

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SUBKRONİK AKRİLAMİD TOKSİSİTESİ OLUŞTURULAN
RATLARDA KAYISININ, KALIN BAĞIRSAK DOKUSU
GLUTATYON S-TRANSFERAZ-Pİ (GST) GEN EKSPRESYONU,
GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-Px), REDÜKTE
GLUTATYON (GSH) VE MALONDİALDEHİD (MDA)
DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MEHMET ERMAN ERDEMLİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2010/86 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA -2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı, Danışman

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

İmza


Üye

Doç. Dr. Efil ÖZEROL



Üye

Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2011 tarih ve 2011/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasından sonlandırılmasına kadar, çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteklerini esirgemeksizin beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e,

Tezimin gen analizi kısmındaki çalışmalarda desteğini hiçbir şekilde esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Öğretim üyelerinden Doç.Dr.Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e,

İstatistiksel analizler konusundaki desteklerinden dolayı Yard. Doç. Dr. Cemil ÇOLAK 'a,

Çalışmalar sırasında benden yardımını esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan memnuniyet duyduğum Uz. Biyolog Zümrüt DOĞAN 'a,

Yaşamımın her alanında ve her anında olduğu gibi eğitim hayatımda da destek ve sabırlarını esirgemeyen başta babam Prof.Dr A.Ümit ERDEMLİ ve aileme teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Bu araştırmaya 2010/86 proje numarasıyla maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığına içtenlikle teşekkür ederim.

ÖZET

Bu araştırmada dişi Sprague Dawley ratlara içme suyu ile subkronik dozda akrilamid verilerek, akrilamidin kalın bağırsakta meydana getirebileceği muhtemel hasarların incelenmesi ve bu hasarların organik kuru kayısı ile nlenebilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır.

Canlı ağırlıkları ortalama 200 gr olan 40 adet dişi Sprague Dawley ratlar her grupta 10 rat olacak şekilde dört gruba ayrıldı: 1. grup (kontrol grubu, 12 hafta süreyle normal yemle beslendiler). 2. grup (kayısı grubu, 12 hafta süreyle yem içinde %5 kuru kayısı ile beslendiler). 3. grup (akrilamid grubu; 12 hafta süreyle içme suyu içinde 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vücud ağırlığı akrilamid ve normal yemle beslendiler). 4. grup (akrilamid+kayısı grubu; 12 hafta süreyle içme suyu ile 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vücud ağırlığı akrilamid ve yemle %5 kuru kayısı içeren yemle beslendiler).

12 haftalık sürenin sonunda tüm ratlar dekapite edildi. Ratlarda, Glutasyon S-Transferaz Pi (GST-Pi) gen ekspresyonu, Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Redükte Glutasyon (GSH), Malondialdehid (MDA), total protein analizi için kalın bağırsak doku örnekleri alındı.

Kalın bağırsak MDA düzeyleri (nmol/gr yaşdoku; gyd) kontrol grubunda 191, kayısı grubunda 197,5, akrilamid grubunda 4070, kayısı+akrilamid grubunda 375 bulundu. Akrilamid uygulaması, kontrol grubuna göre kalın bağırsak MDA seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde yükseltirken ($p < 0,05$), akrilamid+kayısı grubu MDA seviyesi akrilamid verilen gruba göre anlamlı bir düşüş gösterdi ($p < 0,05$). Kalın bağırsak GSH düzeyleri (nmol/gyd) kontrol grubunda 1820,4, kayısı grubunda 1806,5, akrilamid grubunda 1849,6, kayısı + akrilamid grubunda 1868,2 olarak tespit edildi. Bütün gruplar arasında istatistikî olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($P > 0,05$). Kalın bağırsak GST aktivite düzeyleri kontrol grubunda 15,05, kayısı grubunda 21,25, akrilamid grubunda 339,65, kayısı+akrilamid grubunda 9,2 $\text{Ü}/\text{gr}$ protein olarak bulundu. Kontrol grubuna kıyasla akrilamid grubunda GST aktivitesinde istatistiki olarak anlamlı bir artış gözlenirken ($p < 0,05$), akrilamid grubu ile karşılaştırıldığında kayısı-akrilamid grubu GST aktivitesinde istatistiki olarak önemli derecede düşüş tespit edildi ($p < 0,05$). Kalın bağırsak GSH-Px aktivite düzeyleri kontrol grubunda 191,1, kayısı grubunda 2573,8,

akrilamid grubunda 2383,6, kayısı+akrilamid grubunda 3179,5 U/gr protein olarak bulundu. Kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında bütün gruplarda GSH-Px aktivitesindeki artış istatistiki olarak anlamlı idi ($P<0,05$). GST-Pi gen ifade düzeyleri (GST-Pi/GAPDH mRNA sinyal oranı olarak) kontrol grubunda 0,71; kayısı grubunda 0,73; akrilamid grubunda 3,00; kayısı+akrilamid grubunda; 1,50 olarak bulundu. Akrilamid grubu GST-Pi gen ifade düzeyi diğer gruplara göre anlamlı bir artış gösterirken ($p< 0,05$), akrilamid+kayısı grubu GST-Pi gen ifadesi akrilamid grubuyla karşılatırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi ($p < 0,05$).

Sonuç olarak; İnsan ve hayvanlarda yapılan araştırmalar, herhangi bir dokuda Glutasyon S-Transferaz Pi (GST-Pi) gen ekspresyonu düzeylerinin artış göstermesinin, o dokuda prekanserojenik değişikliklerin meydana geldiğini ortaya koymuştur. Bu araştırmada akrilamid uygulanan ratların kalın bağırsak dokusunda Glutasyon S-Transferaz Pi (GST-Pi) gen ekspresyonu ve malondialdehid (MDA) düzeyleri önemli derecede artmıştır. 12 hafta süreyle akrilamid uygulamasının kalın bağırsakta prekanserojenik değişiklikler meydana getirdiğini göstermektedir. Ancak, akrilamidle beraber organik kuru kayısı uygulaması, ratlarda kalın bağırsak Glutasyon S-Transferaz Pi (GST-Pi) gen ekspresyonu ve malondialdehid (MDA) düzeylerini kontrol grubu değerlerine düşürmüştür. Bu sonuç, akrilamidin kalın bağırsakta meydana getirdiği prekanserojenik ve toksik değişiklikleri, organik kuru kayısının önlediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Rat, akrilamid, kalın bağırsak, preneoplastik değişiklikler, RT-PCR, GST-Pi, organik kuru kayısı, antioksidan enzimler

ABSTRACT

In this thesis, it was aimed to investigate the possible toxic effects that subchronic doses of acrylamide with administered drinking water on the large intestine tissue and to test these effects preventability with organic dried apricots in female Spraque Dawley rats.

Forty female Spraque Dawley rats with the average weight of 200 g were divided into 4 equal groups as follows: Group 1(Control);animals in this group was administered with normal diet and normal drinking water for 12 weeks. Group 2(apricot);animals were administered daily diet with %5 apricot and normal drinking water for 12 weeks. Group 3 (acrylamide) ;animals were administered daily acrylamide 500 µg/kg via drinking water and normal diet. Group 4 (acrylamide-apricot);animals were administered daily acrylamide 500 µg/kg via drinking water diet with %5 apricot.

At the end of the 12 week-period, all rats were decapitated. Samples of large intestine were collected for biochemical analyses to measure levels of Glutathione Peroxidase (GSH-Px) activity, Glutathione-S Transferase (GST) activity, Glutathione S-Transferase Pi gene expression, Malondialdehyde (MDA),Reduced Glutathione (GSH) and Total protein.

MDA levels of large intestine in control, groups apricot, acrylamide and apricot +acrylamide were found to be 191, 197,5 , 4070 and 375 nmol/gwt, respectively. Acrylamide treatment significantly increased large intestine MDA level as compared to control ($p < 0.05$), while MDA level in group apricot +acrylamide was significantly lower than in group acrylamide ($p < 0.05$). GSH levels of large intestine in control, apricot, acrylamide and apricot +acrylamide groups were 1820,4, 1806,5, 1849,6 and 1868,2 nmol/gwt, respectively. With respect to GSH levels, no significant difference was found among the groups ($P > 0.05$). GST activities of large intestine in control, groups apricot, acrylamide and apricot +acrylamide were 15,05, 21,25 , 339,65 and 9,2 (U/g protein), respectively. GST activity of acrylamide group was significantly increased compared to control, whereas GST activity of group apricot + acrylamide was significantly reduced as compared to group acrylamide ($p < 0.05$). GSH-Px activities of large intestine in control, groups apricot, acrylamide and

apricot +acrylamide were found to be 1961,1 , 2573,8 , 2383,6 and 3179,5 (U/g protein), respectively. GSH-Px activities in 3 treatment groups were significantly higher than in control ($p < 0.05$). Level of GST-Pi gen expression (as GST-Pi/GAPDH mRNA signal ratio) in control, and groups apricot, acrylamide and apricot +acrylamide were found to be 0,71 , 0,73 , 3,00 and 1,5, respectively. Level of GST-Pi gen expression in acrylamide group was significantly elevated compared to the other groups, whereas level of GST-Pi gen expression of group apricot+acrylamide group was significantly decreased compared to that of group acrylamide ($p < 0.05$).

In conclusion, the studies on humans and animals show that increase of GST-Pi gene expression in the tissues is related to the pre-carcinogenic changes. In this study, GST-Pi gene expression and MDA levels in acrylamide group large intestine tissues significantly increased. When the organic dried apricot has been given at the same time, these levels have been decreased at the control group levels. This result shows that the acrylamide caused the pre-carcinogenic and toxic changes on large intestine tissues and the organic dried apricot has prevented these effects.

Key words: Rat, acrylamide, large intestine, precarsinogenic changes, RT-PCR, GST-Pi, organic dried apricot, antioxidant enzymes.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Akrlamid	3
2.1.1 Akrlamidin Kimyasal yapısı	4
2.1.2 Akrlamidin kimyasal olarak oluşumu	4
2.1.3 Akrlamidin gıdalarda oluşumu	7
2.1.4 Akrlamidin gıdalarda bulunuşu	8
2.1.5 Besinlerde oluşan akrilamidin azaltılmasına yönelik önlemler	10
2.1.6 Akrlamidin toksik etkileri	11
2.1.6.1 Akrlamidin nörotoksitesi	12
2.1.6.2 Akrlamidin genotoksitesi	13
2.1.6.3 Akrlamidin kanserojenik etkisi	14
2.1.6.4 Deney hayvanlarında yapılan kanserojenite çalışmaları	14
2.2 Kayısı (<i>Prunus armeniaca L.</i>)	16
2.2.1 Kayısının besin değeri	16
2.2.2 Malatya' da yetiştirilen kayısıların özellikleri	17
2.2.3 Kayısının insan sağlığı açısından önemi	19
2.3 Tez çalışmasına dahil edilen parametreler hakkında genel bilgi	20
2.3.1 Glutatyon metabolizması	20
2.3.2 Glutatyon S-Transferaz (GST) ve GST-Pi	23

2.3.3 Lipid peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA).....	25
2.3.4 Polimeraz zincir reaksiyonları (PZR).....	27
2.3.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonlarının işleyişi	27
2.3.4.2 Geri transkripsiyon PZR (RT-PZR).....	29
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	30
3.1 Gereçler	30
3.1.1 Kimyasal malzemeler.....	30
3.1.2 Kullanılan aletler	31
3.1.3 Ratların temini ve bakımı.....	31
3.2 Yöntemler.....	31
3.2.1 Grupların oluşturulması	31
3.2.2 Numune alınması ve hazırlık işlemleri	32
3.2.3 Redükte glutatyon (GSH) analizi	32
3.2.3.1 Numunelerin hazırlanması	32
3.2.3.2 Kullanılan reaktifler	32
3.2.3.3 GSH düzeylerinin tayini.....	33
3.2.4 Malondialdehit (MDA) analizi.....	34
3.2.4.1 Numunelerin hazırlanması	34
3.2.4.2 Kullanılan reaktifler	34
3.2.4.3 MDA düzeylerinin tayini	34
3.2.5. Glutatyon S-Transferaz aktivitesinin analizi.....	35
3.2.5.1 Numunelerin hazırlanması	36
3.2.5.2. Kullanılan reaktifler	36
3.2.5.3. GST aktivite düzeylerinin tayini	36
3.2.5.4. GST aktivite düzeylerinin hesaplanması.....	37
3.2.6. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesinin analizi	37
3.2.6.1. Numunelerin analizi.....	37
3.2.6.2. Kullanılan reaktifler	38

3.2.6.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin tayini	38
3.2.6.4 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin hesaplanması	39
3.2.7 Protein düzeylerinin analizi	39
3.2.7.1 Kullanılan reaktifler	40
3.2.7.2 Protein düzeylerinin analizi.....	40
3.2.8 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	41
3.2.8.1 Kullanılan araç ve gereçler.....	41
3.2.8.2 Kullanılan kimyasal malzemeler.....	41
3.2.8.3 Kullanılan çözelti ve tamponlar	42
3.2.8.4 RNA 'nın agaroz jele yükleme işlemi	43
3.2.8.5 cDNA sentez protokolü.....	44
3.2.8.6 Gerçek zamanlı PZR protokolü.....	44
3.2.9 PZR için istatistiksel analizler	45
3.2.10Biyokimyasal veriler için İstatistiksel analizler.....	45
4. BULGULAR	46
4.1 Grupların kalın bağırsak MDA düzeyleri	46
4.2 Grupların kalın bağırsak GST aktiviteleri.....	47
4.3 Grupların kalın bağırsak GSH-Px aktiviteleri.....	48
4.4 Grupların kalın bağırsak GSH düzeyleri.....	49
4.5 Grupların kalın bağırsak GST-Pi düzeyleri.....	50
4.6 Grupların haftalık ortalama ağırlıkları	53
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	63
7. KAYNAKLAR	65
EK.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	79

SİMGE ve KISALATMALAR DİZİNİ

aa: Amino asit

ABD: Amerika Birleşik Devleti

ACR: Akrilamid

BSA: Sığır serum albumini

cDNA: Komplementer DNA

CYP 450 2E1: Sitokrom P-450 ailesi-2 Enzim polipeptid alt ailesi

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksiribonükleozid trifosfat

EH: Epoksit hidrolaz

FAO: Birleşmiş milletler tarım ve gıda örgütü

FDA: Gıda ve ilaç dairesi

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

GSH: Redükte glutatyon

GSSG: Okside glutatyon

GST: Glutatyon S-transferaz

H₂O₂: Hidrojen peroksit

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

CAT: Katalaz

MDA: Malondialdehit

mRNA: Mesajcı RNA

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside)

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)

NOAEL: No observed adverse effect level

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

RT-PCR: Gerçek Zamanlı PCR

SOD: Süperoksit dismütaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

TBA: Tiyobarbitürik asit

TÜBİTAK: Türkiye Bilimsel Araştırma Merkezi

WHO: Dünya sağlık örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Akrilamidin molekül yapısı.

Şekil 2: Maillard reaksiyonu ve akrilamid oluşumu.

Şekil 3: Farklı moleküllerden akrilamid sentezi.

Şekil 4: GSH 'ın moleküler yapısı.

Şekil 5: Glutatyon oluşum mekanizması.

Şekil 6: Polimeraz zincir sisteminin basamakları.

Şekil 7: GSH standart grafiği.

Şekil 8: MDA standart grafiği.

Şekil 9: Albumin standart grafiği.

Şekil 10: Grupların Kalın bağırsak MDA düzeyleri.

Şekil 11: Grupların Kalın bağırsak GST aktiviteleri.

Şekil 12: Grupların Kalın bağırsak GSH-Px aktiviteleri.

Şekil 13: Grupların Kalın bağırsak GSH düzeyleri.

Şekil 14: Qiagen RNA easy saflaştırma kiti ile kalın bağırsak örneklerinden saflaştırılan toplam RNA örnekleri.

Şekil 15: GAPDH ve GST-Pi'lerin cDNA'larının gerçek zamanlı PZR deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi ile gösterimi.

Şekil 16: Kontrol ve uygulama gruplarında Kalın bağırsak GST-Pi/GAPDH mRNA seviyelerinin oranı.

Şekil 17: Ratların haftalık ağırlık değişimi.

TABLolar DİZİNİ

Tablo1: Farklı şekerlerin asparajın amino asidi (aa) ile birlikte ısının etkisiyle akrilamide dönüşmesi.

Tablo 2: Amerikada sıklıkla tüketilen besinlerdeki akrilamid düzeyleri.

Tablo 3: TÜBİTAK'ın Türkiyedeki çeşitli gıdalarda akrilamid tarama çalışması

Tablo 4: Yaş ve kuru kayısı'nın besin içeriği.

Tablo 5: Malatya'da yetiştirilen kayısı çeşitlerinin fenolik, karotenoid ve β -karoten miktarları

Tablo 6:Malatya'da yetiştirilen kayısı çeşitlerinin bazı mineral içerikleri

Tablo 7: Primer dizilimleri.

Tablo 8: Gruplarda ölçülen Kalın bağırsak GST-Pi/GAPDH mRNA seviyelerinin oranı.

Tablo 9: Ratların haftalık ağırlık ortalamaları.

1. GİRİŞ

Rosaceae (Gülgiller) familyasının *Armeniaca* cinsine ait olan kayısının botanik adı *Armeniaca vulgaris* Lam. (*Prunus armeniaca* L.)'dir. Bugün Türkiye yaş kayısı üretiminin yaklaşık % 50'si, kuru kayısı üretiminin ise % 95'i Malatya ilinde yapılmaktadır. Üretilen kuru kayısının çok önemli bölümü ihraç edilmekte ve dünya kuru kayısı ticaretinin yaklaşık % 80-85'i Malatya'dan sağlanmaktadır. Bütün bunların haklı bir sonucu olarak Malatya ili kayısı ile anılmaya başlanmış başlamıştır (1). Kayısı mineral maddelerden potasyum ve vitaminlerden β -karotene çok zengindir ve β -karoten A vitamini'nin öncüsüdür. A vitamini ise üreme ve büyümede, enfeksiyonlara karşı vücut direncinin artmasında önemli rol oynar. Diğer taraftan A vitamini normal vücut hücrelerinin kanserli hücreye dönüşmesinin başlıca sorumlusu olan aktif karsinojenlerden tekli oksijenin oluşmasını önlemekte veya oluştuktan sonra etkisiz hale getirmektedir. Ayrıca A vitamini organizmanın ve sağlıklı hücrelerin direncini artırarak kansere karşı koruyucu görev yapmaktadır. Kuru kayısının beslenme ve sağlık açısından en önemli bileşiklerinden biri de diyet lifidir. Diyet lifi sindirim sistemimizde salgılanan enzimler tarafından hidrolizlenemeyen polisakkarit ve lignin gibi bileşiklerden oluşmaktadır. Diyet lifi kabızlık, apandisit, hemoroit, diş hastalıkları, şişmanlık, şeker hastalığı, koroner kalp hastalıkları ve kolon kanseri gibi hastalıkların oluşum riskini azaltmakta, bağırsakların düzenli çalışmasını sağlamaktadır (2).

Akrilamid doğal olarak bulunmamakla birlikte oldukça yüksek kimyasal aktiviteye sahip α - β -ansature karbonil bileşiği olup oldukça yaygın kullanılmaktadır. Araştırma laboratuvarlarında özellikle moleküler biyolojide yoğunlukla kullanılmakta, matbaacılık ve tekstil sektöründe, atık suların iyileştirilmesinde, losyon deodorant gibi kozmetik sektöründe kullanılan katkı maddesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Gıdaların yüksek sıcaklık derecelerinde pişirilmesiyle de akrilamid oluşmaktadır.

Akrilamidin, sıçan ve fareler için kanserojen ve genotoksik olduğu ve belli dozların üzerine çıktığında ise, insan ve hayvan sinir sisteminde nörotoksisiteye yol açtığı bilinmektedir.

İnsanlarda kanser oluşumuyla henüz bir bağlantısı kanıtlanmasa da

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından “muhtemelen insanlar için kanserojen (Grup 2A)” olarak değerlendirilmesine neden olmuştur (3). Redükte glutatyon (GSH) vücudun en önemli non-enzimatik antioksidan moleküllerinden biridir. GSH, serbest oksijen radikallerini (SOR) non-enzimatik yolla detoksifiye ederek dokuları oksidatif stres’in zararlı etkilerinden korumaktadır. Çok daha önemli olan diğer bir işlevde, dokuların en önemli enzimatik antioksidanlarından olan glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi için şiddetle ihtiyaç duyulan bir koenzim olmasından ileri gelmektedir. Fizyolojik şartlarda tüm dokularda oksidanlarla antioksidanlar arasında bir denge söz konusu olup bu oksidan/antioksidan dengesi, vücut da doğal olarak üretilen SOR’ ların etkisizleştirilmesini ve dokuların radikallere bağlı hasarlanmalardan korunmasını sağlamaktadır.

Ağız yoluyla alınan akrilamid, sindirim sistemi boyunca yeterli düzeyde GSH’ın varlığında, GST ile akrilamid-glutatyon formuna dönüştürülerek etkisizleştirilir ve vücut dışına rahatlıkla atılabilmektedir. Yanlış, akrilamidin sulu ortamlarda kolaylıkla çözünebilme özelliği nedeniyle akrilamidin bir kısmında tüm vücut dokularına dağılım gösterir. Vücudun tüm dokuları, GST / GSH seviyelerine bağlı olarak akrilamidi GSH ile konjuge ederek etkisiz hale getirebilirler. Akrilamid ayrıca, karaciğerde Sit P450 2E1 (CYP 450 2E1) ile okside edilerek çok daha genotoksik olan glisidamid’e dönüştürülür. Glisidamid molekülünde GST / GSH sistemiyle glisidamid-glutatyon şekline çevrilerek detoksifiye edilir ve vücut dışına idrarla atılır. Ancak, ortamda yeterli düzeyde GSH’ın bulunabildiğinde akrilamid katabolize edilebilmekte ve vücut dışına atılabilmektedir.

Yüksek miktarlarda ve uzun süreli akrilamidin vücuda alınması, genel olarak tüm vücut dokularında bir GSH azalmasına neden olabilmektedir. Bu durum radikallerin nonezimatik detoksifikasyonu ve GSH gerektiren enzimatik detoksifikasyon kapasitesinde düşüşe neden olmaktadır. Dokuların oksidan / antioksidan dengesi oksidanların lehine bozulur ve dokuların hasarlanması olarak ifade edilen oksidatif stres bilançosu şeklinde kendini belli eder. Oksidatif strese bağlı olarak dokuların GSH düzeyindeki azalma, ağızdan alınan akrilamidin yeterli düzeyde detoksifiye edilememesine neden olmaktadır. Bu durumda akrilamid karaciğerde Sit P450 2E1 ile okside edilerek çok daha toksik bir madde olan

glisidamid'e dönüştürülmektedir. Sonuç olarak da dokularda genotoksik etkiler meydana gelmektedir.

Bu araştırmanın amacı: dişi Spraque Dawley ratlara 12 hafta süreyle subkronik dozda akrilamid verilerek kalın bağırsak dokusunda meydana gelebilecek toksik ve karsinojenik değişiklikleri incelemek ve organik kuru kayısı'nın akrilamid kaynaklı bu toksik ve karsinojenik değişiklikleri önleyip önleyemediğinin test edilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKRİLAMİD

Tabiatta doğal olarak bulunmayan akrilamid, ancak kimyasal olarak sentezlenebilen oldukça toksik doymamış çift bağ içeren bir amiddir. Akrilamid, ilk olarak 20.yy ortalarında özellikle Amerika'da kimyasal yollarla sentezlenmiş ve tekstil, kâğıt, kozmetik sanayi içme sularının iyileştirilmesi gibi çok değişik endüstriyel alanlarda kullanılmaya başlanmıştır (4).Ayrıca yapılan araştırmalarda sigaranın da bileşeni olduğu bildirilmiştir (5). Son yapılan araştırmalarda, yüksek sıcaklık derecelerine maruz bırakarak hazırlanan besinlerde de akrilamid oluştuğu keşfedilmiştir. Yapılan araştırmalar, gıdaların 120 °C'nin üzerindeki sıcaklık derecelerinde pişirilmesi (özellikle kızartma, gril, ya da fırınlama) sırasında bol miktarda akrilamidin meydana geldiğini ortaya koymuştur. Pişirilme sırasında meydana gelen akrilamid miktarı, maruz bırakılan sıcaklık derecesi ve süresi ile doğru orantılı olarak artmaktadır (6).

