



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKRİLAMİTİN C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİSİNE KARŞI TİMOKİNON
VE KUERSETİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

SEDAT KAÇAR

DANIŞMAN

PROF. DR. VAROL ŞAHİNTÜRK

2020



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKRİLAMİTİN C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİSİNE KARŞI TİMOKİNON VE
KUERSETİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

SEDAT KAÇAR

DANIŞMAN

PROF. DR. VAROL ŞAHİNTÜRK

2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sedat KAÇAR'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "Akrilamitin C6 sıçan glioma hücreleri üzerindeki toksik etkisine karşı timokinon ve kuersetinin etkilerinin araştırılması" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

10.03.2020

Üye: Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK (Danışman)



Üye: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU



Üye: Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI



Üye: Doç. Dr. Gökhan KUŞ



Üye: Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / tarih ve / sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Özkan ALATAŞ

Enstitü Müdürü

ÖZET

C_3H_5NO kimyasal formülüyle bilinen akrilamid beyaz renge sahip suda çok iyi çözünebilen bir monomerdur. Birçok endüstriyel alanda kullanılmasının yanında akrilamid ayrıca yüksek sıcaklığa maruz kalan karbonhidratça zengin yiyeceklerde de oluşmaktadır. Hayvan ve insanlarda yapılan farklı farmakolojik ve epidemiyolojik çalışmalarda akrilamidin nörotoksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Timokinon çörek otunun aktif maddesidir. Timokinonun anti-inflamatuar, antikonvülsan, antitüsif, anti-tümör ve antioksidan aktiviteleri de içeren birçok faydalı özelliği bulunmaktadır. Kuersetin ise çeşitli yiyeceklerde bulunan bir flavonoiddir. Antioksidan, anti-inflamatuar ve antiviral etkilere sahiptir. C6 hücre hattı sıçan glioblastoma hücreleridir. Literatürde akrilamidin C6 hücreleri üzerindeki etkilerini gösteren bir araştırmaya rastlamadık. Ancak, önceki laboratuvar deneyimlerimiz bize akrilamidin C6 hücreleri üzerinde toksik etkilerinin olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmamızda, akrilamidin C6 hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve timokinon ile kuersetinin akrilamidin etkisini ne yönde etkilediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda ilk olarak MTT testi ile akrilamidin 24 saat için C6 glioblastoma hücreleri için toksik dozu bulundu. Sonra timokinon ve kuersetinin 24 saat için C6 hücrelerine toksik olmayan dozları MTT kolorimetrik testi kullanılarak belirlendi. Daha sonra bulunan bu dozlar kullanılarak apoptoz yolağına bakmak için akış sitometrisi ile kaspaz 3/7 ve anneksin V testleri yapıldı. Ayrıca otofajik ölüm ve oksidatif stres de akış sitometrisi analiziyle değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak Nrf2 miktarı incelendi. Morfolojik inceleme TEM ve konfokal mikroskop analizleriyle yapıldı.

Bulgularımıza bakıldığında C6 hücrelerinde toksik etki oluşturmak için 4 mM akrilamid değeri belirlendi. Timokinon ve kuersetinin toksik olmayan dozları sırasıyla 3.9 ve 2.0 μ M olarak belirlendi. Timokinon ve kuersetinin anneksin V ve kaspaz 3/7 sonuçlarına bakıldığında akrilamidin neden olduğu apoptozu ve mikroskopik incelemelerde de morfolojik deformasyonları azalttığı

görüldü. Otofaji incelemesinde ise akrilamitin neden olduğu otofajinin timokinon ve kuersetin verilmesiyle azaldığı ortaya konuldu. Nrf2 ifadesine bakıldığında akrilamitin Nrf2 ifadesini arttırdığı, timokinon ve kuersetinin verilmesinin bu ifadeyi daha da arttırdığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, akrilamitin C6 glioblastoma hücreleri üzerinde hasar yapıcı etkisinin bulunduğu, timokinon ve kuersetinin önceden verilmesinin bu hücrelerde akrilamit kaynaklı hasara karşı koruyucu etkilerinin olduğu saptanmıştır. Timokinon ve kuersetinin diğer akrilamit ilişkili hücre, doku veya organ hasarlarında da koruyucu etki gösterme potansiyeline sahip olduğuna ve ileriki çalışmalarda denenebileceğine inanıyoruz.

Anahtar kelimeler: Akrilamit, C6 hücreleri, Timokinon, Kuersetin

SUMMARY

Acrylamide, known as the formula of C_3H_5NO , is a white-colored and readily water-soluble monomer. Besides being used in many industrial areas, acrylamide is also formed in carbohydrate-rich foods processed at high temperatures. Acrylamide was reported to exhibit neurotoxic effects in different pharmacological and epidemiological studies conducted on animals and humans. Thymoquinone is the active constituent of *Nigella sativa* and has many beneficial properties, including anti-inflammatory, anticonvulsant, antitussive, anti-tumor and antioxidant activities. Quercetin is a flavonoid found in various foods. It has antioxidant, anti-viral and anti-inflammatory properties. C6 cells are rat glioblastoma cells. In the literature, to the best of our knowledge, there is not any study showing the effects of acrylamide on C6 cells in literature. However, our previous laboratory experience showed that acrylamide exerts toxic effects in C6 cells. In this study, we aimed at attempting to prevent the toxicity of acrylamide against C6 cells by using thymoquinone and quercetin.

In our study, first, the toxic dose of acrylamide against C6 glioblastoma cells for 24 hours was determined by MTT test. Then, non-toxic doses of thymokinone and quercetin against C6 cells for 24 hours were determined by MTT colorimetric test. After that, using these doses, caspase 3/7 and annexin V tests were performed by flow cytometry to evaluate whether apoptosis pathway was induced. Furthermore, autophagy and oxidative stress were also assessed by flow cytometry. The amount of Nrf2 was immunocytochemically examined. Morphological examination was performed by TEM and confocal microscope analyses.

As a result, the 4 mM of acrylamide was determined to be used to induce toxicity in C6 cells. The non-toxic doses of thymokinone and quercetin were respectively determined as 3.9 ve 2.0 μM . Thymokinone and quercetin not only reduced both acrylamide-induced apoptosis in annexin V and caspase 3/7 results and morpholocial deformations in microscopic examinations. In autophagy, it was revealed that acrylamide-induced autophagy was decreased

by quercetin and thymokinone pretreatments. As for Nrf2 expression, it was observed that acrylamide increased Nrf2 expression and thymokinone and quercetin pretreatments increased this expression even further.

In conclusion, in the study, acrylamide had a damaging effect on C6 glioblastoma cells and thymokinone and quercetin pretreatments exerted a protective effect against acrylamide-induced damage in C6 cells. We believe thymokinone and quercetin might be used in future studies due to their potential to exhibit protective effects against other acrylamide-related cell and organ damages.

Keywords: Acrylamide, C6 cells, Thymoquinone, Quercetin

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY.....	v
TABLO DİZİNİ	x
ŞEKİL DİZİNİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sinir Sistemi.....	4
2.2. Sinir Sistemi Hücreleri.....	4
2.2.1. Nöronlar	4
2.2.2. Nöroglia hücreleri.....	4
2.2.2.1. Astrositler	4
2.2.2.2. Mikroglialar	5
2.2.2.3. Oligodendrositler.....	5
2.2.2.4. Ependim hücreleri.....	6
2.3. C6 Glioblastoma Hücreleri	6
2.4. Akrilamit.....	8
2.4.1. Akrilamitin genel özellikleri	8
2.4.2. Akrilamitin metabolizması	8
2.4.3. Akrilamitin maruz kalındığı alanlar	9
2.4.4. Akrilamitin nörotoksik etkileri.....	10
2.4.5. Akrilamitin genotoksik etkisi	10
2.4.6. Akrilamitin kanserojenitesi	11
2.4.7. Akrilamit ve hücre kültürü çalışmaları	11

2.5. Timokinon	13
2.6. Kuersetin	15
2.7. Apoptoz	17
2.6. Otofaji	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
3.1. Kimyasallar	20
3.2. Hücre Kültürü	20
3.2.1. Hücre hattı ve besi ortamı	20
3.2.2. Maddelerin stok solüsyonlarının hazırlanması	21
3.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	21
3.3.1. MTT testi	21
3.4. Anneksin V Yöntemi	22
3.5. Kaspaz 3/7 Aktivite Ölçümleri	23
3.6. Otofaji Aktivitesinin Belirlenmesi	24
3.7. Oksidatif Stresin Ölçülmesi	25
3.8. Nrf2 İmmünohistokimya Boyaması	26
3.9. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) İncelemesi	26
3.10. Konfokal Mikroskop İncelemesi	29
3.11. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	31
4.1. MTT Sonuçları	31
4.1.1. Akrlamitin MTT'si	31
4.1.2. Timokinonun MTT'si	33
4.1.3. Kuersetinin MTT'si	36

4.1.4. Timokinon+Akrilamit ve Kuersetin+Akrilamit Gruplarının MTT'si	39
4.2. Anneksin V Sonuçları	41
4.3. Kaspaz 3/7 Sonuçları	44
4.4. Otofaji Sonuçları	47
4.5. Oksidatif Stres Sonuçları	49
4.6. Nrf2 İmmünohistokimya Boyaması Sonuçları	50
4.7. TEM Sonuçları	54
4.8. Konfokal Mikroskop Sonuçları	56
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR DİZİNİ	78
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLO DİZİNİ

Tablo 4. 1 MTT sitotoksisite testinde verilen akrilamit dozlarına göre hücre canlılığı yüzdesi ve istatistiksel anlamlılık dereceleri.	33
Tablo 4. 2 MTT sitotoksisite testinde verilen timokinon dozlarına göre hücre canlılığı yüzdesi ve istatistiksel anlamlılık dereceleri.	35
Tablo 4. 3 MTT sitotoksisite testinde verilen kuersetin dozlarına göre hücre canlılığı yüzdesi ve istatistiksel anlamlılık dereceleri.	38
Tablo 4. 4 MTT sitotoksisite testinde timokinon+akrilamit ve kuersetin + akrilamit dozları verildiğinde hücre canlılığı yüzdesi ve istatistiksel anlamlılık dereceleri.	41
Tablo 4. 5 Gruplara göre ortalama otofaji yoğunluğu ve otofaji indüksiyon oranı	48

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Akrilamitin kimyasal formülü.....	8
Şekil 2.2 Timokinonun kimyasal formülü.....	15
Şekil 2.3 Kuersetinin kimyasal formülü.....	17
Şekil 4. 1 Akrilamit verilen C6 glioblastoma hücrelerinin canlılık oranları...	32
Şekil 4. 2 Timokinon verilen C6 glioblastoma hücrelerinin canlılık oranları..	34
Şekil 4. 3 Kuersetin verilen C6 glioblastoma hücrelerinin canlılık oranları...	37
Şekil 4. 4 Timokinon+Akrilamit ve Kuersetin+Akrilamit dozlarının verildiği C6 glioblastoma hücrelerinin canlılık oranları.	40
Şekil 4. 5 Akrilamit için anneksin V sonuçları	42
Şekil 4. 6 Tüm grupların anneksin V sonuçları	44
Şekil 4. 7 Kaspaz 3/7 sonuçları	46
Şekil 4. 8 Otofaji sonuçları	48
Şekil 4. 9 Oksidatif stres sonuçları	50
Şekil 4. 10 Kontrol grubuna ait Nrf2 immünohistokimya boyaması mikroskop görüntüleri.....	51
Şekil 4. 11 Akrilamit grubuna ait Nrf2 immünohistokimya boyaması mikroskop görüntüleri	52
Şekil 4. 12 Timokinon+akrilamit grubuna ait Nrf2 immünohistokimya boyaması mikroskop görüntüleri.....	53
Şekil 4. 13 Kuersetin+akrilamit grubuna ait Nrf2 immünohistokimya boyaması mikroskop görüntüleri	54
Şekil 4. 14 Akrilamit verilen C6 glioblastoma hücrelerinin elektron mikroskopu görüntüleri	55
Şekil 4. 15 Elektron mikroskopu görüntüleri.....	56

Şekil 4. 16 Kontrol grubuna ait konfokal mikroskop görüntüleri.....	57
Şekil 4. 17 Akrilamit grubuna ait konfokal mikroskop görüntüleri	58
Şekil 4. 18 Akrilamit+timokinon grubuna ait konfokal mikroskop görüntüleri.	59
Şekil 4. 19 Akrilamit+kuersetin grubuna ait konfokal mikroskop görüntüleri.	60



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

7-AAD	7-amino-aktinomisin D
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
E3G	Epigallokateşin-3-gallat
EG	Epigallokateşin
FBS	Fetal sığır serumu
FITC	Floresan isotiyosiyanat
g	Gram
GCLC	Glutamat sistein ligaz katalitik altbirimi
GCLM	Glutamat sistein ligaz değıştirici altbirimi
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)
IC50	Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu
IL-1β	İnterlökin-1 beta

i.p.	İntraperitonal
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliđi)
JAK	Janus kinazı
LDH	Laktat dehidrojenaz
L-NAME	N(ω)-nitro-L-arginin methyl ester
MAPK	Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
MDA	Malondialdehit
MLC	Myosine light chain (Miyozin hafif zinciri)
MPO	Miyeloperoksidaz
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit
NF κ B	Nükleer Faktör kappa B
NO	Nitrik oksit
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2–ilişkili faktör 2
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PPAR- λ	Peroksizom–proliferatör aktive reseptör λ
ROS	Reaktif oksijen türleri
S3G	Siyanidin-3-glukozit
SOD	Süperoksit dismutaz
STAT	Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü

TNF- α

Tümör nekroz faktör-alfa

UDP

Üridin difosfat

UTP

Üridin trifosfat



1. GİRİŞ VE AMAÇ

C_3H_5NO ($CH_2CHCONH_2$) kimyasal formülüyle bilinen akrilamid veya 2-propenamit beyaz renkli kristalize halde bir kimyasal birleşiktir. Akrilamid etanol, eter, kloroform ve su gibi çözücülerde çözülebilir. Akrilamidin erime sıcaklığı $84,5 \pm 0,3$ °C olup, düşük buhar basıncı vardır (0.007 mm Hg at 25 °C, 0.03 mm Hg at 40 °C, 0.07 mm Hg at 50 °C and 0.14 at 55 °C). Kaynama noktası yüksektir (136 °C at 3.3 kPa/25 mmHg). Sudaki çözünürlüğü 215.5 g/100 mL'dir. Hem hafif asidik hem bazik özellik gösterir ve vinil grubu içerir (Eriksson, 2005). Akrilamid birçok endüstriyel sektörde kullanılmaktadır. Bunlar arasında tekstil, kozmetik, kâğıt, polimer alanları sayılabilir. Akrilamid ayrıca araştırma laboratuvarlarında poliakrilamid jel üretilirken kullanılmaktadır (Friedman, 2003).

Akrilamidin 2002 yılında gıdalarda bulunduğu saptanınca önemi daha da artmıştır (Tareke, Rydberg, Karlsson, Eriksson, & Tornqvist, 2002). Akrilamid 120 °C'nin üstünde sıcaklıklarda özellikle asparajin aminoasiti ve indirgenmiş şekerlerin reaksiyonu ile oluşmaktadır (Stadler vd., 2002). Bundan dolayı bu sıcaklıklar altında işlem gören birçok besinde bulunmaktadır. Bunlar arasında ekmek, patates cipsi, kahve ve kızarmış patates sayılabilir (Kacar & Sahinturk, 2018). Kanserojen etkisi açısından akrilamid Uluslararası Kansere Araştırma Kurumu (IARC) tarafından 1994'dan beri 2A grubu maddeler arasında sayılmaktadır (Dearfield vd., 1995; IARC, 1994). 2A grubu maddeler insanlarda kansere neden olma olasılığı olan maddeler olarak adlandırılır. Akrilamidin nörotoksik, genotoksik, üremeye ilgili ve kanserojenik etkilerini inceleyen birçok hayvan çalışması vardır. Akrilamidin bilinen ilk toksik etkisi nörotoksik etkisidir. Bu nörotoksik etki sanayi işçilerinin akrilamite maruz kalması sonucu işçilerde ataksi, el ve ayaklarda uyuşma, kas zayıflığı, vb. gibi bozuklukların bulunmasıyla açığa çıktı. Genotoksik etkisine bakıldığında, akrilamid germ hücre DNA'sına bağlanarak DNA sentezini geciktirmekte ve hatta bozmaktadır (Sega, Generoso, Brimer, & Malling, 1990) . Akrilamite maruz kalan annelerin yavrularının genetik hastalıklara daha yatkın olduğu ve hastalığı gösterme risklerinin arttığı bildirilmiştir (Dearfield vd., 1995).

Akrilamit ayrıca üreme sisteminde de toksik etkiler göstermektedir. Seminifer tübüllerde çok çekirdekli dev hücrelere yol açar (Kaçar, Şahintürk, Can, & Musmul, 2018), sperm sayısını ve kalitesini azaltır, anormal sperm sayısını arttırır (Pourentezari vd., 2014), Leydig hücrelerine hasar verir, testosteron seviyelerini düşürür (Song, Wang, Geng, Cao, & Liu, 2008).

Timokinon, Latince ismiyle *Nigella sativa* (çörek otu) tohumlarının aktif bileşenidir. Halk arasında inflamasyon, hipertansiyon, astım, bronşit, diyabet, baş ağrısı, egzema, gastrointestinal rahatsızlıklar gibi durumlarda birçok hastalığa çare olarak yüzyıllar boyu kullanılagelmiştir (Woo, Kumar, Sethi, & Tan, 2012). Timokinon güçlü bir antioksidandır, iyi bir reaktif oksijen türleri (ROS) toplayıcısıdır ve anti-iflamatuar özellik göstermektedir (Aslam, Shahzad, Shabbir, & Irshad, 2018; Badary, Taha, Gamal el-Din, & Abdel-Wahab, 2003; Mansour, Nagi, El-Khatib, & Al-Bekairi, 2002). Birçok toksisiteye karşı iyi geldiği gösterilmiştir. Bunlar arasında hepatotoksisite (Aycan vd., 2014) , böbrek toksisitesi (Ulu vd., 2012) ve pulmoner hasar (Yetkin vd., 2019) da bulunmaktadır. Aynı zamanda endoplazmik retikulum stresi ve mitokondri kaynaklı apoptozu da önlediği gösterilmiştir (Bouhleb vd., 2017). Timokinon sinir sistemi toksisitesini de azaltmaktadır (Mehri, Shahi, Razavi, Hassani, & Hosseinzadeh, 2014). Başka bir çalışmada sıçan mesanesinde timokinonun Nrf2 miktarını arttırdığı da bildirilmiştir (Gore vd., 2016).

Kuersetin çay, kırmızı şarap ve meyve gibi günlük gıdalarda doğal olarak bulunan bir flavonoiddir. Kuersetinin antioksidan, antiviral, anti-iflamatuar etkilerini de içeren birçok yararlı etkisi mevcuttur. Ayrıca günlük kuersetin alımındaki artış kalp hastalıkları, tümör oluşumu, nörodejeneratif hastalığa yakalanma gibi riskleri ve yaşlanmayı azaltmaktadır (Kawabata, Mukai, & Ishisaka, 2015). Ayrıca, madde toksisitesine karşı güçlü bir koruyucudur (Waheed & Mohammed, 2012).

C6, sıçan glioblastoma hücre hattı olup pek çok çalışmada kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, akrilamitin C6 hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve timokinon ve kuersetinin akrilamitin olası hasar

yapıcı etkilerini anneksin V ve kaspaz 3/7 ile apoptoz, LC3 işaretleyerek otofaji aktivitesi ve oksidatif stres değişimi ve Nrf2 ifadesi değişimine bakarak değerlendirmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi

Sinir sisteminin görevi vücut içinde ve dışında meydana gelen ve değişen uyarılara karşı vücudun cevap vermesini sağlamaktır. Aynı zamanda sinir sistemi diğer organ ve organ sistemlerinin işlevlerini kontrol eder ve birbiriyle iletişimlerini sağlar. Anatomik olarak sinir sistemi merkezi ve periferik sinir sistemi olarak iki kısımdan oluşur (Ross & Pawlina, 2014).

2.2. Sinir Sistemi Hücreleri

Sinir sistemi nöronlar ve nöroglia olarak adlandırılan sinir destek hücrelerinden oluşur.

2.2.1. Nöronlar

Merkezi sinir sisteminin işlevsel birimleridir. Nöronlar soma denilen bir hücre gövdesi ve uzantılara sahiptirler. Sinir gövdesinden çıkan çok sayıda kısa uzantılar dendrit adını alırken, uzun ve tek sayıda olan uzantı akson adını alır. Sinir hücreleri hücrelerden uyarıları almak ve iletmekten sorumludurlar (Ross & Pawlina, 2014).

2.2.2. Nöroglia hücreleri

Merkezi sinir sisteminde astrosit, migroglia, oligodentrosit ve ependim hücreleri olmak üzere başlıca 4 adet nöroglia hücresi mevcuttur.

2.2.2.1. Astrositler

En büyük nöroglia hücreleridir. Yıldız şeklinde görülen yapıları vardır. Histolojik incelemelerde hücrenin merkezinde bulunan ökromatik yuvarlak çekirdeklerinden ayırt edilebilirler. Nöronlarla daima iletişim halinde bulunarak nöronları desteklerler ve merkezi sinir sisteminde bir hücre ağı meydana getirirler. Nöronlardan artık ürünleri uzaklaştırmada, çeşitli metabolitlerin nöronlara taşınmasında astrositler uzantılarını kan damarlarından nöronlara doğru uzatırlar. Uzantıların uçları genişleyerek damar veya aksolemmanın dışındaki geniş bir yüzeyi kaplayan son ayakları

oluştururlar. Miyelin oluşturamazlar. İki astrosit tipi tanımlanmıştır. Beynin gri madde adı verilen dış bölümünde bulunan, bol granüllü sitoplazma içeren, çok sayıda kısa ve kalın uzantıları olan astrosit tipi protoplazmik astrosittir. Beynin ak madde adı verilen iç bölümünde bulunan, az sayıda uzun uzantıları olan astrosit tipi ise fibröz astrosittir (Ross & Pawlina, 2014). Fibröz astrositte daha çok olmak üzere her iki astrosit tipinde de bir ara filament proteini olan gliyal fibriller asidik protein bulunmaktadır.

2.2.2.2. Mikroglialar

Nöroglial hücrelerin en küçüğü mikroglia'dır. Histolojik incelemelerde küçük, yassı ve heterokromatik çekirdekleri ile tanınırlar. Mikroglia hücreleri fagositik hücrelerdir. Merkezi sinir sisteminde gliyal hücrelerin ortalama %5'ini oluştururlar. Mononükleer fagositik sistem içerisinde sayılırlar (Ross & Pawlina, 2014). Merkezi sinir sisteminin hasarında buranın yerleşik "makrofaj benzeri" hücreleri olarak mikroglia rol oynar ve herhangi bir patolojik durum tespit edildiğinde hızla aktive olurlar (Thompson & Tsirka, 2017). Nöron ve astrositlerle temas halindedirler. Ölü nöronların olduğu bölgelerde çoğalarak ölü hücreleri fagosite ederler (Kierszenbaum, 2006).

2.2.2.3. Oligodendrositler

Oligodendrosit Yunancada birkaç uzantıya sahip demektir. Oligodendrositin merkezi sinir sistemindeki görevi aksonların yalıtımını sağlamak ve aksonları desteklemektir (Kierszenbaum, 2006). Bu bağlamda oligodendrositler miyelinin oluşturulmasında ve devamlılığının sağlanmasında rol oynarlar. Büyük kısmı lipit içeren bu kılıf oligodendrosit plazma membranının konsantrik katmanları aracılığıyla yapılır. Tek bir oligodendrosit birden fazla aksonun miyelin kılıfını aynı anda yapabilir (Ross & Pawlina, 2014). Oligodendrositler astrositlerle kıyaslandığında daha az uzantıları vardır, daha küçüktürler ve heterokromatik düzensiz bir çekirdekleri vardır. Çok sayıda golgi aygıtı ve mitokondri içerirler (Kierszenbaum, 2006).

2.2.2.4. Ependim hücreleri

Ependim hücreleri tek katlı kübik epitel şeklinde düzenlenirler ve bu şekilde omuriliğin santral kanalı ve beyin ventrikül boşluklarını kaplarlar. Apikal kısımlarında fazla sayıda mikrovillüs ve az sayıda silya bulundurlar. Ayrıca bazal kısımlarıyla astrositlerle temas halindedirler (Kierszenbaum, 2006). Epitel hücreleri gibi apikal tarafta bağlantı birimleri vardır. Ama epitelden farklı olarak bazal laminaları bulunmaz (Meshcher, 2019).

2.3. C6 Glioblastoma Hücreleri

Beyin tümörleri, heterojen bir neoplazmik tümör grubudur. Primer beyin tümörleri, çok nadir görülen, invaziv olmayan ve cerrahi olarak tedavi edilebilen astrositomlardan yetişkinlerde en sık görülen, invaziv ve neredeyse tedavi edilemez olan en yaygın intraparenkimal beyin tümörü olan glioblastoma multiformeye kadar farklı çeşitleri içerir. Ayrıca, Merkezi sinir sistemi tümörleri ödem, nöbetler, endokrinopati, yorgunluk, psikiyatrik bozukluklar ve venöz tromboembolizm gibi yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyebilecek çeşitli semptom ve komplikasyonlarla ilişkilidir (Nabors vd., 2013).

2018 yılı verilerine göre, beyin ve sinir sistemi kanserleri 296.851 yeni vaka ile insidans olarak 17. ve 241.037 ölümlü mortalite olarak 33 kanser türü arasında 12. sırada yer almaktadır (Bray vd., 2018). Bu oranların neredeyse yarısı Asya kıtasına aittir (Bray vd., 2018). Beyin ve sinir sistemi kanserlerinden gliomlar merkezi sinir sisteminde en yaygın görülen tümörlerdir. Gliomlar arasında, glioblastoma veya glioblastoma multiforme, astrositlerden türeyen en invaziv olanıdır. Ek olarak, glioblastomun mortalitesi beyin tümörleri arasında en yüksek olup, üç hastadan sadece biri 1 yıl boyunca yaşar ve 5 yıldan fazla hayatta kalan hasta oranı %5'in altındadır (Nabors vd., 2013).

Glioma hücre biyolojisini anlamak için kullanılan birçok model hücre bulunmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olanlarından biri de C6 glioblastoma hücreleridir. C6 glioblastoma hücreleri ilk kez Benda ve

arkadaşları (1968) tarafından N-nitrozo metil üre ile glioblastom oluşturulmuş *Wistar furth* türü sıçan beyinlerinden elde edilmiştir (Benda, Lightbody, Sato, Levine, & Sweet, 1968). Oligodendrosit ve tip 2 astrositlere farklanabildiği bildirilmiştir (Parker, Norenberg, & Vernadakis, 1980; Tsai, Chen, Horng, & Wu, 2002). Bu hücreler astrositlerin bir ara filamanı olan glial fibriller asidik proteini içerirler. Ayrıca oligodendrosit belirteçleri olan gliserol fosfat dehidrojenaz ve 2', 3'-siklik nükleotit fosforilaz enzimlerini de bulundurur. C6 hücreleri kemosenivite testi, retrovirus-aracılı terapi gibi farklı testlerde kullanılmaktadır (Freshney, 2005).

C6 hücreleri normalde poligonal şekillidirler ve tutundukları yüzey üzerine iyi yayılarak büyürler ve fibroblast benzeri morfolojileri vardır. C6 hücrelerinde aktin filamanları, plazma zarının hemen altında kortikal bir ağ oluşturur ve sitoplazmada kas olmayan hücrelerde bulunan, kasılmayı sağlayan, aktin demeti olan, stres liflerini oluşturur. Fosfomiyosin II, stres lifleri boyunca ve hücre zarı altında bulunur. Hücreler açıkça sınırları belirgin olan lamellipodyum ile polarizedir. Fosforile miyozin hafif zinciri (MLC) ve aktin filamentlerini ayrıştıran ve aktin bağlayıcı bir protein olan cofilin seviyesinin azalması, hücre polarizasyonu kaybına, stres liflerinin ayrışmasına neden olur ve çoklu lamellipodia oluşumunu destekleyerek hücrenin hareketini destekler. Hücreler yuvarlaklaşarak iskeleti bir araya gelir ve uzunlamasına dışa büyüme gösterir. Yuvarlaklaşmış durumdaki hücrelerin yüzey alanına göre hacimleri büyüktür. F-aktin proteini başlıca hücre yüzeyinde ve uzama esnasında yoğunlaşır (Klopocka, Korczynski, & Pomorski, 2013).

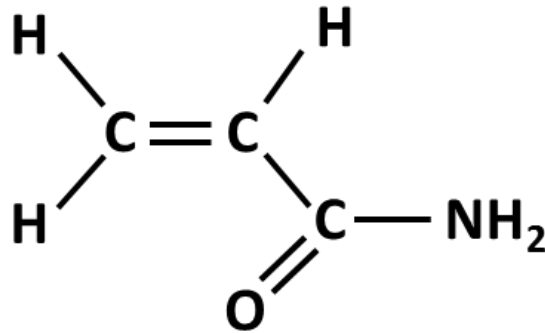
C6 glioma hücreleri glioma hücre biyolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. C6 hücreleriyle astrosit kökenli glioma hücre olarak görülmekte olup astrositlerin biokimyasal hücre modeli olarak araşırmalar yapılmaktadır (Brismar, 1995).. Glioma gelişiminin adenosin trifosfat (ATP) sinyali ile ilişkili olduğu ve hatta bu sinyalle belirlendiğine dair kanıtlar mevcuttur. (White & Burnstock, 2006) ATP, üridin trifosfat (UTP) ve metabolitleri olan adenosin difosfat (ADP), üridin difosfat (UDP) ve adenosin

plazma membranında bulunan spesifik reseptörlerin uyarılmasıyla ücre çoğalması, yayılması ve ölümünü düzenleyerek hücre metabolizması üzerinde etki göstermektedirler (Wypych & Baranska, 2013). Bundan dolayı, nükleotit reseptörleri potansiyel terapötik hedefler olarak görülmektedir (Burnstock, 2002; Wypych & Baranska, 2013). Bu bağlamda C6 glioblastoma hücreleri çeşitli nükleotit reseptörlerini eksprese ederler. Bu hücrelerde ADP, ATP ve UTP'nin başlattığı kalsiyum yanıtının değişen Ca²⁺ 'nın kapasitatif modeli ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. (Baranska, Przybylek, & Sabala, 1999; Sabala vd., 2002; Wypych & Pomorski, 2013).

2.4. Akrilamid

2.4.1. Akrilamidin genel özellikleri

Açık kimyasal formülü Şekil 2.1'de görülen akrilamid C₃H₅NO formülüyle bilinmekte olup suda çok iyi bir çözünürlüğe sahip, beyaz renkte, kristalize bir monomerdur. Yapısında karbonil, amino ve vinil grupları bulunmaktadır. Ayrıca, sudan başka metanol, etanol ve eterde de çözünebilir. Moleküler ağırlığı 71.08 g/mol'dur. (NCBI-PubChemDatabase, 2019).



Şekil 2.1 Akrilamidin yapısal formülü

2.4.2. Akrilamidin metabolizması

Akrilamid vücuda girdikten sonra iki yol izler. Birinci yolda doğrudan glutatyon S transferaz enziminin aktivitesiyle glutatyon (GSH) ile birleşir. İkinci yolda önce sitokrom P450 oksidaz sisteminin bir üyesi olan sitokrom P450 2E1 enzimi ile glisidamite dönüştürülür ve sonrasında ya yine glutatyon

S transferaz enziminin aktivitesiyle GSH ile birleşir veya epoksi hidrolaz enzimi ile 2,3-dihidroksi propionamite dönüştürülür. En sonunda ara ürün olarak N-asetil-S sistein türevlerine dönüştürülerek vücut dışına atılır. Glutasyon S transferaz enzimi karaciğer başta olmak üzere böbrek, kırmızı kan hücreleri, beyin ve dalak gibi organlarda bulunur (Corrigall & Kirsch, 1988). Akrilamit en fazla karaciğerde metabolize olur. Akrilamitin glisidamite dönüşme yüzdesi canlılar arasında farklılık göstermektedir. Mesela farelerde bu değişim diğer canlılara göre daha yüksek orandadır. İnsanlarda ise bu değişim daha yavaş ve azdır (Calleman, Bergmark, Stern, & Costa, 1993; JIFSAN/NCFST, 2004; Kacar & Sahinturk, 2018).

2.4.3. Akrilamitin maruz kalındığı alanlar

Akrilamit 1950'lerden beri ticari olarak sanayi alanlarında kullanılmaya başlanmıştır. Akrilamit kâğıt, boya, plastik sanayilerinde, atık su arındırılması işlemlerinde, kozmetik alanında, moleküler analiz laboratuvarlarında proteinlerin ayrılmasına dayanan poliakrilamit elektroforezinde ve daha birçok alanda kullanılmaktadır (Friedman & Levin, 2008). İnsanların akrilamite maruziyetinin 2002 yılına kadar bu alanlarda sınırlı olduğu düşünülmüştür ve akrilamitle ilgili bilimsel çalışmalar kısıtlı sayıda kalmıştır. 2002 yılında ise Tareke ve arkadaşları (2002) akrilamitin yiyeceklerde doğal olarak bulunmasa da bazı ısı işlemler sonucunda oluştuğunu saptadılar (Tareke vd., 2002). Böylece akrilamit maruziyetinin günlük gıdalarımızda da olduğu kanıtlandı. Genel olarak fırınlama, yağda kızartma, tost yapma, kavurma ve ızgara yapma gibi işlemlere maruz kalan yiyeceklerde akrilamit oluşmaktadır. Bu oluşumun hızı ve miktarı çeşitli faktörlere bağlıdır. 120 °C'de oluşmaya başlayan akrilamitin miktarı sıcaklık arttıkça logaritmik olarak artmaktadır. Ayrıca, akrilamit oluşumu karbonhidrat bakımından zengin, aminoasit bakımından fakir, ama özellikle asparajin aminoasitince zengin gıdalarda daha fazla oluşmaktadır. Akrilamitin fazlaca bulunduğu bazı besinler arasında kızarmış patates, kahve, bisküvi, kraker ve cipsler sayılabilir (Kacar & Sahinturk, 2018).

