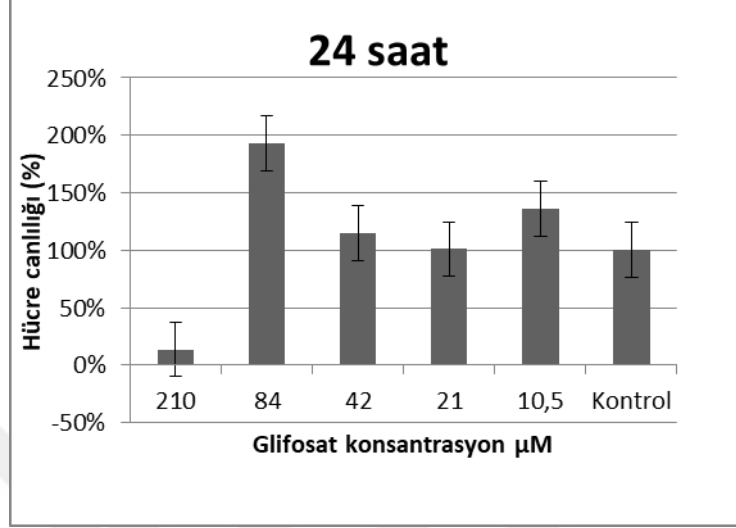


Şekil 4.3 Glifosat konsantrasyonu artışının 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca değişimi

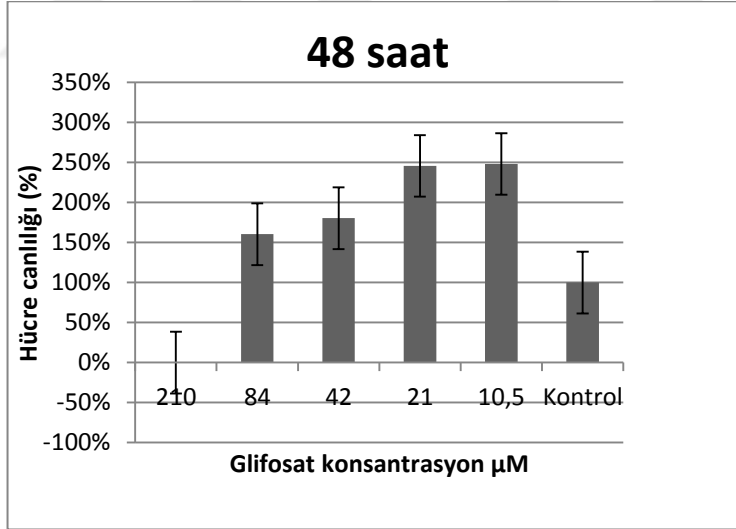
4.2 Glifosat Konsantrasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

L929 hücre hattına 24 saat boyunca 10,5 μ M ile 210 μ M arasındaki 5 farklı konsantrasyonda uygulanan glifosat konsantrasyonlarının hücre canlılığı Şekil 4.4'de verilmiştir. Kontrol grubu %100 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuna göre 210 μ M glifosat konsantrasyonu hariç diğer konsantrasyonlarda hücre canlılığında (hücre sayısı)

artış görülmektedir. 210 μM glifosat konsantrasyonunda ise kontrol grubuna göre hücre canlılığında büyük oranda azalma görülmektedir.

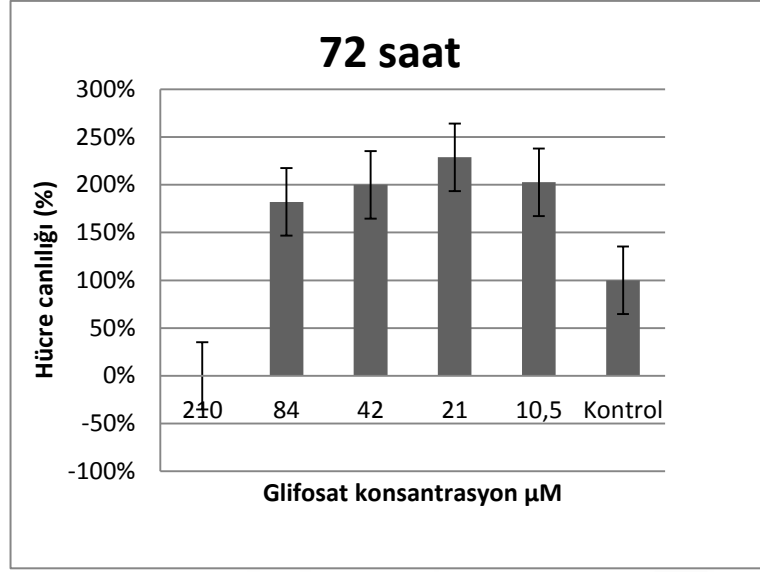


Şekil 4.4 Glifosat konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, 24 saat



Şekil 4.5 Glifosat konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, 48 saat

24 saat glifosat konsantrasyonlarına benzer şekilde hem 48 saatte hem de 72 saatte 210 μM glifosat konsantrasyonu hariç kontrole göre hücre canlılığında artış görülmektedir. Uygulanan 210 μM glifosat konsantrasyonunda ise 48 ve 72 saatlerde hücre canlılığı görülmemektedir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