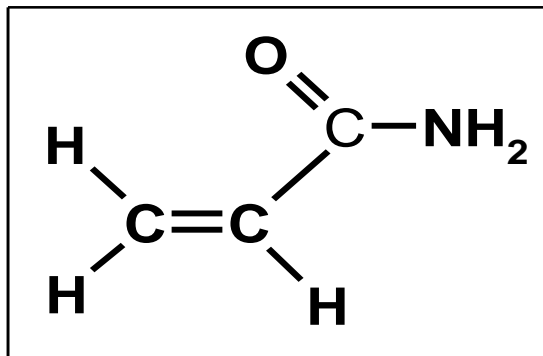
Akrilamid ve bisakrilamid birimlerinin polimerizasyonu ile yüksek moleküler ağırlıklı polimerik özelliği olan poliakrilamid oluşumu söz konusudur.

Yüksek moleküler ağırlıklı bu polimerler, kimyasal olarak inert (tepkisiz), nontoksik ve genellikle de kararlı yapılardır. Poliakrilamid, matbaacılık ve tekstil sektöründe kâğıdın dayanıklılığını arttırmada, atık suların arıtılması işleminde yoğunlaştırma basamaklarında, losyon, deodorant, parfüm gibi birçok farklı kozmetik ürünlerin hazırlanması sırasında yağlı ve yumuşatıcı bir özellik kazandırmak için katkı maddesi olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bununlada

kalmayıp poliakrilamid, araştırma laboratuvarlarında elektroforez ve kromatografi gibi moleküler biyoloji uygulamalarında, proteinlerin saflaştırılması çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır (5).

2.1.1 Akrlamidin kimyasal yapısı

Akrlamid doymamış çift bağ içeren bir amiddir. Diğer isimleri etilen karboksamid, propenoik asit amid, akrilik amid ve vinil amiddir (Şekil 1:) (6).



Şekil 1: Akrlamidin molekül yapısı

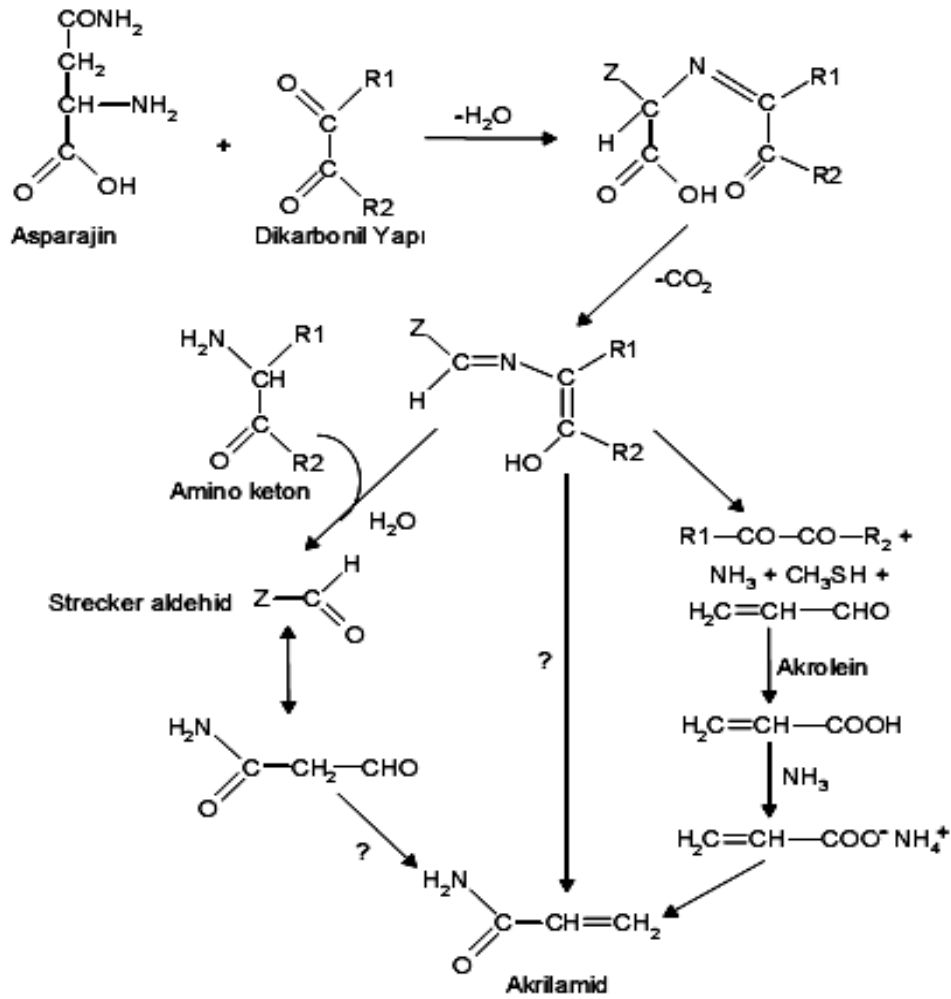
Sıvı halde iken beyaz bir kristal gibi görülen akrilamid oda sıcaklığında kokusuz, tatsız, katı ve suda yüksek çözünürlüğe sahiptir. Erime sıcaklığı 84.56 °C, kaynama sıcaklığı 125.6 °C'dir. Molekül ağırlığı 1.08 g/mol olan akrilamid suda ve diğer polar çözücülerde (aseton, metanol, etanol vb) kolaylıkla çözünürken; polar olmayan çözücülerde çözünmez (7).

Akrilamid üre CO(NH₂)₂ ve formaldehit (HCHO) veya glioksal (CHO)₂, aldehitler (RCHO), aminler (R₂NH), tiyoller (RSH) gibi küçük reaktif moleküllerle reaksiyona girebilmektedir (8).

2.1.2 Akrlamidin kimyasal olarak oluşumu

Gıda kaynaklı akrilamid, 120 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda glukoz ya da fruktoz gibi monosakkaritlerle asparajin gibi aminoasitler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (Şekil 2) (9,10).

Proteinlerin yapısına giren standart 20 aminoasitten özellikle asparajin, akrilamid oluşumunda başrolde yer almaktadır.



Şekil 2: Maillard Reaksiyonu ve Akrilamid Oluşumu

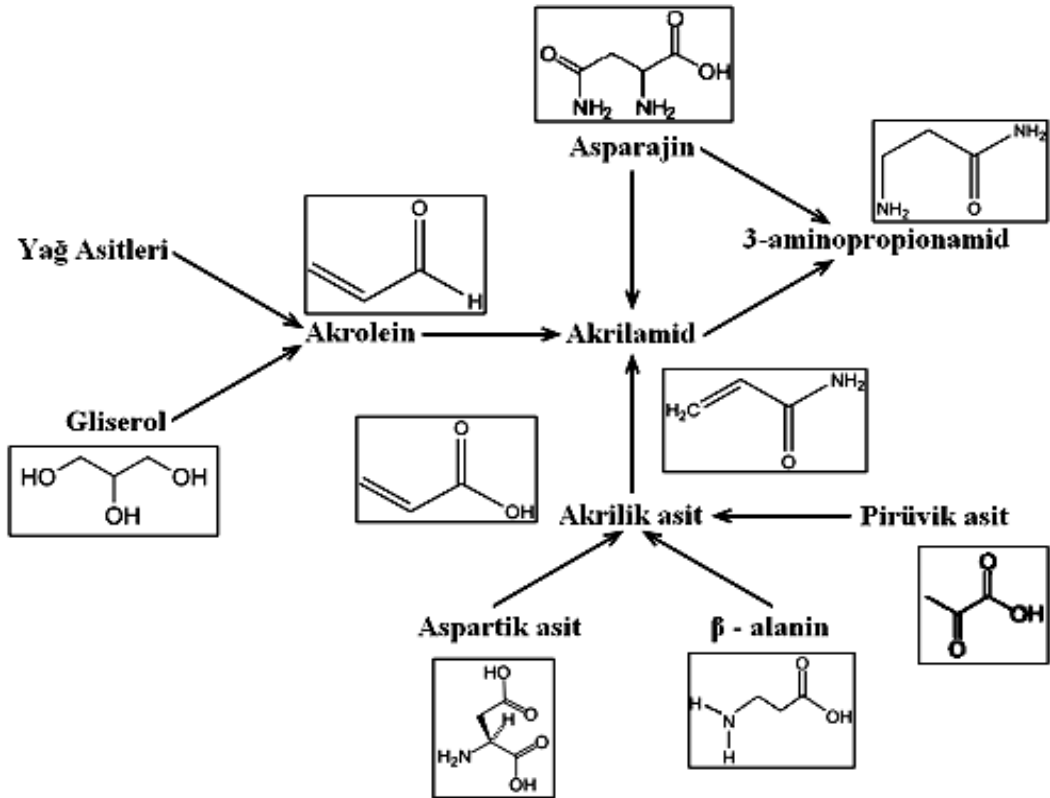
Araştırmalar, akrilamid oluşumunda glukozun fruktoz ya da galaktozdan daha etkili olduğunu göstermiştir (Tablo 1.) (11).

Asparajin amino asidi dışında akrilamid oluşumuna asparajin aa kadar etkili olmasada; glutamin, sistin, arginin, metiyonin ve aspartik asit gibi amino asitler de neden olmaktadır (12).

Akrilamid oluşumunda sadece asparajin yolu olmadığı; akrilik asit, akrolein gibi farklı maddeler üzerinden akrilamid oluşum yollarının da var olduğu ancak asparajin yolu kadar etkili olmadığı yapılan araştırmalar sonucunda görülmüştür (8). Akrilamidin farklı moleküllerden oluşum yolları Şekil 3.'de verilmiştir

Tablo 1: Farklı şekerlerin asparajin aa ile birlikte ısının etkisiyle akrilamide dönüşüm potansiyelleri (170 °C 'de 30 dk sonunda).

KARBONHİDRAT	AKRİLAMİD
Glukoz	9.6 mmol
Fruktoz	8.9 mmol
Laktoz	8.1 mmol
Riboz	7.6 mmol
Arabinoz	6.7 mmol
Eritroz	6.4 mmol
Sukroz	5.7 mmol



Şekil 3: Farklı moleküllerden akrilamid sentezi

2.1.3 Akrilamidin gıdalarda oluşumu

Gıdaların pişirme süresi ve sıcaklığı ile akrilamid oluşumu arasında yakın bir ilişki vardır aynı gıda tiplerinin farklı ürünleri veya aynı ürünlerin farklı tarihlerde üretilmiş olanları arasında bile akrilamid içeriği bakımından farklılıklar göstermektedir. Pişirme şeklinin de akrilamid oluşumunda etkisi olduğu bilinmektedir. Bazı araştırmalarda haşlanarak pişirilen gıdalarda akrilamidin oluşmadığı bildirilmiştir (13).

Yağ süt ve şekerin yüksek sıcaklıkta pişirilmesinin gerek bisküvide gerekse muhallebi ve bunlar gibi diğer birçok ürünlerde maillard reaksiyonu oluşmakta ve bu sağlığı olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Maillard reaksiyonu nedeniyle sütteki proteinlerin kullanılmaz hale geldiği sonuç olarak da karaciğerde toksik etkiye sebebiyet verdiği görülmüştür (14).

Besinlerin sahip olduğu asparajin ve indirgen şekerler (başlıca glukoz ve fruktoz) yönünden bileşimi, türü, saklama koşulları, mevsimsel değişiklikler de akrilamid miktarı üzerine farklılıklara yol açmaktadır.

Yapılmış birçok çalışmada besinlerin pH değeri ve su içeriğinin de akrilamid oluşumuna etki ettiği ve ortamda Maillard reaksiyonuna girmeye uygun diğer aminoasitlerin bulunmasının akrilamid oluşumunu azalttığı belirtilmektedir (14).

Akrilamidin gıdalarda oluşumunun kanıtlanmasından sonra dünya çapında birçok resmi kuruluş bu tehlikeli maddenin oluşumu ve azaltılması üzerine çalışmalar başlatmışlardır. Yayınlanan raporlarda, yürütülmekte olan üretim basamaklarında yapılan iyileştirmelerle, patates cipslerindeki akrilamid miktarlarında % 30–40 oranında azalma sağlanabileceği bildirilmiştir (15). Yalnız bu iyileştirmelerin patates cipsi üreticileri tarafından hangi yaygınlıkta uygulandığı belirsizliğini hala korumaktadır. Benzer öneriler ve durumlar oldukça yaygın kullanılan kahve ve kahvaltılık gevrekler için de söz konusu konumunu korumaktadır.

Çeşitli gıda modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda akrilamid miktarının azaltılabilmesi için birçok seçeneğin var olduğu belirtilmektedir. Bu seçeneklerden

en verimli olan yöntem ise; akrilamid oluşumunda öncül madde olan asparajin aa'nin pişirme öncesinde gıdaya asparajinaz ilave edilerek yıkılması ve akrilamid oluşumunun engellenmesidir. Bunun yanı sıra asparajinin azaltılmasına yönelik alternatif yöntemler de vardır. Akrilamid miktarının azaltılması için önerilen diğer yöntemler ise temel gıda bileşenlerinin değiştirilmesi (Maillard reaksiyonuna asparajinle yarışmalı olarak giren aminoasitlerin katılması gibi) ve pişirme şartlarının değiştirilmesidir (sıcaklığın süresinin ve derecesinin düşürülmesi gibi) (15). Oldukça meşakkatli olan bu önerilerin işletmelerce uygulanıp uygulanmaması belirsizliğini korumaktadır. Bu noktada üretim yöntemlerinin tüketici memnuniyeti, ürünlerin besleyicilik özellikleri ve olası zararlı maddelerin oluşumu üzerine etkilerinin de değerlendirilmesi gerektiği şüphesizdir.

2.1.4 Akrilamidin gıdalarda bulunuşu

Akrilamid, toksik etkilerinin başlangıç konsantrasyonlarının tam olarak bilinemediği kimyasallar grubunda değerlendirilmektedir. Akrilamidin de yer aldığı bu grup kimyasal maddeler, çok düşük konsantrasyonlarda dahi bir risk taşıyabilmekte ve bunlar için tamamen zararsız denmesi mümkün olmamaktadır. Vücuda alınan akrilamid miktarının artışı ve maruz kalınan sürenin uzaması oluşan hastalık riskinde o denli etkili hale getirebilir.

24 Nisan 2002'de İsveç Ulusal Yiyecek Ajansı ve Stockholm Üniversitesi 120 °C'nin üzerindeki sıcaklık derecelerinde özellikle kızartılmış veya pişirilmiş yiyeceklerde yoğun miktarlarda akrilamid oluştuğunu dünya kamuoyuna duyurduktan sonra çok sayıda kuruluş da kendi ülkelerindeki gıdaların akrilamid düzeylerini ve sınır değerlerini tespit etmek üzere çalışmaya başlamışlardır.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. FDA) 2002 yılından beri periyodik olarak her yıl piyasadan örneklerini aldığı gıda maddelerinde akrilamid ölçümleri yapmakta ve bu sonuçları kendi Web sitesinden kamuoyuna duyurmaktadır (Tablo 2) (16).

Tablo 2: Amerikada sıklıkla tüketilen besinlerin akrilamid içerikleri

Gıda/Gıda ürünleri	Akrilamid düzeyi (µg/kg)			
	Ortalama	Ortanca	Alt-üst	Örnek sayısı
Patates cipsi	1312	1342	170-2287	38
Patates kızartması	537	330	<50-3500	39
Hamur ürünleri	36	36	<30-42	2
Fırınlanmış ürünler	112	<50	<50-450	19
Bisküvi, kraker, tost	423	147	<30-3200	58
Kahvaltılık tahıllar	298	150	<30-1346	29
Mısır cipsi	218	167	34-416	7
Sütlü ekmek	50	30	<30-162	41
Balık ve deniz ürünleri	35	35	30-39	4
Kümes hayvanları	52	52	39-64	2
İnstant malt içecekleri	50	50	<50-70	3
Çikolata tozu	75	75	<50-100	2
Kahve tozu	200	200	170-230	3

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi laboratuvarında yapılan Türkiye'deki akrilamid taramalarında evde taze patatesin soyularak kızartılmasına oranla fast-food ürünü olarak doğranıp dondurulmuş patatesteki çok daha yüksek miktarda akrilamid oluştuğunu göstermektedir (Tablo 3). TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi tarafından yapılan bu çalışmada tesadüfi yöntemle ev yemekleri, kavrulmuş çerezler, ekmek ve fırıncılık mamulleri, cipsler, kahve, bisküvi, kraker, çikolata, bebek mamaları, patates kızartmaları, geleneksel Türk tatlıları, pekmez, ızgara, kebab, döner ve köfte gibi geleneksel gıdalardan örnekler alınmıştır. 9 ay süren çalışmanın sonunda bu gıda ürünleri nin akrilamid düzeyleri tespit edilmiştir. Bu araştırmanın sonuçları Tablo 3.'de verilmiştir.

Tablo 3: TÜBİTAK`ın Türkiye deki çeşitli gıdalarda akrilamid tarama çalışması

Gıda maddesi	Akrilamid ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Pirinç pilavı	Ölçülebilir değerin altında
Tahin helvası	Ölçülebilir değerin altında
Kebap, döner, ızgara	Ölçülebilir değerin altında
Çavdar ekmeği	Ölçülebilir değerin altında
Beyaz ekme (kabukta)	40-160
Kızarmış ekme (hazır)	200
Hazır çorbalar	40-60
Tulumba tatlısı	40-45
Bebe bisküvisi	400-600
Bisküvi	70-130
Kraker	70-200
Kahvaltılık gevrekler	80-350

Akrilamidin cips, kraker, kahvaltılık gevrekler, bisküvi ve bebe bisküvileri ile patates ve ekme kızartmalarında yüksek miktarlarda olduğu tespit edilmiştir. Tulumba tatlısı ve beyaz ekmeğin kabuğunda da kayda değer oranda akrilamid bulunduğu ortaya konulmuştur. Ancak ekmeğin iç kısmında, ızgara, döner, tahin helvası, çavdar ekmeği, baklava ve pilavda ise akrilamid düzeyleri ölçülebilir değerlerin altında bulunmuştur. Gıdaların haşlanması sırasında da akrilamid oluşumu söz konusu olmadığı görülmüştür (10).

WHO yüksek düzeyde akrilamid içeren gıdaların insan sağlığını tehdit etmesi nedeniyle yasaklanması ya da bu gıdaların ambalajlarına “insan sağlığına zararlı akrilamid maddesi içerir” uyarı yazısının konulması gerektiği yönünde görüş bildirmiştir.

2.1.5 Besinlerde oluşan akrilamidin düşürülmesine yönelik önlemler

- Patateslerin suya daldırılması: Pişirme veya kızartma işlemi gerçekleşmeden önce patateslerin ılık suda, sıcak suda veya oda ısısında bekletilmesi.

- Kızartma işleminden önce suyunu iyi arıtma (suda bekletilen patatesin).
- Kızartma işlemi öncesinde uygulanan haşlama işlemi patatesten glukoz ve asparajin içeriğini azaltmıştır (17, 18).
- Asparajin düzeyi: Patatesin önemli bir bileşendir, düzeyinin kontrol edilmesinin pratik olduğu ile ilgili fikirler net değildir.
- Asparajinaz enziminin kullanımı etkileşimi durdurmaktadır. (Maillard reaksiyonunu). Fakat konuyla ilgili daha ileri çalışmalar gerekmektedir.
- Örneğin: patatesi % 0.5-1.0'lik sitrik asit çözeltisinde en az 20 dakika bekletme, akrilamid oluşumunu önemli ölçüde azaltmaktadır.
- pH'yı düşürme: Akrilamid oluşumunu %20-30 oranında azaltmaktadır,
- Soğuk depolama önlemi: 8 °C'nin altında depolama'nın indirgen şeker miktarını azalttığı bildirilmiştir.
- Pişirme süresi ve ısısı'nın düşürülmesi. Ancak tüm besinler patojenleri öldürecek kadar pişirilmelidir.
- Derece ve pişirme kuralları: Başlangıç kızartma derecesinin 175 °C olması.
- Geleneksel fırınlarda pişirme ısısı 200 °C'yi, fanlı fırınlarda 190 °C'yi geçmemesi.
- Altın sarısı rengi vermek için glukoz/dekstroz solüsyonuna daldırmanın yapılmaması (özellikle patatesin kızartılmasında).
- Galetaya bulanmış ürünlerin tekrar pişirilmesi önemli oranda akrilamid düzeyini artırdığından bu ürünlerin çok fazla tercih edilmemesi.
- Dışarıda donmuş ve korunmamış patateslerin tercih edilmemesi.
- Tahıl ürünlerinde amonyum bikarbonat yerine sodyum hidrojen karbonatın yükseltgenme ajanı olarak kullanılması akrilamid düzeyini azaltmaktadır.

2.1.6 Akrilamidin toksik etkileri

Akrilamid'in hayvanlarda kansere sebebiyet verdiği ve belli dozların üzerine çıkıldığında ise insan ve hayvan sinir sisteminde nörotoksositeye yol açtığı bilinmektedir. Farelerde yapılan araştırmalar; akrilamidin, gıdaların pişirilmesi sırasında oluşan diğer kanserojenlere benzer bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. İnsanlar için, gıda kaynaklı kanserojen ajanların etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Akrilamidin diyetle, diğer gıda kaynaklı kanserojenlere oranla daha yüksek düzeylerde bulunması, akrilamidin kanserojen olabileceği şüphesini ciddi derecede arttırmış ve üzerindeki çalışmaları yoğunlaştırmıştır (19).

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar da, monomerik bir yapıya sahip olan akrilamidin gerek sinir gereksede üreme sistemlerinde hücresel hasara neden olduğu ve özellikle hormonal duyarlılığı olan dokularda tümör gelişimini indüklediği bildirilmiştir (20).

İnsanlar üzerinde yürütülmüş epidemiyolojik çalışmalarda gıda kaynaklı akrilamide yoğun olarak maruz kalan toplumlarda nörotoksisitenin önemli oranda ilerlemiş olduğu ancak kanser riskinde böyle bir artışın olmadığı ileri sürülmüştür. (21,22).

2.1.6.1. Akrilamidin Nörotoksisitesi

Laboratuvar hayvanları ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalar da, akrilamidin nörotoksik olduğu bildirilmiştir (23,24).

Yapılan bu çalışmalar, akrilamidin farklı doz protokollerinin özellikle oral ve damar içi uygulamalarında meydana gelen doku hasarlarının mekanizmalarının ortaya çıkartılmasına yönelik olmuştur. Bazı çalışmalarda sinirsel dokulardaki morfolojik ya da biyokimyasal değişiklikler incelenmişken, bazı çalışmalarda sadece nörotoksisitesi incelenmiştir. Birkaç çalışmada ise akrilamid toksisitesinin zamanla değişimi, biyokimyasal ve morfolojik parametreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Fullerton ve ark. (25) sıçanlara akut ve subakut dozda akrilamid vererek yaptığı çalışmada, akrilamidin nörotoksik etkilerine bağlı olarak sıçanların arka ayaklarında zayıflık, arka ayakları sürüklenme ve kısmi felçlere neden olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada dişi sıçanlara 100 mg/kg ya da 203 mg/kg (LD50) dozda akrilamid verilmiş. 203 mg/kg akrilamid uygulanan grupta 48 saat boyunca bir titremenin net bir şekilde görüldüğü ve ayrıca bu sıçanların ya hemen iyileştikleri ya da 2-3 gün içinde öldüklerini bildirmişlerdir. Diğer grupta ise verilen ilk 100 mg/kg'lık dozdan sonra sıçanlarda titreme başlamış ve 24 saat sonra uygulanan ikinci dozdan sonra halsizlik, bünyede zayıflık ve bunu takip eden 3 gün içinde ölümle sonuçlanan bir tabloyla karşılaştıklarını bildirmişlerdir. (25)

Fullerton ve ark. aynı araştırmada, erkek ve dişi sıçanlara 15 gün boyunca sonda yoluyla 50 mg/kg akrilamid uygulamışlardır. Bu işlem çok ciddi bünye zayıflığına ve sıçanların ölümüne sebebiyet vermiştir. Doz azaltılarak haftanın 5 günü 25 mg/kg akrilamid 20 seans şeklinde uyguladıklarında ise bacak kaslarında gözle görülür bir zayıflık tespit etmişler ve ardından 28. doza ulaştıklarında ise vücudun her yerinde ciddi zayıflıklar gözlemlenmişlerdir. Tam olarak iyileşme ancak uygulama bittikten 4 hafta sonra gerçekteşebilmiştir. Akrilamidin nörotoksik etkilerini inceleyen çalışmalar sıçan, fare, maymun, köpek ve kediler üzerinde yoğun olarak sürdürölmektedir (26).