2.4.4. Akri laminin nörotoksik etkileri

Akri laminin saptanan ilk toksik etkisi nörotoksik etkisidir. Bu nörotoksik etki sanayi işçilerinin akrilamite maruz kalması sonucu işçilerde ataksi, el ve ayaklarda uyuşma, kas zayıflığı, vb. bozuklukların görülmesiyle açığa çıkmıştır.

Akri lamite maruz kalan 71 işçide nörolojik ve elektronöromiyografik incelemeler sonucunda bacaklarda zayıflık, el ve ayaklarda uyuşma, deride soyulma, ayak topuklarında titreşim hissinin bozulması ve ayak bilek reflekslerinde kayıp gibi bulgular tespit edilmiş ve işçilerin %73.2'sinde akrilamit toksisitesi bulunduğu bildirilmiştir (He vd., 1989). Aynı makalede, kronik akrilamit maruziyetinin temel olarak periferik sinir sistemine hasar verdiği, daha ağır ve uzun maruziyetlerin ise serebellar disfonksiyon ve polinöropatiye neden olduğu bulunmuştur (He vd., 1989). Pennisi ve arkadaşları 2013'de yayınladıkları bir derlemede akrilamitin toksisitesi periferik nitelikte olsa da merkezi sinir sisteminde de etkisinin bulunduğu bahsetmişlerdir (Pennisi vd., 2013).

2.4.5. Akri laminin genotoksik etkisi

Akri laminin genotoksik etkisi akrilamitin DNA'ya bağlanma özelliğinden kaynaklanmaktadır. Solomon ve arkadaşları (1985) akrilamitin adenin ve guaninin N halkası aracılığı ile DNA'ya bağlandığını ortaya çıkarmıştır (Solomon, Fedyk, Mukai, & Segal, 1985). Başka bir çalışmada da akrilamitin germ hücre DNA'sına bağlanarak DNA sentezini geciktirmekte olduğu gösterilmiştir (Sega vd., 1990). Ayrıca, akrilamite maruz kalan annelerin çocuklarının genetik hastalıklara daha yatkın olduğu ve hastalığı gösterme risklerinin arttığı bildirilmiştir (Dearfield vd., 1995). Daha da önemlisi vücuda alınan akrilamit karaciğerde daha reaktif olan ve daha çok risk teşkil eden glisidamit denen bir kimyasala dönüştürülür. Bu kimyasalın DNA'ya bağlanma oranı akrilamite göre en az 100 kat daha fazladır (Segeberback, Calleman, Schroeder, Costa, & Faustman, 1995).

2.4.6. Akrilamitin kanserojenitesi

1954'den beri kullanılan ve aslında evlerimizde bilmeden de olsa maruz kaldığımız akrilamit 1994 yılında 2A grubu maddeler, yani insanda kanser yapma ihtimali olan maddeler arasına eklenmiştir (IARC, 1994). Akrilamitin deney hayvanlarında kansere neden olduğu bilinmektedir. Farede akciğer tümörlerini arttırdığı ve dermal maruziyet sonrası deri tümörlerine neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca, sıçanlarda primer beyin, meme bezi, tiroid foliküler hücre tümörleri ve mezotelyomaya neden olduğu bildirilmiştir (Rice, 2005). Kısaca, akrilamit deney hayvanlarında birçok organda tümör oluşumunu indüklemektedir. Ama insanda kanser yaptığına dair net bir bilgi yoktur. Hatta Pelucchi ve arkadaşları (2015) meta analiz çalışmasında günlük besinlerden alınan akrilamitin birçok kanser için risk teşkil etmediğini ileri sürmüşlerdir (Pelucchi, Bosetti, Galeone, & La Vecchia, 2015). Mucci ve arkadaşları (2003) günlük besinlerle maruz kalınan akrilamitle kalın bağırsak, böbrek ve mesane kanseri ilişkisini araştırdıkları çalışmada akrilamitin bu kanserler için önemli bir risk teşkil etmediği sonucuna varmışlardır (Mucci, Dickman, Steineck, Adami, & Augustsson, 2003). Akrilamitin insanda kansere neden olduğuna dair kesin bir bilgi olmasa da yeterince reaktif bir kimyasal olması kendisinin veya yan ürünü olan glisidamitin DNA'ya bağlanarak DNA aktivitesini engellemesi akrilamite ihtiyatla yaklaşılmasını gerektirmektedir. Bundan dolayı da akrilamit Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nca kanser yapma ihtimali olan maddeler arasında yer almaktadır.

2.4.7. Akrilamit ve hücre kültürü çalışmaları

Akrilamitin *in vitro* ortamda birçok hücre hattına karşı toksik etkisi araştırılmıştır. Akrilamitin insandan elde edilmiş A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerini model olarak kullandığımız bir çalışmamızda akrilamit A549 hücrelerine toksik, apoptotik ve antiproliferatif etki göstermiş ve hücrelerin yarısının proliferasyonunu durduran dozu olan IC₅₀'si 4.6 mM olarak bulunmuştur (Kacar, Vejselova, Kutlu, & Sahinturk, 2017c). Yine NIH/3T3 fare normal embriyonik fibroblast hücrelerinde akrilamitin etkisini

araştırdığımız başka bir çalışmamızda ise akrilamitin hücrelerin yarısını inhibe eden dozunu 6.73 mM olarak bulduk ve akrilamitin fibroblast hücrelerine doza bağlı olarak hasar verdiği ve öldürdüğü görüldü (Sahinturk, Kacar, Vejselova, & Kutlu, 2018). En güncel olan çalışmamızda ise akrilamitin BEAS-2B normal akciğer hücreleri üzerinde etkisini araştırdık. Bu hücrelerin önceki çalıştığımız hücrelere göre akrilamite daha hassas olduğunu tespit ettik ve akrilamitin IC₅₀'sini 2.0 mM olarak saptadık (Kacar, Sahinturk, & Kutlu, 2019). Martins ve arkadaşları (2007) V79 hamster fibroblast hücreleri üzerinde akrilamitin ve akrilamitin sitokrom p450E1 enzimiyle epoksidasyonu ile oluşan glisidamitin etkilerini araştırmışlardır. Her iki kimyasalın da kromozomal bozukluğa neden olduğunu ve mitotik indeksi azalttığını bulmuşlardır. Ayrıca, kardeş kromatit değişiminin kromozomal bozukluklarının glisidamitte akrilamite oranla daha fazla bulunduğunu tespit etmişler ve sonuçta glisidamitin daha tehlikeli olduğuna vurgu yapmışlardır (Martins vd., 2006). Attoff ve arkadaşlarının (2016) SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada akrilamitin bu hücrelerin farklılaşması ve çoğalması üzerine nasıl etki ettiği araştırılmıştır. Bu çalışmada akrilamitin SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinin farklılaşmasını engellediği, nöronal ve astrosit belirteçlerinin ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Bundan dolayı akrilamitin gelişimsel nörotoksik bir ajan olabileceğine değinilmiştir (Attoff, Kertika, Lundqvist, Oredsson, & Forsby, 2016). Benzer bir şekilde Chen ve Chou (2015) SH-SY5Y nöroblastoma ve U-1240 MG glioblastoma hücreleri üzerindeki çalışmalarında akrilamitin SH-SY5Y hücrelerinin retinoik asit aracılı nörogenezisi ve U-1240 hücrelerinin bütirik asit aracılı astroglionezi azalttığını ileri sürmüşlerdir. Bunun da akrilamitin mikrotübül ilişkili proteinleri ve JAK-STAT sinyal yolağı proteinlerinin ifadesini azaltmasıyla ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (Chen & Chou, 2015). Akrilamitin BV-2 fare mikroglia hücrelerinde mitokondrial solunumu, anaerobik glikozisi ve mitokondrial solunum enzimlerinin ifadesini azaltarak hücre enerji metabolizmasını bozduğu ve bununda mitokondriyal zar potansiyelinin ve Bcl-2/Bax oranının azalmasına ve apoptozun indüklenmesine neden olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2015). Genel olarak

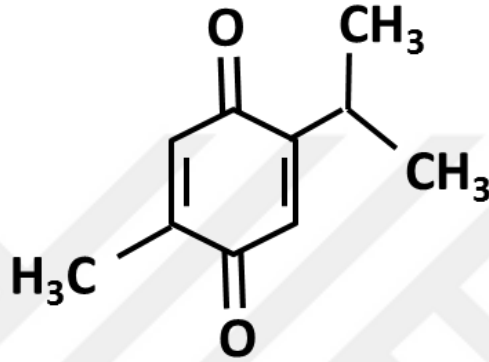
incelendiğinde akrilamitin hücre kültürü çalışmalarında doza bağlı olarak hücrelerde oksidatif stres ve serbest radikallerin artmasına neden olduğu (Yousef & El-Demerdash, 2006), pro-apoptotik proteinlerin ifadesini arttırarak apoptozu indüklediği (Kacar vd., 2019), hücre antioksidan düzeylerini özellikle de GSH miktarlarını düşürdüğü söylenebilir (Luo vd., 2015).

2.5. Timokinon

Nigella sativa Akdeniz kıyısına komşu ülkelerde yetişen yıllık otsu bir bitkidir. Halk arasında bilinen adı “çörek otu”dur. *Nigella sativa*’nın genel olarak aktif bileşenleri timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timol olarak sayılabilir. Timokinon veya 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon $C_{10}H_{12}O_2$ formülüyle bilinen, moleküler ağırlığı 164.2 g/mol olan, sarı renkli, uçucu bir kristalize monoterpendir (**Şekil 2.2**). Timokinon ilk defa El-Dakhakhny tarafından *Nigella sativa* L. yani çörek otunun tohumlarından 1963 yılında izole edilmiştir (El-Dakhakhny, 1963). Halk arasında inflamasyon, hipertansiyon, astım, bronşit, diyabet, baş ağrısı, egzema, gastrointestinal rahatsızlıklar gibi durumlarda birçok hastalığa çare olarak yüzyıllar boyu kullanılmagelmiştir (Woo vd., 2012). Timokinonun hastalıklara etkisi ile ilgili çalışmalara bakıldığında, Sankaranarayanan ve Pari (2011) çalışmalarında streptozotosin ve nikotinamit ile sıçanlarda diyabet oluşturmuşlar ve 45 gün boyunca 80 mg/kg timokinonun etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak timokinonun pankreatik beta hücre fonksiyonunu koruduğunu, antioksidan özelliğiyle oksidatif stresi önlediğini ve böylece diyabet kaynaklı hasarı anlamlı bir şekilde düzelttiğini rapor etmişlerdir (Sankaranarayanan & Pari, 2011). Aslam ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında ise farelerin kulak kepçelerinde atopik dermatit oluşturulmuş ve iki farklı şekilde oral ve lokal olarak farelere timokinon verilmiştir. Bu deneyde timokinonun kanda iltihabi hücre miktarını, farelerin kulak kalınlığını, dermatit skor puanını, IgE düzeylerini, interlökin 4, interlökin 5 ve interferon gama mRNA ifadelerini azaltarak koruma sağladığını saptamışlardır (Aslam vd., 2018). Khattab ve Nagi (2007) sıçanlarda 4 hafta boyunca 50 mg/kg L-NAME vererek hipertansiyonu tetiklemişler ve yine 4

hafta boyunca 0.5 ve 1 mg/kg timokinon vererek sıçanları tedavi etmeye çalışmışlardır. Sonuçta timokinonun sistolik kan basıncını düşürerek artmış kreatinin ve GSH miktarlarını azaltarak hipertansiyona karşı koruyucu etki gösterdiği sonucuna varmışlardır (Khattab & Nagi, 2007). Timokinon güçlü bir antioksidandır ve iyi bir ROS toplayıcısıdır. Timokinonun antioksidan özelliği ile ilgili olarak, Badary ve arkadaşları (2003) timokinonun lipid peroksidasyonunu engellediğini, güçlü bir antioksidan potansiyelinin olduğunu ve farklı radikal türlerini temizleme kabiliyetinin bulunduğunu, fakat özellikle de süperoksit anyonlarına karşı daha da güçlü etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Timokinonun lipid peroksidasyonu ve süperoksit radikali inhibisyonunda medyan inhibitör konsatrasyonları sırasıyla 16.8 ve 3.35 μ M olarak bulunmuştur (Badary vd., 2003). Mansour ve arkadaşları (2002) farelerde oral timokinon alımının karaciğer, kalp ve böbrek dokularında antioksidan enzim miktarını ve lipid peroksidasyonunu nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Farelere 5 gün boyunca 25, 50 ve 100 mg/kg timokinon dozları verilmiştir. Bu çalışmada böbrekte anlamlı bir değişiklik olmasa da karaciğerde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve malondialdehit (MDA) miktarlarının düştüğü gözlenmiştir. Kalpte ise sadece MDA ve SOD düzeylerinde anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Bu çalışmada SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin miktarlarının düşme sebebi, timokinonun antioksidan görevi yaparak ortamdaki serbest radikalleri süpürmesi ve antioksidan enzimlerin bağlanacağı daha az substrat oluşmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür. Ayrıca nanomolar seviyelerindeki timokinonun ve timokinonun metaboliti olan dihidrotimokinonun serbest oksijen radikallerini azalttığı görülmüştür (Mansour vd., 2002). Timokinonun birçok toksisiteye karşı iyi geldiği gösterilmiştir. Bunlar arasında hepatotoksisite (Aycan vd., 2014) , böbrek toksisitesi (Ulu vd., 2012) ve pulmoner hasar (Yetkin vd., 2019) da bulunmaktadır. Aynı zamanda endoplazmik retikulum stresi ve mitokondri kaynaklı apoptozu da önlediği gösterilmiştir (Bouhleb vd., 2017). Timokinon sinir sistemi toksisitesini de azaltmaktadır (Mehri vd., 2014). Diğer bir çalışmada sıçan mesanelerinde timokinonun Nrf2 miktarını arttırdığı da

bildirilmiştir (Gore vd., 2016). Woo ve arkadaşları (2012) derlemelerinde timokinonun iltihabi hastalıklar ve kanserde hedeflediği yolak ve proteinleri iltihabi reaksiyona neden olan sitokinler, antioksidan enzimler, NF-κB, STAT3, MAPK, PPAR-λ, Akt, anti-metatazis ve anti-anjiogenezis, ROS, apoptoz, hücre siklusunu durdurma, kemoterapide kullanılan ilaçların etkisini arttırma veya toksik etkisini giderme ve tümör baskılayıcı proteinler olarak özetlemişlerdir (Woo vd., 2012).

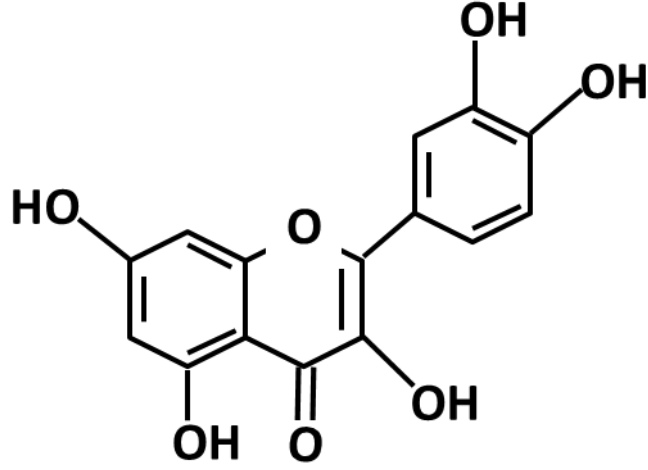


Şekil 2.2 Timokinonun kimyasal formülü

2.6. Kuersetin

Kuersetin (C₁₅H₁₀O₇, 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon), IUPAC ismi 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one olan bir antioksidandır (Şekil 2.3). Polifenolik birleşik ailesinden bir flavonoid olan kuersetin 2 benzen halkası ve ortada bağlı olduğu heterosiklik piron dan oluşmuştur (Kuhnau, 1976). Bitkilerde ve günlük yiyeceklerimizin çoğunda bulunur. Genel olarak meyve ve sebzelerde vardır. Kuersetinin bulunduğu bu yiyecekler arasında narenciye, elma, üzüm, kiraz, çilek, marul, soğan özellikle kırmızı soğan, brokoli, domates, maydanoz, adaçayı, siyah çay, rezene ve zeytinyağı sayılabilir (Anand David, Arulmoli, & Parasuraman, 2016; Kuhnau, 1976). Kuersetinin biyolojik olarak aktif birçok yararlı özelliği bulunmaktadır. Güçlü bir antioksidan ve radikal temizleyicidir (Zhang vd., 2011). Kuersetinin antioksidan etkisi bu maddenin koruyucu etkisi çalışılırken hemen hemen her

çalışmada gösterilen bir özelliğidir. Diğer etkilerinin yanında, anti-inflamatuar, anti-diyabetik, anti-hipertansiv, antihiperkolesterolemik, antiaterosklerotik anti-koagülant ve anti-iskemik etkileri de bildirilmiştir (Anand David vd., 2016). Ayrıca literatürdeki bilgilere göre peptik ülser, osteoporosis, göz bozuklukları, gut hastalığı, koroner kalp hastalıkları, artrit, kanser, astım, prostatit, viral enfeksiyonlara karşı tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır (Lakhanpal & Rai, 2007). Ayrıca karaciğer iskemi-reperfüzyonuna da iyi geldiği bildirilmiştir (Uylas, Sahin, Sahinturk, & Alatas, 2018). Sıçanlarda karaciğer iskemi reperfüzyonunun 50 dakika öncesinde oral olarak verilen kuersetin (0.13 mmol/kg) antioksidan seviyelerini arttırarak ve üretilen serbest radikal ve oksidatif stress oranını azaltarak koruma sağlamıştır (Su vd., 2003). Kuersetinin sıçanlarda streptozotosin ile oluşturulan diyabet modelinde lipit peroksidasyonunu azalttığı, antioksidan seviyelerini arttırdığı ve böylece oksidatif stresi azalttığı ve ayrıca beta hücre hasarına karşı koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (Coskun, Kanter, Korkmaz, & Oter, 2005). Kuersetinin anti-diyabetik etkisiyle ilgili olarak, Bule ve arkadaşlarının 2019'da literatürdeki verileri toplayarak yaptıkları meta-analiz çalışmasında 10, 25 ve 50 mg/kg dozunda kullanılan kuersetinin çeşitli hayvanların serum glikoz seviyelerini düşürdüğünü bildirmişlerdir (Bule, Abdurahman, Nikfar, Abdollahi, & Amini, 2019). Ultraviyole (UV) ışınıyla zarar verilen ve oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda 50 mg/kg kuersetinin, UV sonrası artan MDA'yı düşürdüğü, glutasyon redüktaz, GSH-Px, CAT ve SOD enzimlerini arttırarak koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (Erden Inal & Kahraman, 2000). Kuersetinin Alzheimer hastalığında amiloid- β plaklarının oluşumunu baskıladığı ve Alzheimer modeli farelerin bilişsel bozukluklarını önlediği gösterilmiştir (Nakagawa & Ohta, 2019). Kuersetinin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi birçok bakteriyel patojenin adezyonunu engelleyerek, plazma zarını bozarak, nükleik asit sentezini bloke ederek biofilm gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Memariani, Memariani, & Ghasemian, 2019).



Şekil 2.3 Kuersetinin kimyasal formülü

2.7. Apoptoz

Hücreler ölüme çeşitli şekillerde ve yollarla gidebilir. Apoptoz ve nekroz bu ölüm çeşitleri arasında yer almaktadır. Apoptoz diğer adıyla programlı hücre ölümü olarak adlandırılır. Apoptozda, hücre içinde meydana gelen deformasyonlardan dolayı veya hücre dışından hücresel reseptörlerle algılanan ölüm sinyalleri yoluyla sitokrom C mitokondriden sitoplazmaya salınır ve apoptozomu oluşturur ve sonrasında kaspaz 3 ve 7'nin indüklemesiyle hücre ölümü gerçekleşir. Apoptozda çevreye sinyal yayılarak çevre hücreler de ölüme tetiklenmez ve az sayıda hücre kapsanır. Hem patolojik hem de fizyolojik yolla gerçekleşebilir. Bu hücre ölüm şekli canlılığın gelişimsel sürecinde hücre regülasyonunda görüldüğü gibi, hücrenin canlılığının organizma için zararlı olacağı durumlarda da görülmektedir (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972; Saraste & Pulkki, 2000). Nekroz ise daha çok sadece hücre dışından gelen toksinler, radyasyon, ultraviyole ışınları gibi zararlı uyarıcıların hücreyi sistematik bir şekilde tahrip etmesidir ve rastgele bir şekilde gerçekleşir. Ayrıca hücre zar bütünlüğü bozulur, hücre içeriği boşalır ve dokuda enflamasyon görülür. Apoptozda ise enflamasyon yoktur. Apoptoz da hücre apoptotik cisimciklere ayrışır ve bu cisimcikler komşu hücreler ve

makrofajlar tarafından fagosite edilir. Klasik nekroz, apoptoz gibi az sayıda hücreyi kapsamaz, geniş çaplı bir hücre grubunu kapsamaktadır. Hücre ve organeller su alır ve şişer, çekirdek küçülür ve parçalara ayrılır. Apoptozda ise tersine hücre küçülür (Majno & Joris, 1995).

Akrilamitin apoptoza neden olduğu birçok makalelerde gösterilmiştir (Liu vd., 2015, Sahinturk vd., 2018, Kacar vd., 2019). Bundan dolayı akrilamite karşı koruyucu etki göstermesi gereken maddelerin akrilamit kaynaklı apoptozda azaltması gerekmektedir. Çalışmamızda akrilamitin indüklediği apoptozu koruyucu olarak kullandığımız timokinon ve kuersetinin engelleyip engellemediğini ve engelliyorsa ne derece engellediklerini araştırdık.

2.8. Otofaji

Otofajik hücre ölümünde en açık morfolojik farklılık, hücre sitoplazmasında çok tabakalı zarla çevrili, mitokondri ve çeşitli organelleri de içerebilen veziküllerin oluşmasıdır. Otofajik veziküller otofajinin ilerleyen aşamalarında lizozomlarla birleşerek, lizozomal enzimlerce taşıdıkları madde ve atıkların parçalanmasına neden olurlar. Otofaji olarak isimlendirilen bu olay kendi kendini yemek manasındadır. Otofaji hakkında yaygın görüş, apoptozun gerçekleşmesinin daha zor veya olanaklı olmadığı hücre şartlarında, uyarıcı tipi, uyarma şekli ve şiddetiyle değişen bir şekilde hücrenin bu ölüm şeklini seçmesidir (Glick, Barth, & Macleod, 2010).

Otofaji besin azlığı veya mTOR yolağının inaktivasyonu ile tetiklenir. Sitolitik proteinler ve yaşlanan organeller çift zarlı vezikülle çevrelenerek otofagozomu meydana getirirler. Otofajinin en önemli belirteçlerinden biri sitoplazmadan bulunan LC3 proteinin otofagozoma alınmasıdır. Daha sonra otofagozom hücrede lizozom organeliyle birleşir ve LC3 proteiniyle beraber, içeriği burada parçalanır. LC3 otofajinin görüntülenmesinde belirteç olarak kullanılabilir (Shvets, Fass, & Elazar, 2008).

Otofaji ve akrilamitle ilişkili bir bilimsel boşluk vardır. Bizim bilgimiz dahilinde literatürde akrilamit ve otofajiyle ilişkili sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde akrilamit uygulanması

bu hücrelerde otofajiyi indüklediği ve otofajik veziküllerin birikmesine neden olduğu bildirilmiştir (Song vd., 2017). Bu bilimsel boşluğun doldurulması için çalışmamızda akrilamitin otofajiyi nasıl etkilediği ve buna karşın timokinon ve kuersetinin nasıl bir koruma sağladığını araştırdık.



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasallar

Akrilamit (A9099, \geq %99), MTT, penisillin-streptomisin, high glucose DMEM, tripsin-EDTA ve DMSO Sigma Aldrich'ten (St Louis, Missouri, USA); timokinon (AB 142560, %98) ve kuersetin (AB 121197, %97) abcr'den satın alındı (Karlsruhe, Germany). Muse™ Annexin V & Dead Cell, Caspase-3/7, Oksidatif Stress ve Autophagy LC3-antibody-based kitleri Merck Millipore Şirketinden (Hayward, CA, USA) satın alındı. C6 hücre hattı Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ABD üyesi olan Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU'dan temin edilmiştir.

3.2. Hücre Kültürü

C6 sıçan glioblastoma hücreleri hücre kültürü laboratuvarında steril %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklıkta kontrollü şartlar altında büyütüldü.

3.2.1. Hücre hattı ve besi ortamı

Çalışmamızda C6 sıçan glioblastoma hücre hattı kullanıldı. Hücre süspansiyonu; %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren 10 mL yüksek glikoz içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyeri içerisine alındı. -80°C'de viallerde DMSO (dimetil sülfoksit) ile dondurulmuş olarak saklanan hücreler 10 mL besiyeriyle beraber 15 mL'lik falkon tüpe alınarak 10 dakika boyunca 150 g'de santrifüj yapıldıktan sonra üstte kalan sıvı tarafı atıldı ve hücre peletine hazır besiyeri (10 mL kadar) eklenerek hücreler 25 cm² flasklarda açıldı. Hücreler yapıştıktan ve büyüdüktan sonra tripsin-EDTA (etilendiamin tetra asetik asit) ile kaldırılarak 75 cm²lik flasklara aktarıldılar. Eskiyen besiyerlerinin boşaltılarak, yeni besiyeriyle 2-3 günde bir değiştirilmesine dikkat edildi. Hücrelerin çoğalma durumu inverted mikroskop ile kontrol edildi. Hücrelerin logaritmik faza girdiğinden emin olunduktan sonra deneylere alındı. Deney aşamasında genel olarak, flasklarda yeterli doluluğa ulaşan hücrelerin eski besiyerleri atıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 5 dakika PBS-EDTA ile yıkandı ve sonrasında %0.25 tripsin ile 5 dakika 37 °C'de

inkübatörde bekletildi ve böylece tabandan kopmaları sağlandı. 15 mL'lik falkona aktarılan hücreler 4 °C ve 150 g'de 10 dakika döndürüldü. Santrifüj sonunda sıvı kısım atıldı ve alltaki katı kısım olan pelet ise besiyeri ile süspanse edildi. Hücreler sayılırken ise hücrelerin olduğu süspanse kısım sıvı kısımdan iyice karıştırılarak 10 µL alındı ve Thoma lamı üzerine konuldu. 1 mL'deki hücre sayısı Thoma lamı yardımıyla ölçüldü.

3.2.2. Maddelerin stok solüsyonlarının hazırlanması

Akrilamitin stok solüsyonu 5 M konsantrasyonda steril distile su içerisinde, timokinonun ve kuersetinin stok solüsyonları her biri 100 mM olarak DMSO içerisinde hazırlandı. Her bir stok solüsyon 1.5 mL olarak hazırlandıktan sonra 50 µL olarak tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı. Akrilamit (Kacar vd., 2017c), timokinon (Fouda, Daba, & Ahmed, 2014) ve kuersetin (Li vd., 2018a) dozlarının stok doz miktarı ve MTT uygulama süresi yapılan literatür taraması sonrasında karar verilmiştir.

3.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücreler akrilamit ile muamele edildikten sonra hücre canlılığı MTT yöntemiyle belirlendi. Akrilamitin dozları hücrelere 0-100 mM arasında herbir doz yarıya indirilerek uygulandı. Timokinon ve kuersetinin dozları ise hücrelere 0-1000 µM arasında yine herbir doz yarıya indilerek uygulandı.

3.3.1. MTT testi

MTT kolorimetrik testi canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesine dayanır. Canlı hücrelerde dehidrojenaz enzimi aktivitesi gözlemlenirken, ölen hücrelerde gözlemlenmemektedir. Hücrelere uygulanan kimyasal maddelerin hücreyi öldürmesi veya çoğalmasını durdurması, hücre dehidrojenaz enzim aktivitesine göre saptanır. Hücreler, MTT maddesini kendi içine alarak mitokondriyal dehidrojenaz enzimleriyle koyu mavi-mor renkli katı formazan kristallerine çevirirler. Daha az hücre ve canlılık içeren kuyularda daha az formazan tuzu, daha fazla canlı hücre içeren kuyualarda ise daha çok formazan kristali oluşur. Sonrasında DMSO ile bu mavi kristaller çözdürülür ve ELISA okuyucuda kolorimetrik olarak ölçülür. Test yapılırken

C6 hücreleri flasklardan kaldırılarak 96'lı plakalara her bir kuyu 5×10^3 hücre içerecek şekilde ekildi. Hücrelere 24 saat boyunca akrilamid (0-100 mM), timokinon (0-1000 μ M) veya kuersetinin (0-1000 μ M) farklı dozları verildi. Uygulama süresi bittikten sonra hücrelerin besiyerleri atıldı ve üzerlerine 100 μ L 1:10 oranında besiyeri ile seyreltilmiş 2.0 mg/mL MTT verildi. En az 3 saat 96'lı plaklar 37 °C, CO₂ içeren inkübatöre bekletildi. İnkübasyon sonrasında 96'lı plaka ters çevrilerek döküldü. Herbir kuyucuğa 100 μ L DMSO konularak formazan kristalleri çözüldü ve 96'lı plak ELISA okuyucuda 570 nm'de okutuldu.

Canlılık hesabı (%): Uygulanan maddelere (akrilamid-kuersetin-timokinon) maruz bırakılmış hücrelerdeki canlılık yüzdeleri hiçbir madde verilmeyerek kontrol hücresi olarak kullanılan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek saptandı. Yani kontrol hücresi %100 canlı olarak kabul edildi ve diğer hücrelerin canlılığı kontrole göre oranlanarak hesaplandı. Buna göre hücrelerin canlılık oranı aşağıdaki formüle göre yapıldı:

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{100 \times (\text{Örneğin Absorbansı} - \text{Blankin absorbansı})}{(\text{Kontrolün Absorbansı} - \text{Blankin absorbansı})}$$

3.4. Anneksin V Yöntemi

Akrilamidin hücreler üzerindeki sitotoksitesine ve apoptotik etkisine anneksin V yöntemi ile Muse™ Annexin V & Dead Cell kiti kullanılarak bakıldı. Normalde hücre zarının iç yüzeyine bakan fosfolipid sırada yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre apoptoza gittiğinde zarın dış yüzeyindeki sıraya geçer. Bu yer değiştirmenin önemi apoptozda erken safhalarda gerçekleşmiş olmasıdır ki hücre zarı henüz bütünlüğünü kaybetmemiştir. Bu sayede erken apoptozdan söz edilebilir. Hücrenin dış yüzeyine geçen fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olan anneksin V, floresan isotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir. Bu testte FITC-anneksin V bileşiminin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı ölçülür (Vermees, Haanen, Steffens-Nakken, &

Reutelingsperger, 1995). Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de anneksin V bağlanması görülebildiği için apoptoz kriteri olarak ikinci boya olan 7-amino-actinomycin D (7-AAD) kullanılır. 7-AAD ise hücre ölümü belirtecidir. Canlı hücreler ve erken apoptotik hücreler bu boyayı hücre içine almazken, hücre zarı bütünlüğünü kaybetmiş ölü hücreler boyayı alır ve floresan ışımaya yapar (Schmid, Krall, Uittenbogaart, Braun, & Giorgi, 1992). Deneye için C6 hücreleri flasklardan kaldırılarak 24'lük plakalara her bir kuyu 5×10^4 hücre içerecek şekilde ekildi. Hücrelere gerekli maddeler verildikten sonra besiyerleri atıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Sonrasında hücreler PBS-EDTA ile yıkanarak tripsin-EDTA'da 5 dakika bekletildi. Kaldırılan hücreler 150 g'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve pelete %1 FBS içeren taze besiyeri eklendi. 100 μ L kadar anneksin V ve propidium ioditi içeren solüsyon Ependorf tüplere aktarıldı. Sonra üzerine hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 μ L kadar eklendi. Bu iki solüsyon karanlıkta 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra hücreler Muse™ Cell Analyzer (Merck Millipore, Hayward, CA, USA) ile analiz edildi.

3.5. Kaspaz 3/7 Aktivite Ölçümleri

Akrilamitin hücrelerdeki kaspaza etkisi Muse™ Caspase-3/7 kiti ile bakıldı. Deneyde kaspaz 3/7 reagenti ve bir hücre ölüm belirteci olan 7-AAD kullanılmaktadır. Kaspaz 3/7 reagenti hücre zarından geçebilir, hücrelere toksik değildir ve DNA bağlayıcı bir boyayı içerir. Bu boya kaspaz 3/7'nin kesme bölgelerini içeren DEVD adlı substrata bağlıdır ve bu substrata bağlı olduğunda boya DNA'ya bağlanamaz. Hücrede aktif kaspaz 3/7'nin varlığında ise kaspazlar DEVD sekansını keser ve boya serbest kalır, çekirdekteki DNA'ya geçer ve floresan ışımaya verir. Bu ışımamanın çokluğu aktif kaspaz 3/7 miktarıyla doğru orantılıdır (Cen, Mao, Aronchik, Fuentes, & Firestone, 2008). Ölen ve zar bütünlüğü bozulan hücrelerin ayrılması için ikinci bir boya olarak floresan ışımaya yapan 7-AAD kullanılır. Deney için C6 hücreleri flasklardan kaldırılarak 24'lük plakalara her bir kuyu 5×10^4 hücre içerecek şekilde ekildi. Hücreler kontrol, akrilamit, kuersetin+akrilamit ve timokinon+akrilamit olarak 4 gruba bölündü. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir madde

uygulanmadı. Akrilamit grubu hücrelerine 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+timokinon grubu hücrelerine 24 saat boyunca 3.9 µM timokinon ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+kuersetin grubu hücrelerine ise önce 24 saat boyunca 2.0 µM kuersetin ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Uygulamaların sonunda hücrelerin besiyerleri atıldı ve hücreler PBS ile yıkamaya tabi tutuldu. Sonrasında hücreler PBS-EDTA ile yıkanarak tripsin-EDTA'da 3-5 dakika bekletildi. Kaldırılan hücrelere besiyeri ilave edilerek 150 g'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve pelete %1 FBS içeren taze besiyeri eklendi. Önce kaspaz 3/7 reagenti 1/8 oranında kitle beraber sağlanan PBS ile seyreltilerek kaspaz çalışma solüsyonu hazırlandı. Ayrıca, bir hücre ölüm belirteci olan 7-AAD'den 2 µL alınarak ve kitle birlikte sağlanan 148 µL tampon çözeltisiyle karıştırılarak kaspaz 7-AAD çalışma solüsyonu hazırlandı. Daha sonra 5 µL kaspaz çalışma solüsyonu 50 µL hücre süspansiyonuna eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda süspansiyona 150 µL kadar 7-AAD çalışma solüsyonundan eklendi ve hücreler Muse™ Cell Analyzer ile analiz edildi.

