

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKRİLAMİDİN İN VİVO VE İN VİTRO GENOTOKSİSİTESİ
ÜZERİNE FENOLİK BİLEŞİKLERDEN PELARGONİDİN VE
GALLİK ASİDİN ETKİLERİ**

**Arş. Gör. Pınar AKSU
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Abdullah DOĞAN**

2012-KARS

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKRİLAMİDİN İN VİVO VE İN VİTRO GENOTOKSİSİTESİ
ÜZERİNE FENOLİK BİLEŞİKLERDEN PELARGONİDİN VE
GALLİK ASİDİN ETKİLERİ**

**Arş. Gör. Pınar AKSU
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Abdullah DOĞAN**

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel Araştırmalar Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2010-VF-47**

2012-KARS

T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora programı çerçevesinde Pınar AKSU tarafından hazırlanmış olan “Akrilamidin İn vivo ve İn vitro Genotoksisitesi Üzerine Fenolik Bileşiklerden Pelargonidin ve Gallik Asidin Etkileri” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonucunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24 / 05 / 2012

Adı Soyadı

İmza

Başkan : Prof.Dr. Ayhan FİLAZİ
Üye : Prof.Dr. Abdullah DOĞAN
Üye : Doç.Dr. Süleyman GÜL
Üye : Doç.Dr. Dinç EŞSİZ
Üye : Yrd.Doç.Dr. Murat BAYEZİT

(Handwritten signatures of the jury members)

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 29/05/2012 tarih ve ...21...../136... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet ÇİTLİ
Enstitü Müdürü



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IV
TABLolar DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
RESİMLER DİZİNİ	XI
ÖNSÖZ	XIII
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Genel Bilgiler	6
1.2.1. Akriamid	6
1.2.1.1. Akriamidin Gıdalarda Oluşum Yolları	7
1.2.1.2. Akriamidin Toksisitesi	10
1.2.1.3. Gıdalarda Akriamid Oluşumunun Azaltılması	11
1.2.2. Fenolik Bileşikler	12
1.2.2.1. Fenolik Asitler	13
1.2.2.1.1. Gallik Asit	14
1.2.2.2. Flavonoidler	15
1.2.2.3. Antosiyaninler	16
1.2.2.3.1. Pelargonidin	18
1.2.3. Genotoksisite	18
1.2.3.1. Kromozom Aberasyonları	19
1.2.3.2. Mikronükleus (MN)	23
1.2.3.3. Kardeş Kromatid Değişimi	30
2. MATERYAL ve METOT	33
2.1. İn-Vivo Çalışma	33

II

2.1.1.	Materyal	33
2.1.1.1.	Hayvan Materyali (Deney Hayvanları)	33
2.1.1.2.	Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	33
2.1.1.3.	Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları	37
2.1.2.	Metot	38
2.1.2.1.	Kromozomal İnceleme ve Mitotik İndeksin Tespiti	40
2.1.2.2.	Mikronükleus Testi	41
2.2.	İn-Vitro Çalışma	42
2.2.1.	Materyal	42
2.2.1.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar	42
2.2.1.2.	Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları	46
2.2.2.	Metot	47
2.2.2.1.	Kromozom Anormallikleri (KA, Chromosomal Aberration, CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	47
2.2.2.2.	Mikronükleus Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler	52
2.2.2.3.	Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	53
2.2.2.4.	İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	61
3.	BULGULAR	62
3.1.	İn Vivo Grubu	62
3.1.1.	Kontrol ve deney gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyon üzerindeki etkileri	62
3.1.2.	Kontrol ve Deney Gruplarının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik Aktivite Oranları	68
3.1.3.	Kontrol ve Deney Gruplarının Fare Kemik İliği	

III

	Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığı Üzerindeki Etkileri	71
3.2.	İnvitro Grubu	76
3.2.1.	Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Kültürü Kromozomlarında Aberasyon Oranları	76
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ	98
5.	ÖZET	114
6.	SUMMARY	115
7.	KAYNAKLAR	116
8.	ÖZGEÇMİŞ	135

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KA=CA	:Kromozom aberasyonu
MN	:Mikro nükleus
KKD	:Kardeş kromatid değişimi
SCE=KKD	:Sister chromatid Exchange
EGCG	:Epigallokateşin galat
PCE	:Polikromatik eritrosit
NCE	:Normokromatik eritrosit
MNPCE	:Mikronükleuslu polikromatik eritrosit
Cyt-B	:Sitokalsin-B
NPB	:Nükleoplazmik köprü
CBMN	:Sitokinezi bloke edilmiş mikronükleus
NDI	:Nüklear bölünme frekansı
NDCI	:Nüklear bölünme sitotoksisite frekansı
BrdU	:Bromodeoksiüridin
AA	:Akrilamid
GA	:Gallik asid
PG	:Pelargonidin
MMC	:Mitomisin-C
i.p	:İntraperitoneal
UV	:Ultraviyole
RI	:Replikasyon indeksi
MI	:Mitotik indeks
KK	:Kromozom kırığı
Kk	:Kromatid kırığı
F	:Fragment
DSK	:Disentrik kromozom
KKB	:Kardeş kromatid birleşmesi
r	:Regresyon

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 3.1. Kontrol ve Deney Gruplarında 24-48 Saat Sonra Fare Kemik İliği Hücrelerinde Rastlanan Kromozom Anormallik Çeşitleri (sayılan 100 hücrede) ve Yüzde Toplamları	63
Tablo 3.2. Kontrol ve Deney Gruplarında 24-48 Saat Sonra Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik Aktivite Oranları	69
Tablo 3.3. Kontrol ve Deney Gruplarının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığı	72
Tablo 3.4. Kontrol ve Deney Gruplarının Değişik Dozları ile Etkileşime Sokulan İnsan Lenfosit Kültürü Kromozomlarında Aberasyon Oranları	77
Tablo 3.5. Kontrol ve Deney Gruplarının Değişik Dozları İle Etkileşime Sokulan İnsan Lenfosit Kültüründe Mitotik Aktivite Oranları	83
Tablo 3.6. Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığı Üzerindeki Etkileri	86
Tablo 3.7. Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişimi (%)	91
Tablo 3.8. Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi (%)	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1.1. Akrilamidin molekül yapısının iki ve üç boyutlu şekilleri	7
Şekil 1.2. Glisidamidin iki ve üç boyutlu şekilleri	7
Şekil 1.3. Asparajinin molekül yapısı	8
Şekil 1.4. Asparajinin akrilamide dönüşme mekanizması	9
Şekil 1.5. A. Gıdanın Akrilamid İçeriği İle Sıcaklık ve B. pH Arasındaki İlişki	10
Şekil 1.6. Fenolik Asitlerin Temel Kimyasal Yapısı	14
Şekil 1.7. Gallik Asitin Kimyasal Formülü	15
Şekil 1.8. Flavonoidlerin Genel Yapısı	16
Şekil 1.9. Çok Bilinen Bazı Antosiyaninleri Kimyasal Yapısı	17
Şekil 1.10. Pelergonidinin Kimyasal Formülü	18
Şekil 1.11. G1 fazında yapılan ışınlamalar sonucu meydana gelebilecek kromozom tipi aberasyonlar ile bunların çeşitli yapışma olasılıkları ve S fazını izleyen mitozda saptanan görüntüleri	20
Şekil 1.12. Kromozom eşleşmesi tamamlandıktan sonra, G2 fazında yapılan ışınlamalar sonucunda meydana gelebilecek kromatid tipi aberasyonlar ile bunların çeşitli yapışma olasılıkları ve sonraki mitozda saptanan görüntüleri	21
Şekil 1.13. MN testi yapılışı	27
Şekil 1.14. CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) Dağılımı	29

VII

Şekil 1.15.	Sitotoksik ajanın etkisindeki hücrelerin olası durumları	30
Şekil 2.1.	Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi	56
Şekil 2.2.	Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdU) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları	57
Şekil 2.3.	BrdU'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması	59
Şekil 3.1.	Akrilamidin değişik dozları (25-50-100-150 mg/kg) ve kontrol gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde, kromozom aberasyon oranları	67
Şekil 3.2	AA+ PG ve PG grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, kromozom aberasyon oranları	67
Şekil 3.3.	AA+GA ve GA grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, kromozom aberasyon oranları	68
Şekil 3.4.	Akrilamidin farklı konsantrasyonları ile kromozomal aberasyon arasındaki regresyon ($r= 0,96$) çizelgesi	68
Şekil 3.5.	Akrilamidin değişik dozları (25-50-100-150 mg/kg) ve kontrol gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde, mitotik indeks oranları	70
Şekil 3.6.	AA+ PG ve PG grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mitotik indeks oranları	70
Şekil 3.7.	AA+GA ve GA grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mitotik indeks oranları	71

VIII

Şekil 3.8.	Akrilamidin farklı konsantrasyonları ile mitotik indeks arasındaki regresyon ($r = -0,91$) çizelgesi	71
Şekil 3.9.	Akrilamidin değişik dozları (25-50-100-150 mg/kg) ve kontrol gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde, mikro nükleus oranları	74
Şekil 3.10.	AA+ PG ve PG grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mikro nükleus oranları	75
Şekil 3.11.	AA+GA ve GA grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mikro nükleus oranları	75
Şekil 3.12.	Akrilamidin farklı konsantrasyonları ile mikro nükleus arasındaki regresyon ($r=0,98$) çizelgesi	76
Şekil 3.13.	Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kromozomal aberasyon oranları	80
Şekil 3.14.	AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kromozomal aberasyon oranları	81
Şekil 3.15.	AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kromozomal aberasyon oranları	81
Şekil 3.16.	AA in farklı konsantrasyonları ile kromozomal aberasyon arasındaki regresyon ($r=0.91$) çizelgesi	82
Şekil 3.17.	Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mitotik indeks oranları	84

Şekil 3.18.	AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mitotik indeks oranları	84
Şekil 3.19.	AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mitotik indeks oranları	85
Şekil 3.20.	AA in farklı konsantrasyonları ile mitotik indeks arasındaki regresyon ($r = -0.99$) çizelgesi	85
Şekil 3.21.	Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mikro nükleus oranları	88
Şekil 3.22.	AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mikro nükleus oranları	89
Şekil 3.23.	AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mikro nükleus oranları	89
Şekil 3.24.	AA in farklı konsantrasyonları ile mikro nükleus arasındaki regresyon ($r = 0.95$) çizelgesi	90
Şekil 3.25.	Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kardeş kromatid değişim oranları	92
Şekil 3.26.	AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kardeş kromatid değişim oranları	92
Şekil 3.27.	AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kardeş kromatid değişim oranları	93

- Şekil 3.28.** AA in farklı konsantrasyonları ile kardeş kromatid değişimindeki regresyon ($r=0.91$) çizelgesi 93
- Şekil 3.29.** Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe replikasyon indeks oranları 95
- Şekil 3.30.** AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe replikasyon indeks oranları 95
- Şekil 3.31.** AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe replikasyon indeks oranları 96
- Şekil 3.32.** AA in farklı konsantrasyonları ile replikasyon indeks arasındaki regresyon ($r=-0.99$) çizelgesi 96