2.1.6.2. Akrilamidin Genotoksisitesi

Akrilamid ve metabolitleri (glisidamid gibi) hem genotoksik (mutajenik) hemde kanserojendir. Akrilamidin bu iki etkisiyle ilgili olarak memelilerde yapılmış olan çok sayıdaki araştırma da, akrilamidin memeliler için genotoksik ve kanserojen olduğunu ortaya koymaktadır (27,28). İnsanlarda glisidamid oluşumunun çok düşük düzeylerde gerçekteşmesi nedeniyle akrilamidin insanlar üzerindeki mutajenik etkisi hayvanlara göre daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Akrilamidin insanlar için 2A grubu bir kanserojen olduğunu belirten Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), bu kararını akrilamidin kemirgenlerin üreme ve somatik hücrelerinde yaptığı kromozomal anormalliklere ve gen mutasyonlarına dayandırmıştır (29). Labaratuvarında yapılan hücre kültürü çalışmalarında da akrilamidin gen mutasyonları ve kromozomal anormalliklere neden olduğu bildirilmiştir (30).

Son zamanlarda yapılmış birçok çalışmada, akrilamid'in canlılarda genotoksik olduğunu ve genotoksisitesiye sebebiyet verenin akrilamid'den ziyade glisidamid olduğu bildirilmiş. Hayvanlara verilen glisidamidin aynı dozdaki akrilamidden daha mutajenik olduğunu tespit edilmiştir (31,32,33). Glisidamid ya da akrilamid ile muamele edilen hücrelerin, kendiliğinden mutasyona uğrayan kontrol hücrelerine oranla daha fazla A→G geçişleri ve G→C transversion'larını göstermişken, glisidamid ile muamele edilen hücrelerde G→T transversion'ları çok daha yüksek düzeylerde gerçekteştiği ortaya konmuştur (31,34).

2.1.6.3. Akrilamidin Kanserojenik Etkisi

Akrilamidin içme suyu veya diğer yollarla uzun süre verilmesi fare ve sıçanlarda çeşitli organlarda tümör gelişmesine neden olmaktadır (20,35,36). Akrilamid; farelerde alveol kaynaklı akciğer tümörü oluşumuna, dermal uygulamalarda deri tümörlerine sebebiyet verirken, sıçanlarda testis, tiroid ve memeye ilgili tümör oluşumunu tetiklemektedir (20). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, hipofiz ve klitoral salgı bezlerinin adenoması, ağız boşluğunun papilloması, rahmin adenokarsinoması ve böbreküstü bezine ait tümörlere rastlanılmıştır (20).

Deney hayvanlarında ağızdan alınan akrilamidin önemli bir bölümü, kimyasal olarak tepkisel ve genotoksik olan glisidamide dönüşür. Glisidamidin kanserojen olduğunu tam olarak ortaya koyan bir araştırma bulunmamaktadır, ancak bu bileşikle ilgili araştırmalar yoğun şekilde sürmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalarda ise akrilamidin insanlarda kansere yakalanma riskini arttıran kesin ve kati bir olguya rastlanmamıştır (21,37,38). Yüksek miktarda akrilamide maruz bırakılan işçilerde pankreas kanseri insidansı ikiye katlanmışken, bu durumun tutarlı bir maruz kalma-etki ilişkisi saptanamamıştır (37) .

Bazı avrupa ülkelerinde kanser oranları üzerine yapılan çalışmalarda, akrilamid içeren gıda ve içeceklerin tüketimi ile böbrek, kalın bağırsak, idrar kesesi, ağız boşluğu, yutak, gırtlak, yemek borusu, göğüs ve yumurtalığı kapsayan çeşitli yerlerdeki kanser oranları arasında direkt bir ilişki olmadığını bildirilmiştir (39,40,41).

2.1.6.4. Deney Hayvanlarında Yapılan Kanserojenite Çalışmaları

Sıçanlarda ve farelerde akrilamid'in kanserojenitesi ile ilgili birçok çalışma yayımlanmıştır. Sıçanlarda iki yıllık bir çalışmayı farelerde daha kısa süreli birçok çalışmayı içeren bu deneylerde akrilamid, çeşitli yollarla sistemli bir şekilde verildiğinde, gerek farelerin (42,43) gerekse de sıçanların (35) çeşitli dokularında tümör gelişmiştir. Akrilamid, vücuda girdikten sonra oksidasyona uğrayarak genotoksik bir metabolit olan glisidamide (44,45) dönüştürülebilmektedir.

Yapılmış bir başka çalışmada, yiyeceklerin pişirilmesi esnasında özellikle bir amino asid olan asparagin ile glukoz gibi şekerler (46,9) arasındaki Maillard reaksiyonu sonucunda akrilamidin oluştuğu gösterilmiştir. Gıda kaynaklı akrilamid'den dolayı insanlarda oluşabilecek olası kanser risklerini saptamak için toplumun büyük bir kısmını içine alan çok sayıda epidemiyolojik çalışma planlanmış ve bir kısmı da yapılmaya başlanmıştır.

Akciğer tümörü gelişimi üzerine akrilamidin etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, erkek ve dişi farelere sondayla çeşitli dozlarda akrilamid verilmiş, hayvanlar yedi ay sonra dekapite edildiğinde, akciğer adenoma'lı farelerin sayısında ve fare başına akciğer adenomaları sayısında doz ile alakalı önemli bir artış olduğu saptanmıştır (36). Bir diğer çalışmada, 8 haftalık 16 erkek ve 16 dişi fareye vücut ağırlıklarına göre çeşitli dozlarda akrilamid uygulanmış. Uygulama karın zarı içine sekiz hafta boyunca haftada üç defa olacak şekilde yapılmıştır. Akrilamid uygulaması, en yüksek doz seviyesinde (60 mg/kg) hayvanlarda nöropati ve düşük hayatta kalma yüzdesine yol açması nedeniyle sonlandırılmıştır. Diğer gruptaki hayvanlar uygulamayı takip eden 6. aya kadar yaşamış, ancak 6. ayın sonunda dekapite edildiklerinde erkeklerde akciğer adenoma gelişim oranlarının doza bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir (36).

5-6 haftalık erkek ve dişi sıçanlarda yapılmış bir başka çalışmada, iki yıl boyunca içme suyuna akrilamid verilmiş ve çalışmanın sonunda en yüksek dozu alan her iki cinsiyetten hayatta kalan hayvan sayısı oldukça azalmıştır. Çalışmada erkeklerde tiroid bezi ile testis tümörü oranlarında dişilerde ise meme, merkezi sinir sistemi, tiroid bezi, ağız boşluğu, rahim ve klitoral salgı bezi tümörlerinin oranlarında da önemli artışlar gözlemlenmiştir (35). Yang ve ark. (19), akrilamid verilen sıçanların testislerinde meydana gelen toksik etkileri araştırmış ve akrilamidin sperm kalitesini etkilediğini ve sperm konsantrasyonu'nu azalttığını bildirmişlerdir. Histopatolojik incelemeler de ise; testislerde çok sayıda histopatolojik değişikliğin olduğunu ve toksik etki nedeniyle çok sayıda Leyding hücresinin öldüğünü, sperm noksanlıklarının ve çeşitli histopatolojik anormalliklerin meydana geldiğini bildirmişlerdir.

2.2. Kayısı (*Prunus armeniaca L.*)

Rosaceae (Gülgiller) familyasının *Armeniaca* cinsine ait olan kayısının botanik adı *Armeniaca vulgaris* Lam. (*Prunus armeniaca L.*)'dir. Birçok araştırmacıya göre kayısının anavatanı Çin ve Orta Asya olup, Büyük İskender'in Asya seferleri sırasında (M.Ö.330–323) İran ve Transkafkaslar yolu ile Anadolu'ya getirilmiştir (1).

Bugün Türkiye'nin yaş kayısı üretiminin yaklaşık % 50'si, kuru kayısı üretiminin ise % 95'i Malatya ilinde yapılmaktadır. Üretilen kuru kayısının çok önemli bölümü ihraç edilmekte ve dünya kuru kayısı ticaretinin yaklaşık % 80-85'i Malatya'dan sağlanmaktadır. Malatya ile kayısı özdeş iki kelime haline gelmiştir.

2.2.1. Kayısının besin değeri

100 gr. yaş ve kuru kayısının besin değerleri aşağıdaki Tablo 4.'de verilmiştir (47).

Tablo 4: Yaş ve kuru kayısının besin içeriği.

İçerik	Yaş Kayısı (100 gr'da)	Kuru Kayısı (100 gr'da)
Su (%)	86.3	31.1
Enerji (Kcal)	48.0	48.0
Protein (%)	1.4	3.65
Lipid (%)	0.39	0.46
Karbonhidrat (g)	11.12	61.75
Vitamin A (I.U)	2.612	7.420
Vitamin B1 (mg)	0.3	0.1
Vitamin B2 (mg)	0.04	0.16
Vitamin C (mg)	10	12
Kalsiyum (mg)	17	67
Demir (mg)	0.54	4.7
Sodyum (mg)	10	26
Potasyum (mg)	296	1378
Fosfor (mg)	23	108

2.2.2. Malatyada yetiştirilen kayısıların özellikleri

Malatya’da yetiştirilen kayısının mineral içeriği Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES) ile ölçülmüş ve olgun kayısının kuru madde, kül, ham protein, ham lif, pH, asidite, suda çözünebilen içerik ve mineral içerik miktarları da belirlenmiştir (48).Yapılan ölçümlerde; ham protein %2.8–4.29, ham yağ % 0.55– 3.12, ham lif % 0.77–2.41, kül % 2.72–5.34, suda çözünebilen içerik % 48.3–74.7, alkolde çözünebilen içerik % 19.9–25.9, kuru madde% 16.73–22.63, pH 4.16–5.23 ve asidite oranı % 0.17–0.79 (mallik asit) şeklinde belirlenmiştir (47). Bütün çeşitler yüksek miktarda 20791–33364 ppm K, 1436.49–2643.42 ppm P, 843.28–1896.53 ppm Ca, 773.95–1129.74 ppm Na, ve 402.82–765.62 ppm Mg içermektedirler. Antioksidan içeren meyveler arasında özellikle kayısı gerek kendine has şekli ve rengiyle gerekse de içerdiği farklı mineral (Na, K, P, Mg) ve antioksidanlar (likopen, β -karoten, A, E vitamini) bakımından beslenmede önemlidir. İki-üç adet taze kayısı kişinin günlük kalori ve β -karoten ihtiyacının karşılayabilir (49). Malatya’da yetiştirilen 9 farklı kayısı çeşidinin toplam fenolik, karotenoid, β -karoten miktarları Tablo 5: ve 6:’da verilmektedir.

Tablo 5: Malatyada yetiştirilen kayısı çeşitlerinin fenolik, karotenoid ve β -karoten miktarları (mg/100g kuru madde olarak) (49).

Kayısı Çeşidi	Toplam Fenolikler	Toplam Karotenoidler	β -karoten
Hacıhaliloğlu	5341.29± 206.05	21.87 ± 1.99	8.88±0.62
Hasanbey	5827.98±401.84	50.78 ± 7.49	22.02 ± 4.5
Soğancı	4965.99±355.64	23.29 ± 7.04	9.18±2.97
Kabaası	5822.03 ± 73.72	40.00 ± 2.85	26.18±0.16
Çöloğlu	5674.25±459.27	14.83 ± 1.47	5.74 ± 0.50
Çataloğlu	6107.21± 209.41	32.08 ± 7.14	17.53±4.89
Hacı kız	6592.38 ± 59.83	22.81 ± 0.99	13.05±0.37
Tokaloğlu	4233.70± 174.03	50.07 ± 3.12	21.59±2.51
Alyanak	6773.43 ± 78.70	91.75 ± 8.16	48.69±0.44

Tablo 6: Malatyada yetiştirilen kayısı çeşitlerinin bazı mineral içerikleri (mg/100 g kuru madde olarak) (49).

Kayısı Çeşidi	Magnezyum (Mg)	Fosfor (P)	Demir (Fe)	Çinko (Zn)	Selenyum (Se)
Hacıhaliloğlu	134.7±4.9	107.0± 1.3	2.98 ± 0.06	1.38 ± 0.12	0.150±0.013
Hasanbey	152.2 ± 3.8	118.6± 2.3	2.80 ± 0.43	1.41 ± 0.11	0.190±0.031
Soğancı	110.4± 10.4	97.9± 4.5	3.48 ± 1.58	1.90 ± 0.92	0.115 ± 0.024
Kabaaşı	131.0±3.7	97.0 ± 3.1	2.34 ± 0.52	2.63 ± 0.13	0.150 ± 0.043
Çöloğlu	120.4±16.9	72.0 ± 2.8	3.73 ± 0.32	1.61 ± 0.20	0.230±0.078
Hacıkız	146.7 ± 3.0	104.6 ± 2.4	3.51 ± 0.17	2.02 ± 0.24	0.185±0.044
Tokaloğlu	148.8 ± 1.0	144.1 ± 3.1	5.09 ± 1.35	2.05 ± 0.13	0.250±0.012
Çataloğlu	131.7±19.3	88.9 ± 7.4	2.73 ± 0.32	2.19 ± 0.51	0.145 ± 0.061
Alyanak	160.4 ± 11.5	157.2 ± 5.4	7.74 ± 1.03	2.54± 0.89	0.335±0.091

Kayısı yüksek miktarlarda demir (Fe)'den dolayı iyi bir antianemik, aynı zamanda düşük oranda yağ ve yeterli miktarda sükröz, glukoz, fruktoz vb ile Na, K, P ve Mg ile A, C ve E vitamini içermesinden dolayı kaliteli ve dengeli beslenme açısından önemli bir gıda maddesidir (49,50).

Kayısının, içerdiği fenolik bileşikler, vitamin ve mineraller ile fruktoz oranı çeşit, genetik yapı, yetiştirildiği coğrafyaya, bakım ve gübrelemeye göre değişmektedir (49,50). Taze kayısının rengiyle içerdiği fenolik bileşikler arasında bir ilişki bulunamazken türüyle içerdiği fenolik bileşikler arasında önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Kayısı çekirdeği de içerdiği yağ, yağda çözünen vitaminler ve mineraller bakımından zengindir (50,51). Eski çağlardan bu yana kronik kabızlığın tedavisinde günde 6–8 kayısı iyi bir lakzatif olarak etki gösterdiği, deri, karaciğer, mide-bağırsaklar ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkilerine vurgu yapılmaktadır (50,52).

Malatya'da yetiştirilen 9 farklı kayısı çeşidi, oksidatif strese karşı koruyucu olabilen Magnezyum (Mg), Fosfor (P), Demir (Fe), Çinko (Zn) ve Selenyum (Se) gibi bazı iz elementleri içermektedir. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda %10 oranında kuru kayısı (kabaaşı türü) ilavesinin metotreksatla uyarılmış ratlarda

intestinal oksidatif hasarın tedavisinde faydalı olduğu (53), yine %10 ve %20 oranında kuru kayısı ilaveli yemle beslenen ve deneysel miyokardial iskemi-reperfüzyon uygulanan ratlarda doku hasarına karşı koruyucu olduğu bildirilmektedir (54).

2.2.3. Kayısının İnsan Sağlığı Bakımından Önemi

Kayısı, insan vücudunun günlük enerji ve protein gereksiniminin karşılanmasında çok az katkıda bulunmakla birlikte mineral maddelerden potasyum ve vitaminlerden β -karotene çok zengindir. A vitaminin öncül maddesi olan β -karoten vücut ve organları saran epitel doku, göz sağlığı, kemik, diş gelişmesi ve endokrin bezlerinin çalışması için gereklidir.

Bu görevlerinden başka A vitamini üreme ve büyümede, enfeksiyonlara karşı vücut direncinin artmasında önemli rol oynar. Diğer taraftan A vitamini normal vücut hücrelerinin kanserli hücreye dönüşmesinin başlıca sorumlusu olan aktif karsinojenlerden tekli oksijenin oluşmasını önlemekte veya oluştuktan sonra etkisiz hale getirmektedir. Ayrıca A vitamini organizmanın ve sağlıklı hücrelerin direncini artırarak kansere karşı koruyucu görevi yapmaktadır. Bu koruyucu aktivite sigara ve alkol kullananlar için daha da önemlidir.

Kayısının sodyumca fakir potasyumca zengin olması nedeniyle kalp yetmezliği, böbrek hastalıkları, hepatit ve siroz tedavisinde olumlu etkileri olduğu bildirilmektedir (55).

Kuru kayısının beslenme ve sağlık açısından en önemli bileşiklerinden biri de diyet lifidir. Kuru 100 g'da yaklaşık olarak 24 g diyet lifi bulunur. Yetişkin bir insanın günlük diyet lifi gereksinimi ise 25 g'dır.

Diyet lifi sindirim sistemimizde salgılanan enzimler tarafından hidrolizlenemeyen polisakkarit ve lignin gibi bileşiklerden oluşmaktadır. Diyet lifi kabızlık, apandisit, hemoroid, diş hastalıkları, şişmanlık, şeker hastalığı, kronik kalp hastalıkları ve kolon kanseri gibi hastalıkların oluşum riskini azaltmakta, bağırsakların düzenli çalışmasını sağlamaktadır. (55).

2.3. Tez Çalışmasına Dahil Edilen Parametreler Hakkında Genel Bilgi

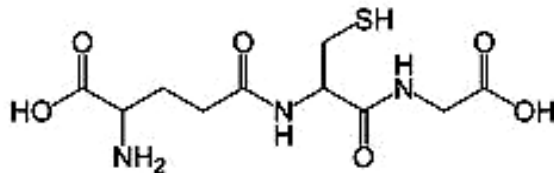
2.3.1. Glutasyon Metabolizması

Glutasyon nonprotein tiyol olup hücrenin antioksidan savunmasında görev yapmaktadır. Aktif grubu sistein kalıntısındaki tiyol (-SH) grubudur (Şekil 4). Tüm organlarda özellikle de karaciğerde sentezlenir ve tüm memeli dokularında bulunmaktadır (56).

Total GSH'nin çoğu sitozolde (%85–90) bulunurken geri kalanı ise (%10-15) mitokondri ve diğer organellerde bulunur. Bazı durumlarda mitokondride sitozoldeki oranlara ulaşıldığı görülmüştür (57). Mitokondride GSH sentezleyen enzimlerde eksiklik oluştuğunda sitozolden alınarak devamlılığı sağlanır (57).

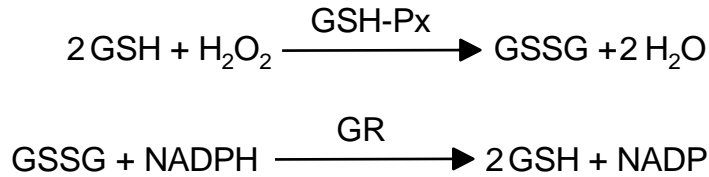
Hücrelerde total glutasyon, serbest veya proteinlere bağlı (%15) olarak bulunur. Serbest glutasyon çoğunlukla redükte formda bulunur ve oksidatif strese okside forma dönüştürülür. Hücrelerde redoks halinde redükte ve okside formların oranı (GSH/GSSG) kritik öneme sahiptir. Normalde memeli hücrelerinde, glutasyon redoks çifti 1-10 mM konsantrasyon aralığında bulunur ve redükte glutasyon, okside forma göre daha üst seviyededir. Hücre dinlenme halindeyken bu oran 100'ü aşarken oksidatif stres modellerinde bu oran 10 ile 1 mM'a düşer (58).

Organlar arası GSH döngüsünün devamlılığını sağlayan en önemli organlar karaciğer ve böbrektir. Fakat dalak, lens, eritrosit ve lökositler tarafından da kısmen sağlanır. Geri dönüşümü olmayan hücre hasarı meydana geldiğinde, hücredeki GSH içeriği devamlılığını kaybeder. Biyolojik kompartımanlarda GSH'nin konsantrasyonunun ölçülmesi, çeşitli patolojik durumların anlaşılması için önemli bir parametredir (59).



Şekil 4: GSH'nin moleküler yapısı

Glutasyon, birincil olarak ROS'a karşı engelleyici olarak görev alır. Bu amaçla serbest radikalleri süpürür ve H₂O₂'yi azaltır. Hücrelerde oksidatif stresin etkisiyle oluşan hidrojen peroksid (H₂O₂), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi ve GSH'ın etkisiyle suya yıkılır. Ancak redükte glutasyon (GSH), okside glutasyona (GSSG) dönüşür. Okside glutasyon daha sonra glutasyon redüktaz (GR) ile tekrar GSH'a dönüştürülür.

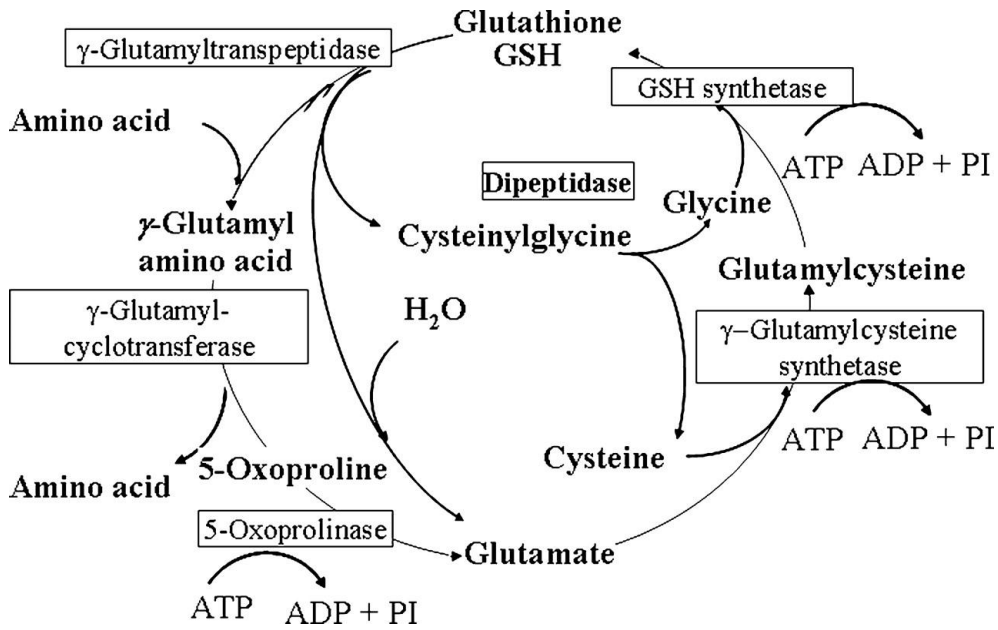


Glutasyon bağımlı enzimler, hücrelerin korunmasındaki ikinci basamağı oluştururlar. Bunlar serbest radikallerin yayılmasını engelleyeceği gibi ROS tarafından üretilen ürünlerin detoksifikasyonunu da sağlarlar. GSH bağımlı proteinlerin çoğu antioksidan ajanlar tarafından indüklenerek oksidatif stresin dengelenmesini sağlarlar. Glutasyon S-Transferaz enziminin birçok pro-oksidan ajan tarafından indüklendiği görülmüştür (60).

Glutasyon hücrede altı enzim serisinin katalizlediği reaksiyonlarda, γ -glutamilsistein sentetaz (GCS) ve Glutasyon sentetaz (GS)'in etkisiyle sentezlenir. Bu reaksiyonlar γ -glutamil döngüsü olarak isimlendirilir (61,62).

Glutasyon, merkezi sinir sisteminin fonksiyonu için önemlidir. γ -glutamil döngüsünde defekt olan hastalarda zekâ geriliği ve diğer beyin defektleri meydana gelmektedir (56).

Glutasyon sentezi, dokunun glutasyon konsantrasyonuna bağlı olarak feedback inhibisyonla kontrol edilir. γ -GCS, heterodimer yapıda olup katalitik aktiviteden sorumlu ağır subünite (katalitik subünite, GCS_h) ve enzimin glutamat için K_m'inin düzenlenmesi ve feedback inhibisyondan sorumlu hafif subünite (düzenleyici subünite, GCS_i) olmak üzere iki üniteden oluşur. Heriki subünite pro-oksidant ajanlar (tert-butylhidroquinon ve β -naftoflavon) tarafından indüklenir. İkinci basamak γ -glutamil sistein dipeptidine glisin eklenmesiyle gerçekleşir ve glutasyon sentetaz tarafından katalizlenir. Bu basamakta ürün inhibisyonu yoktur, fakat doku spesifik salınım söz konusu olup en çok böbrekte bulunmuştur.



Şekil 5: Glutatyon sentezinde γ -glutamil döngüsü (61,62).

Glutatyon, γ -glutamil transpeptidaz enzimi aracılığıyla enzime bağlı olarak belli hücrelere taşınır. γ -glutamil transpeptidaz enzimi, γ -glutamil amino asit ve sisteinil glisin oluşumuna önderlik eder. Daha sonra ise dipeptidaz ile sistein ve glisine ayrılır. γ -glutamil amino asitler, intraselüler enzim γ -glutamil siklotransferaz enziminin substratı olup bu enzim tarafından serbest amino asitlere ve 5-okzoprolin'e dönüştürülür. 5-okzoprolin, glutamat oluşturmak için tekrar döngüye girer. 5-okzoprolin ve glutamat arasındaki denge nötral pH'da, döngünün devamlılığı yönündedir, ancak bunun için enerjiye gereksinim vardır (63,64).