3.6. Otofaji Aktivitesinin Belirlenmesi

Otofajik aktivite Muse™ Autophagy LC3-antibody-based kit ile yapıldı. Artan bilgi birikimi hücre ölümüne sadece apoptozun değil, otofajinin de katkıda bulunduğunu göstermiştir. Kısaca bahsetmek gerekirse, otofaji besin yetersizliği veya eksikliği veya mTOR yolağının inhibisyonu ile başlar. Otofaji esnasında sitozolik proteinler ve yaşlanan organeller çift zarlı vezikülle sarılarak otofagozom oluşturulur. Otofajinin en önemli belirteçlerinden biri LC3 proteinin sitozolden otofagozoma geçmesidir. Bu süreç sonrasında otofagozom lizozomla birleşir ve LC3 proteiniyle beraber, içeriği burada parçalanır. LC3 işaretlenerek otofaji görüntülenebilir (Shvets, Fass, & Elazar, 2008). Deney için C6 hücreleri flasklardan kaldırılarak 24'lük plakalara her bir kuyu 5×10^4 hücre içerecek şekilde ekildi. Hücreler kontrol, akrilamit, kuersetin+akrilamit ve timokinon+akrilamit olarak dört gruba bölündü. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir madde uygulanmadı. Akrilamit grubu

hücrelerine 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+timokinon grubu hücrelerine 24 saat boyunca 3.9 µM timokinon ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+kuersetin grubu hücrelerine ise 24 saat boyunca 2.0 µM kuersetin ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Uygulamaların sonunda, hücreler kitle birlikte verilen otofaji A reagenti ile 6 saat boyunca inkübe edildi. Sonrasında hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Kaldırılan hücrelere besiyeri ilave edildi ve hücreler 150 g'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Her bir hücre peleti 5 µL antikor ve 95 µL otofaji reagenti B karışımı ile 30 dakika inkübe edildi. Hücreler 10 dakika 150 g'de döndürüldü. Son olarak, hücre peletine 200 µL tampon solüsyonu eklendi ve Muse™ Cell Analyzer ile analiz edildi.

3.7. Oksidatif Stresin Ölçülmesi

Oksidatif stress ölçümü Muse® Oxidative Stress Kit ile yapıldı. Kısaca, ölçümde dihidroetidiyumdan yararlanıldı. Dihidroetidiyum reagentinin hücre zarından geçebilme özelliği vardır ROS'un varlığında oksidasyona uğrar. Oksidasyon sonucunda DNA'ya bağlanabilen bir florofor olan etidiyum bromit oluşur ve bu boya kırmızı floresan ışımaya yapar. Kırmızı floresan ışımının oranı serbest radikal miktarıyla doğru orantılıdır (Bindokas, Jordan, Lee, & Miller, 1996). Deney için C6 hücreleri flasklardan kaldırılarak 24'lük plakalara her bir kuyu 5×10^4 hücre içerecek şekilde ekildi. Hücreler kontrol, akrilamit, kuersetin+akrilamit ve timokinon+akrilamit olarak dört gruba bölündü. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir madde uygulanmadı. Akrilamit grubu hücrelerine 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+timokinon grubu hücrelerine 24 saat boyunca 3.9 µM timokinon ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+kuersetin grubu hücrelerine ise 24 saat boyunca 2.0 µM kuersetin ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Uygulamaların sonunda hücrelerin besiyerleri atıldı ve hücreler PBS ile yıkamaya tabi tutuldu. Sonrasında hücreler PBS-EDTA ile yıkanarak tripsin-EDTA'da 3-5 dakika bekletildi. Kaldırılan hücrelere besiyeri ilave edilerek 150 g'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre peleti oksidatif stres kitinde

sağlanan tampon çözeltisiyle süspansiyon edildi. Daha sonra oksidatif stres reagenti tampon çözeltisiyle 1:100 oranında seyreltilerek ara solüsyon yapıldı. Bu ara solüsyon da tampon çözeltisiyle 1:80 oranında seyreltilerek oksidatif stress çalışma solüsyonu hazırlandı. Tampon çözeltisiyle hazırlanan hücrelerden 10 µL ve oksidatif stres çalışma solüsyonundan 190 µL alınarak 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler Muse™ Cell Analyzer ile analiz edildi.

3.8. Nrf2 İmmünohistokimya Boyaması

İlk olarak, daha önceden kaldırılmış olan C6 hücreleri 6'lı plakalar üzerine her bir kuyu 3×10^5 hücre içerecek şekilde ekildi. Hücreler kontrol, akrilamit, kuersetin+akrilamit ve timokinon+akrilamit olarak dört gruba bölündü. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir madde uygulanmadı. Akrilamit grubu hücrelerine 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+timokinon grubu hücrelerine 24 saat boyunca 3.9 µM timokinon ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+kuersetin grubu hücrelerine ise 24 saat boyunca 2.0 µM kuersetin ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Hücrelere gerekli maddeler uygulandıktan ve üzerinden yeterli süre geçtikten sonra hücreler üzerindeki besiyeri atıldı ve hücreler 6'lı plakalar içerisinde PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler %3.7 formaldehit ile fikse edildi ve tekrar PBS ile 3 kez yıkandı. Daha sonra triton X ile muamele edilerek hücre üzerindeki porların daha açık hale gelmesi sağlandı. Takiben, hücreler yıkanarak bloklandı. Daha sonra, bir gece 4 °C'de bekletilerek primer antikor, ertesi gün sekonder antikor uygulandı ve hücreler AEC kromoforu ile muamele edildi. Renk değişimi görüldükten sonra hücreler su bazlı yapıştırma materyali ile lam üzerinde kapatıldı.

3.9. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) İncelemesi

C6 hücreleri 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe 75 cm²'lik flasklarda büyütüldüler. Yeterince büyüdükten sonra flasklar kontrol, akrilamit, akrilamit+timokinon ve akrilamit+kuersetin olmak üzere dört ayrı gruba

bölündü. İlk gün akrilamit+timokinon ve akrilamit+kuersetin gruplarına 24 saat boyunca timokinon (3.9 µM) veya kuersetin (2.0 µM) verildi. Ertesi gün akrilamit içeren gruplara (akrilamit, akrilamit+timokinon ve akrilamit+kuersetin grupları) 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Madde uygulaması bitiminde hücrelerin besiyerleri boşaltıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Ardından PBS-EDTA ile 3 dakika 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe bekletildi ve 5 dakika boyunca tripsin-EDTA eklendi ve inkübatörde bekletilmeye devam edildi. Mikroskop altında hücrelerin kalktığından emin olunduktan sonra hücrelerin üzerlerine en az konulan tripsin-EDTA miktarının 2 katı kadar olacak şekilde besiyeri eklendi. Hücreler toplandı ve 15 mL falkon tüplere alınarak 150 g'de 5 dakika katı ve yapışkan bir pelet oluşmayacak şekilde döndürülerek çöktürüldü. Daha sonra TEM doku takibi prosedürüne geçildi.

- Fosfat Tamponu Hazırlanışı: Na₂HPO₄ ve KH₂PO₄ karıştırılarak, tampon solüsyonu hazırlandı.
- Glutaraldehit Fiksatifinin Hazırlanışı: %25'lik fiksatiften PBS ile seyreltilerek %3 tamponlanmış glutaraldehit hazırlandı.

Pelet halinde 15 mL'lik konik Falkon tüpün dibinde bulunan hücrelerin üzerine 500 µL %3 glutaraldehit konularak hücreler 4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

- Osmiyum tetraoksitin hazırlanması: 100 mg osmiyum içeren cam ampul 500 µL PBS içerisinde bir gün önceden kırıldı ve bir gece 4 °C'de çözünmeye bırakıldı.

Ertesi gün glutaraldehit solüsyonlarını içeren Falkon tüpleri PBS ile yıkanarak 3 kez 150 g'de herbiri 5 dakika olmak üzere santrifüj edildi. Falkon tüpleri alüminyum folyo ile güzelce sarıldı. Daha sonra bir gün önceden kırılmış PBS'de çözülmüş osmiyum tetraoksitten herbir örnek için 500 µL ve PBS'den de aynı hacimde alınarak Falkon tüplerde bulunan hücre peletlerinin üzerine konuldu. Falkon tüpleri 2 saat boyunca rotatorda döndürmeye

bırakıldı. 2 saatlik döndürmeden sonra hücreler herbiri PBS ile herbiri 5'er dakika olmak üzere 3 kez yıkanarak 150 g'de 5'er dakika santrifüj edildi.

- Alkol serilerinin hazırlanışı: %50, %80 ve %96'lık etilalkol serileri hazırlandı.

Son PBS ile yıkamadan sonra hücreler düşükten yükseğe doğru alkol serilerinden geçirildi. Dehidrasyon için hücreler ilk 10 dakika boyunca %50'lik, sonra 10 dakika boyunca %80'lik ve en sonunda 5 dakika boyunca %96'lık alkole alındılar. Herbir alkol aşamasından sonra hücre kaybının engellenmesi için kısa süreli (1 veya 2 dk) maksimum 200 g'yi geçmeden santrifüj yapıldı. Şeffaflandırma aşamasında ise hücreler 10'ar dakika aralarla 4 °C'de propilen oksit içerisinde bekletildiler.

- Resin Solüsyonunun Hazırlanması: Resin solüsyonu hazırlanırken 20 mL Araldit CY212, 20mL DDSA, 0.6 mL BDMA ve 1 mL dibütilfitalat kullanıldı.

Propilen oksit inkübasyonunun ardından propilen oksit (1 mL)+resin (1 mL) solüsyonunda 30 dakika bekletildi. Takiben, hücreler saf resine alındı ve gece boyu 4 °C'de bekletildi. Ertesi gün taze hazırlanmış resinle bloklama işlemi yapıldı. Hücre peletleri gömülürken peletin bloğun uç kısımlarına gelmesine dikkat edildi ve blok içerisine kurşun kalemle etiketleme yapıldı.

Bloklar önce 24 saat boyunca 45 °C'de ve sonra 24 saat boyunca 60 °C'de ayarlanmış etüv içerisinde bekletildi. Ertesi gün etüv kapatıldı ve blokların kendiliğinden soğuması beklendi. Hazırlanan bloklardan ultramikrotom ile kesitler alınarak gridler üzerine yerleştirildi.

- Uranil Asetat Boyasının Hazırlanması: 80 mL metil alkol, 2 g uranil asetat ve 20 mL distile su ile hazırlandı ve süzüldü.
- Kurşun Sitrata Boyasının Hazırlanması: 5 mL su içerisinde 2 g 10 N NaOH ve 50 mL distile su içerisinde 200 mg kurşun sitrat karıştırılarak kuvvetlice çalkalandı ve pH 12'ye ayarlandı.

Gridler üzerindeki kesitler uranil asetat boyası içerisinde en az 45 dakika bekletildi ve distile su ile yıkandı. Sonrasında kurşun asetatla boyandı ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama Merkezi'nde (ARUM) elektron mikroskopuyla (JEOL JEM-1220, USA) incelendi.

3.10. Konfokal Mikroskop İncelemesi

İlk olarak, daha önceden kaldırılmış olan C6 hücreleri 6'lı plakalar üzerine her bir kuyu 3×10^5 hücre içerecek şekilde ekildi. Hücreler kontrol, akrilamit, kuersetin+akrilamit ve timokinon+akrilamit olarak dört gruba bölündü. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir madde uygulanmadı. Akrilamit grubu hücrelerine 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+timokinon grubu hücrelerine 24 saat boyunca 3.9 μM timokinon ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Akrilamit+kuersetin grubu hücrelerine ise 24 saat boyunca 2.0 μM kuersetin ve sonrasında tekrar 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verildi. Deney sonunda hücreler üzerindeki besiyeri atıldı ve hücreler 6'lı plaklar içerisinde PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler soğuk metanolle 10 dakika fikse edildi ve tekrar PBS ile 3 kez yıkandılar. Daha sonra, hücreler 30 dakika boyunca karanlık ortamda falloidin-FITC boyasıyla boyandı. Tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra, hücreler DAPI kapatma solüsyonuyla kapatılarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama Merkezi'nde (ARUM) lazer taramalı konfokal mikroskopta (ZEISS LSM 800) incelendi.

3.11. İstatistiksel Analiz

Gruplar arası farklar incelenirken ilk değişkenlerin normal dağılım izleyip izlemediği Shapiro-Wilk normalite testi ile kontrol edildi. Normal dağılım gösteren veriler arasındaki fark tek yönlü varyans analizi ANOVA testi ile yapıldı. ANOVA'da Levene testinde varyansları homojen dağılan veri setine Tukey çoklu karşılaştırma testi, varyansları homojen dağılmayan veri setine ise Tamhane çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Normal dağılım göstermeyen veri setlerinde ise Kruskal-Wallis testi yapıldı. İstatistiksel

anlamlılık $p < 0.05$ ise * ile $p < 0.01$ ise ** ile ve $p < 0.001$ ise *** şeklinde ifade edildi.



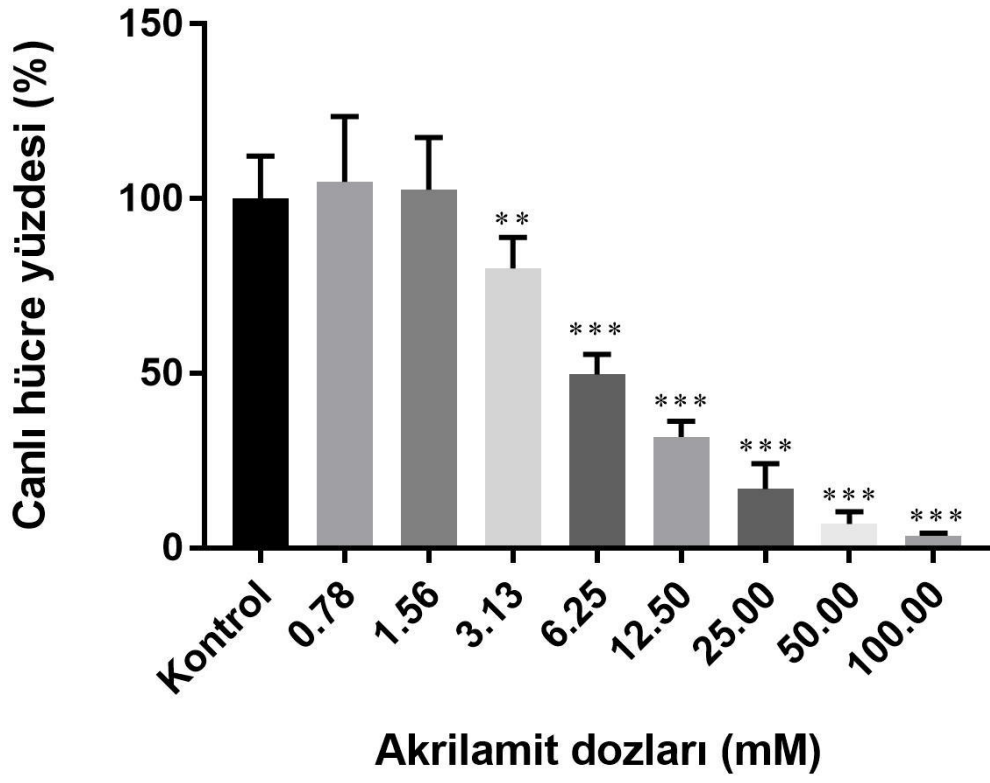
4. BULGULAR

4.1. MTT Sonuçları

MTT sonuçları akrilamit, timokinon ve kuersetin MTT sonuçları olarak 4 altbaşlık altında toplanarak aşağıda verilmiştir.

4.1.1. Akrilamitin MTT'si

Akrilamitin farklı dozları uygulanan C6 hücrelerinde hücre canlılığı sonuçlarına bakıldığında (**Şekil 4.1, Tablo 4.1**), 0.78 ve 1.56 mM akrilamit dozlarında sırasıyla hücre canlılıkları %104.9 ve %102.6 olarak bulunmuş olup kontrol ile aralarında anlamlı bir istatistiksel fark saptanmamıştır ($p>0.05$). 3.13 mM akrilamit dozunda ise hücre canlılığı %20 azalarak %80'lere düşmüştür ve kontrolden istatistiksel olarak anlamlı bir düşme görülmüştür ($p<0.01$). 6.25 mM akrilamit dozuna bakıldığında yaklaşık hücrelerin yarısı inhibe olmuştur ve canlılık %49.7 olarak bulunmuştur. Ayrıca, 6.25 mM akrilamit verilen hücrelerde kontrole göre istatistiksel anlamlılık derecesi $p<0.001$ 'e yükselmiştir. 12.5 mM akrilamit dozunda hücre canlılığı %31.8 iken 25 mM akrilamit dozunda ise %16.9 olarak bulundu (her ikisi de $p<0.001$). 50 ve 100 mM akrilamit dozları incelendiğinde hücre canlılık oranlarının %10'dan daha aşağıları indiği saptandı. Bu çalışmada akrilamitin IC50 değeri 6.22 mM olarak hesaplanmıştır. Sonraki deneylerde 4 mM akrilamit dozununun C6 hücrelerinde toksik etki oluşturmada kullanılmasına karar verilmiştir. Akrilamitin hücrelere geri dönüşümsüz hasar vermesinden kaçınılmak istenmesinden dolayı çok yüksek akrilamit dozları yerine 4 mM akrilamit kullanılmıştır.



Şekil 4.1 Akrilamit verilen C6 glioblastoma hücrelerinin canlılık oranları. ** ve *** kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ anlamlı farkı gösterir.

Tablo 4.1 MTT sitotoksosite testinde verilen akrilamid dozlarına göre hücre canlılığı yüzdesi ve istatistiksel anlamlılık dereceleri.

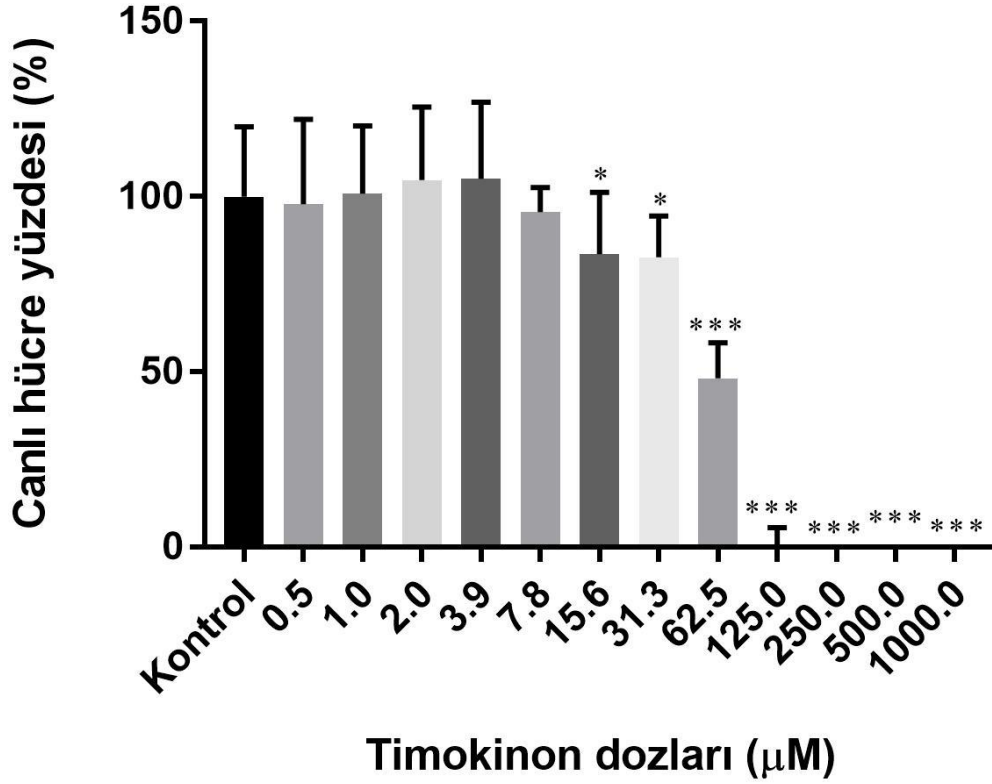
Akrilamid dozu (mM)	Hücre canlılığı (%) (ortalama±SS)	p değerleri
Kontrol	100.0 ± 12.9	-----
0.78	104.9 ± 18.8	ns
1.56	102.6 ± 14.9	ns
3.13	80.0 ± 8.9	<0.01*
6.25	49.7 ± 5.7	<0.001*
12.5	31.8 ± 4.5	<0.001*
25.0	16.9 ± 7.3	<0.001*
50.0	7.0 ± 3.4	<0.001*
100.0	3.6 ± 0.8	<0.001*

* Kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı farkı **ns** ise anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir.

4.1.2. Timokinonun MTT'si

Timokinonun farklı dozları uygulanarak C6 hücrelerine timokinonun zarar vermeyen veya proliferasyonunu destekleyen dozları arandı. Hücre canlılığı sonuçlarına bakıldığında (**Şekil 4.2, Tablo 4.2**)125 µM ve üstü dozlarda (125, 250, 500 ve 1000 µM) C6 hücrelerinde herhangi bir canlılığa rastlanmadı. 62.5 µM timokinon dozunda ise hücre canlılığı kontrole göre %48.2 (p<0.001); 15.6 ve 31.3 µM timokinon dozlarında ise sırasıyla %83.5 ve %82.7'ye kadar geriledi (p<0.05). 7.8 µM timokinon dozundaki hücre canlılığı ise %95.6 idi ve kontrole arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05). 0.5,

1.0, 2.0 ve 3.9 μM timokinon dozlarında da canlılık kontrol grubundaki canlılığa benzerdi ve kontrollerle aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Timokinonun olası koruyucu dozu olarak 3.9 μM belirlendi ve sonraki deneylere bu dozla devam edildi.



Şekil 4.2 Timokinon verilen C6 glioblastoma hücrelerinin canlılık oranları. * ve *** kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.001$ anlamlı farkı göstermektedir.

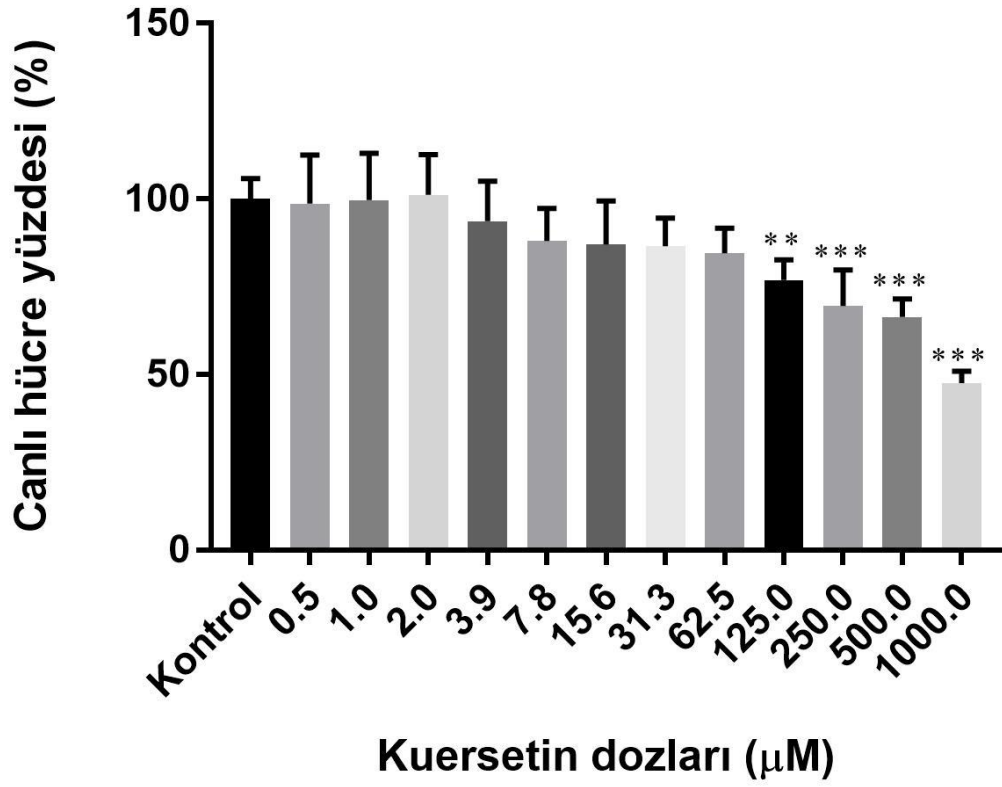
Tablo 4.2 MTT sitotoksosite testinde verilen timokinon dozlarına göre hücre canlılığı yüzdesi ve istatistiksel anlamlılık dereceleri.

Timokinon dozu (μM)	Hücre canlılığı (%) (ortalama\pmSS)	p değerleri
Kontrol	100.0 \pm 19.9	-----
0.5	97.8 \pm 24.4	ns
1.0	100.8 \pm 19.3	ns
2.0	104.7 \pm 20.9	ns
3.9	105.0 \pm 21.9	ns
7.8	95.6 \pm 7.0	ns
15.6	83.5 \pm 17.7	<0.05*
31.3	82.7 \pm 11.7	<0.05*
62.5	48.2 \pm 10.1	<0.001*
125.0	0.26 \pm 5.3	<0.001*
250.0	0.0 \pm 3.0	<0.001*
500.0	0.0 \pm 2.8	<0.001*
1000.0	0.0 \pm 1.2	<0.001*

* Kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı farkı **ns** ise anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir.

4.1.3. Kuersetinin MTT'si

Kuersetinin farklı dozları uygulanarak C6 hücrelerine kuersetinin zarar vermeyen veya proliferasyonunu destekleyen dozları arandı. Hücre canlılığı sonuçlarına bakıldığında (**Şekil 4.3, Tablo 4.3**) 125 µM ve üstü dozlarda yani 125, 250, 500 ve 1000 µM dozlarında kuersetinin C6 hücrelerinde hücre canlılığını kontrol ile kıyaslandığında sırasıyla %76.9 (p<0.01), %69.5 (p<0.001), %66.5 (p<0.001) ve %47.6 (p<0.001) 'ya düşürdüğü gözlemlendi. Kuersetinin 15.6, 31.3 ve 62.5 µM dozlarında ise hücre canlılıkları sırasıyla %87, 86.8 ve 84.6'ya inince de kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05). Kuersetinin 3.9 ve 7.8 µM dozlarında ise anlamlı bir canlılık düşüşü olmasa da hücre canlılığı kontrolden düşük olarak saptandı (p>0.05). Kuersetinin 0.5, 1.0 ve 2.0 µM dozlarında ise hücre canlılıkları kontrole oldukça benzer bulunmuş olup bu dozlar hücre canlılığında önemli bir azalmaya yol açmamıştır. Bunlar arasında 2 µM kuersetin dozu hücre canlılığının düşmediği kontrol grubuna yakın canlılık gösteren en büyük kuersetin dozu olduğundan ve kontrol grubuna göre anlamlı fark olmasa da bir miktar proliferasyon görülmektedir. Bundan dolayı kuersetinin olası koruyucu dozu olarak 2.0 µM olarak belirlendi ve sonraki deneylere bu dozla devam edildi.



Şekil 4.3 Kueretin verilen C6 glioblastoma hücrelerinin canlılık oranları. ** ve *** kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ anlamlı farkı göstermektedir.

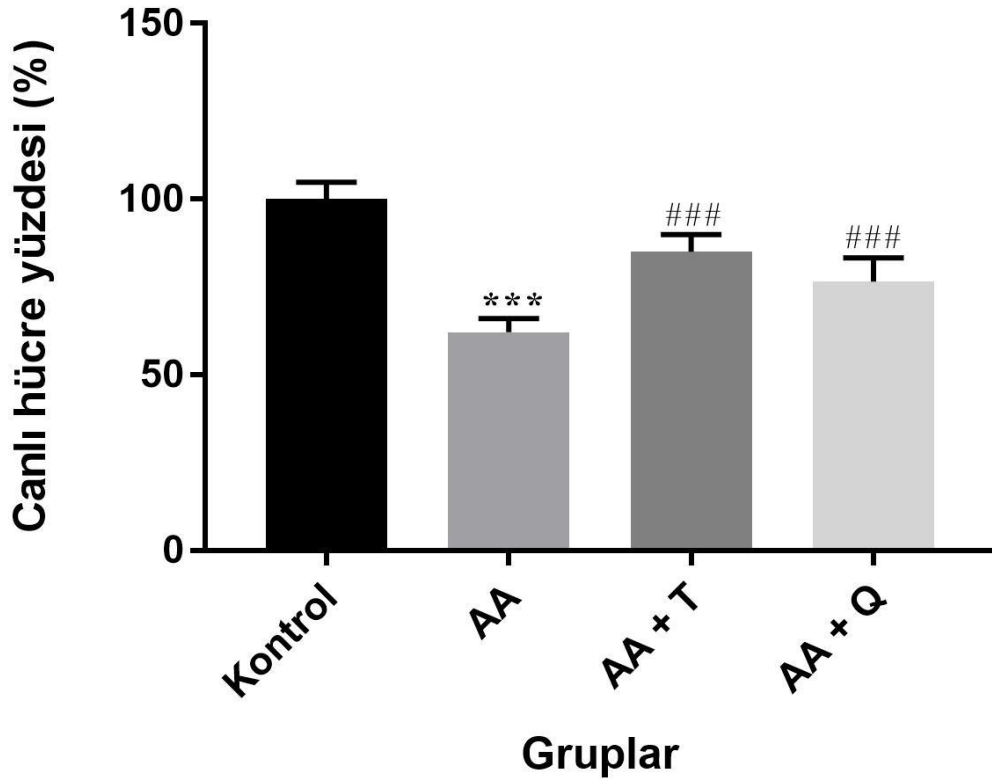
Tablo 4.3 MTT sitotoksisite testinde verilen kuersetin dozlarına göre hücre canlılığı yüzdesi ve istatistiksel anlamlılık dereceleri.

Kuersetin dozu (μM)	Hücre canlılığı (%) (ortalama\pmSS)	p değerleri
Kontrol	100.0 \pm 5.8	-----
0.5	98.7 \pm 13.9	ns
1.0	99.7 \pm 13.4	ns
2.0	101.2 \pm 11.5	ns
3.9	93.7 \pm 11.4	ns
7.8	88.1 \pm 9.2	ns
15.6	87.0 \pm 12.4	ns
31.3	86.6 \pm 8.0	ns
62.5	84.6 \pm 7.1	ns
125.0	76.9 \pm 5.8	<0.01*
250.0	69.5 \pm 10.2	<0.001*
500.0	66.5 \pm 5.1	<0.001*
1000.0	47.6 \pm 3.3	<0.001*

* Kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı farkı **ns** ise anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir.

4.1.4. Timokinon+Akrilamit ve Kuersetin+Akrilamit Gruplarının MTT'si

MTT testinde belirlenmiş akrilamit toksisitesine karşı kullanılacak timokinon ve kuersetin dozları 3.9 ve 2.0 μ M olarak belirlenmiştir. Akrilamit dozu da 4 mM olarak belirlenmiştir. Bu dozlar kullanılarak kontrol, akrilamit, akrilamit+timokinon ve akrilamit+kuersetin grupları oluşturulmuştur. Özetle ilk 24 saat timokinon ve kuersetinin koruyucu dozları uygulanmış, sonrasında 24 saat boyunca akrilamit hücrelere verilmiştir. Buna göre kontrol hücrelerimizin canlılık yüzdesini %100 kabul edip diğer çıkan sonuçlarımızla oranladığımızda akrilamit grubu hücrelerinin canlılık oranı %62.2'lere kadar düştü ve bu düşüş kontrole anlamlı bir fark oluşturdu ($p<0.001$). Akrilamit+timokinon grubunda ise hücre canlılığı korunarak %85.1'lerde kaldı ve bu gruptaki canlılık akrilamit grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdi ($p<0.001$). Akrilamit+kuersetin grubunda ise hücre canlılığı korunarak %76.6 olarak hesaplandı ve bu gruptaki canlılık akrilamit grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.001$) (**Şekil 4.4, Tablo 4.4**).



Şekil 4.4 4.1.4. Timokinon+Akrilamit ve Kuersetin+Akrilamit dozlarının verildiği C6 glioblastoma hücrelerinin canlılık oranları. *** kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ve ### akrilamit grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0.001$ anlamlı farkı göstermektedir. **AA:** Akrilamit, **T:** Timokinon ve **Q:** Kuersetini ifade etmektedir.

Tablo 4.4 MTT sitotoksosite testinde timokinon+akrilamit ve kuersetin+akrilamit dozları verildiğinde hücre canlılığı yüzdesi ve istatistiksel anlamlılık dereceleri.