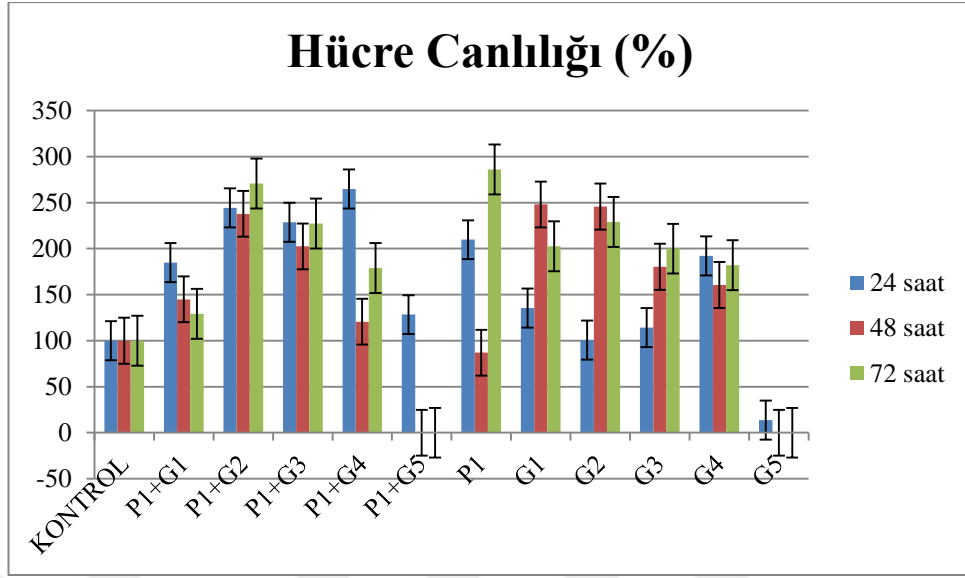
Şekil 4.6 Glifosat konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, 72 saat

IC_{50} (yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu) değeri; bir maddenin maksimum biyolojik cevabın yarısını inhibe etmek için gereken konsantrasyon olarak tanımlanır. Burada MTT testindeki hücre canlılığının % 50 azalması olarak hesaplanmıştır. IC_{50} değerleri sırasıyla 24 saat için 184 μM , 48 saat için 175 μM ve 72 saat içinse 176 μM olarak hesaplanmıştır.

4.3 Prolin Konsantrasyonlarının Glifosatla Birlikte Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Prolin P1 (1 mM), P2 (3mM) ve P3 (5 mM) olarak adlandırılıp 3 farklı konsantrasyonda kullanılmıştır. 24, 48 ve 72 saat boyunca glifosatın 5 farklı konsantrasyonu ile birlikte prolinin 3 farklı konsantrasyonu uygulanmıştır.

Tek başına uygulanan prolin konsantrasyonlarında (P1, P2, P3) 24, 48 ve 72 saatte kontrole göre hücre artışı görülmektedir. Hücrelere uygulanan P1, P2 ve P3'ler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise P3'te (kontrole göre) P1 ve P2'ye nazaran daha az hücre artışı görülmektedir.

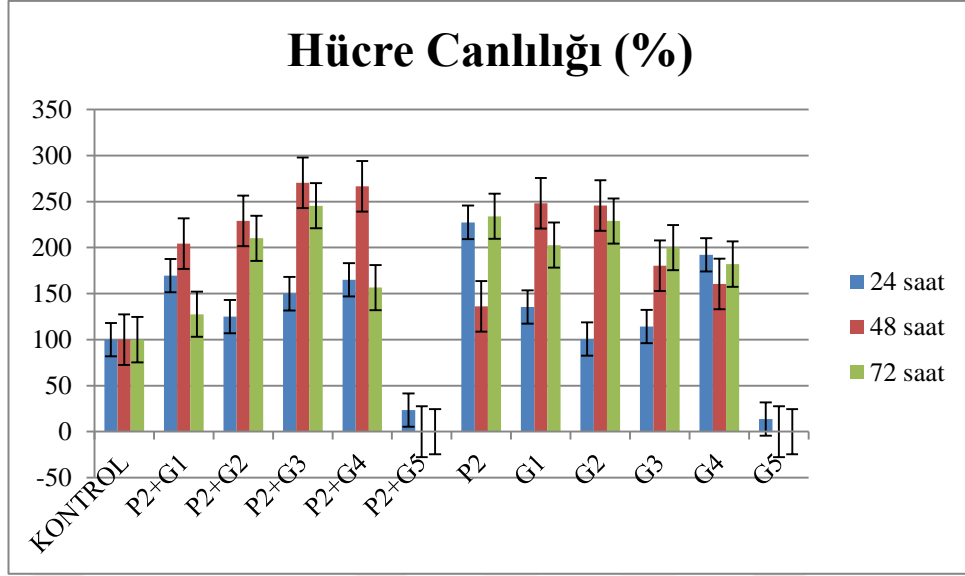


Şekil 4.7 1 mM prolinin (P1) ve glifosatın hücre canlılığı grafiği

24 saatte G (G1, G2, G3, G4, G5)'ler P1+G (P1+G1, P1+G2, P1+G3, P1+G4, P1+G5)'ler ile karşılaştırıldığında ise P1+G'lerdeki hücre canlılığı artışı G'lere göre daha fazla görülmektedir. 48 ve 72 saatte ise hücre canlılığı birbirine yakın görülmektedir (Şekil 4.7).

P1 ve G'lerle karşılaştırıldığında ise 24 saatte G'lere göre P1'de hücre canlılığında artış görülmektedir. 48 saatte ise G'lere göre P1'de (G5 hariç) hücre canlılığında azalış görülmektedir. 72 saatte ise G'lere göre P1'de hücre canlılığında artış görülmektedir (Şekil 4.7).

P1 ile P1+G'ler karşılaştırıldığında ise 24 saatte (P1+G1 ve P1+G5 hariç) P1'e göre hücre canlılığında artış görülmektedir. 48 saatte ise P1'e göre P1+G'lerde (P1+G5 hariç) hücre canlılığında artış görülmektedir. 72 saatte ise P1'e göre P1+G'lerde hücre canlılığında azalış görülmektedir (Şekil 4.7).

