

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SUBKRONİK AKRİLAMİD TOKSİSİTESİ
OLUŞTURULAN RATLARDA KAYISININ, KARACİĞER
DOKUSU GLUTATYON S-TRANSFERAZ-Pİ (GST-P) GEN
EKSPRESYONUNA, GST, GSH-Px, GSH VE MDA
DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Kamuran ÇINAR
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

MALATYA-2010

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SUBKRONİK AKRİLAMİD TOKSİSİTESİ
OLUŞTURULAN RATLARDA KAYISININ, KARACİĞER
DOKUSU GLUTATYON S-TRANSFERAZ-Pİ (GST-P) GEN
EKSPRESYONUNA, GST, GSH-P_x, GSH VE MDA
DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Kamuran ÇINAR
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

**Bu araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
2010/66 proje numarası ile desteklenmiştir.**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TEŞEKKÜR	iv
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akrlamid.....	3
2.1.1. Akrlamidin Özellikleri ve Metabolizması.....	4
2.1.2. Akrlamidin Gıdalarda Oluşumu.....	6
2.1.3. Akrlamidin Toksik Etkileri.....	10
2.1.4. Akrlamidin Gıdalarda Bulunuşu.....	13
2.1.5. Gıda Kaynaklı Akrlamidten Korunma Yolları.....	15
2.2. Kayısı (<i>Prunus armeniaca L.</i>).....	16
2.3. Tez Çalışmasına Dahil Edilen Parametreler Hakkında Genel Bilgi.....	19
2.3.1. PZR ve Gerçek Zamanlı PZR.....	19
2.3.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) Oluşum Mekanizması	19
2.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri.....	19
2.3.1.3. PZR'nin İşleyişi.....	21
2.3.1.4. PZR Uygulama Alanları.....	22
2.3.1.5. PZR'a Dayalı Yöntemlerden Bazıları.....	22
2.3.2. Glutasyon (GSH) Metabolizması.....	24
2.3.2.1. Glutasyonun Biyosentezi.....	27
2.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) (EC 1.11.1.9).....	27
2.3.4. GST Enzimleri ve Genleri.....	28
2.3.4.1. Glutasyon S-Transferaz Pi 1 Geni (GSTP1).....	30
2.3.5. Tiyoarbitürik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS); Malondialdehid (MDA) ve Lipid Peroksidasyonu.....	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1. Gereçler.....	34
3.1.1. Ratların Temini ve Bakımı.....	35
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	35
3.1.3. Kullanılan Aletler	34

3.2. Yöntemler.....	36
3.2.1. Grupların Oluşturulması.....	36
3.2.2. Numune Alınması ve Hazırlık İşlemleri.....	36
3.2.3. PZR.....	37
3.2.3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	37
3.2.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	37
3.2.3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar.....	38
3.2.4. Redükte Glutasyon (GSH) Analizi.....	41
3.2.4.1. Numunelerin Hazırlanması.....	41
3.2.4.2. Kullanılan Reaktifler.....	41
3.2.4.3. GSH Düzeylerinin Tayini.....	42
3.2.5. Malondialdehit (MDA) (Tiyobarbiturik Asit Reaktif Partikülleri =TBARS) Analizi.....	43
3.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması.....	43
3.2.5.2. Kullanılan Reaktifler.....	43
3.2.5.3. TBARS Düzeylerinin Tayini.....	43
3.2.6. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin Analizi.....	44
3.2.6.1. Numunelerin Hazırlanması.....	45
3.2.6.2. Kullanılan Reaktifler.....	45
3.2.6.3. GSH-Px Aktivite Düzeylerinin Tayini.....	45
3.2.6.4. GSH-Px Aktivite Düzeylerinin Hesaplanması.....	46
3.2.7. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Analizi.....	46
3.2.7.1. Numunelerin Hazırlanması.....	47
3.2.7.2. Kullanılan Reaktifler.....	47
3.2.7.3. GST Aktivite Düzeylerinin Tayini.....	47
3.2.7.4. GST Aktivite Düzeylerinin Hesaplanması.....	48
3.2.8. Doku Protein Düzeylerinin Analizi.....	48
3.2.8.1. Kullanılan Reaktifler.....	49
3.2.8.2. Protein Düzeylerinin Tayini.....	49
3.2.9. İstatistiksel Analizler.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Grupların Karaciğer GSH Düzeyleri.....	53
4.2. Grupların Karaciğer MDA Düzeyleri.....	54
4.3. Grupların Karaciğer GSH-Px Düzeyleri.....	55

4.4. Grupların Karaciğer GST Düzeyleri.....	56
4.5. Grupların Karaciğer GST-Pi Gen Ekspresyon Düzeyleri.....	56
4.6. Rat Ağırlıkları Grup Ortalamalarının Haftalık Değişimi	59
4.7. Grupların Karaciğer Histopatoloji Sonuçları.....	59
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	69
7. ÖZET.....	70
8. SUMMARY.....	72
9. KAYNAKLAR.....	74

TEŞEKKÜR

Bu projenin hazırlanmasından sonlandırılmasına kadar, çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteklerini esirgemeksizin beni yönlendiren danışman hocam sayın Prof. Dr. Yusuf Türköz'e, rektörümüz ve anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Cemil Çelik'e, değerli hocalarımız Prof. Dr. İsmail Temel'e, Prof. Dr. Tayfun Güldür'e, Doç. Dr. İ. Çetin Öztürk'e, Doç. Dr. Çağatay Taşkapan'a, Doç. Dr. Aysun B. Karabulut'a, Doç. Dr. Elif Özerol'a, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Çıgılı'ya, ayrıca tezimin gen analizi çalışmalarında desteğini aldığım Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. hocamız Doç. Dr. Yılmaz Çiğremiş'e, histopatolojik değerlendirme için sayın Dr. Nurhan Şahin'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteklerini benden esirgemeyen, asistanlık eğitimim süresince beraber çalışmaktan memnuniyet duyduğum Dr. Hasan Şahin'e, Dr. Meltem Demir'e ve diğer asistan arkadaşlarıma, Dr. Şule Gürsoy'a, Uzm. Bio. Zümrüt Doğan'a, Bio. Erman Erdemli'ye teşekkür ederim.

Yine dört yıl boyunca iyi kötü günlerimizi paylaştığımız Tıbbi Biyokimya AD.'nda çalışan tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Yaşamımın her anında ve her alanında olduğu gibi eğitim hayatımda da destek ve sabırlarını esirgemeyen eşime ve aileme çok teşekkür ediyorum.

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: Ölmez ve ark.'nın gıda kaynaklı akrilamid analiz sonuçları.....	14
Tablo 2: Kuru kayısı meyvesinin besin içeriği.....	18
Tablo 3: Primer dizilimleri	40
Tablo 4: TBARS, GSH-Px, GST için temel karakteristikler.....	52
Tablo 5: GSH için temel karakteristikler.....	52
Tablo 6: Gruplarda ölçülen karaciğer GST π /GAPDH mRNA seviyelerinin oranı....	58
Tablo 7: Ratların haftalık ağırlık ortalamaları.....	59
Tablo 8: Grupların karaciğer histopatoloji sonuçları.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Akrilamidin molekül yapısı.....	4
Şekil 2: Akrilamidin sitokrom P450 enzimleri tarafından glisidamide dönüşmesi.....	5
Şekil 3: Glisidamidin molekül yapısı.....	5
Şekil 4: Akrilamidin metabolik yollarının CYP2E1, GST ve EH ile ilişkisi.....	6
Şekil 5: Maillard reaksiyonu ve akrilamid oluşumu.....	8
Şekil 6: Farklı moleküllerden akrilamid sentezi.....	9
Şekil 7: Polimeraz zincir reaksiyonunun işleyişi.....	22
Şekil 8: Glutatyonun moleküler yapısı.....	25
Şekil 9: Glutatyonun biyosentezi ve katabolizması.....	27
Şekil 10: GST gen ailesi.....	30
Şekil 11: GSTP1 gen yapısı.....	31
Şekil 12: GSH standart grafiği.....	42
Şekil 13: TBARS standart grafiği.....	44
Şekil 14: GSH-Px reaksiyonu.....	44
Şekil 15: BSA standart grafiği.....	50
Şekil 16: Grupların karaciğer GSH düzeyleri.....	53
Şekil 17: Grupların karaciğer MDA düzeyleri.....	54
Şekil 18: Grupların karaciğer GSH-Px düzeyleri.....	55
Şekil 19: Grupların karaciğer GST düzeyleri.....	56
Şekil 20: Karaciğer örneklerinden saflaştırılan RNA'nın elektroforegramı.....	57
Şekil 21: GAPDH ve GST π 'lerin cDNA'larının gerçek zamanlı PZR'deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi.....	57
Şekil 22: Gruplardaki karaciğer GST π /GAPDH mRNA seviyelerinin oranı.....	58
Şekil 23: Ratların haftalık ağırlık değişimleri.....	59
Şekil 24: Grupların Karaciğer Histopatoloji Sonuçları.....	59

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
GSH	: Redükte glutatyon
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
GST	: Glutatyon S-transferaz
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
MDA	: Malondialdehid
CYP 450 2E1	: Sitokrom P-450 ailesi-2 alt ailesi-Enzim polipeptid-1
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EH	: Epoksit hidrolaz
NOAEL	: Herhangi bir etki gözlenmeyen en yüksek düzey
ALT	: Alanin transaminaz
AST	: Aspartat transaminaz
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
FAO	: Gıda ve Tarım Teşkilatı
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
cDNA	: Komplementer DNA
mRNA	: Messenger RNA
RT-PZR	: Ters Transkriptaz PZR
KAT	: Katalaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
GSSG	: Okside glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside)
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif türleri

1. GİRİŞ

Kayısı (*Prunus armeniaca*) dünyada en yaygın olarak Anadolu'da (özellikle Malatya ve çevresinde) yetiştirilmektedir. Dünya kuru kayısı üretiminin yaklaşık %85'i Türkiye'de gerçekleşmektedir. Kayısının en önemli bileşeni karotenoid grubu maddelerdir. Karotenoid grubu maddeler sarı, turuncu ve kırmızı renkteki doğal pigmentlerdir. Bu maddeler organizmada antioksidan etkiye sahiptirler. Provitamin-A etkisi gösteren karotenoidlerin en önemlisi olan β -karoten ince barsaklarda karoten oksijenaz enzimi ile retinol, retinal ve retinoik aside dönüşerek immün sistem, görme olayı ve epitel dokunun sentezi ve yenilenmesinde önemli rol oynamaktadır. Kayısının aynı zamanda fenolik maddeler bakımından da oldukça zengin olduğu bildirilmiştir. Özellikle önemli derecede antioksidan özellikte oldukları bilinen flavonoid grubu fenolik maddeler bakımından zengindirler (1).

Akrilamid oldukça yüksek kimyasal aktiviteye sahip α - β -ansature karbonil bileşiğidir. Endüstriyel üretimden laboratuvar çalışmalarına kadar birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Akrilamidin insanlarda ve laboratuvar hayvanlarında nörotoksik etkisi kanıtlanmıştır. Yine laboratuvar hayvanlarında kanser oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. İnsanlardaki kanser oluşumuyla henüz bir bağlantısı kanıtlanmasa da Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (International Agency for Research into Cancer-IARC) gıdalardaki akrilamidi 'insanlar için potansiyel kanserojen maddeler' (grup 2A) arasına almıştır (2).

Gıdaların yüksek sıcaklık derecelerinde pişirilmesi sırasında oluşan akrilamid, bu gıdalarla birlikte vücuda alınmaktadır. Gıdalarla alınan akrilamidin insan vücudunda

ne gibi hasarlar oluşturabileceği konusu tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, gıda kaynaklı akrilamid tüm insanlığı tehdit eden bir problem olarak karşımızda durmaktadır.

Redükte glutasyon (GSH) vücudun en önemli non-enzimatik antioksidan molekülüdür. GSH, serbest oksijen radikallerini (SOR) non-enzimatik yolla detoksifiye ederek dokuları oksidatif stresin zararlı etkilerinden korur. Çok daha önemli olan diğer bir işlevi de, dokuların en önemli enzimatik antioksidanlarından olan glutasyon S-transferaz (GST) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi için şiddetle ihtiyaç duyulan bir koenzim olmasıdır. Fizyolojik şartlarda tüm dokularda oksidanlarla antioksidanlar arasında bir denge söz konusudur. Bu oksidan/antioksidan dengesi, vücutta doğal olarak üretilen SOR'ların etkisizleştirilmesini ve dokuların radikallere bağlı hasarlardan korunmasını sağlar.

Gastrointestinal yolla alınan akrilamid, sindirim sistemi boyunca yeterli düzeyde GSH mevcut ise, GST tarafından glutasyonla konjuge edilerek (akrilamid-glutasyon) etkisizleştirilir ve kolaylıkla atılır. Tüm vücutta bulunan redükte glutasyonun yaklaşık %60'ı karaciğerde bulunduğu için karaciğerde çok daha yüksek bir kapasite ile akrilamid, akrilamid-glutasyon konjugatına çevrilerek büyük oranda idrarla vücut dışına atılır. Ancak akrilamidin, suda çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle bir kısmı da bütün vücut dokularına dağılım gösterir. Vücudun tüm dokuları, GST / GSH düzeylerine bağlı olarak akrilamidi GSH ile konjuge ederek etkisizleştirebilir. Akrilamid ayrıca, karaciğerde sitokrom P450 2E1 (CYP 450 2E1) ile okside edilerek çok daha genotoksik olan glisidamid'e dönüştürülür. Glisidamid molekülü de GST / GSH sistemiyle glisidamid-glutasyon konjugatına çevrilerek detoksifiye edilir ve idrarla vücut dışına atılır. Ancak, akrilamidin katabolizması sırasında en önemli sınırlayıcı faktör, ortamda yeterli düzeyde GSH'ın bulunabilirliğidir.

Bu çalışmada dişi Spraque Dawley ratlara içme suyu ile akrilamid verilerek, akrilamidin karaciğer dokusunda meydana getirebileceği muhtemel hasarların incelenmesi ve bu hasarların organik kuru kaybı ile önlenebilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akrilamid

Akrilamid ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}$) özellikle poliakrilamid ve birçok çeşitli kimyasalın sentezinde kullanılan vinil türevi bir monomerdır (3,4).

Akrilamid, tabiatta doğal olarak bulunmayan, ancak kimyasal olarak sentez edilerek ticari kullanıma sunulan, yüksek kimyasal aktiviteye sahip bir maddedir.

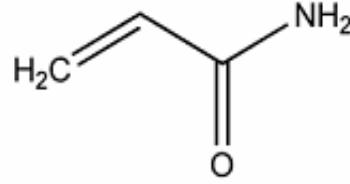
Akrilamid ve bisakrilamid birimlerinin polimerizasyonu ile yüksek moleküler ağırlıklı polimerik özelliği olan poliakrilamid oluşmaktadır. Bu polimerler, kimyasal olarak inert (tepkisiz), nontoksik ve genellikle kararlı yapılardır. Poliakrilamid, matbaacılık ve tekstil sektöründe kağıdın dayanıklılığını arttırmak amacıyla, atık suların arıtılması işleminde yoğunlaştırma basamaklarında, losyon, deodorant gibi birçok değişik kozmetik ürünlerin hazırlanması sırasında yağlı ve yumuşatıcı bir özellik kazandırmak için katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca poliakrilamid, araştırma laboratuvarlarında elektroforez ve kromatografi gibi moleküler biyoloji tekniklerinde, proteinlerin ayırımı ve purifikasyonunda yoğun olarak kullanım alanı bulmaktadır (5). Akrilamidin sigara dumanı bileşeni de olduğu ve son yıllarda yapılan çalışmalarda gıda maddelerinde de yaygın olarak bulunduğu saptanmıştır (6).

2.1.1. Akrlamidin Özellikleri ve Metabolizması

Akrlamid, oda sıcaklığında katı, kokusuz, tatsız, beyaz renkli kristaller halinde bulunur. Molekül ağırlığı 71.08 g/mol olan akrlamid suda ve diğer polar çözücülerde (aseton, metanol, etanol vb) kolaylıkla çözünürken; polar olmayan çözücülerde çözünmez (4).

Akrlamid doymamış çift bağ içeren bir amiddir. Diğer isimleri etilen karboksamid, propenoik asit amid, akrilik amid ve vinil amiddir (7).

Erime sıcaklığı 84.56°C, kaynama sıcaklığı (25 mm Hg) 125°C'dir (8). Şekil 1'de akrlamidin molekül yapısı verilmiştir



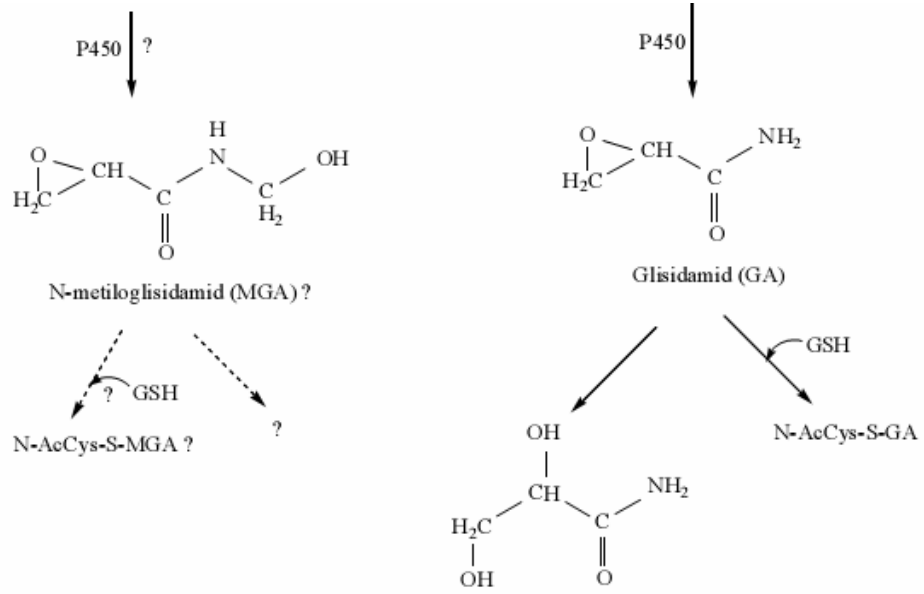
Şekil 1: Akrlamidin molekül yapısı

Akrlamid, üre $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ve formaldehit (HCHO) veya glioksal $(\text{CHO})_2$, aldehitler (RCHO), aminler (R_2NH), tiyoller (RSH) gibi küçük reaktif moleküllerle reaksiyona girebilmektedir (8).

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler, akrlamidin mide ve barsaklar yoluyla çok hızlı ve etkili biçimde emildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, türler arasındaki emilim seviyelerinin farklılıklarının da altı önemle çizilmiştir. Elde edilen sonuçlar, insanlarda glisidamid oluşumunun farelerden 2 ya da 4 kat daha az olduğunu ortaya koymuştur (9).

Yakıcı veya tahriş edici özelliği yoktur. Hem zayıf asidik hem de zayıf bazik karaktere sahiptir. Akrlamid iki farklı fonksiyonel gruba sahip monomerik bir yapıdır. Elektronca zayıf bir çift bağ ile bir amid grubuna sahiptir ve kimyasal reaksiyonlara bu gruplar aracılığıyla katılmaktadır. Akrlamid, sahip olduğu çift bağ ile amonyak, aminler, alkoller gibi nükleofilik maddelerle Michael tipi katılma reaksiyonları verdiği gibi, serbest radikallerle de çeşitli reaksiyonlara girer. Amid grubu ise hidroliz, dehidrasyon ve aldehitlerle kondenzasyon reaksiyonları verebilmektedir.

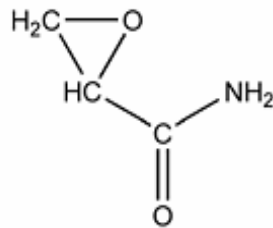
Akrilamidin katabolizması için en etkili yolun GSH ile konjugasyonu olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra ikinci yol ise akrilamidin CYP2E1 (Cytochrom P-450 family-2 subfamily Enzym polypeptide-1) enzimi aracılığıyla bir epoksit türevi olan glisidamide dönüşmesidir (2,10). Glisidamid DNA'ya bağlanma yetisine sahip potansiyel bir mutajendir. CYP2E1 reaksiyonu sırasında reaktif oksijen radikallerinin de oluşumu söz konusudur. Şekil 2'de akrilamid ve glisidamid için olası metabolik yollar gösterilmiştir



Şekil 2: Akrilamidin sitokrom P450 enzimleri tarafından glisidamide dönüşmesi

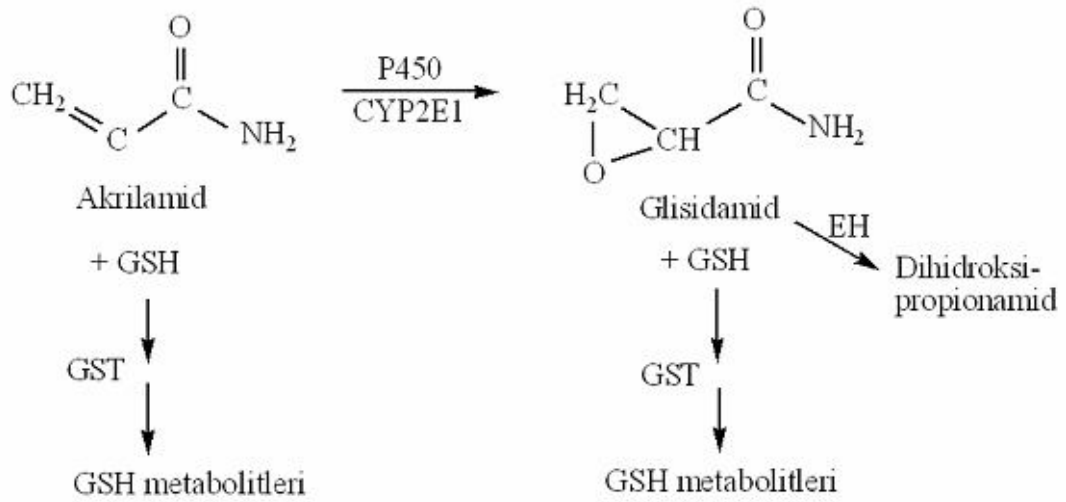
Glisidamid, akrilamidin zararlarının değerlendirilmesi açısından anahtar bir role sahiptir; çünkü akrilamid, toksik etkilerinin büyük bir kısmını bu metaboliti aracılığıyla göstermektedir (10,11).

Şekil 3'de glisidamidin molekül yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3: Glisidamidin molekül yapısı

Mesleki olarak akrilamide maruz kalan insanlarda akrilamid/glisidamid oranının 10:3 olduğu tahmin edilmektedir (12). Glisidamid sonradan GSH konjugasyonundan veya epoksit hidrolaz (EH) tarafından katalize olan epoksit grubunun hidroliz edilmesiyle metabolize olmaktadır. Hem akrilamid ve glisidamiden oluşan GSH metabolitleri hem de glisidamiden oluşan hidroliz ürünleri, akrilamide maruz bırakılan kemirgen hayvanların idrarında bulunmuştur (2). Şekil 4’de Akrilamidin metabolik yollarının CYP2E1, GST ve EH enzimleri ile ilişkisi verilmiştir.



Şekil 4: Akrilamidin metabolik yollarının CYP2E1, GST ve EH enzimleri ile ilişkisi

Akrilamid ve akrilamid türevlerinin organizmadan atılımı temel olarak idrar yolu ile olmak üzere safra, feçes ve solunum yolu ile gerçekleşmektedir (4,6,13,14). Akrilamidin metabolize olmadan doğrudan atılımı, konjuge olmuş ürünlerine göre çok daha düşüktür.

2.1.2. Akrilamidin Gıdalarda Oluşumu

Akrilamid, yüksek karbonhidrat ve düşük protein içerikli bitkisel kaynaklı ürünlerin 120°C'nin üstündeki sıcaklıklarda pişirme ve benzeri termal uygulamalar sırasında yüksek sıcaklığa maruz bırakılması sonucu meydana gelmektedir.

Akrilamid oluşumu üç şekilde meydana gelmektedir.