Gruplar	Hücre canlılığı (%) (ortalama±SS)	p değerleri
Kontrol	100.0 ± 4.8	-----
AA	62.2 ± 3.9	<0.001*
AA+T	85.1 ± 4.9	<0.001#
AA+Q	76.6± 6.8	<0.001#

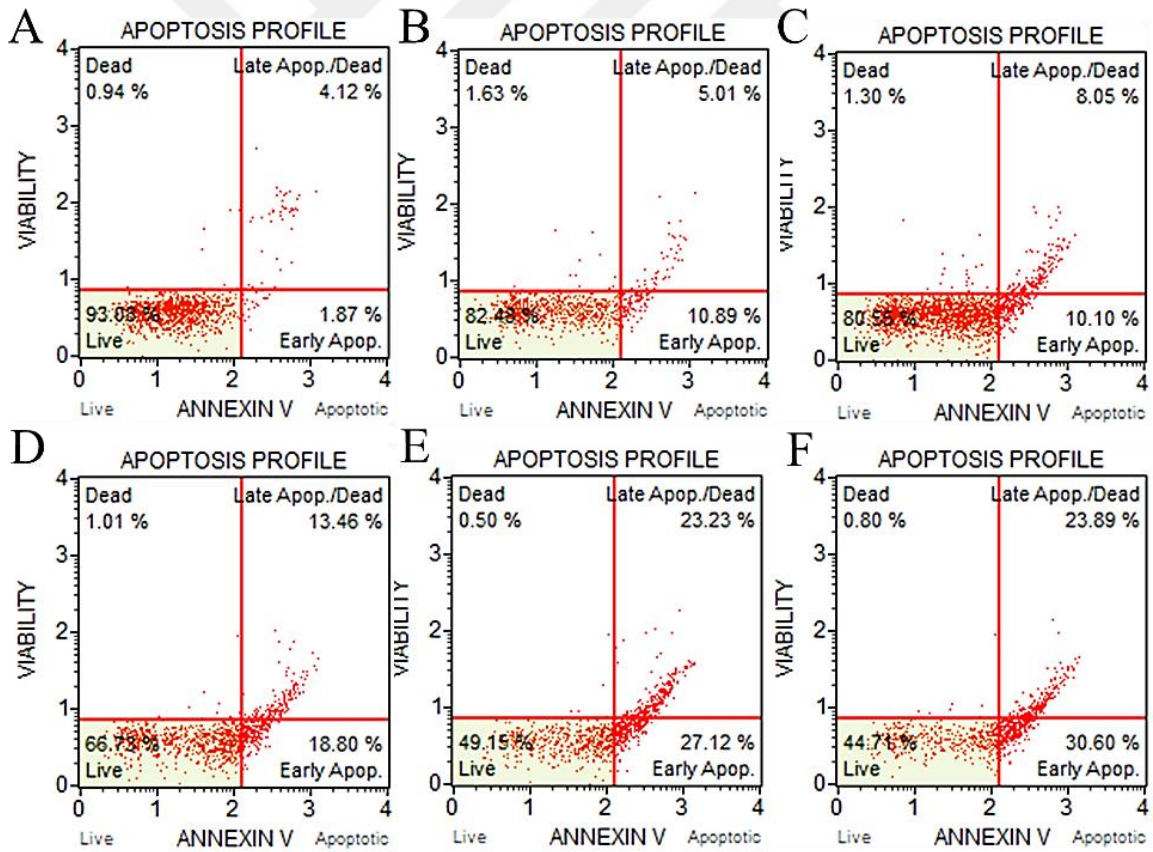
* Kontrolle karşılaştırıldığında ve # akrilamit grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı ifade eder. **AA**: Akrilamit, **T**: Timokinon ve **Q**: Kuersetini ifade etmektedir.

4.2. Anneksin V Sonuçları

Akrilamitin farklı dozları uygulanan hücrelerde bakıldığında herhangi bir kimyasalla muamele edilmeyen C6 hücrelerinde hücre canlılığı %93.08 bulunurken toplam apoptotik hücre oranı %5.99 olarak saptandı (erken apoptotik hücre oranı %1.87 ve geç apoptotik hücre oranı %4.12). 2 mM akrilamit verilen hücrelerde hücre canlılığı %82.48'e düşerken, toplam apoptotik hücre oranı %15.9 olarak bulundu (erken apoptotik hücre oranı %10.89 ve geç apoptotik hücre oranı %5.01). 3 mM akrilamit verilen hücrelerde hücre canlılığı %80.55'e düşerken, toplam apoptotik hücre oranı %18.15 olarak bulundu (erken apoptotik hücre oranı %10.10 ve geç apoptotik hücre oranı %8.05). 4 mM akrilamit verilen hücrelerde hücre canlılığı %66.73'e düşerken, toplam apoptotik hücre oranı %32.26 olarak bulundu (erken apoptotik hücre oranı %18.80 ve geç apoptotik hücre oranı %13.46). 5 mM akrilamit verilen hücrelerde hücre canlılığı %49.15'e düşerken, toplam apoptotik hücre oranı %50,35 olarak bulundu (erken apoptotik hücre oranı

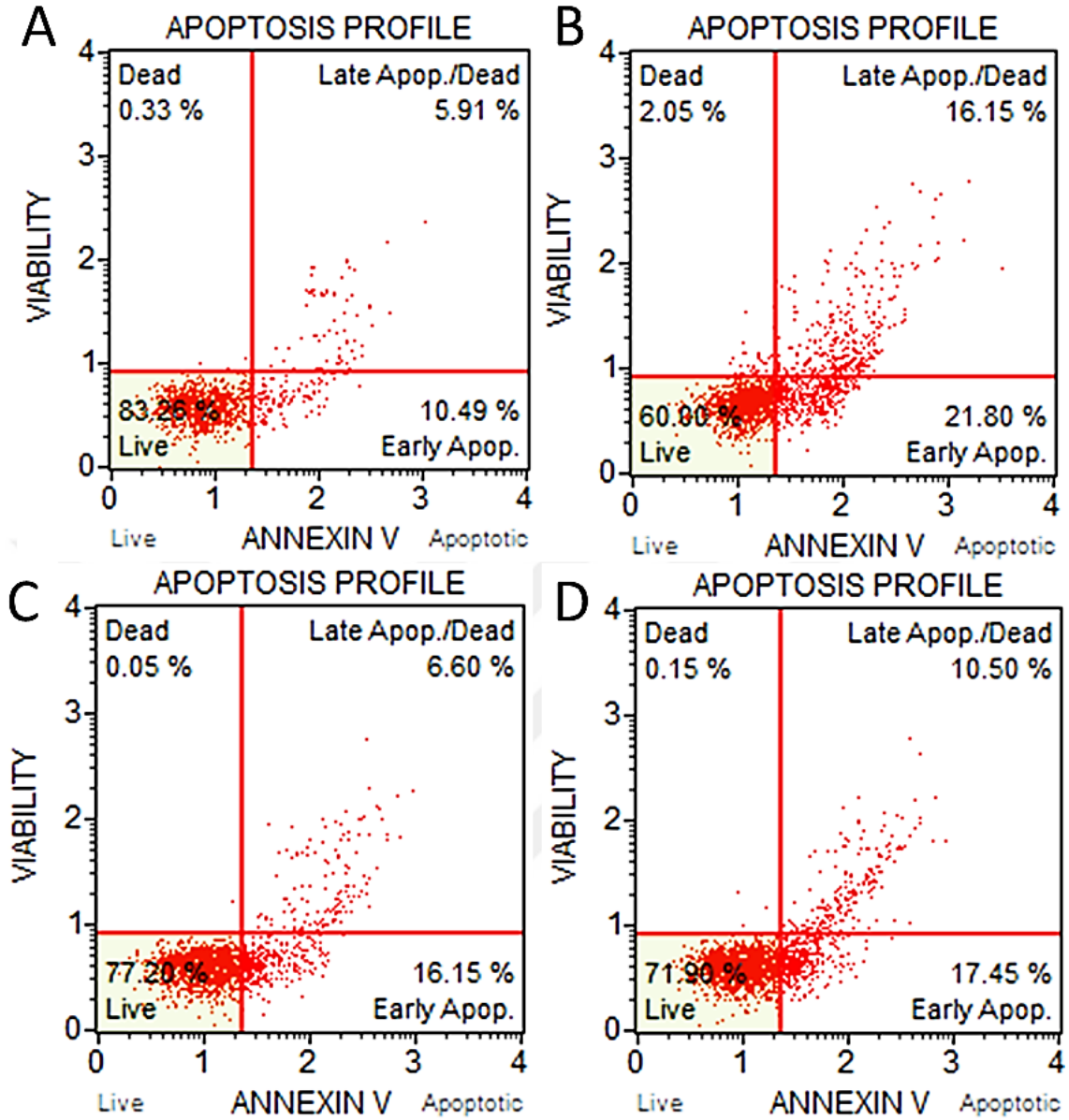
%27.12 ve geç apoptotik hücre oranı %23.23). Son olarak 6 mM akrilamit verilen hücrelerde hücre canlılığı %44.71'e düşerken, toplam apoptotik hücre oranı %54.49 olarak bulundu (erken apoptotik hücre oranı %30.60 ve geç apoptotik hücre oranı %23.89) (Şekil 4.5).

Sadece akrilamitin farklı dozlarının kullanıldığı hücrelerin anneksin V sonuçlarına göre, akrilamitin 5 mM dozda hücre canlılık ve apoptoz oranlarına bakıldığında hücrelerin geri dönüşümü olmayan bir hasara uğrama ihtimalinin olduğu düşünüldü. Akrilamitin 3 mM dozunda ise canlı hücrelerin yeterince hasara uğramama ihtimali vardı, çünkü hücre canlılığı %80'lerdeydi. Bundan dolayı 24 saat akrilamit toksisitesi oluşturmak için 4 mM dozun C6 hücrelerinde bizim deneyimiz için daha uygun olduğunu değerlendirdik.



Şekil 4.5 Akrilamit için anneksin V sonuçları. A: Kontrol, B: 2 mM, C: 3 mM, D: 4 mM, E: 5 mM ve F: 6 mM akrilamit uygulanan hücreler.

Tüm grupların anneksin V sonuçlarına bakıldığında ise herhangi bir kimyasalla muamele edilmeyen C6 hücrelerinde hücre canlılığı %83.26 bulunurken, toplam apoptotik hücre oranı (erken apoptotik hücre oranı %10.49 ve geç apoptotik hücre oranı %5.91 olmak üzere) %16.40 olarak bulundu. Ölü hücre oranı ise %0.33 idi. Akrilamid verilen hücrelerde ise hücre canlılığı %60.00'a düşerken, toplam apoptotik hücre oranı (erken apoptotik hücre oranı %21.80 ve geç apoptotik hücre oranı %16.15 olmak üzere) %37.95 olarak bulundu. Ölü hücre oranı ise %2.05 idi. Timokinonla akrilamid verilmeden önce muamele edilen hücrelerde ise hücre canlılık yüzdesi akrilamid grubuna göre daha yüksekti (%77.20). Toplam apoptotik hücre oranı ise (erken apoptotik hücre oranı %16.15 ve geç apoptotik hücre oranı %6.60 olmak üzere) %22.75 olarak bulundu. Toplam apoptotik hücre yüzdesi akrilamid grubuna göre daha düşüktü. Ölü hücre oranı ise %0.05 idi. Kuersetinle akrilamid verilmeden önce muamele edilen hücrelerde hücre canlılık yüzdesi akrilamid grubuna göre yine daha yüksekti (%71.90). Toplam apoptotik hücre oranı ise (erken apoptotik hücre oranı %17.45 ve geç apoptotik hücre oranı %10.50 olmak üzere) %27.95 olarak bulundu. Toplam apoptotik hücre yüzdesi akrilamid grubuna göre daha düşüktü. Ölü hücre oranı ise %0.15 idi (**Şekil 4.6**).

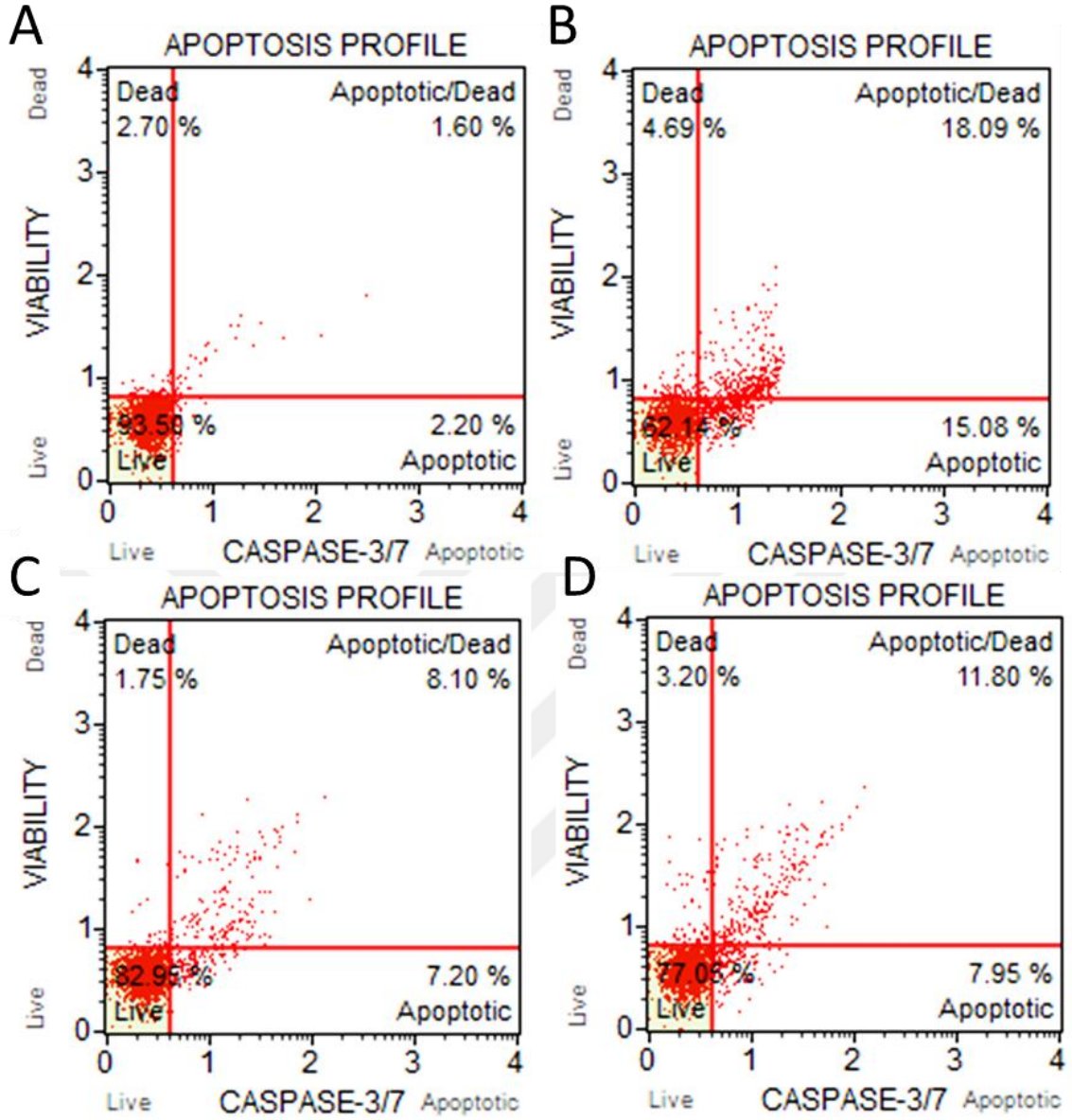


Şekil 4.6 Tüm grupların anneksin V sonuçları. **A:** Kontrol, **B:** Akrilamitle muamelen edilen hücreler, **C:** 3.9 μ M timokinon sonrasında akrilamit uygulanan hücreler, **D:** 2.0 μ M kuersetin sonrasında akrilamit uygulanan hücreler.

4.3. Kaspaz 3/7 Sonuçları

Kaspaz 3/7 sonuçlarına bakıldığında herhangi bir kimyasalla muamele edilmeyen, yani kontrol olarak kullanılan C6 hücrelerinde hücre canlılığı %93.50 bulunurken, toplam apoptotik hücre oranı (erken apoptotik hücre oranı%2.20 ve geç apoptotik hücre oranı %1.60 olmak üzere) %3.80 olarak

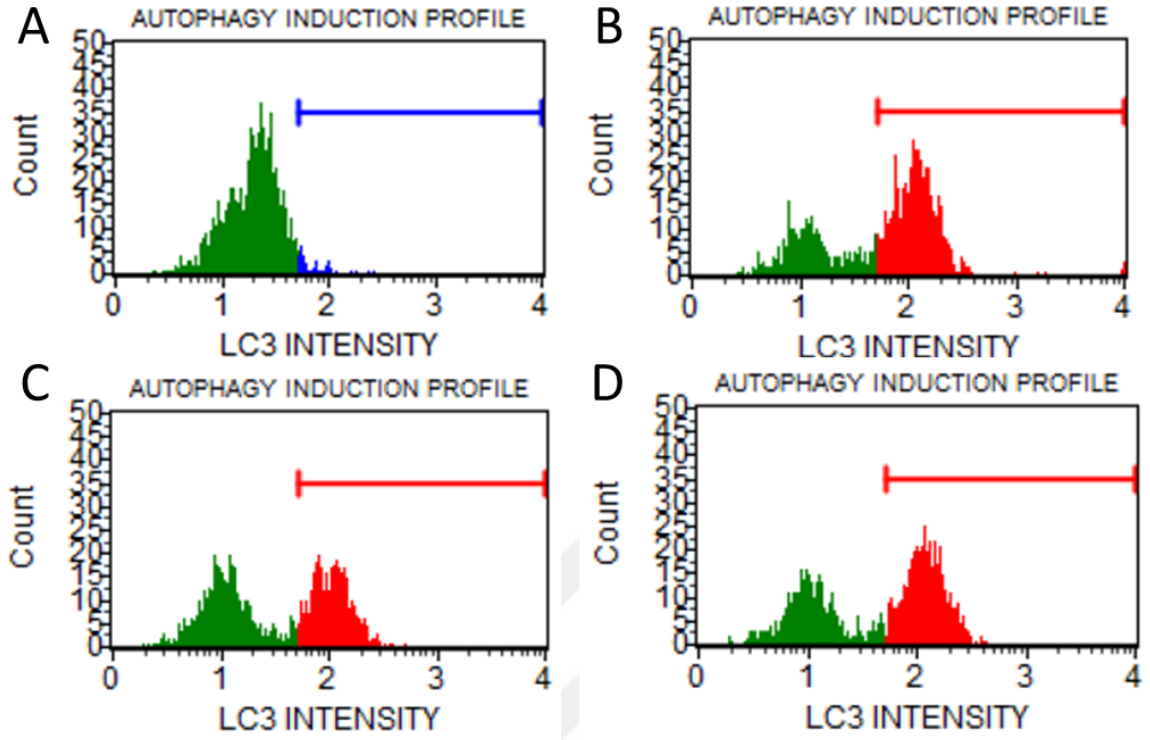
bulundu. Ölü hücre oranı ise %2.70 idi. Akrilamid verilen hücrelerde ise canlılığın %62.14'e kadar gerilediği, toplam apoptotik hücre oranının (erken apoptotik hücre oranı %15.08 ve geç apoptotik hücre oranı %18.09 olmak üzere) %33.17 olduğu gözlemlendi. Ölü hücre oranı ise %4.69 idi. Timokinonla akrilamid verilmeden önce muamele edilen hücrelerde hücre canlılık yüzdesi akrilamid grubuna göre daha yüksekti (%82.95). Toplam apoptotik hücre oranı ise (erken apoptotik hücre oranı %7.20 ve geç apoptotik hücre oranı %8.10 olmak üzere) %15.30 olarak bulundu. Toplam apoptotik hücre yüzdesi akrilamid grubuna göre daha düşüktü. Ölü hücre oranı ise %1.75 idi. Akrilamid öncesinde kuersetin verilen hücrelerde hücre canlılık yüzdesi akrilamid grubuna göre yaklaşık %15 yükselerek %77.05'e ulaştı. Toplam apoptotik hücre oranı ise (erken apoptotik hücre oranı %7.95 ve geç apoptotik hücre oranı %11.80 olmak üzere) %19.75 olarak bulundu. Akrilamidle beraber kuersetin verilen grubun toplam apoptotik hücre yüzdesi (%19.75) yalnız akrilamid uygulanan hücreler ile (%33.17) kıyaslandığında daha düşüktü. Ölü hücre oranı ise %3.20 idi (**Şekil 4.7**).



Şekil 4.7 Kaspaz 3/7 sonuçları. **A:** Kontrol, **B:** Akrilamitle muamelen edilen hücreler, **C:** 3.9 μ M timokinon sonrasında akrilamit uygulanan hücreler, **D:** 2.0 μ M kuersetin sonrasında akrilamit uygulanan hücreler.

4.4. Otofaji Sonuçları

Otofaji sonuçları madde verilen hücrelerdeki otofajik değişimin herhangi bir kimyasalla muamele edilmeyen hücrelerdeki değişime oranıyla değerlendirildi. Kontrol hücrelerinin ortalama otofaji yoğunluğu 84.8 olarak bulundu. Kontrol hücrelerinin otofaji indüksiyon oranı 1 olarak kabul edildi. Akrilamid verilen hücrelerde ortalama otofaji yoğunluğu 181.7 idi. Buna göre otofaji indüksiyon oranı kontrole göre %110 artarak 2.1 olarak bulundu. Timokinon+akrilamid grubunda ise ortalama otofaji yoğunluğu 117.4 olarak kaydedildi. Buna göre otofaji indüksiyon oranı kontrole göre %40 artarak ve akrilamid grubuna göre yaklaşık %33 azalarak 1.4 olarak bulundu. Kuersetin+akrilamid grubunda ise ortalama otofaji yoğunluğu 131.8 olarak saptandı. Buna göre otofaji indüksiyon oranı kontrole göre %60 artarak ve akrilamid grubuna göre yaklaşık %24 azalarak 1.6 olarak bulundu (**Şekil 4.8 ve Tablo 4.5**).



Şekil 4.8 Otofaji sonuçları. **A:** Kontrol, **B:** Akrilamitle muamelen edilen hücreler, **C:** 3.9 μM timokinon sonrasında akrilamit uygulanan hücreler, **D:** 2.0 μM kuersetin sonrasında akrilamit uygulanan hücreler.

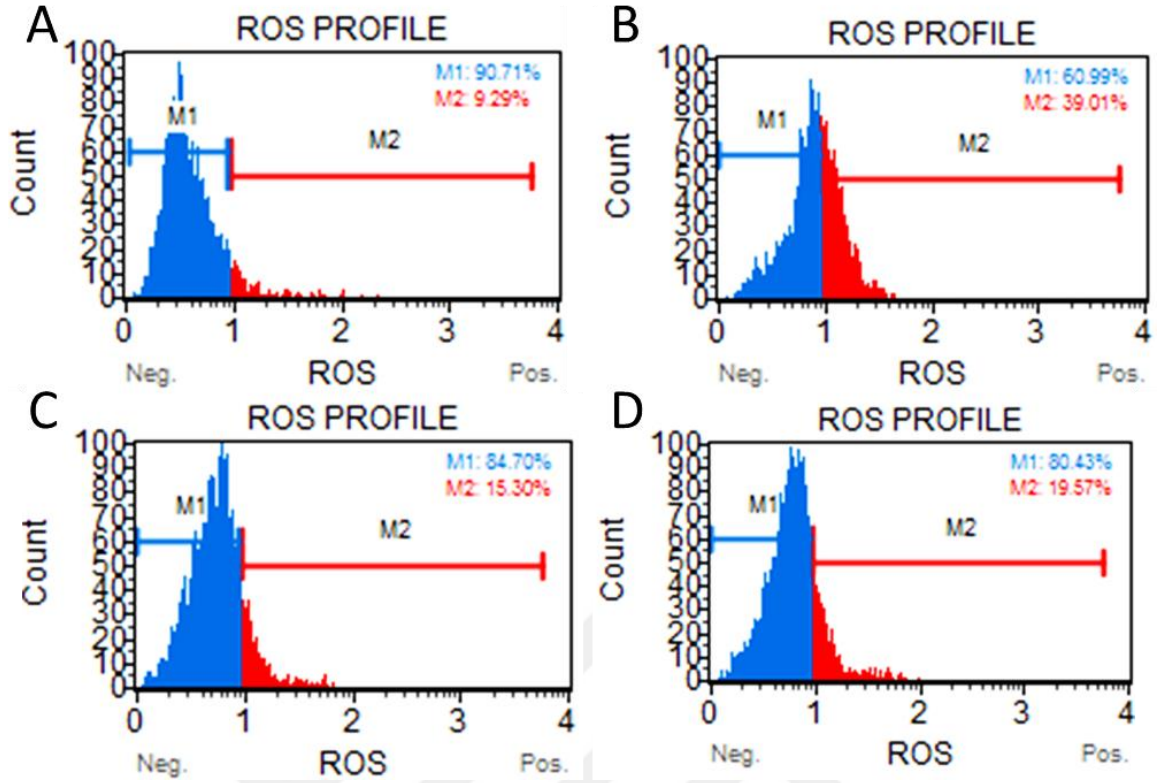
Tablo 4. 5 Gruplara göre ortalama otofaji yoğunluğu ve otofaji indüksiyon oranı

Gruplar	Ortalama Otofaji Yoğunluğu	Otofaji İndüksiyon Oranı
Kontrol	84.8	1.0
AA	181.7	2.1
AA+T	117.4	1.4
AA+Q	131.8	1.6

AA: Akrilamit, T: Timokinon ve Q: Kuersetini ifade etmektedir.

4.5. Oksidatif Stres Sonuçları

Oksidatif stres sonuçlarına bakıldığında, herhangi bir kimyasalla muamele edilmeyen, yani kontrol olarak kullanılan C6 hücrelerinde ROS negatif hücre oranı %90.71 olarak bulunurken, ROS pozitif hücre oranı %9.29 olarak bulundu. Sadece akrilamitle muamele edilen hücrelerde ise ROS negatif hücre oranı %60.99'a gerilerken, ROS pozitif hücre oranı %39.01'e kadar çıktı. Timokinon+akrilamit grubuna bakıldığında, ROS negatif hücreler %84.70 iken ROS pozitif hücreler %15.30 olarak bulundu. Buna göre akrilamit grubuna göre ROS pozitif olan hücre oranı %39.01'den %15.30'a kadar geriledi. Kuersetin+akrilamit grubunda ise ROS negatif hücreler %80.43 iken ROS pozitif hücreler %19.57 olarak bulundu. Buna göre kuersetin+akrilamit grubunda akrilamit grubuna göre ROS pozitif olan hücre oranı %39.01'den %19.57'ye düştü (**Şekil 4.9**).

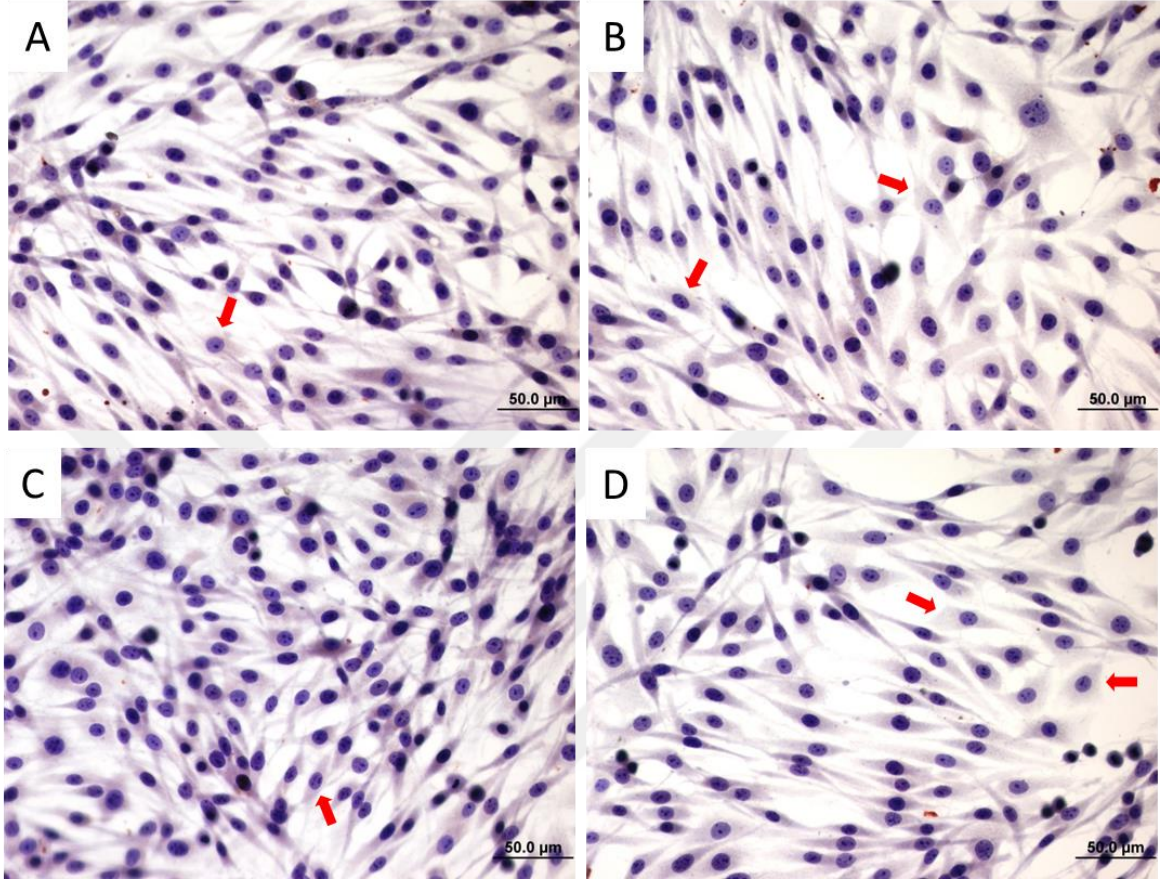


Şekil 4.9 Oksidatif stres sonuçları. **A:** Kontrol, **B:** Akrilamitle muamelen edilen hücreler, **C:** 3.9 μ M timokinin sonrasında akrilamit uygulanan hücreler, **D:** 2.0 μ M kuersetin sonrasında akrilamit uygulanan hücreler.

4.6. Nrf2 İmmünohistokimya Boyaması Sonuçları

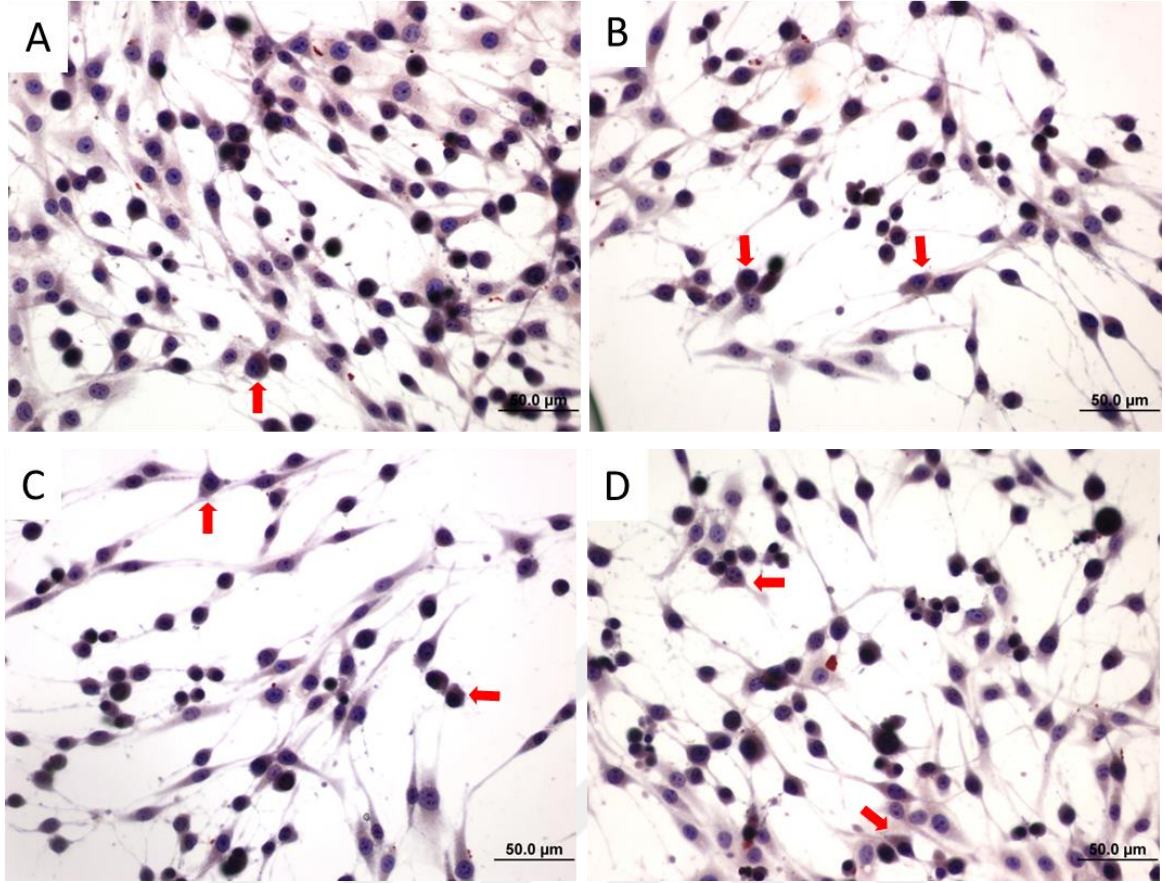
Nrf2 immünohistokimya sonuçlarına göre kontrol grubuna bakıldığında, Nrf2 boyanmasının çok yoğun olmadığı ve daha seyrek boyandığı gözlemlendi. Akrilamit grubunda ise özellikle sitoplazmada Nrf2 proteini daha iyi boyanmıştı. Timokinin+akrilamit grubunda ise Nrf2 boyanması daha da arttı. Hatta nükleer Nrf2 boyanmasının akrilamit grubuna göre daha yoğun boyandığı gözlemlendi. Kuersetin+akrilamit grubunda da timokinin+akrilamit grubuna benzer biçimde nükleer Nrf2 boyanması arttı.

Nrf2 immünohistokimya boyanması incelendiğinde kontrol grubundaki hücrelerin çok az bir miktarının pozitif boyanma gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.10).