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No.</u>
Resim 1.1. PCE, NCE ve MN taşıyan PCE (MNPCE)	25
Resim 1.2. Kardeş kromatid değişimi örneği	32
Resim 2.1. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar	60
Resim 2.2. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar	60
Resim 2.3. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar	61
Resim 3.1. Fareye ait normal metafaz örneği (n=40)	64
Resim 3.2. Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatid birleşmesi (x1000)	64
Resim 3.3. Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde disentrik kromozom (x1000)	65
Resim 3.4. Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde kromozom kırığı (x1000)	65
Resim 3.5. Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde kromatid kırığı (x1000)	66
Resim 3.6. Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde fragment (x1000)	66
Resim 3.7. Muamele görmemiş fare kemik iliginde mikronükleuslu olmayan PCE ve NCE'ler	73
Resim 3.8. Deney grubu farelerin kemik iliginde MNPCE ve normal PCE ve NCE'ler	73
Resim 3.9. Deney grubu farelerin kemik iliği hücrelerinde 3 mikronükleuslu PCE	74
Resim 3.10. Sağlıklı Bir Bireye Ait Kromozom Görüntüsü (x1000)	78
Resim 3.11. Kromatid Kırığı (Kk) (x1000)	78

Resim 3.12.	Kromozom Kırığı (KK)(x1000)	79
Resim 3.13.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB)(x1000)	79
Resim 3.14.	A= Kromozom Kırığı (KK), B= Fragment (F)(x1000)	80
Resim 3.15.	İnsan Periferal Lenfositlerinde Bir Mikronükleus İçeren Binükleer Hücre (x1000)	87
Resim 3.16.	İnsan Periferal Lenfositlerinde 3 ve 4 Nükleus İçeren Hücre	87
Resim 3.17.	İnsan Periferal Lenfositlerinde 1 ve 2 Nükleus İçeren Hücre	88
Resim 3.18.	Kontrol ve Deney Gruplarında Kardeş Kromatid Değişimi	97
Resim 3.19.	Kontrol ve Deney Gruplarında Kardeş Kromatid Değişimi	97

ÖNSÖZ

Akrilamid kimya sanayi ve laboratuvarlarda kullanılan bir maddedir. Gıda maddelerinin yanlış işlenmesi sonucunda da oluşabildiği bilinmektedir. Bu maddenin genotoksik etkileri yapılan çalışmalarla tespit edilmiş olup, yüksek dozlarda ya da düşük miktarlarda uzun süre kalıntılarının besinler ile tüketilmesi canlılarda zararlı etkilere neden olmaktadır. Genotoksik etkiler, hücrelerde mutasyon oluşturur. Bu etkiler sonucu karsinojenite, teratojenite ve biyokimyasal bozukluklar gelişebilir. Bozuk genler gelecek nesillere aktararak sürdürülebilir canlı sağlığını tehdit eder. Bu nedenle olumsuz etkilerinin giderilmesi canlıların sağlığı açısından büyük önem arz eder.

Polifenolik bileşikler bitkisel kaynaklı maddelerdir. Bunların yapılan çalışmalarla antioksidan etkileri gösterilebilmiştir. Bu nedenle belirli miktarlarda tüketilmelerinin faydalı olabileceği düşünülmektedir. Akrilamidin genotoksitesisi üzerine polifenollerin koruyucu etkilerinin olup, olmadığının ortaya çıkarılması canlıların sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Gıda maddelerinde oluşan ve küçük miktarlarda alınan akrilamid sağlık üzerine olumsuz etkilere neden olduğu bilinmektedir. Kaçınılması mümkün olmayan akrilamid toksisitesinden korunma, günümüzde ciddi bir sorun olarak insanoğlunun karşısında durmaktadır. Polifenolik bileşiklerin koruyucu etkilerinin tespiti, akrilamid toksikasyonuna karşı polifenol ihtiva eden bitki ve gıda maddelerinin tüketilmesinin yolunu açması açısından oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca diğer benzer araştırmaların yapılmasına da ışık tutacaktır. Bu araştırma akrilamidin genotoksitesisi üzerine polifenol bileşiklerin etkilerinin ortaya konması için planlanmıştır. Elde edilen sonuçların canlı sağlığının korunmasına hizmet edeceği düşünülmektedir.

Bu tez konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde bana her zaman yön gösteren ve destek veren, çalışmalarım süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve aynı zamanda akademik gelişimimde büyük emeği geçen danışman hocam Prof. Dr. Abdullah DOĞAN'a, çalışmamın her aşamasında çalışmamı takip eden ve yardımlarını esirgemeyen, bana laboratuvar olanağı sunan değerli hocam Doç. Dr. Süleyman GÜL'e, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Hocalarım, Doç. Dr. Dinç EŞSİZ' e, Yrd. Doç. Dr. Murat BAYEZIT' a, Yrd. Doç.

Dr. Ayşe KANICI' ya, çalışma arkadaşım Doktora öğrencisi Uzman Biyolog Dinçer ERDAĞ'a, çalışmama maddi destek sağlayan Kafkas Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığı'na ve eğitimimin her aşamasında maddi-manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Gıdaların hazırlanması ve dayanıklı hale getirilmesi için çoğunlukla 90-200 °C arasında değişen ısıların uygulandığı çeşitli işlemlere örneğin; pişirme, fırınlama, kızartma, kavurma vs. başvurulmaktadır. Isı başta olmak üzere uygulanan bu işlemler, gıdalarda toksik bileşiklerin oluşmasına yol açabilmektedir. Gıdalara ısı enerjisinin uygulanması sonucu oluşan bu toksik bileşiklerin en önemlileri ve en iyi bilinenleri arasında, heterosiklik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-alkil-N-nitrosamin bileşikleri ve akrilamid sayılabilir. Bu maddelerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinin bulunduğu araştırmalarla tespit edilmiştir (37).

Akrilamid 1950'li yıllardan itibaren endüstri ve laboratuvarlarda kullanılan bir maddedir. Akrilamid'in canlıların yaşamına zarar verdiğinin tespit edilmesi, konunun çok boyutlu olarak ele alınmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Akrilamid çoğu besin maddesinde pişirilme esnasında oluşabilmektedir. Böyle besin maddelerinin tüketilmesiyle de canlılara ulaşan akrilamid, çeşitli mekanizmalarla karsinojenik ve nörotoksik etkilere neden olmaktadır. Mutajenik etkileri de bulunan bu madde, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından olası kanserojenler grubu olan 2A kategorisinde değerlendirilmektedir (85). Bu sınıflandırma, akrilamidin hayvanlarda kansere neden olduğunun ispatlanmasına dayanmaktadır. Çok sayıda yapılan çalışmalarda akrilamidin hücrelerin makro molekülleriyle reaksiyona girdiği, hayvan hücreleri başta olmak üzere kromozomlarda anomaliler oluşturduğu, diğer bir deyişle mutasyon yaptığı gösterilebilmiştir (115).

Gıdalara sanayiden kontamine olması yasal olarak sınırlandırılabilir. Ancak gıdaların pişirilmesi esnasında oluşması, maalesef böyle bir sınırlandırmayı pratik açıdan olumsuz yönde etkilemektedir. Çünkü gıdalara uygulanan ısı işlemleri bölgelere ve bireysel lezzet alışkanlıklarına göre değişiklik arz etmektedir. Pişirilme şekilleri toplumdan topluma çok büyük farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle akrilamid gıdalarda pişirilme esnasında doğal olarak oluşabildiğinden, tüketiminin yasaklanması büyük oranda mümkün görülmemektedir. Ancak yüksek ısıda kızartma işlemlerinden kaçınılması tavsiye edilebilir. Bütün bu olumsuz duruma rağmen özellikle hazır gıdalarda akrilamidin tüketilmesine izin verilen tolerans sınırları

getirilebilir. Bu durumun akrilamidin tüketilmesi sonucu ortaya çıkabilecek risklerin azalmasına hizmet edeceği düşünülmektedir (31).

Akrilamid konusu 1997 yılında İsveç'te inşa edilen bir tünel inşaatı sırasında yaşanan bir olay ile ilk kez bilim dünyasında dikkati üzerine çekmiştir. Tünel duvarlarının inşaatı sırasında, nehir yatağından meydana gelen su sızıntısını engellemek için, su tutucu özelliğinden dolayı harca akrilamid katılmış ve kısa bir süre sonra çevrede büyükbaş hayvan ve balık ölümleri görülmeye başlanmıştır. Görülen bu sonuçlar üzerine yapılan incelemelerde çevreye büyük miktarda akrilamidin sızdığı ve bunun hayvan ölümlerine neden olduğu belirlenmiştir. Çevreye yayılan akrilamidin, suda ve o bölgede yaşayan çok sayıda hayvan ve insanı olumsuz yönde etkilediği düşünülmüş (inşaatçı çalışan personel dahil) ve bu konu üzerinde çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yapılan analizlerde bireylerin kanında akrilamidin hemoglobin ile reaksiyona girdiği belirlenmiştir. Bu reaksiyon ürünleri kanda tespit edilmiştir (72). Çevrede yaşayan insan, hayvan ve üretilen gıda maddeleri üzerinde yapılan analizler sonucu akrilamidin zararlı etkileri gözlenmiştir. Bu olay ve elde edilen analiz bulguları, insan ve çevre sağlığı açısından akrilamidin önemi üzerine dikkatlerin çekilmesine neden olmuştur. Bilim adamlarını akrilamid konusunda araştırma yapmaya sevk etmiştir (165). Yapılan bir çalışmada, hemoglobin-akrilamid ürünü, pişmemiş yem ile beslenen sıçanlara göre, pişmiş yemle beslenen sıçanlarda fark edilir ölçüde yüksek bulunmuştur. Pişirilmiş yem ile beslenen sıçanların kanlarında akrilamid miktarının yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular sonucu yiyeceklerin pişirilmesiyle akrilamid düzeylerinin arttığı görüşü ileri sürülmüştür (157). IARC tarafından 2A sınıfı kanserojenler grubuna alınan akrilamidin toksisitesi, etkileri, çevredeki yaygınlığı ilgi çekmiş, üzerinde yapılan bu araştırmaları diğer çalışmalar izlemiştir. Yapılan çalışmalarda yüksek sıcaklığa maruz bırakılan gıdalarda, yüksek miktarda akrilamid içeriği bulunduğu rapor edilmiştir (158). Bu sonuçlar, İsveç, Norveç, İsviçre, İngiltere, Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere birçok ülkenin resmi gıda komisyonları tarafından da onaylanmıştır (131).

Gıdalarda akrilamid oluşum yolları ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu maddenin asıl olarak gıdaların içinde bulunan aminoasit ve indirgen özellikteki

glikoz gibi şekerlerden, Maillard reaksiyonu ile meydana geldiği tespit edilmiştir (106, 150).

Birçok hastalığın başlama ve gelişiminde, reaktif oksijen türevleri ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengesizlik önemli bir rol oynamaktadır. Bu dengesizlik vücutta biyokimyasal mekanizmaların bozulması ve organlarda patolojik durumun ortaya çıkmasına bağlıdır. Antioksidanlar, serbest radikallere bağlı olarak ortaya çıkan oksidasyonu önleyen maddelerdir. Antioksidanlar bu etkilerini değişik konsantrasyonlarda ortaya koyarlar. Düşük miktarlarda göstermesi daima istenen bir özelliktir. Organik moleküllerin bazıları serbest radikallere bağlı oksidasyonu engelleyebilmektedir. Oksidasyonun engellenmesi organizmada görülebilecek fizyopatolojik etkileri önler. Bu nedenle Farmasötik ve Gıda endüstrisinin bitkisel kökenli doğal antioksidanlara karşı ilgisi giderek artmaktadır. Antioksidan bileşiklerden olan polifenollerin, hangi bitkilerde ne kadar bulunduğu, koruyucu etkilerini gösterebilmeleri için diyetle ne kadar alınmaları gerektiği, açıklanması gereken problemlerin başında gelmektedir (52).