γ -glutamil transpeptidaz enzimi, dokuların epitellerinde bulunur ve çoğunlukla transportta (nefron, koroid pleksus, jejunum) görev alır (65). Bu enzim hücre membran yüzeyinin dış kısmında lokalize olurken glutatyon intraselüler olarak bulunur (66). Bu nedenle glutatyonun transportu γ - glutamil döngüsünün önemli bir basamağını oluşturur.

Transpeptidaz inhibitörü verildiği zaman plazma glutatyon seviyesi yükselir. Plazma glutatyonunun çoğu karaciğer tarafından karşılanır. Glutatyon plazmadan transpeptidazların aktivitesiyle uzaklaştırılır ve bu enzim çoğunlukla böbreklerde lokalize olmuştur.

Böbreklerde kullanılan glutatyonun büyük kısmı organın kendi iç döngüsünden, böbrek hücrelerinden tübüllere transfer edilerek karşılanırken geri

kalan miktar plazmanın glomerular filtrasyonundan kaynaklanır (67).

Glutasyon birçok fizyolojik role sahiptir ve hücrenin koruyucu mekanizmalarında önemli görevleri vardır. Amino asitlerin transportu, proteinlerin ve nükleik asitlerin sentezinde, enzimlerin aktif formlarının devamlılığında, heksoz mono fosfat yolunun düzenlenmesinde, radyasyon ve endotoksinlere maruz kalmalarda bunlara karşı koruyucu etkisi vardır.

Ayrıca septik ve kardiyojenik şokun önlenmesinde de etkilidir. Glutasyon transhidrojenasyon reaksiyonlarına katılarak diğer moleküllerin (Koenzim A, çeşitli enzimler ve proteinlerin) sülfidril gruplarını devamlılığını ve yapısının korunmasını sağlar. Birçok reaksiyon için redükte kapasiteye sahiptir ve hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Çeşitli ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görevli olup bunlarla etkileşerek markaptürik asit olarak dışkı ve idrarla atılmasını sağlar (60).

2.3.2. Glutasyon S-Transferaz (GST) ve GST-Pi

Glutasyon S-transferaz (GST) enziminin izoenzimleri bakterilerden insana kadar bütün organizmalarda bulunmaktadır. Glutasyon S- transferaz enzim sistemleri hücrelerde oluşan endojen toksinlerin yok edilmesinde veya değişime uğratılmasında önemli rol oynayan Faz II metabolizması enzimlerindedir (68). Hücre sitozolünde bulunan GST enziminin primer yapısını oluşturan amino asit zincirine göre alfa, mü, pi, sigma, theta, zeta ve omega olmak üzere yedi izoenzimi bulunur. Ayrıca memeli hücrelerinde bunlardan farklı olarak mitokondriyal GST olan kapa izoenzimi de bulunur (69).

Glutasyon S-transferaz enzimi, farklı bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bu özelliğini, yapısındaki spesifik olmayan hidrofobik grupların varlığına ve çok sayıda izoenzimini bulunmasına borçludur. Bu sayede GST enzimi; birçok kanserojenik bileşik çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanabilmektedir. GST, ksenobiyotik için ve GSH için birer bağlanma bölgesi taşıyan iki protein alt birimine sahip bir dimerdir (70).

GST'nin yedi izoenzimi, birbirinden farklı aktivitelere ve tepkime türlerine sahiptirler. Bu enzimler, kataliz ettiği substrat bileşiğinin elektrofilik merkezi ile

GSH'nin sülfür atomu arasında bir tiyoester bağı oluşturarak konjugasyon tepkimesi meydana getirir. Bu tepkimenin yanı sıra, GSH bağımlı tepkimelerde organik hidroperoksitleri de katalize ederler. Bu enzimler, karsinojenlerin detoksifikasyonu, birçok hidrofobik ligandın hücre içi taşınımı ve sinyal ileti süreçlerinin modülasyonu gibi non-enzimatik işlevler de yapabilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, GST'nin Pi1 izoenziminin akciğer tümörogenezinde önemli rolü olduğu rapor edilmiştir ve insan akciğerinde en fazla bulunan GST izoenzimidir. GST Pi1 en çok insan akciğerinin bronşiol epitelyumundaki Clara hücrelerinde bulunur (71). Aynı şekilde GST Pi1'in fare akciğer dokusuna lokalize olduğu görülmüştür (72). GST Pi1'in, sigara tütününde bulunan kimyasalları (polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi) detoksifikasyona uğrattığı görülmüştür (73,74). Ayrıca sigaranın sitotoksik etkisini inhibe etmek için insan akciğer fibroblastlarında GST Pi sentezinde çok fazla miktarda artış olduğu görülmüştür (75). Yine insan akciğerinde yapılmış olan epidemiyolojik çalışmalar da, GST Pi geninin ekspresyonunda artış olduğu bildirilmiştir (76,77).

Glutasyon S-transferaz, faz II ksenobiyotik metabolizmasında çok önemli rol oynamaktadır. Genelde GST'nin aktivitesi, Sit P450'nin katalizlediği tepkimeleri takip etmektedir. Bu enzimler, akrilamid gibi elektrofilik merkezli ksenobiyotikler ile nükleofilik GSH'ı konjuge ederek bu maddelerin detoksifikasyonunu gerçekleştirirler. GSH ile moleküler olarak işaretlenen bu ksenobiyotik konjugatlar, ilaç taşıyıcı proteinler aracılığıyla hücreden uzaklaştırılmak üzere faz III metabolizmasına dahil edilirler. Hücre dışına atıldıktan sonra ksenobiyotik-GSH konjugatının γ -glutamil ve glisin rezidüleri, γ -Glutamil Transpeptidaz (γ -GT) ve Sisteinilglisin Dipeptidaz ile yapıdan uzaklaştırılır. Ksenobiyotiğin açığa çıkan bu sisteinil formu, *N*-asetilasyon tepkimelerine uğrar ve ksenobiyotiğin idrarla atılan formu olan markaptürik aside dönüştürülür (78).

GST'nin ksenobiyotikler ile GSH'ı konjuge etmesi ile başlayan ve sonrasında markaptürik asit oluşturan reaksiyonların tamamına detoksifikasyon tepkimeleri adı verilmektedir.

Fakat bazı bileşikler, GSH ile konjugasyon oluşturduktan sonra çok daha aktif bir forma dönüşür ve omurgalılarda özellikle böbrek dokusunda ana bileşiğe oranla çok daha ciddi hasarlar oluşturabilmektedir (79). GST, hidroksialkenaller,

bazı propenaller (lipid peroksidasyonu yıkım ürünleri) ve hidroperoksitler gibi endojen bileşikleri de detoksifiye ederek antioksidan etki göstermektedir. GST'nin peroksidaz aktivitesi selenyum-bağımlı değildir, fakat GSH'a şiddetle gereksinim duymaktadır (78).

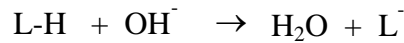
2.3.3. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonu, çoğunluğu reaktif elektrofillerden oluşan çeşitli kompleks ürünler açığa çıkarır. Bu ürünlerin çoğunluğu DNA ve proteinlere bağlanarak toksik ve mutajenik etkiler meydana getirirler (80).

Uzun zincirli doymamış yağ asitleri bir veya daha fazla çift bağ içeren metilen gruplar içerirler. Metilen gruplar oksidan ajanlara karşı yüksek reaktiviteye sahiptir. Uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan ilk ürün peroksil radikalleridir.

Serbest radikaller diğer moleküllerle birçok yolla reaksiyona girerler (81,82). Eğer iki radikal ajan bir araya gelirse elektronlarını paylaşırlar ve kovalent olarak birbirine bağlanırlar. Hücrelerde bulunan birçok molekül radikal değildir. Ancak radikaller ile elektron alışverişinde bulunduğu anda kendileri de radikal bileşiklere dönüşürler. Lipid peroksidasyonu buna uyumlu en iyi örnektir.

Hidrojen atomu bir proton ve bir elektrona sahiptir. Bu nedenle radikal olarak isimlendirilir (82).



Bilinen serbest radikaller özellikle O_2^{\cdot} ve diğer reaktif oksijen türleri (H_2O_2 gibi) vücutta devamlı olarak üretilirler. Organizmalar bunlara karşı yalnız antioksidan koruyucu sistemle değil aynı zamanda oksidatif hasar yapıcı moleküllerin birikmesini engelleyici sistemlerle koruma sağlarlar (81).

OH^{\cdot} radikali çok reaktif bir türdür, bütün biyolojik moleküllere saldırabilir ve böylece serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatır (81,83).

OH^{\cdot} radikali organizmada iki şekilde oluşur. Ya H_2O_2 ile metal iyonlarının transisyon reaksiyonu ile ya da suyun iyonize radyasyonla fizyona uğramasıyla oluşur (84).

$O_2\cdot$ ve H_2O_2 radikalleri $\cdot OH$ radikaline göre daha az reaktiftirler (81,84). Fakat tamamen zararsız da değildirler. Eğer fazla miktarlarda oluşursa belli hücrelerde direk hasara sebep olabilirler. Buna ilave olarak $O_2\cdot$, birçok hücre tarafından özellikle fagositler ve damar endotel hücrelerince üretilen NO (Nitrik oksit) ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuna sebep olurlar. Peroksinitrit toksik etkiye sahip olmasının yanı sıra (-SH grubunun güçlü oksidandır) aynı zamanda OH^- oluşturmak üzere ayrışır (85).

Aerobik organizmalarda fazla $O_2\cdot$ 'nin süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından O_2 ve H_2O_2 'ye dönüştürülmesi önemli bir fizyolojik antioksidan koruma mekanizmasıdır (155). H_2O_2 birçok metabolik fonksiyona sahiptir. H_2O_2 , hücre membranını kolaylıkla geçer ve spesifik proteinlerin tiyol gruplarını okside ederek hücre içi olayların başlamasını tetikler (81).

Uzun zincirli doymamış yağ asitleri (özellikle araşidonat), serbest radikaller tarafından saldırıya uğrayarak okside olurlar ve lipid peroksidlerini oluştururlar. Doymuş yağ asitleri serbest radikal saldırılarına karşı dirençlidir. Lipid peroksidleri toksiktir ve çoğu hücre için hasar yapma kapasitesine sahiptirler.

Lipid peroksidleri, yüksek ısıda hoş olmayan tat ve kokuya sahip ürünler (keton, asitler ve aldehitler) oluşturmak üzere ayrışır (86,87). Yüksek sıcaklıkta lipid peroksidlerinin ayrışması insan kanındaki proseslerde mümkün değildir. Çünkü çoğu lipid peroksidi $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de metal iyonlarının yokluğunda stabildirler.

Peroksidatif yol boyunca reaktif ara ürünler yoluyla aldehitler; malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal, pentan ve etan, 2,3 trans konjuge dienler, isoprostanlar ve kolesteroloksidler gibi son ürünler şekillenmektedir. Aldehitler, lipid hidroperoksidlerinin yıkımı sırasında daima oluşurlar ve birçoğu biyolojik olarak aktiftir. Bunlardan en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenal'dir (88).

Oluşan bu ürünler kolayca difuze olarak hücrenin diğer bölümlerinde hasara yol açarlar. Oluşan bu aldehitlerden MDA, membran doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun bir işareti olup, lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir (88). MDA ve 4-hidroksinonenal gibi aldehitler, hücrede bulunan DNA ve proteinlerle çapraz bağlar oluşturarak onların fonksiyonlarını bozarak bir takım bozukluklara sebep olurlar.

2.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

PZR yöntemi, bir organizma veya bir mutant gene ilişkin sağlam veya parçalanmış DNA veya RNA parçasının *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem saç teli ve sperm gibi değişik dokulardan elde edilen 1-2 hücreden bile sonuca ulaşılmasını sağlar. bir gen veya DNA bölgesinin bu bölgeye bağlanan oligonükleotid primerler aracılığı ile bir dizi replikasyon döngüsü geçirerek çoğaltılması işlemidir. PZR yönteminde sözü edilen her replikasyon döngüsü; i) DNA'nın denatürasyonu, ii) Primerlerin bağlanması ve iii) Primerlerin uzaması, olmak üzere 3 aşamadan oluşur.

Bu döngüler tekrarlanarak istenen sayıda hedef DNA bölgesi elde edilir. Her döngüde oluşan ürün bir öncekinin 2 katıdır. Böylece yaklaşık 20 döngülük bir reaksiyon sonucunda yaklaşık 1 milyon DNA kopyası elde edilir (89).

Hedef DNA'nın çoğaltılması, DNA'daki mutasyonların belirlenmesi, dizi analizi için DNA'ların çoğaltılması, laboratuvar şartlarında kontrollü mutasyonların oluşturulmasında (PZR) oldukça yaygın kullanılmaktadır.

2.3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) İşleyişi

PZR, nükleik asitlerin *in vitro* şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş, bir test tüp sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir (89,90,91). *In vivo* şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir.

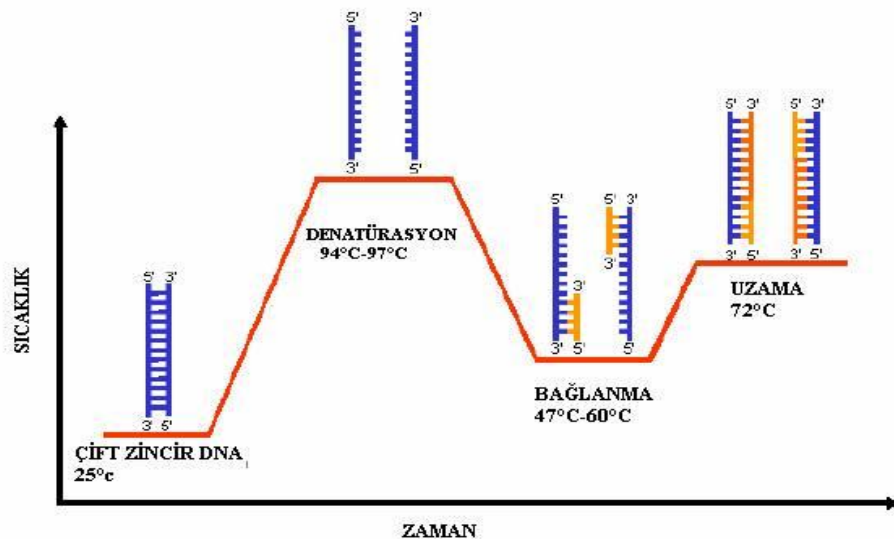
Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PZR'da *in vivo* çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, özel bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir.

Kullanılan polimeraz enzimine bağlı olarak kopyalanarak çoğaltılacak olan bölgenin uzunluğu Taq DNA polimeraz için 2 kb'dan küçük, daha komplike enzim veya enzim karışımları ile 5 kb'dan daha büyük hatta 40-50 kb kadar olabilmektedir (89).

In vivo şartlarda DNA replikasyonu esnasında enzimler ilk olarak DNA'nın çift zincirli yapısını bozarak tek zincirli hale geçişini sağlar. Daha sonra RNA

polimeraz sentezlenir ve replikasyon başlangıç bölgesinde tek zincirli hale dönüştürülmüş DNA zincirlerinden birisine tamamlayıcı RNA'nın oluşumu sağlanır. Bu DNA/RNA heterodupleksi DNA polimerazın saldırısı için bir başlatıcı bölge rolü oynar. Böylece DNA'nın tamamlayıcısı sentezlenir. PZR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100 ng kadar) içeren örnek çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir.

Daha sonra örnekteki çift sarmal DNA'nın tek sarmal DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır. Tek sarmal DNA iplikçiklerinin karşısı 20-30 baz çifti uzunluğundaki sentetik oligonükleotid diziler, RNA/DNA heterodubleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerlerden birisi tek iplikçikli DNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır. Taq DNA polimeraz enziminin yardımıyla primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her tek zincirli DNA zincirinin tamamlayıcısı oluşturulur. Böylece iki adet çift sarmal DNA oluşur. Oluşan çift sarmal DNA'lar yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenirler. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığında birkaç saat içerisinde, hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir. PZR temel olarak tekrarlayan üç basamaklı bir yöntemdir (92). Bu basamaklar sırasıyla denaturasyon, bağlanma ve uzamadır (Şekil 6 da gösterilmektedir).



Şekil 6: Polimeraz Zincir Sisteminin Basamakları

2.3.4.2. Geri Transkripsiyon PZR (RT-PZR)

RNA PZR olarak da adlandırılan RT-PZR iki aşamalı olup RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi (geri transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA'nın da standart PZR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar. RT-PZR tek aşamalı bir reaksiyonla da gerçekleştirilebilir. T.thermophilus(Tth) DNA polimerazı gibi bazı polimerazlar Mangan varlığında hem RNA hem de DNA kalıp ipliklerini kullanabildiğinden tüm işlem aynı tüpte tek aşamada yapılabilmektedir.

RT-PZR, mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmalarında oldukça duyarlı bir yöntemdir. Aynı zamanda "Message amplification phenotyping-MAPPING-" olarak da bilinen bu yöntem az sayıdaki hücreden aynı anda fazla miktarda RNA'nın analizini de olası kılar. Ayrıca RNA PZR, hücresel bir RNA örneğindeki tüm mRNA'lardan PZR yoluyla cDNA kitaplıklarının oluşturulması için de yararlı bir yöntemdir. Böylece, çok az sayıdaki, hatta tek bir hücreden ya da çoğaltılamayan hücrelerden bile cDNA kitaplıklarının kurulması gerçekleştirilebilir.

cDNA sentezinde kullanılacak çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ters transkriptaz enzimleri vardır. Bunlara örnek olarak avian myeloblastosis virus'' (AMV) ve "Moloney murine leukemia virus" (MMLV) revers transkriptazları verilebilir (93,94).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

1. Potasyum Klorür (KCl) –Merck,
2. 1,1,3,3 tetraethoxypropan –Acros,
3. Fosforik asit - Merck,
4. Tiobarbutirik asit (TBA) –Acros,
5. Etanol-Merck,
6. n-butanol –Merck,
7. Redükte glutatyon (GSH)- Sigma,
8. Trikloroasetik asit (TCA) – Sigma,
9. 5.5'dithiobis 2 nitrobenzoik asit (DTNB) – Sigma,
10. Trisodyum sitrat -Aklar Kimya,
11. Sodyum azid-Merck,
12. NADPH – Sigma,
13. GSH Redüktaz- Sigma,
14. Amonyum Sülfat -J.T Baker,
15. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) –Merck,
16. Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA) -J.T Baker,
17. Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄)-Merck,
18. Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄)-Merck,
19. 1-Kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB) –Merck,
20. Sığır serum albumini (BSA) – Sigma,
21. Bakır sülfat 5 sulu(CuSO₄.5H₂O) -Aklar Kimya,
22. Sodyum Potasyum Tartarat-Merck,
23. Sodyum Hidroksit (NaOH) – Sigma.

3.1.2. Kullanılan Aletler

1. Homojenizatör –IKA Labortechnik Staufen T25B,
2. Vorteks –WiseMix VM10,
3. Manyetik karıştırıcı –Wisestir MSH-20A,
4. Santrifüj –Hettich Universal 320R,
5. Otomatik pipet-Medisis marka 20,200,1000 mL' lik,
6. Hassas terazi- Shimadzu Libror AEG-320,
7. Spektrofotometre –LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054UV/ visible
8. pH metre –Hanna Instruments HI8314 membrane,
9. Su banyosu- Memmert WB22,
10. Deepfreez (-70°C)-Hera Freeze Kendro,
11. Buz makinesi-Buzzbarr Kale.

3.1.3. Ratların temini ve Bakımı

Bu araştırma için, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları yerel etik kurulundan etik onay alındı. Bu çalışmada kullanılan canlı ağırlığı ortalama 200 gram olan 40 adet dişi Spraque Dawley rat, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edildi.

Ratlar sıcaklığın 21 °C ve ortam neminin % 55–60 olduğu, 12 saat ışık (08.00–20.00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda bakıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Grupların oluşturulması

1. grup (kontrol grubu); 12 hafta süreyle normal yemle beslendi. 2. grup (kayısı grubu); 12 hafta süreyle yem içinde %5 kuru kayısı ile beslendi. 3. grup (akrilamid grubu); 12 hafta süreyle içme suyu içinde 500 µg/kg canlı ağırlık akrilamid ve normal yemle beslendi. 4. grup (akrilamid+kayısı grubu); 12 hafta süreyle içme suyu ile 500 µg/kg canlı ağırlık akrilamid ve yemle %5 kuru kayısı ile beslendi.

3.2.2. Numune Alınması ve Hazırlık İşlemleri

Sürenin sonunda ratlar ksilazin-ketamin anestezisi sonrası, tüm ratlar dekapite edilerek kalın bağırsak doku örnekleri alındı, doku örnekleri serum fizyolojikle yıkanarak fazlalık kanın uzaklaştırılması sağlandı.

Dokuların bir kısmı histopatolojik incelemeler için alkolle tespit edildikten bir kısmı GST-Pi gen ekspresyon düzeyinin araştırılması için RNA later saklama çözeltilerinin içine aktarıldı.

Geriye kalan dokular farklı parametreler için farklı çözeltiler içinde homojenize edildi. Doku homojenatlarının 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmesinden sonra elde edilen süpernatantlarda GST ve GSH-Px aktivite düzeyleri ile GSH, MDA ve protein düzeyleri ölçüldü.

GST, GSH, MDA ve Protein düzeyleri, spektrofotometrik ölçüm yöntemleri ile analiz edildi.

3.2.3. Redükte Glutatyon (GSH) Analizi

GSH analizi, Ellman'ın tarif ettiği (95) metoda göre yapıldı. Metodun GSH ölçüm prensibi, analiz tüpünde bulunan glutatyonun 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi ve oluşan bu rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyunda, spektrofotometrede okunarak redükte glutatyon miktarının tayin edilmesi şeklindedir.

3.2.3.1. Numunelerin Hazırlanması

Gruplardan alınan kalın bağırsak numunelerine %10'luk homojenat oluşturacak şekilde distile su ilave edildi ve buz üzerinde 1-2 dakika 12000 devir/dakika homojenize edildi. Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4 derecede, 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta TCA çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve tekrar 3000 rpm'de, +4 derecede, 20 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Açık renkli süpernatant numuneleri GSH analizinde kullanıldı.

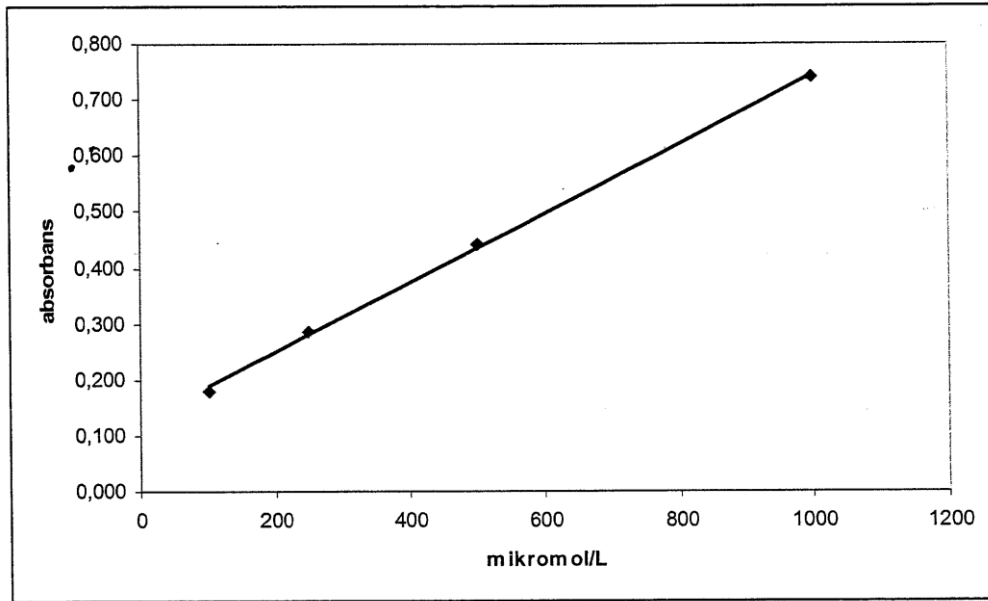
3.2.3.2. Kullanılan Reaktifler

% 10'luk triklor asetik asit, % 1'lik trisodyum sitrat, % 0.4'lük 5,5'-Ditiyobis 2-nitrobenzoik asit, 0.3 molar disodyum hidrojen fosfat.