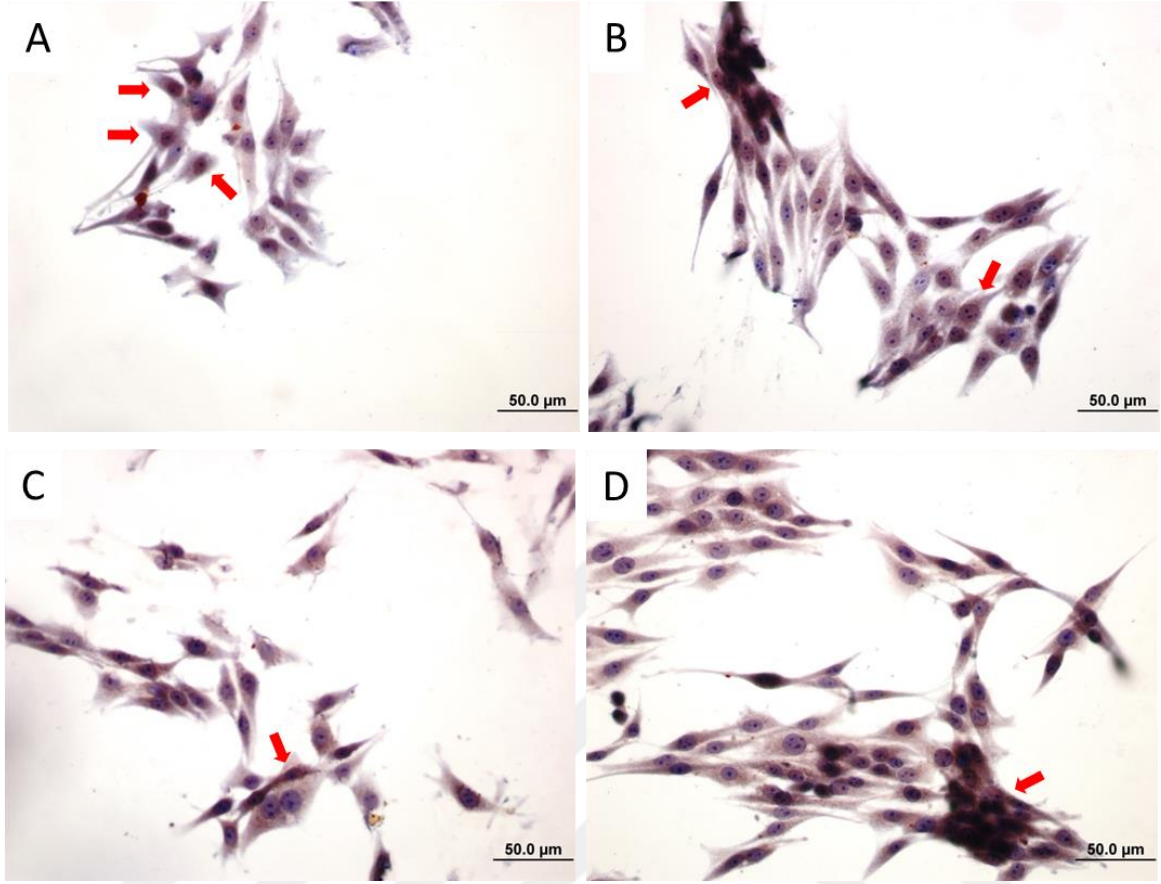
Şekil 4.10 A-D: Kontrol grubunun farklı bölgelerinden çekilmiş Nrf2 immünohistokimya boyanması mikroskop görüntüleri. Kırmızı oklar: hafif sitoplazmik boyanma. Barlar: 50 µm.

Akrilamid uygulanan hücrelerde Nrf2 boyanmasına bakıldığında, akrilamid verilen hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarının küçüldüğü görülürken Nrf2 pozitif hücre sayısının da arttığı gözlemlendi. Hatta küçülen ve çekirdekleri kondanse şekilde görülen hücrelerde Nrf2 boyanmasının daha koyu ve fazla olduğu bulundu (Şekil 4.11).



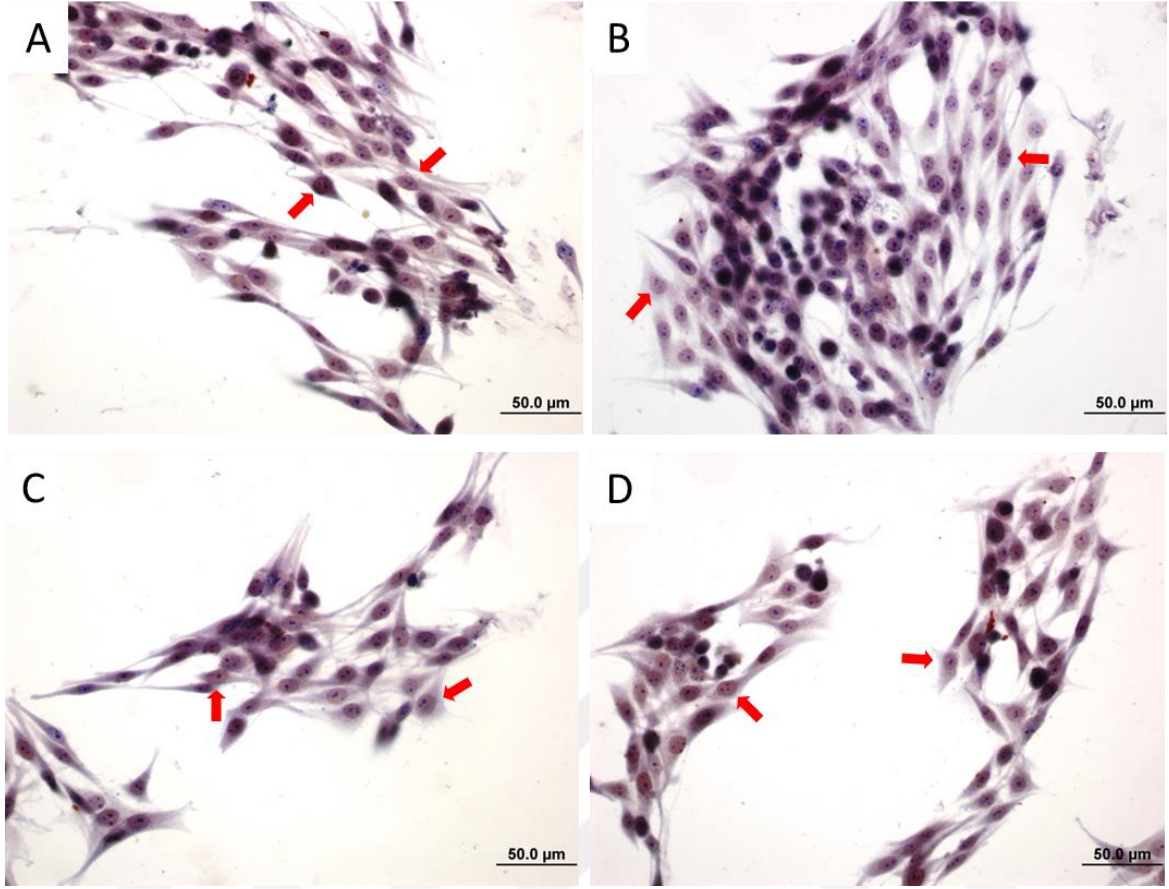
Şekil 4.11 A-D:Akrilamit grubunun farklı bölgelerinden çekilmiş Nrf2 immünohistokimya boyaması mikroskop görüntüleri. *Kırmızı oklar:* koyu sitoplazmik boyanma. Barlar: 50 µm.

Akrilamitten önce timokinon uygulanan hücrelerde de Nrf2 boyamasının arttığı gözlemlendi. Yine bu grupta, akrilamit grubunda görülen yoğunlaşmış çekirdek ve küçülmüş sitoplazmalara sahip hücrelerin nadir görüldüğü ve bu bakımdan kontrole daha yakın olduğu gözlemlendi. Ayrıca, Nrf2 boyanmasının sitoplazmayla birlikte çekirdekte de bulunması dikkat çekmekteydi (**Şekil 4.12**).



Şekil 4.12 A-D:Timokinon+akrilamit grubunun farklı bölgelerinden çekilmiş Nrf2 immünohistokimya boyaması mikroskop görüntüleri. *Kırmızı oklar:* Nükleer boyanma. Barlar: 50 µm.

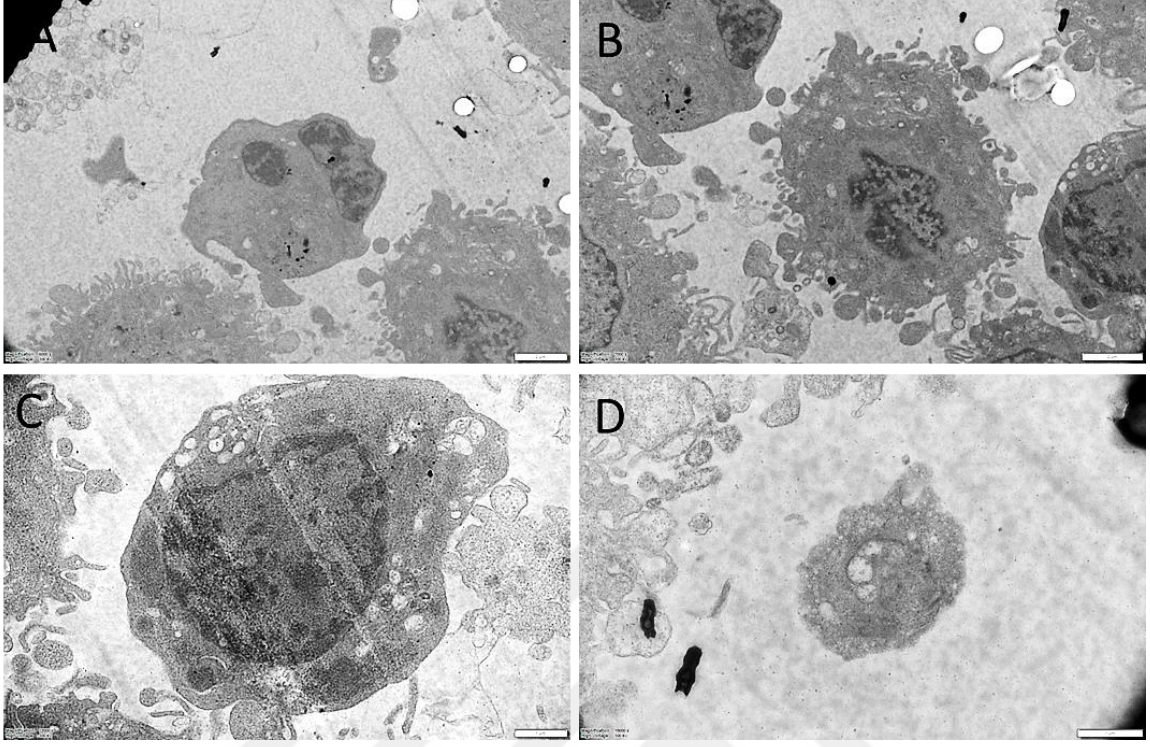
Akrilamitten önce kuersetin uygulanan hücrelerde de Nrf2 boyamasının arttığı gözlemlendi. Yine bu grupta, akrilamit grubundaki görülen yoğunlaşmış çekirdek ve küçülmüş sitoplazmalara sahip hücrelerinin daha az olduğu ve kontrole daha çok benzediği gözlemlendi. Ayrıca, Nrf2 boyanmasının daha çok çekirdekte gözlemlenmesi dikkat çekiciydi (**Şekil 4.13**).



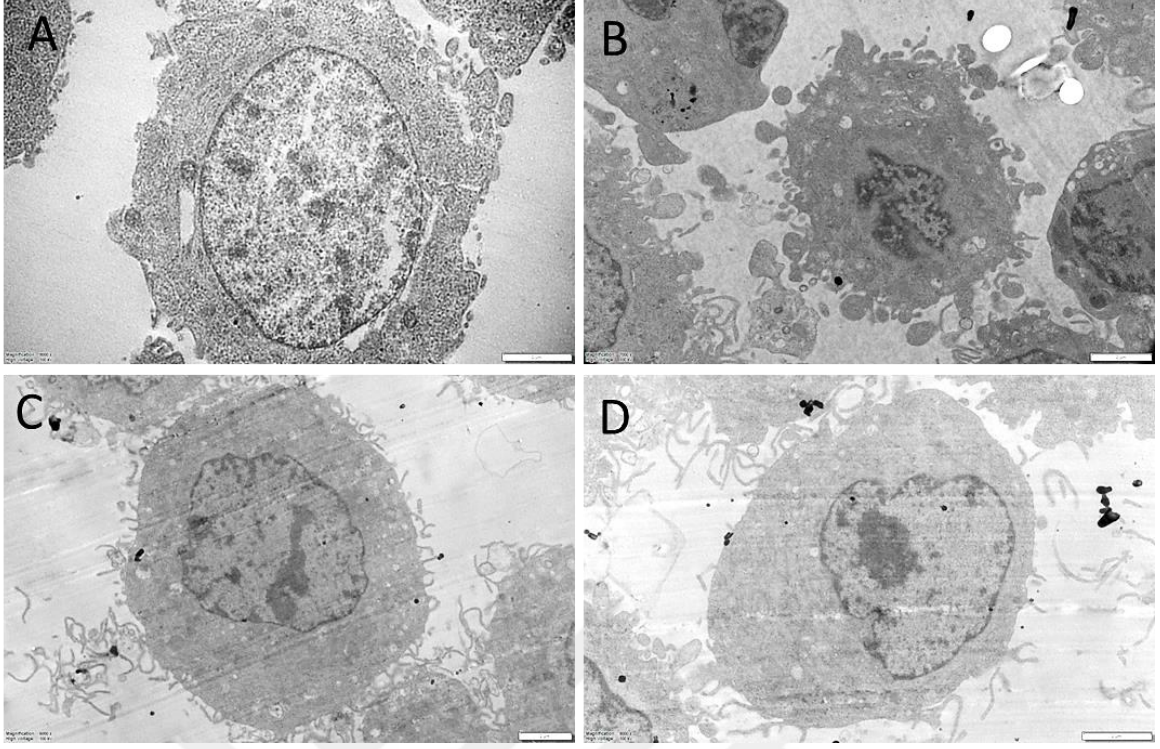
Şekil 4.13 A-D: Kuersetin+akrilamit grubunun farklı bölgelerinden çekilmiş Nrf2 immünohistokimya boyaması mikroskop görüntüleri. *Kırmızı oklar:* Nükleer boyanma. Barlar: 50 µm.

4.7. TEM Sonuçları

TEM sonuçları incelendiğinde, kontrol grubunda C6 glioblastoma hücrelerinin normal bir sitoplazma ve çekirdek içerdikleri görüldü. Akrilamitle muamele edilen hücrelerde ise küçülme, apoptotik cisimcikler, membran blebbing, bazılarında vakuolizasyon, düzensiz şekilli çekirdekler, çekirdekte fragmantasyon ve yoğunlaşma gözlemlendi. Akrilamit verilmeden önce timokinon ve kuersetin verilen gruplarda ise sadece akrilamit verilen gruplardaki dejenerasyonların azalarak mikroskopik görüntülerin daha çok kontrole yakınlığı saptandı (**Şekil 4.14 ve 4.15**).



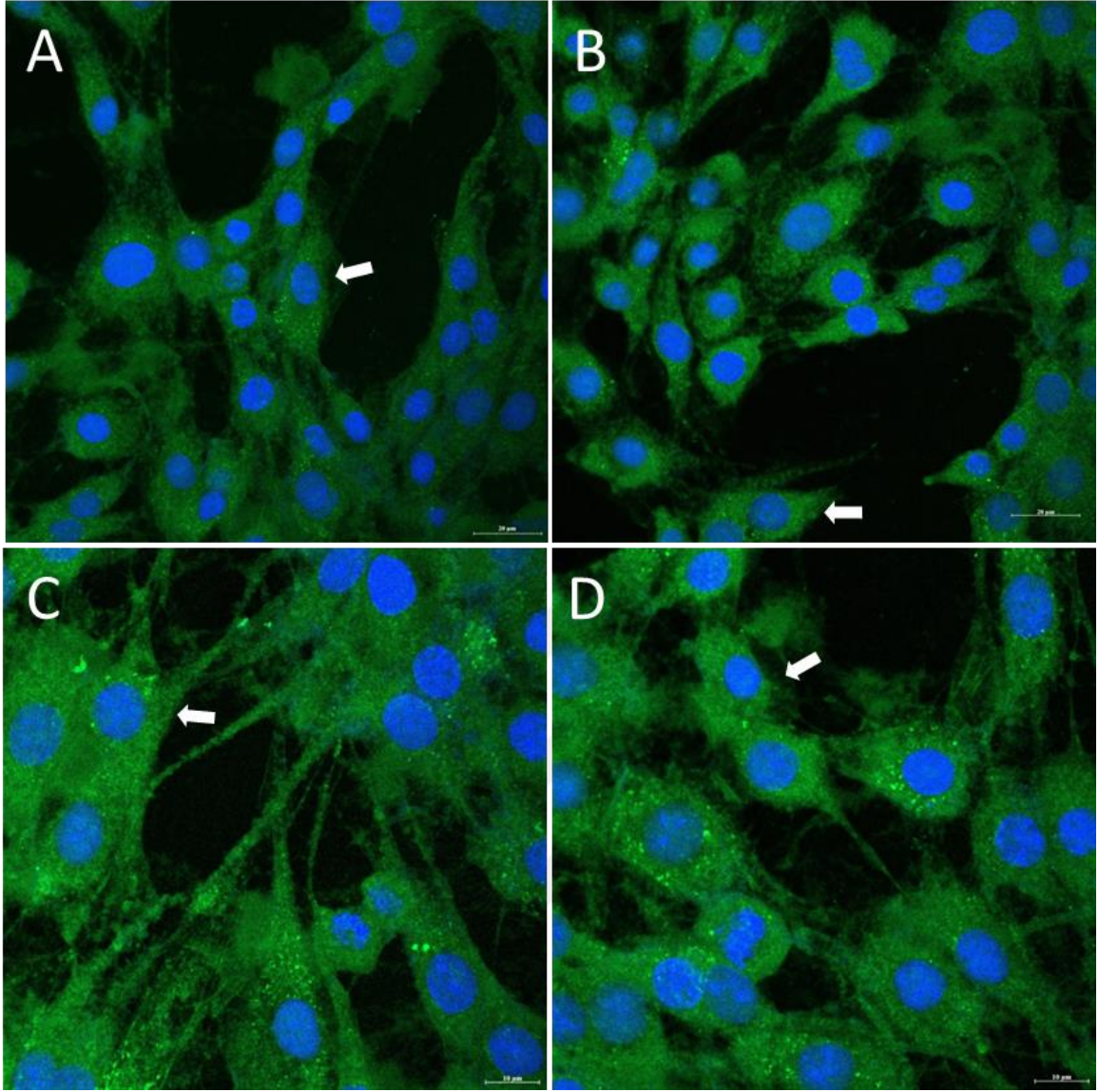
Şekil 4.14 A-D: Akrilamit grubunun farklı bölgelerinden çekilmiş C6 glioblastoma hücrelerinin elektron mikroskobu görüntüleri. Barlar: 2 µm



Şekil 4.15 Elektron mikroskobu görüntüleri. **A:** Kontrol, **B:** Akrilamitle muamelen edilen hücreler, **C:** 3.9 μM timokinon sonrasında akrilamit uygulanan hücreler, **D:** 2.0 μM kuersetin sonrasında akrilamit uygulanan hücreler. Barlar: 2 μm .

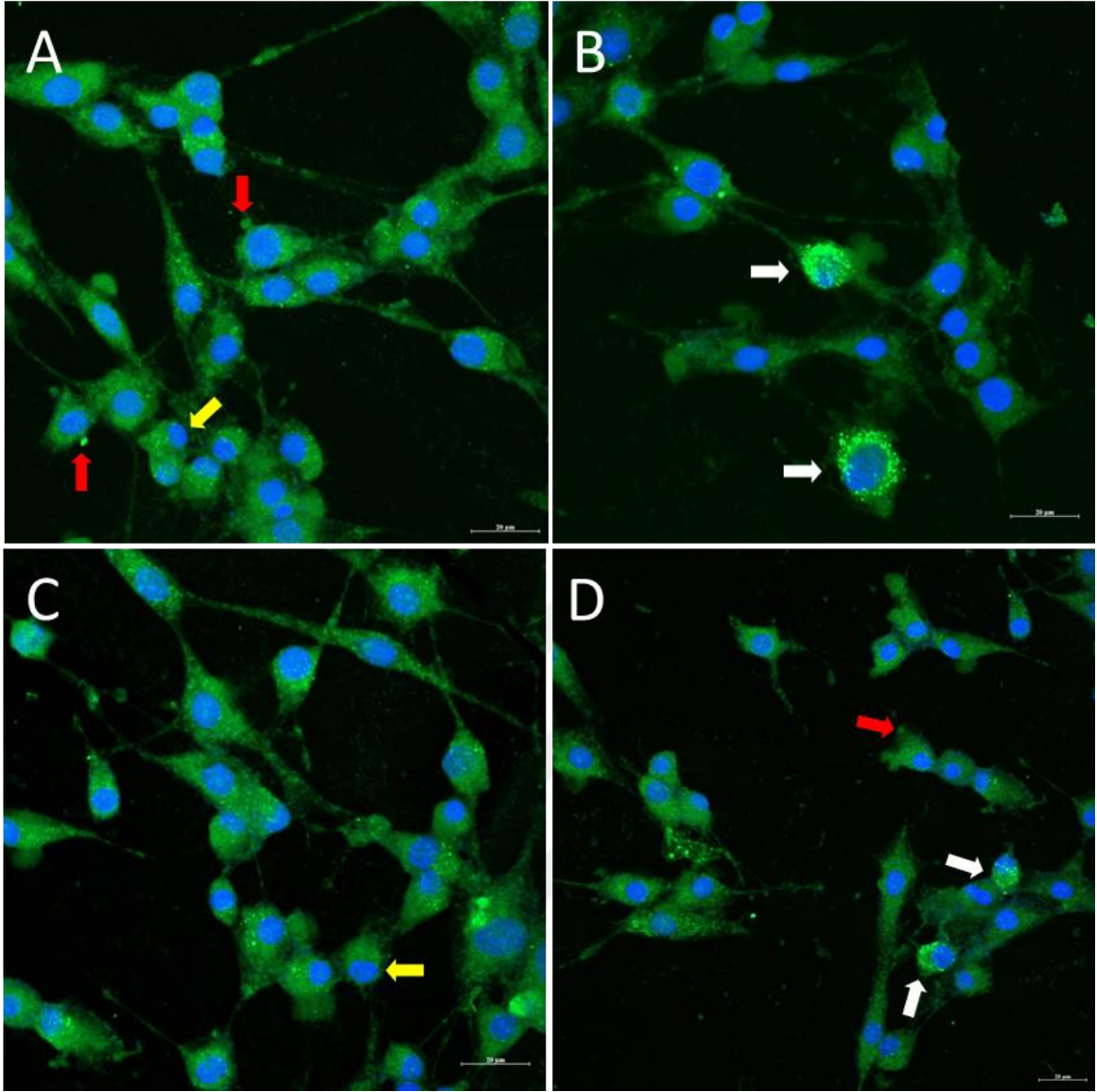
4.8. Konfokal Mikroskop Sonuçları

Konfokal mikroskop sonuçlarına bakıldığında kontrol grubundaki hücreler normal büyüklük ve şekilde sitoplazma ve çekirdekleriyle gözlemlendi (Şekil 4.16).



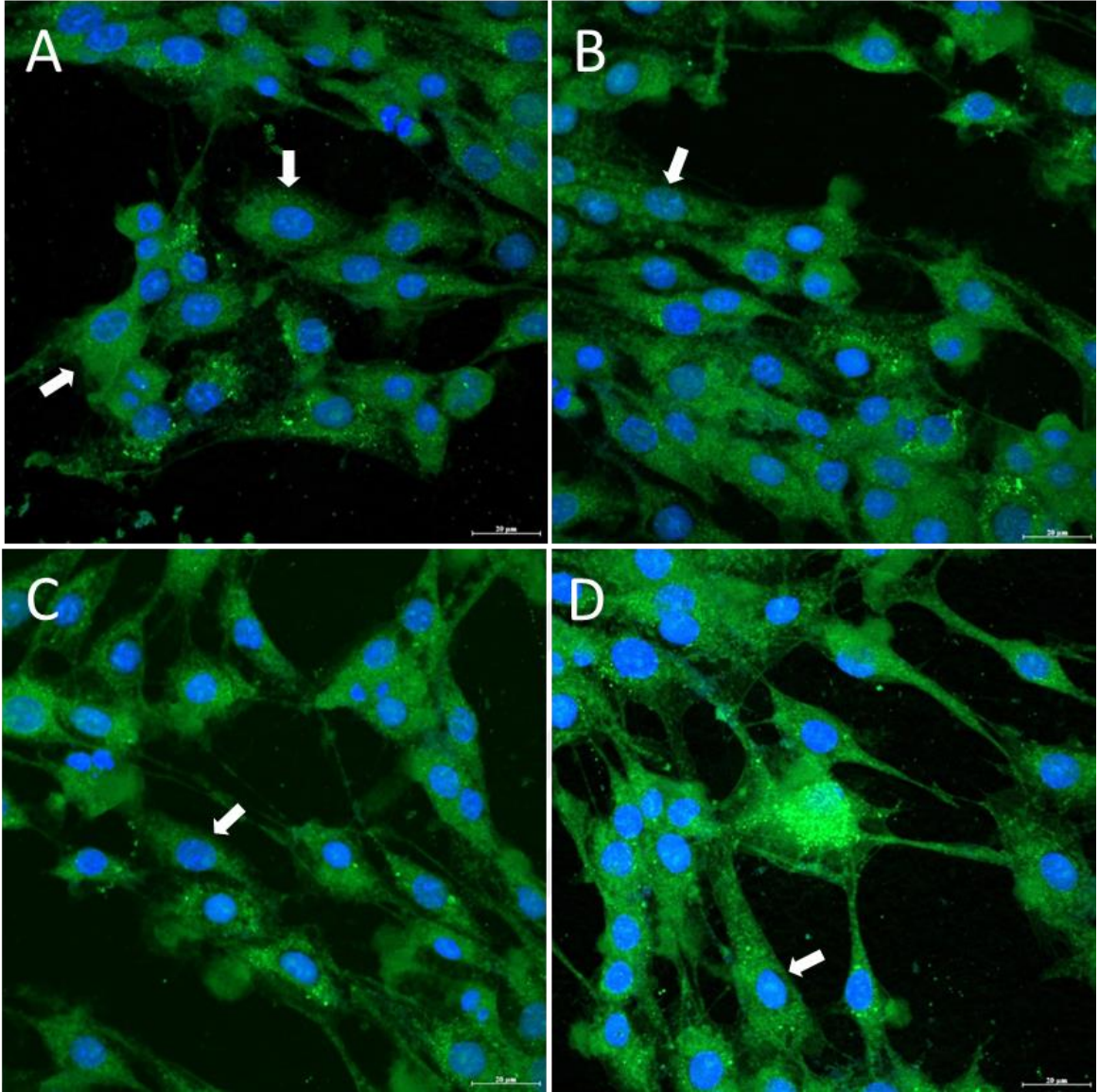
Şekil 4.16 A-D:Kontrol grubunun farklı bölgelerinden çekilmiş konfokal mikroskop görüntüleri. *Beyaz oklar:* Bol sitoplazma ve iri çekirdekleriyle normal görünümlü hücreler. Barlar: 20 µm in A and B, 10 µm in C and D.

Akrilamit uygulanan hücrelerde çeşitli dejenerasyonlar görüldü. Bunlar arasında hücrelerde küçülme, çekirdeklerde yoğunlaşma, eksantrik ve at nalı şeklinde çekirdek görünümü, sitoplazmik fragmentasyon ve blebbingler vardı (Şekil 4.17).



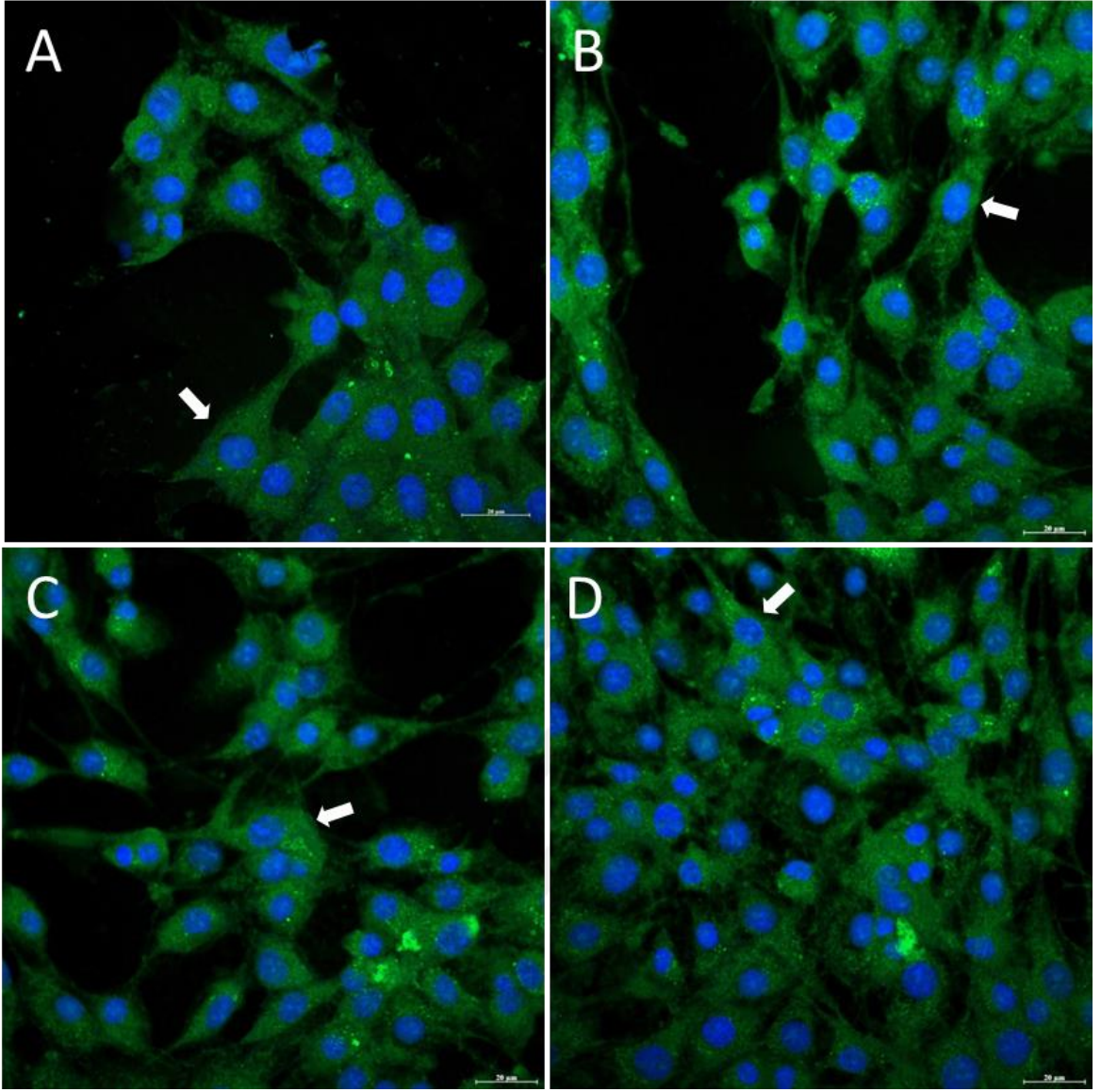
Şekil 4.17 A-D: Akrilamid grubunun farklı bölgelerinden çekilmiş konfokal mikroskop görüntüleri. *Beyaz oklar:* sitoplazmik fragmentasyon, *sarı oklar:* yarım ay şekilli kenara çekilmiş çekirdek, *kırmızı oklar:* membran blebbingi göstermektedir. Barlar: 20 µm.

Timokinon+akrilamid uygulanan hücrelerde ise akrilamid grubunda görülen dejenerasyonlar daha azalmış olarak görüldü. Yine de, akrilamid grubu kadar olmasa da yer yer hücresel dejenerasyonlar vardı. Bunlar arasında hücrelerde küçülme ve sitoplazmik fragmentasyon sayılabilir (**Şekil 4.18**).



Şekil 4.18 A-D: Akrlamit+timokinon grubunun farklı bölgelerinden çekilmiş konfokal mikroskop görüntüleri. *Beyaz oklar:* Bol sitoplazma ve iri çekirdekleriyle normal görünümlü hücreler. Barlar: 20 μ m.

Kuersetin+akrlamit uygulanan hücrelerde de akrlamit grubunda görülen dejenerasyonların azaldığı saptandı. Kontrole daha yakın bir görünüm sergileyen hücrelerde yine de yer yer dejenerasyonlar vardı. Bu dejenerasyonlar arasında hücrelerde küçülme ve membran blebbing sayılabilir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 A-D: Akrilamit+kuersetin grubunun farklı bölgelerinden çekilmiş konfokal mikroskop görüntüleri. *Beyaz oklar:* Bol sitoplazma ve iri çekirdekleriyle normal görünümlü hücreler. Barlar: 20 μm .

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda C6 glioblastoma hücrelerinde akrilamitin oluşturduğu toksik etkileri timokinon ve kuersetin ile gidermeye çalıştık. Akrilamitin toksik dozu, timokinon ve kuersetinin C6 hücrelerine zarar vermeyen dozuna karar verdikten sonra hücredeki apoptotik, oksidatif, otofajik ve morfolojik değişimler incelendi. Özetle, akrilamit ile muamelelerinden önce verilen 3.9 μM timokinon ve 2.0 μM kuersetin C6 hücrelerini akrilamitin toksik etkilerini azaltarak apoptotik, otofajik, oksidatif ve morfolojik açıdan korudular.