Bitkilerde bulunan flavonoidlerin antiinflamatuvar, antitumöjenik ve antiyalerjik özellikleri bilimsel araştırmalarla ortaya konmuştur (82). Geleneksel halk hekimliğinde kullanılan bitkilerin bilimsel araştırmalarla önemleri anlaşılmış ve tedavide kullanılmaları gündeme gelmiştir. Bu durum günümüzde fitoterapi adında bir bilim dalının gelişmesine neden olmuştur. Bu bilim dalı her geçen gün gelişmekte ve önemi giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verileri, gelişmekte olan ülkelerde toplumların % 80'inin bu terapi yöntemlerini kullandıklarını ve dünyada 3,3 milyar insanın tıbbi bitkilerden tedavi amacıyla faydalandığını ortaya koymuştur (42).

Kimyasal maddelerin mutasyona sebep olup, olmadıklarının belirlenmesi, kısa sürede yapılabilen genotoksisite testleri ile mümkün olabilmektedir. Kimyasal bir maddenin genotoksik veya antigenotoksik olup olmadığının belirlenmesinde; kromozom aberasyonu (KA, chromosome aberration, CA), mikronükleus (MN) ve kardeş kromatid değişimi (KKD, sister chromatid Exchange, SCE) testleri kullanılmaktadır (9, 33, 56, 71, 77, 167).

Kromozomal aberasyonun oluşum mekanizması bütün dokularda aynıdır. Bu nedenle bir dokuda tespit edilmesi benzer etkilerin diğer dokularda da ortaya

çıkabileceğine işaret eder. Lenfositlerdeki aberasyon düzeyi, diğer dokulardaki genetik yapıların aberasyona meyilini de gösterir. Bu nedenle lenfositlerdeki aberasyon oranları vücudun kansere yakalanma riskinin bir göstergesi olduğu düşünülmektedir (4, 21-26). Kromozomlardaki aberasyon oranındaki artış, kanser riskinin artışı şeklinde ele alınabilir. Kromozomal aberasyonların DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanabileceği bildirilmektedir (25, 137).

Karsinojenite ve genotoksisitenin ortaya çıkarılmasında kullanılan metodlardan bir diğeri ise mikronükleus testidir (58, 77). Periferal kan lenfositleri üzerinde kromozom hasarının ortaya çıkarılmasında kullanılan mikronükleus testi ilk kez 1976 yılında Contryman ve Heddle tarafından ortaya konulmuştur (78). Asentrik kromozom, kromatid kırıkları ya da kromozom ve kromatidlerin anafazda tam ayrılmaması sonucu telofaz safhasında görülen büyük nükleusun dışında kalan küçük nükleuslara mikronükleus adı verilmektedir (154). Mikronükleuslar multipolar anafaz ve telofaz safhasında da görülebilmektedir (163). Kromozomların tam ayrılamaması (nondisjunction) ya da kısmi kaybı sonucu mikronükleus oluşumuna rastlanabilmektedir. Kromozom iplikçığı, sentromerlerde bozunma veya metefazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu gelişebildiği de bilinmektedir. Yaşlanma ve kanser gibi hastalıklarda mikronükleus oluşumu ortaya çıkmaktadır (45). Bonassi ve arkadaşlarına (2007) göre periferal kan lenfositlerindeki yüksek mikronükleus oranı insanlarda kanser riskine işaret etmektedir (24). Mikronükleus testi anöjenik ve klastojenik etkilerin göstergesidir (94, 111).

Genotoksisitenin ortaya çıkarılmasında kullanılan bir diğeri ise kardeş kromatid değişimi (KKD) sıklığının değerlendirilmesidir. Kardeş kromatid değişimi eş kromozom lokuslarında iki kromatid arasında oluşan ve kromozom morfolojisinde değişikliğe sebep olmayan karşılıklı segment değişimi olarak tanımlanmaktadır (12, 73). KKD sıklığının tespit edilmesi, klastojenite, genotoksisite veya genetik instabilite araştırmalarında kullanılmaktadır. KKD sıklığının artması mutajenik etkinin ve artan kanser riskinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (70). WHO 1993 yılında kardeş kromatid değişimlerinin, replikasyon sırasında kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında karşılıklı DNA değiş tokuşlarından kaynaklandığını, bütün hücrelerde kendiliğinden ve belli oranda oluşmalarına

rağmen, birçok fiziksel ve kimyasal ajanların DNA üzerinde hasar oluşturarak KKD frekansında artışa sebep olduğunu bildirmiştir (98).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ısı işleme tabi tutulmuş, sanayide üretilen, sigara ve besinlerin genotoksik ve mutajenik etkiye sahip olan akrilamid maddesini içerdiği tespit edilmiştir. Bilimsel araştırmalar ile akrilamidin, somatik ve cinsiyet hücreleri üzerinde genotoksik etkileri gösterilmiştir. Akrilamid gen ve kromozomlarda kalıtsal hasara neden olmaktadır. İnsanların günlük hayatında yaygın olarak karşılaşılabileceği ve çeşitli yollarla bünyesine alacağı akrilamidin olumsuz etkilerini azaltacak hatta minimize edecek maddelerin tespiti oldukça önemlidir. Bu nedenle akrilamidin *in vivo* ve *in vitro* olarak genotoksik etkilerini engelleyecek maddelerin keşfedilmesi üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmada kullanılan fenolik bileşiklerin bu tip etkilerinin saptanması, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ışık tutabileceği gibi, ilaç sanayisinde de kullanılabilmesi düşünülmektedir. Etkilerinin ve dozlarının deney hayvanları üzerinde gösterilmesi bu açıdan çok önemlidir. Bu çalışma ile, akrilamidin genotoksitesini üzerine pelargonidin ve gallik asidin antigenotoksik etkilerinin olup, olmadığı fare kemik iliği hücreleri (*in vivo*) ile insan periferik lenfositlerinde (*in vitro*) kromozomal aberasyon (KA), mikronükleus (MN) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) yapıp yapmadığının saptanması amaçlanmıştır.

1.2.Genel Bilgiler

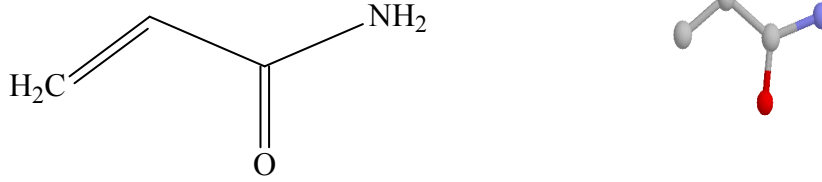
1.2.1.Akrilamid

Akrilamid, kristal halinde, renksiz, kokusuz olup, su, aseton, metanol, etanol gibi polar çözücülerde çözünür. Açık molekül formülü C_3H_5NO ($CH_2=CH-CONH_2$)'dur. Molekül ağırlığı 71.08'gramdır (86). Yapısında % 50,69 karbon, % 7,09 hidrojen, % 19,71 azot ve % 22,51 oksijen elementlerini içerir. Erime noktası 87.5 °C ve kaynama noktası ise 125 °C'dir. Bir monomer olan akrilamid, hidrolize olarak akrilik aside dönüşür. Katı haldeki akrilamid oda sıcaklığında stabildir. Ancak UV ışığa maruz kaldığında ve kaynama noktasında kolaylıkla polimerize olmaktadır. Akril ve amid gruplarından oluşan monomer şekil, uygun şartlar bulunduğu bir araya gelerek polimerik forma dönüşmektedir (13, 14, 124). Akrilamid monomerleri propenamid, etilen karboksiamid, akrilik amid ve vinil amid gibi isimlerle de anılır ve poliakrilamid sentezinde kullanılır. Poliakrilamid maden, mineral, asfalt, kâğıt üretiminde, ham petrol işleme aşamasında, içme ve atık suların arıtılmasında, toprak ve kum arıtımında fazla miktarda kullanılmaktadır. Ayrıca, katkı maddesi olarak kozmetik sanayinde, elektroforez ve moleküler biyoloji uygulamalarında, fotoğraf filmi, yapıştırıcı imalatında, vernik ve boya sanayinde, diş hekimliğinde kullanılan alaşımların hazırlanmasında kullanım alanına sahiptir (53).

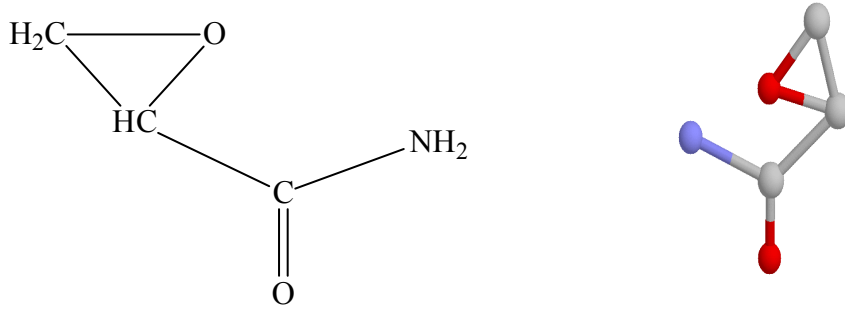
Akrilamid, kimyasal reaksiyonlara taşıdığı amid grubu ve elektron yönünden zayıf çift bağ aracılığıyla iştirak eder. Akrilamid, yapısında bulundurduğu çifte bağ ile amonyak, amin, alkol gibi nükleofilik maddelerle Michael tipi katılma reaksiyonları verir. Yine taşıdığı çift bağ ile serbest radikallerle birleşir ve Diels–Alder reaksiyonlarına iştirak eder. Amid grubu ise hidroliz, dehidrasyon ve aldehitlerle kondensasyon reaksiyonları verebilmektedir. Polimerleşmesi, sodyum bisülfid ve sodyum persülfat gibi serbest radikal kaynakları kullanılarak başlatılmakta ve reaksiyon şartlarına bağlı olarak doğrusal ya da çapraz bağlantı sonucu çeşitli polimerleri elde edilebilmektedir.

Akrilamidin vücutta metabolizasyonu CYP2E1 enzimi aracılığıyla olmaktadır. Bu enzim akrilamidi bir epoksit türevi olan glisidamide dönüştürmektedir. Glisidamid, akrilamidin toksik etkilerinin büyük bir kısmının

ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (biyoaktivasyon) (31). Akrilamid ve glisidamidin yapıları sırasıyla şekil 1. 1 ve 1. 2'de görülmektedir.



Şekil 1. 1: Akrilamidin molekül yapısının iki ve üç boyutlu şekilleri



Şekil 1. 2: Glisidamidin iki ve üç boyutlu şekilleri

1.2.1.1. Akrilamidin Gıdalarda Oluşum Yolları

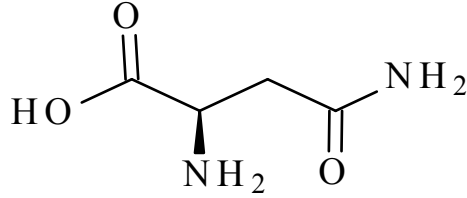
Akrilamid düşük protein ve yüksek karbonhidrat içerikli ürünlerin pişirilmesi, gıdaların yüksek sıcaklığa maruz kalması sonucu oluşmaktadır. Akrilamidin oluşumu üç farklı şekilde ortaya çıkmaktadır.

1. Lipitlerin transformasyonu, karbonhidratlar ve aminoasitlerin ayrışması yoluyla ortaya çıkan akrolein ya da akrilik asitten oluşur.

2. Malik asit, laktik asit ve sitrik asit içeren temel bazı organik asitlerin dehidrasyon-dekarboksilasyonu sonucu oluşur.

3. Karbonhidratlar ve proteinler arasında meydana gelen maillard reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (124).