3.2.3.3. GSH Düzeylerinin Tayini

	Numune	Kör
Süpernatant	250 µL	-----
Na ₂ HPO ₄ (0.3 M)	2 mL	2 mL
DTNB	250 µL	250 µL
Distile su	-----	250 µL

Yukarda belirtilen çalışma şemasına göre deney tüpleri hazırlandı, çözeltilerin iyice karışması için tüpler vorteksledi. Spektrofotometre kör ile 410 nm 'de sıfır absorbansa ayarlandı. Oda ısısında 5 dakika bekletilen numunelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve glutasyon standard grafiğinden yararlanılarak GSH düzeyleri bulundu. Doku GSH düzeyleri, nmol/gr yaş doku olarak ifade edilmiştir.



Şekil 7: GSH standart Grafiği

3.2.4. Malondialdehit (MDA) Analizi

Lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi olan MDA, Ohkawa ve ark (96)'nın tarif ettiği metoda göre analiz edildi. Analizin temel prensibi, ortamda bulunan MDA'nın asit ortamda tiyobarbutürik asit ile ısıtıldığında reaksiyona girerek pembe renkli bir kromojen oluşturmasına dayanmaktadır. Pembe rengin şiddeti, numunedeki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.2.4.1. Numunelerin Hazırlanması

Kalın bağırsak numunelerine %10'luk homojenat oluşacak şekilde %1.15'lik KCl çözeltisi ilave edildi ve 15000 devir/dakikada, 1–2 dakika süreyle buz içinde homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar MDA analizinde kullanıldı.

3.2.4.2. Kullanılan Reaktifler

% 8,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) , % 20'lik asetik asit, % 0,8'lik 2-tiyobarbutürik asit (TBA) , 2 mmol/L 1,1',3,3' tetraetoksipropan.

3.2.4.3. MDA Düzeylerinin Tayini

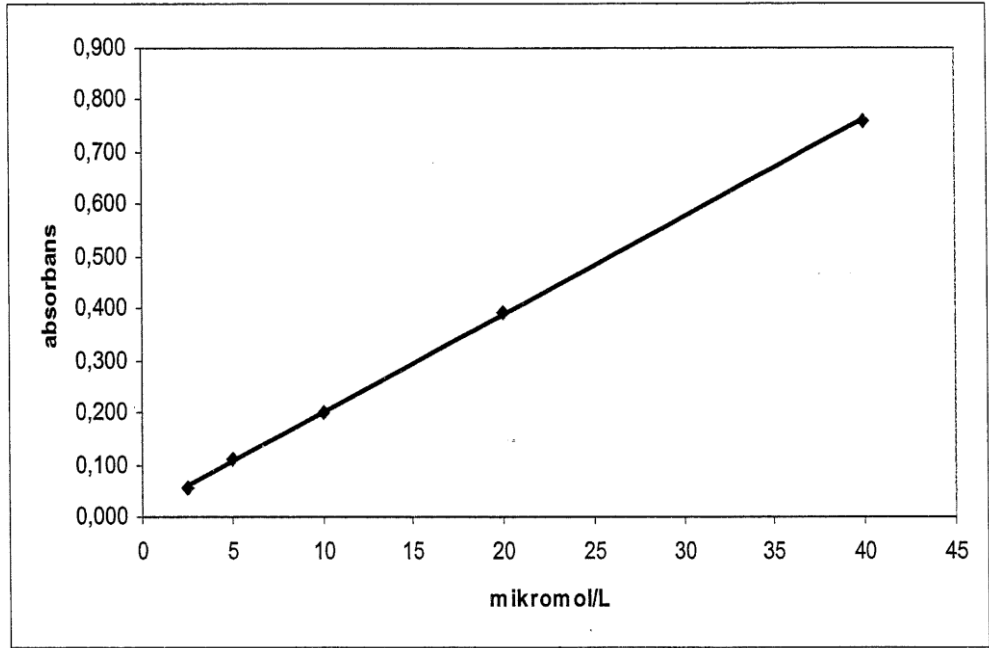
	Numune	Kör
% 10'luk Homojenat	250 µl	-----
% 1'lik Fosforik asit	1500 µl	1500µl
% 0.6'lık TBA	500 µl	500 µl
Etanol	-----	250 µl

Vortekslenip 45 dakika kaynar su banyosunda (95°C) inkubasyon ve soğutma.

n-butanol	2 mL	2mL
-----------	------	-----

Hazırlanan çözeltiler yukarıdaki çalışma tablosunda belirtildiği şekilde deney tüplerine eklendi, çözeltilerin karışması için iyice vortekslenildi. Tüpler kaynar suda

(en az 95 derecede) 1 saat bekletildi, akan çeşme suyunda soğutuldu ve 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometre 532 nm'de körle sıfır absorbansa ayarlandı. Pembe renkli süpernatantların absorbansları 532 nm'de okundu ve 1,1',3,3' tetraetoksipropanla hazırlanan standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{mol/L}$ cinsinden MDA düzeyleri bulundu. Doku MDA düzeyleri nmol/gr yaş doku olarak ifade edildi.



Şekil 8: MDA standart grafiği

3.2.5. Glutasyon S-Transferaz aktivitesinin analizi

GST aktivitesi, Habig ve ark.'nın (97) tarif ettiği metoda göre tayin edildi. GST aktive düzeyleri, 340 nm dalga boyunda 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB)'nin GSH ile konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbans artışlarının takip edilmesi ile ölçülür. Enzim aktivitesi 340 nm'de 37 °C'de GSH ve CDNB kullanılarak dakikada oluşan S-2,4 dinitrofenilglutasyonun 1 μmol 'unu katalizleyen enzim miktarının ölçülmesiyle belirlenir.



3.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması

Kalın bağırsak numunelerine %10'luk homojenat oluşacak şekilde distile su ilave edilerek ve buz üzerinde 1–2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi. Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4 derecede, 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, GST aktivite düzeylerinin tayininde kullanıldı.

3.2.5.2. Kullanılan Reaktifler

100 mM Tris Tamponu (pH 7.4), 1 mM 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB), 5 mM Redükte Glutasyon.

3.2.5.3. GST Aktivite Düzeylerinin Tayini

Glutasyon S-transferaz aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir.

Çözeltiler	Numune	Kör
Fosfat Tamponu	2.1 mL	2.15 mL
CDNB	25 µl	25 µl
GSH	25 µl	25 µl
Tüplere Alınan çözeltiler iyice karıştırılır		
Süpernatant	50 µl	-----

Numune küvetine GST kaynağı olan süpernatant numunesinden 25 l ilave edildi, hafifçe karıştırıldı ve 340 nm'de 3 dk boyunca meydana gelen absorbans artışları ölçüldü. 3 dakika sonunda ölçülen absorbans 3'e bölünerek dakika başına düşen absorbans değeri tespit edildi.

3.2.5.4. GST Aktivite Düzeylerinin Hesaplanması

Aşağıdaki formül ile hesaplanan GST aktivite düzeyleri (U/L) olarak hesaplandı ve aşağıda verilen diğer bir formülle spesifik aktiviteye (U/g protein) çevrildi.

$$U/L (\mu M/min/L) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{\epsilon \times V_s \times L} \times 10$$

ϵ = CDNB 'nin ekstinksiyon sabiti ($9,6 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

V_t = Total reaksiyon volümü (ml)

V_s = Total reaksiyon içindeki numune volümü (ml)

L = Küvet çapı (1cm)

$\Delta A/t$ = Dakikadaki absorbans değişimi

10^6 = Molü μM 'e çevirme sabiti

$\times 10$ = Sulandırma faktörü

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GST (U/mL)}}{\text{Protein (mg/mL)}}$$

3.2.6. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Analizi

GSH-Px aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (98). GSH-Px hidrojen peroksit varlığında GSH'ın GSSG'ye yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'ya indirgenir.

3.2.6.1. Numunelerin Hazırlanması

Kalın bağırsak numunelerine %10'luk homojenat oluşacak şekilde EDTA'lı fosfat tamponu ilave edildi ve buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi. Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4 derecede, 30 dakika

santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, GSH-Px aktivite düzeylerinin tayininde kullanıldı.

3.2.6.2. Kullanılan Reaktifler

50 mM, pH:7. 0,5 mM ETDA'lı fosfat tampon, 150 mM GSH (redükte glutasyon), 1 mM Sodyum azid (NaN_3), 3 mM NADPH, GSH redüktaz, 3.2 M amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 2 mM H_2O_2 çözeltisi.

3.2.6.3. GSH-Px Düzeylerinin Tayini

Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanan spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri 3 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının 3 dakikalık süresi esas alındı. 3 dakikalık süre sonunda ölçülen absorbans farkı 3'e bölünerek dakika başına düşen absorbans değişimi tespit edildi.

GSH-Px aktivitesini ölçmek için çözeltiler aşağıdaki şekilde tüpe alınır.

Fosfat tamponu 5 mM EDTA'lı	2.65 mL
Redükte GSH (150 mM)	0.10 mL
NADPH (10 mM)	0.10 mL
GSH redüktaz (1İÜ)	0.01 mL
NaN_3 (1 M)	0.01 mL
Numune	0.02 mL

İyice karıştırıldı ve 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra H_2O_2 ilavesiyle reaksiyon başlatıldı.

H_2O_2 (2 mM)	0.100 mL
-------------------------------	----------

Reaksiyonda 3 dk. boyunca absorbans düşüşü takip edildi ve dakika başına düşen absorbans hesaplandı.

3.2.6.4. GSH-Px Aktivite Düzeylerinin Hesaplanması

GSH-Px'in aktivite düzeyleri aşağıda verilen formülle U/L olarak hesaplandı ve spesifik aktiviteye (U/g protein) çevrildi. Doku süpernatant numuneleri protein düzeyleri, sığır albüminin standart olarak kullanıldığı Biüret metoduna göre ölçüldü.

$$U/L (\mu M/min/L) = \frac{\Delta A/t \times V_t \times 10^6}{\epsilon \times V_s \times L} \times 10$$

ϵ = NADPH 'ın ekstinksiyon sabiti ($6,22 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

V_t = Total reaksiyon volümü (ml)

V_s = Total reaksiyon içindeki numune volümü (ml)

L = Küvet çapı (1cm)

$\Delta A/t$ = Dakikadaki absorbans değişimi

10^6 = Molü μM 'e çevirme sabiti

$\times 10$ = Sulandırma faktörü

$$\text{GSH-Px Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GSH-Px (U/L)}}{\text{Protein (g/L)}}$$

3.2.7. Protein Düzeylerinin Analizi

Doku protein tayini Biüret metodu ile analiz edildi (99). Bu yöntem, alkali koşullar altında Cu^{+2} iyonlarının amonyum, aminoasitler, peptidler, proteinler ve biüretler gibi amonyumlu bileşiklerle mavi-mor renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Protein ve peptidlerde iki peptid bağı oluşumuna katılan 4 azot atomu ile biüret ayırıcından gelen Cu^{+2} 'nin renkli kompleks oluşturması esastır. Oluşan bu kompleks 540-560 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir.

3.2.7.1. Kullanılan Reaktifler

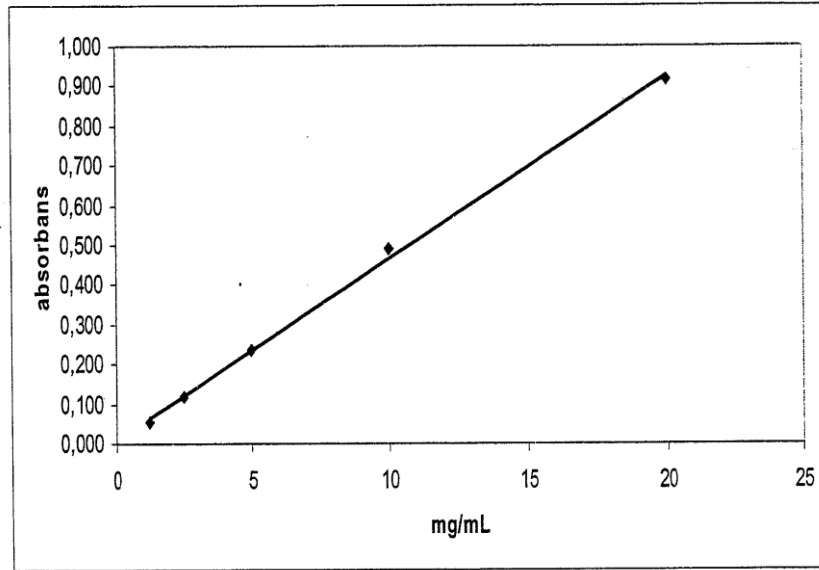
Bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), Na-K tartarat, Sodyum hidroksit (NaOH), Sığır serum albumini (BSA).

3.2.7.2. Protein Düzeylerinin Tayini

Protein düzeylerinin tayini için hazırlanan çözeltiler, aşağıdaki çalışma tablosunda belirtildiği şekilde deney tüplerine eklendi.

	Kör	Standart	Numune
Distile su	0.5 mL	-----	-----
Numune	-----	-----	0.5 mL
Standart	-----	0.5mL	-----
Büret ayıracı	2 mL	2 mL	2 mL

Tüpler iyice vortekslenip, 30 dakika oda ısısında bekletildi, numunelerde oluşan mor rengin absorbanısı 540 nm de spektrofotometrede okundu. Numunelerin protein düzeyleri, BSA ile hazırlanan standart grafiğinden yararlanılarak mg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 9: Protein standart grafiği

3.2.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.2.8.1 Kullanılan Araç ve Gereçler

1. Biorad-MyCycler marka PZR cihazı,
2. Denver Instrument marka terazi,
3. Biorad marka elektroforez güç kaynağı,
4. Jenco marka 6173 model pH metre,
5. Hettich-zentrifugen marka micro 200 model masaüstü santrifüj cihazı
6. Ultra turrax T 25 model homejenizasyon cihazı,
7. Biohit marka hassas otomatik pipetler ve uçları,
8. Labart marka vorteks,
9. Yellow line marka manyetik karıştırıcı.

3.2.8.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$; FW: 372.24; Sigma no: E5134),
2. Tris Baz ($C_4H_{11}NO_3$; FW: 121.14 ; Sigma no: T6066),
3. Borik asit (H_3BO_3 ; FW:61.83 ; Sigma no: B6768),
4. EtBr ($C_{21}H_{20}N_3.Br$; FW: 394.32; Sigma no: E8751),
5. Gliserol ($C_3H_8O_3$; FW: 92.09; Sigma no: G5516),
6. Bromofenol Blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$; FW: 669.96 Sigma no: B0126)
7. Agaroz (Sigma No: 5093),
8. Sodyum Sitrat tribasik dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$; FW:294.1;),
9. Sodyum Asetat (CH_3COONa ; FW: 82.03; Sigma no: S3272),
10. Guanidin Tiyosiyanat ($CH_5N_3.CHNS$; FW:118.16; Sigma no: G9277),
11. Sodyum Hidroksit ($NaOH$; FW:40.00; Sigma no: S8045),
12. Hidroklorik asit (HCl ; FW:36.46; Sigma no: H1758–1 l),
13. Konsantre Asetik Asit (CH_3CO_2H ; FW:60.05; Sigma no:A9967),
14. DEPC-O($COOC_2H_5$)₂; FW: 162.14; sigma no:D5758),
15. Beta-merkaptoetanol (C_2H_6OS ; FW: 78.13; Sigma no: M3148),
16. Sodyum Klorit ($NaCl$; FW: 58.44; Sigma no: S3014),
17. Amonyum Sülfat ($(NH_4)_2SO_4$; FW132.14; Sigma no: A4915),
18. dNTP (Invitrogen),

19. Superscript (Invitrogen),
20. Primer (Operon veya Midland, Teksas, USA),
21. Taq polimeraz (Sigma).

3.2.8.3 Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

RNA Later Saklama Solüsyonunun Hazırlanışı

70 gr Amonyum Sülfat, 10 mM EDTA ve 25 mM Sodyum Sitrat (pH=5,2) 100 ml DEPC ile işlenmiş ddsu içerisinde karıştırılarak hazırlandı ve pH 5.2'ye ayarlandı.

RNA Denaturasyon Solüsyonunun Hazırlanışı (RLT çözeltisi)

4M Guanidin Tiyosiyanat, 25 mM Sodyum Sitrat (pH=7), % 0,5 Sarkosil içeren çözelti hazırlandı ve kullanımdan hemen önce son konsantrasyon % 1 olacak şekilde beta-merkaptöetanol eklendi.

Total RNA saflaştırması (Qiagen Kit Protokolü)

Bu işlem için QIAGEN RNA Mini Saflaştırma Kiti aşağıda verilen şekliyle kullanıldı.

- Yaklaşık 100 mg doku parçası alındı ve % 5 (w/v) doku olacak şekilde kit içerisindeki RLT çözeltisi içine kondu.
- 13500 rpm hızda 5 mm'lik homojenizatörün ucuyla buz üzerinde 40 saniye homojenize edildi.
- Homojenattan 600 µl alındı (30 mg dokuya karşılık geliyor)
- 10 dakika 18000 rpm'de (4 °C) de santrifüj edildi
- Süpernatant kısmı yeni eppendorf tüpüne alındı ve üzerine aynı hacimde %70 ethanol (DEPC ddsu ile hazırlandı) eklendi
- Çözeltinin 600 µl'si filtreye kondu ve altındaki tüple beraber 10000 rpm 15 saniyede santrifüj edildi
- Alt tüpteki sıvı atıldı ve tüp tekrar filtreye takılarak geriye kalan çözeltide filtreye eklendi ve yukarıdaki gibi sanrifüj edildi

- Alttaki tüpteki sıvı atıldı ve filtreye RWI solüsyonundan 700 µl eklendi ve 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi
- Alttaki tüp atıldı ve filtrenin altına yeni bir tüp takıldı (2 ml) ve filtreye 500 µl RPE solüsyonu ilave edildi (kullanmadan önce RPE için 4 kat etanol eklendi) ve 15 saniye 10000 rpm'de santrifüj edildi
- Alttaki sıvı atıldı ve filtreye 500 µl RPE eklendi ve 2 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi
- Alttaki tüp atıldı ve filtre yeni bir eppendorf içerisine takıldı ve filtreye 50 µl RNAaz içermeyen ddsu eklendi ve 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi
- Filtreye tekrar 50 µL RNAaz içermeyen ddsu konularak tekrar 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildi alttaki tüpteki saf toplam RNA hemen -30 °C'de saklandı.

3.2.8.4 RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri

QIAGEN RNAeasy saflaştırma kiti ile karaciğer örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'lar, %1'lik agaroz jel üzerinde, elektroforezde 100 mV'da koşturuldu. RNA bantları jel görüntüleme sisteminde (ultraviole ışık altında) görüntülenerek 28S ve 18S keskin ribozomal RNA bantlarının elde edildiği ve herhangi bir yıkımın olmadığı RNA'lar cDNA işleminde kullanıldı (Şekil 14 'de). Örneklerin RNA miktarları spektrofotometrede 260 nm UV spektrumunda okundu. cDNA yapımında ortama 1 µg toplam RNA eklendi. RNA miktar hesaplanmasında 260 nm deki OD x Sulandırma faktörü x 40/1000 formülü kullanıldı. RNA miktarı µg/NL cinsinden bulundu.

1000 ml 5X TBE çözeltisi hazırlamak için ;

- 54 gr Trise Base
- 27.5 gr Borik Asit
- 20 ml 0.5 M EDTA çözeltisi

900 mL dd su içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı 8.0 oluncaya kadar HCl eklendi. Çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. 1x TBE hazırlamak için bu çözelti 1/5 oranında dilüe edildi.

3.2.8.5 cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezi için Invitrogen firmasının ürettiği SuperScript III ters transkriptaz enzim kiti kullanıldı. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapıldı. K 100 µl'lik PZR tüpüne 1 µg toplam RNA, 1 µl primer 100 pmol PoliT-18 primeri), 1 µl dNTP (10 mM) ve toplam hacim 13 µl olacak şekilde ddsu eklendi, karıştırıldı ve 65 °C'de 15 dakika PZR makinesinde ısıtıldı. Bu karışım üzerine 4 µl 5x First Strand tamponu, 2 µl DTT, 1 µl ddH₂O, 1 µl SuperScript III ters transkriptaz enzimi eklendi ve karıştırıldı ve PZR makinesinde 50 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 15 dakika ısıtıldı, daha sonra da -20 °C de analize kadar saklandı.

Araştırmada rat GAPDH ve GST Pi gen ifadeleri için, listesi Tablo 7'de verilen primerler kullanıldı.

Tablo 7. Primer dizilimleri

Primer adı	Primer dizilimi	PZR ürünü büyüklüğü (baz sayısı)	Primerin alındığı kaynak
GAPDH-F GAPDH-R	CAAATTCAACGGCACAGTCA ACACATTGGGGGTAGGAACA	540	131
GST π -F GST π -R	CCTCACCCCTTTACCAATCTA TTCGTCCACTACTGTTTACC	462	132

3.2.8.6. Gerçek Zamanlı PZR protokolü

Gerçek zamanlı PZR cihazı Roche LC480 modeli olduğu için ROCHE gerçek zamanlı PZR kit karışımı kullanıldı. Reaksiyonlar 20 µl toplam hacimde yapıldı. Bunun için 10 µl kit karışımı (Enzim, dNTP, Mg, tampon ve su), 0,2 µl cDNA, 0,2 µl ileri ve geri primerler (10 pmol/µl) ve 9,4 µl ddsu olacak şekilde hazırlandı. İlk denaturasyon, 5 dakika 95 °C, denaturasyon 30 saniye 95 °C, bağlanma 55 °C' 40 saniye ve polimerizasyon 72 °C 40 saniye olarak ve döngü sayısı 50 olarak kullanıldı.

3.2.9. PCR Verileri İçin İstatistiksel Analizler

İstatistik incelemede, SPSS 15.0 istatistik paket programı kullanıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma (Ort \pm SD) şeklinde ifade edildi. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı, gruplar arası karşılaştırmalarda Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. P'nin 0.05 den küçük olduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

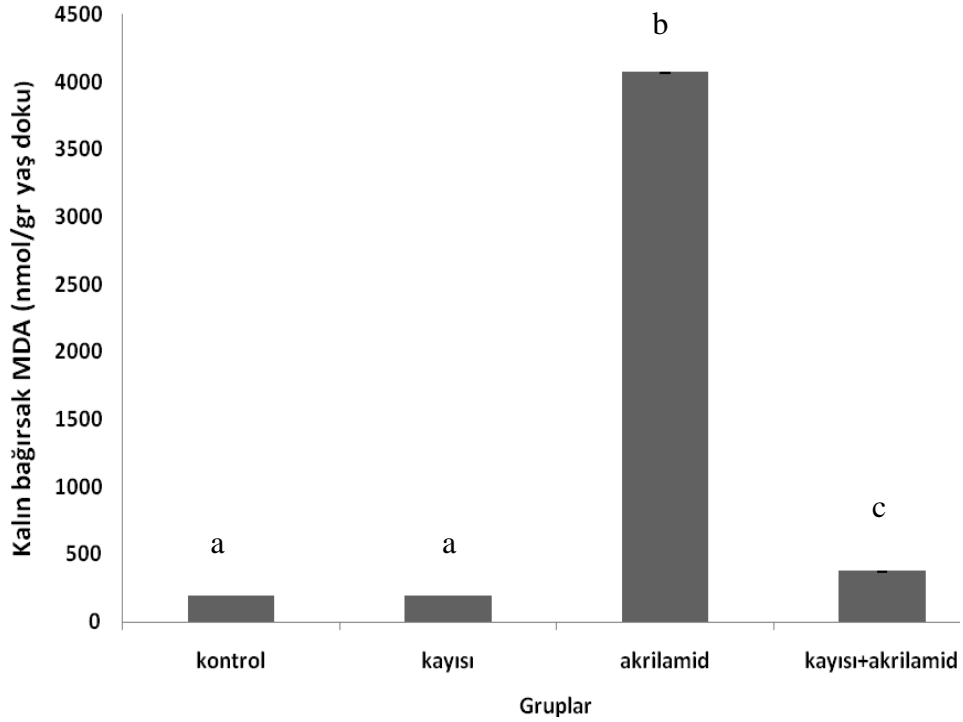
3.2.10. Biyokimyasal Veriler İçin İstatiksel Analizler

İstatiksel analizler SPSS 9.05 Windows paket programı ve GraphPad Prism programı kullanılarak değerlendirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testiyle değerlendirildi. Normal dağılım gösteren veriler ortalama \pm standart sapma (mean \pm SD) olarak, normal dağılım göstermeyen veriler ise ortanca (min-maks) şeklinde ifade edildiler. Normal dağılım gösteren veriler için gruplar arasındaki karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi uygulandı, gruplar arası çoklu karşılaştırmalarda Tukey'in HSD testi yapıldı. P 'nin 0.05 den küçük olduğu değerler istatiki olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Grupların ortanca değerleri Dunn'ın testi ile karşılaştırıldı. P 'nin 0.05 ve 0.01 den küçük olduğu değerlerde anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Grupların Kalın bağırsak MDA düzeyleri

Yapılan istatiki ölçümler sonucunda Rat Kalınbağırsak MDA düzeyleri Ortanca ; (min-mak): Kontrol grubunda 191 (124–248), Kayısı grubunda 198 (174-251), Akrilamid grubunda 4070 (1039-7069), Akrilamid+Kayısı grubunda 375 (298-499) nmol/gr yaş doku olarak bulunmuştur. Akrilamid grubunda MDA aktivitesi diğer tüm gruplara göre istatistikî olarak anlamlı derecede artarken ($P<0.05$), kayısı+akrilamid grubunda, kayısı uygulaması akrilamid grubuna göre MDA aktivitesini istatistikî olarak anlamlı şekilde düşürmüştür ($P<0.05$).