Çalışmamızın ilk aşamasını oluşturan sitotoksisite testlerinde akrilamit, timokinon ve kuersetinin tek başına verildiğindeki çalışmamıza uygun dozları belirlendi. Timokinon ve kuersetinin koruyucu dozları bulunurken akrilamitin toksik dozu arandı. Buna göre akrilamit, timokinon ve kuersetinin çalışmamızda kullanılan dozları sırasıyla 4 mM, 3.9 μM ve 2.0 μM olarak belirlendi. Akrilamitin IC₅₀'si C6 hücreleri için 6.2 mM olarak bulundu. Koruyucu dozlar kullanılarak yapılan MTT'de C6 hücrelerinin canlılığı akrilamit verilmesiyle %62'lere kadar gerilerken önceden kuersetin verilmesi canlılığı %76'ya, timokinon verilmesi ise %85'e kadar çıkardı. Timokinonun akrilamite karşı koruyucu etkisine dair literatürde birkaç tane *in vivo* çalışma olmasına rağmen, bizim bilgimize göre, hücre hatları üzerinde *in vitro* olarak gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda çalışmamız özgündür. Fakat timokinonun başka toksik maddelere karşı koruyucu etkisini konu alan *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Alhebshi ve arkadaşlarının (2013) çalışmalarında 72 saat boyunca verilen 1, 10 ve 100 nM timokinon primer nöron kültüründe amiloid- β kaynaklı nörotoksisiteye karşı koruyucu etki göstermiştir (Alhebshi, Gotoh, & Suzuki, 2013). Yine aynı ekip 72 saat boyunca verilen 100 nM timokinonun nöron kültüründe α -sinüklein kaynaklı sinaptik hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Alhebshi, Odawara, Gotoh, & Suzuki, 2014). Ayrıca, amiloid- β kaynaklı nörotoksisiteye karşı timokinonun koruyucu etkisinin çalışıldığı bir başka çalışmada da nörotoksisite oluşturulmadan önce verilen 0.1 ve 1 μM timokinonun amiloid- β kaynaklı apoptozu engellediği gösterilmiştir (Ismail vd., 2013). Fouda ve

arkadaşları (2014) insan lenfosit kültüründe benzo(a)piren ve mitomisin C kaynaklı genotoksisiteye karşı timokinonun etkisini araştırmıştır. 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 ve 10.0 µM dozlarında verilen timokinonun doza bağlı koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (Fouda vd., 2014). Mousavi ve arkadaşları (2010) çörek otu özütü ve timokinonun, glikozdan yoksun bırakılarak strese sokulan PC12 feokromositoma hücrelerine karşı koruyucu etkisini çalışmışlardır. Bu çalışmada hücrelere 15.62-250 µg/mL dozları arasında farklı çörekotu ve 1.17-150 µM dozları arasında farklı timokinon dozları uygulanarak 6 ve 18 saat glikoz yoksunluğunda oluşan strese karşı etkilerine bakılmıştır. Glikoz stresinden önce 250 µg/mL çörekotu ve 2.34, 4.68, 9.37 µM timokinon dozlarının uygulanmasının koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür (Mousavi, Tayarani-Najaran, Asghari, & Sadeghnia, 2010). Radad ve arkadaşları (2015) timokinonun primer mezensefalik hücre kültüründe 1-metil-4-metil-fenilpiridinyum kaynaklı dopaminerjik hücre ölümüne karşı nöroprotektif etkisini araştırmışlardır. 4 gün boyunca *in vitro* ortamda uygulanan 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM timokinon dozlarından 0.1 ve 1 µM olanlarının etkili olduğunu bulmuşlardır (Radad, Al-Shraim, Moustafa, & Rausch, 2015). Timokinonun farklı toksik maddelere karşı kullanıldığı yukarıda bahsedilen bu *in vitro* çalışmalara benzer bir şekilde bizim çalışmamızda da 24 saat boyunca verilen 3.9 µM timokinon akrilamit ile indüklenen apoptozu engellemiş ve akrilamit toksisitesine karşı koruyucu etki göstermiştir.

Timokinonun akrilamite karşı koruyucu etkisine dair bazı *in vivo* çalışmalara göz atacak olursak, Mehri ve arkadaşlarının (2014) çalışmasında Wistar sıçanlara 11 gün boyunca 50 mg/kg akrilamit veya akrilamitle beraber 2.5, 5, 10 mg/kg timokinon intraperitoneal olarak verilmiştir. Bu çalışmada timokinon iki şekilde uygulanmıştır. İlkinde 1 hafta önceden timokinona başlanmış ve devamında timokinon akrilamitle beraber verilmeye devam etmiştir. İkinci uygulamada ise bu maddeler aynı anda verilmiştir. Deney sonunda sıçanların duruşları, MDA ve GSH düzeyleri değerlendirilmiş ve her iki timokinon verilme yönteminde de akrilamitin sıçanda neden olduğu duruş bozukluklarının düzeldiği, artmış MDA miktarlarının azaldığı saptanmıştır

(Mehri vd., 2014). Omar ve arkadaşları (2015) sıçanda akrilamitle oluşturulan testis hasarını timokinon ile önlemeye çalışmıştır. Bu çalışmada sıçanlar içme sularına akrilamit konularak 28 gün boyunca akrilamite maruz bırakılmışlardır. Akrilamitle beraber verilen 10 mg/kg timokinonun artan testis MDA ve NO düzeyleri ile azalan SOD, CAT and GSH antioksidan miktarlarını düzelttiği görülmüştür. Ayrıca timokinon akrilamit kaynaklı histopatolojik değişiklikleri de gidermiştir. Sonuçta testis toksisitesinin timokinon ile engellenebileceği gösterilmiştir (Omar, Abdel-Ghafar, Fiedan, & Ahmed, 2015). En güncel çalışmalardan birisi olan Tabeshpour ve arkadaşlarının (2019) çalışmasında Wistar sıçanlara Mehri ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde 11 gün boyunca 50 mg/kg akrilamit veya akrilamitle beraber 2.5, 5, 10 mg/kg timokinon intraperitoneal olarak verilmiş ve sonuçta akrilamitin hayvanlarda ciddi duruş bozukluklarına, MDA'nın artmasına ve GSH içeriğinin düşmesine neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca, akrilamit p-ERK/ERK oranını ve miyelin bazik protein içeriğini azaltırken pJNK/JNK, p-p38/p38 ve Bax/Bcl-2 ile kaspaz 3/9 düzeylerini arttırmıştır. Buna karşın timokinon 5 ve 10 mg/kg dozlarında sıçanların duruş bozukluklarını engellemiş, MDA'yı azaltmış ve GSH içeriğini ise arttırmıştır. Ayrıca, timokinon verilmesi p-ERK/ERK oranını ve miyelin bazik protein içeriğini arttırmış ve pJNK/JNK, p-p38/p38 ve Bax/Bcl-2 oranı ile kaspaz 3/9 düzeylerini ise azaltmıştır. Sonuç olarak makalede timokinonun MAP kinaz ve apoptotik yolak üzerinden akrilamit kaynaklı siyatik sinir toksisitesine karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir (Tabeshpour, Mehri, Abnous, & Hosseinzadeh, 2019). Akrilamit toksisitesine karşı timokinonun kullanıldığı *in vivo* çalışmalarda, görüldüğü gibi, timokinon koruyucu etkiler göstermiştir. Bu çalışmalarla benzer şekilde, C6 hücreleri ile yaptığımız bu *in vitro* çalışmamızda biz de timokinonun 3.9 µM dozunda koruyucu etkisinin olduğunu, oksidatif stresi azalttığını ve apoptoza karşı koruduğunu gösterdik.

Kuersetin'in akrilamite karşı koruyucu etkisi hakkında literatürde birkaç *in vivo* çalışma olmasına rağmen, bizim bilgilerimize göre, hücreler üzerinde *in vitro* olarak yürütülmüş bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda

çalışmamız özgündür. Ancak, kuersetinin diğer toksik maddelere karşı koruyucu etkisini konu alan *in vitro* çalışmalar literatürde mevcuttur. Ramyaa ve Padma'nın (2013) Vero maymun böbrek hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarında okratoksin ile hücrelerde hasar oluşturulmuştur. Hücrelere okratoksin verilmeden önce 10 µM kuersetinin verilmesi hücre canlılıklarını kontrole göre %95'lere kadar çıkarmıştır. Fakat 5 ve 15 µM kuersetin verilmesi hücre canlılıklarını sırasıyla %89 ve %86'ya çıkarabilmiştir. Kuersetinin okratoksinde önce verilmesi beraber veya sonra verilmesine göre hücre canlılığı bakımından daha etkili bulunmuştur (Ramyaa & Padma, 2013). Bizim çalışmamızda da kuersetin akrilamid toksisitesinden önce verilmiştir ve 2.0 µM kuersetin koruyucu etki göstermiştir. Guo ve arkadaşlarının (2019) çalışmasında kuersetin lipopolisakkaritle indüklenen HK-2 insan böbrek epitelyal hücre hasarını engellemek için 5, 10, 15 ve 20 µM dozlarında kullanılmış ve 10, 15 ve 20 µM kuersetin dozları doza bağlı olarak hücrelerin canlılığını arttırmıştır (Guo, Sun, & Zhuang, 2019). Wang ve arkadaşları 2.5 ve 5 µM kuersetini BRL-3A sıçan karaciğer hücrelerinde aflatoksin B₁ ile indüklenen sitotoksositeye karşı kullanmışlar ve aflatoksin hasarından önce verilen kuersetinin hücreleri aflatoksin hasarına karşı koruduğu gözlenmiştir (Wang, Li, & Zhang, 2019).

Kuersetinin akrilamid toksisitesine dair *in vivo* çalışmalara göz atacak olursak, Zargar ve arkadaşları (2016) sıçan beyinlerinde kuersetinin akrilamid kaynaklı nörotoksositeye karşı koruyucu etkisini çalışmışlardır. Akrilamid tek doz halinde (50 mg/kg) verilirken kuersetin 5 gün boyunca 10 mg/kg olarak verilmiş ve sonuçta kuersetinin akrilamid kaynaklı nörotoksosite ve oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (Zargar, Siddiqi, Ansar, Alsulaimani, & El Ansary, 2016). El-Betachi ve arkadaşları (2016) sıçan beyin, karaciğer, böbrek ve testis dokularında 30 gün boyunca 20 mg/kg düzeyinde akrilamid vererek hasar oluşturmuşlar ve bu hasarı 25 ve 50 mg/kg kuersetini oral olarak vererek gidermeye çalışmışlardır. Sonuçta akrilamidle artan oksidatif stres ve biyokimyasal hasar kuersetinle düzeltilmiştir (El-Beltagi & Ahmed, 2016). Bu *in vivo* çalışmalarla uyumlu olarak bizim

deneyimizde de 2.0 μM kuersetin C6 hücrelerinde oksidatif hasarı azaltmıştır. İçme suyuna verilen akrilamitle indüklenen 16 haftalık sıçanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada renal toksisitenin oral olarak verilen 50 mg/kg kuersetinin antioksidan savunma sistemini güçlendirmesi ve lipit, enerji ve aminoasit metabolizmasını düzenlemesi ile kısmi olarak koruma sağladığı belirtilmiştir (Bo vd., 2018). Yine Uthra ve arkadaşları sıçanlardaki araştırmalarında kuersetinin akrilamit toksisitesine karşı koruduğunu saptamışlardır (Uthra vd., 2017). Ansar ve arkadaşları (2016) sıçanlarda yaptıkları çalışmada 5 gün boyunca 10 mg/kg kuersetin vererek sıçanları tek doz (50 mg/kg) verilerek oluşturulan akrilamit toksisitesine karşı korumaya çalışmışlardır. Kuersetinin karaciğerde akrilamit kaynaklı DNA hasarını düzelttiği, hepatoprotektif etki sağladığı ve antioksidan seviyesini arttırdığı görülmüştür (Ansar, Siddiqi, Zargar, Ganaie, & Abudawood, 2016). Bu *in vivo* çalışmalarla uyumlu olarak bizim deneyimizde de 2.0 μM kuersetin C6 hücrelerinde akrilamite karşı koruyucu etki yapmıştır.

Apoptoz sonuçlarımıza bakıldığında anneksin V testinde 4 mM akrilamitin kontrol hücrelerinde %83.26 olan canlılığı %60.90'a düşürdüğü ve %37.95 oranında total apoptoz gösterdiği saptandı. Timokinonun 3.9 μM dozunda verilmesi total hücre canlılık oranını akrilamit grubuyla kıyaslandığında %77.28'e çıkarmıştır ve total apoptoz oranını %22.75'e düşürmüştür. Kuersetinin 2.0 μM dozda verilmesi ise total hücre canlılık oranını akrilamit grubuyla kıyaslandığında %71.90'a çıkarmış ve total apoptoz oranını %27.95'e düşürmüştür. Kaspaz 3/7 testinde ise 4 mM akrilamitin kontrol hücrelerinde %93.50 olan canlılığı %62.14'e düşürdüğü ve %33.17 oranında total apoptoz gösterdiği saptanmıştır. Timokinonun 3.9 μM dozunda verilmesi total hücre canlılık oranını akrilamit grubuyla kıyaslandığında %82.95'e çıkarmış ve total apoptoz oranı %15.30'a düşmüştür. Kuersetinin 2.0 μM dozunda verilmesi ise total hücre canlılık oranını akrilamit grubuyla kıyaslandığında %77.05'e çıkarmış ve total apoptoz oranı %19.75'e düşmüştür. Morfolojik değişimlere gelindiğinde konfokal ve TEM mikroskoplarında genel olarak akrilamitin nükleer fragmantasyon, nükleer yoğunlaşma, yarım ay

şeklinde çekirdek görünümü, apoptotik cisimcikler, membran blebbing gibi apoptotik deformasyonlar gösterdiği gözlenmiştir. Apoptozla ilgili sonuçlarımızı literatürle kıyasladığımızda, akrilamitin birçok farklı hücre hattında apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Kacar, Sahinturk, & Kutlu, 2017a; Kacar, Sahinturk, & Kutlu, 2017b; Kacar vd., 2019; Kacar vd., 2017c; Sahinturk vd., 2018). Timokinonun apoptozdan koruyucu etkisiyle ilgili literatür incelendiğinde, Tabeshpour ve arkadaşlarının (2019) *in vivo* çalışmalarında akrilamit toksisitesine karşı sıçanlarda 5 ve 10 mg/kg timokinonun Bax/Bcl-2 oranını ve kaspaz 3/9 düzeylerini azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca, primer serebellar nöronlarda oluşturulmuş amiloid-β kaynaklı nörotoksositeye karşı timokinonun koruyucu etkisinin çalışıldığı bir *in vitro* çalışmada da nörotoksosite oluşturulmadan önce verilen 0.1 ve 1 µM dozlarındaki timokinonun amiloid-β kaynaklı apoptozu engellediği gösterilmiştir (Ismail vd., 2013). Kuersetinin apoptozu engelleyici etkisine bakıldığında, kuersetinin okratoksin kaynaklı toksisite oluşturulan Vero maymun böbrek hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli kaybını engelleyerek mikroskop incelemelerinde apoptotik karakterli hücre sayısını ve DNA fragmentasyonunu azaltarak apoptoza karşı koruma gösterdiği bildirilmiştir (Ramya & Padma, 2013). Ayrıca, kuersetinin kurşun toksisitesine maruz kalan sıçan böbreklerinde kaspaz 3 ve TUNEL-pozitif hücreleri azaltarak apoptozu azalttığı gösterilmiştir (Liu, Ma, & Sun, 2010).

Oksidatif stres sonuçlarımıza baktığımızda 24 saat 4 mM akrilamit verilen hücrelerde kontrol grubunda 9.29 olan ROS-pozitif hücre oranının %39.01'e çıktığı görülmüştür. Akrilamit öncesinde kuersetin verilmesi ROS-pozitif hücre oranını %19.57'e düşürürken timokinon verilmesi %15.30'a kadar azaltmıştır. Elektronca fakir kimyasallar elektrofil olarak adlandırılırlar. Akrilamit bir elektrofildir ve makromoleküllerdeki nükleofilik yapılarla reaksiyona girer. Bundan dolayı DNA ve hücre proteinlerle reaksiyona girerek radikaller oluşturup oksidatif strese yol açar (Kacar vd., 2017c; LoPachin & Gavin, 2012). Akrilamitin oksidatif stresi ve ROS-pozitif hücreleri arttırdığı birçok makalede bildirilmiştir (Azari, Shokrzadeh, Zamani, Amani,

& Shaki, 2019; Hong, Nan, Wu, Yan, & Yuan, 2019; Yousef & El-Demerdash, 2006). Timokinonun oksidatif stresi engelleyici etkisine dair çalışmaların olduğu bilinmektedir (Sankaranarayanan & Pari, 2011). Çalışmamızda oksidatif stres ölçümünde akrilamitin neden olduğu oksidatif strese karşı hücrelere önceden verilen 3.9 µM timokinon koruyucu etki yapmış ve %39 olan ROS-pozitif hücre oranını yüzde %15.3'e kadar düşürmüştür. Kullandığımız test süperoksit anyonu ölçümüne dayanıyor olup timokinonun özellikle süperoksit anyonlarını yok ettiğine literatürde değinilmiştir (Badary vd., 2003). Kuersetinin oksidatif stresi engellediğine dair çok sayıda çalışma literatürde mevcuttur (Coskun vd., 2005; Erden Inal & Kahraman, 2000; Liu vd., 2010). *In vitro* olarak verilen kuersetinin sıçanlarda akrilamit kaynaklı oksidatif strese karşı karaciğer, böbrek, testis ve beyinde koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (El-Beltagi & Ahmed, 2016).

Nrf2 immünoSitokimya sonuçlarımıza baktığımızda hücrelere akrilamit verildiğinde Nrf2-pozitif olan hücrelerin yoğunluğunda bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, timokinon ve kuersetin verildiğinde Nrf2 boyanmasının akrilamit grubuna göre özellikle de çekirdekte daha da arttığı saptanmıştır. Akrilamit verilmesiyle Nrf2 miktarının değişimi hakkında literatürde çelişkili sonuçlar vardır. Akrilamitin verilmesinden sonra Nrf2'nin azaldığını (Albalawi, Alhasani, Biswas, Reilly, & Shu, 2017) ve arttığını bildiren (Kacar vd., 2019) makaleler mevcuttur. Ancak, literatürde akrilamit verildikten sonra Nrf2 ifadesinin arttığını bildirilen makale sayısı daha fazladır. Kuersetinin Nrf2 ifadesine etkisine bakıldığından Ramyaa ve Padma (2013) Vero maymun böbrek hücrelerinde kuersetinin doza bağlı olarak Nrf2 ifadesini arttırdığını göstermişlerdir (Ramyaa & Padma, 2013). Ayrıca Wang ve arkadaşları 2.5 ve 5 µM kuersetinin BRL-3A sıçan karaciğer hücrelerinde Nrf2 sinyal yolağını indüklediğini belirtmişlerdir -(Wang vd., 2019). Timokinonun Nrf2 ifadesine etkisi incelendiğinde, timokinonun HaCaT insan keratinosit hücrelerinde Nrf2 ifadesini arttırdığı bildirilmiştir (Kundu, Kim, Kundu, & Chun, 2014). Bir başka çalışmada timokinonun BV2 mikrogliya hücrelerinde NF-κB kaynaklı inflamasyonu Nrf2 sinyal yolağını aktive ederek

önlediğine değinilmiştir (Farkhondeh, Samarghandian, Shahri, & Samini, 2018).

Akrilamit ve otofajiyle ilgili olarak literatürde bizim bilgilerimize göre sadece bir tek çalışma vardır. Song ve arkadaşlarının (2017) SH-SY5Y hücreleri ile yaptığı bu çalışmada hücrelere 24 saat boyunca 5 mM akrilamit uygulanmış ve akrilamit bu hücrelerde LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünü ve beclin-1 proteinin ifadesini arttırarak otofajiyi indüklemiş ve otofajik veziküllerin birikmesine neden olmuştur. Western blot incelemelerinde 1.25, 2.5 ve 5 mM olarak verilen akrilamit LC3-II/LC3-I oranını ve beclin-1 protein ifadesini doza bağlı olarak arttırmıştır. Ayrıca, bir otofaji inhibitörü olan 3-metiladenin eklenerek veya eklenmeden akrilamit verildiğinde hücre ölümleri anneksin V testi ile değerlendirilmiştir. Sadece akrilamit verilen hücrelerin canlılığı %79.58 iken akrilamitle beraber otofaji inhibitörü verilen hücrelerin canlılığı %85.55 olarak bulunmuştur. Bu da akrilamitin hücreleri otofajiyle de öldürdüğüne bir diğer kanıt olarak sunulmuştur. Koruyucu olarak lipoik asitin kullanımını ise LC3 dönüşümünü ve beclin-1 ifadesini azaltarak koruma göstermiştir (Song vd., 2017). Normalde otofajide sitozolik LC3-I otofagozoma geçen LC3-II'ye dönüşür. Bizim otofaji akış sitometrisiyle yaptığımız analizimiz sadece otofagozomda bulunan LC3'ün korunup ölçülmesine dayalıdır. Sonuçlarımıza bakıldığında kontrol grubu hücrelerimize kıyasla 24 saat boyunca 4 mM akrilamit verilen C6 hücrelerimizin ortalama otofaji indükleme oranı kontrol grubunun iki katından fazladır (2.1). Akrilamitten 24 saat önce 3.9 μ M timokinon verilmesi ortalama otofaji indüksiyon oranını sadece akrilamit grubuyla kıyaslandığında %33.3 düşürmüştür ve bu oran 2.1'den 1.4'e gerilemiştir. Yalnız kontrolle kıyaslandığında yine de yüksektir. Akrilamitten 24 saat önce 2.0 μ M kuersetinin verilmesi ortalama otofaji indüksiyon oranını sadece akrilamit verilen gruba kıyaslandığında %23.8 düşürmüştür ve bu oran 2.1'den 1.6'ya gerilemiştir. Yalnız kontrolle kıyaslandığında yine de yüksektir. Özellikle TEM incelemesinde akrilamit verilen hücrelerde daha görünür olan otofajik vakuoller olarak nitelendirdiğimiz (otofagozom) bazı vakuolizasyonlar gördük. Bu

dejenerasyonlar timokinon ve kuersetin grubunda neredeyse yok gibiydi. Buna göre timokinon ve kuersetin akrilamitle indüklenen otofajik ölümü inhibe etme potansiyeline sahiptir.

Literatürde ticari olarak alınabilen birçok hücre hattında akrilamit toksisitesi oluşturulmuş ve çeşitli koruyucu maddeler bu toksisiteyi azaltmak veya gidermek için kullanılmıştır. Genel olarak koruyucu maddeler akrilamit toksisitesi oluşturulmadan önce hücrelere verilmiştir. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda tartışılmıştır.

Hong ve arkadaşları (2019) BRL-3A sıçan karaciğer hücrelerine *Allium sativum* yani sarımsağın aktif maddesi olan allisini 2 saat boyunca 3.75, 7.5, 15 ve 30 μM dozlarında uyguladıktan sonra hücrelere 24 saat boyunca 2 mM akrilamit uygulamışlardır. Sonuçta allisinin antioksidan seviyelerini arttırarak ve ROS'u azaltarak akrilamite bağlı oksidatif stresi ve DNA hasarını azalttığını öne sürmüşlerdir (Hong vd., 2019). Azari ve arkadaşları (2019) lantanitlerden az bulunan bir metal oksit türü olan seryum oksit nanoparçacıklarının koruyucu etkisini ölçmek için HepG2 karaciğer kanseri hücrelerini kullanmış ve hücrelere 30 dakika boyunca 50, 100 ve 200 μM dozlarında seryum oksit nanoparçacıklarını uygulamışlardır. Daha sonra, hücrelerde 24 saat boyunca 200 μM (IC50 dozunda) akrilamit ile hasar oluşturmuşlardır. Seryum oksit nanoparçacıkları antioksidan seviyelerini artırarak ve ROS'u azaltarak akrilamite karşı doza bağlı koruyucu bir etki göstermiştir (Azari vd., 2019). Li ve arkadaşları (2018) HepG2 karaciğer kanseri hücreleri ile yaptıkları çalışmada yabanmersini özütü antosiyaninlerinin hücreleri akrilamit toksisitesine karşı ne derece koruduklarını araştırmışlardır. Bunun için 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ antosiyanin dozları 12 saat süreyle hücrelere verilmiştir. Daha sonra, hücreler 24 saat boyunca 10 mM akrilamit ile muamele edilmiş ve sonunda akrilamitle beraber antosiyanin alan hücrelerin sadece akrilamit verilen hücrelere göre canlılıklarının daha fazla olduğu, antioksidan seviyelerinin arttığı ve oksidan seviyelerinin azaldığı görülmüştür (Li, Liu, Lv, Yan, & Yuan, 2018b). Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda akrilamit toksisitesine karşı

kullandığımız timokinon ve kuersetinin önceden verilmesi ROS-pozitif hücre sayısını azaltarak oksidatif stresi düşürmüş ve akrilamit toksisitesine karşı koruyucu etki yapmıştır. Yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak biz akrilamit toksisitesini 4 mM akrilamit ile gerçekleştirdik. Akrilamit dozlarındaki bu farklılığın sebebi bizim deneyimizde farklı hücre hattı (C6 glioblastoma) ile farklı deney tasarımı ve süresidir.

Cao ve arkadaşları (2008) kurkumini HepG2 hücrelerinde akrilamit toksisitesini baskılamak için kullanmışlardır. Özetlemek gerekirse, hücreler 2.5 µg/mL kurkumin ile muamele edilmiş ve daha sonra hücrelere 2.5-20 mM arasında değişen çeşitli akrilamit dozları verilmiştir. Bu çalışmanın bulgularına bakıldığında kurkumin HepG2 hücrelerinde akrilamit kaynaklı sitotoksik etkiyi, DNA fragmantasyonunu, mikronükleus ve ROS oluşumunu belirgin şekilde düşürmüştür (Cao vd., 2008). Yıldızbayrak ve Erkan (2019) TM3 Leydig hücrelerini kullanarak 2.5 µM kurkuminin akrilamit toksisitesine karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Hücrelere 24 saat boyunca sabit 2.5 µM kurkumin dozunu ve değişen akrilamit dozlarını (1, 10, 100 ve 1000 µM) aynı anda uygulamışlardır. Kurkuminin akrilamite bağlı zararlı etkileri giderdiğini ve ayrıca akrilamitin aktive ettiği MAPK yolağı ekspresyonunu baskıladığını göstermişlerdir (Yıldızbayrak & Erkan, 2019). Çalışmalardaki kurkuminin yaptığı koruyucu etkiye benzer bir şekilde bizim çalışmamızda da kuersetin ve timokinon ROS pozitif hücreleri azaltarak oksidatif stresi düşürmüş, C6 hücre canlılığını korumuş ve akrilamit kaynaklı çekirdek fragmantasyonu gibi hücredeki morfolojik değişiklikleri düzeltmiştir. Pan ve arkadaşları (2018) N-asetil sisteinin (NAC) akrilamitle toksisite oluşturulan PC12 sıçan feokromositoma hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmış, aynı dozda NAC (0.6 mM) 24 saat boyunca 0-10 mM arasında değişen farklı akrilamit konsantrasyonları ile birlikte hücrelere uygulanmış ve sonuçta NAC'nin artmış MDA, ROS ve TNF-α seviyelerini düşürdüğünü ve NF-κB yolunu inhibe ederken Nrf2 yolağını aktive ettiğini saptamışlardır (Pan vd., 2018). Bizim çalışmamızda koruyucu maddelerimiz Nrf2'nin boyanmasını arttırmış ve akrilamit kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etki

göstermiştir. He ve arkadaşları (2017) PC12 hücrelerinde akrilamit toksisitesine karşı yeşil çayda bulunan bir polifenol olan epigallokateşin-3-gallat (E3G) kullanmış, hücreler başlangıçta 24 saat boyunca farklı E3G konsantrasyonları (2.5, 5, 10 ve 20 μM) ile muamele edilmiş, E3G uygulanmasından sonra hücreler 24 saat boyunca 6 mM akrilamite maruz bırakılmış ve sonuçta E3G hücrelerin canlılığını koruduğu ve hücrelerin apoptoza gitmesini engellediğini annexin V, sitokrom c ve kaspaz 3 analizleri ile ve artmış Bcl/Bax oranı ile göstermişlerdir. Ek olarak, E3G ROS ve MDA'yı düşürürken GSH ve SOD antioksidan seviyelerini arttırmıştır. Bu çalışmaya benzer şekilde biz de anneksin V ve kaspaz 3/7 aktivitelerini ve süperoksit radikallerinin neden olduğu ROS'u ölçtük. Timokinon ve kuersetin uygulamamızın artan anneksin V-pozitif hücre sayısını, kaspaz 3/7 aktivitelerini ve ROS miktarlarını azalttığını gördük. Esmaeelpanah ve arkadaşları (2018) PC12 hücrelerinde akrilamit toksisitesine karşı korumak için yeşil çayın kateşinlerinden olan E3G ve epigallokateşini (EG) kullanmıştır. Hücelere 24 ve 48 saat süreyle 2.5, 5, 10, 20, 30 ve ayrı ayrı her biri 40 μM E3G ve EG verdikten sonra 24 saat boyunca 4.85 mM akrilamit uygulamışlar, hücre canlılıkları incelendiğinde de akrilamitle beraber kateşin kullanılan gruplarda akrilamit verilen gruba göre daha yüksek canlılık yüzdesi saptamışlardır. Her iki ajanda da 20 μM doz optimum doz olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda, kullandığımız maddelerin optimum dozları hücrelerin canlılıklarının en iyi görüldüğü dozlar olarak kabul edilmiş ve timokinon için 3.9 ve kuersetin için 2.0 μM dozları seçilmiştir. Yukarıda anılan çalışmaların dozları ile kıyaslandığında bizim kullandığımız maddelerin daha düşük konsantrasyonlarda etki gösterdiği görülmektedir. Mehri ve arkadaşları (2012), PC12 hücrelerini 24 saat boyunca akrilamit toksisitesi öncesinde çeşitli konsantrasyonlarda krosin (10, 20 ve 50 μM) ile inkübe etmişler, sonra PC12 hücrelerine 24 saat boyunca 5 mM akrilamit vermişlerdir. Krosinin akrilamit verilmesinden önce uygulanması hücrede DNA fragmantasyonu ve ROS üretimini azaltırken hücre canlılıklarını arttırmıştır. Ayrıca, krosinin anneksin V düzeylerini ve Bax/Bcl-2 oranını azaltarak akrilamite bağlı apoptozu azalttığı da gösterilmiştir (Mehri vd.,