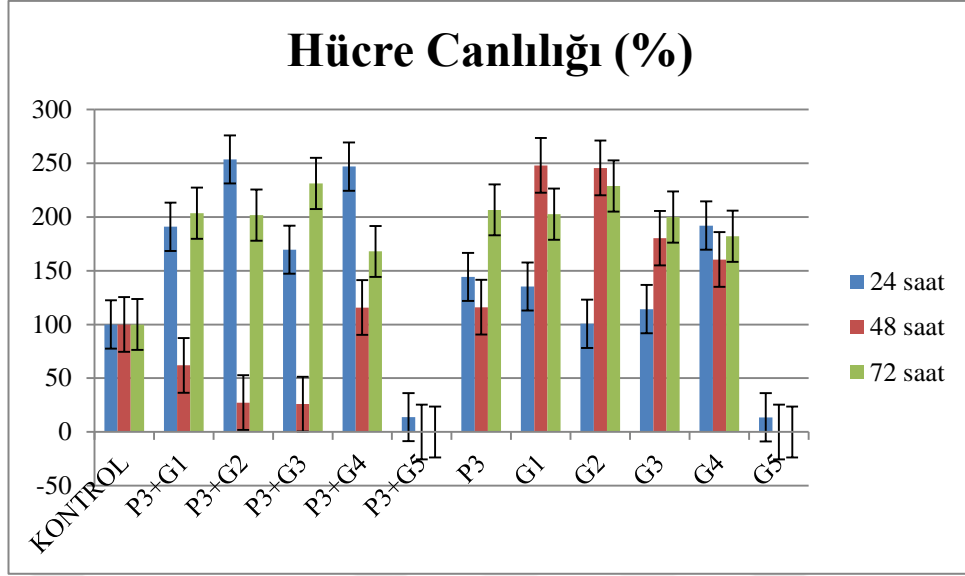


Şekil 4.8 3 mM prolinin (P2) ve glifosatın hücre canlılığı grafiği

24 saatte G'ler P2+G (P2+G1, P2+G2, P2+G3, P2+G4, P2+G5)'ler ile karşılaştırıldığında P2+G'lerdeki hücre canlılığı artışı G'lere göre daha fazla görülmektedir (Şekil 4.8).

P2 ve G'lerle karşılaştırıldığında ise 24 saatte G'lere göre P2'de hücre canlılığında artış görülmektedir. 48 saatte ise G'lere göre P2'de (G5 hariç) hücre canlılığında azalış görülmektedir. 72 saatte ise G'lere göre P2'de hücre canlılığında artış görülmektedir (Şekil 4.8).

P2 ile P2+G'ler karşılaştırıldığında ise 24 saatte P2+G'lere göre P2'de hücre canlılığında artış görülmektedir. 48 saatte ise P2'ye göre P2+G'lerde (P2+G5 hariç) hücre canlılığında artış görülmektedir. 72 saatte ise P2'ye göre P2+G'lerde (P2+G3 hariç) hücre canlılığında azalış görülmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.9 5 mM prolinin (P3) ve glifosatın hücre canlılığı grafiği

24 saatte G'ler P3+G (P3+G1, P3+G2, P3+G3, P3+G4, P3+G5)'ler ile karşılaştırıldığında ise P3+G'lerdeki hücre canlılığı artışı G'lere göre daha fazla görülmektedir. 48 saatte G'ler P3+G'ler ile karşılaştırıldığında ise P3+G'lerde hücre canlılığında azalış görülmektedir. 72 saatte ise hücre canlılığı birbirine yakın görülmektedir (Şekil 4.9).

P3 ve G'lerle karşılaştırıldığında ise 24 saatte G'lere göre P3'de (G4 hariç) hücre canlılığında artış görülmektedir. 48 saatte ise G'lere göre P3'de (G5 hariç) hücre canlılığında azalış görülmektedir. 72 saatte ise G'lere göre P3'de hücre canlılığı birbirine yakın görülmektedir (Şekil 4.9).

P3 ile P3+G'ler karşılaştırıldığında ise 24 saatte P3+G'lere göre P3'de (P3+G5 hariç) hücre canlılığında azalış görülmektedir. 48 saatte ise P3'e göre P3+G'lerde (P3+G4 P3'le neredeyse aynı olduğu için hariç) hücre canlılığında azalış görülmektedir. 72 saate ise P3'e göre P3+G'lerde (P3+G5 hariç) hücre canlılığı neredeyse birbirine yakın görülmektedir (Şekil 4.9).

Yapılan istatistiksel analizde prolin grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.4 Deneydeki tüm grupların standart sapmalarıyla birlikte MTT absorbanans ortalama değerleri

MTT absorbanans ortalamaları	24 Saat	48 Saat	72 Saat
KONTROL	0,147±0,008	0,281±0,069	0,285±0,168
G1	0,199±0,085	0,696±0,250	0,578±0,099
G2	0,148±0,064	0,689±0,125	0,652±0,290
G3	0,168±0,087	0,506±0,093	0,570±0,386
G4	0,282±0,118	0,450±0,123	0,519±0,142
G5	0,020±0,035	0±0	0±0
P1	0,308±0,206	0,243±0,251	0,815±0,096
P2	0,334±0,075	0,382±0,284	0,667±0,005
P3	0,212±0,036	0,325±0,066	0,589±0,096
P1+G1	0,271±0,204	0,407±0,310	0,368±0,308
P1+G2	0,359±0,117	0,667±0,099	0,772±0,200
P1+G3	0,336±0,162	0,568±0,088	0,648±0,025
P1+G4	0,389±0,130	0,338±0,055	0,510±0,068
P1+G5	0,189±0,087	0±0	0±0
P2+G1	0,249±0,081	0,573±0,054	0,364±0,299
P2+G2	0,184±0,085	0,642±0,122	0,599±0,231
P2+G3	0,220±0,086	0,758±0,062	0,700±0,106
P2+G4	0,243±0,041	0,748±0,083	0,446±0,022
P2+G5	0,035±0,031	0±0	0±0
P3+G1	0,281±0,199	0,174±0,136	0,580±0,162
P3+G2	0,373±0,101	0,077±0,052	0,575±0,218
P3+G3	0,249±0,052	0,073±0,074	0,659±0,071
P3+G4	0,363±0,100	0,325±0,100	0,479±0,074
P3+G5	0,020±0,035	0±0	0±0