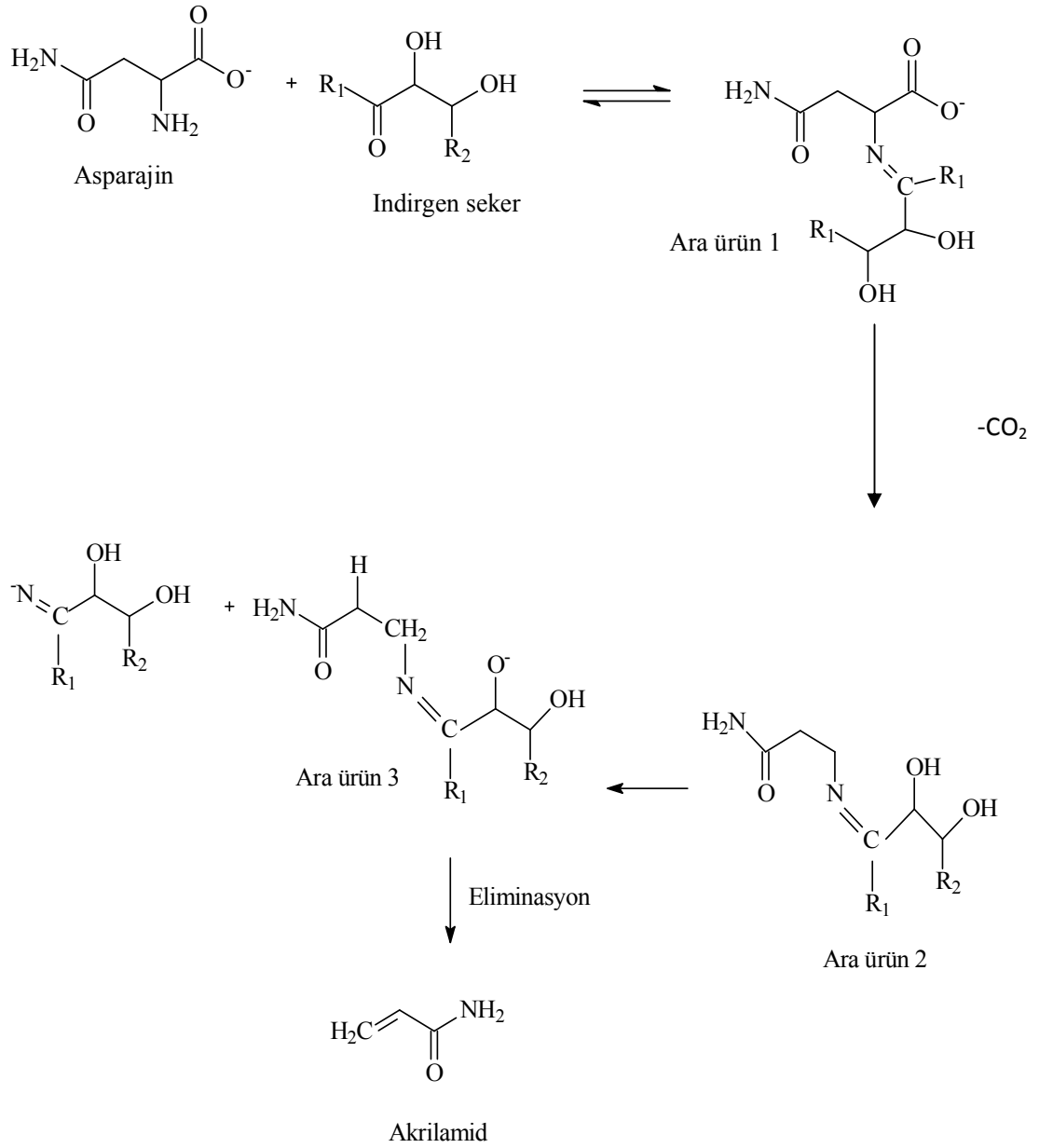
Gıdalarda akrilamidin oluşumu birçok mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Bu mekanizmalardan en önemlisi asparajin ve indirgen şekerlerden oluşan Maillard reaksiyonudur.



Asparajin

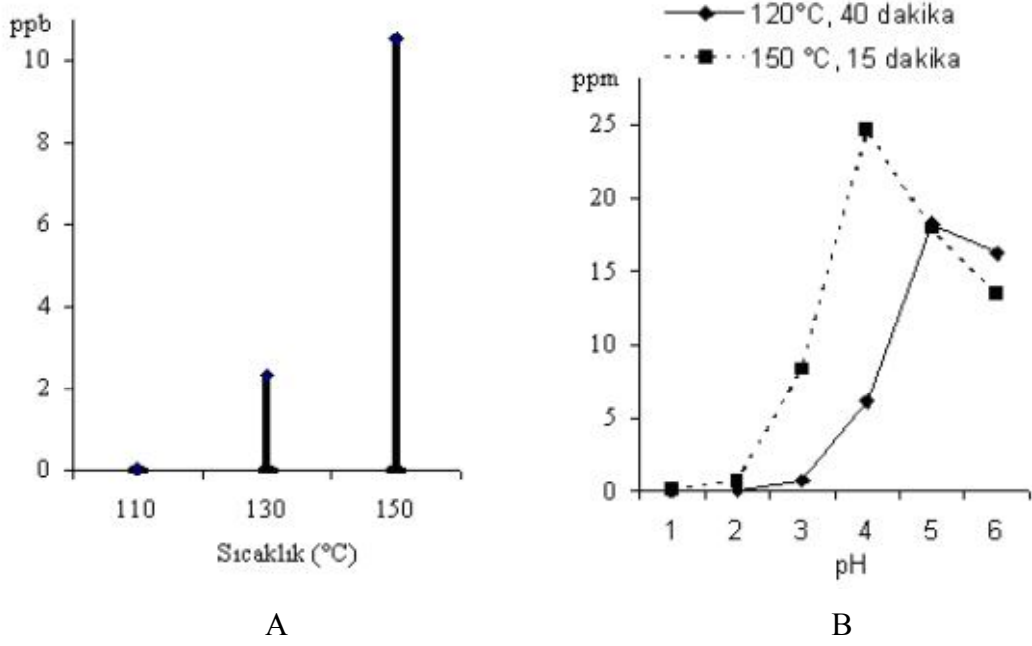
Şekil 1. 3: Asparajinin molekül yapısı

Serbest halde bulunan asparajin, indirgen şekerlerle Maillard reaksiyonuna uğrayıp, akrilamidi meydana getirmektedir. Bu yolla oluşum, diğer yollara göre daha fazla olduğu araştırmalardan anlaşılmaktadır. Maillard reaksiyonu, ilk defa 1912 yılında Louis Camille Maillard tarafından ortaya konmuştur. Maillard reaksiyonu; aminoasit ve şekerlerin iştirak ettiği reaksiyondur. Bu reaksiyon sonucu çeşitli renk pigmentleri oluşmaktadır. Isıya maruz kalan gıdaların kahverengi renk alması, diğer bir ifadeyle, kızarma işlemi aslında Maillard reaksiyonudur. Yapılan çalışmalar ile bir aminoasit olan asparajinin Maillard reaksiyonu aracılığı ile akrilamide dönüştüğü belirlenmiştir (106, 150). Asparajinin akrilamide dönüşebilmesi için indirgen özellikteki şekerlere ihtiyaç vardır (13, 152, 153, 187). Yüksek sıcaklık ve sıcaklığa bağlı süre, akrilamidin oluşmasına neden olmaktadır. Aynı ürünlerin farklı tarihlerde üretilmiş olanları veya aynı gıda tiplerinin farklı ürünleri arasında akrilamid içeriği bakımından farklılıklar görülmektedir. Gıda maddesinin sahip olduğu asparajin ve fruktoz-glikoz gibi indirgen şekerlerin miktarı, bileşimi, ürünlere uygulanan ısı derecesi ve süresi, ürünleri saklama koşulları, türü, elde edilen dönem, besinlerdeki akrilamid miktarını etkilemektedir. Yapılan birçok çalışmada pH değeri ve su içeriğinin de akrilamid oluşumu üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (şekil 1. 5) (31).



Şekil 1. 4: Asparajinin akrilamide dönüşme mekanizması

Akrilamid oluşumu ile sonuçlanan reaksiyonlara pirüvik asitin de katıldığı bilinmektedir. Maddenin amonyak varlığında sırası ile pirüvik asit, laktik asit, akrilik asit ve akrilamid gibi bir yol çizdiği bildirilmiştir (178, 182, 183).



Şekil 1. 5: A. Gıdanın Akrilamid İçeriği İle Sıcaklık ve B. pH Arasındaki İlişki (28).

1.2.1.2. Akrilamidin Toksisitesi

Akrilamid sindirim sisteminden emilerek kana geçer. Suda çok yüksek derecede çözünebildiği için, süt ve plasenta dahil olmak üzere vücutta çok geniş bir dağılım göstermektedir (166). WHO akrilamid maddesinin deriden geçebildiğini bildirmektedir. İnsanlarda zehirlenmelere ve kanser riskinin artmasına neden olan bir maddedir. Ayrıca sinir sistemine de zarar vermektedir. Gıdalarla alınan düşük miktarda akrilamidin insanlarda kansere neden olup olmadığı hakkında kesin sonuçların olmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle şüpheli kanserojenler grubunda yer almaktadır (2/A). Yüksek dozda ağız yolu ile verilen akrilamidin laboratuvar hayvanlarında kansere yol açması nedeniyle, insanlar için potansiyel kanserojen olduğu düşünülmektedir. WHO ve FAO 2005 yılında yüksek sıcaklıkta pişirilmiş ve işlenmiş bazı gıdaların önemli düzeylerde akrilamid içerdiklerini ve bu gıdaların insan sağlığı için önemli riskler taşıyabileceğini bildirmişlerdir (54, 186).

Çin’ de akrilamid üreten fabrikalarda çalışan işçilerde, kısa süreli akrilamide maruz kalmaları sonucu bacaklarda güçsüzlük, ayak parmaklarının refleks ve duyarlılıklarını kaybetmesi, ellerde uyuşukluk gibi belirtiler gözlenmiştir (76).

Akrilamide maruz kalan kişilerde periferel nöropati ortaya çıkmaktadır. Bu belirtiler akrilamidin insanda nörotoksik etkisinin olduğunu göstermektedir (30, 40). Bu akut maruziyeti, kronik bir hal aldığında merkezi sinir sistemi de etkilenmektedir. Akrilamide daha uzun vadede maruz kalındığında, periferel nöropati, serebellar disfonksiyon kendini gösterir. Beyincikle ilgili olan bu sorunlar kendisini denge bozukluğu şeklinde gösterir (76). Yürüme ve harekette ciddi sorunlar ortaya çıkar. Kızarmış yiyeceklerle beslenen hayvanlarda, kızarmış yiyecek tüketmeyen hayvanlara kıyasla yüksek düzeyde DNA ve hemoglobin hasarları görülmektedir. Ayrıca yapılan deneylerle hayvan hücrelerinde çeşitli kromozom anormalliklerine rastlanmıştır (107, 157).

Fareler ve sıçanların spermatidlerinde akrilamidin yüksek derecede mutasyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Akrilamid memeli üreme hücrelerinde mutajeniteye neden olmaktadır (2, 144). Sıçanlar 30-90 gün süreyle günlük 5-20 mg/kg dozda akrilamid ile beslendiklerinde nörolojik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Böyle akrilamide maruz kalan erkek ve dişi sıçanlarda dölleme yeteneği hızla düşmektedir. Hamile dişilerde yavru büyüklüğü ve ağırlığında azalma görülmektedir. Ayrıca erkek sıçanlarda sperm sayısı azalmakta, anormal sperm oluşumu ise yükselmektedir (35, 133, 177). Sıçanların akrilamidin dozuna bağlı olarak üreme hücrelerindeki kromozomlarında ortaya çıkan hasarlar, akrilamidin deri yoluyla alınmasında da görülmektedir. Bu bulgular akrilamidin üreme üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır (67).