2012). Bu çalışmaya benzer şekilde biz de anneksin V ve ROS testlerini yaptık. Timokinon ve kuersetin uygulamamızın artan annexin V-pozitif hücre sayısını ve ROS miktarlarını azalttığını gördük. Song ve arkadaşları (2017) BV2 fare mikrogliya hücrelerinde akrilamid toksisitesine karşı lipoik asit kullanmış ve deneylerinde hücreler ilk olarak 1 saat 50 µM lipoik asit ile ön işleme tabi tutulmuştur. Daha sonra, hücreler 24 saat boyunca 2 mM akrilamid ile muamele edilmiştir. Lipoik asitin akrilamid verilmesinden önce uygulanması hücrelerin mitokondriyal potansiyelini ve H₂O₂ seviyelerini kontrol seviyelerine getirmiş ve akrilamid uygulandığında tükenen GSH miktarlarını bir dereceye kadar artırmıştır. Ayrıca, lipoik asit beyin kaynaklı nörotrofik faktörü arttırırken artmış MPO, NO, TNF-α ve IL-1β seviyelerini düşürmüştür. Li ve arkadaşları (2017) deve dikenini özütü olan silimarinle PC12 hücrelerinde akrilamid hasarını engellemek için çalışmışlardır. Kısaca, hücreleri 3 saat boyunca 12, 24, 48, 96 ve 192 µg/mL silimarin dozlarıyla inkübe etmişler ve sonrasında 24 saat boyunca 5 mM akrilamid vermişlerdir. Özellikle 69 ve 192 µg/mL dozlarında silimarin akrilamidle beraber artan ROS ve MDA ile azalan GSH seviyelerini tersine döndürmüştür. Ayrıca, Nrf2 ve GSH-Px, glutamat sistein ligaz katalitik (GCLC) ve değiştirici (GCLM) altbirimlerini de içeren Nrf2'nin hedef antioksidan enzimlerinin ifadesini arttırmıştır (Li, Sun, Liu, Zhao, & Shao, 2017). Bizim çalışmamızda da timokinon ve kuersetinin akrilamid hasarından önce uygulanması Nrf2 ifadesini arttırmıştır. Sumizawa ve Igisu (2009) karboksifulerenin akrilamid toksisitesine karşı terapötik etkisini araştırmak için SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerini kullanmışlardır. Bu çalışmada önce sitotoksikite testi ile en uygun karboksifuleren dozu belirlenmiş, daha sonra SH-SY5Y hücreleri, 60 µM karboksifuleren ile 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bunu takiben hücrelere 18 saat boyunca farklı akrilamid konsantrasyonları uygulanmış ve sonuçta karboksifuleren verilmesiyle LDH ve kaspaz 3 aktivitesinin azaldığı, hücre canlılığının arttığı ve hücre sel GSH içeriğinin korunduğu görülmüştür (Sumizawa & Igisu, 2009). Bizim çalışmamızda da akrilamid hasarına karşı kullanılan koruyucu maddeler kaspaz 3/7 aktivitesini azaltmış ve hücre canlılığını korumuştur. Jiang ve ark. (2018) akrilamid ile uyarılmış oksidatif

hasarlanmaya karşı siyah renkli bir mantar türü olan *Ganoderma atrum* polisakkaritinin etkilerini IEC-6 epitelyal ince bağırsak hücrelerinde incelemiştir. Çalışmada, önce hücreler değişen konsantrasyonlarda (20, 40, 80 ve 160 µg/mL) *Ganoderma atrum* polisakariti ile 20 saat inkübe edilmiş ve ardından 24 saat boyunca 5 mM akrilamid uygulanmıştır. Polisakkarit antioksidan (SOD, GSH-Px) ve anti-apoptotik (Bcl-2) protein seviyelerini artırarak ve oksidan (MDA) ve pro-apoptotik (Bax, kaspazlar) protein seviyelerini azaltarak akrilamid toksisitesine karşı etkili olmuştur (Jiang vd., 2018). Bu çalışmada anneksin V testinde 5 mM akrilamid verilmesi hücrelerin %56.83'ünü apoptoza süreklemiştir. Artan dozlarda koruyucu maddenin verilmesi apoptozu %47.7'den %44.1'lere kadar düşürmüştür. Bizim çalışmamızda ise hücrelere 4 mM akrilamid uygulanmıştır ve total apoptotik hücre oranı %37.95 olarak saptanmıştır. Timokinon uygulanması bu oranı %22.75'e, kuersetin uygulanması ise %27.95'e kadar düşürmüştür. Çalışmamızın sadece akrilamid dozlarını test ettiğimiz kısmında 5 mM akrilamid verdiğimiz hücrelerde anneksin V ile belirlediğimiz total apoptoz oranı %50.35 idi. Görüldüğü gibi aynı akrilamid dozu ile farklı hücreler kullanmış olsak da benzer apoptoz oranı saptanmıştır. Chen ve arkadaşları (2014) Caco-2 insan bağırsak hücrelerinde yenilebilir mantar *Phellinus linteus*'un biyoaktif bileşenlerinden biri olan hispidinin akrilamid toksisitesine karşı koruyucu etkisini çalışmışlardır. Hispidinin koruyucu etkisini değerlendirmek için hücreler 48 saat boyunca aynı anda 5 veya 10 µg/mL hispidin ve 5 mM akrilamite maruz bırakılmıştır. Sonuçta, hispidin hücrelerin canlılık yüzdesini korumuş ve akrilamid kaynaklı ROS artışı, GSH stoklarının tükenmesi ve mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına karşı olumlu etki göstermiştir (Chen, Shen, Su, & Zheng, 2014). Bu çalışmaya benzer şekilde bizim çalışmamızda da akrilamitle artan ROS miktarları timokinon ve kuersetin maddeleriyle azaltılmıştır. Shi ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında kazeinat ve glikolize kazeinatın IEC-6 hücrelerinde akrilamid tarafından indüklenen bağırsak bariyeri deformasyonuna karşı etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 1.25-10 mM arasındaki akrilamid dozları, hücre canlılığında bir azalmaya ve LDH salımında bir artışa yol

açmıştır. Ayrıca, akrilamitin trans-epitelyal elektrik direncini azaltarak ve epitel geçirgenliğini arttırarak bağırsak bariyerlerinde anormalliklere yol açtığı bildirilmiştir. Kazeinatın 2.5 mM akrilamit ile birlikte verilmesi hücrelerin canlılığını arttırmış, bariyer anormalliklerini iyileştirmiş ve hücrelerarası bağlantı birim proteinleri olan okludin, ZO-1 ve klaudin-1'in ifadesini arttırmıştır (Shi, Fu, & Zhao, 2018). Chen ve arkadaşları (2013) mumağacının kabuğundan elde edilen mirisitrin maddesinin bağırsak hücrelerini akrilamit toksisitesine karşı koruyup korumadığını araştırmışlardır. Hücrelere 48 saat boyunca 2.5, 5 veya 10 µg/mL mirisitrin ve 5 mM akrilamiti birlikte uygulamışlar ve mirisitrinin akrilamit ile hasar verilen Caco-2 hücrelerinde azalan proliferasyonu ve artan ROS oluşumunu önlediğini öne sürmüşlerdir (Chen vd., 2013). Bu çalışmaya benzer şekilde, kullandığımız timokinon ve kuersetin maddeleri C6 glioblastoma hücrelerinde ROS-pozitif hücreleri azaltmış ve hücre canlılığını arttırmıştır. Yukarıdaki çalışmadan farklı yönlerimiz bizim çalışmamızda maddelerin 24 saat önceden ayrı ayrı verilmesidir. Rodriguez-Ramiro ve arkadaşları (2011) zeytin yağında bulunan hidroksitirozolün akrilamit toksisitesine karşı önleyici etkisini Caco-2 hücreleri üzerinde çalışmışlardır. Hücrelere önce 5, 10, 20 ve 40 µM hidroksitirozol dozları 20 saat süreyle verilmiştir. Sonrasında hücreler 5 mM akrilamit ile muamele edilmiştir. Bu çalışmanın bulgularında, akrilamitle indüklenen ROS'nin belirgin olarak nötralize edildiği, kaspaz 3 aktivitesinin orta derecede azaldığı ve GSH-Px ve glutatyon redüktaz aktivitelerinin bazal seviyelere düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca, akrilamit kaynaklı p-JNK seviyesindeki artış kısmen tersine çevrilmiştir. Ancak, hidroksitirozol ile GSH stoklarında azalma engellenememiştir (Rodriguez-Ramiro, Martin, Ramos, Bravo, & Goya, 2011). Bu çalışmada akrilamit 5 mM dozunda kullanılmış iken bizim çalışmamızda 4 mM dozunda kullanılmıştır. Dozlar birbirine nispeten yakındır. Bu çalışmada 20 saat süreyle koruyucu doz verilirken biz 24 saat süreyle verdik ve tek doz olarak maddelerimizi uyguladık. Sonuçlara bakıldığında, bizim kullandığımız koruyucu maddeler de kaspaz 3/7 ve ROS-pozitif hücre sayısını azaltmıştır. Albalawi ve arkadaşları (2017) akrilamitle indüklenen ARPE-19 insan retina hücrelerinde akrilamit toksisitesine karşı

biberiye ve ada çayında bulunan karnosik asidin koruyucu etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada hücreler önce 24 saat boyunca 10 µM karnosik asit ile ön işleme tabi tutulmuş ve sonrasında hücrelere 24 saat boyunca 0.7 veya 1 mM akrilamid uygulanmıştır. Karnosik asitin akrilamid uygulanmasından önce verilmesi ARPE-19 hücre canlılığını ve antioksidan seviyelerini arttırmıştır. Ayrıca, hücre ölümü ve oksidan seviyelerini azaltmış ve karnosik asit akrilamid uygulanmasından sonra azalan Nrf2 ekspresyonunu arttırmıştır. (Albalawi vd., 2017). Bizim çalışmamız ve yukarıda bahsedilen çalışmada koruyucu madde ve akrilamid verilmiş biçimleri aynıdır. Nrf2 ifadesine gelince, onlar Western blotla yaptıkları incelemede akrilamid verilmesiyle Nrf2'nin azaldığını gözlemlemişler iken biz immünohistokimya ile akrilamid verilmesinin boyanmayı arttırdığını gördük. Onların verdikleri koruyucu madde Nrf2 ifadesini arttırmıştır. Bizim çalışmamızda da akrilamid verilmesinden önce timokinon veya kuersetinin uygulanması Nrf2 ifadesini daha da arttırmıştır. Song ve arkadaşları (2013) insan MDA-MB-231 insan meme hücresi üzerinde akrilamid hasarı gerçekleştirmiş ve meyvelerde bulunan bir antosiyanin türü olan siyanidin-3-glukozit (S3G) ile bu hasarı gidermeye çalışmışlardır. Hücrelere 4, 10, 25, 50 ve 100 µM S3G uyguladıktan sonra hücrelere 20 saat boyunca 5 mM akrilamid vererek hasar oluşturmuşlardır. S3G'nin önceden verilmesi, ROS üretimini azaltarak, GSH depolarının tükenmesini engelleyerek ve sitoprotektif enzimlerin ekspresyonunu arttırarak akrilamid toksisitesine karşı koruyucu bir rol oynamıştır. Ayrıca, S3G'nin yüksek konsantrasyonlarda (50 ve 100 µM) sitokrom P450 2E1'in ifadesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Song vd., 2013). Bu çalışmayla benzer bir şekilde biz de akrilamidin arttırdığı süperoksit kaynaklı ROS oluşumunun timokinon ve kuersetin maddeleriyle azaldığını gösterdik.

Çalışmamızın sınırlılıklarından bahsetmek gerekirse, deneyimizde Nrf2 incelemesi yapılırken Nrf2'nin nükleer ve sitoplazmik miktarı ayrı ayrı Western blot ve real-time PCR analizleriyle incelenebilirdi. Deneyimizde doğrulamak için MTT testinin yanında bir başka sitotoksikite testi daha kullanılabilirdi. Çalışmayı daha ileriye taşıyacak olursak timokinon ve

kuersetinin koruyucu etkileri *in vivo* çalışmamızın yanında bir de *in vitro* çalışmayla da desteklenebilirdi. Ayrıca, deneyimizde apoptoz ve/veya otofaji inhibitörleriyle hücrelerin kullanılan maddelere tepkisi ölçülebilir ve antioksidan miktarlarının değişimi değerlendirilebilirdi.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Akrilamit evlerimize kadar ulaşan nörotoksik ve reprotoksik bir ajan olduğu kanıtlanmış, kanser yapma ihtimali olan maddeler arasında yer alan, birçok hücre ve organa çeşitli toksik etkileri olan tehlikeli bir ajandır. Akrilamit toksisitesini engellemede kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır, koruyucu maddelerin kullanımı bu yaklaşımlardan bir tanesidir. Biz de bu çalışmamızda timokinon ve kuersetin fitokimyasallarını kullanmayı seçtik. Çalışmamızda akrilamite karşı koruyucu olarak kullandığımız bu maddelerin akrilamitle indüklenen apoptozu, otofajiyi, oksidatif stresi ve hücrede morfolojik deformasyonları engellediğini gösterdik. Timokinon ve kuersetin akrilamit toksisitesini engellemede potansiyel sergileyen fitokimyasallar olup bu kimyasallarla ilgili daha ileri çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Albalawi, A., Alhasani, R. H. A., Biswas, L., Reilly, J., & Shu, X. H. (2017). Protective effect of carnosic acid against acrylamide-induced toxicity in RPE cells. *Food Chem Toxicol*, *108*, 543-553. doi:10.1016/j.fct.2017.01.026
- Alhebshi, A. H., Gotoh, M., & Suzuki, I. (2013). Thymoquinone protects cultured rat primary neurons against amyloid beta-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, *433*(4), 362-367. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.139
- Alhebshi, A. H., Odawara, A., Gotoh, M., & Suzuki, I. (2014). Thymoquinone protects cultured hippocampal and human induced pluripotent stem cells-derived neurons against alpha-synuclein-induced synapse damage. *Neurosci Lett*, *570*, 126-131. doi:10.1016/j.neulet.2013.09.049
- Anand David, A. V., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. (2016). Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev*, *10*(20), 84-89. doi:10.4103/0973-7847.194044
- Ansar, S., Siddiqi, N. J., Zargar, S., Ganaie, M. A., & Abudawood, M. (2016). Hepatoprotective effect of Quercetin supplementation against Acrylamide-induced DNA damage in wistar rats. *BMC Complem Altern M*, *16*(1), 327-327. doi:10.1186/s12906-016-1322-7
- Aslam, H., Shahzad, M., Shabbir, A., & Irshad, S. (2018). Immunomodulatory effect of thymoquinone on atopic dermatitis. *Mol Immunol*, *101*, 276-283. doi:10.1016/j.molimm.2018.07.013
- Attoff, K., Kertika, D., Lundqvist, J., Oredsson, S., & Forsby, A. (2016). Acrylamide affects proliferation and differentiation of the neural progenitor cell line C17.2 and the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Toxicol In Vitro*, *35*, 100-111. doi:10.1016/j.tiv.2016.05.014
- Aycan, I. O., Tufek, A., Tokgoz, O., Evliyaoglu, O., Firat, U., Kavak, G. O., Turgut, H., & Yuksel, M. U. (2014). Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Int J Surg*, *12*(3), 213-218. doi:10.1016/j.ijssu.2013.12.013
- Azari, A., Shokrzadeh, M., Zamani, E., Amani, N., & Shaki, F. (2019). Cerium oxide nanoparticles protects against acrylamide induced toxicity in HepG2 cells through modulation of oxidative stress. *Drug Chem Toxicol*, *42*(1), 54-59. doi:10.1080/01480545.2018.1477793

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal el-Din, A. M., & Abdel-Wahab, M. H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*, *26*(2), 87-98. doi:10.1081/dct-120020404
- Baranska, J., Przybyłek, K., & Sabala, P. (1999). Capacitative calcium entry. Glioma C6 as a model of nonexcitable cells. *Pol J Pharmacol*, *51*(2), 153-162.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., & Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, *161*(3839), 370-371. doi:10.1126/science.161.3839.370
- Bindokas, V. P., Jordan, J., Lee, C. C., & Miller, R. J. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci*, *16*(4), 1324-1336.
- Bo, L., Liu, Y., Jia, S., Liu, Y., Zhang, M., Li, S., Zhao, X., & Sun, C. (2018). Metabonomics analysis of quercetin against the nephrotoxicity of acrylamide in rats. *Food Funct*, *9*(11), 5965-5974. doi:10.1039/c8fo00902c
- Bouhleb, A., Ben Mosbah, I., Hadj Abdallah, N., Ribault, C., Viel, R., Mannai, S., Corlu, A., & Ben Abdennebi, H. (2017). Thymoquinone prevents endoplasmic reticulum stress and mitochondria-induced apoptosis in a rat model of partial hepatic warm ischemia reperfusion. *Biomed Pharmacother*, *94*, 964-973. doi:10.1016/j.biopha.2017.08.018
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *68*(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brismar, T. (1995). Physiology of transformed glial cells. *Glia*, *15*(3), 231-243. doi:10.1002/glia.440150305
- Bule, M., Abdurahman, A., Nikfar, S., Abdollahi, M., & Amini, M. (2019). Antidiabetic effect of quercetin: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Food Chem Toxicol*, *125*, 494-502. doi:10.1016/j.fct.2019.01.037
- Burnstock, G. (2002). Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin Med (Lond)*, *2*(1), 45-53. doi:10.7861/clinmedicine.2-1-45

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Calleman, C. J., Bergmark, E., Stern, L. G., & Costa, L. G. (1993). A nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by the neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide. *Environ Health Perspect*, *99*, 221-223.
- Cao, J., Liu, Y., Jia, L., Jiang, L.-P., Geng, C.-Y., Yao, X.-F., Kong, Y., Jiang, B.-N., Zhong, L.-F. (2008). Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. *J Agr Food Chem*, *56*(24), 12059-12063.
- Cen, H., Mao, F., Aronchik, I., Fuentes, R. J., & Firestone, G. L. (2008). DEVD-NucView488: a novel class of enzyme substrates for real-time detection of caspase-3 activity in live cells. *FASEB J*, *22*(7), 2243-2252. doi:10.1096/fj.07-099234
- Chen, J. H., & Chou, C. C. (2015). Acrylamide inhibits cellular differentiation of human neuroblastoma and glioblastoma cells. *Food Chem Toxicol*, *82*, 27-35. doi:10.1016/j.fct.2015.04.030
- Chen, W., Feng, L., Shen, Y., Su, H., Li, Y., Zhuang, J., Zhang, L., & Zheng, X. (2013). Myricitrin inhibits acrylamide-mediated cytotoxicity in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *Biomed Res Int*, *2013*, 724183. doi:10.1155/2013/724183
- Chen, W., Shen, Y., Su, H., & Zheng, X. (2014). Hispidin derived from *Phellinus linteus* affords protection against acrylamide-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Chem Biol Interact*, *219*, 83-89. doi:10.1016/j.cbi.2014.05.010
- Corrigall, A. V., & Kirsch, R. E. (1988). Glutathione S-transferase distribution and concentration in human organs. *Biochem Int*, *16*(3), 443-448.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., & Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res*, *51*(2), 117-123. doi:10.1016/j.phrs.2004.06.002
- Dearfield, K. L., Douglas, G. R., Ehling, U. H., Moore, M. M., Sega, G. A., & Brusick, D. J. (1995). Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat Res*, *330*(1-2), 71-99. doi:10.1016/0027-5107(95)00037-j
- El-Beltagi, H. S., & Ahmed, M. M. (2016). Assessment the Protective Role of Quercetin on Acrylamide-Induced Oxidative Stress in Rats. *J Food Biochem*, *40*(6), 715-723. doi:10.1111/jfbc.12262

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- El-Dakhakhny, M. (1963). STUDIES ON THE CHEMICAL CONSTITUTION OF EGYPTIAN NIGELLA SATIVA L. SEEDS. II) THE ESSENTIAL OIL. *Planta Med*, 11(04), 465-470. doi:10.1055/s-0028-1100266
- Erden Inal, M., & Kahraman, A. (2000). The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology*, 154(1-3), 21-29. doi:10.1016/s0300-483x(00)00268-7
- Eriksson, S. (2005). *Acrylamide in food products Identification, formation and analytical methodology*. (Doctoral Thesis), Stockholm University, Akademitryck.
- Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Shahri, A. M. P., & Samini, F. (2018). The Neuroprotective Effects of Thymoquinone: A Review. *Dose-Response*, 16(2), 1559325818761455. doi:10.1177/1559325818761455
- Fouda, A.-M. M., Daba, M.-H. Y., & Ahmed, A. R. Y. (2014). Antigenotoxic Effects of Thymoquinone against Benzo[a]Pyrene and Mitomycin C - Induced Genotoxicity in Cultured Human Lymphocytes. *Research in Immunology: An International Journal*, 2014(2014). doi: 10.5171/2014/535279
- Freshney, R. (2005). *Culture of Animal Cells :A manual of basic texhnique* (5th ed.). Hoboken, N.J: Wiley-Liss.
- Friedman, M. (2003). Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *J Agr Food Chem*, 51(16), 4504-4526. doi:10.1021/jf030204+
- Friedman, M., & Levin, C. E. (2008). Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *J Agr Food Chem*, 56(15), 6113-6140. doi:10.1021/jf0730486
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12. doi:10.1002/path.2697
- Gore, P. R., Prajapati, C. P., Mahajan, U. B., Goyal, S. N., Belemkar, S., Ojha, S., & Patil, C. R. (2016). Protective Effect of Thymoquinone against Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis through Inhibiting DNA Damage and Upregulation of Nrf2 Expression. *Int J Biol Sci*, 12(8), 944-953. doi:10.7150/ijbs.15781
- Guo, S., Sun, J., & Zhuang, Y. (2019). Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by up-regulation miR-124 in human renal tubular epithelial cell line HK-2. *Biofactors*. doi:10.1002/biof.1596

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- He, F. S., Zhang, S. L., Wang, H. L., Li, G., Zhang, Z. M., Li, F. L., Dong, X. M., & Hu, F. R. (1989). Neurological and electroneuromyographic assessment of the adverse effects of acrylamide on occupationally exposed workers. *Scand J Work Environ Health*, 15(2), 125-129. doi:10.5271/sjweh.1878
- Hong, Y., Nan, B., Wu, X., Yan, H., & Yuan, Y. (2019). Allicin alleviates acrylamide-induced oxidative stress in BRL-3A cells. *Life Sci*, 231, 116550. doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116550
- IARC. (1994). *International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans.:* International Agency for Research on Cancer
- Ismail, N., Ismail, M., Mazlan, M., Latiff, L. A., Imam, M. U., Iqbal, S., Azmi, N. H., Ghafar, S. A., & Chan, K. W. (2013). Thymoquinone prevents beta-amyloid neurotoxicity in primary cultured cerebellar granule neurons. *Cell Mol Neurobiol*, 33(8), 1159-1169. doi:10.1007/s10571-013-9982-z
- Jiang, G., Zhang, L., Wang, H., Chen, Q., Wu, X., Yan, X., Chen, Y., & Xie, M. (2018). Protective effects of a Ganoderma atrum polysaccharide against acrylamide induced oxidative damage via a mitochondria mediated intrinsic apoptotic pathway in IEC-6 cells. *Food Funct*, 9(2), 1133-1143. doi:10.1039/c7fo01619k
- JIFSAN/NCFST. (2004). Mechanisms of formation of acrylamide in food summary report-Acrylamide in Food Workshop Retrieved from <http://jifsan.umd.edu/events/view/65>
- Kacar, S., & Sahinturk, V. (2018). A Multiple Organ Toxicant: Acrylamide. *Osmangazi Journal of Medicine*, 40(1), 94-100.
- Kacar, S., Sahinturk, V., & Kutlu, H. (2017a). *Analysis of the Effect of Acrylamide on MCF-7 Human Breast Adenocarcinoma Cell Line With Oxidative, Apoptotic, Morphological and Cell Cycle Assays*. Paper presented at the 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul.
- Kacar, S., Sahinturk, V., & Kutlu, H. (2017b). *Examination of apoptosis inducing effect of acrylamide on 5RP7 cells*. Paper presented at the 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kacar, S., Sahinturk, V., Can, B., & Musmul, A. (2018). L-Cysteine Partially Protects Against Acrylamide-Induced Testicular Toxicity. *Balkan medical journal*, 35(4), 311-319. doi:10.4274/balkanmedj.2017.0830
- Kacar, S., Sahinturk, V., & Kutlu, H. (2019). Effect of acrylamide on BEAS-2B normal human lung cells: Cytotoxic, oxidative, apoptotic and morphometric analysis. *Acta Histochem*, 121(5), 595-603. doi:10.1016/j.acthis.2019.05.005
- Kacar, S., Vejselova, D., Kutlu, H., & Sahinturk, V. (2017c). Acrylamide-derived cytotoxic, anti-proliferative, and apoptotic effects on A549 cells. *Hum Exp Toxicol*, 960327117712386. doi:10.1177/0960327117712386
- Kawabata, K., Mukai, R., & Ishisaka, A. (2015). Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food Funct*, 6(5), 1399-1417. doi:10.1039/c4fo01178c
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. doi:10.1038/bjc.1972.33
- Khattab, M. M., & Nagi, M. N. (2007). Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytother Res*, 21(5), 410-414. doi:10.1002/ptr.2083
- Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş* (R. Demir Ed.). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Klopocka, W., Korczynski, J., & Pomorski, P. (2013). Cytoskeleton and nucleotide signaling in glioma C6 cells. *Adv Exp Med Biol*, 986, 103-119. doi:10.1007/978-94-007-4719-7_6
- Kuhnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 24, 117-191.
- Kundu, J., Kim, D. H., Kundu, J. K., & Chun, K. S. (2014). Thymoquinone induces heme oxygenase-1 expression in HaCaT cells via Nrf2/ARE activation: Akt and AMPKalpha as upstream targets. *Food Chem Toxicol*, 65, 18-26. doi:10.1016/j.fct.2013.12.015
- Lakhanpal, P., & Rai, D. K. (2007). Quercetin: A Versatile Flavonoid, *IJMU*, 2(2). doi: 10.4314/ijmu.v2i2.39851

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Li, L., Sun, H.-y., Liu, W., Zhao, H.-y., & Shao, M.-l. (2017). Silymarin protects against acrylamide-induced neurotoxicity via Nrf2 signalling in PC12 cells. *Food Chem Toxicol*, *102*, 93-101. doi:10.1016/j.fct.2017.01.021
- Li, S., Yuan, S., Zhao, Q., Wang, B., Wang, X., & Li, K. (2018a). Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. *Biomed Pharmacother*, *100*, 441-447. doi:10.1016/j.biopha.2018.02.055
- Li, X., Liu, H., Lv, L., Yan, H., & Yuan, Y. (2018b). Antioxidant activity of blueberry anthocyanin extracts and their protective effects against acrylamide-induced toxicity in HepG2 cells. *Int J Food Sci Tech*, *53*(1), 147-155. doi:10.1111/ijfs.13568
- Liu, C. M., Ma, J. Q., & Sun, Y. Z. (2010). Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environ Toxicol Pharmacol*, *30*(3), 264-271. doi:10.1016/j.etap.2010.07.002
- Liu, Z., Song, G., Zou, C., Liu, G., Wu, W., Yuan, T., Liu, X. J. F. R. B., & Medicine. (2015). Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells. *Free Radic Biol Med*, *84*, 42-53.
- LoPachin, R. M., & Gavin, T. (2012). Molecular mechanism of acrylamide neurotoxicity: lessons learned from organic chemistry. *Environ Health Perspect*, *120*(12), 1650-1657. doi:10.1289/ehp.1205432
- Luo, Y. S., Long, T. Y., Shen, L. C., Huang, S. L., Chiang, S. Y., & Wu, K. Y. (2015). Synthesis, characterization and analysis of the acrylamide- and glycidamide-glutathione conjugates. *Chem Biol Interact*, *237*, 38-46. doi:10.1016/j.cbi.2015.05.002
- Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, *146*(1), 3-15.
- Mansour, M. A., Nagi, M. N., El-Khatib, A. S., & Al-Bekairi, A. M. (2002). Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochem Funct*, *20*(2), 143-151. doi:10.1002/cbf.968

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Martins, C., Oliveira, N. G., Pingarilho, M., Gamboa da Costa, G., Martins, V., Marques, M. M., Beland, F. A., Churchwell, M. I., Doerge, D. R., & Rueff, J. J. T. S. (2006). Cytogenetic damage induced by acrylamide and glycidamide in mammalian cells: correlation with specific glycidamide-DNA adducts. *Toxicol Sci*, *95*(2), 383-390.
- Mehri, S., Abnous, K., Mousavi, S. H., Shariaty, V. M., Hosseinzadeh, H. J. C., & neurobiology, m. (2012). Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*, *32*(2), 227-235.
- Mehri, S., Shahi, M., Razavi, B. M., Hassani, F. V., & Hosseinzadeh, H. (2014). Neuroprotective effect of thymoquinone in acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. *Iran J Basic Med Sci*, *17*(12), 1007-1011.
- Memariani, H., Memariani, M., & Ghasemian, A. (2019). An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. *World J Microbiol Biotechnol*, *35*(9), 143. doi:10.1007/s11274-019-2719-5
- Meshcher, A. L. (2019). *JUNQUEIRA Temel Histoloji* (S. Solakoglu, A. Erdoğan, & H. S. Mutlu Eds. Ondördüncü Baskı ed.): Güneş Tıp Kitapevleri.
- Mousavi, S. H., Tayarani-Najaran, Z., Asghari, M., & Sadeghnia, H. R. (2010). Protective effect of Nigella sativa extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. *Cell Mol Neurobiol*, *30*(4), 591-598. doi:10.1007/s10571-009-9484-1
- Mucci, L. A., Dickman, P. W., Steineck, G., Adami, H. O., & Augustsson, K. (2003). 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*, *88*(1), 84-89. doi:10.1038/sj.bjc.6600726
- Nabors, L. B., Ammirati, M., Bierman, P. J., Brem, H., Butowski, N., Chamberlain, M. C., DeAngelis, L. M., Fenstermaker, R. A., Friedman, A., Gilbert, M. R., Hesser, D., Holdhoff, M., Junck, L., Lawson, R., Loeffler, J. S., Maor, M. H., Moots, P. L., Morrison, T., Mrugala, M. M., Newton, H. B., Portnow, J., Raizer, J. J., Recht, L., Shrieve, D. C., Sills, A. K., Jr., Tran, D., Tran, N., Vronis, F. D., Wen, P. Y., McMillian, N., Ho, M., & National Comprehensive Cancer, N. (2013). Central nervous system cancers. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, *11*(9), 1114-1151. doi:10.6004/jnccn.2013.0132

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Nakagawa, T., & Ohta, K. (2019). Quercetin Regulates the Integrated Stress Response to Improve Memory. *Int J Mol Sci*, 20(11). doi:10.3390/ijms20112761
- NCBI-PubChemDatabase. (2019). Acrylamide, CID=6579, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acrylamide> (accessed on Dec. 31, 2019).
- Omar, H. M., Abdel-Ghafar, S. K., Fiedan, I. O., & Ahmed, E. A. (2015). Thymoquinone ameliorate testicular toxicity induced by acrylamide in rats. *The Journal of Free Radicals and Antioxidants*, 142, 407-414.
- Pan, X., Wu, X., Yan, D., Peng, C., Rao, C., & Yan, H. (2018). Acrylamide-induced oxidative stress and inflammatory response are alleviated by N-acetylcysteine in PC12 cells: Involvement of the crosstalk between Nrf2 and NF-kappaB pathways regulated by MAPKs. *Toxicol Lett*, 288, 55-64. doi:10.1016/j.toxlet.2018.02.002
- Parker, K., Norenberg, M., & Vernadakis, A. (1980). "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science*, 208(4440), 179-181. doi:10.1126/science.6102413
- Pelucchi, C., Bosetti, C., Galeone, C., & La Vecchia, C. (2015). Dietary acrylamide and cancer risk: An updated meta-analysis. *Int J Cancer*, 136(12), 2912-2922. doi:10.1002/ijc.29339
- Pennisi, M., Malaguarnera, G., Puglisi, V., Vinciguerra, L., Vacante, M., & Malaguarnera, M. (2013). Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers. *Int J Environ Res Public Health*, 10(9), 3843-3854. doi:10.3390/ijerph10093843
- Pourentezari, M., Talebi, A., Abbasi, A., Khalili, M. A., Mangoli, E., & Anvari, M. (2014). Effects of acrylamide on sperm parameters, chromatin quality, and the level of blood testosterone in mice. *Iran J Reprod Med*, 12(5), 335-342.
- Radad, K. S., Al-Shraim, M. M., Moustafa, M. F., & Rausch, W. D. (2015). Neuroprotective role of thymoquinone against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced dopaminergic cell death in primary mesencephalic cell culture. *Neurosciences (Riyadh)*, 20(1), 10-16.
- Ramyaa, P., & Padma, V. V. (2013). Ochratoxin-induced toxicity, oxidative stress and apoptosis ameliorated by quercetin--modulation by Nrf2. *Food Chem Toxicol*, 62, 205-216. doi:10.1016/j.fct.2013.08.048

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Rice, J. M. (2005). The carcinogenicity of acrylamide. *Mutat Res*, 580(1-2), 3-20. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.09.008
- Rodriguez-Ramiro, I., Martin, M. A., Ramos, S., Bravo, L., & Goya, L. (2011). Olive oil hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *Toxicology*, 288(1-3), 43-48. doi:10.1016/j.tox.2011.07.002
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2014). *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas-İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile*. (B. Baykal Ed. 6. baskı ed.). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Sabala, P., Targos, B., Caravelli, A., Czajkowski, R., Lim, D., Gragnaniello, G., Santella, L., & Baranska, J. (2002). Role of the actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry in glioma C6 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 296(2), 484-491. doi:10.1016/s0006-291x(02)00893-8
- Sahinturk, V., Kacar, S., Vejselova, D., & Kutlu, H. M. (2018). Acrylamide exerts its cytotoxicity in NIH/3T3 fibroblast cells by apoptosis. *Toxicol Ind Health*, 34(7), 481-489. doi:10.1177/0748233718769806
- Sankaranarayanan, C., & Pari, L. (2011). Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and beta-cell damage in experimental hyperglycemic rats. *Chem Biol Interact*, 190(2-3), 148-154. doi:10.1016/j.cbi.2011.02.029
- Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, 45(3), 528-537. doi:10.1016/s0008-6363(99)00384-3
- Schmid, I., Krall, W. J., Uittenbogaart, C. H., Braun, J., & Giorgi, J. V. (1992). Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, 13(2), 204-208. doi:10.1002/cyto.990130216
- Sega, G. A., Generoso, E. E., Brimer, P. A., & Malling, H. V. (1990). Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled dna synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA. *Environ Mol Mutagen*, 16(3), 137-142. doi:10.1002/em.2850160302
- Segeberback, D., Calleman, C. J., Schroeder, J. L., Costa, L. G., & Faustman, E. M. (1995). Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [14C]acrylamide. *Carcinogenesis*, 16(5), 1161-1165.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Shi, J., Fu, Y., & Zhao, X.-H. (2018). Effects of Maillard-type caseinate glycation on the preventive action of caseinate digests in acrylamide-induced intestinal barrier dysfunction in IEC-6 cells. *RSC Adv*, 8(66), 38036-38046. doi:10.1039/C8RA08103D
- Shvets, E., Fass, E., & Elazar, Z. (2008). Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy*, 4(5), 621-628. doi:10.4161/auto.5939
- Solomon, J. J., Fedyk, J., Mukai, F., & Segal, A. (1985). Direct Alkylation of 2'-Deoxynucleosides and DNA following in Vitro Reaction with Acrylamide. *Cancer Res*, 45(8), 3465-3470.
- Song, G., Liu, Z., Wang, L., Shi, R., Chu, C., Xiang, M., Tian, Q., & Liu, X. (2017). Protective effects of lipoic acid against acrylamide-induced neurotoxicity: involvement of mitochondrial energy metabolism and autophagy. *Food Funct*, 8(12), 4657-4667. doi:10.1039/c7fo01429e
- Song, H. X., Wang, R., Geng, Z. M., Cao, S. X., & Liu, T. Z. (2008). [Subchronic exposure to acrylamide affects reproduction and testis endocrine function of rats]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 14(5), 406-410.
- Song, J., Zhao, M., Liu, X., Zhu, Y., Hu, X., & Chen, F. (2013). Protection of cyanidin-3-glucoside against oxidative stress induced by acrylamide in human MDA-MB-231 cells. *Food Chem Toxicol*, 58, 306-310. doi:10.1016/j.fct.2013.05.003
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M.-C., & Riediker, S. (2002). Food chemistry: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419(6906), 449-450.
- Su, J. F., Guo, C. J., Wei, J. Y., Yang, J. J., Jiang, Y. G., & Li, Y. F. (2003). Protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by oral pretreatment with quercetin. *Biomed Environ Sci*, 16(1), 1-8.
- Sumizawa, T., & Igisu, H. (2009). Suppression of acrylamide toxicity by carboxyfullerene in human neuroblastoma cells in vitro. *Arch Toxicol*, 83(9), 817-824. doi:10.1007/s00204-009-0438-7
- Tabeshpour, J., Mehri, S., Abnous, K., & Hosseinzadeh, H. (2019). Neuroprotective Effects of Thymoquinone in Acrylamide-Induced Peripheral Nervous System Toxicity Through MAPKinase and Apoptosis Pathways in Rat. *Neurochem Res*, 44(5), 1101-1112. doi:10.1007/s11064-019-02741-4

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Tornqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem*, 50(17), 4998-5006.
- Thompson, K. K., & Tsirka, S. E. (2017). The Diverse Roles of Microglia in the Neurodegenerative Aspects of Central Nervous System (CNS) Autoimmunity. *Int J Mol Sci*, 18(3), 504. doi:10.3390/ijms18030504
- Tsai, Y. J., Chen, I. L., Horng, L. Y., & Wu, R. T. (2002). Induction of differentiation in rat C6 glioma cells with Saikosaponins. *Phytother Res*, 16(2), 117-121.
- Ulu, R., Dogukan, A., Tuzcu, M., Gencoglu, H., Ulas, M., Ilhan, N., Muqbil, I., Mohammad, R. M., Kucuk, O., & Sahin, K. (2012). Regulation of renal organic anion and cation transporters by thymoquinone in cisplatin induced kidney injury. *Food Chem Toxicol*, 50(5), 1675-1679. doi:10.1016/j.fct.2012.02.082
- Uthra, C., Shrivastava, S., Jaswal, A., Sinha, N., Reshi, M. S., & Shukla, S. (2017). Therapeutic potential of quercetin against acrylamide induced toxicity in rats. *Biomed Pharmacother*, 86, 705-714. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.065
- Uylas, M. U., Sahin, A., Sahinturk, V., & Alatas, I. O. (2018). Quercetin dose affects the fate of hepatic ischemia and reperfusion injury in rats: An experimental research. *Int J Surg*, 53, 117-121. doi:10.1016/j.ijisu.2018.03.043
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184(1), 39-51. doi:10.1016/0022-1759(95)00072-i
- Waheed, M., & Mohammed, H. (2012). Fenvalerate-induced Oxidative Stress in Erythrocytes and the Protective Role of Quercetin. *Int.J. PharmTech Res.*, 4(3), 1078-1083.
- Wang, X., Li, L., & Zhang, G. (2019). Quercetin protects the buffalo rat liver (BRL-3A) cells from aflatoxin B1-induced cytotoxicity via activation of Nrf2-ARE pathway. *World Mycotoxin J*, 1-14. doi:10.3920/wmj2019.2465
- White, N., & Burnstock, G. (2006). P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 27(4), 211-217. doi:https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.02.004

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G., & Tan, K. H. (2012). Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol*, 83(4), 443-451. doi:10.1016/j.bcp.2011.09.029
- Wypych, D., & Baranska, J. (2013). Cross-talk in nucleotide signaling in glioma C6 cells. *Adv Exp Med Biol*, 986, 31-59. doi:10.1007/978-94-007-4719-7_3
- Wypych, D., & Pomorski, P. (2013). Calcium signaling in glioma cells--the role of nucleotide receptors. *Adv Exp Med Biol*, 986, 61-79. doi:10.1007/978-94-007-4719-7_4
- Yetkin, N. A., Buyukoglan, H., Sonmez, M. F., Tutar, N., Gulmez, I., & Yilmaz, I. (2019). The protective effects of thymoquinone on lung damage caused by cigarette smoke. *Biotech Histochem*, 1-8. doi:10.1080/10520295.2019.1681511
- Yildizbayrak, N., & Erkan, M. (2019). Therapeutic effect of curcumin on acrylamide-induced apoptosis mediated by MAPK signaling pathway in Leydig cells. *J Biochem Mol Toxicol*, 33(7), e22326. doi:10.1002/jbt.22326
- Yousef, M. I., & El-Demerdash, F. M. (2006). Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*, 219(1-3), 133-141. doi:10.1016/j.tox.2005.11.008
- Zargar, S., Siddiqi, N. J., Ansar, S., Alsulaimani, M. S., & El Ansary, A. K. (2016). Therapeutic role of quercetin on oxidative damage induced by acrylamide in rat brain. *Pharm Biol*, 54(9), 1763-1767.
- Zhang, M., Swarts, S. G., Yin, L., Liu, C., Tian, Y., Cao, Y., Swarts, M., Yang, S., Zhang, S. B., Zhang, K., Ju, S., Olek, D. J., Jr., Schwartz, L., Keng, P. C., Howell, R., Zhang, L., & Okunieff, P. (2011). Antioxidant properties of quercetin. *Adv Exp Med Biol*, 701, 283-289. doi:10.1007/978-1-4419-7756-4_38

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler:

Adı-Soyadı : Sedat KAÇAR
Doğum tarihi ve yeri : 17.01.1984 - Şişli
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresleri : ESOGÜ Tıp Fakültesi – Temel Tıp
Bilimleri - Histoloji ve Embriyoloji
ABD

Eğitim Durumu:

1990-1996 Önder İlköğretim Okulu
1996-1998 Gültepe İlköğretim Okulu
1998-2002 Sarıyer V.K.V. Lisesi (Y.D.A.)
2002-2003 ODTÜ yabancı dil hazırlık
2003-2010 Orta Doğu Teknik Üniversitesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik
Bölümü (Lisans)
2013-2015 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi - Histoloji ve Embriyoloji
(Yükseklisans)
Diller: Türkçe (Anadil), İngilizce (ileri derecede), Almanca (başlangıç),
İspanyolca (başlangıç).