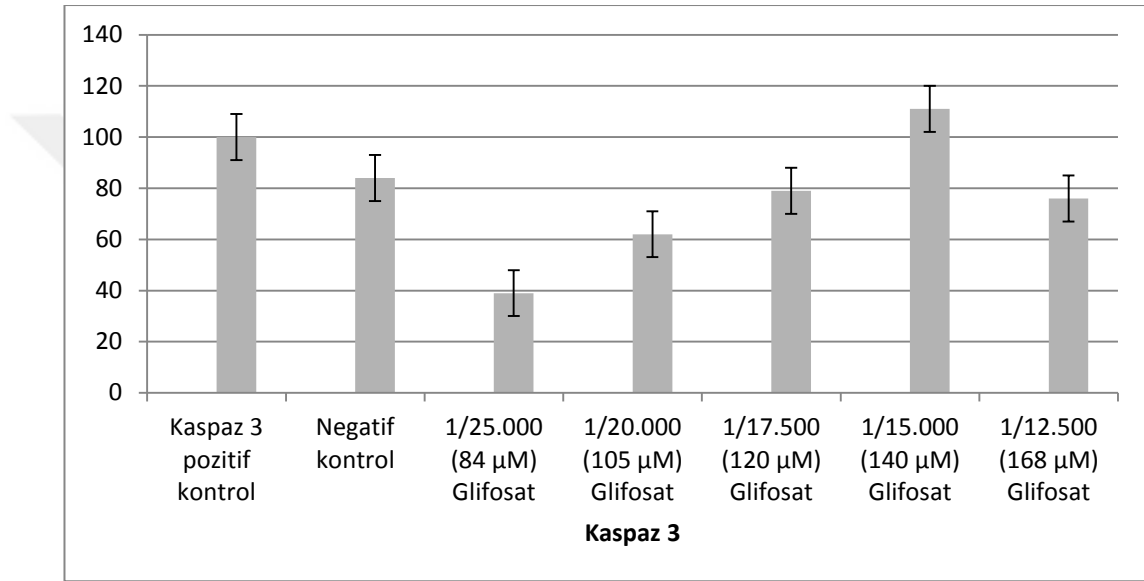
4.4 Kaspaz 3 Aktivitesi

Kaspaz 3 aktivitesi için glifosat ve prolin konsantrasyonları 24 saat boyunca uygulanmıştır. Uygulanan glifosat konsantrasyonları glifosatın G4 (1/25.000) konsantrasyonundan başlayıp G5 (1/10.000) konsantrasyonu arasında seçilmiştir. Son konsantrasyon (1/12.500-168 µM) ise IC₅₀ değerine yakın seçilmiştir. Aşağıda kaspaz 3 için uygulanan glifosat konsantrasyonları verilmiştir:

- 1/25.000 (84 µM)
- 1/20.000 (105 µM)

- 1/17.500 (120 μ M)
- 1/15.000 (140 μ M)
- 1/12.500 (168 μ M)

Glifosatla birlikte prolin uygulanan konsantrasyonlarda ise glifosatın kaspaz 3 aktivitesi için uygulanan en yüksek (1/12.500-168 μ M) ve en düşük (1/25.000-84 μ M) konsantrasyonları seçilmiştir. Prolin P1 (1 mM), P2 (3 mM) ve P3 (5 mM) olacak şekilde uygulanmıştır.

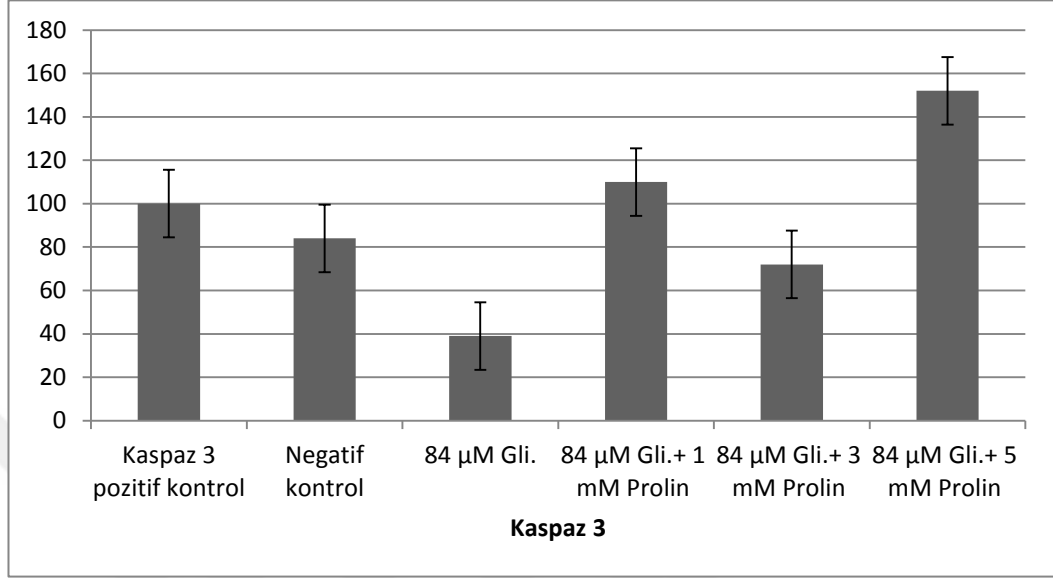


Şekil 4.10 Glifosat gruplarındaki Kaspaz 3 aktivitesi

Kaspaz 3 pozitif kontrole göre sadece 1/15.000'lik glifosat konsantrasyonunda kaspaz 3 artışı görülmektedir. Yine negatif kontrol (glifosat uygulanmamış hücreler)'e göre kaspaz 3'te artış sadece 1/15.000'lik glifosat konsantrasyonunda görülmektedir (Şekil 4.10).