1.2.1.3. Gıdalarda Akrilamid Oluşumunun Azaltılması

Akrilamid oluşumu için ana bileşenler indirgen şekerler ve asparajin aminoasididir. Bu maddeler yüksek ısıda bırakıldığında akrilamid oluşumuna neden olurlar. Gıda maddelerindeki düzeylerini maddenin çeşidi, ısıya maruz kalma süresi, sıcaklık, nem oranı, pH, ısıtma ortamı ve depolama gibi faktörler önemli derecede etkilemektedir (8, 13, 127, 132, 150, 156). Gıdaların yağda kızartılması sırasında da akrilamid oluşmaktadır. Bu tip oluşumlarda kullanılan yağın çeşidi etkili olabilmektedir. Akrilamid oluşumunu önlemek için bu faktörlerin tamamının göz önüne alınması gerekmektedir (13, 64).

Akrilamidin gıda içerisinde oluşumunu önlemek için tercih edilecek en uygun yöntem, işlem süresince oluşum koşullarını engellemektir. Yüksek ısıya maruz bırakmamak, yakmamak ve kızartmamak bunlar arasında gelmektedir. Farklı pişirme yöntemlerini tercih etmek önerilebilir. Ayrıca suda bekletme ve katkı maddeleri ekleme gibi ön işlemler gıdalara uygulanabilmektedir.

İndirgen şekerler ve sebest aminoasitler, Maillard reaksiyonu sonucu esmer bir renk alırlar. Bu esnada akrilamid oluşmaktadır. Pişirilme ile bu durum arasında doğru bir ilişki vardır. Pişirme ise yiyecek maddelerine lezzet katmaktadır (8). Bu nedenle alışılmış lezzet alışkanlıklarından vazgeçmek ve gıdaları fazla kızartmamak gerekir. Bu işlemleri yaparken gıdaların organoleptik özelliklerini de göz önüne almak şarttır. Lezzeti etkilemeyecek pişirilme şekilleri geliştirilmeli yada toplumların damak zevkleri değiştirilmelidir (151).

1.2.2. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerde doğal olarak bulunurlar. Bitkilerin normal gelişimi sırasında sentez edilen ikincil metabolitlerdir. Bitkilerdeki düzeyleri bitkinin çeşidine ve çevre faktörlerine göre değişiklik gösterir. Genellikle birden fazla hidroksil grup içeren bir veya daha fazla aromatik halka bulunduran kimyasal maddelerdir. Çok çeşitli yapıda olup, hücrelerin bazı fonksiyonlarında görev alırlar (108, 126). Fenolik bileşikler bitkileri UV ışınlarından, hastalık ve diğer zararlı etkenlere karşı korumaktadır. Büyüme ve gelişmeye yardım ederler. Ayrıca renk ve aromaya katkıda bulunurlar (61). Fenolik bileşiklerin en fazla bulunduğu gıdaların başında meyveler gelmektedir. Meyve türü, cinsi, çevresel ve iklimsel koşullar, toprak çeşidi, büyüme mevsimi, bitki hastalıkları gibi etkenler meyvelerdeki fenolik bileşik içeriğini etkilemektedir. Benzer faktörler diğer bitkiler için de geçerlidir (140).

Fenolik bileşiklerin besin olarak doğrudan yüksek bir öneme sahip olmadıkları düşünülür (yapısal açıdan). Ancak üstlendikleri fonksiyonların sağlık üzerine olumlu etkileri vardır (fonksiyonel açıdan önemli). Bitkilerde bulunan flavonoidler ve diğer polifenolik bileşiklerin antioksidan etkileri özellikle önemlidir.

Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri, metallerle şelat oluşturmaları, serbest radikalleri bağlamaları ve bazı enzimleri inaktive etmeleriyle açıklanmaktadır (181).

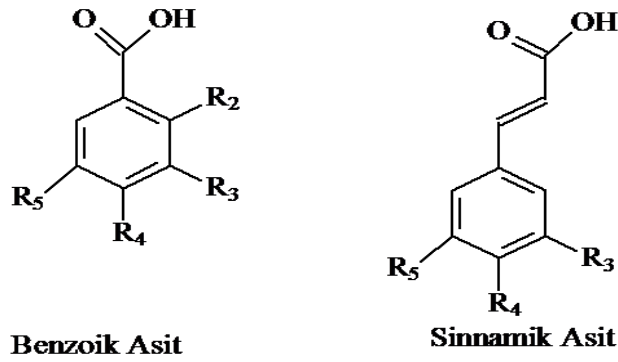
Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Flavonoidler, bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik yapılardır. Antioksidan etkilidirler. Fenolik bileşiklerden bazıları meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında etkilidirler. Bazıları ise meyve ve sebzelerin sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadırlar. Meyve ve sebzelerin işlenmelerinde enzimatik etkileşim esmerleşme sorunu doğurabilir. Meyve ve sebzelere, ayrıca bunlardan elde edilen ürünlere renk, lezzet ve antioksidan özellik kazandırdıklarından, gıdalarda istenen düzeylerde bulunması beslenme açısından çok önemlidir (34).

Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşikler nedeniyle antioksidatif ve antimikrobiyal etkiye sahiptirler. Sağlık üzerine olumlu etki yapan fonksiyonel gıda maddeleri olarak değerlendirilmektedirler. Beslenme fizyolojisi açısından vücut üzerine olumlu etki yaptıkları için fenolik bileşiklere "biyo flavonoid" adı da verilmektedir. Bazı kaynaklarda flavonoidler P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadır (34, 135). Fenolik bileşikler enzim inhibisyonuna da neden olmaktadır. Fenolik bileşikler değişik gıdalarda kalite kontrol kriteri olmaları nedeniyle büyük önem taşımaktadırlar (135). Bitkilerde doğal olarak sentezlenen fenolik maddelerin en geniş ve en yaygın grubunu flavonoidler oluşturur. Bunların dışında bitki kökenli fenoller, fenolik asitleri, basit fenoller, stilbenleri, kumarinleri, hidrolize ve kondense tanenleri, lignan ve ligninleri içermektedir (108).

1.2.2.1. Fenolik Asitler

Benzoik ve sinamik asitler olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Sinamik asitler altı karbonlu benzen halkasının bir numaralı karbon atomunda iki karbon ve bir karboksil grup taşırlar. Meyvelerde yoğun bir şekilde görülen sinamik asitler arasında, kafeik asit, ferulik asit ve kumarik asit sayılabilir. Meyvelerde sinamik asitler serbest bulunabilecekleri gibi daha çok esterleşmiş halde bulunabilmektedirler. Kafeik asitin kuinik asit ile meydana getirdiği ester olan klorojenik asit bitkilerde en yaygın görülen sinamik asit türevidir (15, 108).

Meyvelerde benzoik asit türevleri çoğunlukla ester halde bulunmaktadır. Benzoik asitler altı karbonlu benzen halkasının bir numaralı karbon atomunda bir karboksil grup taşırlar. Benzoik asit türevlerinden en önemlileri, salisilik asit (2-hidroksibenzoik asit), p-hidroksibenzoik asit (4-hidroksibenzoik asit), protokateşik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit), vanilik asit (3-metoksi-4-hidroksibenzoik asit) ve gallik asit (3-4-5-trihidroksibenzoik asit) dir (15, 108).

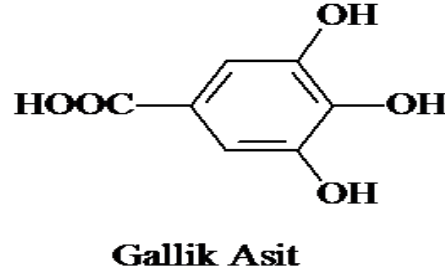


Şekil 1. 6: Fenolik Asitlerin Temel Kimyasal Yapısı

Lifli materyaller yüksek oranda flavon ve fenolik asit içermektedirler. Kumarik asit ve ferulik asit gibi fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri düşüktür. Kafeik asit ve klorojenik asit ise daha fazla hidroksil grubu taşıyan fenolik bileşiklerin ise antioksidan aktiviteleri daha yüksektir. Bunun dışında gallik asit ve esterleri bilinen en güçlü antioksidanlardandır (84).

1.2.2.1.1. Gallik Asit

Gallik asit, fenolik bileşiklerin, fenolik asitler grubuna dahildir. Bilinen en güçlü antioksidandır. Neredeyse bütün bitkilerde bulunmaktadır. En fazla mazi, üzüm, çay, şerbetçi otu ve meşe kabuğunda bulunur. Özellikle meyvelerin yeni olgunlaşmaya başladığı zamanlarda yoğun olarak bulunurlar. Ayrıca normal hücrelere zarar vermeden, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterir (84).



Şekil 1.7: Gallik Asitin Kimyasal Formülü

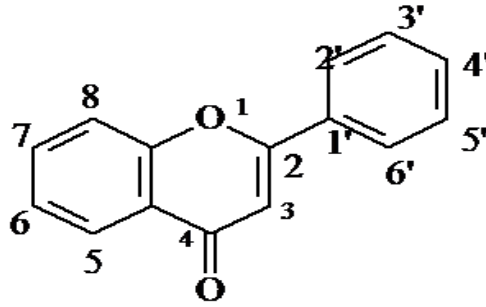
1.2.2.2. Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşmuştur. Diğer bir deyişle flavonoidler 15 karbon atomu içeren difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) yapısındadırlar. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları oldukça reaktiftir ve bu grup kolaylıkla şekerlerle birleşir. Bu nedenle bitkilerde glikozidler halinde bulunur (18). Latince sarı anlamına gelen flavus'dan isimlerini almışlardır. Genellikle sarı renkli olan bu bileşiklere bu nedenle flavonoidler adı verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları açığa çıkarılmıştır. Flavonoidlerin çoğu antioksidan aktivite göstermektedir. Çoğu flavonoid, meyve ve sebzelere kırmızı, turuncu, sarı, mavi ve mor renk vermektedir. Yeşil çayda bulunan flavonoidlerden olan EGCG (epigallokateşin galat) antikanserojen etkileri konusunda dikkat çekmektedir (108).

Bitkilerde doğal olarak oluşan flavonoidler, kimyasal yapıları göz önüne alınarak altı gruba ayrılırlar. Bunlar flavanon, flavonlar, izoflavonoidler, flavanlar (flavanoller), antosiyaninler ve flavonoller'dir (101, 120).

Flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri genel olarak üç şekilde ortaya çıkar. Kimyasal maddelerle birleşerek (birincil antioksidan), metallere şelat oluşturarak ya da süperoksit anyonunu yakalayarak antioksidan özellik gösterirler. Sonuçta serbest radikallerin etkisini gidermektedirler. 3'-4'-5' durumundaki hidroksil grupların varlığı tek hidroksil içeren türevlere göre antioksidan aktiviteyi artırmaktadır. Ayrıca 3-hidroksil grupları ve 2-3 çift bağlar antioksidan özellik üzerine olumlu etki yapmaktadır (101).

Doğal flavonoidlerin yapısında en fazla yedi hidroksil grubunun bulunduğu belirlenmiştir. Flavonoidlerin yapısında bulunan hidroksil grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolay bir şekilde şeker ve alkil gruplarıyla birleşir. Bundan dolayı flavonoidlerin metoksi ve glikozit türevlerine bitkilerde fazla rastlanılmaktadır (43).