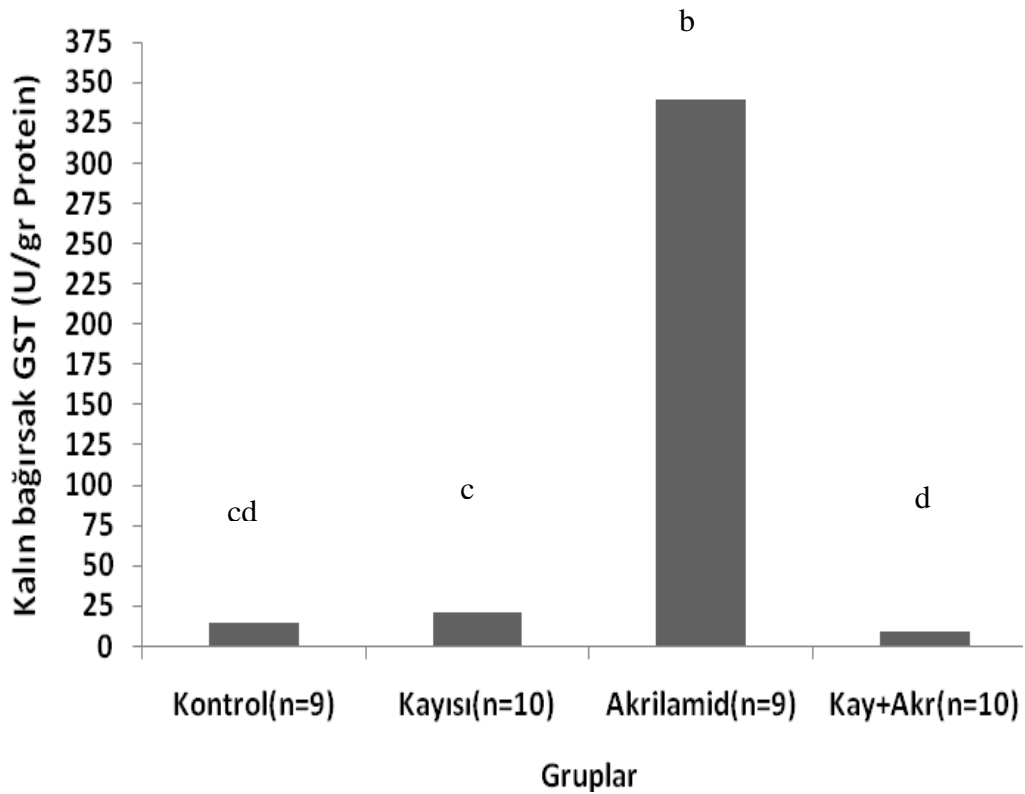


Şekil 10: Grupların Kalın bağırsak MDA düzeyleri

*Gruplarda farklı olan harfler istatistikî olarak birbirinden anlamlıdır ($P<0,05$).

4.2. Grupların Kalın Bağırsak GST Düzeyleri

Yapılan istatiki ölçümler sonucunda Rat Kalın bağırsak GST düzeyleri Ortanca (min-mak): Kontrol grubunda 15,05 (9,8-19,50), Kayısı grubunda 21,25 (18,50-29), Akrilamid grubunda 339,6 (224-604), Akrilamid+Kayısı grubunda 9,2 (5,9-11,3) U/gr protein olarak bulunmuştur. Akrilamid grubunda GST aktivitesi diğer tüm gruplara göre istatistikî olarak anlamlı derecede artarken ($P<0.05$), Akrilamid+kayısı grubunda kayısı uygulaması akrilamid grubuna göre GST aktivitesini istatistikî olarak anlamlı şekilde düşürmüştür ($P<0.05$).

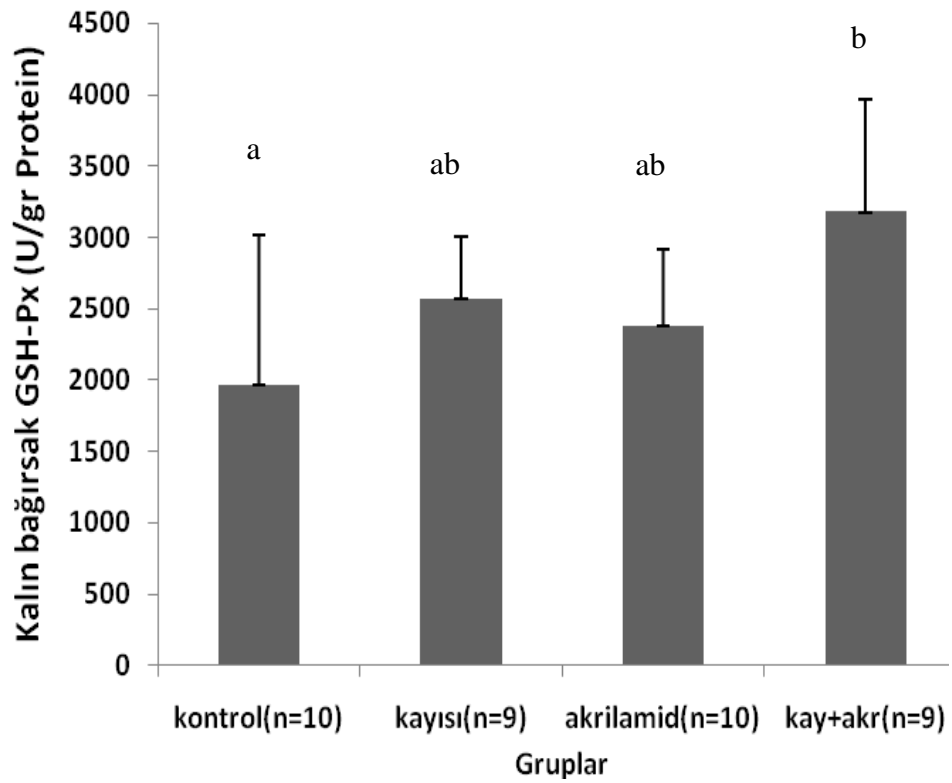


Şekil 11: Grupların kalın bağırsak GST aktivite düzeyleri

*Gruplarda farklı olan harfler istatistikî olarak birbirinden anlamlıdır ($P<0,05$).

4.3. Grupların Kalın Bağırsak GSH-Px Düzeyleri

Yapılan istatiki ölçümler sonucunda Rat Kalın bağırsak GSH-Px düzeyleri (Ortalama \pm SD): Kontrol grubunda 1961 ± 1052 , Kayısı grubunda 2573 ± 436 , Akrilamid grubunda 2383 ± 537 , Akrilamid+Kayısı grubunda 3179 ± 791 U/gr protein olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla akrilamid+kayısı grubu, GSH-Px aktivitesini istatistikî olarak anlamlı derecede arttırmıştır ($P < 0,05$).

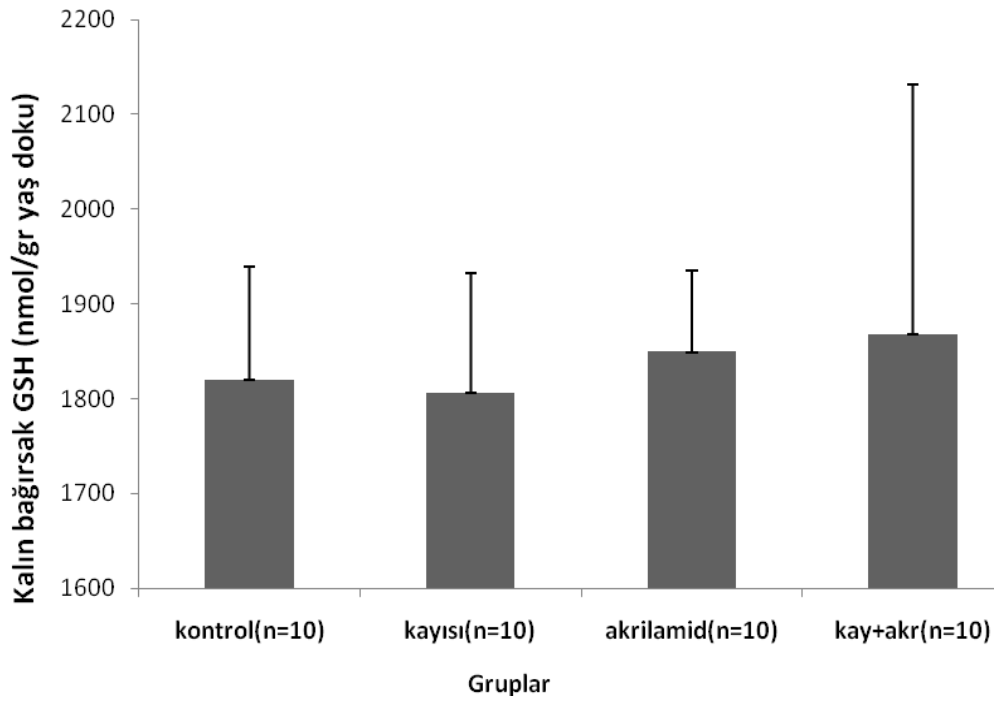


Şekil 12: Grupların Kalın bağırsak GSH-Px düzeyleri

*Gruplarda farklı olan harfler istatistikî olarak birbirinden anlamlıdır ($P < 0,05$).

4.4. Grupların Kalın Bağırsak GSH Düzeyleri

Yapılan istatistikî ölçümler sonucunda Rat Kalın bağırsak GSH düzeyleri (Ortalama \pm SD): Kontrol grubunda 1820 \pm 119, Kayısı grubunda 1806 \pm 126, Akrilamid grubunda 1849 \pm 86, Akrilamid+Kayısı grubunda 1868 \pm 264 nmol/gr yaş doku olarak bulunmuştur. Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur ($P > 0,05$).

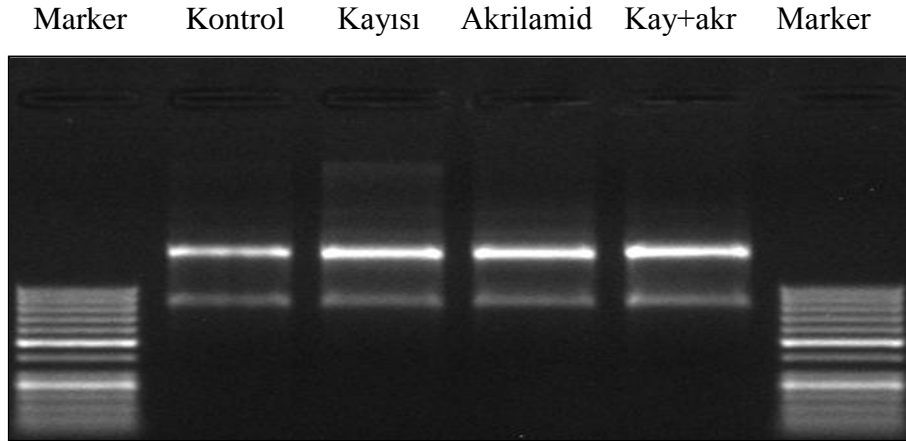


Şekil 13: Grupların Kalın bağırsak GSH düzeyleri

4.5. Grupların Kalın Bağırsak GST-Pi Gen Ekspresyon Düzeyleri

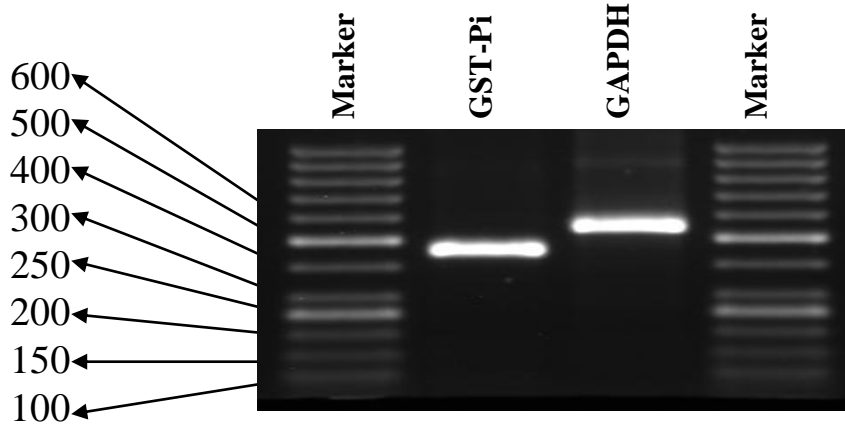
PZR Sonuçları

RNA'lar saflaştırıldıktan sonra % 1' lik agaroz jele yüklenerek incelendiler. Şekil 14'de her gruptan seçilen saflaştırılmış RNA'ların % 1' lik agaroz jelde koşturulmuş resmi görülmektedir. Şekilde de görüldüğü üzere saflaştırılan RNA'larda herhangi bir yıkılım olmadığı gibi, iki ribozomal bantta büyük saflıkta elde edilmiştir.



Şekil 14: Qiagen RNAeasy saflaştırma kiti ile kalın bağırsak örneklerinden saflaştırılan toplam RNA örnekleri (% 1'lik agaroz jel).

GAPDH ve GST-Pi'nin, gerçek zamanlı PCR'de çoğaltılarak elde edilmiş DNA'ları % 1'lik agaroz jele yüklendi. Daha sonra bu örneklerin kullanılmasıyla yapılan agaroz elektroforezinde, PZR sonuçlarının tek ve istenilen boyda bir DNA bantı oluşturduğu görüldü (Şekil 15).

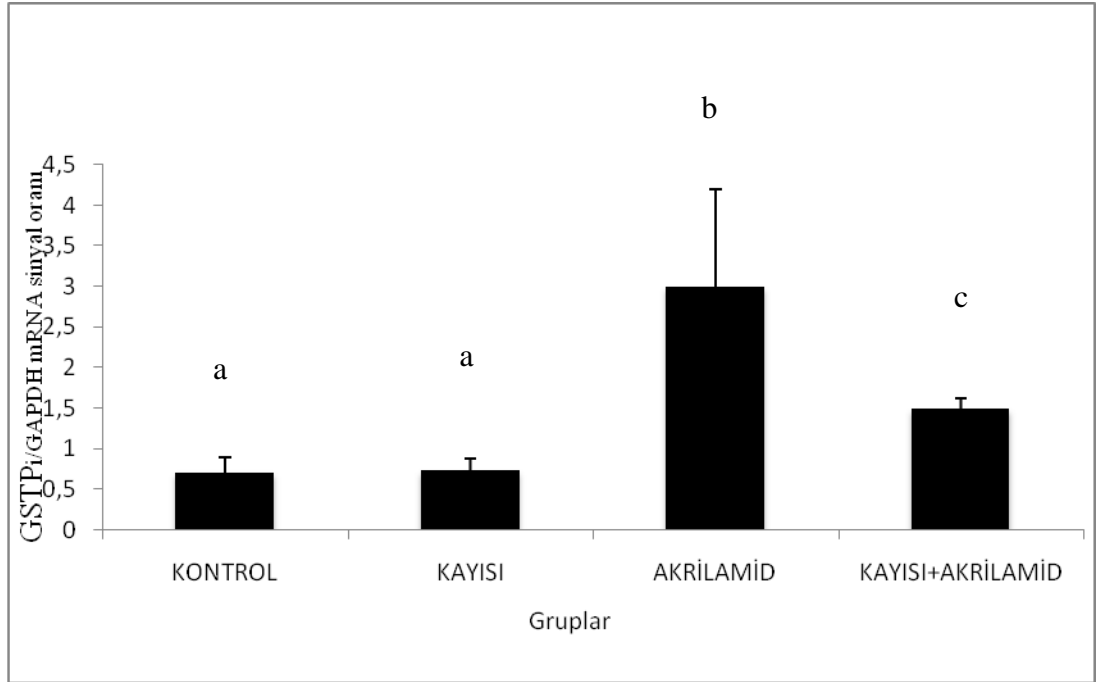


Şekil 15: Gerçek zamanlı PZR da çoğaltılan GAPDH ve GST-Pi cDNA'larının elektroforegramı

Tablo 8: Gruplarda ölçülen Kalın bağırsak GSTPi/GAPDH mRNA seviyelerinin oranı.

Gruplar	GSTPi/GAPDH ortalama \pm standart sapma
Kontrol	0.71 \pm 0.185 ^a
Kayısı	0.73 \pm 0.150 ^a
Akrilamid	3.00 \pm 1.192 ^b
Kayısı+ Akrilamid	1.50 \pm 0.116 ^c

Kontrol, kayısı, akrilamid ve akrilamid+kayısı uygulanan gruplarda GSTPi/GAPDH mRNA sinyal oranı sırasıyla 0.71, 0.73, 3 ve 1.50 olarak bulundu. Gruplar arasında GSTPi mRNA seviyeleri istatistikî olarak karşılaştırıldığında, akrilamid grubunun mRNA seviyelerinin diğer gruplara göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ($P<0.05$).



Şekil 16:Kontrol ve uygulama gruplarında kalın bağırsak GSTPi/GAPDH mRNA seviyelerinin oranı.

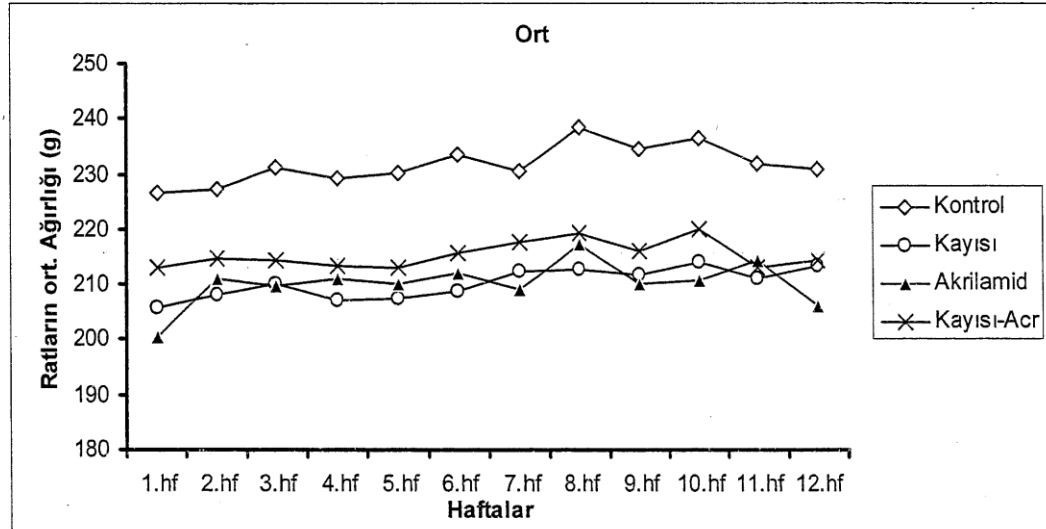
*Sütünde farklı olan harfler istatistikî olarak birbirinden anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

4.6. Grupların Haftalık Ortalama Ağırlıkları

12 hafta boyunca gruplardaki her bir dişi Spraque dawley türü rat haftalık olarak tartıldı. 12 hafta süre sonunda tartım sonuçları değerlendirildiğin de gruplar arasında ortalama ağırlık bakımından anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p < 0.05$).

Tablo 9: Ratların haftalık ağırlık ortalamaları

Haftalar \ Gruplar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrol	227	227	231	229	230	233	231	239	235	236	232	231
Kayısı	206	208	210	207	207	209	212	213	212	214	211	213
Akrilamid	200	211	210	211	210	212	209	217	210	211	214	206
Kayısı + Akrilamid	213	215	215	213	213	216	218	219	226	220	213	214



Şekil 17: Ratların haftalık ağırlık değişimleri

5. TARTIŞMA

Akrilamid doğal olarak bulunmamakla birlikte oldukça yüksek kimyasal aktiviteye sahip α - β -ansature karbonil bileşiği olup oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanım alanı, gerek endüstriyel alanda gerekse de besinlerin pişirilmesi sırasında görülmektedir. İnsanlık için asıl tehlikeli olan gıda kaynaklı akrilamiddir, çünkü gıda kaynaklı akrilamid günlük düzenli olarak vücuda alınmaktadır. Gıda kaynaklı akrilamid, karbonhidrat ve özellikle asparajin amino asidi içeren gıdalarda yüksek sıcaklığın etkisi ile oluşmaktadır. Bu oluşum, maillard reaksiyonu ile gerçekleşmektedir. Akrilamid oluşumu, kızartma ve fırınlama işlemi sırasında 120 °C üzerine çıkan pişirme işleminde gerçekleşmektedir (100). Ancak haşlama işlemi sırasında akrilamid oluşumu ile ilgili risk olmadığı bildirilmiştir (101).

Akrilamidin, gıdaların işlenmesi sırasında da oluştuğunun ortaya konulması, çok sayıda klinik ve deneysel çalışmanın yapılmasına sebep olmuştur. Bu araştırmalar, akrilamidin insanlık için nörotoksik, deney hayvanları için nörotoksik ve kanserojen olduğunu göstermiştir (102, 103). Akrilamidin insanlarda kanser oluşturduğuna dair henüz bir bilimsel veri bulunmasada, Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (International Agency for Research into Cancer-IARC) gıdalardaki akrilamidi ‘insanlar için potansiyel kanserojen maddeler’ (grup 2A) arasına almıştır. Akrilamidin canlılar için tehlikeli bir madde olması dolayısıyla çoğu ülkede, akrilamidin günlük üst ve alt alım sınırlarını belirlemeye ve günlük alım miktarlarını azaltmaya yönelik olarak bilimsel çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmaların sonuçları, insanların ortalama günlük akrilamid alım düzeylerinin beslenme alışkanlıklarına göre değişkenlik gösterdiği ve ortalama olarak 0.3-5.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ arasında olduğu tespit edilmiştir. Akrilamidin ortalama günlük alım miktarları konusunda önde gelen kuruluşlar tarafından yapılmış çalışmaların sonuçları yayımlanmıştır. WHO; 0.3–0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ aralığında, FDA ise 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ olarak belirlemiştir (104,105). Vücuda gıdalarla alınan akrilamidin büyük kısmı, patates kızartmaları ve cipslerden (%6-46), kahvede (%13-39), hamur işleri ve bisküvilerden (%10-20), ekmekten (%10-30) kaynaklanmaktadır.

İsveç'te yapılmış bir araştırmada, bir kişinin yiyeceklerle aldığı akrilamid miktarının günlük olarak ortalama 35 mg olduğu tespit edilmiştir. Yetişkin bir insanın vücut ağırlığının ortalama 70 kg olduğunu düşünürsek, kg canlı ağırlık başına ortalama 0.5 µg akrilamidin vücuda alındığı görülmektedir (45). Mojska, Polonya da yapmış olduğu bir çalışmada ise, insanların ortalama 0.43 µg/kg/gün akrilamid aldığını rapor etmiştir (106). Avrupa'nın diğer ülkelerinde yapılan araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (47,48)

Yapılan bir araştırmada, sağlıklı gönüllülere kg başına değişik miktarlarda radyoaktif işaretli akrilamid verilerek güvenli ve tehlikeli doz aralığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu araştırmanın sonuçları, 0.5 µg/kg/gün'den düşük olan akrilamid dozlarının iyi derecede tolere edilebildiğini, ancak 0.5 µg/kg/gün'den yüksek olan miktarların ise insan sağlığı için çok zararlı olduğunu göstermiştir (107). Olcay Kaplan ve ark., Türkiyede yaptıkları akrilamid tarama çalışmasında, çeşitli gıdalarda: mangalda tavuk, et türleri, patates kızartmaları bisküvi ve kahve de 20–250 µg/kg düzeyinde akrilamidin bulunduğunu tespit etmişlerdir (108). TÜBİTAK tarafından sadece besinlerde ki akrilamid miktarı hesaplanmış, ancak akrilamid kaynaklı bir risk değerlendirilmesi yapılmamıştır.