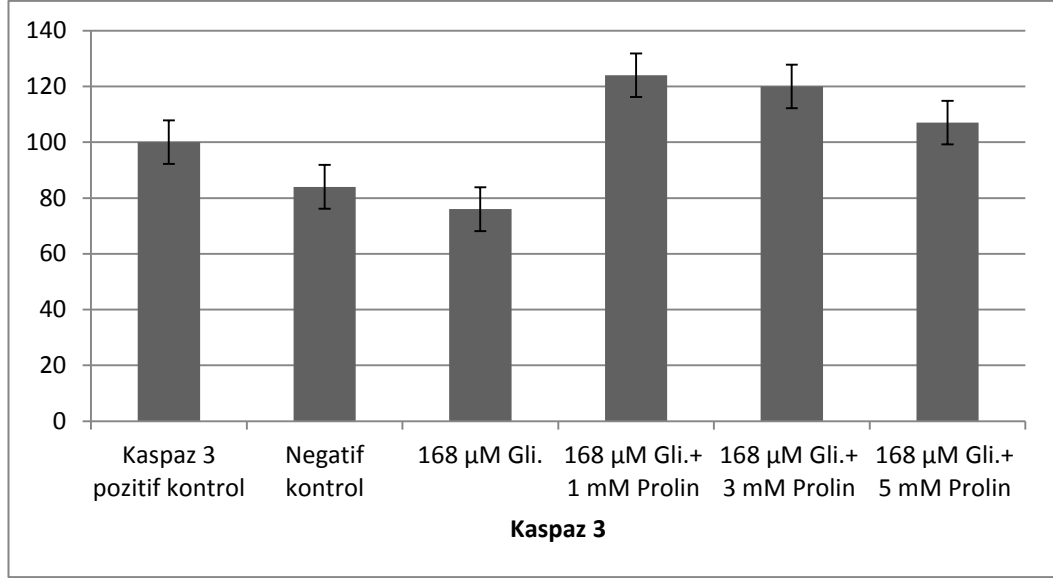
84 μ M (1/25.000) glifosat uygulanan hücre grubuna göre glifosat ile birlikte 1 mM, 3 mM ve 5 mM prolin uygulanan gruplarda kaspaz 3 aktivitesinde artış görülmektedir. 84 μ M glifosat uygulanan grupta hem kaspaz 3 pozitif kontrole göre hem de negatif kontrole göre kaspaz 3 aktivitesinde azalış görülmektedir. Fakat 84 μ M glifosatın prolinle birlikte uygulanan gruplarında ise (84 μ M glifosat+3 mM prolin hariç) 1 mM

ve 5 mM prolin'li gruplarda kaspaz 3 pozitif kontrol ve negatif kontrole göre kaspaz 3 aktivitesinde artış görülmektedir (Şekil 4.11).

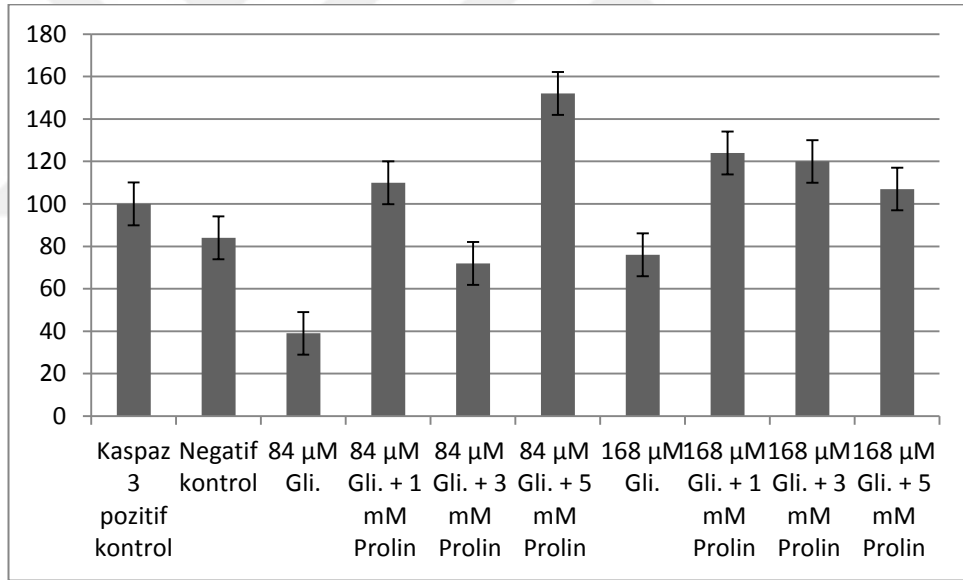


Şekil 4.11 84 µM glifosat ve prolinin kaspaz 3 aktivitesi

168 µM (1/12.500) glifosat uygulanan hücre grubuna göre glifosat ile birlikte 1 mM, 3 mM ve 5 mM prolin uygulanan gruplarda kaspaz 3 aktivitesinde artış görülmektedir. 168 µM glifosat uygulanan grupta hem kaspaz 3 pozitif kontrole göre hem de negatif kontrole göre kaspaz 3 aktivitesinde azalış görülmektedir. 168 µM glifosatın prolinle birlikte uygulanan gruplarında kaspaz 3 pozitif kontrol ve negatif kontrole göre kaspaz 3 aktivitesinde artış görülmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 168 µM glifosat ve prolinin kaspaz 3 aktivitesi