1. Lipidlerin transformasyonu, karbonhidratlar ve aminoasitlerin ayrışması yoluyla ortaya çıkan akrolein ya da akrilik asit reaksiyonu,

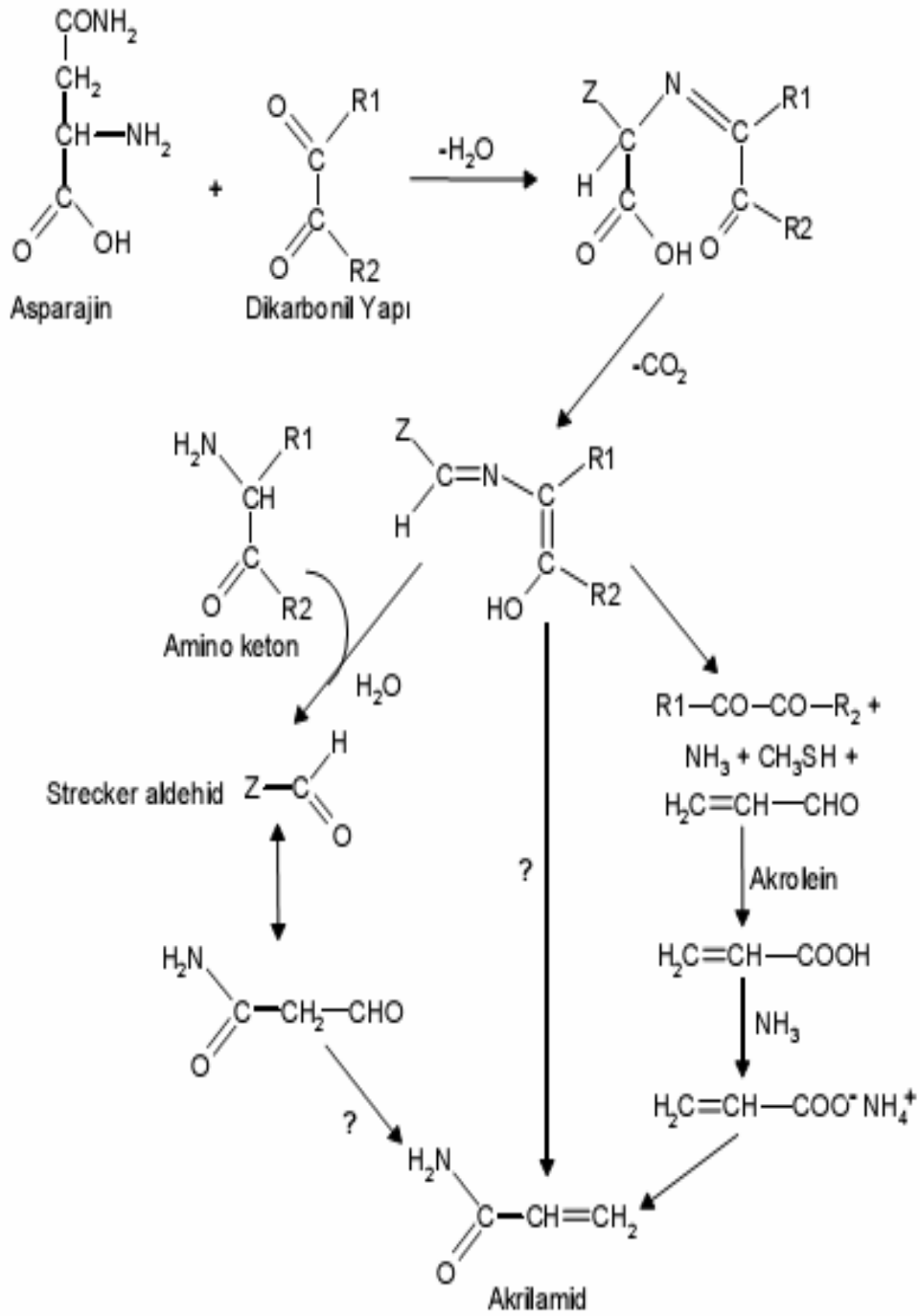
2. Malik asit, laktik asit ve sitrik asit içeren temel bazı organik asitlerin dehidrasyon-dekarboksilasyonu,
3. Karbonhidratlar ve proteinler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (15).

Bu mekanizmaların en etkini asparajin ve indirgen şekerler üzerinden yürüten Maillard reaksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon reaktif bir karbonil grubu ile aminoasitler arasında gerçekleşmektedir (16–19). Maillard reaksiyonu aynı zamanda enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Söz konusu reaksiyon kompleks olmasına karşın yine de önemli aroma ve lezzet bileşiklerini oluşturması açısından arzu edilmektedir (20).

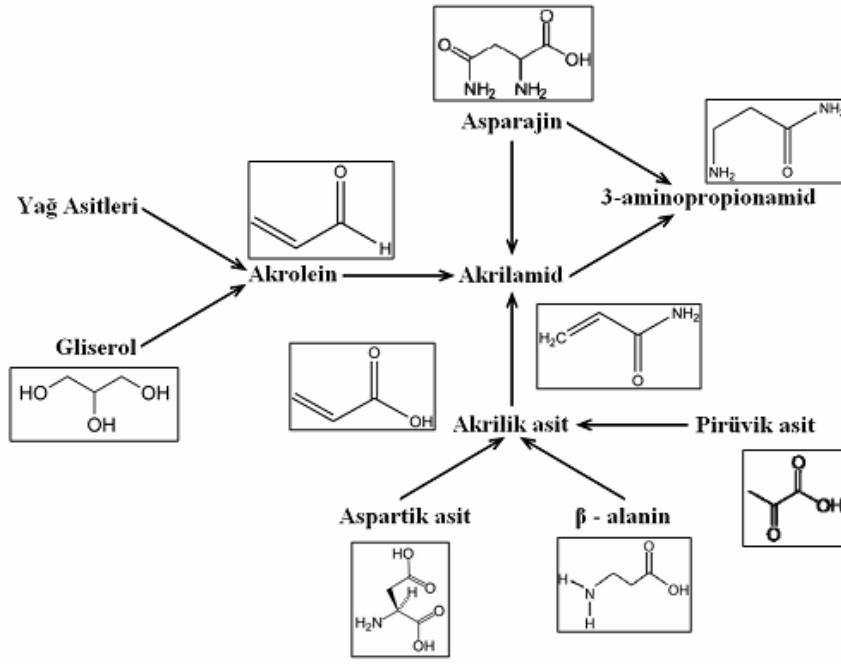
Yapılan çalışmalar akrilamidin oluşumundan sorumlu aminoasidin asparajin olduğunu ve gıdaların pişirilmesi sırasında asparajinin indirgen şekerlerle reaksiyonu sonucunda akrilamid oluştuğunu göstermektedir (21).

İlk kez 1912 yılında Louis-Camille Maillard tarafından ortaya konan ve bu nedenle kendi adıyla anılan Maillard reaksiyonu, şekerlerin ve aminoasitlerin, renk pigmentleri oluşturmak üzere etkileşmelerini açıklayan bir reaksiyondur. Isıya maruz bırakılmış gıdaların kızarmasına veya kahverengi renk almasına neden olan, bir başka deyişle yediğimiz yiyeceklerin güzel görünmesini sağlayan “kızarma” reaksiyonu Maillard reaksiyonudur. Şekil 5’de Maillard Reaksiyonu verilmiştir.

Örnek çalışmalar, akrilamid oluşumunda fruktozun glukoz ya da galaktozdan daha etkili olduğunu göstermiştir (22). Asparajin amino asidi dışında glutamin, sistin, arginin, metiyonin ve aspartik asit gibi amino asitler de eser miktarda akrilamid oluşturmaktadır (23).



Şekil 5: Maillard reaksiyonu ve akrilamid oluşumu



Şekil 6: Farklı moleküllerden akrilamid sentezi

Şeker, yağ ve sütün yüksek sıcaklıkta pişirilmesinin gerek bisküvide gerekse muhallebi gibi diğer ürünlerle karamelize şekerlerde Maillard reaksiyonu oluşmaktadır ve bu sağlıklı olumsuz yönde etkilemektedir. Maillard reaksiyonu nedeniyle sütteki proteinler kullanılmaz hale gelmektedir. Bu durum, karaciğerde toksik etki yapabilmektedir (24).

Piştirme süresi ve sıcaklığı ile akrilamid oluşumu arasında doğrusal bir ilişki olmakla birlikte aynı gıda tiplerinin farklı ürünleri veya aynı ürünlerin farklı tarihlerde üretilmiş olanları arasında bile akrilamid içeriği bakımından farklılıklar görülmektedir. Benzer bir durum evde piştirme söz konusu olduğunda da ortaya çıkmaktadır. Piştirme şeklinin de akrilamid oluşumunda etkisi vardır. Örneğin bazı çalışmalarda haşlanarak pişirilen gıdalarda akrilamidin oluşmadığı gözlenmiştir (25).

Gıdanın özellikle sahip olduğu asparajin ve indirgen şekerler (başlıca fruktoz ve glukoz) yönünden bileşimi, türü, saklama koşulları, dönemsel değişiklikler de akrilamid miktarı üzerinde farklılıklara yol açmaktadır.

Gıdalarda akrilamid varlığının kanıtlanmasından sonra dünya çapında birçok resmi kuruluş bu maddenin oluşumu ve azaltılması üzerine çalışmalar başlatmıştır. Yayımlanan raporlarda, yürütülmekte olan üretim basamaklarında yapılan iyileştirmelerle, patates cipslerindeki akrilamid miktarlarında %30–40 oranında azalma sağlanabileceği belirtilmektedir (26). Ancak bu iyileştirmelerin patates cipsi üreticileri

tarafından hangi yaygınlıkta uygulandığı belirsizdir. Benzer öneriler ve durumlar kahve ve kahvaltılık gevrekler için de söz konusudur.

Gıda modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda akrilamid miktarının azaltılabilmesi için birçok seçeneğin bulunduğu belirtilmektedir. En verimli yöntem, öncül madde olan asparajinin pişirme öncesinde gıdaya asparajinaz enzimi katılarak seçici olarak yok edilmesidir. Bunun yanı sıra asparajinin azaltılmasına yönelik alternatif yöntemler de vardır. Akrilamid miktarının azaltılması için önerilen diğer yöntemler ise temel gıda kompozisyonunun değiştirilmesi (Maillard reaksiyonuna asparajinle yarışmalı olarak giren aminoasitlerin katılması gibi) ve pişirme şartlarının değiştirilmesidir (sıcaklığın düşürülmesi gibi). Ne var ki bu önerilerin büyük ölçekli üretime uygulanabilirliği henüz tam olarak değerlendirilmemiştir. Bu noktada üretim yöntemlerinin tüketici memnuniyeti, ürünlerin besleyicilik özellikleri ve olası zararlı maddelerin oluşumu üzerine etkilerinin de değerlendirilmesi gerekmektedir.

2.1.3. Akrilamidin Toksik Etkileri

Akrilamid, suda çok yüksek çözünürlüğü nedeniyle vücutta (süt ve plasenta dahil) çok geniş bir dağılım göstermektedir (27).

Akrilamidin toksik özellikleri ve etki mekanizmalarına yönelik birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalardan çıkan ortak görüş, akrilamidin akut toksik etkilerinin 100 mg/kg ve üstü dozlarda ortaya çıktığı ve LD₅₀ değerlerinin genellikle 150 mg/kg'ın üzerinde olduğu belirtilmektedir (26).

Akrilamid kaynaklı olası toksik etkiler temel olarak birbiriyle ilişkili iki yolla gerçekleşmektedir (6,11,28).

1. Doğrudan, akrilamid ve türevlerinin oluşturduğu etkiler.
2. CYP2E1 aktivasyonu sırasında oluşan reaktif oksijen radikalleri ile oluşan etkiler.

Akrilamidin CYP2E1 aracılı detoksifikasyonu, reaktifliği yüksek ara bileşiklerle gerçekleşmektedir. Eğer konjugasyon basamağı (Faz II), aktivasyon basamağını (Faz I) izlemezse, aktive olmuş akrilamid molekülü kendi çevresindeki diğer moleküllerle tepkimeye girebilmekte ve toksik etki göstermektedir (29,30).

CYP2E1 genine sahip olan ve olmayan iki grup farenin kullanıldığı bir çalışmada, akrilamid uygulaması sonrası CYP2E1 olmayan farelerde karaciğer, testis ve akciğerlerde glisidamidin DNA eklentileri düzeylerinin ve buna bağlı hasarın %67 daha

az olduğu gözlenmekte ve akrilamidin mutajenik ve karsinojenik etkilerinden temel olarak glisidamidin sorumlu olduğu bildirilmektedir (31).

Farklı deney hayvanları kullanılarak yapılan çalışmalarda akrilamidin toksik etkilerini gösterdiği başlıca bölgenin sinir sistemi olduğu tespit edilmiştir. Akrilamide yeterli dozda sürekli maruz bırakılma sonucunda periferik sinirlerde dejenerasyonun meydana geldiği, daha uzun süreli maruz bırakılma durumunda ise beyindeki öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonların yürütüldüğü bölgelerdeki (serebral korteks, talamus, hipokampus) nöronlarda dejenerasyon ve morfolojik değişiklikler görüldüğü belirtilmiştir (32–37). En sık görülen klinik belirtiler; el ve ayaklarda karıncalanma ve uyuşukluk, bacaklarda zayıflık, postural ve motor inkoordinasyon, konvülsiyonlar ve titreme gibi nörotoksisite belirtileridir. Bu belirtiler geri dönüşümlüdür (38–40).

Akrilamidin nörotoksik etkisinin iki farklı mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu mekanizmalardan biri, aksonlar arasında sinir impulslarının hızlı ileri doğru iletimi için gerekli olan nöroflamentlerin kinesin-related motor proteinlerinin akrilamid ile etkileşimidir. Bu motor proteinlerin inhibisyonu ve sinir büyüme faktörlerinin transaksional taşınmasının bozulması sonucu hücre gövdesinden distal aksone moleküler transport aksar ve böylece sinir hücresinin işlevi durur. Diğer bir mekanizma ise, akrilamidin sinir uçlarındaki membran füzyon prosesi ile etkileşimdir. Böylece sinaptik veziküllerin hedef hücre ile füzyonu bozularak, nörotransmitter iletimi azalır ve sonuçta sinir uçlarında dejenerasyon meydana gelir (41).

Yüksek doz akrilamide maruz kalan laboratuvar hayvanlarında reproduktif (üreme) toksisite de gözlenmiştir (5,42). Reproduktif toksisite için NOAEL (No observed adverse effect level-Deney hayvanlarında gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz) dozu yaklaşık 2–5 mg/kg bw/gün'dür (43). İnsanlarda reproduktif toksisite bildirilmemiştir. Reproduktif toksisite için gerekli doz nörotoksisite oluşturan dozdan en az 4 kat fazladır ve ayrıca bu doz diyetle maruziyetle alınan akrilamidin tahmini 2000 katıdır (44–46). Düşük seviyede kronik maruziyetin kümülatif etkileri hakkında bazı kaygılar olsa da, diyetle alınan akrilamidin reproduktif toksisiteye neden olma ihtimali oldukça düşüktür.

Reproduktif toksisiteden sorumlu bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Örneğin disfonksiyonel birleşme, spermin vajina ve uterusda uygun birikimini ve sonrasında üreme ve implantasyonun stimülasyonunu sağlayan hormonal olayları etkileyebilir. Buna ek olarak, erektil fonksiyon penisin sinir hasarı nedeniyle de azalmış olabilir (42).

Başka bir teoriye göre hem reproduktif toksisite hem de nörotoksisitenin altında yatan mekanizma, kinesin-motor proteinlerinin etkilenmesi aracılığıyla. Bu kinesin-proteinleri sinir sistemi ve diğer dokularda olduğu gibi spermin flagellasında da bulunmaktadır. Bu proteinlerin etkilenmesiyle fertilizasyon olayı ve sperm motilitesi azalmaktadır (42,43,47,48).

Memeli hücrelerinde akrilamidin in-vivo ve in-vitro olarak klastojenik (kromozom kırılması) ve genotoksik (mutajenik) etkili olduğu ve akrilamidin metabolizması sonucu oluşan glisidamidin, akrilamid genotoksitesi için en önemli basamak olduğu belirtilmektedir. Akrilamid ve glisidamidin hemoglobin, DNA ve diğer proteinler ile katılım reaksiyonu ürünleri oluşturduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (2,13,49–53).

Akrilamidin organizmadaki başlıca reaksiyonu, sahip olduğu α , β doymamış çift bağının, protein ve aminoasit yapılarındaki amin ve tiol grupları ile etkileşerek meydana getirdiği Michael tipi katılım reaksiyonudur. Akrilamidin, hemoglobinlerin N-terminal ucu ile bu reaksiyon aracılığıyla etkileştiği (12,54) ve başlıca katılım ürünleri olarak N-2-karbamoiletıl valin ve N-2-karbamoil hidrosietıl valini oluşturduğu rapor edilmiştir (55).

Yüksek dozlarda (500 mg/kg ve 250 mg/kg) akrilamid uygulamasının karaciğer, testis, beyin, böbrek ve akciğer dokularda lipid peroksidasyon düzeylerini arttırdığı, sülfidril grup içeriğini ve doku total protein düzeylerini düşürdüğü bildirilmektedir (6).

Yapılan bir başka çalışmada ise rat hepatositlerinde akrilamid uygulamasının doz ve zaman bağımlı olarak, hücrelerde glutasyon düzeylerini düşürdüğü, AST ve ALT enzim aktivitelerini arttırdığı görülmüştür. AST aktivitesindeki artışın, özellikle mitokondriyal hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (56).

Akrilamide, endüstriyel üretim ve tüketim sırasında, mesleki olarak maruz kalan bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda akrilamide mesleki maruziyetin kanser veya ölüm vakalarında anlamlı bir artışa yol açmadığı rapor edilmiştir (57–60). Ancak yapılan başka bir çalışmada ise mesleki maruziyet sonucunda pankreas kanseri görülme sıklığında artış olduğu belirtilmiştir (61).

Hollanda, İsveç, İsviçre, İtalya ve Norveç'te yaşayan halkların, beslenme ile akrilamide maruz kalmaları ve hastalanma risklerinin araştırıldığı çalışmalarda, kanser görülme sıklığında akrilamid alımıyla ilişkilendirilebilecek bir artışa rastlanmadığı rapor edilmiştir (45,46,62–65).

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 konsantrasyonlar da dahi bir risk taşırlar ve bunlar için tamamen zararsız denmesi mümkün değildir. Vücuda alınan akrilamid miktarı arttıkça ve maruz kalınan süre uzadıkça oluşan hastalık riskide o oranda artış göstermektedir.

24 Nisan 2002'de İsveç Ulusal Yiyecek Ajansı ve Stockholm Üniversitesi 120°C'nin üzerindeki sıcaklık derecelerinde kızartılmış veya pişirilmiş yiyeceklerde yoğun miktarlarda akrilamid oluştuğunu dünyaya duyurduktan sonra çok sayıda kuruluş kendi ülkelerinde gıdaların akrilamid düzeylerini ve sınır değerlerini tespit etmek üzere çalışma başlatmışlardır.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. FDA) 2002 yılından beri periyodik olarak her yıl piyasadan örnekleme şeklinde aldığı gıda maddelerinde akrilamid ölçümleri yapmakta ve bu sonuçları kendi Web sitesinden kamuoyuna duyurmaktadır (66).

Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu'nun (TÜBİTAK) Marmara Araştırma Merkezi laboratuvarında yapılan gıda analizlerinde, Türkiye'deki akrilamid taramalarında evde taze patatesin soyularak kızartılmasına oranla fast-food ürünü olarak doğranıp dondurulmuş patatesten çok daha yüksek miktarda akrilamid oluştuğu tespit edilmiştir (67).

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi tarafından yapılan bu araştırmada 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 ürünlerinin akrilamid düzeyleri tespit edilmiştir (67). Bu araştırmanın sonuçları Tablo 1' de verilmiştir.

Tablo 1: Ölmez ve ark. 'nın gıda kaynaklı akrilamid analiz sonuçları (67)

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
Ekme	40–160
Kızarmış ekme	90–1430
Sade kek	150–400
Zencefilli kek	1070–1410
Çeşitli fırıncılık ürünleri	230–3200
Kahvaltılık tahıllar	30–1400
Patates kızartması	330–3700
Kahve (bir bardakta)	25

Akrilamidin çips, 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 miktarda akrilamid bulunduğu ortaya konulmuştur. Ancak ekmeğin iç kısmında, ızgara, döner, tahin helvası, çavdar ekmeği, baklava ve pilavda ise akrilamid düzeyleri ölçülebilir değerlerin altında bulunmuştur. 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 bildirilmiştir.

2.1.5. Gıda Kaynaklı Akrilamidden Korunma Yolları

120°C'nin üzerindeki sıcaklık derecelerinde kızartılmış veya pişirilmiş yiyeceklerde yoğun miktarlarda akrilamid oluştuğu tam olarak ispat edilerek ortaya konulmuştur (68). Ancak, 120°C'nin altındaki sıcaklıklarda haşlanarak hazırlanmış gıdalarda ise akrilamid oluşmadığı tespit edilmiştir (25). Bu nedenlerden dolayı gıdalar hazırlanırken uzun süre çok yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmamalı ve aşırı derecede kızartılmamalıdır. Ancak bilhassa et ve et ürünleri, gıda zehirlenmelerine sebep olan bakterileri öldürmeye yetecek şartlarda pişirilmelidir. Akrilamid konusunda yapılan çalışmaların sonuçlarına dayanarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Tarım Örgütü (FAO), insanları akrilamid toksisitesinden korumak için yüksek sıcaklık derecelerinde kızartılmış ve yağlı gıdaların (akrilamid içeriği yüksek) mümkün olduğunca tüketilmemesini, beslenmede sebze ve meyve ağırlığının artırılması gerektiğini tavsiye etmektedirler (69).

Avrupa Sağlık Komisyonu (European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General) akrilamid konusunda yapılan araştırmaların sonuçlarını da göz önüne alarak, gıdaların akrilamid içeriğini azaltmak amacıyla üretici ve tüketicilere bazı tavsiyelerde bulunmuştur (70).

Yüksek sıcaklıklarda kızartılarak tüketilen patates, gıdalar içerisinde en yüksek akrilamid içeren ürün olarak bilinmektedir. Patates kızartmalarında akrilamid oluşumunu artıran en önemli faktör patatesin şeker içeriğidir. Bu nedenle patates ürünlerinin hazırlanmasında;

- 1- Şeker içeriği düşük yeni patates türlerinin geliştirilmesi,
- 2- Kızartma işleminden önce patateslerin beyazlatılması, pH seviyesinin düşürülmesi ve nem oranının yükseltilmesi,
- 3- Evde yapılan patates kızartmalarında, patateslerin kahverengi yerine altın sarısı renk alana kadar bekletilmesi ve bu amaçla sıcaklığın 175°C'nin altında tutulması tavsiye edilmiştir.

Tahıl ürünleri asparajin amino asidi bakımından çok zengin olan gıdalardır. Tahıl ürünlerinde akrilamid oluşumunu etkileyen en önemli faktör asparajin düzeyidir. Bu nedenle tahıl ürünleri pişirilirken 120°C'nin altındaki sıcaklık derecelerinin tercih edilmesi ve asparajin düzeyleri düşük tahıl türlerinin seçilmesi önerilmiştir.

2.2. Kayısı (*Prunus armeniaca* L.)

Rosaceae (gülgiller) familyasının *Armeniaca* cinsine ait olan kayısının botanik adı *Armeniaca vulgaris* Lam. (*Prunus armeniaca* L.)'dir. Kayısı zerdalinin (yabani kayısı) aşısı ile çoğaltılan bir kültür tipidir (71).

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 (72).

Kayısı (*Prunus armeniaca*) dünyada en yaygın Anadolu'da (özellikle Malatya ve çevresinde) yetiştirilmektedir. Dünya kuru kayısı üretiminin yaklaşık %85'i Türkiye'de gerçekleşmektedir. Kayısının en önemli bileşeni karotenoid grubu maddelerdir. Karotenoid grubu maddeler sarı, turuncu ve kırmızı renkteki doğal pigmentlerdir. Bu maddeler organizmada antioksidan etkiye sahiptirler. Provitamin-A etkisi gösteren karotenoidlerin en önemlisi olan β -karoten ince barsaklarda karoten oksijenaz enzimi ile retinol, retinal ve retinoik aside dönüşerek immün sistem, görme olayı ve epitelyum dokunun sentezi ve yenilenmesinde önemli rol oynamaktadır (1).

Kayısı sert çekirdekli, sarı-turuncu renkli bir meyvedir. Ham durumda biraz asidiktir, olgunlaştıkça asiditesi azalır, şeker içeriği artar ve A vitamini oranı 2 katına çıkar. Kayısının sağlık açısından oldukça fazla yararları vardır. Taze meyvesi kolay sindirilebilir doğal şekerler, vitamin A ve C, riboflavin (B2) ve niasinden (B3) zengindir. Ayrıca kalsiyum, fosfor, demir gibi minerallerin mükemmel bir kaynağıdır, az miktarda sodyum, kükürt, manganez, kobalt ve brom da içermektedir.