Şekil 1.8: Flavonoidlerin Genel Yapısı

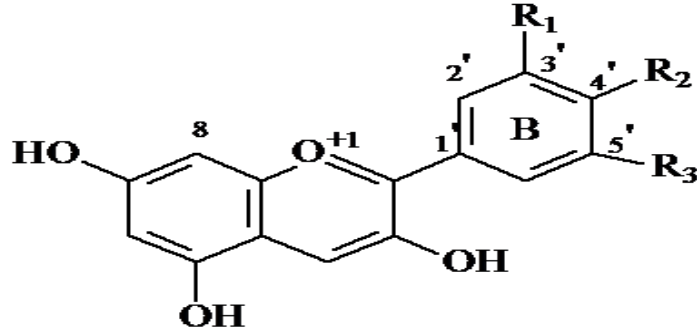
1.2.2.3. Antosiyaninler

Antosiyaninler 2-fenilbenzopiril'in polihidroksi ve polimetoksi türevlerinden oluşan glikozitlerdir. Bu yapı, şeker (mono-di-tri sakkaritler) ve şeker olmayan (aglikon) maddelerin birleşmesi sonucu oluşmaktadır. Ayrıca yapılarında heterosiklik bir halka olan pirilyum katyonu bulunmaktadır. Pirilyum katyonu yapısında pozitif yüklü oksijen taşıyan bir oksonyum iyonudur. Bu eksik elektron taşımaları nedeniyle antosiyaninler aktif bileşiklerdir. Antosiyaninlerin şeker olmayan bölümü antosiyanidinler ($C_6-C_3-C_6$) olarak adlandırılmaktadır. Antosiyanidinler farklı asit veya şekerlerle, çeşitli şekillerde bağlanarak çok sayıda antosiyanin oluşturabilmektedirler (89).

Antosiyaninler suda çözünen, sebze ve meyvelere pembe, mor ve kırmızı renk veren pigmentlerdir. Antosiyaninler taşıdıkları şeker ve bunların bağlanma durumlarına göre çok sayıda türevleri vardır. Dephinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin, peonidin ve petunidin en çok tanınan antosiyanidin türevlerindedir. Antosiyanidinlerden meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan altı adedinin kimyasal yapısı şekil 8'de gösterilmiştir (34, 143).

Reaktif olmaları nedeniyle bitkilerde bulunan doğal antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleri halinde bulunmaktadır. Bu glikozit yapıda aromatik veya alifatik asitler bulunabilir. P-kumarik asit, kafeik asit, ferulik, sinapik asit, gallik veya p-hidroksibenzoik asitler ile açillenme antosiyaninlerin stabilitesini artırması açısından önemlidir (168).

Genellikle antosiyaninler doğal renklendirici olarak kullanılmaktadırlar. Üzümden elde edilen antosiyanin ticari amaçlı mor ve kırmızı renklendiriciler olarak alkollü içecekler, alkolsüz içecekler, meyve şurupları, meyve konserveleri, şarap, tatlı ve yoğurtlarda kullanılmaktadır (168).

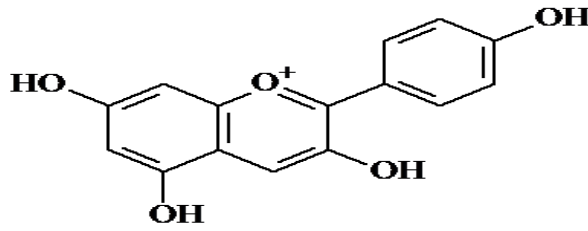


	3'	4'	5'
Pelargonidin	H	OH	H
Siyanidin	OH	OH	H
Delphinidin	OH	OH	OH
Peonidin	OMe	OH	H
Peturidin	OMe	OH	OH
Malvidin	OMe	OMe	OMe

Şekil 1. 9: Çok Bilinen Bazı Antosiyaninleri Kimyasal Yapısı

1.2.2.3.1. Pelargonidin

Pelargonidin, bir antosiyanidindir. Bitki pigmentinin yapısına girer. Karakteristik olarak portakal renginin değişik tonlarını verir. Kırmızı ıtır çiçeği, olgun ahududu, çilek, yaban mersini, böğürtlen ve eriklerde bulunur. Antioksidan etkisiyle tanınır (89).



Şekil 1. 10: Pelargonidin'in Kimyasal Formülü ($C_{15}H_{11}O_5^+$, Molekül ağırlığı: 271.23 g/mol)

1.2.3. Genotoksite

Her canlı türünün kendine has genetik bilgisinde gen rekombinasyonundan başka sebeplerle ani olarak ortaya çıkan kalıtsal değişikliklere mutasyon denilmektedir. Mutasyonlar doğada kendiliğinden oluşmasının yanı sıra, mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal etkenler tarafından da meydana getirilebilirler. Mutajenler DNA molekülünde birçok hasar oluştururlar. Bu hasarların bir kısmı hücrede özel mekanizmalar ile onarılmaya çalışılır. DNA'da meydana gelen hasarların birçoğu onarılabilmektedir. Bazen hücrenin ölümden kurtulabilmesi için DNA'da meydana gelen hasarlar mecburen yanlış olarak da onarılabılır. Bazen de onarım mekanizmalarının çalışmasını kontrol eden genlerdeki mutasyon sonucu ya da yaş, hastalıklar, beslenme, ısı gibi şartların olumsuz etkisiyle DNA'da meydana gelen hasarlar onarılmadan kalabilir. Bunun sonucu o hücrede mutasyona neden olur. Mutasyon sonucu çeşitli bozukluklar ortaya çıkar. Kanseri ve hücre ölümü bunlar arasındadır. Mutasyonlar bazen canlıda üstün bir karakterin ortaya çıkmasına neden

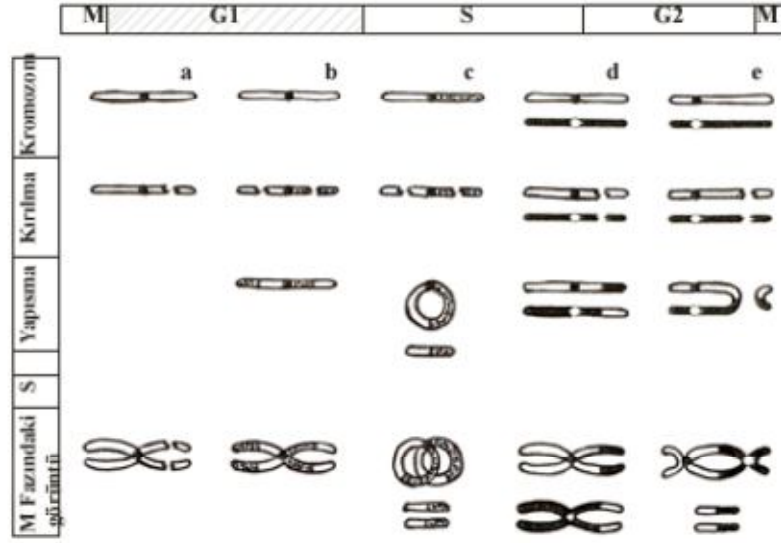
olabilir. Ancak genellikle canlılar için olumsuz olan özelliklerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (62,87).

Canlıların DNA'larında oluşan hasarlar, diğer bir deyişle mutasyon, Ames testi, in vivo memeli fare kemik iliği kromozom aberasyon testi, in vivo memeli eritrosit mikronukleus testi, in vitro memeli hücre gen mutasyon testi, bakteri kullanarak yapılan geri mutasyon testleri ile belirlenmektedir. İn vitro memeli kromozom aberasyon, kardeş kromatid değişimi ve mikronukleus testi, DNA'da oluşan hasarın ve genotoksik etkilerin sitogenetik açıdan araştırılmasında en fazla kullanılan yöntemlerdendir (109).

1.2.3.1. Kromozom Aberasyonları

Kromozomların yapı ve sayısındaki değişimlere kromozom aberasyonları (KA=CA) denir. Bu tür değişiklikler sonunda genlerin sayı ve yerleşim düzenleri değişir. Farklı genotipik özellikler ortaya çıkar. Kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, translokasyon, inversiyon, izokromozomlar yapısal kromozom aberasyonlarıdır. Yapısal kromozom aberasyonları, aberasyonun kromozomun bir veya iki kromatidinde görülmesine bağlı olarak ikiye ayrılır. Eğer aberasyon tek bir kromatidde görülüyorsa, kromatid tip, her iki kromatidinde görülüyorsa kromozom tip aberasyon denir. Bu aberasyon tipleri, mutajen uygulamasının yapıldığı hücre siklusu safhasına ve kullanılan mutajenin çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, eğer iyonize ışınlar, hücre G1 safhasında iken etki ederse, kromozom tip aberasyonlar, hücre G2 safhasında iken etki ederse, kromatid tip aberasyonlar ve hücre S safhasında iken etki ederse her 2 tip aberasyonlar meydana gelebilmektedir (109).

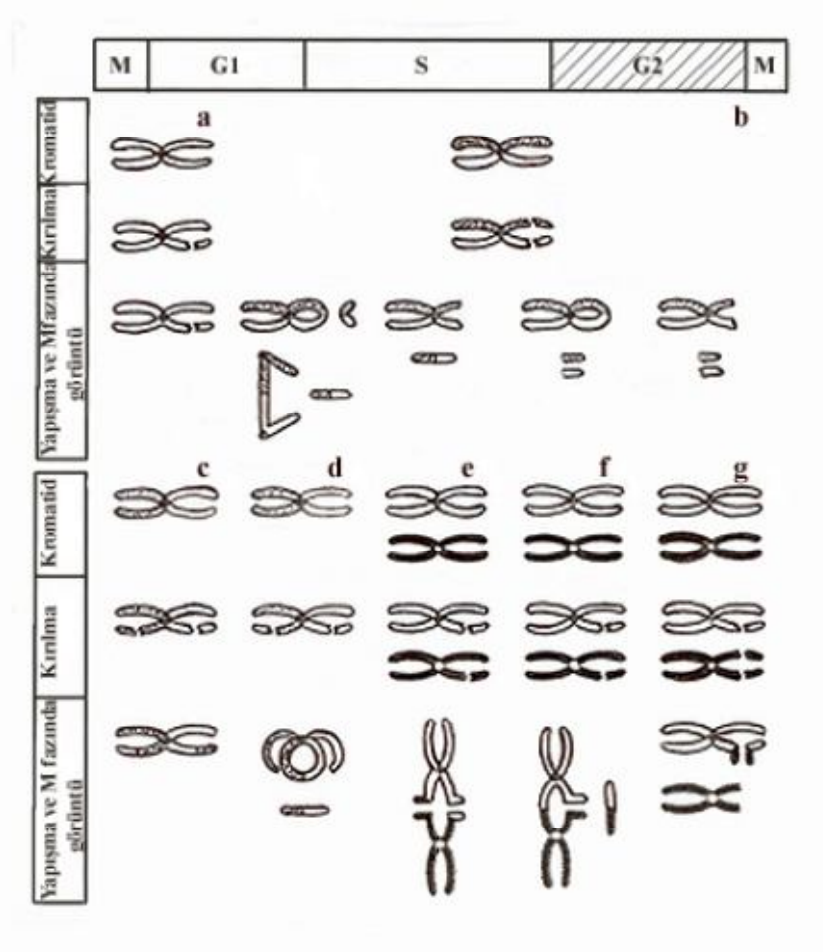
Şekil 1.11'de görülen terminal delesyon, kromozomun tek bir kolunun kırılması ile oluşmuştur. Kırılan parça ilk mitozda asentrik fragment şeklinde görülür. Asimetrik parça değişimi, aynı kromozomun iki kolunda kırılma olması ve kromozomun kırılan iki kolunun birbirine, kırılan iki parçanın da birbirine yapışması ile oluşur ve mitozda halka kromozom ve fragment şeklinde görülür (109).