Şekil 4.13 Uygulanan tüm gruplarda (84 µM, 168 µM glifosat ve prolin grupları) kaspaz 3 aktivitesi

Kaspaz 3 uygulanan gruplar arasında yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada tüm dünyada yaygın olarak kullanılan glifosat bazlı herbisit olan Roundup Star'ın L929 fibroblast hücrelerine toksisitesinin araştırılması ve oluşan toksisite üzerine prolin (L formu) amino asidinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Glifosat bazlı herbisit Roundup Star'dan (etken maddesi glifosat) 5 farklı glifosat konsantrasyonu hazırlanarak L929 hücrelerine uygulanmıştır. Glifosatın L929 hücreleri üzerine toksisite etkisine karar verebilmek için 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanmıştır. MTT testi ile uygulanan glifosatın hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiştir. Hücre canlılığına etkisine göre belirlenen 2 farklı konsantrasyonda kaspaz 3 aktivitesine bakılmıştır. L929 hücrelerinde glifosatın ve prolinle birlikte uygulanmış glifosatın apoptotik etkilerini değerlendirmek için kolorimetrik kaspaz 3 aktivitesi ölçümü yapılmıştır.

Literatürde yapılan çalışmalarda hem glifosat bazlı herbisitlerle (Roundup ve diğerleri) hem de sadece glifosatla ilgili birçok hayvan deneyleri ve hücre kültürü üzerine toksisite deneyleri yapılmıştır. Ancak bu çalışmada kullanılan hücre hattı olan L929 fare fibroblastı hücreleri üzerine glifosat veya Roundup'ın toksik etkisinin araştırıldığı çalışmaya rastlanılmamıştır.

Martini vd. (2012) tarafından Arjantin'de satılan ticari glifosat bazlı herbisitinin 3T3-L1 fibroblastı üzerine yaptıkları çalışmada; kullandıkları glifosat bazlı herbisitinin hem hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini hem de apoptozu indüklediğini tespit etmişlerdir. Çalışmada; 3T3-L1 fibroblastı 24 ve 48 saat boyunca glifosatın 1/1.000, 1/2.000, 1/5.000 ve 1/10.000 konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. 48 saat maruziyet sonucu kontrole göre en yüksek hücre ölümü olan konsantrasyon en yüksek glifosat konsantrasyonu olan 1/1.000'de görülmüştür. Diğer glifosat konsantrasyonları (1/5.000 ve 1/10.000) için; kontrole göre hücre canlılığı yüzdesi azalmakla birlikte, glifosat konsantrasyonu ile hücre canlılığı yüzdesi arasında ters orantı gözlenmiştir. 24 saat maruziyet sonucu ise 1/2.000 glifosat konsantrasyonunda da kontrole göre yaklaşık %50 oranında hücre ölümü gözlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan en yüksek glifosat konsantrasyonu olan G5 - 1/10.000 (210 µM)'de hücre canlılığı 24 saat yok denecek kadar az olup; 48 ve 72 saatlerde ise tüm hücrelerin öldüğü gözlenmiştir. Martini vd. (2012) yaptığı çalışmada ise 1/10.000 glifosat konsantrasyonu çalışmadaki en düşük konsantrasyondur ve hücre canlılığı en fazla bu konsantrasyonda gözlenmekte olup; kontrole çok yakındır. Martini vd. (2012) yaptığı çalışma ile çalışmamızdaki 1/10.000 konsantrasyonda gözlenen hücre canlılığındaki farkın kullanılan hücrelerin aynı olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Martini vd. (2012) yaptığı çalışma ile benzer olarak çalışmamızda glifosat konsantrasyon hücre canlılığı yüzdesi arasında ters orantı gözlenmiştir. Fakat çalışmamızda G5 hariç diğer glifosat konsantrasyonlarında kontrole göre hücre canlılığında artış gözlenmiştir. Bu artışın ise Martini vd. (2012) çalışmasına göre çalışmamızda çok düşük konsantrasyonlarda glifosat kullanıldığı için gerçekleştiği düşünülmektedir.

de Melo vd. (2018) yaptığı çalışmada insan yağ dokusu türevli mezenşimal kök hücrelerde glifosat bazlı herbisit toksik etkisini incelemiştir. 24 saat boyunca 150 µg/mL, 100 µg/mL, 71 µg/mL, 45 µg/mL, 33 µg/mL, 10 µg/mL, 3,2 µg/mL ve 1,26 µg/mL konsantrasyonlarını uygulamışlardır. MTT testi sonucu IC₅₀ değerini 24 saat için 42,98 (± 1,72) µg /mL olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda da benzer olarak bulunan IC₅₀ değerleri sırasıyla 24 saat için 184 µM (38,64 µg/mL), 48 saat için 175 µM (36,75 µg/mL) ve 72 saat içinse 176 µM (36,96 µg/mL) olarak hesaplanmıştır.

de Melo vd. (2018) 24 saat boyunca 90 µg/mL konsantrasyonda glifosat bazlı herbisite maruz bırakılan yağ dokusu türevli mezenşimal kök hücrelerinde Annexin V Apoptoz Kiti ile yapılan incelemede; glifosat bazlı herbisit hem apoptoza hem de nekroza neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda apoptozun belirlenmesi için kaspaz 3 kitinde kullanılan doz belirlenen IC₅₀ konsantrasyonuna yakın konsantrasyonlardan seçilmiştir (84 µM-17,64 µg/mL ile 168 µM-35,28 µg/mL arasında). Glifosat konsantrasyonlarında kendi içinde artan kaspaz 3 aktivitesi görülse de; kaspaz 3 pozitif kontrol veya negative kontrole göre anlamlı bir kaspaz 3 aktivitesi görülmemiştir. Bu farklılığın çalışmamızdaki hücrelere çok düşük konsantrasyonda glifosat