Kayısı sıklıkla kurutulmuş, reçeli yapılarak tüketilir. Kayısı kurutulduğunda kalorisi oldukça artar, ayrıca içerdiği kalsiyum, fosfor ve demir miktarı da önemli ölçüde artmaktadır. Meyvede bulunan beta-karoten ve likopen LDL-kolesterolü oksidasyondan koruyarak, kalp hastalıklarını önlemektedir.

Kayısı çekirdeği diğer tohumlar gibi protein ve yağ bakımından zengindir. Ayrıca Laetril (amigdalin) olarak bilinen vitamin B17 içeriği son derece yüksektir. Kayısı çekirdeğinin günlük tüketiminin kanseri önlemede etkili olduğu iddia edilmektedir. Laetril tedavisi (yüksek doz vitamin B17) alan kanser hastalarında tümör boyutunun küçüldüğü bildirilmiştir (73).

Kayısının meyvesi, çekirdeği, yağı ve çiçekleri antik çağlardan beri tıbbi tedavi ve ilaç olarak kullanılmıştır. Kayısı çekirdeği yağı sakinleştirici, kas gevşetici ve anti-spazmotik olarak kullanılmıştır.

Anemi: Meyve yüksek demir içeriği nedeniyle anemi hastaları için iyi bir besindir. İçinde bulunan çok az miktardaki bakır, demiri vücut tarafından kullanılabilir hale getirmektedir. Kayısının düzenli tüketimi hemoglobin üretimini artırmaktadır. Dolayısıyla aşırı menstruasyon kanaması olan kadınlar için ideal bir yiyecektir.

Konstipasyon: Selüloz ve pektin içeriği hafif laksatif etkisi nedeniyle kabızlık tedavisinde etkilidir. Çözünmeyen selüloz barsak hareketlerine yardımcı bir posa olarak rol oynar. Pektin suyu absorbe ederek tutar, böylece dışkı hacmi artırır ve ince barsak hareketlerine yardımcı olur.

Sindirim: Kayısının yemekten önce alınması alkali bir reaksiyona neden olarak sindirime yardımcı olmaktadır.

Gözler/görme: Yüksek vitamin A içeriği (özellikle kurutulmuş meyvede) görme yeteneğinin gelişmesinde oldukça faydalıdır. A vitamini eksikliğinde gece körlüğü ve görmeye bozulmaya neden olmaktadır.

Cilt problemleri: Taze meyve suyunun uyuz, ekzema, güneş yanığı ve cilt kaşıntılarında serinletici ve rahatlatıcı etkileri olmaktadır (74).

Dünya yaş kayısı üretiminin %14,4 ü Türkiye'den, Türkiye kayısı üretiminin yaklaşık %80'si Malatya'dan sağlanmaktadır. Malatya gerek ağaç sayısı gerekse yaş ve kuru kayısı üretimiyle sadece Türkiye'nin değil Dünya'nın en önemli kayısı üretim merkezidir. Malatya'da üretilen yaş kayısının yaklaşık %90'ı kurutulmuş olarak ihraç edilmektedir. Kuru kayısı ihracatında Türkiye %75'lik paya sahiptir (75).

Kayısı, ülkemizin dünya yaş ve kuru üretimde birinci sırada yer aldığı bir üründür. Üretilen kuru kayısının yaklaşık %80-85'lik kısmı ihraç edilirken, %10-15'lik kısmı iç piyasada tüketilmektedir (76).

Meyve ve sebzeler, vitaminler, mineraller ve fenolik bileşikler gibi fitokimyasalların zengin bir kaynağıdır. Fenolik bileşikler antioksidan özellikleri ile vitamin C, E ve beta-karotenden daha önemlidir. Fenoliklerin antioksidan özellikleri redoks özellikleri nedeniyledir. Böylece redükleyici ajan, hidrojen verici ve metal bağlayıcı olarak davranırlar (77).

Kayısı türleri farklı düzeylerde fenolik bileşik içermektedirler. Özellikle önemli derecede antioksidan özellikte oldukları bilinen flavonoid grubu fenolik maddeler bakımından zengindir (78).

Kayısı meyvesinde kaffeik (caffeic), β -kumarik (β -coumaric) ve ferulik asit gibi hidroksisinnamik (hydroxycinnamic) asitler ve bunların esterleri en çok bulunan bileşiklerdir (79).

Kayısıdaki dominant ester klorojenik (chlorogenic) (5'-caffeoylquinic acid) asittir (80).

İçerdiği fenolik maddeler, kayısının türüne, olgunlaşma durumuna ve yetiştiği coğrafi bölgeye göre değişiklik göstermektedir (81).

Ayrıca güneş ışığı, toprak ve mevsim değişiklikleri de kayısıdaki fenolik bileşiklerin miktarında etkili olmaktadır (82–84).

Kayısı β -karotene zengin olmasının yanında diğer besin öğelerince de zengin ve besleyici bir üründür. Tablo 2’de kayısı meyvesinin besin içeriği verilmiştir (85).

Tablo 2: Kuru kayısı meyvesinin besin içeriği (85)

İçerik	Miktar
Su	%25
Protein	%5
Yağ	%0.5
Karbonhidrat	%66.5
Enerji	294 kal/100g
A vitamini	10.9 IU
B1 vitamini	0.01 mg/100g
B2 vitamini	0.16 mg/100g
C vitamini	12 mg/100g
Kalsiyum	22 mg/100g
Demir	3.88 mg/100g
Sodyum	1.25 mg/100g
Potasyum	1269 mg/100g
Fosfor	108 mg/100g
Magnezyum	47.8 mg/100g

2.3. Tez Çalışmasına Dahil Edilen Parametreler Hakkında Genel Bilgi

2.3.1. PZR ve Gerçek Zamanlı PZR

2.3.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) Oluşum Mekanizması

PZR, çift sarmal bir DNA molekülünde bulunan hedef dizilere in vitro koşullarda iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanan tepkimelere verilen isimdir. Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, oligonükleotid primerler tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle bağlanırlar. Oligonükleotid primerlerin spesifik olarak hedef dizilerine bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3'hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülünün sentezi gerçekleşmiş olur. PZR döngüsü denaturasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongasyon) olmak üzere üç basamaktan oluşur. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları eksponansiyel olarak artar. Bu artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PZR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. Böylece başlangıçtaki az miktarda kalıp DNA'dan yeterli miktarda DNA elde edilmesi sağlanır. Örneğin 30 döngü boyunca amplifiye edilen tek bir DNA molekülünden, teorik olarak 2^{30} adet yeni molekül elde edilecektir (86–88).

2.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri

PZR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA Polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve MgCl₂'dür.

a) Kalıp DNA: PZR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PZR'da kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA'da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA'dan önce klasik yolla cDNA elde edilir. Genomik DNA ve cDNA örneğinin elde edildiği RNA saf olarak izole edilmeli, proteinden ve alkolden çok iyi bir şekilde arındırılmış olmalıdır (86,87).

b) Polimerazlar: DNA polimeraz enzimleri, orijinal kalıp DNA zincirindeki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan tamamlayıcısı olan DNA zincirinin sentezini kataliz ederler. DNA polimeraz enzimleri, sentezi başlatmak için kalıp molekülündeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerler) ihtiyaç duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (86).

Termostabil DNA polimerazlardan PZR'da en yaygın kullanılanı *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimeraz'dır. Taq DNA polimerazın polimerizasyon oranı (nükleotid/saniye) enzim için en uygun sıcaklık olan 70–80°C (optimum 72°C) de 35–100 dür. Enzimin reaksiyondaki konsantrasyonu da önemlidir. 100 µL'lik bir reaksiyonunda polimeraz enzim konsantrasyonu 1–5 ünite arasında olmalıdır. Bu miktarlar hedef ve kalıba göre değişim gösterir (86).

c) Primerler: Genellikle kimyasal olarak sentezlenen, 15–20 bazlık DNA oligonükleotid dizileridir. Tamamlayıcı DNA ipliklerinden karşıt yönlerde DNA sentezini başlatabilmek için iki adet primer kullanılır. Primer tasarımı yapılırken hedef DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır (86).

d) dNTP karışımı: Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10–100 µM) kalıba uygun doğru bazlar seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PZR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Ayrıca dört dNTP'nin eşit konsantrasyonda kullanılması önemlidir (86).

e) Tamponlar ve MgCl₂: PZR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan 10–50 mM derişiminde 20°C'de pH 8.3-8.8 arasında olan tris-HCl tamponudur. Ancak hedef dizi ve amaca uygun olarak farklı tamponlarda kullanılabilir. Tampon içeriğinde bulunan KCl'ün 50 mM'a kadar olan konsantrasyonları primer yapışmasını artırır. Ancak 50 mM üzerindeki KCl konsantrasyonlarının Taq polimeraz enzimini engellediği unutulmamalıdır. MgCl₂ 'ün reaksiyon karşısındaki final konsantrasyonu değişebilmekle birlikte genellikle 0.5–5.0 mM'lık değerler arasında çalışılır.

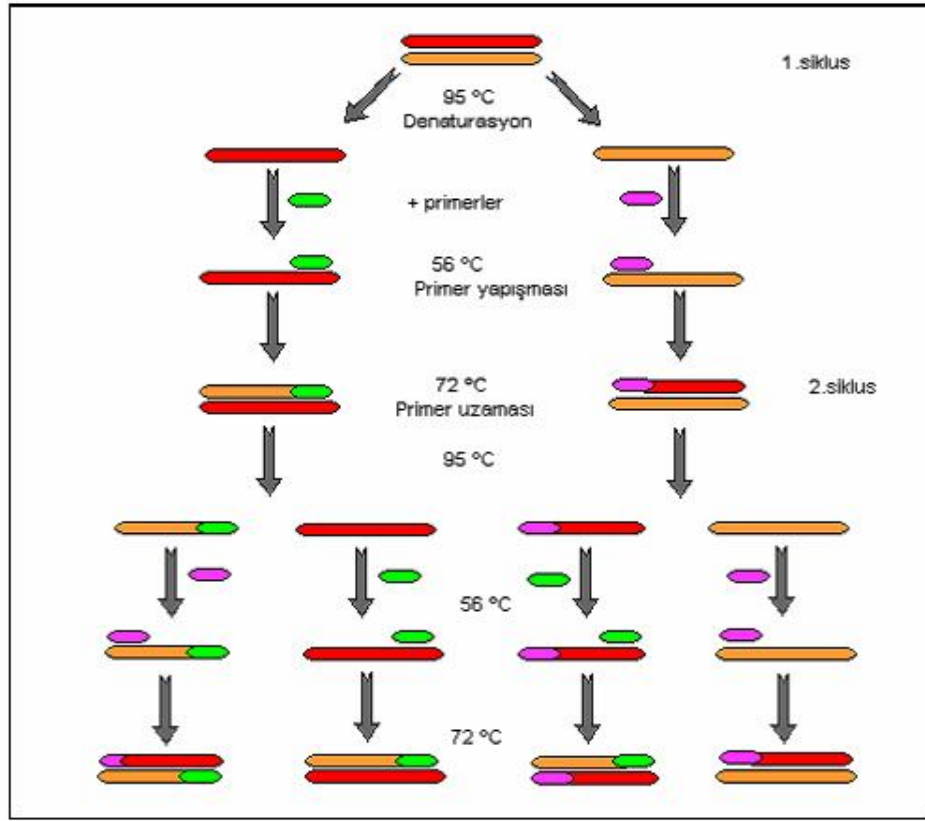
2.3.1.3. PZR'nin işleyişi

Günümüzde PZR'in verimi ve kullanımında önemli gelişmelerin yaşanmasının nedeni, termostabil DNA polimerazların ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlayabilen PZR cihazlarının (thermal cycler) kullanıma sunulmasıdır. Verimli bir PZR için; denaturasyon, primerlerin bağlanması, primerlerin uzaması, döngü sayısı ve PZR cihazının sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir (Şekil 7) (86).

a) Denaturasyon: Başlangıç denaturasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (95–100°C) kullanılır. Ancak PZR sırasında genellikle en etkin denaturasyon sıcaklığının 92–95°C olduğu saptanmıştır. G+C den zengin hedefler için daha yüksek sıcaklıklar gereklidir. Denaturasyonun tam olarak gerçekleşmesi önemlidir. Tamamlanmamış denaturasyon DNA zincirlerinde kopmalara neden olarak ürün verimini azaltır. Ayrıca Taq DNA polimerazın yarı ömründe dikkate alınmalıdır. Taq DNA polimeraz enzimi 92.5°C'de 2 saatten fazla, 95°C'de 40 dakika ve 97°C'de ise 5 dakika yarı ömre sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (86,87).

b) Primer Yapışması (Annealing): Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu ve sıcaklık değeri; primerlerin uzunluğuna, baz içeriğine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Denaturasyonu takiben primerin bağlanması aşamasındaki T_m /bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PZR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. 55–72 °C arası yapışma sıcaklıkları en iyi sonuçları verir (86,87).

c) Primer Uzaması (Extension): Uzama zamanı hedef dizinin uzunluğuna, konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlıdır. Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72 °C kullanılır. Uzama aşaması için çoğu zaman 2 dakika yeterli olmakla birlikte, eğer uzun ampikonlar çoğaltılıyorsa süre arttırılır. PZR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi çoğunlukla uzun (10–15 dakika) tutulur. En uygun döngü sayısı hedef DNA başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermekle beraber, ideal döngü sayısı genellikle 25–35 arasındadır (86–89).



Şekil 7: Polimeraz Zincir Reaksiyonunun işleyişi (2 döngü gösterilmiş) (86)

2.3.1.4. PZR Uygulama Alanları

Göreceli olarak yeni bir teknik olmasına rağmen PZR amplifikasyonu genetik bozuklukların tanısında, klinik örneklerdeki patojenik organizmaların nükleik asit dizilerinin belirlenmesinde, adli örneklerin ya da tek bir spermin genetik olarak tanımlanmasında ve etkinleşmiş onkogen mutasyonlarının ve tek gen polimorfizmlerinin analizinde yoğun uygulama alanı bulmuştur (86,87).

2.3.1.5. PZR'a Dayalı Yöntemlerden Bazıları

Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR) kısaca PZR amplifikasyonunu görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. "Sayımsal Gerçek Zamanlı-Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-

PZR)", "İzlenebilir Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT)", "Floresan Sayımsal RT-PZR", "kinetik PZR", "homojen PZR", "kantitatif Real-time PZR" gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir (90).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve DNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme PZR'in en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, viral yük tayini, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur. Doğum öncesi tanıda X'e bağlı genetik geçişli hastalıklarda fetal cinsiyet tayini, Rh izoimmünizasyonunda fetal kan grubu tayini için RT-PZR %100 tanı koydurucu özelliği nedeniyle günümüzde klinik uygulamaya geçmiştir (91).

RT-PZR, PZR amplifikasyonunu görünür hale getirir, monitörize eder. PZR sonuçlarına ulaşmak için harcanan zaman azaltmaktadır. Sistemin özellikleri tek bir reaksiyondan elde edilen bilginin miktarını en üst seviyeye çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Bu şekilde sistemi kantitatif PZR için güçlü bir cihaz haline dönüştürmektedir. Sistem gen ekspresyonunun miktarını belirleme ve tek nükleotid polimorfizminin saptanması olanaklarını sağlamaktadır. Ayrıca polimeraz zincir reaksiyonunun kısa sürede tanımlamak için yeni bir hızlı sıcaklık döngüsü kullanmaktadır. PZR ürünlerini yeni erime eğrisi analiz programları kullanarak yeni sınırları araştırmamıza yardımcı olarak daha önceden ulaşılabilenin aksine daha zengin bir bilgiye sahip olmaya olanak sağlamaktadır. Real time-PZR, üstün kopyalama yeteneği ve hassasiyet performansı sağlamaktadır. PZR uygulamalarında optimum performansa ulaşabilmek için geliştirilmiştir. Floresan işaretli probalar veya interkalatör boyalar kullanılır. Oluşan DNA ile doğru orantılı floresan ışımaya meydana gelir. Hızlı (1 saat) sonuç verir. Günlük numune çalışma sayısı yüksektir (~200 numune/gün). Düşük kontaminasyon riski vardır. Sensitivitesi yüksektir (< 5 kopya). Tekrarlanabilirliği oldukça iyidir (CV<%2.0). PZR ile miktar tayini yapılabilir. PZR sonrası elektroforez gibi ilave tekniklere ihtiyaç yoktur. Konvansiyonel ölçümlerden 1000 kat daha az RNA ile çalışabilir. İki kat artmış değişimi belirleyebilme hassasiyetindedir. Bu itibarla, kantitatif real time-PZR analizi ile minimal rezidüel hastalıklarla bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanması kliniklere büyük katkı sağlayacak potansiyeldedir (92).

Ters Transkriptaz PZR (RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR)

PZR başlangıç inkübasyonunda retroviral bir transkriptaz ile birleştirilirse, DNA, tek sarmallı RNA'dan köken alarak da amplifiye edilebilir. Bu şekilde kombine reaksiyon RT-PZR olarak adlandırılır.

mRNA ve viral RNA gibi RNA hedef dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır. Bu PZR çeşidinde bir reverse transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. DNA primeri genellikle dT oligonükleotidi içerir (sadece heksamer yapıda timidin nükleotidi) veya bir spesifik primerdir. Önce reverse transkriptaz veya bir primer yardımı ile RNA'dan cDNA üretilir. Meydana gelen mRNA/cDNA heterodupleksi polimeraz zincirinin RNAaz aktivitesi ile parçalanır. DNA tek iplikçik haline döner. Bağlanma sıcaklığında, cDNA daki hedef diziye bağlanan primer, Taq DNA Polimeraz için hedef haline gelir ve uzamayı başlatır. Böylece 30 siklus sonunda milyonlarca mRNA üretilir.

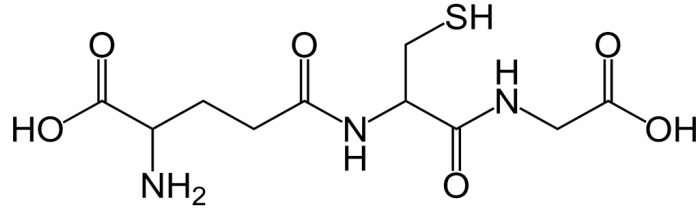
Reverse transcription ve PZR amplifikasyonu bir veya iki aşamada uygulanabilir. Ayrı ayrı iki aşama halinde uygulanan RT-PZR daha hassas, tek aşamalı ise daha az kontaminasyon riski taşır (çünkü tüp transkripsiyondan sonra açılmamaktadır). Hangi yöntemin kullanılacağına belirlenmesi bizim hassasiyet mi yoksa kontaminasyondan kaçınmak mı istediğimize bağlıdır. RT-PZR için birkaç çeşit reverse transcriptase enzimi vardır. Bir veya iki aşamalı reaksiyon seçimi ve daha sonraki aplikasyonlara göre enzim karakteristiği seçilir. Bu seçimde RNase aktivitesinin olup olmaması, iyon gerekliliği, dUTP ekleyebilme yeteneği ve optimum çalışma ısısı gibi etmenler de önemlidir.

2.3.2. Glutatyon (GSH) Metabolizması

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türevleri (ROS); nükleik asitler, serbest aminoasitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri gibi canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün sınıflara dahil bileşiklerle reaksiyona girerek reversibl veya irreversibl hasar oluşturabilmektedir (93). Bunların iltihap, iskemi ve reperfüzyon, kanser ve yaşlanma gibi temel hastalık proseslerinde çok büyük öneme sahip oldukları bu konulardaki çalışmalar ilerledikçe daha iyi anlaşılmaktadır (94–96). Canlı organizmalar, oldukça reaktif olan ve hemen hemen tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hasar

meydana getirme potansiyeline sahip olan bu yapıları etkisiz hale getirmek üzere savunma mekanizmalarına ihtiyaç duyar. İnsan organizmasını serbest radikal hasarından koruyan enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalar mevcuttur. Canlı hücreleri serbest radikallerin hasarından koruyan başlıca enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon S-tarnsferaz (GST)'dir . Non-enzimatik mekanizmalar arasında ise başlıca; E vitamini, C vitamini, glutatyon (GSH), melatonin ve ürik asit bulunmaktadır.

GSH (γ -glutamil sisteinil glisin) tüm aerobik hücrelerde milimolar konsantrasyonlarda (0.5-10 mM) bulunan, ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan atipik bir tripeptittir (Şekil 8). Atipik denmesinin sebebi glutamilin gama pozisyonundan sisteine bağlanmasıdır (97). Genelde GSH olarak kısaltılır. Tabiatta yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiş ve 1935 yılında δ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin halinde sentezlenmiştir (98).



Şekil 8: Glutatyonun moleküler yapısı (97)

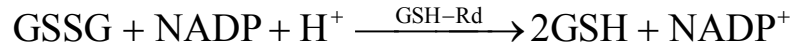
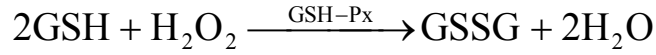
-SH sisteinin sülfidril (tiyol) grubudur ve molekülün reaksiyona giren en aktif kısmıdır. Glutatyonun birbirine dönüşen redükte bir tiyol formu (GSH) ile okside formu (GSSG) bulunmaktadır. Çoğu hücrede GSH'nin GSSG'ye oranının 500/1'den büyük olmasından dolayı GSH, glutatyonun en yoğun bulunan formu olarak kabul edilmektedir (99). İzomerizasyon reaksiyonlarının kofaktörü, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, hücre proliferasyonu gibi önemli fonksiyonları bulunan, sisteinin depo ve transport şekli olan indirgenmiş glutatyon (GSH), içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasara karşı korumaktadır.

Total GSH'nin çoğu sitozolde (% 85–90) bulunurken geri kalanı ise (% 10–15) mitokondri ve diğer organellerde bulunur (100).

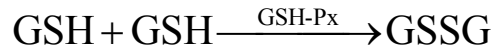
Glutasyon;

- Proteinlerin sülfidril gruplarını indirgenmiş formda tutar.
- Protein disülfid redüktaz enzimi, glutasyon ve proteinler arasındaki sülfidril disülfid değişimlerini katalizler.
- Hücre membranından aminoasit transportunu sağlar.
- Bazı enzimatik reaksiyonlar için kofaktördür.
- Glutasyonun sülfidril grubu, oksijen transportu sırasında oluşan peroksitlerin indirgenmesinde kullanılır.

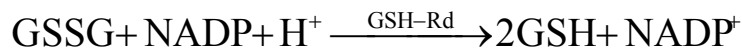
Glutasyon, glutasyon peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonda toksik potansiyeli olan hidrojen peroksidin (H_2O_2) suya yıkılmasını sağlar. Bu sırada redükte glutasyon (GSH), okside glutatyon (GSSG) dönüşür. Okside glutasyon daha sonra glutasyon redüktaz (GR) ile GSH'a dönüştürülür.



GSH enzimlerin çok önemli grupları olan -SH gruplarının redüklenmiş durumda kalmalarına yardım eden önemli bir hücre içi redüktördür. GSH redükleyici bir ajan olarak etkili olduğundan -SH grubu okside olur ve glutasyonun diğer bir molekülü ile aşağıdaki formülde görüldüğü gibi bir disülfid köprüsü oluşturur.