Şekil 1.11: G1 fazında yapılan ışınlamalar sonucu meydana gelebilecek kromozom tipi aberasyonlar ile bunların çeşitli yapışma olasılıkları ve S fazını izleyen mitozda saptanan görüntüleri. a)Terminal delesyon, b)Aynı kromozomda simetrik parça değişikliği, c)Aynı kromozomda asimetric parça değişikliği, d)Farklı kromozomlar arasında simetrik parça değişikliği, e)Farklı kromozomlar arasında asimetric parça değişikliği (116).

Homolog olmayan kromozomlar arasında meydana gelen karşılıklı parça değişimine translokasyon denilmektedir. Farklı kromozomlar arasında simetrik parça değişiminde, sonraki mitozda görülebilir bir değişiklik meydana gelmezken, asimetric parça değişiminde, sonraki mitozda bir disentrik kromozom ve iki asentrik fragment görülür.

Şekil 1.12’de G2 safhasında; ışınlara bağlı meydana gelen, kromatid aberasyonlar; terminal delesyon, izokromatid delesyon, aynı veya farklı kromozomlar arasında simetrik ve asimetric parça değişiklikleri görülmektedir.



Şekil 1.12: Kromozom eşleşmesi tamamlandıktan sonra, G2 fazında yapılan ışınlamalar sonucunda meydana gelebilecek kromatid tipi aberasyonlar ile bunların çeşitli yapışma olasılıkları ve sonraki mitozda saptanan görüntüleri. a)Terminal delesyon, b)İzokromatid delesyon c)Aynı kromozomda simetrik parça değişikliği, d)Aynı kromozomda asimetrik parça değişikliği, e)Farklı kromozomlar arasında simetrik parça değişikliği, f)Farklı kromozomlar arasında asimetrik parça değişikliği, g)Triradial aberasyon (116).

Şekildeki terminal delesyon, sonraki mitozda terminal kromatid delesyon ve asentrik fragment şeklinde görülmektedir. İzokromatid delesyonlar, bir kromozomun iki kardeş kromatidinde aynı zamanda kırılma meydana gelmesi sonucu oluşmaktadır. Bunun sonucu mitozun anafaz safhasında köprü ve asentrik fragment oluşabilir. Diğer bir olasılıkta ise sadece fragmentler birbirine yapışır, metafazda bir fragment şeklinde görülür. Başka bir olasılıkta ise, kırılan kromozomun iki kromatidinin sadece uçları yapışır ve kırılan parçalar yapışmaz. Buna ek olarak, hiçbir yapışmanın

olmaması durumu ile de karşılaşılabılır. Simetrik parça değişikliği bir kromozomun aynı kromatidinde kırılma meydana gelmesiyle ve ardından kırılan parçaların karşılıklı yer değiştirilmesi ile oluşur. Mitozda görülebilir bir değişiklik olmaz. Eğer kromatidlerin kırık uçları birbirine, kırılan iki asentrik parça da birbirine yapışırsa asimetrik parça değişikliği gerçekleşir. Bunu izleyen mitozda kardeş kromatidlerden birisi normal diğeri halka kromozom ile asentrik fragment şeklinde görülür. Farklı kromozomlar arasında simetrik ve asimetrik parça değişiklikleri görölmektedir. Simetrik değişiklikte, iki ayrı kromozomun birer kromatidinden kopan parçalar karşılıklı yer değiştirirler. Mitozda görülebilir bir değişiklik olmaz. Eğer kırılan parçalar birbirlerine ve kromatidlerin de kırılan uçları birbirlerine yapışırsa, takip eden mitozda bu durum bir disentrik kromozom ve asentrik fragment şeklinde görülür. Triradial aberasyonlar, bir kromozomun tek kromatidinde, diğer kromozomun iki kromatidinde (izokromaid) kırılma meydana gelmesi ve izokromatid kırılma sonucu meydana gelen asentrik parçaların, tek kromatid kırılması ile oluşan kırık uçlara yapışmasıyla meydana gelir. Mitozda 3 kollu bir kromozom ile izokromatid delesyon şeklinde izlenir. Bunlardan başka oluşan kromozom aberasyonlarından biri olan inversiyonlar, bir kromozomun kopan bir parçasının 180° dönüp tekrar aynı kromozoma yapışmasıyla oluşur. İzokromozomlar ise kromozomun sentromer bölgesinden kromozom tipi enine bir kopmanın olması sonucu oluşur. Her iki kromatidinin genetik bilgileri aynı olan yeni bir kromozom meydana gelir. Gap, kromozomda kromatid kalınlığına eşit ya da ondan daha dar boyanmamış (akromatik) bölgelere verilen isimdir. Kromozomdaki boyanmamış bölge kromatid kalınlığından fazla ise kromatid kırık olarak kabul edilmektedir (163). Gaplar da kırıklarda olduğu gibi izokromatid veya kromatid gap şeklinde de olabilir. Her iki kromatidde de gap varsa izokromatid gap, tek bir kromatidde gap varsa kromatid gap denir. Elektron mikroskobu çalışmalarında, gap bölgelerinde (akromatik bölgelerde) bağlantının olduğu saptanmıştır. Özellikle DNA sentezini inhibe eden bazı kimyasallar, yüksek sıklıkla gaplara neden olurlar (109). Spiral çözülmesi, kromozomda soluk boyanan bölgelerdir. Gap'a göre daha geniş bir alanı kapsar. Kromozomların kontrole göre boylarının çok kısılması ve kalınlığının artmasına kromozom kontraksiyonu denir. Bu olay kimyasal maddenin histon proteinlerine etki ettiğini göstermektedir (163).

1.2.3.2. Mikronükleus (MN)

Mikronükleus (MN) oluşumu ilk kez Howell ve arkadaşları tarafından eritrositlerde tespit edilmiştir. Jolly tarafından tanımlanmış olduğu için MN'a Howell-Jolly cisimciği adı da verilmektedir. Mikronükleus, hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmenti, kromozom parçasıdır. Bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında yer almaktadır (58). Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucu DNA harabiyetine bağlı olarak oluşmaktadır. Diğer bir deyişle hücrelerde görülen MN, DNA hasarının bir göstergesidir. Genetik hasar tespitinde kullanılmaktadır. MN testinin günümüzde önemi anlaşılmış, Biyoloji, Farmakoloji-Toksikoloji ve Biyokimyasal araştırmalarda kullanılmaktadır. Kanser riskinin tespitinde oldukça önemlidir. Erken teşhis radyo ve kemoterapideki başarıyı artırmaktadır (60). MN testi, günümüzde DNA'daki hasar oranının in vivo ve in vitro olarak belirlenmesinde, en ekonomik ve pratik tekniklerden biri haline gelmiştir (58-60, 160, 179).

Klastojenik etki sonucu oluşan ve asentrik kromozom fragmentleri içeren MN'ların, aneujenik etki sonucu oluşan tam bir kromozom içeren MN'lardan daha küçük olduğu kabul edilmektedir (136).

Mikronükleus tekniği, kemik iliği, insan periferik kan lenfositleri ve yanak mukoza hücrelerinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu teknik basit ve kısa zaman almaktadır. DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi vermektedir. Bu özellikleri tekniği önemli hale getirmiştir (59, 160, 179). Birçok kanser tipi ile kromozom düzensizlikleri arasında bağlantı olduğu bilinmektedir. Bu amaçla kanserli olgularda teşhis amacıyla mikronükleus testi yapılmaktadır. MN testi ile genotoksisitenin derecesinin belirlenmesine de hizmet etmektedir. Tedavide kullanılan iyonize radyasyonun zararlı etkileri bilinmektedir. İyonize radyasyonla tedavi esnasındaki sitotoksik etkiler MN testi ile belirlenebilmektedir. Bu nedenle MN testi, hem kanserin teşhisinde hem de tedavi sırasında kullanılabilir (20, 128, 147).

MN testinin yaygın olarak kullanıldığı bir alan ise yaşlanmanın tespiti üzerinde yapılan çalışmalardır. Yaş artışıyla anöploid sıklığı arasında yakın bir ilişki söz konusudur. Bireyin kromozomları yaşam içerisinde maruz kaldığı çevresel

ajanların etkisiyle normal bölünmeden saptığı tespit edilmiştir. Her hücrenin mitotik aktivitesi yaş ilerledikçe yavaşlamakta ve mitoz bölünmede iğ iplikçiklerinde katalizör görevi yapan enzimlerde dejenerasyonlar ortaya çıkmaktadır (26, 50, 99, 159, 169).

Mikronükleus tekniği genotoksik ajanların etkisini araştırmak için geliştirilen sitogenetik bir yöntemdir. Bu yöntem 1950'lerde bitki, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve 1976'da da kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kromozom hasarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır (46). MN testinin basit ve pratik olması, kimyasal mutajenlerin hücre bölünmesi sırasında oluşturdukları genotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan güncel bir yöntemdir (172). Von Ledebur ve Schmid 1973'te, Heddle ve Countryman 1976'da, Högstädt ve Karlsson 1985'te ortaya koydukları çeşitli modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN testinden faydalanmışlardır (78, 83, 175). Bu araştırmacılar klastojenlerce oluşturulan MN'ların asentrik kromozom fragmentleri içerdiği ve küçük olduğu, aneujenlerce meydana gelenlerin ise tam kromozom içerdikleri ve daha büyük olduklarını tespit etmişlerdir (46). Fenech ve Morley tarafından 1985 ve 1986 yıllarında Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu geliştirilmiştir (46, 55, 57). Kromozomların sentromerini tanımlamak için, Norppa tarafından 1993 yılında, MN araştırmalarında in situ hibridizasyon (ISH) tekniği ilk defa uygulanmıştır (112).

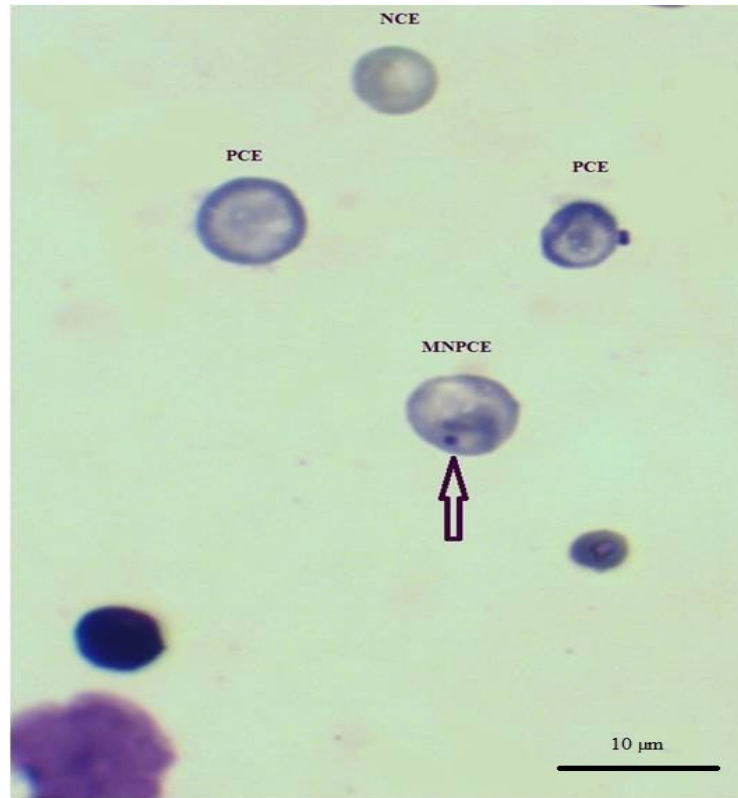
Fare Kemik İliği MN Yöntemi

Fare kemik iliğinde mikronükleus testi, ilk olarak 1970'de Boller ve Schmid gerçekleştirilmiştir. Heddle tarafından bu test 1973 yılında tekrarlanmıştır (80). Kemik iliği, hematopoietik bir dokudur. Hematopoietik hücrelerin çoğalması sırasında bir kimyasalın uygulanması, mitotik iğ ipliklerinin baskılanmasına veya kromozom hasarına yol açmaktadır (114).