Vücutta normal fizyolojik metabolizmada da sürekli serbest radikaller oluşmakta ve bu zararlı radikallere karşı vücudun koruyucu antioksidan mekanizmaları bulunmaktadır. Bu antioksidan mekanizmalar; antioksidan enzimler (SOD, CAT, GSH-Px, GST, GR gibi enzimler), vitaminler (Vitamin A, E ve C) ve organik/inorganik moleküllerden (Glutatyon, melatonin, selenyum) oluşmaktadır. Normal fizyolojik şartlar altında antioksidan sistemler ile serbest radikaller arasında bir denge söz konusudur ve bu denge sayesinde serbest radikaller zararsız hale getirilmektedirler. Bu dengenin oksidanlar tarafına doğru bozulması, oksidatif strese ve hasarlayıcı olayların başlamasına sebebiyet vermektedir. Oksidatif stres ise genel olarak oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Hücreler arası major antioksidan, GSH'dır. GSH, oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde indirgeyici güç olarak görev almaktadır. Total GSH seviyesini muhafaza etmek için ise GSH-Px, GR ve GST gibi antioksidan enzimler koordineli bir şekilde işlev görmektedir (109).

Akrilamidin oksidatif strese yol açıp açmadığını araştırmak amacıyla yapılan deneysel araştırmalar, akrilamidin dokuların GSH düzeylerin önemli derecede azaltarak hücreleri oksidatif hasarlanmaya karşı korumasız bıraktığını ortaya koymuştur. Akrilamidin bu mekanizmayla oksidatif strese yol açarak nörotoksik etkiden mutajenik ve karsinojenik etkilere kadar çok çeşitli hasarlanmalara neden olduğu ve bu çok farklı hasarlanmaların, akrilamidin uygulama dozu, süresi ve yoluna bağlı olarak değiştiği rapor edilmiştir (110,111).

Akrilamid, diğer ksenobiyotiklerin tersine suda iyi derecede çözünür, ağız yoluyla vücuda alındıktan sonra çok hızlı bir şekilde tüm dokulara dağılım gösterir. Akrilamid, sindirim kanalı boyunca tüm dokularda (özafagus, mide, ince ve kalın bağırsak) GST/GSH sistemiyle konjuge edilerek akrilamid-glutasyon kompleks bileşiğine çevrilmekte ve sindirim kanalı dokularının akrilamidin zararlı etkilerinden korunması sağlanmaktadır. Böylece gıdalarla ağızdan alınan akrilamidin bir kısmı sindirim kanalında etkisiz hale getirilmiş olmaktadır. Ancak akrilamidin sindirim kanalı boyunca etkili bir şekilde konjuge edilebilmesi, büyük oranda dokunun GST aktivite ve GSH düzeylerine bağlıdır. Bu konuyla ilgili olarak Lieshout ve ark. (112), ratları bir süre; α -tokoferol, β -karoten, likopen, flavonoid, limonen gibi antioksidan ve antikanserojen madde ilave edilmiş diyetle beslemişlerdir. Çalışma sonucunda yaptıkları analizlerde, sindirim sistemi boyunca; özafagus, mide, ince ve kalın bağırsak dokularında GST aktivitesinin önemli derecede arttığını gözlemlemişlerdir. Lieshout ve ark. bu sonuçları antioksidan ve antikanserojen etkili moleküller açısından zengin olan sebze ve meyvelerin yeterli düzeyde tüketiminin, ağız yoluyla alınan toksik ve kanserojen maddelerin sindirim kanalı boyunca GSH ile konjugasyonunu ve vücut dışına atılımını hızlandıracağı ve bunun sonucunda da vücutu zararlı etkilerden koruyabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Bu araştırmanın sonuçları, gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan kişilerin, antioksidan ve antikanserojen madde içeren bu sebze ve meyveleri yeterince tüketmesinin akrilamid kaynaklı kanserojenik, mutajenik ve oksidatif etkileri engelleyebileceğini düşündürmektedir.

Bağırsaklardan emilerek kana geçen akrilamid büyük oranda karaciğer ve diğer dokulara çok hızlı bir şekilde dağılım gösterir. Akrilamid, yarılanma süresinin kısa olması nedeniyle kandan çok hızlı bir şekilde temizlenmektedir. Karaciğere

alınan akrilamidin bir kısmı GST/GSH sistemiyle konjuge edilerek detoksifiye edilir, bir kısmı ise sitokrom P450 enzim sistemiyle okside edilerek glisidamide dönüştürülmektedir. Glisidamid, akrilamidin okside edilmiş formudur. Kan serumunda değişikliğe uğramamış akrilamid oranının ise çok düşük (% 0.5) olduğu görülmüştür. Ayrıca kana geçen akrilamidin bir kısmının, kanda bulunan proteinler ile hemoglobine yüksek affinite göstermesi nedeniyle bu proteinlere bağlandığı tespit edilmiştir (113). Glisidamidin katabolizması iki enzimatik yolla meydana gelmekte ve glisidamidin etkisizleştirilerek vücut dışına atılması sağlanmaktadır. Birinci reaksiyonda glisidamid, Epoksi Hidrolaz (EH) ile gliseramide okside edilerek yıkıma uğratılmakta ve büyük oranda idrarla dışarı atılmaktadır. İkinci enzimatik yıkım yolu ise, GST'nin glisidamidi GSH ile konjuge ederek detoksifiye etmesi şeklinde gerçekleşir (114). Ancak hücrelerin glisidamidi detoksifiye etme kapasitelerinin büyük oranda yüksek GST aktivite ve GSH düzeylerine bağımlı olduğu, açıkça vurgulanması gerekir.

Seed Alzahrani, akrilamidin fareler üzerindeki genotoksik etkilerini incelediği çalışmada, L-karnitin akrilamidin mutajenik etkilerine karşı koruyucu etkide bulunduğunu bildirmiştir (115). Bu çalışmada 10, 20, 30 mg/kg/gün dozunda akrilamid ve koruyucu olarakta 100 ile 200 mg/kg/gün dozunda L-karnitin uygulanmıştır. 1 veya 2 hafta içinde kemik iliği hücrelerinde kromozomal anomalilerin (morfolojik sperm) ve mikronukleus oluşum oranlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir. L-karnitin uygulanması, bu değişiklikleri önemli derecede azaltmıştır. Yine başka bir çalışmada Chen Shuming ve ark., ratlarda soya sosunun akrilamid kaynaklı nörotoksositeye karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır (116). Bu çalışmada, 8 hafta boyunca ratlara 10 mg/kg/gün dozunda akrilamid ve 0.5 ml soya sosu vermişlerdir. Sonuç olarak soya sosunun, beyin dokusunda akrilamid kaynaklı oksidatif strese karşı önemli bir koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur.

Pupel ve ark. hücre içi GSH seviyelerinin akrilamid ve glisidamidin genotoksik etkilerinin oluşumunda önemli bir faktör olup olmadığını araştırdıkları bir çalışmada, yüksek hücre içi GSH düzeylerinin akrilamidin GSH'la bağlanmasını arttırarak glisidamid oluşumunu azalttığını ve böylece genotoksik hasarların önüne geçilebileceğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmanın GSH sentez inhibitörü verilerek

yapılan kısmında ise, ratlara çok düşük düzeyde akrilamid uygulamasının (1mM) bile, hücre DNA'larında önemli derecede zincir kırıkları, baz kayması gibi değişikliklerinin meydana gelmesine yol açtığı rapor edilmiştir. Bu veriler, gerek akrilamid kaynaklı gerekse de glisidamid kaynaklı genotoksik etkilerin önlenmesinde, hücre içi GSH düzeylerinin çok önemli olduğuna işaret etmektedir (117). Bizim çalışmamızın GSH sonuçları, pupel ve ark. yaptığı çalışmanın sonuçlarına örtüşmemektedir.

Ratlara tek ve tekrarlayan dozlarda akrilamid uygulanarak yapılan deneysel bir araştırmada, akrilamid'in beyin dokusunda GSH düzeylerini ve GST aktivitesini önemli derecede azalttığını ve bunun sonucunda ise akrilamid kaynaklı oksidatif hasarlanmaların meydana geldiğini ortaya konulmuştur (118). Bizim çalışmamızda uzun süreli akrilamid uygulamasına cevaben, GST aktivite düzeylerinde önemli artışlar gözlenmiştir. Bu iki çalışmanın sonuçlarında gözlenen tersliğin, her iki çalışmada uygulanan akrilamid dozunun ve uygulama sürelerinin farklı olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz.. Naruszewicz ve ark., gönüllü insan deneklerine 4 hafta süreyle 157 mg akrilamidi gıda yolu ile uygulamış ve 4 hafta sonra deneklerden kan alınarak yapılan analizlerde hsCRP, γ -GT, ox-LDL ve IL-6 düzeylerinin önemli derecede arttığı, kandan izole edilen monosit, lenfosit ve granülosit gibi kan hücrelerinde aşırı bir SOR üretiminin meydana geldiğini, hücre içi GSH seviyelerinin ciddi derecede azaldığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçtan yola çıkan araştırmacılar, uzun süre gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan insanlarda akrilamidin; oksidatif stres, inflamasyon ve ateroskleroz gelişimini tetikleyebileceğini bildirmişlerdir (119).

Yousef ve El-Demerdash'ın içme sularına 10 hafta boyunca 0.5-500 μ g /kg aralığında akrilamid uygulanan erkek ratlarda plazma protein seviyelerinde ve kreatin kinaz seviyelerinde bir azalma olduğunu, plazma fosfataz düzeylerinde bir artış olduğunu bildirmişlerdir (110). Kan plazmasında, testiste, karaciğer, beyin ve böbrekte MDA, Glutasyon S-transferaz ve Süperoksit dismutaz aktivite düzeyleri artış göstermiştir. Akrilamidin farklı dozlarının bu dokularda enzim aktivitelerinde, lipid peroksidasyonunda ve GSH düzeylerinde azalmalara yol açtığı bildirilmiştir. Buna karşılık, kısa süreli yüksek subletal doz uygulandığında ise GSH konsantrasyonunda bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Bizim araştırmamızda, ratlara 500 μ g/kg dozda

akrilamidin 12 hafta süreyle uygulanması, kalın bağırsak dokusunda MDA düzeyini ciddi derecede artırmıştır. Bu açıdan bakıldığında bizim sonuçlarımız, Yousef ve El-Demerdash'ın araştırma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Ancak Yousef ve El-Demerdash'ın yaptığı çalışmada, akrilamid uygulaması sonrası dokularda GST aktivitesinin arttığını tespit edilmiştir, bu açıdan iki çalışmanın GST sonuçları farklılık göstermiştir. Bu çalışmayı yapan araştırmacılar bu uyumsuzluğun, Yousef ve El-Demerdash'ın uyguladığı akrilamid dozlarının çok düşük olmasından ve uygulama süresinin farklı olmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda akrilamid uygulaması sonrası kalın bağırsak dokusunda GST aktivite seviyelerinde anlamlı bir artış bulunmuştur. Bizim çalışmamızın sonuçları, model olarak birbirine benzeyen Yousef ve El-Demerdash'ın çalışmasıyla paralellik göstermektedir.

GSH-Px, hidrojen peroksidin suya dönüşümünü katalize ederek; eritrosit, zar lipidleri, hücre zarı, sellüler ve subsellüler membranların oksidatif hasarlanmalardan korunmaktadır (120). 4 selenyum atomu içeren GSH-Px hücre membranı, sitozol ve mitokondride bulunmaktadır. GSH-Px aktivitesindeki azalma H_2O_2 düzeylerinin artışına bağlı olarak oksidatif strese ve hücre hasarına yol açmaktadır (121).

Allam ve ark., 10 mg/kg dozunda akrilamidi 7 gün süreyle gebe ratlara uygulayarak yaptıkları çalışmada, doğan yavruların doğum ağırlıklarında ciddi azalmalar gözlemlemişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada, akrilamid uygulanan annelerin yavrularının beyin dokusunda lipid peroksidasyonunun arttığı, GSH düzeyinin ve SOD aktivite seviyesinin önemli derecede düştüğü, oksidatif stres geliştiği ve bunlara bağlı olarakta yavrunun beyin gelişiminin bozulduğu rapor edilmiştir (122). Bir başka çalışmada ise Catalgol ve ark. 0.10, 0.25, 0.50, ve 1.00 mM'lık akrilamid ile insan eritrositlerini invitro şartlarda 37 °C'de 1 saat muamele etmişlerdir. Sonuçta, akrilamidin yüksek dozlarının eritrosit GSH-Px aktivitesini azalttığını saptamışlardır. Bu veri, akrilamidin eritrositlerde antioksidan enzim düzeyini düşürerek oksidatif strese yol açtığını göstermektedir (123).

Bizim çalışmamızda ise akrilamid verilen grubun GSH-Px aktivite düzeyleri, kayısı ve kayısı-akrilamid verilen gruplara kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu bulgular diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Akrilamid ve benzeri toksik maddelerin vücuda alınması sonucu reaktif oksijen türleri meydana

gelmektedir. Bu toksik moleküller vücudun kendi detoksifikasyon sistemleri tarafından ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır. Bu mekanizmalarda görev yapan enzimlerin aktiviteleri ve gen düzeyleri bu toksik maddelere maruz kalma şekline göre değişiklik gösterebilmektedir.

Glutatyon S-transferaz (GST) anti-kanser ilaçlar veya peroksidatif strese karşı hücrel bileşenlerin korunmasını sağlayan çok fonksiyonlu enzimlerdendir. Araştırmamızda GST enzim aktivitesinin, akrilamid uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükseldiği, akrilamidle beraber kayısı uygulamasının enzim aktivitesindeki bu artışı kontrol grubu seviyelerine düşürdüğü tespit edildi. Bu bulgulara paralel olarak aynı sonuçlar GSTP_i mRNA seviyesinde gözlemlendi. Akrilamid uygulaması enzimin mRNA seviyesinde ciddi bir artışa neden olmuş, ancak akrilamidle beraber kayısı uygulaması ise enzimin mRNA seviyesini kontrol grubu ile aynı seviyeye getirmişti.

Akrilamidin organizmada detoksifikasyonunda iki büyük yol vardır. GSH ile doğrudan bağlanma veya sitokrom P450 oksijenazasyonu (CYP2E1) ile toksik ve mutajenik etkisi olan glisidamide dönüşüm. Akrilamidin detoksifikasyonunda ana yol GSH-akrilamid kompleksinin oluşmasıdır (124). GSH ile akrilamid konjugasyonu GSH depolarını tüketen önemli bir etkidir. GSH'nın azalması hücrel hasara neden olabilecek düzeyde oksidatif stresin oluşturabilmektedir. Hücrelerde meydana gelen akrilamid kaynaklı genotoksik etkinin ise, CYP2E1 enziminin akrilamidi detoksifiye ederken oluşturduğu glisidamidden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (125).

İnsanlarda akrilamid, bağırsaktan yüksek oranda ve hızla emilmektedir (126). Bağırsakta akrilamidin taşınması, Caco-2 hücrelerinde pasif difüzyon yolu ile olmaktadır (127). Zödl ve ark., Caco-2 hücre kültür ortamına 0.1, 0.5 ve 1 mM oranlarda akrilamid uygulamışlar ve hücrelerde 24 ve 48 saat sonra CYP2E1 aktivitelerine, GSH düzeylerine bakmışlardır. Araştırmacılar kültür hücrelerinde CYP2E1 enziminin gen ekspresyon düzeyini gerçek zamanlı PZR'la analiz ederek değerlendirmişlerdir. Kültür ortamındaki hücrelerde, uygulamanın 14. ve 21. günlerinde akrilamid dozunun artışına paralel bir GSH azalması tespit etmişlerdir. Yine araştırmacılar, hücre kültür ortamında akrilamidin miktarının artmasına paralel olarak CYP2E1 enziminin mRNA seviyesinin de arttığını tespit etmişlerdir. 0.1 mM

akrilamid uygulamasının hücrelerde CYP2E1 enziminin gen ifadesine bir etki yapmadığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar bu durumu, CYP2E1 enzim ifadesinin artmasıyla hücrelerde akrilamidin glisidamide dönüşümünü artıracak ve bununla hücrelerde genotoksik hasarlanmalara yol açacağı şeklinde yorumlamışlardır. Araştırmacılar, hücresele GSH içeriğinin azalmasının akrilamid genotoksitesinin potansiyel mekanizmalarından biri olabileceği sonucuna varmışlardır (128). Yapılan araştırmalarda, yanmış hayvansal yağlarda mevcut olan akroleinin proteinlere kovalent olarak bağlandığını ve akrolein protein kompleksleri meydana getirdiğini tespit edilmiştir. Bu komplekslerin oksidatif stresin oluşumunda tetikleyici bir marker olduğu düşünülmektedir (129). Akrolein GSH azalmasını indüklemekte ve hücresele hasara yol açmaktadır (130). GST ile katalizlenen reaksiyon, akrolein toksisitesinde önemli bir detoksifikasyon mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır (131). Burada oluşan akrolein-GSH bileşiklerinin ratlarda nefrotoksositeye neden olduğu bildirilmiştir (132).

GST-Pi, başlıca üriner, sindirim ve solunum sistem dokuları olmak üzere vücudun bir çok dokusunda bulunmaktadır (133). İnsan ve hayvanlarda yapılan araştırmalarda, herhangi bir dokuda GST-Pi gen ekspresyonu düzeyindeki artışların, o dokuda preneoplastik değişikliklerin meydana geldiğini gösteren çok önemli bir belirteç olduğu tespit edilmiştir (134-140). GST-Pi rat hepatositlerinde belirlenemeyecek kadar düşük miktarda iken karsinojenlerle muamele edilmiş deneysel hayvan modellerinde karaciğerde aşırı miktarda ifade edildiği tespit edilmiştir (141). Yapılan bir araştırmada 14 gün boyunca ratlara içme suyu ile 2.5, 10 ve 50 mg/kg gün dozlar şeklinde verilen akrilamidin, beyin hipofiz dokusunda GST-Pi mRNA gen ifadesini anlamlı şekilde artırdığı görülmüştür (142).

Araştırmamızda GST-Pi gen ifadesinde gözlemlediğimiz artış, muhtemelen oksidatif stresten kaynaklanmaktadır. Özellikle akrilamidin GSH ile konjuge edilerek vücut dışına atılmasına bağlı olarak kalın bağırsak dokusu GSH depolarının azaltılması, oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar yönünde bozulması sonucunda oksidatif, mutajenik hasarlanmalar ortaya çıkmaktadır. Yine akrilamidin glisidamide dönüşümünün hızlanması, dokularda oksidatif, mutajenik ve genotoksik hasarlanmaların artışı olarak karşımıza çıkmaktadır. Artan oksidatif stres ile beraber NF-Kappa B transkripsiyon faktörünün artması, GST-Pi genindeki indüksiyonu

açıklayan muhtemelen bir mekanizmadır (143). NF-Kappa B artışı genellikle oksidatif stres ile birlikte. Hidrojen peroksitle, sitokinlerle veya UV ile indüklenebilmektedir (144). Kayısı, içeriğinde bulunan birçok vitamin ve fenolik maddeler nedeniyle çok kuvvetli antioksidan özelliğe sahip bir meyvedir. Araştırmamızda, akrilamid ile birlikte kayısı uygulamasının, akrilamid uygulaması ile artan GST-Pi mRNA ifadesini kontrol seviyesine düşürdüğü ortaya konulmuştur. Bunun nedeni, kayısının kuvvetli antioksidan özelliğe sahip bir meyve olmasıdır. Çünkü ortamda antioksidanların bulunması, NF-Kappa B transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu önleyerek bazı genlerin transkripsiyonunu azaltmaktadır (145). Muhtemelen GST-Pi genide, transkripsiyonu NF-KB tarafından uyarılan genlerden birisidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada; kalın bağırsak MDA düzeyleri açısından Akrilamid uygulaması kalın bağırsak dokusu MDA düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı derecede artırdı ($p<0.05$), ancak akrilamidle beraber kayısı verilmesi ise akrilamid grubuna göre MDA düzeyini ciddi derecede azalttı ($p<0.05$). Kalın bağırsak GST aktivite düzeyleri için: Kontrol grubuna kıyasla özellikle akrilamid grubunda GST aktivite düzeyleri önemli derecede yüksek ($p<0.05$) bulunurken, akrilamid+kayısı grubunda önemli derecede düşük bulundu ($p<0.05$). Kalın bağırsak GSH-Px aktivite düzeyleri için: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kayısı, akrilamid gruplarındaki değişim anlamlı değildi, ancak kayısı-akrilamid grubundaki GSH-Px aktivite artışı istatistiksel açıdan anlamlı idi ($p<0.05$). Kalın bağırsak GSH düzeyleri; kontrol grubuna kıyasla kayısı grubunda önemli derecede düşük ($p<0.05$), akrilamid ve akrilamid+kayısı grubunda ise kontrol grubuna kıyasla önemli derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). Grupların GST-Pi gen ifade düzeylerinde kontrol grubuna göre akrilamid grubunda çok ciddi bir artış ($p<0.05$), akrilamid+kayısı grubunda ise önemli bir düşüş ($p<0.05$) gözlemlenmiştir.

12 hafta süreyle akrilamid uygulaması, ratların kalın bağırsak dokusunda preneoplastik değişikliklerin en önemli belirteci olan GST-Pi gen ekspresyonu düzeyini ve lipid peroksidasyonunun en önemli belirteci olan MDA düzeylerini ciddi derecede artırmıştır. Ancak, akrilamidle beraber organik kuru kayısı uygulaması, ratlarda kalın bağırsak GST-Pi gen ekspresyonu ve malondialdehid (MDA) düzeylerini kontrol grubu değerlerine düşürmüştür.

Sonuç olarak; Organik kuru kayısı uygulamasının, akrilamidin kalın bağırsakta meydana getirdiği preneoplastik değişiklikleri ve oksidatif hasarlanmaları önlediği görülmektedir.

Gıda kaynaklı akrilamid toksikasyonlarından korunabilmek için:

- 1- Farklı besin gruplarının amino asit içeriği saptanmalıdır.
- 2- Besinlere uygulanacak pişirme koşulları bir sistem haline getirilmelidir. Derece/pişirme kuralları: başlangıç kızartma derecesi 175 °C olması, Soğuk depolama önlenmeli: 8°C'nin altında depolamanın indirgen şeker miktarını azalttığı

gösterilmiştir (Bazı kaynaklara göre 6 °C),pişirme süresi/ısısının düşürülmeli, ancak tüm besinler patojenleri öldürecek kadar pişirilmelidir

3- Özellikle asparajın aa ve karbonhidratça zengin olan patates kızartmalarında: Düşük şeker içerikli patateslerin tercih edilmesi, dışarıda donmuş ve korunmamış patateslerin tercih edilmemesi, patateslerin suya daldırılması, pişirme veya kızartma işlemi gerçekleşmeden ılık veya sıcak suda veya oda ısısında bekletme, kızartma işleminden önce suyunu iyi arıtma akrilamid oluşumunu önemli derecede düşüreceğinden bu kurallara hassasiyet ile uyulması gerekmektedir.

4- Gelişmekte olan ülkelerde de Akrilamid alım düzeyleri belirlenmelidir.

5- Tencerede pişen yemek kültürü Türkiyede yaşayanlar açısından bir şans olarak görülmeli ve sürdürülmelidir.

6- Gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan insanlar, sindirim kanalı dokularında GSH ve GST aktivite düzeylerini artıran flavonoidlerden zengin sebze ve meyveleri yeterli miktarlarda ve günlük olarak tüketmelidir.

7- Antioksidan ve oksidan dengesinin bozulmaması için özellikle gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan kişilerin, antioksidan (likopen, β -karoten, A, E vitamini, polifenoller) bakımından zengin gıdaları ve özellikle de mevsimine göre taze yada kuru kayısıyı günlük olarak tüketmesini öneriyoruz.

KAYNAKLAR

1. <http://www.belgeler.com/blg/xtp/bazi-kayisi-genotiplerinin-adana-ekolojik-kosullarindaki-verim-ve-kaliteleri-studies-on-some-apricot-genotypes-under-adana-ecological-condition> giriş tarihi:17.04.2011
2. Kayısı ile ilgili genel bilgi araştırılması (Anonim, 2010)
Giriş tarihi:17.04.2011 www.google.com.tr
3. Paulsson B, Grawe J, Törnqvist M. (2002) Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in Mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mutation Res*, 516:101–111.
4. Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. (1988) Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat. Res.*195,45–77.
5. Ghanayem BI, McDaniel LP, Churswell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennel RT. (2005) Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glisidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol Sci*, 88 (2): 11–318.
6. Blasiak J, Gloc, E, Wozniak, K, Czechowska, A. (2004) Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *Chemico-Biological Interac*, 149: 137–149.
7. Overview of acrylamide toxicity and metabolism. (2002) JIFSAN/NCFST Workshop on acrylamide in Food and Toxicology and Metabolic Consequences Working Group.
8. Lingnert, H, Grivas, S., Jagerstad, M., Skog, K., Törnqvist, M., Aman, P. (2002). Acrylamide in food: mechanism of formation and influencing factors during heating of foods. *Scand J Nutr*, 46(4): 159–172.
9. Stadler, RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S. (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419:449–450.
10. Viklund GA, Olsson KM, Sjöholm IM, Skog KI. (2008) Impact of harvest year on amino acids and sugars in potatoes and effect on acrylamide formation during frying. *J Agric Food Chem*, 56(15): 6180-6184.