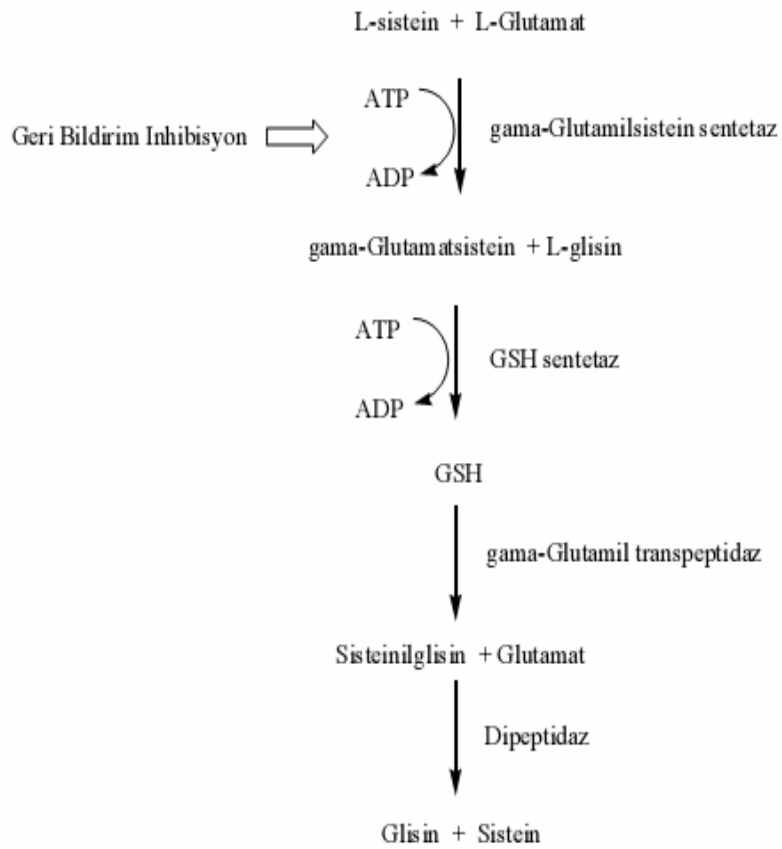


GSSG okside glutatyonudur ve gerektiğinde NADPH'ı kullanan bir reaksiyon ile glutasyon redüktaz tarafından aşağıdaki formülde görüldüğü gibi GSH'a redüklenebilir.



2.3.2.1. Glutatyonun Biyosentezi

GSH sentezi, L-glutamat ve L-sisteinin gama-glutamilsistein sentetaz enzimi ile katalizlenmesi bağlar. Oluşan gama-glutamilsistein ve L-glisin ürünü GSH sentetaz enziminin katalizörlüğünde GSH'ya dönüştürölür. Bu reaksiyonlar esnasında iki ATP harcanır. İlk reaksiyon geri bildirim ile inhibe edilebildiğinden hızı belirleyen basamaktır (şekil 9).



şekil 9: Glutatyonun biyosentezi ve katabolizması

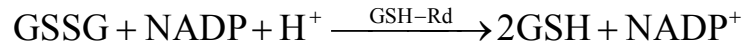
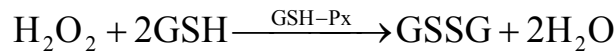
2.3.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) (EC 1.11.1.9)

Glutatyon peroksidaz, biręok dokuda bulunan, doğal bir antioksidandır. Dört protein alt ünitesinden oluşan GSH-Px, tetramerik bir enzimdir ve her ünite aktif bölgesinde bir atom Se elementi içerir. Molekül ağırlığı yaklaşık 85 000 Daltondur. Sitozol ve mitokondride bulunan bir enzimdir. Se elementi selenosistein şeklinde olup

normal sisteindeki sülfür yerinde Se bulunur (R-SH yerine R-SeH). Bu enzim, karaciğerde yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta ve kas da düşük aktivitede bulunur. GSH-Px hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Hidroperoksitlerin redüksiyonu için ileri sürülen katalitik mekanizma selenolat aktif bölgesinin selenenik asite oksidasyonunu kapsamaktadır ve bir molekül GSH'ın ilavesi ile selenenik asit, GSH selenenilsülfid bileşiğine dönüşür. İkinci bir GSH molekülünün ilavesi ile aktif selenolat ve glutatyon disülfid (GSSG) oluşmaktadır. GSH-Px fizyolojik şartlar altında yüksek derecede antioksidan özelliklere sahipken diğer enzimler sadece oksidatif stres durumlarında önemli yer tutmaktadır. Lipid peroksitlerini toksik olmayan alkole çevirir (101–103).

GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonu vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte, mitokondriyal solunum sırasında oluşan radikallerin peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma gerek eritrosit gerekse makrofajlarda hidrojen peroksidin artmasıyla şiddetli hücre hasarına yol açar (104,105).

Bu enzimin substratı küçük molekül ağırlıklı bir tiyol bileşiği olan GSH'dır. GSH-Px, aşırı H₂O₂ mevcudiyetinde GSH'ın GSSG'ye oksidasyonunu katalize eder ve bu arada H₂O₂ de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur. Oluşan GSSG de Glutatyon Redüktaz ile tekrar redükte forma dönüştürülür. Bu reaksiyonda son elektron vericisi NADPH'dur (106,107).



2.3.4. GST Enzimleri ve Genleri

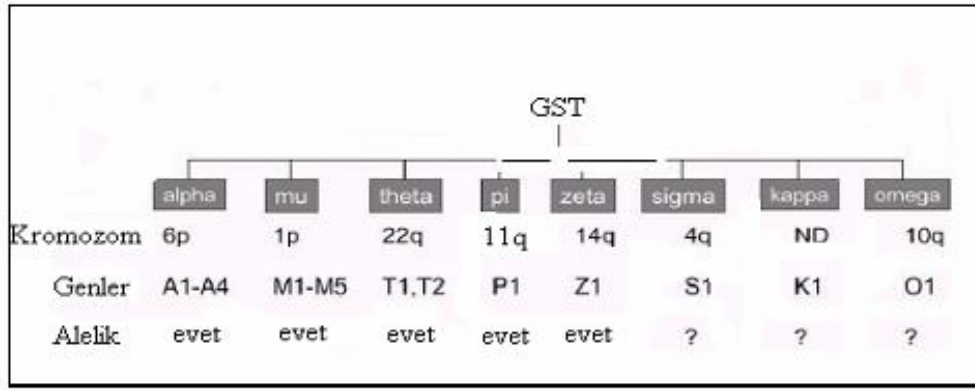
Glutatyon S-transferaz (GST) (EC.2.5.1.18) enzimleri çok fonksiyonlu alt birimlerden oluşmuş (dimerik) ve büyük ölçüde sitozolik bir enzim ailesidir. Bu enzimlerin hem detoksifikasyon yapıcı hem de hücre içi molekülleri bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri vardır. GST gen ailesi, pek çok karsinogenik elektrofil detoksifiye etme kapasitesine sahip dimerik yapıdaki enzimleri kodlamaktadır. Glutatyon S-

transferaz alt birimlerinin değişik ksenobiyotikler (fenobarbital, transtilbenoksit, 3-metilkolantiren) ile uyarılabildiği, insan glutatyon S-transferazlarının en az 4 otozomal gen lokusu tarafından kodlandığı, farklı gen sınıflarının farklı kromozomlar üzerinde yerleştiiği ve birçok organizmanın çok sayıda glutatyon S-transferaz izoenzimini kodlayabilecek genetik kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir. Büyük ölçüde sitozolik olan ve değişik ksenobiyotikler tarafından uyarılabilen, hücre ve doku hasarı sürecinde plazmada metabolizması artabileceği düşünölen glutatyon S-transferaz aktivitesi ve izoenzimleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır (108–110).

Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyon (GSH)'daki sisteine ait sülfhidril (-SH) grubu ile bağlayarak onların elektrofilik özelliklerini nötrale ederler ve ürünün suda daha fazla çözünür hale gelmesine neden olurlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri düzeyde metabolize olurlar. Ksenobiyotiklerin klasik atılım ürünleri olan merkaptürik asitler organizmadan safra ile atılırlar.

Bu yol GST'lerin kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu göstermektedir. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için hem depo hem de taşıma rolü üstlendiklerini göstermektedir (111,112).

Glutatyon S-transferaz (GST) genlerinin sınıflandırılması primer yapılarına, enzimatik özelliklerine, antikorlarla ilgili reaksiyonlarına, yapısal karakteristiklerine, kimyasal affinitelerine, aminoasit dizilerine ve enzimlerin kimyasal davranışlarına göre yapılmıştır. Buna göre GST genleri 8 sınıfa ayrılmaktadır: alpha (α), mu (μ), pi (π), theta (θ), omega (Ω), kappa (κ), sigma (σ) ve zeta (ζ). Alpha 6. kromozomda; mu 1. kromozomda; pi 11. kromozomda; theta 22. kromozomda; omega 10. koromozomda; sigma 4. kromozomda ve zeta 14. kromozomda kodlanmaktadır (Şekil 10) (108,109,113,114).



Şekil 10: GST Gen Ailesi

2.3.4.1. Glutasyon S-Transferaz Pi 1 Geni (GSTP1)

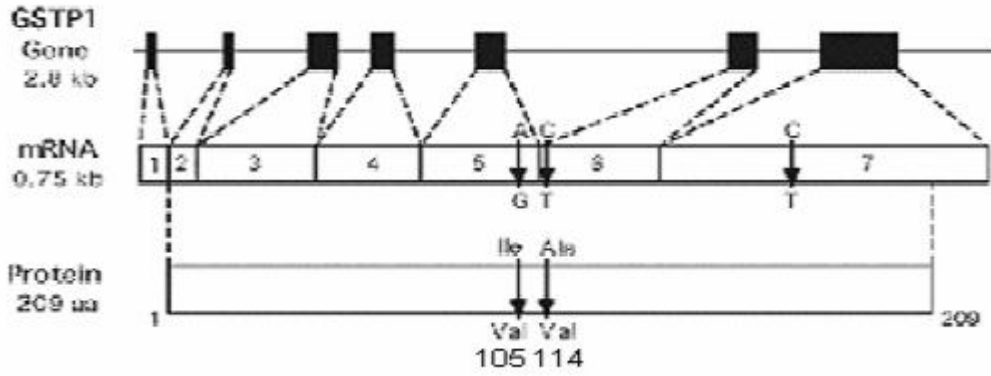
GST-P'nin rat karaciğerinde kimyasal karsinogenezis sırasında oluşan preneoplastik lezyonların yeni bir enzimatik belirteci olduğu kabul edilmektedir. Yani GST-P ekspresyonu ratlarda hepatokarsinogenezis süreci ile yakından ilgili olabilir. Türler arasında neoplastik oluşumda benzerlik olduğu düşünülürse, GST-P'nin insan preneoplastik lezyonları için yararlı bir belirteç olarak kullanılması da beklenebilir. Aslında neoplastik lezyon olsun ya da olmasın, karaciğer veya diğer organlarda benzer şekilde ekspresye edilen bu enzim, onkoloji araştırmacıları arasında oldukça ilgi çeken bir konu haline gelmiştir (115).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda akciğer tümörogenezinde GST'nin Pi izoenziminin önemli bir rolü olduğu ve insan akciğerinde en çok bulunan GST izoenzimi olduğu ortaya çıkmıştır. GST Pi1 en çok insan akciğerinin bronşiol epitelindeki Clara hücrelerinde bulunmaktadır (116). GST Pi1'in, sigara tütününe bulunan kimyasalları (polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi) detoksifikasyona uğrattığı görülmüştür (117). Ayrıca sigaranın sitotoksik etkisini inhibe etmek için insan akciğer fibroblastlarında GST Pi1 sentezinde çok fazla miktarda artış olduğu görülmüştür (118). Yapılan bir epidemiyolojik çalışmada bilinen akciğer subtiplerinde GST Pi1 geninde polimorfizm olduğu gösterilmiştir (119).

Polimorfik GSTP1 gen sınıfı üyeleri; kromozom 11q13 üzerinde, 2.8 kb uzunluğunda, 7 ekzon içeren bir sınıftır (Şekil 11), bu genin 3 aleli GSTP1*A (105 Ile/114 Ala), GSTP1*B (105 Val/114 Ala), GSTP1*C (105 Val/114 Val) tanımlanmıştır. Open reading frame (okuma alanı) bölgesi birinci ekzonun 3' ucundan başlar ve 630 bazçifti uzunluğunda 209 aminoasitten oluşan protein sentezler. GSTP1

gen seviyesi normal dokularla kıyaslandığında hem özofagus, mide, meme, kolon, testis, prostat, deri, akciğer ve mesane tümörlerinde hem de akut miyeloid ve lenfoid lösemilerde yüksek miktarda bulunmuştur (108,120–123).

GSTP1, benzopirin de dahil olmak üzere sigara dumanındaki çoğu karsinojenlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır. Sigara dumanında bulunan aktif benzo(a)prin diol epoksite karşı yüksek düzeyde aktivite gösterirken, benzo(a)prin'in mutajenik formu olduğu düşünülen anti BPDE'nin (+)-enantiomerine karşı da aktif olduğu ve akciğer kanserinin oluşumunda etken olduğu gösterilmiştir (110).



Şekil 11: GSTP1 gen yapısı

GSTP1'in yapısındaki, fonksiyonundaki veya ekspresyon seviyesindeki genetik polimorfizme uygun olan değişiklikler sonucunda oluşan düşük enzimatik aktivite, karsinojenlerin detoksifiye edilebilmelerinde ve akciğer kanseri başta olmak üzere belirli kanser tiplerinin gelişmesinde risk faktörü taşımaktadır. GSTP1'in ekzon 5 (Ile105Val) ve ekzon 6 (Ala114Val) genetik polimorfizmleri, glutatyon S-transferaz gen ürünü üzerinde azalmış enzim aktivitesi ile sonuçlanan fonksiyonel bir etkiye sahiptir (110,122,123).

2.3.5. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS); Malondialdehid (MDA) ve Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu sonucu çoğu reaktif elektrotfillerden oluşan çeşitli kompleks ürünler oluşur. Tüm bu yıkılım ürünleri tiyobarbitürik asitle reaksiyon vermeleri nedeniyle TBARS adını alırlar. Bu ürünlerden oran olarak en yoğun oluşanı

ise MDA'dır. Bu ürünler genelde DNA ve proteinlere bağlanarak, toksik ve mutajenik etkiler oluştururlar (124).

Uzun zincirli doymamış yağ asitleri, bir veya daha fazla çift bağı olan metilen gruplar içerirler. Metilen gruplar oksidan ajanlara karşı yüksek reaktiviteye sahiptir. Uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan ilk ürün peroksil (LOO) radikalleridir.

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

Lipid peroksitleri, yüksek ısıda hoş olmayan tat ve kokuya sahip ürünler (keton, asitler ve aldehitler) oluşturmak üzere ayrışır (125,126). Yüksek sıcaklıkta lipid peroksitlerinin ayrışması insan kanındaki proseslerde mümkün değildir.

Reaktif oksijen radikali ile hücre membran fosfolipidlerinin yapısını oluşturan çoklu doymamış yağ asitleri reaksiyona girerek lipid hidroperoksitlerini oluşturur. Bu olaya lipid peroksidasyonu denir. Lipid hidroperoksidasyonu sonucu aldehit, pentan, etan gibi ürünler oluşur. Bunlardan en toksik olanı aldehitlerdir. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren MDA meydana gelir. Dokudaki ve kandaki MDA seviyesi lipid peroksidasyonunun derecesiyle korelasyon gösterir. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, hücre için çok toksik bir molekül olup aynı zamanda mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olarak kabul edilir. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini göstermektedir. MDA doku, kan ve vücut sıvılarında ölçülerek lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (127).

Lipid peroksidasyonu son derece zararlı bir zincir reaksiyonudur. Membran akışkanlığında kayıp, membran potansiyelinde azalma, hidrojen ve diğer iyonların permeabilitesinde artma ve sonuç olarak membranın rüptürü ile hücre ve organel içeriklerinin ortama boşalmasına neden olur. Bazı peroksit parçalanmalarının sitotoksik özellikleri de vardır (128).

Bilindiği gibi MDA (Malondialdehid), oluşan serbest oksijen radikallerinin iyi bir göstergesidir. MDA yükselmesi, serbest oksijen radikallerinin etkisi ile artmış lipid peroksidasyonunu gösterir. Lipid peroksidasyon, organik yapılar ve membranların

fonksiyonları üzerine çok zararlı etkilerine bağı olarak, hücre ölümüne kadar ilerleyen değişiklikler oluşturur (129).

MDA ölçümü için kullanılan tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu, kolaylığı ve duyarlılığı nedeniyle en çok kullanılan yöntemdir (130).

Doku ve plazma MDA düzeylerinin belirlenmesi, serbest oksijen radikallerinin dokularda oluşturduğu lipid peroksidasyonunun, dolayısıyla oksidatif stresin en duyarlı göstergelerinden biridir. Oksidatif stres ile antioksidan sistem ve arasındaki korelasyon son yıllarda giderek ilgi odağı olmuş, oksidatif stresin göstergesi kan MDA düzeyleri ve antioksidan olarak bazı biyokimyasal parametreler bir çok hastalıkta araştırılmaktadır.

MDA yaygın olarak tiyobarbitürik asitle reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür. Bu reaksiyon sonucunda tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) oluşur. Her ne kadar TBARS ölçüm yöntemi MDA'ya özel olmasa da TBARS terimi lipid peroksidasyonunun genel belirteci olarak kabul edilen MDA ile eşanlamlı olarak kullanılmagelmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Ratların Temini ve Bakımı

Bu çalışma için, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan etik onay alınmıştır. Bu araştırmada ratlara verilen akrilamid (C_3H_5NO) Sigma marka %99 saflıkta idi. Canlı ağırlığı ortalama 200–225 gram, 8–12 haftalık olan 40 adet dişi Spraque Dawley rat, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma merkezinden temin edildi. Ratlar; her grupta 10 rat olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. 1. grup (kontrol grubu); 12 hafta süreyle normal yemle beslendi. 2. grup (kayısı grubu); 12 hafta süreyle %5'lik kuru kayısıli yemle beslendi. 3. grup (akrilamid grubu); 12 hafta süreyle içme suyu içinde 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/gün'lük akrilamid ve normal yemle beslendi. 4. grup (akrilamid + kayısı grubu); 12 hafta süreyle içme suyu ile 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/gün'lük akrilamid ve %5'lik kuru kayısıli yemle ile beslendi. Ratlar sıcaklığın 21°C ve ortam neminin %55–60 olduğu, 12 saat ışık (08:00–20:00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda bakıldı. Akrilamidli su; daha önce distile suda hazırlanan 1 g/dL'lik stok solüsyondan, ortalama 200 g'lık ratların günlük 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw alacakları şekilde musluk suyuyla dilüe edilerek hazırlanmıştır. Ratların içme suları haftada bir kez değiştirildi.

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

- 1) Potasyum Klorür – Merck
- 2) 1,1',3,3' tetraetoksipropan – Acros
- 3) Fosforik asit – Merck
- 4) Tiyobarbutirik asit – Acros
- 5) Etanol – Merck
- 6) n-butanol – Merck
- 7) Redükte glutatyon – Sigma
- 8) Triklorasetik asit – Sigma
- 9) 5,5' ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) – Sigma
- 10) Trisodyum sitrat – Aklar Kimya
- 11) Sodyum azid – Merck
- 12) NADPH – Sigma
- 13) Glutatyon redüktaz – Sigma
- 14) Amonyum sulfat – J.T. Baker
- 15) Hidrojen Peroksit – Merck
- 16) Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA) – J.T. Baker
- 17) Potasyum dihidrojen fosfat – Merck
- 18) Disodyum hidrojen fosfat – Merck
- 19) 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) – Merck
- 20) Sığır serum albumini (BSA) – Sigma
- 21) Bakır sülfat 5 sulu – Aklar Kimya
- 22) Sodyum Potasyum Tartarat – Merck
- 23) Sodyum Hidroksit (NaOH) – Sigma

3.1.3. 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 ve 1000 mL'lik
- 6) Hassas terazi – Shimadzu Libror AEG-320

- 7) Spektrofotometre – LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 UV/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

3.2. Yöntemler

3.2.1. Grupların Oluşturulması

1. grup kontrol grubu olarak kullanıldı. 12 hafta boyunca normal içme suyu ve normal yem ile beslendi. 2. grup; kayısıli yem verilen grup. 12 hafta boyunca normal içme suyu ve yemlerine %5 oranında kuru kayısı ilave edilen rat yemi ile beslendi. 3. grup; akrilamidli su verilen grup. 12 hafta boyunca içme suyu içinde günlük ortalama 500 µg/kg bw alacak şekilde akrilamid ve normal rat yemi verildi. 4. grup; akrilamidli su ve kayısıli yem verilen grup. 12 hafta boyunca içme suyu ile 500 µg/kg bw/gün'lük akrilamid ve yem ile %5 kuru kayısı verildi.

3.2.2. Numune Alınması ve Hazırlık İşlemleri

Sürenin sonunda ratlara ksilazin-ketamin anestezisi altında, laparotomi yapılarak karaciğer doku örnekleri alındı, doku örnekleri serum fizyolojikle yıkanarak fazlalık kanın uzaklaştırılması sağlandı.

PZR ile GST-Pi gen ekspresyonu analizi için alınan dokular steril bir şekilde saklama solusyonu içine alındı. Dokular analizlerin yapılacağı güne kadar -70°C'de bekletildi. Dokuların bir kısmı histopatolojik incelemeler için %10'luk formol içinde tespit edildi.

Analiz zamanında dokular; uygun tamponlar içinde homojenize edildi. Doku homojenatlarının 4°C'de, 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmesinden sonra elde edilen süpernatantlarda glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S-transferaz (GST) aktivite düzeyleri ile redükte glutatyon (GSH), Tiyobarbitürik Asit Ürünleri (TBARS) ve protein düzeyleri ölçüldü. GSH-Px, GST, GSH, MDA ve Protein düzeyleri, spektrofotometrik ölçüm yöntemleri ile analiz edildi. GST-Pi gen ekspresyonu analizi PZR ile yapıldı.

3.2.3. PZR

3.2.3.1. 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 (14000 rpm)
- 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

3.2.3.2. 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) Etidyum Bromür ($C_{21}H_{20}N_3 \cdot Br$; 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 tribazik dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$; FW:294.1; Sigma no: C8532)
- 9) Sodyum Asetat (CH_3COONa ; FW: 82.03; Sigma no: S3272)
- 10) Guanidin Tiyosiyanat ($CH_5N_3 \cdot CHNS$; 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-merkaptotanol (C_2H_6OS ; FW: 78.13; Sigma no: M3148)

- 16) Sodyum Klorit (NaCl; FW: 58.44; Sigma no: S3014)
- 17) Amonyum Sülfat ((NH₄)₂SO₄; FW132.14; Sigma no: A4915)
- 18) dNTP (Invitrogen)
- 19) Superscript (Invitrogen)
- 20) Primer (Operon veya Midland, Teksas, USA)
- 21) Taq polimeraz (Sigma)

3.2.3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

RNA Later Saklama Çözeltisinin Hazırlanışı

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

RNA Denaturasyon Çözeltisinin Hazırlanışı (RLT çözeltisi)

4 M Guanidin Tiyosiyanat, 25 mM Sodyum Sitrata (pH 7), %0.5 sarkozil içeren çözelti hazırlandı ve kullanımdan hemen önce son konsantrasyon %1 olacak şekilde beta-merkaptetanol 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 doku konsantrasyonu %5 (w/v) olacak şekilde 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 (4⁰C) 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 çözelti de filtreye eklendi ve yukarıdaki gibi santrifüj 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.

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 (ultraviyole ışık altında) görüntülenerek 28S ve 18S keskin ribozomal RNA bantlarının elde edildiği ve herhangi bir yıkımın olmadığı RNA’lar cDNA işleminde kullanıldı. Örneklerin RNA miktarları spektrofotometrede 260 nm UV spektrumda okundu. cDNA yapımında ortama 1 µg toplam RNA eklendi.

1x TBE (Tris Borat EDTA) Çözeltisinin Hazırlanışı

- 1) 0.4 M Tris baz
- 2) 2 M Borik asit
- 3) 20 mM EDTA

1000 ml 5X TBE çözeltisi hazırlamak için

- 54 gr Tris baz
- 27.5 gr Borik Asit
- 20 ml 0.5 M EDTA çözeltisi

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

cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezi için Invitrogen firmasının ürettiği SuperScript III ters transkriptaz enzim kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır. Kısaca, 100 µl'lik PZR tüpüne 1 µg toplam RNA, 1 µl primer (4 pmol gen spesifik primer veya 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 -30°C de analize kadar saklandı.

Araştırmada rat GAPDH, GSTπ gen ifadelerinin analizi için Tablo 3'de listesi verilen primerler kullanıldı.

Tablo 3: Primer dizilimleri

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

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

95°C, denaturasyon 30 saniye 95°C, bağlanma 55°C'de 40 saniye ve polimerizasyon 72°C 40 saniye olarak ve döngü sayısı 50 olarak kullanıldı.

3.2.4. Redükte Glutasyon (GSH) Analizi

GSH analizi, Ellman'ın tarif ettiği metoda göre yapıldı (133). Metodun GSH ölçüm prensibi; analiz tüpünde bulunan glutasyonun 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi ve oluşan bu rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda okunarak redükte glutasyon miktarının tayin edilmesi şeklindedir.