Mesleki Deneyim:

Hacettepe Eczacılık Fakültesi Laboratuvarı (2008)
Odtü Moleküler Biyoloji ve Genetik Labarotuarı (2008-2010)
İzmir Adli Tıp Kurumu (2010-2013)
ESOGÜ Tıp-Histoloji ve Embriyoloji ABD (2013- Devam Ediyor)

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Biyokimya Derneği -2017- Devam Ediyor
Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği -2016- Devam Ediyor

Yayımlar:

A-) Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1- KAÇAR SEDAT, KAR FATİH, HACIOĞLU CEYHAN, KANBAK GÜNGÖR, SAHINTÜRK VAROL (2020). The effects of L-NAME on DU145 human prostate cancer cell line: A cytotoxicity-based study.

Human Experimental Toxicology, 39(2), 182-193., Doi: 10.1177/0960327119880591.

2- HACIOGLU CEYHAN, KAR FATİH, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KANBAK GÜNGÖR (2020). High Concentrations of Boric Acid Trigger Concentration-Dependent Oxidative Stress, Apoptotic Pathways and Morphological Alterations in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line. Biological Trace Element Research, 193(2), 400-409., Doi: 10.1007/s12011-019-01739-x.

3- BEKTUR AYKANAT NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, KARAKAYA SERIFE, SAHINTÜRK VAROL (2020). Silymarin suppresses HepG2 hepatocarcinoma cell progression through downregulation of Slit- 2/Robo-1 pathway. Pharmacological Reports, Doi: 10.1007/s43440-019-00040-x.

4- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KUTLU HATICE MEHTAP (2019). Effect of acrylamide on BEAS- 2B normal human lung cells: Cytotoxic, oxidative, apoptotic and morphometric analysis. Acta Histochemica, 121(5):595-603.

5- HACIOGLU CEYHAN, KAÇAR SEDAT, KAR FATİH, SAHINTÜRK VAROL, KANBAK GÜNGÖR (2019). Concentration-Dependent Effects of Zinc Sulfate on DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line: Oxidative, Apoptotic, Inflammatory, and Morphological Analyzes. Biological Trace Element Research, Doi: 10.1007/s12011-019-01879-0.

6- KAÇAR SEDAT, ÜNVER HAKAN, SAHINTÜRK VAROL (2019). A Mononuclear Copper(II) Complex Containing Benzimidazole and Pyridyl Ligands: Synthesis, Characterization, and Antiproliferative Activity against Human Cancer Cells. Arabian Journal of Chemistry. Doi:10.1016/j.arabjc.2019.08.002.

7- KAR FATİH, HACIOGLU CEYHAN, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KANBAK GÜNGÖR (2019). Betaine suppresses cell proliferation by increasing oxidative stress-mediated apoptosis and inflammation in DU-145 human prostate cancer cell line. Cell Stress Chaperones, 24: 871-881.

8- SAHINTÜRK VAROL, KAÇAR SEDAT, DJANAN VEJSELOVA, KUTLU HATICE MEHTAP (2018). Acrylamide Exerts Its Cytotoxicity In NIH/3T3 Fibroblast Cells By Apoptosis. Toxicology and Industrial Health, 34(7):481-489.

9- GÜNES SIBEL, SAHINTÜRK VAROL, USLU SEMA, AYHANCI ADNAN, KAÇAR SEDAT, UYAR RUHI (2018). Protective Effects of

Selenium on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Kidney Injury. *Biological Trace Element Research*, Doi: 10.1007/s12011-017-1231-8.

10- KAÇAR SEDAT, CAN BETÜL, MUSMUL AHMET, SAHINTÜRK VAROL (2018). L-Cysteine Partially Protects Against Acrylamide-Induced Testicular Toxicity. *Balkan Medical Journal*, 35(4), 311-319., Doi: 10.4274/balkanmedj.2017.0830

11- KAÇAR SEDAT, VEJSELOVA DJANAN, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2018). Acrylamide-derived cytotoxic, anti-proliferative, and apoptotic effects on A549 cells. *Human Experimental Toxicology*, 37(5), 468-474.

12- SAHINTURK VAROL, KAÇAR SEDAT, ŞAHİN ERHAN, & AYKANAT NURIYE EZGI BEKTUR (2020). Investigation of endoplasmic reticulum stress and sonic hedgehog pathway in diabetic liver injury in mice. *Life Sci*, 117416. Doi: 10.1016/j.lfs.2020.117416.

13- KACAR SEDAT & SAHINTURK VAROL (2020). The Protective Agents Used Against Acrylamide Toxicity: An In Vitro Cell Culture Study-Based Review. *Cell Journal*. (ACCEPTED MANUSCRIPT in Press by 2021 with volume (issue):23 (3)).

14- KACAR SEDAT, AYKANAT NURIYE EZGI BEKTUR & SAHINTURK VAROL (2020). Silymarin inhibited DU145 cells by activating SLIT2 protein and suppressing expression of CXCR4. *Medical Oncology*. (ACCEPTED MANUSCRIPT).

B.-) Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1- Filizay Mehmet Caner, BÜYÜKTORTOP GÖKÇİNAR NESRİN, SAHINTÜRK VAROL, ÖNER KEVSER SETENAY, KAÇAR SEDAT, ONARAN ZAFER, YUMUSAK MEHMET ERHAN (2019). The evaluation of retinol palmitate against photokeratitis in rat eyes exposed to ultraviolet B radiation. *Beyoglu Eye Journal*, 4(2), 55-61., Doi: 10.14744/bej.2019.51523.

2- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). A Multiple Organ Toxicant: Acrylamide. *Osmangazi Journal of Medicine*, 40(1), 94-100.

C-) Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler :

- 1- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2019). The Examination of Berberine's Effect on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. International Symposium on Academic Studies in Health and Sport Sciences (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 2- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2019). The Cytotoxic and Morphologic Analysis of Acrylamide Against SHSY5Y Neuroblastoma Cells. International Symposium on Academic Studies in Health and Sport Sciences (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 3- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2019). How does the cotreatment of curcumin and silymarin affect SPC212 cells? 4. International Conference on Material Science and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 4- TOMSUK ÖZLEM, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2019). Vitamin D2 and its role in nonsmall cell lung cancer: a cytotoxicity and morphology-based study. 4. International Conference on Material Science and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 5- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2019). Combinatorial effects of vitamin d and silymarin on human mesothelioma cell line. 4. International Conference on Material Science and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 6- KAÇAR SEDAT, TOMSUK ÖZLEM, SAHINTÜRK VAROL (2019). Curcumin has lower IC50 values against A549 lung cancer cells. 4. International Conference on Material Science and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 7- KAÇAR SEDAT, TOMSUK ÖZLEM, SAHINTÜRK VAROL (2019). The impact of curcumin and carvacrol co-administration on human mesothelioma cells. 4. International Conference on Material Science and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 8- TOMSUK ÖZLEM, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2019). Investigation of cytotoxic and morphological effects of carvacrol on human lung cancer cell line. 4. International Conference on Material Science and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 9- KAÇAR SEDAT, TOMSUK ÖZLEM, SAHINTÜRK VAROL (2019). Evaluation of the effect of silymarin on A549 lung cancer cells by cytotoxicity tests and microscopic examination. 4. International Conference on Material Science and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 10- TOMSUK ÖZLEM, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2019). How Does the Combination Of Carvacrol and Vitamin D Influence Spc212

- Cell Lines?. 4. International Conference on Material Science and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 11-BEKTUR AYKANAT NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHIN ERHAN, SAHINTÜRK VAROL (2019). Activation of Sonic Hedgehog Enhances Survival of Neurons via Inhibition of GRP78-Dependent Pathway in Brain of Diabetic Mice. FENS Regional Meeting 2019 (/Poster).
 - 12-TOMSUK ÖZLEM, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Different concentration of vitamin D provoked anticancer effect on colon and prostate cancer cells: A morphological and cytotoxic analysis. 3rd International Health Sciences Congress (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
 - 13-KAÇAR SEDAT, TOMSUK ÖZLEM, SAHINTÜRK VAROL (2018). Combined Vitamins C and E exert cytotoxicity in prostate cancer cells. 3rd International Health Sciences Congress (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
 - 14-TOMSUK ÖZLEM, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Carvacrol presents cytotoxic effect on human prostate cancer cells. 3rd International Health Sciences Congress (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
 - 15-KAÇAR SEDAT, TOMSUK ÖZLEM, SAHINTÜRK VAROL (2018). Demonstration of anti-proliferating effect of acrylamide on prostate cells through a wound healing assay. 3rd International Health Sciences Congress (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
 - 16-KAÇAR SEDAT, TOMSUK ÖZLEM, SAHINTÜRK VAROL (2018). Examination of the cytotoxic, morphological and oxidative effects of acrylamide on DU145 cells. International Eurasian Conference OnScience, Engineering and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
 - 17-TOMSUK ÖZLEM, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Acrylamide inhibited proliferation of human colon cancer cells in vitro. International Eurasian Conference OnScience, Engineering and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
 - 18-TOMSUK ÖZLEM, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Does carvacrol have any preventive effect against acrylamide-induced toxicity in Du145 cells?. International Eurasian Conference OnScience, Engineering and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
 - 19-KAÇAR SEDAT, TOMSUK ÖZLEM, SAHINTÜRK VAROL (2018). Investigation of the effects of vitamin E on Du145 human prostate cancer cells. International Eurasian Conference OnScience, Engineering and Technology (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
 - 20-KAR FATİH, HACIOĞLU CEYHAN, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KANBAK GÜNGÖR (2018). New approaches to supplementary nutrients: They give rise to anti-proliferative effects and oxidative

- damage in prostate cancer. 5th International Symposium On Multidisciplinary Studies (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 21-BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHIN ERHAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). Silymarin shows anti-cancerogenic effect on DU145 prostate cancer cell lines. 5th International Symposium On Multidisciplinary Studies (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 22-KAÇAR SEDAT, BEKTUR NURIYE EZGI, ERTEKIN RIFAT, BAGCI RIDVAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). Glut 2 protein change in hepatocytes after acrylamide exposure: an immunocytochemical examination. TBS International Biochemistry Congress - 2018 29th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)G
- 23-KAÇAR SEDAT, BAGCI RIDVAN, ERTEKIN RIFAT,BURUKOGLU DÖNMEZ DILEK, SAHINTÜRK VAROL (2018). Prominent Autofluorescence Was Observed In Formaldehyde-Fixed, Paraffin.Embedded Liver Tissue Sampl. TBS International Biochemistry Congress - 2018 29th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- 24-KAÇAR SEDAT, BAGCI RIDVAN,BURUKOGLU DÖNMEZ DILEK, SAHINTÜRK VAROL (2018). How do the levels of serum total oxidant change following acrylamide treatment in rats?. TBS International Biochemistry Congress - 2018 29th National Biochemistry Congress (Özet
- 25-BEKTUR NURIYE EZGI, SAHIN ERHAN, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Hipertiroidizm ratların beyin ve beyincik dokularında trpv1 aktivitesini arttırmaktadır. TBS International Biochemistry Congress - 2018 29th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
- 26-ERTEKIN RIFAT, BAGCI RIDVAN, KAÇAR SEDAT,BURUKOGLU DÖNMEZ DILEK, SAHINTÜRK VAROL (2018). The effect of acrylamide administration on large intestine and bladder functions in rats. TBS International Biochemistry Congress - 2018 29th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- 27-BAGCI RIDVAN, KAÇAR SEDAT,ERTEKIN RIFAT,BURUKOGLU DÖNMEZ DILEK, SAHINTÜRK VAROL (2018). Effect of carnosic acid on liver weight in rats. TBS International Biochemistry Congress - 2018 29th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Poster).
- 28-KAÇAR SEDAT, BEKTUR NURIYE EZGI, SAHINTÜRK VAROL (2018). The comparison of fluorometric and colorimetric protein quantification methods. TBS International Biochemistry Congress – 2018 29th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Poster).
- 29-BAGCI RIDVAN, KAÇAR SEDAT,BURUKOGLU DÖNMEZ DILEK, SAHINTÜRK VAROL (2018). The effect of acrylamide on serum alkaline phosphatase level in rats. TBS International Biochemistry

Congress - 2018 29th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Poster).G

- 30-Teksoy Özgün,CENGİZ MUSTAFA,KOROĞLU ESMA, SAHINTÜRK VAROL,INAL BEHCET, KAÇAR SEDAT,AYHANCI ADNAN (2018). Hepatoprotective effect of silymarin against thioacetamideinduced hepatic injury in rats. 1st Eurasia Biochemical Approaches Technologies Congress (/Sözlü Sunum).
- 31- KAÇAR SEDAT, TOMSUK ÖZLEM, SAHINTÜRK VAROL (2018). The impact of vitamin c on cell proliferation and motility of prostate cancer cells. 9th International Biomechanics Congress (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 32-TOMSUK ÖZLEM, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). How does vitamin D2 affect cytotoxicity and motility of DU145 prostate cancer cells?. 9th International Biomechanics Congress (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 33-KAÇAR SEDAT, SAHİN ERHAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). NF-KB protein expression of hepatocytes increased in vitro after acrylamide administration. 19th National Anatomy Congress and International Mediterranean Anatomy Congress (/Poster).
- 34-TOMSUK ÖZLEM, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Epigenetic Regulators: miRNAs regulate each stage of neural development. 19th National Anatomy Congress and International Mediterranean Anatomy Congress (/Poster).
- 35- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KUTLU HATICE MEHTAP (2018). Effect of acrylamide on BEAS-2B normal human lung cells: cytotoxic, oxidative, apoptotic and morphometric analysis.. 19th National Anatomy Congress and International Mediterranean Anatomy Congress (/Sözlü Sunum).
- 36-KAÇAR SEDAT, TOMSUK ÖZLEM, TANRIKUT CIHAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). The Sensitivity of Neutral Red Cytotoxicity Test was assessed by Serial Dilution Method. 19th National Anatomy Congress and International Mediterranean Anatomy Congress (/Poster).
- 37-KAÇAR SEDAT, BAGCI RIDVAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). Gene enrichment cluster analysis of differentiallyexpressed genes in males and females in non-alcoholic fatty liver disease. 19th National Anatomy Congress and International Mediterranean Anatomy Congress (/Poster).
- 38-KAÇAR SEDAT, SAHİN ERHAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). Immunocytochemical examination of TNF- α protein after acrylamide administration. 19th National Anatomy Congress and International Mediterranean Anatomy Congress (/Poster).
- 39-KAÇAR SEDAT, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2018). Flow cytometric analysis of combined expression of caspase 3

- and 7 after acrylamide in normal lung cells. 19th National Anatomy Congress and International Mediterranean Anatomy Congress (/Poster).
- 40-KAÇAR SEDAT, SAHIN ERHAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). Acrylamide reduced the expression of vascular endothelial growth factor in Clone 9 cells. 19th National Anatomy Congress and International Mediterranean Anatomy Congress (/Poster).
- 41-BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Hypertyroidism increases trpc1 activity in the kidney tissues. 19th National Anatomy Congress and International Mediterranean Anatomy Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
- 42-CAN BETÜL,ÖZ SEMİH, SAHINTÜRK VAROL, KAÇAR SEDAT,ÖZKOÇ METE,HACIOGLU CEYHAN,ALATAS İBRAHİM ÖZKAN (2018). The protective effects of conivaptan and mannitol on liver and kidney in a cerebral ischemia-reperfusion animal model. The 43rd FEBS Congress (/Poster).
- 43-KAÇAR SEDAT, BEKTUR NURIYE EZGI, SAHINTÜRK VAROL (2018). Investigation of the distribution of CPT-1 and CD36 proteins in Clone 9 cells after acrylamide treatment. 1st International Food and Medicine Congress (/Sözlü Sunum).
- 44-ERTEKİN RIFAT, BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). The Alteration of Glomerular Volume in Kidneys of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. 1st International Food and Medicine Congress (/Poster).
- 45-KAÇAR SEDAT,ERTEKİN RIFAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Which Types of Genes are Activated in Thyroid Gland of Postnatal Male Rats Following Acrylamide Treatment?. 1st International Food and Medicine Congress (/Poster).
- 46-KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Nuclear Morphologies of Acrylamide-Treated Hepatocyte Cells: A Fluorescent Staining with DAPI. 1st International Food and Medicine Congress (/Poster).
- 47-SAHIN ERHAN, BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Curcumin Reduces the Expressions of Tnf-alpha and Nf?b Proteins In Liver Clone 9 Cells Following Oxidative Stress Injury by Hydrogen Peroxide. 1st INTERNATIONAL HEALTH SCIENCE AND LIFE CONGRESS (/Sözlü Sunum).
- 48-BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHIN ERHAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). Oxidative Stress, Inflammation And Fatty Acid Oxidation Increased in Diabetic Rat Kidneys. 4th International Congress on Applied Biological Sciences (/Sözlü Sunum).
- 49-ERTEKİN RIFAT, KAÇAR SEDAT, SAHIN ERHAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). The morphological changes in clone 9 hepatocyte cells as a result of the reaction between ?-carotene and ready-touse medium. 4th International Congress on Applied Biological Sciences (/Poster).

- 50-BAGCI RIDVAN, BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Effect of mirtazapine in different doses on Clone 9 cells. 4th International Congress on Applied Biological Sciences (/Poster).
- 51-KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Examination of cytotoxic effect of acrylamide on HepG2 cells by a colorimetric assay. 4th International Congress on Applied Biological Sciences (/Poster).
- 52-KAÇAR SEDAT, BEKTUR NURIYE EZGI, SAHIN ERHAN, BURUKOGLU DÖNMEZ DILEK, SAHINTÜRK VAROL (2018). A Comparison Between Standard and Diluted MTT Concentrations : Can It Be Diluted More?. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (/Poster).
- 53-KAÇAR SEDAT, BAGCI RIDVAN, SAHIN ERHAN, BEKTUR NURIYE EZGI, SAHINTÜRK VAROL (2018). The Effect of Different Concentrations of Melatonin on Clone 9 Hepatocyte Cells. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (/Poster).
- 54-KAÇAR SEDAT, SAHIN ERHAN, BEKTUR NURIYE EZGI, SAHINTÜRK VAROL (2018). How do the ascending doses of acrylamide affect Clone 9 Hepatocyte cells?. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
- 55-BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Silymarin decreased angiogenesis-associated proteins in human hepatocellular carcinoma cells. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
- 56-SAHIN ERHAN, KAÇAR SEDAT, BURUKOGLU DÖNMEZ DILEK, SAHINTÜRK VAROL (2018). Cotreatment of β -carotene and H₂O₂ Increased the Caspase 3 Expression in Clone 9 Liver Cells. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), 1313-1313. (Özet Bildiri/Poster).
- 57-KARAKAYA SERIFE, KAÇAR SEDAT, BEKTUR NURIYE EZGI, SAHINTÜRK VAROL (2018). Image Development With 3 Different Blocking Solution in Western Blotting Technique. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (/Poster).
- 58-BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHIN ERHAN, SAHINTÜRK VAROL (2018). The Effects of Silymarin on Healthy Hepatocytes Cell Line. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (/Poster).
- 59-BAGCI RIDVAN, KAÇAR SEDAT, SAHIN ERHAN, BEKTUR NURIYE EZGI, BURUKOGLU DÖNMEZ DILEK, SAHINTÜRK VAROL (2018). What Are Appropriate Plating Densities of Clone 9 Hepatocyte Cells for 24, 48 and 72 Hours Cell Culture Experiment?. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (/Poster).

- 60-KAÇAR SEDAT,KARAKAYA SERIFE, BEKTUR NURIYE EZGI, BAGCI RIDVAN,BURUKOGLU DÖNMEZ DILEK, SAHINTÜRK VAROL (2018). Investigation of the Effect of β -carotene Doses on Clone 9 Liver Cells by MTT Assay. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (/Poster).
- 61- KARAKAYA SERIFE, KAÇAR SEDAT, BEKTUR NURIYE EZGI, SAHINTÜRK VAROL (2018). Image Development With 3 Different Blocking Solution in Western Blotting Technique. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (/Poster).
- 62-BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Silymarin promises hope for hyperglycemia treatment in HEPG2 cells. 7TH WORLD CONGRESS (/Sözlü Sunum).
- 63-HÜLYA AKSOY AYDINLI, BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). How different pregabalin doses affect Clone 9 hepatocyte cells. 4th International Congress on Applied Biological Sciences (/Poster).
- 64-BEKTUR NURIYE EZGI, KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2018). Determination of H₂O₂ dose to induce oxidative stress in Clone 9 cells. 4th International Congress on Applied Biological Sciences (/Poster).
- 65-KAÇAR SEDAT, BEKTUR NURIYE EZGI, SAHINTÜRK VAROL (2018). Does acrylamide induce leptin and galanin expressions in Clone9 cells?. 4th International Congress on Applied Biological Sciences (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).
- 66-KAÇAR SEDAT, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2017). Effect of acrylamide mitochondrial potentials of 5RP7 fibroblast cells. 18th National Anatomy Congress, 11(2) (Özet Bildiri/Poster).
- 67-KAÇAR SEDAT, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2017). The effect of amount and type of media and solutions used in cell culture studies on absorbance values. 18th National Anatomy Congress, 11(2) (Özet Bildiri/Poster).
- 68-KAÇAR SEDAT, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2017). Effects of acrylamide on MCF- 7 human breast adenocarcinoma cells. 18th National Anatomy Congress, 11(2) (Özet Bildiri/Poster).
- 69-KAÇAR SEDAT, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2017). Evaluation of the effects of acrylamide on 5RP7 fibroblast cells with caspase and annexin V tests, cell cycle analysis, electron and confocal microscopy. 18th National Anatomy Congress, 11(2) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
- 70-KAÇAR SEDAT, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2017). Effect of acrylamide on the cell cycle of C6 glioblastoma cells. 18th National Anatomy Congress, 11(2) (Özet Bildiri/Poster).

- 71-KAÇAR SEDAT, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2017). Anti-proliferative, toxic and apoptotic effects of acrylamide on C6 Rat Glioma Cells. International Biochemical Congress 2017 / 28th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
- 72-KAÇAR SEDAT, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2017). The effect of acrylamide on human bronchial epithelial cell BEAS-2B. International Biochemical Congress 2017 / 28th National Biochemistry Congress (Özet Bildiri/Poster).
- 73-KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KUTLU HATICE MEHTAP (2017). Examination of apoptosis inducing effect of acrylamide on 5RP7 cells. 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (Özet Bildiri/Poster).
- 74-KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KUTLU HATICE MEHTAP (2017). Analysis of the Effect of Acrylamide on MCF-7 Human Breast Adenocarcinoma Cell Line With Oxidative, Apoptotic, Morphological and Cell Cycle Assays. 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (Özet Bildiri/Poster).
- 75-MERAL EVIS CEMILE CEREN, KAÇAR SEDAT, ORTADEVECİ ABDULLAH, YEGIN BENGI, ALPAY -MELTEM, KILIÇ CEYDA SIBEL, BASKIN VEYSEL, ALTUNTAS HAKAN, EROL KEVSER (2017). Effects of agmatine on stress-induced gastric ulcer in rats. XXXVIII IUPS Congress (Özet Bildiri/Poster).
- 76-ALPAY MELTEM, YEGIN BENGI, MERAL EVIS CEMILE CEREN, ORTADEVECİ ABDULLAH, KAÇAR SEDAT, KILIÇ CEYDA SIBEL, BASKIN VEYSEL, ALTUNTAS HAKAN, EROL KEVSER (2017). Effects of agmatine on the Histologic alterations of rat cerebellum. Anatomists on the edge (Özet Bildiri/Poster).
- 77-ALPAY MELTEM, YEGIN BENGI, MERAL EVIS CEMILE CEREN, KAÇAR SEDAT, ORTADEVECİ ABDULLAH, KILIÇ CEYDA SIBEL, BASKIN VEYSEL, ALTUNTAS HAKAN, EROL KEVSER (2017). Investigation of Dose-dependent effects of Agmatine on rat kidney. Anatomists on the edge (Özet Bildiri/Poster).
- 78-YEGIN BENGI, ALPAY MELTEM, KAÇAR SEDAT, ORTADEVECİ ABDULLAH, MERAL EVIS CEMILE CEREN, KILIÇ CEYDA SIBEL, BASKIN VEYSEL, ALTUNTAS HAKAN, EROL KEVSER (2017). Effects of Agmatine on stress induced on hippocampal morphology in rats. Anatomists on the edge (Özet Bildiri/Poster).
- 79-KAÇAR SEDAT, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2017). The response of H-ras transformed tumour cell line to different acrylamide concentrations: A colorimetric assay. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Özet Bildiri/Poster).
- 80-SAHINTÜRK VAROL, KAÇAR SEDAT, VEJSELOVA DJANAN, KUTLU HATICE MEHTAP (2017). Acrylamide has cytotoxic antiproliferative and apoptotic effects on mouse fibroblast cells. 15th

- International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Özet Bildiri/Poster).
- 81-KAÇAR SEDAT, ÇEVİK MELIKE, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2017). Effect of acrylamide on mitochondrial potential and cell cycle of fibroblast cell lines. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Özet Bildiri/Poster).
- 82-SAHINTÜRK VAROL, KAÇAR SEDAT (2017). Analysis of neurotoxic effects of acrylamide regarding immunohistochemical markers. 15th Turkish Neuroscience Congress, 7(Suppl 1), 78, Doi: 10.2399/ana.17.001s (Özet Bildiri/Poster).
- 83-KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2017). Body weight changes and hind limb splay formation in acrylamide-applied rats. 15th Turkish Neuroscience Congress, 7(Suppl 1), 1-86., Doi: 10.2399/ana.17.001s (Özet Bildiri/Poster).
- 84-KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL (2016). The distribution of PCNA and Bax proteins and Lcysteine's effect in acrylamide-induced testis damage. 17th National Anatomy Congress with International Participation, 10(Suppl 2), 174, Doi: 10.2399/ana.16.091s (Özet Bildiri/Poster).
- 85-KAÇAR SEDAT, VEJSELOVA DJANAN, KUTLU HATICE MEHTAP, SAHINTÜRK VAROL (2016). Acrylamide has cytotoxic antiproliferative and apoptotic effects on human lung adenocarcinoma cell line A549. 41ST FEBS CONGRESS, 283, 127-427., Doi: 10.1111/febs.13808 (Özet Bildiri/Poster).
- 86-YILMAZ TULAY, KAÇAR SEDAT, KOCABIYIK SEMRA (2012). Altered gene expression patterns of Thermoplasma volcanium 20S proteasome VAT complex proteins in stress response. 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, 279, 499-500., Doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.08705.x (Özet Bildiri/Poster).
- 87-KOYUNCU GÜVEN, KESER İBRAHİM, CUN EBRU, KAÇAR SEDAT, ÖZEKİN KEMAL, KESKİN BAHAR (2012). Importance of X-STR in paternity test: Case Report. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine, 332 (Özet Bildiri/Poster).

D-) Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- 1- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KUTLU HATICE MEHTAP (2017). Hücre Kültüründe Mtt Sitotoksite Testinde Canlılık Ölçümünde Kör Kuyunun Önemi. 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster).
- 2- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KUTLU HATICE MEHTAP (2017). 5rp7 Hücrelerinde Nükleer Reseptör Alt Ailesinden Nr5a2 İfadesinin Varlığının İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi. 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster).
- 3- KAÇAR SEDAT, EROGLU SEÇKİN, SAHINTÜRK VAROL (2017). Sınır Sisteminde Akrlamitle Etkinliği Degisen Genlerin İlskili Gen Kümelerinin Araştırılması. 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).
- 4- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KUTLU HATICE MEHTAP (2017). Akrlamitin Ic75 Konsantrasyonu Uygulanan C6 Hücrelerinde Mitokondriyal Membran Potansiyeli Degisimi. 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster).
- 5- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, KUTLU HATICE MEHTAP (2017). Akrlamit Verilen C6 Hücrelerinde Kaspaz 3 ve Bcl-2 Proteinlerinin İmmünositokimyasal Yöntemle Analizi'. 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster).
- 6- KAÇAR SEDAT, SAHINTÜRK VAROL, CAN BETÜL, MUSMUL AHMET (2016). Sıçanlarda akrlamit ile olusturulan testis hasarı üzerine L sisteinin etkisis. Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster).

Bilimsel etkinlikler:

Projeler:

- 1- Arkeabakteri Kökenli Rekombinant Küçük Isı Soku Proteinlerinin E. coli'de Yüksek Düzeyde Ekspresyonu ve Karakterizasyonu; Çesitli Stres Kosullarında Küçük Isı Soku Protein Genlerinin Anlatım Farklılaşmasının Analizi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 01/09/2010 - 01/04/2011.
- 2- Akrlamitin NIH/3T3 Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik, Anti-Proliferatif Ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması,

Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 02/11/2016 - 24/07/2017

- 3- Sıçanlarda akrilamid kaynaklı karaciger toksisitesinde karnozik asidin etkisi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 23/08/2017 - 10/09/2018
- 4- Sıçanlarda Deneysel Olarak Olusturulmuş Hipertiroidi Modelinde Kalp Kasında Endoplazmik Retikulum Stresi ile Geçici Reseptör Potansiyeli (TRP) Kanalları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 23/02/2018 - 13/05/2019.
- 5- Farelerde diyabetik karaciger hasarında endoplazmik retikulum stresi ve sonik hedgehog ifadesinin araştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 03/01/2018 - 09/05/2019.
- 6- Investigation of the Effects of Timokinon and Quercetin against the Toxic Effect of Acrylamide on C6 Rat Glioma Cells, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 14/09/2018 (Devam Ediyor).
- 7- Deneysel Olarak Olusturulmuş Akut Pankreatit modelinde ?- Hidroksibutirat'ın NLRP3 İnflamazomu üzerine Etkisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 01/02/2018 (Devam Ediyor).
- 8- Silimarinin hepatokarsinomda Slit2/Robo1 ve CXCR4 yolu üzerine etkisinin araştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 25/07/2018 - 08/07/2019.