uygulanmasından ve kullanılan hücrelerin de Melo vd. (2018)'nin yaptığı çalışmadaki hücrelerden farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bununla birlikte yine de Melo vd. (2018)'nin yaptığı çalışmadaki glifosat bazlı herbisitini kullandıkları en düşük konsantrasyonunda (36 µg/mL) 24 saat, 48 saat ve 72 saatteki MTT absorbanslarında kontrole göre hücre canlılığında artış gözlenmiştir. Bu gözlenen artış da çalışmamızdaki düşük konsantrasyonlarda görülen MTT absorbanslarında kontrole göre hücre canlılığındaki gözlenen artış ile benzerdir. Cohen ve Ellwein (1990)'in yaptığı çalışmada proliferasyonla toksisite ilişkilendirilip hücrelerin kanserleşmesi proliferasyonla açıklanmıştır. Çalışmamızda da görülen proliferasyonun glifosatın hücrelerde karsinojen etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda glifosat konsantrasyonu artışı ile birlikte genel olarak kaspaz 3 aktivitesi artışı görülmektedir (kendi içinde bakıldığında; pozitif kontrole veya negatif kontrole göre değil). Düşük konsantrasyonlarda kaspaz 3 aktivitesinin çok az görülmesi hücrelerdeki apoptoz mekanizmasının bozulmuş olabileceğine işaret etmektedir. Yine kaspaz 3 aktivitesine ilaveten; glifosat konsantrasyonu azaldıkça kontrole göre artan hücre canlılığının apoptoz mekanizmasının bozulmuş olmasından kaynaklanıp ve sonuçta hücre ölümünün gerçekleşmeyip tam tersine proliferasyona neden olduğu düşünülmektedir. Böylece düşük dozlarda karsinojen etki gösterip; hücrenin apoptoza gitmesini önleyerek kansere neden olabilmektedir.

Glifosat ve prolin birlikte uygulanan grupların kaspaz 3 aktivitesine bakıldığında; prolinli grupların hem tek başına glifosat uygulanan gruplardan (84 µM ve 168 µM glifosat) hem de kaspaz pozitif kontrol ve negatif kontrole göre daha fazla kaspaz 3 aktivitesi gösterdiği görülmektedir. Bu yüzden prolinli gruplarda gözlemlenen kaspaz 3 artışın; prolinin glifosatla bozulmuş veya baskılanmış olduğu düşünülen apoptoz mekanizmasının geriye çevirmiş olabileceği düşünülmektedir. Fakat tek başına glifosata göre glifosatla birlikte prolin uygulanan gruplarındaki anlamlı olmayan hücre canlılığındaki azalmadan dolayı prolinin apoptoz üstündeki bu rolünün anlaşılabilmesi için daha ileri araştırmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Akşit, H. ve Bildik, A. 2008. Apoptozis. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(1); 55-63.
- Alvarez-Moya, C., Reynoso Silva, M., Valdez Ramirez, C., Gomez Gallardo, D., Leon Sanchez, R., Canales Aguirre, A. and Feria Velasco, A. 2014. Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. Genetics and molecular biology, 37(1); 105-110.
- Anonim. 2019. Glifosatın kimyasal formülü. Web Sitesi : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate> Erişim Tarihi: 21.06.2019
- Anonim. 2019. Prolinin kimyasal formülü. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Proline#section=Structures> Erişim Tarihi: 21.06.2019
- Balkan A. B. M. 2012. HepG2 Hücrelerinde Selenyum ve Vitamin C'nin Apoptozis Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı,93. Ankara.
- Benedetti, A. L., de Lourdes Vituri, C., Trentin, A. G., Domingues, M. A. C., and Alvarez-Silva, M. 2004. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. Toxicology Letters, 153(2); 227-232.
- Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggeri, P, and Abbondandolo, A. 1997. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. Journal of Agricultural and food chemistry, 45(5); 1957-1962.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annual review of cell and developmental biology, 15(1); 269-290.
- Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V. L., de Menezes, C. C., Pretto, A., Baldisserotto, B., Santi, A. and de Avila, L. A. 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 87(6); 597-602.
- Chen, C. and Dickman, M. B. 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(9); 3459-3464.
- Cohen, S. M. and Ellwein, L. B. 1990. Cell proliferation in carcinogenesis. Science, 249(4972); 1007-1011.

- Coullery, R. P., Ferrari, M. E. and Rosso, S. B. 2016. Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. *Neurotoxicology*, 52; 150-161.
- Coşkun, G. ve Özgür, H. 2011. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3); 145-158.
- Csonka, L.N. and Hanson, A.D. 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol*, 45, 569–606.
- Çağlar, S. and Kolankaya, D. 2008. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environmental toxicology and pharmacology*, 25(1); 57-62.
- Çavuşoğlu, K., Yapar, K., Oruc, E. and Yalçın, E. 2011. Protective effect of *Ginkgo biloba* L. leaf extract against glyphosate toxicity in Swiss albino mice. *Journal of medicinal food*, 14(10); 1263-1272.
- de Melo, M. I. A., da Silva Cunha, P., da Mata Martins, T. M., de Miranda, M. C., Gomes, D. A., de Goes, A. M. and Novato-Silva, E. 2018. Glyphosate-based herbicide induces toxic effects on human adipose-derived mesenchymal stem cells grown in human plasma. *Comparative Clinical Pathology*, 27(4); 989-1000.
- Elçin A. E. 2019. Azotlu biyomoleküllerin Metabolizması. 2019. Glutamattan Prolin sentezi. Web Adresi: http://acikarsiv.gazi.edu.tr/File.php?Doc_ID=1154&ses= Erişim Tarihi: 21.06.2019
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 35(4); 495–516.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. and Liang, J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 37(11); 719-727.
- Gallegos, C. E., Bartos, M., Bras, C., Gumilar, F., Antonelli, M. C. and Minetti, A. 2016. Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. *Neurotoxicology*, 53; 20-28.
- Garry, V. F., Harkins, M. E., Erickson, L. L., Long-Simpson, L. K., Holland, S. E. and Burroughs, B. L. 2002. Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environmental health perspectives*, 110(suppl 3); 441-449.
- Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S. and Girdhar, M. 2018. Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16(2); 401-426.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12); 909-930.

- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., da Fonseca, M. B., de Araujo Pedron, F., Duarte, M. F. and Vieira, V. L. P. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2); 237-241.
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Moraes, B. S., Simoes, R. R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M. and Loro, V. L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4); 519-524.
- Hare, P. and Cress, W. 1997. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul*, 21, 79–102.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. and Verma, D. P. S. 2000. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant physiology*, 122(4); 1129-1136.
- IARC. 2015. The IARC Monograph on the herbicide glyphosate. Web Sitesi: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono112-10.pdf> Erişim tarihi: 9 Mart 2019.
- Kayacan N. S. 2015. Endemik *Centaurea nerimaniae* Ekstresinin Kanser Hücre Soyalarında Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 87. İstanbul.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4); 239.
- Krishnan, N., Dickman, M. B. and Becker, D. F. 2008. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(4); 671-681.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Junges, C. M. and Cabagna, M. C. 2011. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 60(4); 681-689.
- Li, Q., Lambrechts, M. J., Zhang, Q., Liu, S., Ge, D., Yin, R., Xi, M. and You, Z. 2013. Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. *Drug design, development and therapy*, 7; 635-643.

- Manas, F., Peralta, L., Raviolo, J., Ovando, H. G., Weyers, A., Ugnia, L., Cid, M. G., Larripa, I. and Gorla, N. 2009. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(1); 37-41.
- Martinez, A. and Al-Ahmad, A. J. 2019. Effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid on an isogenic model of the human blood-brain barrier. *Toxicology letters*, 304; 39-49.
- Martinez, M. A., Ares, I., Rodriguez, J. L., Martinez, M., Martinez-Larranaga, M. R. and Anadon, A. 2018. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environmental research*, 161; 212-219.
- Martini, C. N., Gabrielli, M. and Vila, M. D. C. 2012. A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicology in vitro*, 26(6); 1007-1013.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B. and Mohanty, P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 82(5); 525-532.
- Mesnager, R., Bernay, B., and Seralini, G. E. 2013. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 313(2-3); 122-128.
- Mesnager, R., Defarge, N., De Vendomois, J. S. and Seralini, G. E. 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84; 133-153.
- Mladinic, M., Berend, S., Vrdoljak, A. L., Kopjar, N., Radic, B. and Zeljezic, D. 2009. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. *Environmental and molecular mutagenesis*, 50(9); 800-807.
- Modesto, K. A. and Martinez, C. B. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81(6); 781-787.
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., Hansen, M., Landrigan, P. J., Lanphear, B. P., Mesnager, R., Vandenberg, L. N., vom Saal, F. S., Welshons, W. V. and Benbrook, C. M. 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health*, 15(1); 19.
- Natarajan, S. K., Zhu, W., Liang, X., Zhang, L., Demers, A. J., Zimmerman, M. C., Simpson, M.A. and Becker, D. F. 2012. Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. *Free radical biology and medicine*, 53(5); 1181-1191.

- Öniz, H. 2004. Apoptoz: Ölmeye Yatmak. SSK Tepecik Hast Derg, 14(1); 1-20.
- Paz-y-Mino, C., Sanchez, M. E., Arevalo, M., Munoz, M. J., Witte, T., De-la-Carrera, G. O., and Leone, P. E. 2007. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2); 456-460.
- Rejeb, K. B., Abdelly, C. and Savoure, A. 2014. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80; 278-284.
- Rull, R. P., Ritz, B. and Shaw, G.M. 2006. Neural tube defects and maternal residential proximity to agricultural pesticide applications. *Am J Epidemiol*, 163(8); 743-53.
- Samsel, A., and Seneff, S. 2013. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. *Entropy*, 15(4); 1416-1463.
- Sarıaltın, S. Y. ve Çoban, T. 2017. Glifosat ve Glifosat Bazlı Herbisit Kullanımının İnsan Sağlığı Açısından Riskleri. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 6(1); 1-14.
- SigmaAldrich. 2019. Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric Technical Bulletin. Web Sitesi: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/casp3cbul.pdf> Erişim Tarihi: 10 Mart 2019.
- Szabados, L. and Savoure, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2); 89-97.
- Szekacs, A. and Darvas, B. 2012. Forty years with glyphosate. *Herbicides-properties, synthesis and control of weeds*. Hasaneen MN.
- Szekely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C. and Szabados, L. 2008. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal*, 53(1); 11-28.
- Torretta, V., Katsoyiannis, I., Viotti, P. and Rada, E. 2018. Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain. *Sustainability*, 10(4); 950.
- Ulukaya E. Apoptosis Ders Notları. 2003. Web Sitesi: <https://docplayer.biz.tr/3104543-Apoptosis-ders-notlari.html> Erişim Tarihi: 09.11.2019.
- Wang, Z. B., Liu, Y. Q. and Cui, Y. F. 2005. Pathways to caspase activation. *Cell biology international*, 29(7); 489-496.
- Wu, M., Ding, H. F. and Fisher, D. E. 2001. Apoptosis: molecular mechanisms. *eLS*.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hasret Pınar Tipioğlu

Dođum Yeri : Bartın

Dođum Tarihi : 25.02.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eđitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Nermin Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi (2004)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü (2009)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakóltesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2010)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Ocak 2020)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Netşeker Nikah ve Bebek Şekerleri 09/2012-09/2018 İşletme Sahibi