3.2.4.1. Numunelerin Hazırlanması

Gruplardan alınan karaciğer numuneleri tartıldıktan sonra üzerlerine %10'luk (w/v) homojenat oluşturacak şekilde distile su ilave edildi ve buz içinde 1–2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi. Doku homojenatları 5000 rpm'de, 4°C'de, 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta TCA çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve 3000 rpm'de 4°C'de 10 dakika tekrar santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Açık renkli süpernatant numuneleri GSH analizinde kullanıldı.

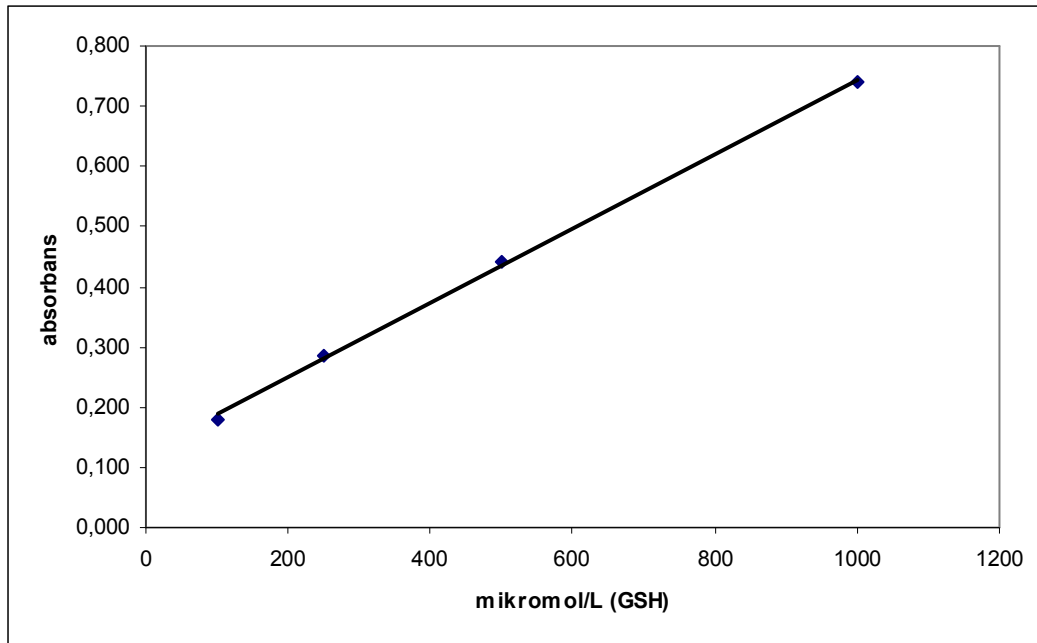
3.2.4.2. Kullanılan Reaktifler

- 1) %10'luk triklor asetik asit (TCA)
- 2) 0.3 M disodyum hidrojen fosfat
- 3) %0.4'lük 5,5'-Ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)
- 4) %1'lik trisodyum sitrat (DTNB'yi çözmek için)
- 5) Standartlar için redükte glutasyon (kalibrasyon grafiği çiziminde kullanılmak üzere 125, 250, 500, 1000 mikromolarlık GSH standartı hazırlandı)

3.2.4.3. GSH Düzeylerinin Tayini

	Kör	Standart	Numune
KC Doku Süpernatantı	-----	-----	250 µL
Standart	-----	250 µL	-----
0.3 M Na ₂ HPO ₄	2 mL	2 mL	2 mL
%0.4'lük DTNB	250 µL	250 µL	250 µL
Distile su	250 µL	-----	-----

Yukarıdaki tabloda belirtilen çalışma şemasına göre deney tüpleri hazırlandı, çözeltilerin karışması için tüpler vortekslendi. Spektrofotometre kör ile 410 nm'de sıfır absorbansa ayarlandı. Oda ısısında 5 dakika bekletilen numunelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve glutatyon standart grafiğinden yararlanılarak µmol/L cinsinden GSH düzeyleri bulundu (Şekil 12). Sonuçlar nmol/g yaş doku olarak ifade edilmiştir.



Şekil 12: GSH Standart Grafiği

3.2.5. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri (TBARS) Analizi

İki molekül tiyobarbitürik asidin (TBA) bir molekül TBARS ile asit ortamda reaksiyona girerek pembe renkli ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan bu bileşik 535 nm’de maksimum absorbanı vermektedir (134).

3.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması

Gruplardan alınan karaciğer numuneleri tartıldıktan sonra üzerlerine %10’luk (w/v) homojenat oluşturacak şekilde %1.5’lik KCl çözeltisi ilave edildi ve buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar MDA analizinde kullanıldı.

3.2.5.2. Kullanılan Reaktifler

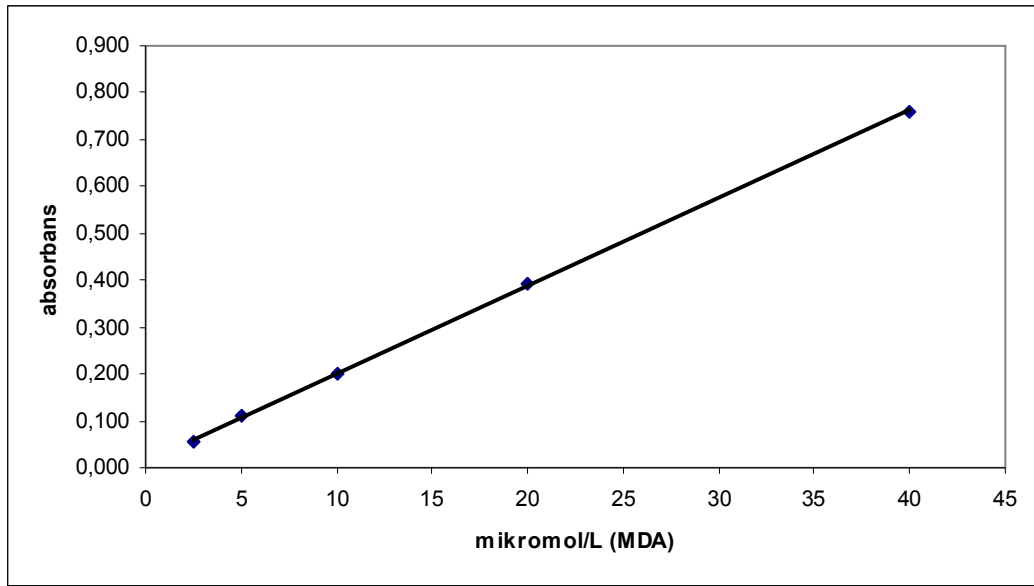
- 1) %1.5’lik KCl
- 2) %1’lik fosforik asit
- 3) %0.6’lık tiyobarbitürik asit (TBA)
- 4) n-butanol (konsantre)
- 5) Standartlar için 1,1',3,3'-tetraetoksipropan (kalibrasyon grafiği çiziminde kullanılmak üzere 2.5, 5, 10, 20, 40 mikromolarlık standartlar hazırlandı)

3.2.5.3. TBARS Düzeylerinin Tayini

	Kör	Standart	Numune
%10'luk KC Doku Homojenatı	-----	-----	250 µL
Standart	-----	250 µL	-----
%1’lik Fosforik Asit	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
%0.6’lık TBA	500 µL	500 µL	500 µL
Etanol	250 µL	-----	-----
Vortekslenip 45 dakika kaynar su banyosunda (95°C’de) inkubasyon ve soğutma			
n-butanol	2 mL	2mL	2 mL

Hazırlanan çözeltiler yukarıdaki çalışma tablosunda belirtildiği şekilde vida kapaklı cam tüplere eklendi, çözeltilerin karışması için 5 dakika boyunca her bir tüp kuvvetlice vortekslendi. 5 dakikanın sonunda numuneler 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant (n-butanol fazı) direkt olarak kuartz küvete alındı.

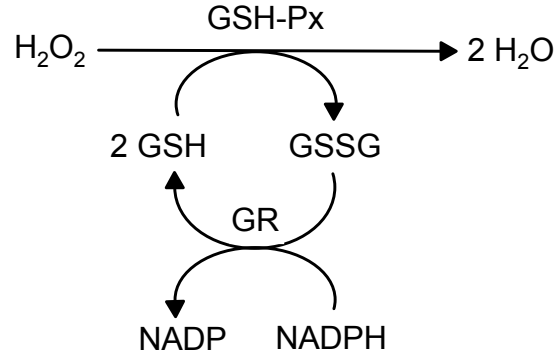
Oluşan pembe renkli süpernatantların absorbanları spektrofotometrede 535 nm'de okundu ve 1,1',3,3'-tetraetoksipropan hazırlanan standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{mol/L}$ cinsinden TBARS düzeyleri bulundu (Şekil 13). Sonuçlar nmol/g yaş doku olarak ifade edilmiştir.



Şekil 13: TBARS standart grafiği

3.2.6. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin Analizi

GSH-Px redükte glutatyonu kullanarak hidrojen peroksidin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonunda redükte glutatyon okside forma dönüşür. Bir diğer hidrojen peroksidin suya katalizi için, okside glutatyonun redükte forma dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm, ortamda NADPH ve glutatyon redüktaz varlığında gerçekleştirilir. Bu durumda NADPH okside NADP'ye çevrilirken, okside glutatyon da redükte forma dönüşür (Şekil 14). NADPH 340 nm'de maksimum absorban gösteren bir maddedir. Glutatyon redüktaz katalizi devam ettikçe 340 nm'de absorban azalması meydana gelir. Çünkü NADPH okside forma dönüşmektedir. Absorbanstaki bu azalma ortamdaki glutatyon peroksidaz aktivitesi ile doğru orantılıdır.



GR: Glutasyon Redüktaz, GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

Şekil 14: GSH-Px reaksiyonu

3.2.6.1. Numunelerin Hazırlanması

Karaciğer 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°C'de, 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, GSH-Px aktivite düzeylerinin tayininde kullanıldı.

3.2.6.2. Kullanılan Reaktifler

- 1) pH 7.0; 5 mM EDTA'lı 50 mM, fosfat tamponu
- 2) 150 mM GSH (redükte glutasyon)
- 3) 1 mM Sodyum
- 4) 3 mM NADPH
- 5) GSH Redüktaz
- 6) 3.2 M amonyum sulfat
- 7) 2 mM hidrojen peroksit çözeltisi

3.2.6.3. GSH-Px Aktivite Düzeylerinin Tayini

Reaktiflerin numune sayısı kadarlık miktarları (doku homojenatı hariç), önceden aşağıdaki tabloda belirtilen oranlarda olacak şekilde (örneğin 40 numune için reaktiflerin 40 katı miktarında ilave edilip) karıştırıldı. Daha sonra doku homojenatları ilave edildi.

Tüpler iyice karıştırıldı ve 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede ilk önce alet distile suya karşı sıfırlandı, daha sonra numuneler kuvartz küvete alındı, 0.100 ml 2 mM hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı, küvet alt üst edilip ve derhal 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede 3 dakika boyunca meydana gelen absorbans azalışı takip edildi. 3 dakika sonunda ölçülen absorbans farkı 3'e bölünerek dakika başına düşen absorbans değişimi (ΔA) tespit edildi.

	Numune tüpü (ml)
EDTA'lı Fosfat tamponu	2.650
150 mM Redükte GSH	0.100
3 mM NADPH	0.100
1 İÜ GSH Redüktaz	0.010
1M NaN ₃	0.010
KC doku homojenatı	0.020

3.2.6.4. GSH-Px Aktivite Düzeylerinin Hesaplanması

Aşağıdaki formül ile hesaplanan GSH-Px'in aktivite düzeyleri (Ü/L) yine aşağıda verilen diğer bir formülle spesifik aktiviteye (U/g protein) çevrildi. Doku süpernatant numunelerinin protein düzeyleri, sıgır serum albümin'inin 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'In ekstinction sabiti (6.22×10^3 L. mol⁻¹ .cm⁻¹)

V_t = Total reaksiyon hacmi (ml)

V_s = Total reaksiyon içindeki numune hacmi (ml)

L = Küvet genişliği (1 cm)

$\Delta A / t$ = Dakikadaki absorbans değişimi

10^6 = mol'ü mikromol'e çevirim sabiti

$\times 10$ = sulandırma faktörü

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

3.2.7. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Analizi

Glutasyon S-transferaz, elektrofilik bileşiklerin GSH'nin -SH grubu ile tepkimesini katalizleyerek bu bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar. GST aktivitesi, Habig ve ark.'nın tarif ettiği metoda göre tayin edilmiştir (135). GST aktive düzeyleri, 340 nm dalga boyunda 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile GSH'nin konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbans artışlarının takip edilmesi ile ölçülür.

Enzim aktivitesi 340 nm'de 25°C'de GSH ve CDNB kullanılarak dakikada oluşan S-2,4-dinitrofenilglutasyonun 1 µmol'unu katalizleyen enzim miktarının ölçülmesiyle belirlenir.



3.2.7.1. Numunelerin Hazırlanması

Karaciğer numunelerine %10'luk homojenat oluşacak şekilde fosfat tamponu ilave edildi ve buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi. Doku homojenatları 5000 rpm'de, 4°C'de, 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, GST aktivite düzeylerinin tayininde kullanıldı.

3.2.7.2. Kullanılan Reaktifler

- 1) 100 mM, pH 6.5 Fosfat Tamponu
- 2) 23 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)
- 3) 23 mM Redükte Glutasyon, Fosfat tamponunda çözülerek hazırlanır.

3.2.7.3. GST Aktivite Düzeylerinin Tayini

Glutasyon *S*-transferaz aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve numune olmak üzere farklı okuma küvetine aşağıdaki şekilde alındı.

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu	2.1 mL	2.15 mL
CDNB	25 µl	25 µl
GSH	25 µl	25 µl
Okuma küvetlerine alınan çözeltiler iyice karıştırıldı		
Süpernatant (GST kaynağı)	50 µl	-----
Küvet 2–3 defa alt-üst edildi ve 340 nm'de (UV'de) okundu		

Numune küvetine GST kaynağı olan süpernatant numunesinden 25 µl ilave edildi, küvet 1–2 defa alt üst edilerek karıştırıldı ve 340 nm'de 3 dk boyunca meydana gelen absorbans artışları takip edildi. 3 dk sonunda ölçülen absorbans farkı 3'e bölünerek dakika başına düşen absorbans değişimi tespit edildi.

3.2.7.4. GST aktivite düzeylerinin Hesaplanması

Aşağıdaki formül ile hesaplanan GST'nin aktivite düzeyleri (U/L) yine aşağıda verilen diğer bir formülle spesifik aktiviteye (U/g protein) çevrildi (136). Doku süpernatant numunelerinin protein düzeyleri, sıgır serum albuminin 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 = CDNB'nin ekstinksiyon sabiti ($9.6 \times 10^3 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

V_t = Total reaksiyon hacmi (ml)

V_s = Total reaksiyon içindeki numune hacmi (ml)

L = Küvet genişliği (1 cm)

$\Delta A / t =$ Dakikadaki absorbands değışimi

$10^6 =$ mol'ü mikromol'e çevirim sabiti

$\times 10 =$ sulandırma faktörü

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

3.2.8. Doku Protein Düzeylerinin Analizi

Doku protein düzeyleri Biüret metodu ile analiz edildi (137). 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 absorbands verir.

Biüret bileşigi yapı olarak peptid bağına benzer bir maddedir ve Cu^{2+} iyonları ile proteinlerin verdiği reaksiyona benzer bir renkli kompleks oluşturur. Bu nedenle kullanılan yöntem Biüret Yöntemi, Cu^{2+} içeren çözeltilere de Biüret Ayırıcı adı verilir.

3.2.8.1. Kullanılan Reaktifler

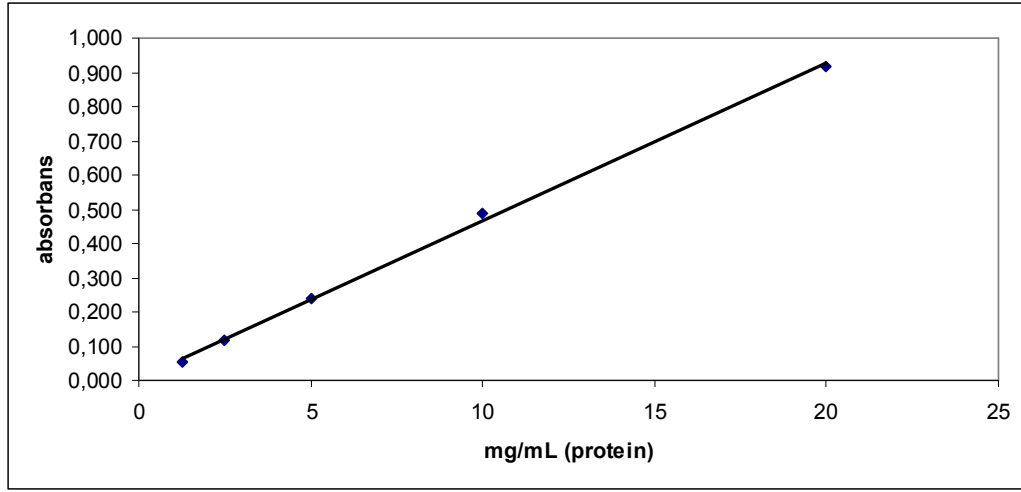
- 1) Bakır sülfat
- 2) Na-K tartarat
- 3) Sodyum hidroksit
- 4) Standartlar için sığır serum albumini (BSA) (kalibrasyon grafiğı çiziminde kullanılmak üzere 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL'lik standartlar hazırlandı)

3.2.8.2. Protein Düzeylerinin Tayini

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

	Kör	Standart	Numune
Distile su	0.5 mL	----	----
Doku süpernatantı	----	----	0.5 mL
Standart	----	0.5 mL	----
Biüret Ayıracı	2 mL	2 mL	2 mL

Tüpler iyice vortekslenip, 30 dakika oda ısısında bekletildi, oluşan mor renkli kompleks 540 nm’de spektrofotometre kör ile sıfırlanarak okundu. Sonuçlar BSA ile hazırlanan standart grafiğinden yararlanılarak mg/mL (g/L) cinsinden ifade edildi (Şekil 15).



Şekil 15: BSA standart grafiği

3.2.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 for Windows paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk testiyle değerlendirildi. Normal dağılım gösteren veriler ortalama±standart sapma (mean±SD) olarak, normal dağılım göstermeyen veriler ise ortanca (min-maks) şeklinde ifade edildi. Normal dağılım gösteren veriler için gruplar arasındaki karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) yapıldı, anlamlılık durumunda post hoc testlerden Tukey testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen verilerin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı, testin anlamlılık durumunda Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

Shapiro Wilk testi sonucu TBARS, GSH-Px, GST verilerinin normal dağılım gösterdiği ($p<0.05$), GSH verilerinin ise normal dağılım göstermediği ($p>0.05$) tespit edildi. TBARS, GSH-Px, GST verilerinin temel karakteristikleri ortalama±standart sapma şeklinde (Tablo 4), GSH verilerinin temel karakteristikleri ise ortanca (min-maks) şeklinde ifade edildi (Tablo 5).

Varyans analizi ile elde edilen sonuçlar her bir parametre için ayrı ayrı grafikler şeklinde gösterildi. TBARS için Tukey testi; GSH-Px için Tamhane testi, GSH için Kruskall Wallis testi uygulandı. $P<0.05$ değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çoklu karşılaştırmalar sonucu GSH, MDA, GSH-Px analizlerinde bazı gruplar arasında anlamlı fark bulunurken, GST analizi sonuçlarında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Tablo 4: TBARS, GSH-Px, GST için temel karakteristikler

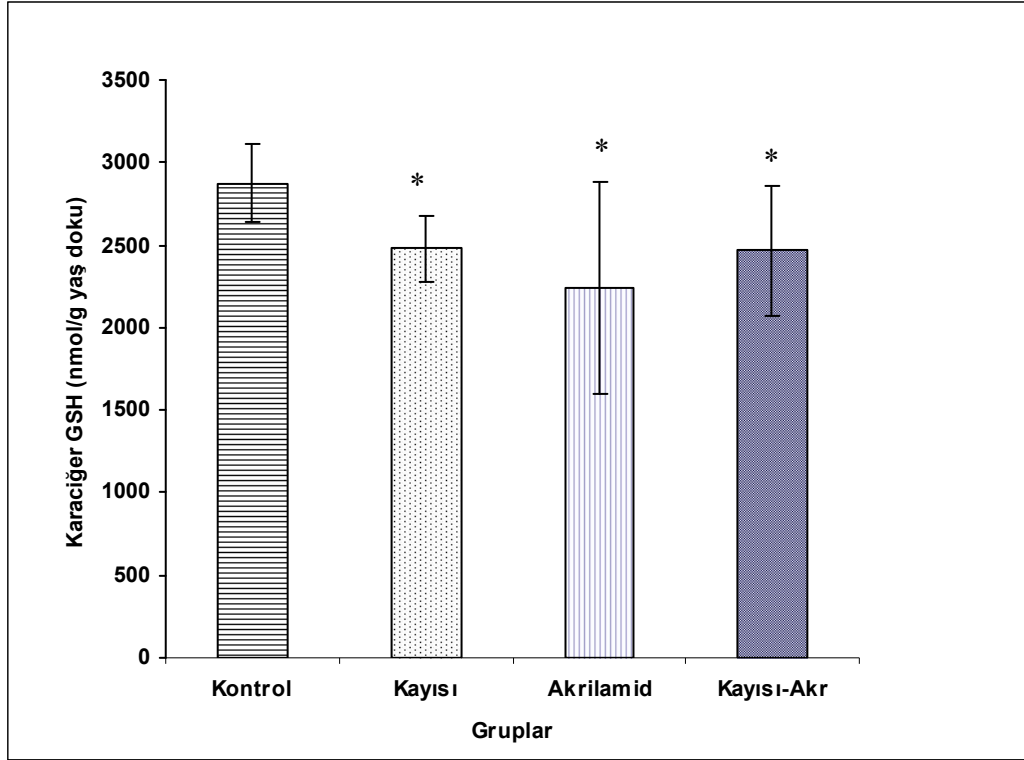
	Grup	n	Ortalama±SD
TBARS	Kont.	8	638±63
	Kayısı	9	730±92
	ACR	9	594±79
	Kayısı-ACR	7	699±55
	Toplam	33	664±90
GSH-Px	Kont.	10	531±24
	Kayısı	10	501±55
	ACR	10	425±47
	Kayısı-ACR	10	454±62
	Toplam	40	478±63
GST	Kont.	10	7.7±0.7
	Kayısı	10	7.7±0.5
	ACR	9	8.4±0.8
	Kayısı-ACR	9	7.8±0.8
	Toplam	38	7.9±0.7

Tablo 5: GSH için temel karakteristikler

	Grup	n	Median; (min-max)
GSH	Kont.	10	2872; (2403–3301)
	Kayısı	10	2433; (2167–2788)
	ACR	10	2513; (1058–2852)
	Kayısı-ACR	10	2545; (1590–2968)
	Total	40	2602; (1058–3301)

4.1. Grupların Karaciğer GSH Düzeyleri

Kayısı, Akrilamid ve Kayısı-Akr verilen grupların GSH düzeyleri kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 16).

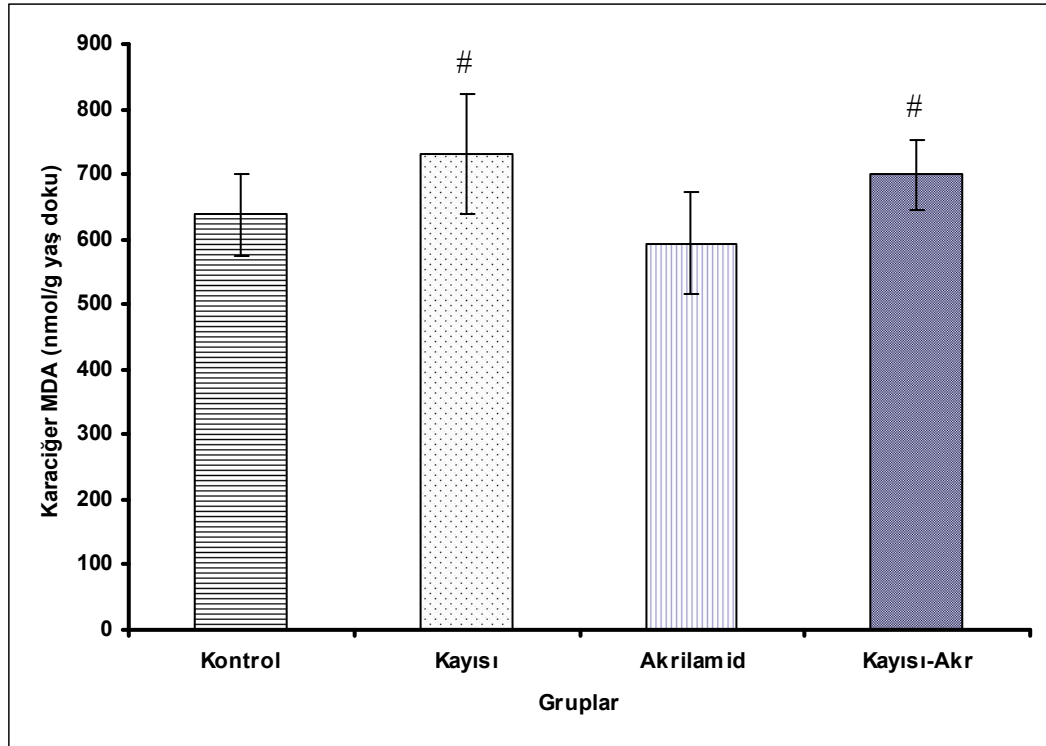


Şekil 16: Grupların karaciğer GSH düzeyleri:

*; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grup ortalamaları arasında $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark mevcut.