11. Biederman, M., Grob, K. (2003). Model studies on acrylamide formation in potato, wheat flour and corn starch: ways to reduce acrylamide contents in bakery ware. *Mitteilungen fu r Lebensmittel Hygiene*, 94: 406–422.
12. Gertz C, Klostermann S. (2002) Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur J Lipid Sci Technol*, 104: 762–771.
13. Margaretha J, Kertsin S. (2005) Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res*, 574: 156–172.
14. Becalski A, Lau BP, Lewis D, Seaman SW. (2003) Acrylamide in foods: occurrence, sources and modelling. *J Agric Food Chem*, 51(3): 802–808.
15. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2005. Summary and conclusions:64thmeeting. Available at www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf.
16. U.S. Food and Drug Administration. The Action Plans for Acrylamide in Food. 2002–2005. Available at <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Acrylamide/default.htm>
17. Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization. Health Implications of Acrylamide in Food, Report of a Joint FAO/WHO consultation. Health Organization, Geneva 2002. Available at www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide_summary.pdf
18. EU. Information on Ways to Lower the levels of Acrylamide Formed in Food (note of the meeting of experts on industrial contaminants in food: acrylamide workshop(2003) Available at http://www.jifsan.umd.edu/docs/acry2004/acry_2004_slayne.pdf
19. Yang, H.J. Lee, S.H., Jin, Y., Choi, J.H., Han, D.U., Chae, C., Lee, M.H., and Han, H.C. (2005). Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reprod Toxicol*, 19: 527- 534.
20. Friedman, M.A. Dulak, L.H. Stedham, M. (1995). A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam Appl Toxicol*, 27: 95–105.
21. Collins, J.J. Swaen, G.M. Marsh, G.M., Utidjian, H.M., Caporossi, J.C., Lucas, L.J. (1989). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide. *J Occup Med*, 31: 614– 617.

22. Olesen, P.T. Olsen, A., Frandsen, H., Frederiksen, K., Overvad, K., Tjønneland, A.(2008). Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *Int J Cancer*, 122: 2094–2100.
23. Spencer, P.S. Sabri, M.I. Schaumburg, H.H. Moore, C.L. (1978). Does a defect of energy metabolism in the nerve fiber underlie axonal degeneration in polyneuropathies. *Ann Neurol*, 5: 501–507.
24. Clements, R.S. (1979). Diabetic neuropathy new concepts in its etiology. *Diabetes*, 28: 604–611.
25. Fullerton, P. and Barnes, J. (1966) Peripheral neuropathy in rats produced by acrylamide. *Br J Ind Med*, 23: 210–221.
26. Yoshimura, S. Imai, K. Saitoh, Y. Yamaguchi, H. and Ohtaki, S. (1992). The same chemicals induce different neurotoxicity when administered in high doses for short term or low doses for long term to rats and dogs. *Mol Chem Neuropathol*, 16: 59–84.
27. Dearfield, K.L. Douglas, G.R. Ehling, U.H. Moore, M.M. G.A. Brusick, D.J. (1995). Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat. Res*, 330: 71–99.
28. Favor, J. Shelby, MD. (2005). Transmitted mutational events induced in mouse germ cells following acrylamide or glycidamide exposure. *Mutat Res*, 580: 21–30.
29. International Agency for Research on Cancer (IARC). (1994). Acrylamide, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Industrial Chemicals. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 60: 389–433.
30. Besaratinia, A. Pfeifer, GP. (2003). Weak yet distinct mutagenicity of acrylamide in mammalian cells. *J Natl Cancer Inst*, 95: 889–896.
31. Gamboa da Costa, G. Churchwell, MI. Hamilton, LP. Beland, FA., Marques, MM., Doerge, DR. (2003). DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem Res Toxicol*, 16: 1328–1337.
32. Sumner, S. Fennell, T. Moore, T. Chanas, B. Gonzalez, F. and Ghanayem, B. (1999b). Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol*, 12: 1110–1116.

33. Favor, J. Shelby, MD. (2005). Transmitted mutational events induced in mouse germ cells following acrylamide or glycidamide exposure. *Mutat Res*, 580: 21–30.
34. Besaratinia, A. Pfeifer, GP. (2004). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. *J Natl Cancer Inst*, 96: 1023–1029.
35. Johnson, KA., Gorzinski, SJ., Bodner, KM., Campbell, R., Wolf, C., Friedman, M.A., and Mast, R.W. (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 85: 154–168.
36. Bull, R.J. Robinson, M. Laurie, R.D. Stoner, G.D. Greisiger, E. Meier, J.R. Stober, J. (1984). Carcinogenic effects of acrylamide in SENCAR and A/J mice. *Cancer Res*, 44: 107–111.
37. Marsh, G.M. Lucas, L.J. Youk, A.O. Schall, L.C. (1999). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *J Occup Environ Med*, 56: 181–190.
38. Mucci, L.A. Wilson, K.M. (2008). Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *J Agric Food Chem*, 56: 6013–6019.
39. Hogervorst, J.G. Schouten, L.J. Konings, E.J. Goldbohm, R.A. van den Brandt, P.A. (2008). Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. *Am J Clin Nutr*, 87: 1428–1438.
40. Olesen, P.T. Olsen, A. Frandsen, H. Frederiksen, K. Overvad, K. Tjønneland, A. (2008). Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *Int J Cancer*, 122: 2094–2100.
41. Hogervorst, J.G. Schouten, L.J. Konings, E.J. Goldbohm, R.A. van den Brandt, P.A. (2007). A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16: 2304–2313.
42. Bull, R.J. Robinson, M. Stober J.A. (1984). Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice. *Cancer Lett*, 24: 209–212.
43. Heath, Jr. CW. Falk, H. Creech, Jr. JL. (1975). Characteristics of cases of angiosarcoma of the liver among vinyl chloride workers in the United States. *Ann NY Acad Sci*, 246: 231–236.

44. Calleman, C.J.Bergmark, E. Costa, L.G. (1990). Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem Res Toxicol*, 3: 406–412.
45. Svensson, K. Abramsson, L. Becker, W. Glynn, A. Hellenas K.E. Lind, Y. Rosen, J. (2003). Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem Toxicol*, 41: 1581–1586.
46. Mottram, D.S. Wedzicha, B.L. Dodson, AT. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419: 448–449.
47. İstanbul ticaret odası dış ticaret şubesi araştırma servisi Giriş tarihi:17.04.2011 <http://www.ito.org.tr/>
48. Haciseferoğulları H, Gezer İ, Özcan MM. (2007) Post harvest chemical and physical–mechanical properties of some apricot varieties cultivated in Turkey. *J Food Process Eng*; 79: 364–73.
49. Akin EB, Karabulut I, Topcu A. (2008). Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Food Chem*, 107: 939–48.
50. Ruiz D, Egea J, Gıl MI. (2005) Characterization and quantitation of phenolic compounds in new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *J Agric Food Chem*, 53: 9544–52.
51. Maoshing N. Apricots: The Secret Anti-Aging Weapon. <http://health.yahoo.com/experts/drmao/198/apricots-these-secret-anti-aging-weapon/> [Erişim tarihi: 20.08.2009].
52. Yang WJ, Li DP, Li JK. (2009) Synergistic antioxidant activities of eight traditional chinese herb pairs. *Biol Pharm Bull*, 32: 1021–1026.
53. Vardı N, Parlakpınar H, Öztürk F. (2008) Potent protective effect of apricot and β -carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol*, 46: 3015–22.
54. Parlakpınar H, Ölmez E, Acet A. (2009) Beneficial effects of apricot-feeding on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Food Chem Toxicol*, 47: 802–808.
55. Kayısının insan sağlığı açısından önemi. Giriş tarihi:17.04.2011 (ANONİM 2010) www.google.com.tr
56. Meister, A. Larsson, A. (1989). Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the γ -glutamyl cycle. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS,

Valle D, editors. The metabolic basis of inherited disease. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 855–68.

57. Martensson, J. Lai, JCK. Meister, A. (1990). High affinity transport of glutathione is part of a multi-component system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 7185–7189.

58. Chai, YC. Ashraf, SS. Rokutan, K. Johnston, Jr. RB. Thomas, JA. (1994). S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*, 310: 273–281.

59. Reed DJ, Fariss MW. (1994). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev*, 36: 235–335.

60. Hayes, JD. McLellan, LI. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*, 31: 273–300.

61. Meister, A. (1973). On the enzymology of amino acid transport. *Science*, 180: 33–9.

62. Meister, A. Anderson, ME. (1983). Glutathione. *Ann Rev Biochem*, 52: 711 – 760.

63. Wilson, H. Canan, RK. (1937). The glutamic acid– pyrrolidonecarboxylic acid system. *J Biol Chem*, 119: 309–405.

64. Meister, A. (1978). Current status of the γ -glutamyl cycle. Functions of glutathione in liver and kidney. *Berlin: Springer-Verlag*, 43–59.

65. Meister, A. Tate, SS. Ross, LL. (1976). Membrane bound γ -glutamyl transpeptidase. In: Martinosi A, editor. The enzymes of biological membranes, vol. 3. *New York: Plenum*, 315–47.

66. Meister, A. (1978). Current status of the γ -glutamyl cycle. Functions of glutathione in liver and kidney. *Berlin: Springer-Verlag*, 43–59.

67. Griffith, OW. Meister, A. (1979). Glutathione: Interorgan translocation, turnover and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 5606–5610.

68. Danielson, UH. Mannervik, B. (1985). Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *Biochem J*, 231: 263–267.

69. Hayes, J.D. and Pulford, D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30: 445–600.
70. Cnubben, N.H.P. Rietjens, I.M.C. M. Wortelboer, H. van Zanden, J. van Bladeren, P.J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol*, 10: 141–152.
71. Fryer, A.A. Hume, R. and Strange, R. C. (1986). The development of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in human lung. *Biochim Biophys Acta*, 883: 448–453.
72. Forkert, P. G. D’Costa, D. and El-Mestrah, M. (1999). Expression and inducibility of alpha, pi, and mu glutathione S-transferase protein and mRNA in murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 143–152.
73. Hu, X. Xia, H. Srivastava, S. K. Herzog, C. Awasthi, Y. C. Ji, X. Zimniak, P. and Singh, S. V. (1997). Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1–1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun*, 238: 397–402.
74. Sundberg, K, Johansson, A. S. Stenberg, G. Widersten, M. Seidel, A. Mannervik, B. and Jernstrom, B. (1998). Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1–1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*, 19: 433–436.
75. Ishii, T. Matsuse, T. Igarashi, H. Masuda, M. Teramoto, S. and Ouchi, Y. (2001). Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: Protective effect of glutathione S-transferase P1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280: 1189–1195.
76. Harries, L.W., Stubbins, M.J., Forman, D., Howard, G.C. and Wolf, C.R. (1997). Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, 18: 641–644.
77. Ryberg, D. Skaug, V. Hewer, A. Phillips, D.H. Harries, L.W. Wolf, C. R. Ogreid, D. Ulvik, A. Vu, P. and Haugen, A. (1997). Genotypes of glutathione transferase m1 and p1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*, 18: 1285–1289.

78. Sherratt, P.J. Hayes, J.D. (2002). Glutathione S-transferases In Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics (Ionnides C, Editor). John Wiley and Sons, Ltd. West Sussex, UK, 319–352.
79. Dekant, W. (2001). Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S conjugate formation. *Toxicol Lett*, 124: 21–36.
80. Porter, N.A. (1986). Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc Chem Res*, 19: 262–268.
81. Halliwell, B. Gutteridge, JMC. (1989). Free radicals in biology and medicine (2nd ed). Oxford. Clarendon Press.
82. Sies, H. (1991). Oxidative stress, oxidants and antioxidants, New York: Academic Press.
83. Von Sonntag, C. (1987). The chemical basis of radiation biology. London: Taylor and Francis.
84. Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutase: an adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*, 264: 7761–4.
85. Radi, R. Beckman, IS. Bush, KM. et al. (1990). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*, 266: 4244–4250.
86. Frankel, EN. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Int Sci Food Agric*, 54: 495–511.
87. Esterbauer, H. Schaur, RG. Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde, and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11: 81–128.
88. Lawrence, J.M. and Adrianne, B. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*, 1: 441–445.
89. Durmaz, R. (2004). “Uygulamalı Moleküler Biyoloji”, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.
90. Tomkins L.S. (1992) The use of molecular methods in infectious diseases. *N Engl J Med*, 327 (10): 1290–7.
91. Buimer, M. Van Doornum G.J. J. et al. (1996) Detection of chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by ligase chain reaction- based assays with

clinical specimens from various sites: implications for diagnostic testing and screening. *J Clin Microbiol*, 34: 2395–2400.

92. Sohal, R.S. Farmer, K.J.Allen, R.G., Cohen, N.R. (1983) Effect of Age Oxygen Consumption, Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione, Inorganic Peroxides and Chloroform- Soluble Antioxidants in Adult Male Housefly, *Musca Domestica*, *Mechan Ageing Develop*, 24 185-195.

93. Temizkan, G. , Yilmazer, S. Öztürk, M. Arı, Ş. Etan, H. Sarıkaya, A.T., ve Arda, N. (2004). “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler”, İstanbul Üniversitesi BİYOGEM yayımları. İstanbul.

94. Howe, C. (1997) *Gene Cloning and Manipulation*, Cambridge University Press.

95. Elman, G.L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82: 70–77.

96. Ohkawa, H. Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbutiric acid reaction. *Anal Biochem*, 95: 351–358.

97. Habig, W.H. Pabst, M.J. Jakoby. W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249: 7130–7139.

98. Paglia D, and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathion peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967; 70(1): 158-169.

99. Josephson B, Gyllensward. (1975) Colorimetric determination of total protein (Biuret Method). *Scand J Clin Lab Invest*, 9: 29-34.

100. Tyl R,Crump K.Acrylamide in Food. Food Standards Agency 2003;5.215–222.

101. Becalski A,Lau BP, Lewis D,Seaman SW. (2002) Acrylamide in foods; occurrence, source. Los Angeles CA. AOAC. Annual Meeting; 22–26.

102. Robert G.T, Michael L.G, Christopher R. Kirman, M., Leigh Carson, Lisa M. Sweeney (2010). *Food Chem Toxicol*, 48: 658–667.

103. Jerry M. Rice. (2005) *Mutat Res*, 580: 3–20.

104. Canady R. (2002) Toxicology Component of FDA's Action Plan for Acrylamide, Food Advisory Committee Contaminants and Natural Toxicants Subcommittee Meeting, US Food and Drug Administration (FDA) Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN); 1–23.

- 105.** WHO – World Health Organization, Health implications of acrylamide in food: Report of a joint FAO/WHO consultation, WHO, Geneva, Switzerland 2002; 1–39.
- 106.** Mojska H. (2010) Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food Chem Toxicol*, 48: 2090-2096
- 107.** Kopp, EK., Sieber, M., Kellert, M., Dekant, W. (2008). Rapid and sensitive HILIC-ESI_MS/MS quantitation of polar metabolites of acrylamide in human urine column switching with an on-line trap column. *J Agr Food Chem*, 56 (21); 9828–9834.
- 108.** Kaplan O, Kaya G, Ozcan C, Ince M, Yaman M. (2009) HPLC-MS Determination of acrylamide. *Microchem J*, 93; 173–179.
- 109.** Sanchez AR, Almedia A, Medina JM. (2002) Oxidative stress in preterm rat brain is due to mitochondrial dysfunction. *Pediatr Res*, 51 (1): 34–39.
- 110.** Yousef, M.I., El-Demerdash F.M. (2006) Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicol*, 219(1–3): 133-141.
- 111.** Awad ME, Abdel-Rahman MS, Hassan SA. (1998) Acrylamide toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol in Vitro*; 12(6): 699–704.
- 112.** Lieshout, EMMV, Bedaf, MMG, Pieter, M, Ekkel, C, Nijhoff, WA, and Peters, WHM. (1998). Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1–1 levels. *Carcinogenesis*, 11(4); 2055–2057.
- 113.** Miller, M.J, Carter, D.E, and Sipes, I.G. (1982). Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher–334 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 63: 36–44.
- 114.** Sumner, S.C, MacNeela, J.P, and Fennell, T.R. (1992). Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1.2.3–¹³C]-acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Res Toxicol*, 5: 81–89
- 115.** Seed Alzahrani HA. (2011) Protective effect of l-carnitine against acrylamide-induced DNA damage in somatic and germ cells of mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18: 29-36.
- 116.** Shuming C, Jilin F, Xichun Z. (2009) The moderating role of dark soy sauce to acrylamide-induced oxidative stress and neurophysiological perturbations in rats. *Toxicol Mech and Meth*; 19 (6–7): 434–440.
- 117.** Puppel N, Tjaden Z, Fueller F, Makro D. (2005) DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutat Res*, 580: 71-80

- 118.** Srivastava, S. Sabri, MI. Agrawal, AK. Seth, PK. (1986). Effect of single and repeated doses of acrylamide and bis-acrylamide on glutathione-S-transferase and dopamine receptors in rat brain. *Brain Res*, 371; 319- 323.
- 119.** Naruszewicz, M. Zapolska-Downar, D. Kośmider, A. Nowicka, G. Kozłowska-Wojciechowska, M. Vikström, AS. Törnqvist, M. (2009). Chronic intake of potato chips in humans increases the production of reactive oxygen radicals by leukocytes and increases plasma C-reactive protein: a pilot study. *Am J Clin Nutr*, 89(3); 773–777.
- 120.** Oldfield JE. (1987) The two faces of selenium. *J Nutrition*, 117: 2002–2008
- 121.** Deaton CM, Marlin DJ. (2003) Exercise-Associated Oxidative stres. *Equine Pract*, 2(3): 278–291.
- 122.** Allam A, El-Ghareeb A, Abdul-Hamid M, Baikry A, Sabri M. (2011) Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: Biochemical and morphological studies. *Toxicol Ind Health*, 27(4): 291-306.
- 123.** Catalgol B, Ozhan G, Alpertunga B. (2009) Acrylamide-induced oxidative stres in human erythrocytes. *Hum Exp Toxicol*, 28(10): 611–617.
- 124.** Fennell, T.R. Sumner, S.C. Snyder, R.W. Burgess, J. Spicer, R. Bridson, W.E. Friedman, M.A. (2005) Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci*, 85, 447–459.
- 125.** Ghanayem, B.I. Witt, K.L. Kissling, G.E. Tice, R.R. Recio, L. (2005) Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CYP2E1-null mice: evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. *Mutat. Res*, 578: 284–297.
- 126.** Fuhr, U. Boettcher, M.I. Kinzig-Schippers, M.Weyer, A. Jetter, A. Lazar, A. Taubert, D. Tomalik-Scharte, D. Pournara, P. Jakob, V. Harlfinger, S. Klaassen, T. Berkessel, A. Angerer, J. Sorgel, F. Schomig, E. (2006) Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15: 266–271.
- 127.** Schabacker, J. Schwend, T. Wink, M. (2004) Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a Caco-2 gut model. *J Agric Food Chem*, 52: 4021–4025.

- 128.** Zödl B, Schmid D, Wassler G, Gundacker C, Leibetseder V, Thalhammer T, Ekmekcioglu C. (2007) Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicol*, 232(1–2): 99–108.
- 129.** Calingasan, N.Y.Uchida, K., Gibson, G.E., (1999) Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 72: 751–756.
- 130.** Arumugam, N. Sivakumar, V. Thanislass, J. Devaraj, H. (1997). Effects of acrolein on rat liver antioxidant defense system. *Indian J Exp Biol*, 35: 1373–1374.
- 131.** Esterbauer, H. Zollner, H. Sholz, N. (1975). Reaction of glutathione with conjugated carbonyls. *Z Naturforsch C Biosci*, 30: 466–473.
- 132.** Horvath, J.J.Witmer, C.M.Witz, G. (1992). Nephrotoxicity of the 1,1 acrolein-glutathione adduct in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 117: 200–207.
- 133.** Terrier, P. Townsend, A.J. Coindre, J.M. Triche, T.J. Cowan, K.H. (1990). An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. *Am J Pathol*, 137: 845–853.
- 134.** Moskaluk, C.A. Duray, P.H. Cowan, K.H. Linehan, M. Merino, M.J. (1997). Immunohistochemical expression of-class glutathione-Stransferase is down-regulated in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, 79: 1595–1599.
- 135.** Mohammadzadeh GS, Nasser Moghadam S, Rasae MJ, Zaree AB, Mahmoodzadeh H, Allameh A. (2003) Measurement of glutathione S-transferase and its class-pi in plasma and tissue biopsies obtained after laparoscopy and endoscopy from subjects with esophagus and gastric cancer. *Clin Biochem*, 36 (4): 283-288.
- 136.** Doğru-Abbasoğlu S, Mutlu-Türkoğlu U, Türkoğlu S, Erbil Y, Barbaros U, Uysal M, Aykaç-Toker G. (2002) Glutathione S-transferase-pi in malignant tissues and plasma of human colorectal and gastric cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 128(2): 91-95.
- 137.** Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K. (2003) Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer *Mol Cell Biochem*; 253(1-2): 319-327.
- 138.** Sato K, Satoh K, Tsuchida S, Hatayama I, Shen H, Yokoyama Y, Yamada Y, Tamai K. (1992) Specific expression of glutathione S-transferase Pi forms in (pre)neoplastic tissues: their properties and functions. *Tohoku J Exp Med*, 168(2): 97-103.

- 139.** Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Nakae D, Tsuda H, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F. (2005) Lack of potential of low dose N-nitrosodimethylamine to induce preneoplastic lesions, glutathione S-transferase placental form-positive foci, in rat liver. *Cancer Lett*, 222(1): 11-15.
- 140.** Hokaiwado N, Takeshita F, Naiki-Ito A, Asamoto M, Ochiya T, Shirai T. (2008) Glutathione S-transferase Pi mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(6): 1134-1138.
- 141.** Sawaki, M. Enomoto, K. Takahashi, K. Nakajima, Y. Mori, M. 1990. Phenotype of preneoplastic and neoplastic liver lesions during spontaneous liver carcinogenesis of LEC rats. *Carcinogenesis*, 1857–1861.
- 142.** Bowyer JF, Latendresse JR, Delongchamp RR, Muskhelishvili L, Warbritton AR, Thomas M, Tareke E, McDaniel LP, Doerge DR. (2008) The effects of subchronic acrylamide exposure on gene expression, neurochemistry, hormones, and histopathology in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis of male Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 230(2): 208–15.
- 143.** Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. (2003) Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 243(1–2): 147–52.
- 144.** Helenius, M. Hanninen, M. Lehtinen, S. K. & Salminen, A. (1996). Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF- κ B transcription factor in mouse cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*, 28: 487–498.
- 145.** Piacentini L, Karliner JS. (1999) Altered gene expression during hypoxia and reoxygenation of the heart. *Pharmacol Ther*, 83(1): 21–37.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI



Toplantı Tarihi : 11.01.2010
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
 Araştırma Protokol no.su : 2010/05
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsi : Wistar
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyu : Albino
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı :
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Ağırlığı :

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'ün yürütücüsü olduğu "Subkronik akrilamid toksisitesi oluşturulan ratlarda kayısının, kalın bağırsak Glutasyon S-Transferaz Pi (GST-P) gen ekspresyonu, GSH-Px, GSH ve MDA düzeylerine etkisinin araştırılması" isimli 2010/05 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Denei Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Prof.Dr. Yusuf TÜRKÖZ Başkan	Doç.Dr.Nigar VARDI Başkan Yard.	Prof.Dr. Yunus KARAKOÇ Raporör
Prof.Dr. Ahmet KIZILAY Üye	Doç.Dr.Abdurrahman KARAMAN Üye	Yrd.Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Üye
Vetr.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye katılmadı	Bekir ÜNAL Sivil Üye katılmadı	Zafer KIRÇUVAL Sivil Toplum Örgütü Üyesi katılmadı

ÖZGEÇMİŞ

03.01.1985 Isparta' da doğdu. İlk orta ve lise eğitimini Malatya'da tamamladı. 2007 yılında Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2008 yılında aynı üniversitenin Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji A.D.'da Yüksek lisansa başladı. 2009 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya A.D.'da Yüksek Lisansa başladı.