4.2. Grupların Karaciğer TBARS Düzeyleri

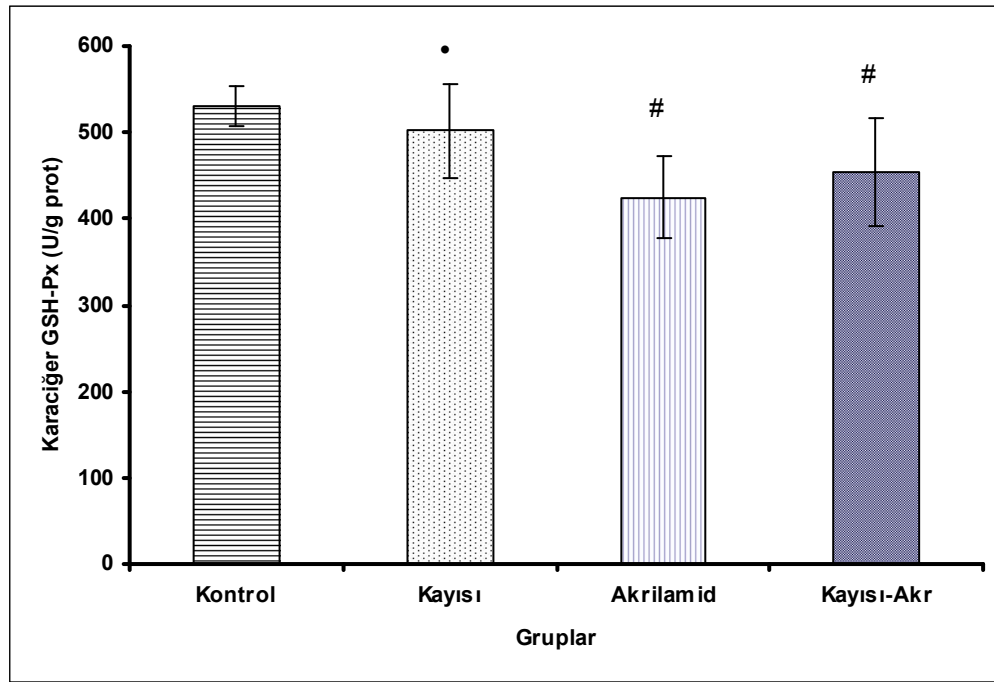
Kayıslı ve Kayıslı-Acr verilen grupların TBARS düzeyleri Akrilamid verilen gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede ($p<0.05$) yüksek bulundu (Şekil 17). Kontrol grubuna göre aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi.



Şekil 17: Grupların karaciğer TBARS (MDA) düzeyleri:
#; akrilamid grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde anlamlı fark mevcut.

4.3. Grupların Karaciğer GSH-Px Düzeyleri

Akrilamid ve kayısı-Acr verilen grupların karaciğer GSH-Px düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede ($p<0.05$) düşük bulundu. Kayısı verilen grubun GSH-Px düzeyi ise akrilamid verilen gruba göre önemli derecede ($p<0.05$) yüksek bulundu (Şekil 18).

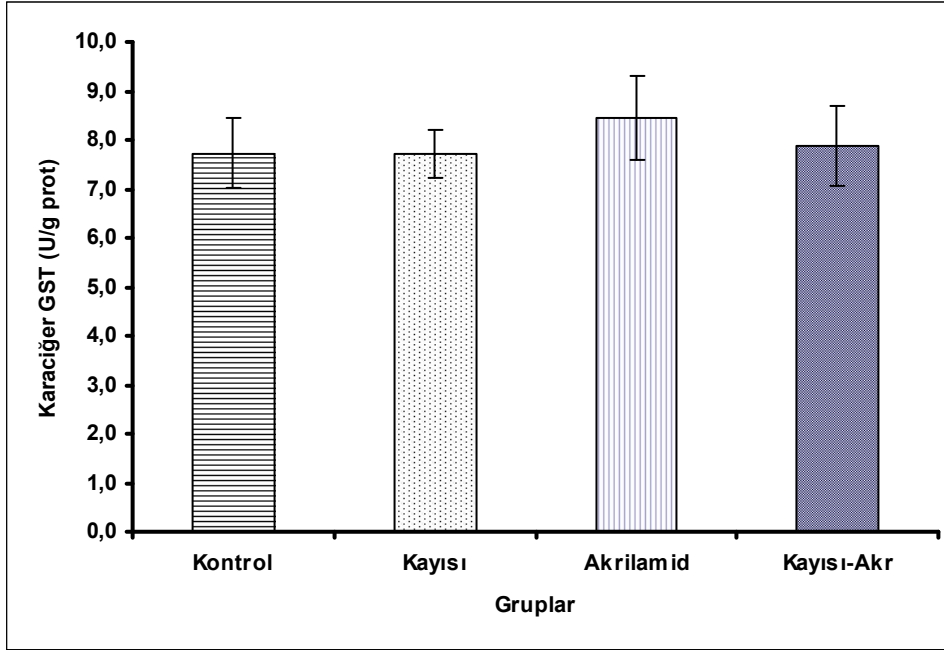


Şekil 18: Grupların karaciğer GSH-Px düzeyleri

•; akrilamid grubu ile karşılaştırıldığında, #; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı fark mevcut.

4.4. Grupların Karaciğer GST Düzeyleri

Grupların GST aktivite düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 19).

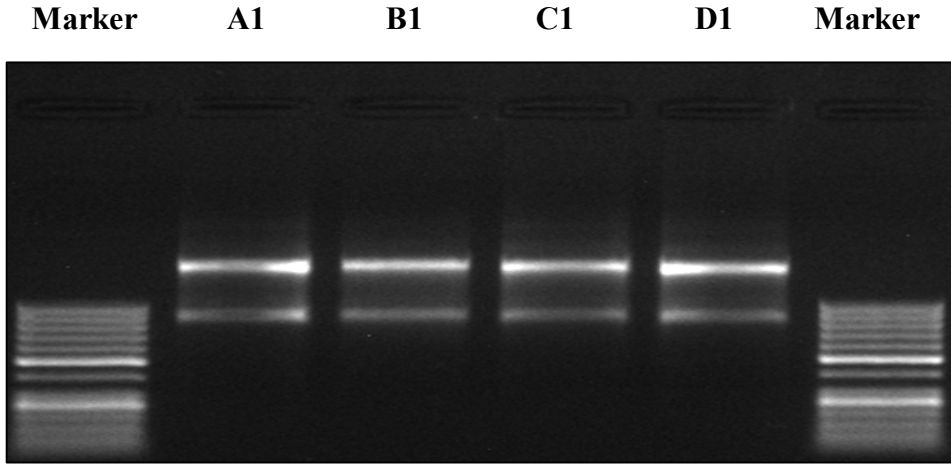


Şekil 19: Grupların karaciğer GST düzeyleri
Gruplar arasında anlamlı bir fark mevcut değil.

4.5. Grupların Karaciğer GST-Pi Gen Ekspresyon Düzeyleri

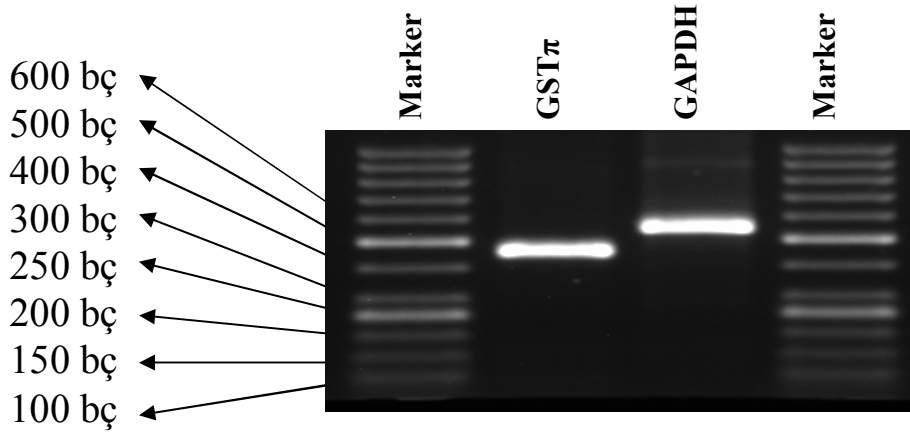
PZR sonuçları

RNA'lar saflaştırıldıktan sonra %1 lik agaroz jele yüklenerek elektroforez yapıldıktan sonra incelendiler. Şekil 20'de her gruptan bir tane seçilen saflaştırılmış RNA'ların %1 agaroz jelde yürütülmüş resmi görülmektedir. Örneklerden saflaştırılan RNA'larda herhangi bir yıkılım yoktu ve iki ribozomal bant büyük saflıkta elde edildi.



Şekil 20: Qiagen RNAeasy saflaştırma kiti ile karaciğer örneklerinden saflaştırılan toplam RNA örnekleri %1 agaroz jelde (A1; kontrol grubundan 1. rat, B1; kayısı grubundan 1. rat, C1; akrilamid grubundan 1. rat, D1; Kayısı-akr grubundan 1. rattan elde edilen RNA örnekleri)

GAPDH ve GST- π 'lerin cDNA'larının, gerçek zamanlı PZR'de çoğaltılarak elde edilen DNA'ları %1'lik agaroz jele yüklendi. Bu örneklerin PZR sonuçlarının tek ve istenilen boyda bir bant oluşturduğu elde edilen ürünlerin DNA jeline koşturulmasıyla görülmüştür (Şekil 21).



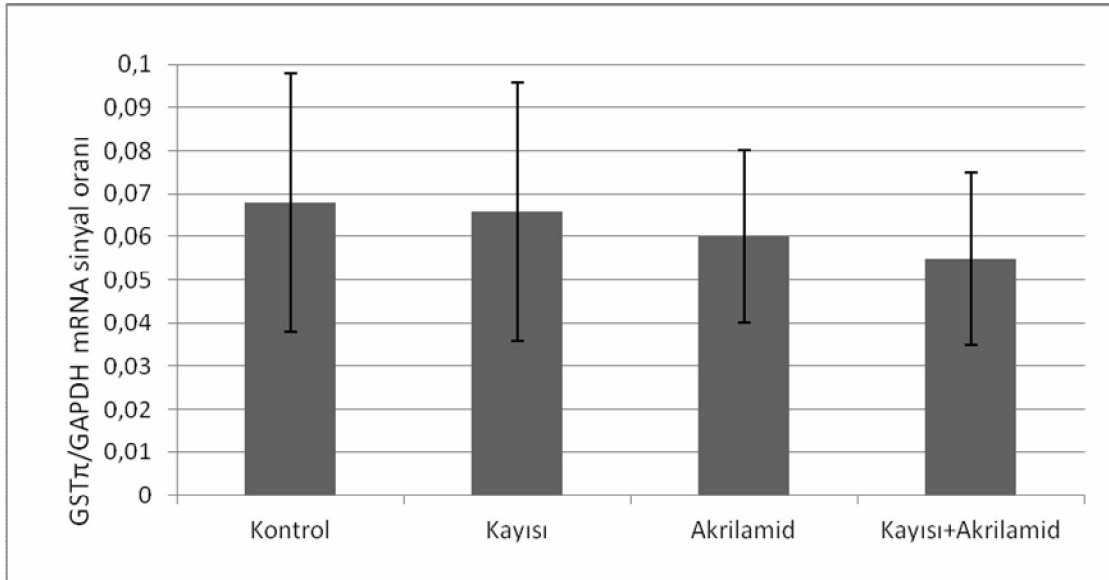
Şekil 21: GAPDH ve GST π 'lerin cDNA'larının gerçek zamanlı PZR deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi.

Elde edilen DNA %1 Agaroz jeline yüklendi. DNA ürünlerinin büyüklükleri tablo 3'de verilmiştir. Kullanılan DNA Markeri 50 bp DNA Marker'dir (Fermentas).

Akrilamid, kayısı, kayısı-akrilamid uygulanan ratların karaciğer GST π mRNAları saflaştırılmış ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar için State-of-the-art “gerçek zamanlı PZR” kullanılmıştır. Şekil 22’de GAPDH ve cDNA örneklerinin “gerçek zamanlı PZR” ile yapılan analiz sonuçları aynı grafikte görülmektedir. mRNA analizi yapılması kararlaştırılan bütün enzim örnekleri için “gerçek zamanlı PZR” uygulanmıştır. Uygulama gruplarının mRNA seviyelerinin, GAPDH mRNA seviyelerine oranlanması sonucunda (Tablo 6), GST π mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Tablo 6: Gruplarda ölçülen karaciğer GST π /GAPDH mRNA seviyelerinin oranı.

Gruplar	GST π /GAPDH ortalama \pm standart sapma
Kontrol	0.068 \pm 0.03
Kayısı	0.066 \pm 0.03
Akrilamid	0.060 \pm 0.02
Kayısı+Akrilamid	0.055 \pm 0.02



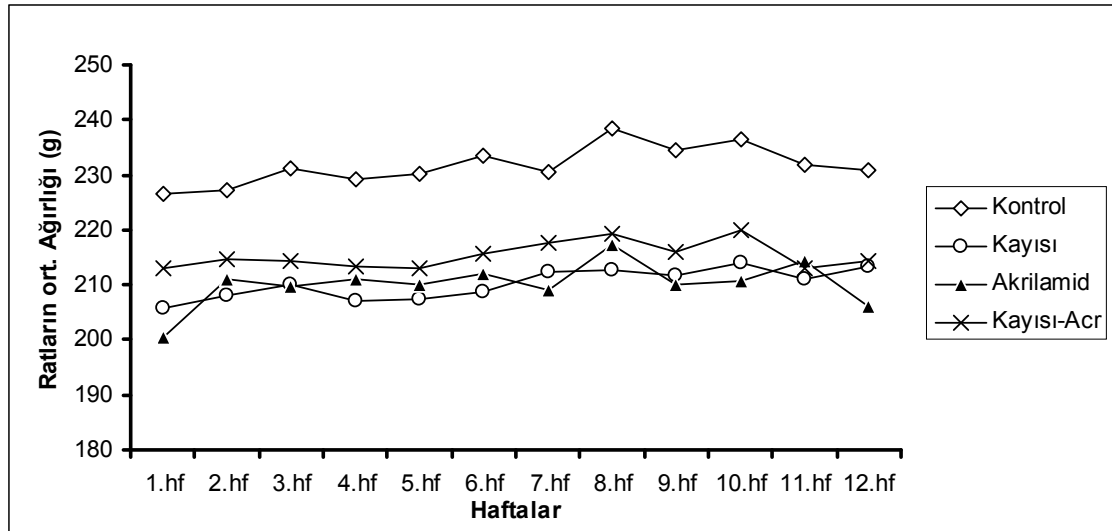
Şekil 22: Gruplardaki karaciğer GST π /GAPDH mRNA seviyelerinin oranı. Kontrol ve uygulama grupları arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir.

4.6. Rat Ağırlıkları Grup Ortalamalarının Haftalık Değişimi

Her bir gruptaki ratlar 12 hafta boyunca haftalık olarak tartıldı. Tartım sonuçları değerlendirildiğinde, 12 haftalık süre sonunda ortalama ağırlıklarındaki değişim bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p<0.05$) (Tablo 7). Şekil 23’de ratların haftalık ağırlık değişimleri grafik olarak verilmiştir.

Tablo 7: Ratların haftalık ağırlık ortalamaları

Grup	1.hf	2.hf	3.hf	4.hf	5.hf	6.hf	7.hf	8.hf	9.hf	10.hf	11.hf	12.hf
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-Acr	213	215	215	213	213	216	218	219	216	220	213	214



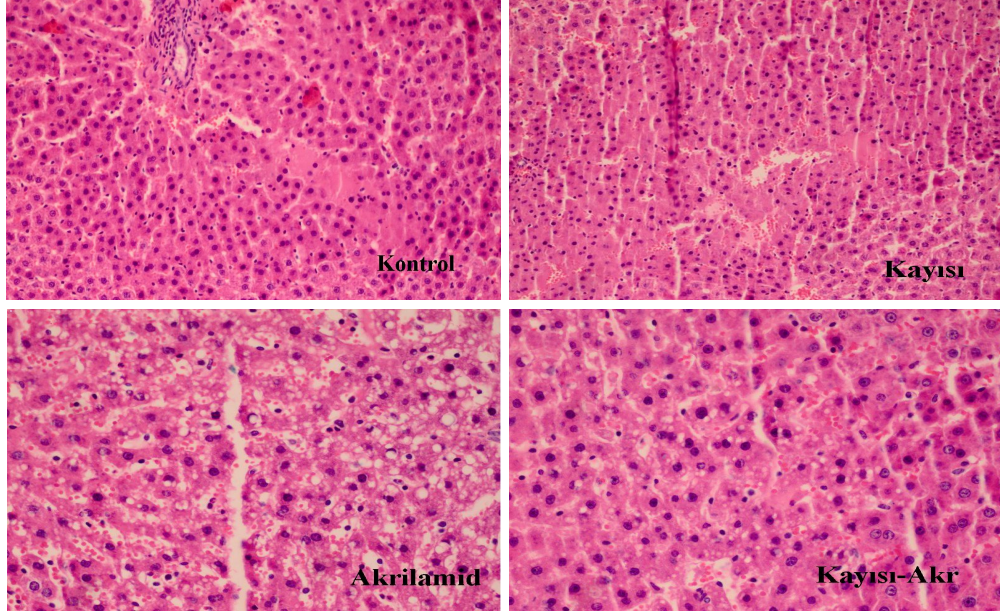
Şekil 23: Ratların haftalık ağırlık değişimleri

4.7. Grupların Karaciğer Histopatoloji Sonuçları

Grupların karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendi (Şekil 24). Dokular intersellüler ödem, yağlı değişiklik ve nekroz açısından değerlendirildi (Tablo 8). Bu özellikler açısından bakıldığında gruplar arasında histopatolojik olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 8: Grupların karaciğer histopatoloji sonuçları

	İnt. Ödem	Yağ. Değ	Nekroz
Kontrol	%60	%0	%0
Kayısı	%60	%0	%0
Akrilamid	%80	%0	%0
Kayısı-Acr	%60	%30	%10



Şekil 24: Grupların Karaciğer Histopatoloji Sonuçları

Kontrol grubu: İntersellüler ödem (H&E-x200), Kayısı grubu: İntersellüler ödem (H&Ex200), Akrilamid grubu: İntersellüler ödem (H&Ex400), Kayısı-Akr grubu: İntersellüler ödem ve yağlı değişiklikler (H&Ex400)

5. TARTIŞMA

Besinlerin doğal yapısında bulunmayan akrilamid, karbonhidrat ve protein içerikli gıdaların yüksek sıcaklıklarda (120°C'nin üzerinde kızartma ve fırında) pişirilmesi sonucu oluşan ve insan sağlığı için zararlı olan kimyasal bir bileşiktir. Gıdalarda bulunan asparajin, akrilamid oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Asparajin gıdaların renk, lezzet ve aromanın oluşumunu sağlayan bir amino asittir. Gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi sırasında asparajin, gıdaların şeker içeriği ile etkileşir ve zincirleme reaksiyonlar dizisi olarak bilinen Maillard reaksiyonu sonucunda akrilamid oluşumuna neden olur. Bu mekanizmanın, gıda kaynaklı akrilamid oluşum mekanizmasında önemli bir rolünün bulunduğu bildirilmiştir (138). Meyve ve sebzelerin çiğ veya haşlanarak tüketildiği durumlarda akrilamid oluşumu açısından bir riskin bulunmadığı ortaya konulmuştur (139).

Akrilamidin zararlı etkilerini incelemek üzere çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapılmış ve akrilamidle ilgili olarak önemli risk değerlendirmeleri ortaya konulmuştur. Bu araştırmalarda akrilamidin özellikle nörotoksik ve karsinojenik etkilerinin incelenmesi ön plana çıkmıştır. 1990–2002 yılları arasında yapılmış olan bir çalışmanın sonuçlarının incelenerek akrilamidin toksik etkilerine yönelik risk değerlendirmelerinin özetlendiği retrospektif bir çalışmada (140), akrilamidin deney hayvanları ve insanlar için karsinojenik etkili bir madde olduğu ortaya konulmuş ve bu durum birçok ülkenin resmi sağlık ve gıda kuruluşları tarafından da teyit edilmiştir.

Birçok ülkede, yetişkinlerin günlük akrilamid alım miktarları üzerine yapılan incelemelerde, bireylerin günde 0.3–5.1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ düzeyinde akrilamid aldığı ve bu değerlerin çocuklarda iki-üç kat fazla olduğu bildirilmiştir. Günlük olarak gıdalarla vücuda alınan akrilamidin başlıca kaynaklarının patates kızartmaları (%16–30), patates

cipsleri (%6–46), kahve (%13–39), hamur işleri ve bisküviler (%10–20) ve ekmekek (%10–30) olduğu tespit edilmiştir (26); diğer gıda gruplarının katkısı %10 dolayındadır. Ülkeler arasındaki diyet özelliklerinin farklı olması, akrilamid profilinde de önemli farklara yol açacağından, yapılan çalışmalarda bu durumun göz önünde tutulması gerekmektedir.

Akrilamidin ortalama günlük alım miktarları konusunda farklı kuruluşlar tarafından farklı değerler yayımlanmıştır. WHO, akrilamidin günlük alım miktarını 0.3–0.8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ aralığında, FDA ise 0.4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ olarak belirlemiştir. FDA verilerine göre, akrilamidin kabul edilebilir günlük alım dozunun 0.2 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ olduğu saptanmıştır (141,142).

Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (EPA-United States Environmental Protection Agency), bireylerin akrilamid alım dozuna karşılık, kansere yakalanma riskleri üzerine yaptığı değerlendirmede, kansere yakalanma olasılığını, hayat boyu 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ dozunda akrilamid alan kişiler için %0.45, 0.02 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ dozunda alanlar için ise %0.01 olarak belirlemiştir. Bu olasılık WHO tarafından 0.14 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{g}^{-1}$ için %0.01 (143), Norveç Gıda Kontrol Otoritesi tarafından 0.08 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{gün}^{-1}$ için %0.01 olarak belirlemiştir (144).

Tüm bu veriler, akrilamidin insanlar için nörotoksik ve karsinojenik bir tehlike olduğu konusunda uluslararası otoritelerin fikir birliği içinde olduğunu göstermektedir. Ancak akrilamidin insanlar üzerinde karsinojenik etkisinin sayısal olarak ifadesi için yeterli düzeyde epidemiyolojik verinin bulunmaması, kesin ve güvenilir bir değerlendirme yapılmasını ve net bir sonuca ulaşılmasını olanaksız hale getirmektedir (26). Risk değerlendirme komiteleri, akrilamid riskinin devam etmekte olan karsinojenite ve uzun dönemli nörotoksisite çalışmaları ışığında tekrar değerlendirilmesini ve gıdalarda akrilamid oluşumunun azaltılmasına yönelik çalışmaların devam ettirilmesini tavsiye etmektedirler. Bununla birlikte Amerika birleşik devletlerinin bazı eyaletlerindeki tüketici dernekleri, akrilamid içeren gıdaların üzerine “kanserojen etkili akrilamid maddesi içerir” ifadesinin yazılmasının kanuni bir zorunluluk haline getirilmesi için yoğun faaliyetler yürütmektedirler.

Türkiye açısından değerlendirildiğinde ise resmi makamlar tarafından bu konuya yönelik yapılmış herhangi bir girişime rastlanmamıştır. Bu, ülkemizde yaşayan bireylere yönelik bir risk değerlendirmesinin henüz yapılmadığı anlamına gelmektedir. TÜBİTAK bünyesinde akrilamid analizlerine yönelik çalışmalar yapılmakla birlikte bilindiği kadarıyla akrilamid kaynaklı risklere yönelik bir rapor yayımlanmamıştır.

Vücutta fizyolojik şartlarda sürekli bir serbest radikal oluşumu ve bu zararlı radikallerin detoksifiye edildiği antioksidan etkili maddelerin etkileşimi söz konusudur. Bu antioksidan etkili yapılar; antioksidan etkili enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon S-transferaz, glutatyon peroksidaz), vitaminler (vitamin A, E ve C) ve diğer organik ve inorganik moleküllerden (glutatyon, melatonin, selenyum) oluşmaktadır. Fizyolojik şartlarda, bu serbest radikallerle antioksidanlar arasında bir denge söz konusudur ve serbest radikaller sürekli zararsız hale getirilmektedir. Oksidanların üretimi ve katabolizması arasındaki hassas denge biyolojik fonksiyonların devamı için çok önemlidir. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması, organizma için hasarlayıcı olayların başlamasına neden olan oksidatif strese yol açmaktadır.

Biyolojik sistemler, normal oksidasyon ve mitokondrideki elektron transportu esnasında O_2^* , H_2O_2 ve $\cdot OH$ gibi reaktif oksijen türleri (ROT) oluştururlar. Bu bileşikler, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol alırlar (145). Organizma ise üretilen ROT'a karşılık süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi bir dizi koruyucu antioksidan enzimler ve glutatyon ile mücadele etmektedir (146,147).

Oksidatif stres, genel olarak oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizlik ile tanımlanır. Normal şartlar altında hücrenin antioksidan savunma mekanizmaları ROT'ları azaltarak oksidatif stresi kontrol altına alır. Hücrelerarası major antioksidan, redükte glutatyon (GSH)'dur. GSH, oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde indirgeyici güç olarak rol alır. Total GSH seviyesini muhafaza etmek için glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-R) ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi antioksidan enzimler koordinasyon halinde çalışmaktadırlar (148).

Akrilamidin oksidatif strese yol açıp açmadığının incelendiği daha önce yapılan deneysel hayvan çalışmalarında çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılığın, akrilamidin uygulama yolu ve dozunun farklı olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (28,56,149). Uzun süre düşük doz akrilamid uygulamasının (10 hafta süre ile içme suyu içinde 0.5–500 μg akrilamid/kg olmak üzere) sıçan karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonuna yol açtığı ve GSH konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (28). Buna karşılık, kısa süre yüksek subletal doz (5 gün süre ile ip olarak 50 mg/kg olmak üzere) akrilamid uygulamasının, karaciğer GSH konsantrasyonunda bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (149). Sıçan hücre kültürü çalışmalarında ise 10 mM akrilamid uygulanmasının hepatosit GSH konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (56).

Akrilamid, suda çözünlüğü yüksek olan bir ksenobiyotik olması nedeniyle, ağız yoluyla alındıktan hemen sonra hızlı bir şekilde tüm dokulara dağılım gösterir. Akrilamid, sindirim kanalı boyunca (özafagus, mide, ince ve kalın bağırsak) yeterli GST enzimi varlığında GSH ile konjuge edilerek akrilamid-glutasyon kompleks bileşiğine çevrilmekte ve sindirim kanalı dokularını akrilamidin zararlı etkilerinden korumaktadır. Gıdalarla ağızdan alınan akrilamidin bir kısmı sindirim kanalında bu şekilde etkisiz hale getirilmektedir. 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. ratları bir süre; α -tokoferol, β -karoten, likopen, flavonoid, limonen gibi antioksidan ve antikanserojen madde ilave edilmiş diyetle beslemişlerdir (150). Çalışma sonucunda, sindirim sistemi boyunca; özafagus, mide, ince ve kalın bağırsak dokularında GST aktivitesinin önemli derecede artığını gözlemlemişlerdir. Lieshout ve ark., bu sonuçları antioksidan ve antikanserojen etkili maddelerden 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 vücudu zararlı etkilerden koruyabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Bu araştırmanın sonuçları, gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan kişilerin, yoğun miktarda antioksidan ve antikanserojen madde içeren bu sebze ve meyveleri yeterince tüketmesinin akrilamid kaynaklı kanserojenik, mutajenik ve oksidatif stres kaynaklı etkileri engelleyebileceğini düşündürmektedir.

Ağız yoluyla alınan akrilamid büyük oranda bağırsaklardan emilip kana geçerek, karaciğer ve diğer dokulara hızlı bir şekilde dağılım gösterir. Akrilamid, yarılanma süresinin kısa olması nedeniyle kandan çok hızlı bir şekilde temizlenmektedir. Karaciğere gelen akrilamidin bir kısmı GST/GSH sistemiyle konjuge edilerek detoksifiye edilir, bir kısmı ise sitokrom P450 enzim sistemiyle okside edilerek glisidamide dönüştürülmektedir. Kanda değişikliğe uğramamış akrilamid oranı ise çok düşüktür (%0.5). Ayrıca kana geçen akrilamidin bir kısmının, kanda bulunan proteinler ile hemoglobine yüksek affinite göstermesi nedeniyle bu proteinlere bağlandığı tespit edilmiştir (151). Glisidamid, akrilamidin okside edilmiş formudur. Glisidamidin katabolizması iki enzimatik yolla meydana gelmekte ve glisidamidin etkisizleştirilerek vücut dışına atılması sağlanmaktadır. Birinci reaksiyonda glisidamid, epoksit 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 (152). Ancak hücrelerin glisidamidi detoksifiye etme kapasitelerinin büyük oranda yüksek GST aktivite ve GSH düzeylerine bağlı olduğunu açıkça bilinmektedir.

Chen Shuming ve ark. soya sosunun, ratlardaki akrilamid kaynaklı nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır (153). Bu çalışmada ratlara 8 hafta boyunca 10 mg/kg/gün dozunda akrilamid ve 0.5 ml soya sosu vermişlerdir. Sonuç olarak soya sosunun, beyin dokusunda akrilamid kaynaklı oksidatif strese karşı kısmen koruyucu olduğu öne sürülmektedir.

Puppel ve ark., hücre içi GSH seviyelerinin, akrilamid ve glisidamidin oluşturacağı genotoksisite açısından önemli bir faktör olup olmadığını araştırmışlardır. Hücre içinde yüksek düzeyde GSH bulunmasının, akrilamidin GSH'la konjugasyonunu artırarak glisidamid oluşumunu azalttığı ve böylece glisidamid kaynaklı genotoksik hasarların önemli derecede engellendiği ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra, GSH sentez inhibitörü verilen hayvanlara düşük düzeyde akrilamid uygulaması (1 mM) bile, hücre DNA'larında önemli derecede zincir kırıkları, baz kayması ve baz değişikliklerinin meydana gelmesine yol açmıştır. Bu sonuçlar, gerek akrilamid ve gerekse de glisidamid kaynaklı genotoksik etkilerin önlenmesinde hücre içi GSH düzeylerinin çok önemli olduğunu göstermektedir (154).

Naruszewicz ve ark., gönüllü insan deneklerine gıda ile 4 hafta süreyle 157 mg akrilamid uygulamışlardır. 4 hafta sonra alınan kan örneklerinden izole edilen monosit, lenfosit ve granüositlerde aşırı bir SOR üretiminin meydana geldiğini, hücre içi GSH seviyelerinin ciddi derecede azaldığını tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar, uzun süre gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan insanlarda akrilamidin; oksidatif stres, inflamasyon ve ateroskleroz gelişimini tetikleyebileceğini bildirmişlerdir (155).

Srivastava ve ark., ratlara tek ve tekrarlayan dozlarda akrilamid uyguladıkları çalışmalarında, akrilamidin beyin dokusunda GST aktivitesi ve GSH düzeylerini önemli derecede azalttığını, bunun sonucunda ise akrilamid kaynaklı oksidatif hasarların meydana geldiğini belirtmişlerdir (156).

Akrilamid kaynaklı oksidatif hasarı ortaya koymak amacıyla yapılan en ciddi deneysel çalışma, Yousef ve El-Demerdash tarafından yapılmıştır. Bu araştırma, erkek ratlara değişik dozlarda akrilamid uygulamasının farklı dokularda antioksidan enzim düzeyleri ve lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla ratların içme suyuna 0.5, 5, 25, 50, 250 ve 500 µg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde akrilamid ilave edilmiş ve 10 hafta süreyle uygulanmıştır. Akrilamid, plazma

protein seviyelerini ve kreatin kinaz aktivitelerini önemli oranda azaltırken, plazma fosfatazlarının seviyesini yükseltmiştir. Karaciğer ve testislerde transaminaz ve fosfataz aktiviteleri ciddi anlamda düşerken laktat dehidrojenaz seviyesinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Akrilamid uygulanan ratlarda, tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinde, glutatyon S-transferaz aktivite düzeylerinde ve plazma, karaciğer, testis, beyin ve böbrek dokusu süperoksit dismutaz seviyelerinde, uygulanan akrilamid dozuyla uyumlu bir artış, GSH düzeylerinde ise ciddi bir düşüş tespit edilmiştir. Bu araştırmanın verileri, akrilamidin toksik etkileri sebebiyle oksidatif strese ve enzim aktivitelerinde bir düzensizliğe sebep olduğunu ve bunun sonucunda da akrilamid kaynaklı doku hasarının meydana geldiği şeklinde yorumlanmıştır (28)

Yapılan diğer bir deneysel hayvan çalışmasında, ratlara 25 mg/kg dozda akrilamid uygulaması sonrası, karaciğer, ince ve kalın bağırsak dokularında MDA düzeylerinin ciddi derecede arttığı, GST aktivite ve GSH seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Yousef ve El-Demerdash'ın yaptığı çalışmada, akrilamid uygulaması sonrası dokularda GST aktivitesinin arttığının tespit edilmiş olması nedeniyle bu iki araştırma sonuçları arasında bir uyumsuzluk meydana gelmiştir. 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.

Akrilamid metabolizmasında en etkin yol GST enzimleri aracılığı ile olan GSH konjugasyonudur (157).

Glutatyon S-Transferazlar, endojen ve eksojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlayarak, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir (158,159).

Tabiatta glutatyon transferaz aktivitesi gösteren enzimler, sitozolik, mitokondriyal ve mikrozomal olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır (160). Memelilerde sitozolik GST'ler kimyasal özellikleri, immünolojik reaktiviteleri ve amino asit dizilimlerine göre sekiz gruba (alpha (α), mu (μ), pi (π), theta (θ), omega (Ω), kappa (κ), sigma (σ) ve zeta (ζ)) ayrılmaktadır (161).

Birçok ksenobiyotik GST aktivitesini farklı yollarla etkileyebilir. Bu etki indüksiyon, aktivasyon ya da inhibisyon şeklinde olabilir. Bu konudaki çalışmalar en çok karaciğer enzimleriyle yapılmıştır. Örneğin fenobarbital, polisiklik aromatik hidrokarbonlar GST'leri indüklediği (162), bazı herbisitler (tirifluran, molinat gibi) GST

aktivitesini arttırdığı (163), siprofibrat gibi bazı hipolipidemik ilaçların ise GST aktivitesini azalttığı belirtilmektedir (164).

Yousef ve ark. yaptıkları çalışmada akrilamid verilen ratların plazma, karaciğer, böbrek, testis ve beyin dokularında GST aktivitelerinin doz bağımlı olarak arttığı bulunmuştur (28).

Bizim yaptığımız araştırmada; akrilamid uygulaması karaciğer GST aktivitesini artırmış, akrilamidle beraber kayısı uygulaması ise GST aktivitesini düşürmüştür. Ancak GST aktivitesindeki bu değişiklikler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

Glutasyon peroksidaz sitozolde bulunan, 4 selenyum atomu içeren, tetramerik yapıda bir enzimdir. GSH-Px elektron kaynağı olarak glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunur. Enzim aktivitesindeki azalma, H₂O₂ düzeylerinin yükselmesine ve hücre hasarına yol açmaktadır. Ayrıca GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır (165,166).

Catalgol ve ark.'nın yaptıkları in vitro çalışmada, akrilamid kaynaklı oksidatif stresin insan eritrositlerine etkisi araştırılmış. Eritrosit solusyonları 0.10, 0.25, 0.50 ve 1.00 mM'lık akrilamid ile 37 derecede 1 saat muamele edilmiş. Sonuçta akrilamidin yüksek dozlarının GSH-Px aktivitesini azalttığını saptamışlardır. Bu durum akrilamidin oksidatif strese yol açarak antioksidan enzimlerde bozulmaya yol açtığını göstermektedir (167).

Zhu ve ark.'nın, akrilamidin siyatik sinir üzerine etkisini araştırdıkları başka bir çalışmada; ratlara 10 hafta süreyle haftada 3 kez intraperitoneal olarak 40 mg/kg'lık dozlarda akrilamid uygulanmıştır. Sonuçta siyatik sinir GSH-Px aktivitesinin arttığını Glutasyon redüktaz aktivitesinin azaldığını saptamışlardır. Bu sonucu da akrilamid kaynaklı nörotoksisite gelişiminin, lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini bozduğuna bağlamışlardır (168).

Bizim çalışmamızda akrilamid verilen grubun GSH-Px aktivite düzeylerinin kontrol ve kayısı verilen gruplara kıyasla daha düşük olduğu saptanmış ve diğer araştırmacıların bulgularını teyid etmiştir. Fakat kayısının GSH-Px aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bunun nedeni, kayısının içerdiği antioksidan maddelerin akrilamid kaynaklı serbest radikalleri detoksifiye ederek oksidatif stresi azalttığı, karaciğerde antioksidan kapasite açısından bir kompanzasyon sağladığı ve bu nedenle de karaciğerde GSH-Px aktivitesinin artışına ihtiyaç duyulmadığı şeklinde açıklanabilir.

Vücuda alınan toksik maddelerin sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri nedeniyle hücre hasarları meydana gelmektedir ve bu tip toksik madde kaynaklı ürünler vücudun kendi detoksifikasyon sistemleri tarafından ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır. Bu mekanizmalarda önemli görevi olan enzimlerin aktiviteleri ve gen ifadeleri bu maddelere maruz kalma ile değişebilmektedir.

Bir araştırmada Mei ve ark. fareleri, içme sularına kattıkları 500mg/L oranında akrilamid ile 3 hafta boyunca beslemişler ve akrilamidin detoksifikasyondan sorumlu olan enzimlerin karaciğerlerindeki gen ifadelerine olan etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar GST π gen ifadesinin akrilamid uygulamasıyla birlikte 2,4 kat daha azaldığını tespit etmişlerdir (169).

Bir başka araştırmada farklı bir toksik madde olan aflatoksin B1'in prenatal ve postnatal dönemde ratların karaciğer GST π gen ifadesine olan etkisi araştırılmıştır. Fatemi ve ark. bu araştırmalarında prenatal ve postnatal dönemde tek doz aflatoksin B1'e (3mg/kg vücut ağırlığı) maruz kalan ratların karaciğer GST π gen ifadesinde bir değişim olmadığını bildirmişlerdir (132).

Farklı bir çalışma subkronik akrilamid uygulamasının erkek ratların beyin hipotalamus ve hipofiz GST π gen ifadesine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla araştırmacılar 14 gün boyunca ratları 2.5 mg, 10 mg ve 50 mg/kg/gün dozlar şeklinde içme sularına kattıkları akrilamid ile muamele etmişlerdir. Yüksek dozda uygulanan akrilamidin hipotalamus GST π gen ifadesine bir etkisi olmazken, hipofizde bulunan GST π mRNA gen ifadesini anlamlı şekilde etkilediğini tespit etmişlerdir (170).

Benzer bir başka çalışmada 50mg/kg/gün dozda içme sularına akrilamid uygulanan erkek ratların beyin striatum ve substantia nigra bölgelerindeki GST π mRNA gen ifadelerinde herhangi bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. (171)

Araştırmamızda biz de benzer olarak akrilamid uygulanan grupların karaciğer GST π mRNA seviyelerinin, GAPDH mRNA seviyelerine oranlanması sonucunda, GST π mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edemedik (P>0.05). Aynı sonuçlar ilgili genin enziminde de elde edilmiştir. Araştırmamızda uyguladığımız akrilamid dozunun, transkripsiyon safhasında GST π mRNA seviyesine ve translasyonda ise enzim aktivitesine etki etmediği ifade edilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada; akrilamid grubu karaciğer dokusu TBARS düzeyleri, kayısı ve kayısı-Acr gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük, GSH düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede düşük, GSH-Px düzeyleri kontrol ve kayısı grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulundu. Kayısı grubu karaciğer dokusu TBARS düzeyleri, akrilamid grubuna göre anlamlı olarak daha düşük, GSH düzeyleri, kontrol grubuna göre daha düşük, GSH-Px düzeyleri, akrilamid grubuna göre daha yüksek bulundu. GST, GST-Pi gen ifade düzeylerinde ve histopatolojik değişiklikler açısından ise gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Elde edilen tüm sonuçlar, 3 ay süreyle ratlara günlük 500 µg/kg dozda verilen akrilamidin karaciğer dokusunda herhangi bir histopatolojik hasara neden olmaksızın karaciğer tarafından kolaylıkla detoksifiye edildiğini göstermektedir. Akrilamidin karaciğer dokusunda ciddi bir histopatolojik hasar meydana getirmemiş olması ve biyokimyasal parametrelerde ciddi bir değişime yol açmamış olması nedeniyle, 3 ay süreyle yemle verilen %5'lik organik kuru kayısının karaciğer üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığı hususu tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu nedenle, kayısının akrilamid kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu etkisinin, daha yüksek dozlarda akrilamid uygulanarak yapılacak çalışmalarda denenmesi gerekmektedir.

7. ÖZET

Subkronik Akrilamid Toksisitesi Oluşturulan Ratlarda Kayısının, Karaciğer Dokusu Glutasyon S-Transferaz Pi (GST-P) Gen Ekspresyonuna, GST, GSH-Px, GSH ve MDA Düzeylerine Etkisinin Araştırılması

Akrilamid endüstride yaygın olarak kullanılan toksik bir kimyasaldır. Akrilamid, gıdaların yüksek sıcaklıklarda işlenmesi sırasında oluşmakta ve bu gıdalarla birlikte vücuda alınmaktadır. Gıdalarla alınan akrilamidin insan vücudunda ne gibi hasarlar oluşturabileceği konusu tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle gıda kaynaklı akrilamid, insan sağlığını tehdit eden önemli bir problem olarak görülmektedir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC-International Agency for Research into Cancer) gıdalardaki akrilamidi ‘insanlar için potansiyel kanserojen maddeler’ (grup 2A) arasına almıştır.

Bu çalışmada dişi Spraque Dawley ratlara içme suyu ile subkronik dozda akrilamid verilerek, akrilamidin karaciğer dokusunda meydana getirebileceği muhtemel toksik etkilerin incelenmesi ve bu etkilerin organik kuru kayısı ile önlenabilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır.

Canlı ağırlıkları ortalama 200 gr olan 40 adet dişi Spraque Dawley ratlar eşit olarak dört gruba ayrıldı: 1. grup (kontrol grubu); 12 hafta süreyle normal yemle beslendi, 2. grup (kayısı grubu); 12 hafta süreyle %5 kuru kayısı yem ile beslendi, 3. grup (akrilamid grubu); 12 hafta süreyle içme suyu içinde 500 µg/kg akrilamid ve normal yemle beslendi, 4. grup (akrilamid+kayısı grubu); 12 hafta süreyle içme suyu ile 500 µg/kg akrilamid ve %5 kuru kayısı yem ile beslendi.

12 haftalık sürenin sonunda tüm ratlar dekapite edildi. Ratlardan histopatolojik inceleme, Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferaz (GST), Glutasyon S-Transferaz Pi (GST-P) gen ekspresyonu, Malondialdehid (MDA), Redükte Glutasyon (GSH), total protein analizi için karaciğer örnekleri alındı.

Çalışmamızın sonucunda; akrilamid grubu karaciğer dokusu MDA düzeyleri, kayısı ve kayısı-Acr gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük, GSH düzeyleri kontrol grubuna kıyasla daha düşük, GSH-Px düzeyleri kontrol ve kayısı gruplarına kıyasla daha düşük bulundu. Kayısı grubu karaciğer dokusu MDA düzeyleri, akrilamid grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek, GSH düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla daha düşük, GSH-Px düzeyleri, akrilamid grubuna kıyasla daha yüksek bulundu. GST

ve GST-Pi gen ifade düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Ayrıca karaciğer dokusu histopatolojik inceleme sonucunda ise gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Elde edilen tüm sonuçlar, 3 ay süreyle ratlara günlük 500 µg/kg dozda verilen akrilamidin karaciğer dokusunda herhangi bir histopatolojik hasara neden olmaksızın karaciğer tarafından kolaylıkla detoksifiye edildiğini göstermektedir. Akrilamidin karaciğer dokusunda ciddi bir histopatolojik hasar meydana getirmemiş olması ve biyokimyasal parametrelerde ciddi bir değişime yol açmamış olması nedeniyle, 3 ay süreyle yemle verilen %5'lik organik kuru kayısının karaciğer üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığı hususu tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu nedenle, kayısının akrilamid kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu etkisinin, daha yüksek dozlarda akrilamid uygulanarak yapılacak çalışmalarda denenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: kayısı, akrilamid, rat, karaciğer, GST-Pi, RT-PZR, antioksidan enzimler.

8. SUMMARY

Subchronic Toxicity of Acrylamide Administered to Rats, Investigation of The Effect of Apricot at Liver Tissue Glutathione S-Transferase P (GST-P) Gene Expression, GST, GSH-Px, GSH and MDA Levels

Acrylamide is a toxic chemical which is widely used in industry. Acrylamide could occur in food during high temperature cooking and it can be taken up by humans via diet. Adverse effects of acrylamide on human body are completely unknown when taken up via food chain. Therefore, dietary source of acrylamide could pose a great risk for public health. Acrylamide, which in food, is classified in Group 2A as a 'possible carcinogen to humans' by International Agency for Research on Cancer (IARC).

In this study, it was aimed to investigate the possible toxic effects that subchronic doses of acrylamide with administered drinking water on the liver 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 at 500µg/kg via drinking water and normal diet. Group 4 (acrylamide-apricot); animals were administered daily acrylamide 500µg/kg via drinking water and diet with %5 apricot.

At the end of 12 weeks-period, all rats were decapitated. Samples of liver were collected for histopathological examination as well as biochemical analyses to measure levels of Glutathione Peroxidase (GSH-Px) activity and Glutathione S-Transferase (GST) activity, Glutathione S-Transferase Pi gene expression, Malondialdehyde (MDA), Reduced Glutathione (GSH) and Total Protein.

As a result of our study, liver tissue MDA levels of acrylamide group were significantly lower than apricot and apricot-ACR groups, GSH levels, lower than the control group, GSH-Px levels were lower than control and apricot groups. Apricot group liver tissue MDA levels were significantly lower compared to the acrylamide group, GSH levels were lower than the control group, GSH-Px levels were found higher

compared to the group of acrylamide. GST and GST-Pi gene expression levels were no significant differences between the groups.

All the results obtained, the rats daily for 3 months 500 µg/kg dose of acrylamide in the liver tissue without any histopathological damage has been detoxified by the liver easily. Did not bring serious damage to the liver tissue of acrylamide in a histopathological and biochemical parameters that have not signed because of a serious change in the way, for a period of 3 months 5% of the organic dried apricots with diet a protective effect on the liver and the matter is not fully exposed. Therefore, the protective effect of apricot against toxicity from acrylamide, the examination of studies must be done by applying higher doses of acrylamide.

Key words: apricot, acrylamide, rat, liver, GST-P, RT-PCR, anti-oxidant enzymes.

9. KAYNAKLAR

1. Özer EA, Yağmur C. Cezerye üretimi ile beslenmedeki yeri ve önemi. Geleneksel gıdalar sempozyumu. Van, 2004; 35–39.
2. Paulsson B, Grawé J, Törnqvist M. Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mutation Res.* 2002; 516: 101–111.
3. Galdo CV, Massart C, Jin L, Vanvooren V, Fauquet-Caillet P, Andry G. Acrylamide, an in vivo thyroid carcinogenic agent, induces DNA damage in rat thyroid cell lines and primary cultures. *Molecul and Cellu Endocrinol.* 2006; 257–258: 6–14.
4. Overview of acrylamide toxicity and metabolism. JIFSAN /NCFST Workshop on Acrylamide in Food and Toxicology and Metabolic Consequences Working Group 2002.
5. Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat. Res.* 1988; 195: 45–77.
6. Ghanayem BI, McDaniel LP, Churcwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennel RT. Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glisidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol Sci.* 2005; 88 (2): 311–318
7. Blasiak J, Gloc E, Wozniak K, Czechowska A. Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *Chemico-Biological Interac.* 2004; 149: 137–149.
8. Lingnert H, Grivas S, Jagerstad M, Skog K, Törnqvist M, Aman P. Acrylamide in food: mechanism of formation and influencing factors during heating of foods. *Scand J Nutr.* 2002; 46(4): 159–172.
9. Ikeda G, Miller E, Sapienza P, Mchel T, Inskeep P. Comparative tissue distribution and excretion of [1–14C]-acrylamide in beagle dogs and miniature pigs. *Food Chem Toxicol.* 1987; 25(11): 871– 875.
10. Sumner SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI. Role of cytochrome P4502E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in Mice. *Chem. Res. Toxicol.* 1999; 12: 1110–1116.
11. Ghanayem B, Witt K, Kissling G, Tice R, Recio L. Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CYP2E1-null mice: Evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. *Mutat Res.* 2005; 578(1–2): 284–297.

12. Bergmark E, Calleman CJ, He F, Costa LG. Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993; 120: 45–54.
13. Maniere I, Godard T, Doerge DR, Ghurchwell MI, Guffroy M, Laurentie M. ve diğerleri. DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutat Res.* 2005; 580(1–2): 119–129.
14. Sublet VH, Zenick H, Smith MK. Factors associated with reduced fertility and implantation rates in females mated to acrylamide-treated rats. *Toxicol.* 1989; 55(1–2); 53–67.
15. Richmond P, Borrow R. Acrylamide in Food. *The Lancet* 2003; 361(2): 361–362.
16. Stadler, RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002; 419: 449–450.
17. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002; 419: 448–449.
18. Zyzak D, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge D, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD. Acrylamide formation in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 4782–4787.
19. Yaylayan V, Wnorowski A, Locas C. Why Asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 1753–1757.
20. Stadler R, Scholz G Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation and potential strategies of control. *Nutr Reiew.* 2004; 62: 449–467.
21. Taeymans D, Wood J, Ashby P, et al. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44:323 – 47.
22. Biederman M, Grob K. Model studies on acrylamide formation in potato, wheat flour and corn starch: ways to reduce acrylamide contents in bakery ware. *Mitt. Geb. Lebensm. Unters. Hyg.* 2003; 94: 406–422.
23. Gertz C, Klostermann S. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002; 104: 762–771.
24. Becalski A, Lau BP, Lewis D, Seaman SW. Acrylamide in foods: occurrence, sources and modelling. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(3): 802–808.
25. Margaretha J, Kertsin S. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res.* 2005; 574: 156–172.

26. JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting, JECFA/64/SC, World Health Organization WHO, Rome, Italy 2005; 7–17.
27. Tritscher A. Human health risk assesment of processing-related compounds in food. *Toxicol Lett.* 2004; 149: 177–186.
28. Yousef MI, El-Demerdash FM. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology* 2006; 219(1–3): 133–141.
29. Tong GC, Cornwell WK, Means GE. Reactions of acrylamide with glutathione and serum albumin. *Toxicology Letters* 2004; 147(2): 127–131.
30. Zödl B, Schmid D, Wassler G, Gundacker C, Leibetseder V, Thalhammer T ve diğerleri. Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicol* 2007; 232(1–2): 99–108.
31. Doerge DR, Young JF, McDaniel P, Twaddle NC, Churchwell MI. Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicol and Appl Pharmacol.* 2005; 208(3): 199–209.
32. Burek JD, Albee RR, Beyer JE, Bell TJ, Carreon RM, Morden DC, Wade CE, Hermann EA, Gorzinski SJ. Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1980; 4(5–6): 157–182.
33. Chapin RE, Fail PA, George JD, Grizzle TB, Heindel JJ, Harry GJ, Collins BJ, Teague J. The reproductive and neural toxicities of acrylamide and three analogues in Swiss mice, evaluated using the continuous breeding protocol. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1995; 27(1): 9–24.
34. Friedman MA, Dulak LH, Stedham MA, A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1995; 27(1): 95–105.
35. Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM, Campbell RA, Wolf CH, Friedman MA, Mast RW. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986; 85(2): 154–168.
36. Tyl RW, Marr MC, Myers CB, Ross WP, Friedman MA. Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reprod. Toxicol.* 2000; 14(2): 147–157.

37. Wise LD, Gordon LR, Soper KA, Duchai DM, Morrissey RE. Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 1995; 17(2): 189–198.
38. Hagmar L, Tornqvist M, Nordander C, Rosen I, Bruze M, Kautiainen A, Magnusson AL, Malmberg B, Aprea P, Granath F, Axmon A. Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health* 2001; 27: 219–226.
39. Tilson H, Cabe PI, Spencer P. Acrylamide neurotoxicity in rats: A correlated neurobehavioral and pathological study. *Neurotox.* 1979; 1: 89–104.
40. Post EJ, McLeod JG. Acrylamide autonomic neuropathy in the cat: Part 1. Neurophysiological and histological studies. *J. Neurol. Sci.* 1997; 33: 353–374.
41. LoPachin RM. The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicol.* 2004; 25: 617–630.
42. Tyl RW, Friedman MA. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod. Toxicol.* 2003; 17: 1–13.
43. Tyl RW, Friedman MA, Losco PE, Fisher LC, Johnson KA, Strother DE, Wolf CH. Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water. *Reprod. Toxicol.* 2000; 14: 385–401.
44. World Health Organization.. FAO/WHO consultation on the health implications of acrylamide in food. Geneva, 2002. www.who.int.
45. Dybing E, Sanner T. Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicol. Sci.* 2003; 75: 7–15.
46. Konings EJ, Baars AJ, van Klaveren JD, Spanjer MC, Rensen PM, Hiemstra M, van Kooij JA, Peters PW. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *Food Chem. Toxicol.* 2003; 1: 1569–1579.
47. Tyl RW, Marr MC, Myers CB, Ross WP, Friedman MA. Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reprod. Toxicol.* 2000; 14: 147–157.
48. Miller MG, Mulholland DJ, Vogl AW. Rat testis motor proteins associated with spermatid translocation (dynein) and spermatid flagella (kinesin-II). *Biol. Reprod.* 1999; 60: 1047–1056.

49. Barber D, Hunt J, Ehrich M, Lehning E, LoPachin R. Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. *Neurotoxicol.* 2001; 22: 341–353.
50. Bergmark E, Calleman C, Costa L. Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1991; 111(2): 352–363.
51. Hashimoto K, Aldridge W. Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent, *Biochem. Pharmacol.* 1970; 19(9): 2591–2604.
52. Paulsson B, Athanassiadis I, Rydberg P, Tornqvist M. Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; 17(16): 1859–1865.
53. Paulsson B, Kotova N, Grawe J, Henderson A, Granath F, Golding B, Tornqvist M. Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide, *Mutat. Res.* 2003; 535 (1): 15–24.
54. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornqvist M. Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol.* 2000; 13(6): 517–522.
55. Fennell T, Sumner S, Snyder R, Burgess J, Spicer R, Bridson W, Friedman M. Metabolism and haemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* 2005; 85: 447–459.
56. Awad ME, Abdel-Rahman MS, Hassan SA. Acrylamide toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol in Vitro.* 1998; 12(6): 699–704.
57. Collins JJ, Swaen GMH, Marsh GM, Utidjian HMD, Caporossi JC, Lucas JJ. Mortality patterns among workers exposed to acrylamide. *J. Occup. Med.* 1989; 31: 614–617.
58. Hogan KA, Scott CLS. Mortality patterns and acrylamide exposure. *J. Occup. Med.* 1990; 32: 947–949.
59. Marsh GM, Lucas LJ, Youk AO, Schall, LC. Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup. Environ. Med.* 1999; 56: 181–190.
60. Sobel W, Bond GG, Parsons TW, Brenner FE. Acrylamide cohort mortality study. *Br. J. Ind. Med.* 1986; 43: 785–788.
61. Schulz MR, Hertz-Picciotto I, van Wijngaarden E, Hernandez JC, Ball LM. Dose–response relation between acrylamide and pancreatic cancer. *Occup. Environ. Med.* 2001; 58: 609.

62. Mucci, L.A., Dickman, P.W., Steineck, G., Adami, H.O., Augustsson, K., Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder. Absence of an association in a population-based study in Sweden, *Br. J. Cancer* 2003; 88: 84–89.
63. Mucci LA, Lindblad P, Steineck G, Adami HO. Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. *Int. J. Cancer* 2004; 109: 774–776.
64. Pelucchi C, La Vecchia C, Franceschi S, Levi F. Letter to the editor: fried potatoes and human cancer, *Int. J. Cancer* 2004; 108: 636–637.
65. Svensson K, Abramsson L, Becker W, Glynn A, Hellenas KE, Lind Y, Rosen J. Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem. Toxicol.* 2003; 41: 1581–1586.
66. U.S. Food and Drug Administration. The Action Plans for Acrylamide in Food. 2002–2005. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/pestadd.html#acrylamide>.
67. Ölmez H, Tuncay F, Özcan N, Demirel S. A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2008; 21: 564–568.
68. Sharp D. Acrylamide in food. *Lancet* 2003; 361: 361–362.
69. 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 <http://www.who.int/fsf/acrylamide/SummaryReportFinal.pdt>
70. 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; 20–21.
71. Güner M. Bazı kayısı çeşitlerinde çekirdek kırılma karakteristiklerinin belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi* 1998; 5: 95–103.
72. Asma BM. Geçmişten Günümüze Malatya’da Kayısı Yetiştiriciliği. 2002; İzollu 18–20.
73. Milazzo S, Lejeune S, Ernst E. Laetrile for cancer: a systematic review of the clinical evidence. *Support Care Cancer* 2007; 15: 583–595.
74. [<http://www.juicing-for-health.com/apricot.html>]
75. Malatya Çevre ve Orman Müdürlüğü, Çevre Durum Raporu 2005.
76. Yıkar E, Sahakyan L, Akgün N. Gıda sektörü atıklarından süperkritik karbondioksit ile yağ eldesi. http://cevre.club.fatih.edu.tr/webyeni/konfreweb/2008_pdf/sayfa47.pdf

77. Akbulut M, Artık N. Kayısı ve zerdali meyvelerinin fenolik madde dağılımı ve prosesteki değişimi. Türkiye 7. Gıda Kongresi Ankara. 2002; 22–24.
78. Macheix JJ, Fleuret A, Billot J. Fruits phenolics. Boca Raton, FL: CRC pres. 1990.
79. Hermann K. Flavanols and compounds in fruits and vegetables. Ernahrungs Umschau 1976; 21: 177–181.
80. Radi M, Mahrouz M, Jaouad A. Phenolic Content, Browning Susceptibility and aryttenoids content of several apricot cultivars at maturity. Hort. Sci. 1997; 32: 1087–1091.
81. Dragovic-Uzelacü V, Levaj B, Mrkic V, Bursac D, Boras M. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and gegraphical region. Food Chem. 2007; 102: 966–975.
82. Spanos GA, Wrolstad RE, Heatherbell DA. Influence of processing and storage on the phenolic content of apple nectar. J. Agric. Food Chem. 1990; 38: 1572–1579.
83. Spanos GA, Wrolstad RE. Influence of variety, maturity, processing and storage on the phenolic content of pear nectar. J. Agric. Food Chem. 1990a; 38: 817–824.
84. Joshi VK, Chauhan SK, Lal BB. Extraction of nectars from peaches, plums and apricots by pectinolytic treatment. J. Food Sci. Techn. 1991; 28: 64–65.
85. Baysal T, Ersus S. Karotenoidler ve İnsan Sağlığı. Gıda 1999; 24(3): 177–185.
86. Güler Temizkan, Nazlı Arda. (Ed.) Moleküler Biyolojide kullanılan yöntemler. Genişletilmiş 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi, 2004; 90–120.
87. Erlich HA. PZR Technology. Molecular Biology and Biotechnology (Edited by Robert A. Meyers), VCH Publishers USA 1990; 641–648.
88. Newton CR, Graham A. PZR. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford, UK 1994.
89. White BA. PZR protocols: Current methods and Applications for DNA amplification. IRL Press at Oxford University Pres. UK 1993.
90. Günel TA. Real-Time PZR ve Uygulama Alanları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2009; 2(2): 42–44.
91. Zimmerman B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Ahn S. Optimized real-time quantitative PZR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. Clin. Chem. 2005; 51: 1598–1604.
92. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. Real-Time PZR. Turkiye Klinikleri J. Med. Sci. 2007; 27: 763–767.

93. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Soul RL, McCard M, Harman, D. Oxygen radicals and human disease. *Annal Intern. Med.* 1987; 107: 526–545.
94. Merry P, Winyard PG, Morris CJ, Grootveld M, Blake DR. Oxygen free radicals inflammation and synovitis the current status. *Ann. Rheum. Dis.* 1989; 48(10): 864–870.
95. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985; 227(4685): 375–381.
96. Pasifici RE, Davies KJA. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: The free radical theory of aging revisited. *Gerontol.* 1991; 37: 166–180.
97. Champe PC, Harvey RA. Glikozaminoglikanlar. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E. Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya ikinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 1997; 147–156.
98. Gözükara EM. Biyokimya. Evin Matbaası, İstanbul 1997.
99. Terpstra M, Henry PG, Gruetter R. Measurement of reduced glutathione (GSH) in human brain using LC model analysis of difference-edited spectra, *Magnetic Resonance in Medicine.* 2003; 50: 19–23.
100. Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 4668–72.
101. Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2 nm resolution, *Eur J Biochem.* 1983; 133: 51–69.
102. Hall L, Williams K, Perry ACF, Frayne J, Jury JA. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced, implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J.* 1998; 333: 5–9.
103. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991; 161: 488–503.
104. Akkuş I. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları Konya. 1995.
105. Knapen MFCM, Zusterzeel PLM, Peters WHM, Steegers EAP. Glutathione and Glutathione-related enzymes in reproduction: A review. *Eur J Obstet and Gynecol and Reprod Biol.* 1999; 82: 171–184.

106. Aydın A, Sayal A, Işimer A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi 2001; 20: 1–87.
107. Eskandari HG, Acartürk E, Yüregir GT, Demir M, Belge E. Glutathione Concentration, Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase Activity of Erythrocytes in the Early Onset of Acute Myocardial Infarction. *Annal Med Sci.* 2001; 10(3): 110–112.
108. Strange RC, Lear JT, Fryer AA. Glutathione S-Transferase Polymorphisms: Influence on Susceptibility to Cancer. *Chemico-Biolo Interact.* 1998; 112: 351–364.
109. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione S-Transferase Family of Enzymes. *Mutat Res.* 2001; 482: 21–26.
110. Stewart VN, Vaughan TL, Stapleton P, Loo JV, Nicol-Blades B, Eaton DL. A Population-Based Study of Glutathione S-Transferase M1, T1 and P1 Genotypes and Risk For Lung Cancer. *Lung Cancer* 2003; 40(3): 247–258.
111. Pickett CB. Glutathione S-transferases: Gene Structure, regulation, and biological function., *Annu.Rev. Biochem.* 1989; 58: 743–764.
112. Mc Quaid S, O'Brein A, Butler MR, Humphries P. Transcriptional activation of glutathione S-transferase π gene in human ureteric and bladder carcinomas. *Cancer Lett.* 1988; 39: 209–216.
113. Choi SC, Yun KJ, Kim TH, Kim HJ, Park SG, Oh GJ, Chae SC, Oh GJ, Nah, YH, Kim JJ, Chung HT. Prognostic Potential of Glutathione S-Transferase M1 and T1 Null Genotypes for Gastric cancer Progression. *Cancer Lett.* 2003; 195(2): 169–175.
114. Tsai YY, McGlynn A, Hu Y, Cassidy AB, Arnold J, Engstrom PF, Buetow KH. Genetic Susceptibility and Dietary Patterns in Lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 41: 269–281.
115. Kano T, Sakai M, Muramatsu M. Structure and expression of a Human Class π Glutathione S-Transferase Messenger RNA. *Cancer Res.* 1987; 47: 5626–5630.
116. Fryer AA, Hume R, Strange RC. The development of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in human lung. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 883: 448–453.

117. Hu X, Xia H, Srivastava SK, Herzog C, Awasthi YC, Ji X, Zimniak P, Singh SV. Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238: 397–402.
118. Ishii T, Matsuse T, Igarashi H, Masuda M, Teramoto S, Ouchi Y. Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: Protective effect of glutathione S-transferase P1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280: 1189–1195.
119. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997; 18: 641–644.
120. To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Piqué E, Borrego N, Corbella J. Lung Cancer Susceptibility in Relation to Combined Polymorphisms of Microsomal Epoxide Hydrolase and Glutathione S-Transferase P1. *Cancer Lett.* 2001; 173: 155–162.
121. Reszka E, Wasowicz W. Significance of Genetic Polymorphisms in Glutathione S-Transferase Multigene Family and Lung Cancer Risk. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 2001; 14(2): 99–113.
122. Lewis SJ, Cherry NM, Niven RML, Barber PV, Povey AC. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Polymorphisms and Lung Cancer Risk. *Cancer Lett.* 2002; 180: 165–171.
123. Duvoixa A, Morceava F, Delhalle S, Schmitza M, Schnekenburgera M, Galteaub MM, Dicatoa M, Diedrich M. Induction of Apoptosis by Curcumin: Mediation by Glutathione S-Transferase P1-1 Inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(8): 1475–1483.
124. Porter NA. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc Chem Res.* 1986; 19: 262–268.
125. Frankel EN. Recent advances in lipid oxidation. *Int Sci Food Agric* 1991; 54: 495–511.
126. Esterbauer H, Schaur RG, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde, and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11: 81–128.
127. Van Bebber IPT, Boekholz WKF, Goris RJA et al. Neutrophil function and lipid peroxidation in a rat model of multiple organ failure. *J Surg Res* 1989; 47: 471–475.

128. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41: 1819–1828.
129. Ming CL, El-Saka A, Grazion T. The effect of vascular endothelial growth factor on a rat model of traumatic arteriogenic erectile dysfunction. *J Urol.* 2002; 167: 761–767.
130. Şimşek F. Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Lipid Peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri J Pediatri* 1999; 8: 42–47.
131. Wang XT, Liu PY, Tang JB. PDGF gene therapy enhances expression of VEGF and bFGF genes and activates the NF-kappaB gene in signal pathways in ischemic flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(1):129–39.
132. Fatemi F, Allameh A, Dadkhah A, Forouzandeh M, Kazemnejad S, Sharifi R. Changes in hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity and expression of its class-P during prenatal and postnatal period in rats treated with aflatoxin B1. *Arch Toxicol.* 2006; 80(9): 572–9.
133. Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1979; 95: 351–358.
134. Yoshiko T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1979; 135: 372–376.
135. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249: 7130–7139.
136. Eisenthal R, Danson MJ. *Enzyme assays.* Oxford University Press. 1998; 330.
137. Anonim 1998. Spectrophotometric Determination of Total Protein-Biuret Method A New Approach Founded by the National Science Foundation. Dorey and Draves University of Central Arkansas, Department of Chemistry Conway, AR 72035 Update:5/98.
138. Tyl R, Crump K. Acrylamide in Food. *Food Standards Agency* 2003; 5: 215–222.
139. Becalski A, Lau BP, Lewis D, Seaman SW. Acrylamide in foods; occurrence, source. Los Angeles CA. AOAC. Annual Meeting 2002; 22–26.
140. Ruden C. Acrylamide and cancer risk—expert risk assessments and the public debate, *Food Chem. Toxicol.* 2004; 42: 335–349.
141. Canady R. 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) 2002; 1–23.

142. WHO - World Health Organization, Health implications of acrylamide in food: Report of a joint FAO/WHO consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland 2002; 1–39.
143. WHO - World Health Organization, Acrylamide, In: Guidelines for drinking water quality, health criteria and other supporting information, International Programme on Chemical Safety, Second ed. Geneva, Switzerland 1996.
144. NFCA - Norwegian Food Control Authority, Report from the Scientific Committee of the Norwegian Food Control Authority: Risk assessment of acrylamide intake from foods with special emphasis on cancer risk, Oslo, Norway 2002.
145. Genestra, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling* 2007; 19 (9): 1807–1819.
146. Davies KJ, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure, *J Biol Chem.* 1987; 262(20): 9908–9913.
147. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 31 (11): 1287–1312.
148. Sanchez AR, Almeida A. Medina JM. Oxidative stress in preterm rat brain is due to mitochondrial dysfunction. *Pediat Res.* 2002; 51(1): 34–39.
149. Dixit R, Husain R, Mukhtar H, Seth PK. Acrylamide induced inhibition of hepatic glutathione-S-transferase activity in rats. *Toxicol Lett.* 1981; 7(3): 207–210.
150. Lieshout EMMV, Bedaf MMG, Pieter M, Ekkel C, Nijhoff WA, Peters WHM. Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1–1 levels. *Carcinogenesis* 1998; 11(4): 2055–2057.
151. Miller MJ, Carter DE, Sipes IG. Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher–334 rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982; 63: 36–44.
152. Sumner SC, MacNeela JP, Fennell TR. 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.* 1992; 5: 81–89.
153. Shuming C, Jilin F, Xichun Z. The moderating role of dark soy sauce to acrylamide-induced oxidative stress and neurophysiological perturbations in rats. *Toxicol Mechan and Meth.* 2009; 19(6–7): 434–440.
154. Puppel N, Tjaden Z, Fueller F, Makro D. DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutat Res.* 2005; 580: 71–80.

155. Naruszewicz M, Zapolska-Downar D, Kosmider A, Nowicka G, Kozowska WM, Vikström AS, Törnqvist M. 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.* 2009; 89(3): 773–777.
156. Srivastava S, Sabri MI, Agrawal AK, Seth PK. Effect of single and repeated doses of acrylamide and bis-acrylamide on glutathione S-transferase and dopamine receptors in rat brain *Brain Res.* 1986; 371: 319–323.
157. Friedman M. Chemistry Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *J. Agric. Food. Chem.* 2003; 51: 4504–4526.
158. Amstrong RN. Structure catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 1997; 10(1): 2–18.
159. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45: 51–88.
160. Ladner JE, Parsons JF, Rife CL, Gilliland GL, Amstrong RN. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1–1. *Biochemistry* 2004; 43(2): 352–361.
161. Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermin LS, et al. Identification characterization and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem.* 2000; 275(32): 24798–24806.
162. Davies MH, Schnell RC. Comparison of basal glutathione S-transferase activities and of the influence of phenobarbital, butylated hydroxy-anisole or 5,5'-diphenylhydantoin on enzyme activity in male rodents. *Comp Biochem Physiol.* 1987; 88: 91–3.
163. Moody DE, Narloch BA, Shull LR, Hammock BD. The effect of structurally divergent herbicides on mouse liver xenobiotic-metabolizing enzymes (P-450-dependent mono-oxygenases, epoxide hydrolases and glutathione S-transferases) and carnitine acetyltransferase. *Toxicol Lett.* 1991; 59: 175–185.
164. Awasthi YC, Singh SV, Goel SK, Reddy JK. Irreversible inhibition of hepatic glutathione S-transferase by ciprofibrate, peroxisome proliferator. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123: 1012–1018.
165. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clin. Tech. Equine Pract.* 2003; 2(3): 278–291.

166. Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: Essential nutrient and antioxidant component of the immun system. *Adv Exp Med Biol* 1990; 262: 145–158.
167. Catalgol B, Ozhan G, Alpertunga B. Acrylamide-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Hum Exp Toxicol*. 2009; 28(10): 611–617.
168. Zhu YJ, Zeng T, Zhu YB, Yu SF, Wang QS, Zhang LP, Guo X, Xie KQ. Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. *Neurochem Res*. 2008; 33(11): 2310–2317.
169. Mei N, Guo L, Tseng J, Dial SL, Liao W, Manjanatha MG. Gene expression changes associated with xenobiotic metabolism pathways in mice exposed to acrylamide. *Environ Mol Mutagen*. 2008; 49(9): 741–745.
170. Bowyer JF, Latendresse JR, Delongchamp RR, Muskhelishvili L, Warbritton AR, Thomas M, Tareke E, McDaniel LP, Doerge DR. 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*. 2008; 230(2): 208–215.
171. Bowyer JF, Latendresse JR, Delongchamp RR, Warbritton AR, Thomas M, Divine B, Doerge DR. The mRNA expression and histological integrity in rat forebrain motor and sensory regions are minimally affected by acrylamide exposure through drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 240(3): 401–411.