Bu test, kimyasal maddelerin etkilerine bağlı olarak, hasar görmüş kromozomlarda ortaya çıkan küçük nükleusların (MN) belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Oluşan MN çekirdeğin yanında sitoplazmada kalmaktadır. Fare kemik iliği mikronükleus testinde eritrositler kullanılmaktadır. Eritroblastlar

PCE'lere (polikromatik eritrositler) dönüştüğünde mitozdan yaklaşık 6 saat sonra nukleuslarını kaybederler. Dolayısı ile MN'u belirlemek daha kolay olmaktadır (104). Mikronükleus yüzdesini belirlemek için, polikromatik (PCE) ve normokromatik eritrositler (NCE) kullanılır (173). Eritropoez sırasında meydana gelen nükleus hasarını tespit etmek için kullanılan bu eritrositler, boyanma özelliklerinden dolayı kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (122).

PCE, yeterince gelişmemiş ve olgunlaşmamış eritrosit demektir. Gelişimin ara safhasındadırlar ve ayrıca ribozomları vardır. NCE, yeterince gelişmiş ve olgunlaşmış eritrositlerdir. Periferal kanda yaklaşık bir ay kalırlar ve ribozomları yoktur (104). PCE'ler, May Grünwald-Giemsa ile maviye, NCE'ler ise kırmızı renge boyanırlar. Aşağıdaki resimde (Resim 1.1) PCE, NCE ve mikronükleus taşıyan PCE hücreleri görülmektedir.

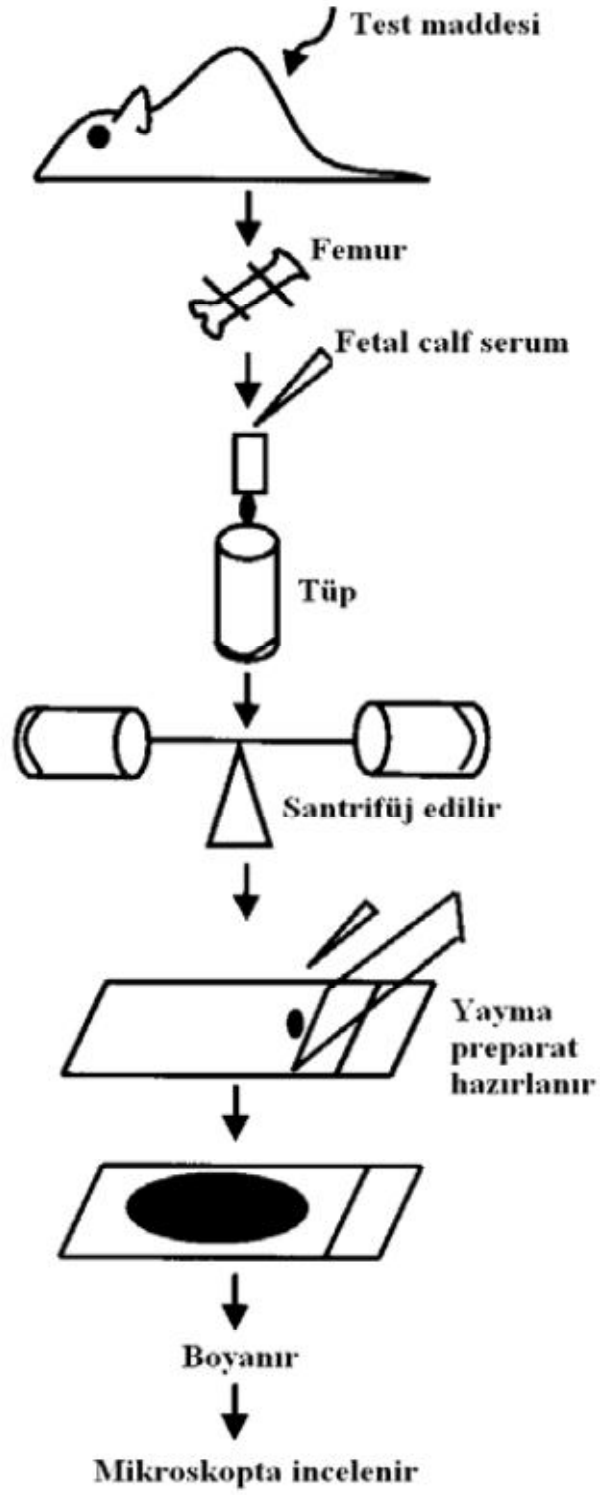


Resim 1.1: PCE, NCE ve MN taşıyan PCE (MNPCE)

Mikronükleusların değerlendirilmesi bazı kriterlere göre yapılmaktadır. Mikronükleusun çapı, eritrosit nükleusunun yarısından daha az olmalıdır. Şekli genellikle yuvarlaktır, ama bazen oval, halka ya da badem şeklinde olabilir (139). MN'un çevre sınırları çoğunlukla açıktır. Heddle vd. (1983) göre, eritrosit populasyonunda MN'un % 6'dan fazla olması, kullanılan kimyasal maddenin genotoksitesini (79, 122), PCE/NCE oranındaki azalma ise, kimyasal maddenin sitotoksitesini belirlemektedir Schmid'e (1975) göre ise, normal kemik iliğinde PCE/NCE oranı genellikle 1:1'dir (41, 139). Nükleuslu hücrelerin olgunlaşması ve bölünmesi üzerine sitotoksik etkiler meydana geldiği zaman, kemik iliğinde boşluk oluşması sebebiyle, PCE/NCE oranında azalma olabilmektedir (65, 138).

Sıçan kemik iliğinde PCE'lerin yaşam süresi 10-33 saat arasındadır (39, 134). MN'lu PCE sayısı aneujenler ve klastojenler uygulamalarından sonra sırasıyla 6 ve 10 saat daha uzamaktadır (38, 74, 171). Aneujenik veya klastojenik kimyasal maddeler ile muameleden 24 ve 48 saat sonra MN'li PCE'ler kemik iliğinde tespit edilebilirler (172). Bu nedenle, bir kimyasal maddenin toksik etkisini tespit etmek için, farede in vivo MN testi, kimyasal madde canlıya uygulandıktan sonra, her biri 12 ve 72 saat aralığında olmak üzere üç muamele süresi önerilmektedir (48, 113).

Kemik iliği yöntemi: Canlıya kimyasal madde uygulanır, muamele süresinin sonunda hayvan servikal dislokasyon ile ötanazi edilir, fetal calf serum ile femurdan kemik iliği çıkarılır, santrifüj edilir, süpernatant atılır, pipetaj yapılır, yayma preparatlar hazırlanır, fiksasyon ve boyama işleminden sonra mikroskopik inceleme yapılır. Uygulama şekil 1.13'de özetlenerek verilmiştir.



Şekil 1.13: MN testi yapılışı (66)

Sitokinezi Engellenmiş MN yöntemi

Sitokinezi-blok MN (CBMN; Cytokinesis Block MicroNucleus) analizleri, Cyt-B'nin (Cytochalasin-B) hücre bölünmesini sitokinez evresinde durdurması özelliğine dayanmaktadır (60, 160, 179). Cyt-B, *Helminthosporium dermatioideum* türü mantardan elde edilen bir ekstraktır. Sitokinez evresinde Cyt-B, aktin filamentlerini etkileyerek hücre bölünmesini durdurmaktadır. Cyt-B, bu etkisini aktin filamentlerin ucuna bağlanıp, aktinin polimerize olmasını önleyerek gerçekleştirir (14, 99, 159, 162, 169). Yapılan bir çalışmada hücre kültürüne sitoplazma bölünmesini durduran bir aktin inhibitörü olan cytochalasin-B, mitoz esnasında ilave edildiğinde çekirdek bölünmesinin tamamlanmadığı belirlenmiştir (95). Sitoplazmik bölünmesini gerçekleştiremeyen çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. Preparat üzerinde incelenen alanlarda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlayan 4 çekirdekli hücrelere de rastlanabildiği tespit edilmiştir (95).

Mikronukleus hesaplama kriterleri

İnsan lenfositlerinin sitokinezinde bloklanan mikronukleusların hesaplanması için öncelikle hücre tiplerinin belirlenmesi gereklidir. Hücreler, mononukleus, binukleus, multinukleus, apoptotik veya nekrotik hücre tipinde olabilirler. Mononukleuslu hücrelerin küçük sitoplazmaları, büyük nükleusları vardır. Binukleuslu hücreler ise eş büyüklükteki iki hücre çekirdeği taşırlar. Bu tip hücrelerde iki nükleus nükleoplazmik köprüyle (NPB) birleşmiş olabilir. Nükleuslar birbirleri ile temas halinde veya üst üste olabilir. Multinukleuslu hücreler üç, dört veya daha fazla farklı büyüklükte nükleus taşırlar. Bu tip hücreler pek çok sayıda MN içerebilirler. Sitokinezde bloke edilmiş hücrelerin CBMN frekansı tespit edilirken aşağıdaki özellikleri göz önüne alınır.

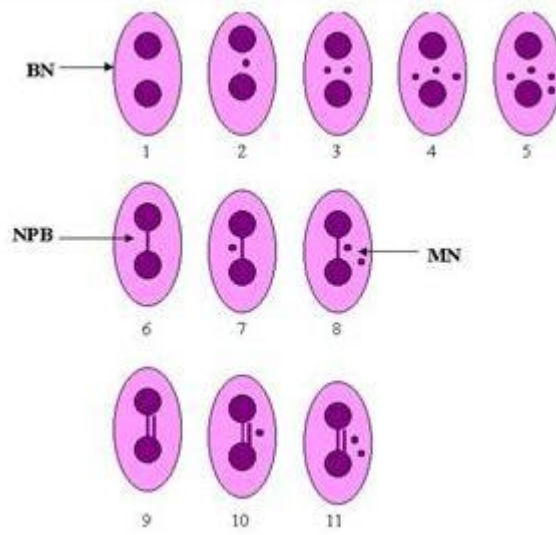
- MN sayımları BN'lu (Binukleus) hücrelerde yapılır.
- MN'ların çapı, ana nükleusun yarı çapının 1/16 ile 1/3'ü kadar olmalıdır.
- MN'ın alanı ana nükleusun alanının 1/256 ile 1/9'u arasında olmalıdır.
- MN'lar ana nükleusa bağlı olmamalıdır.

- MN'ların çoğu nükleusların arasındadır ama aynı zamanda hücrelerin kutuplarında da olabilir.

- MN'ların yapıları küçük nükleuslara benzer. Fakat boya veya yanılmalara neden olabilecek kabarcıklar ve noktalar MN olarak kabul edilmemelidir (59).

Değerlendirmede göz önüne alınacak kriterler Şekil 1.14'de gösterilmiştir.

Klastojenlere maruz kalmış BN hücrelerde nükleoplazmik köprüler tespit edilebilir. Bu köprüler iki nükleusu birleştirmektedir. Köprülerin kalınlığı BN hücrelerdeki nükleus çapının $1/3 - 1/25$ 'i arasında değişebilmektedir (59)



Şekil 1.14: CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) Dağılımı; 1. Binükleuslu hücre, 2. Bir MN'lu BN hücre, 3. İki MN 'lu BN hücre, 4. Üç MN 'lu BN hücre, 5. Dört MN'lu BN hücre, 6. NPB'li BN hücre, 7. Bir nükleoplazmik köprü ve bir MN'lu BN hücre, 8. Bir nükleoplazmik köprü ve iki MN'lu BN hücre, 9. İki nükleoplazmik köprü, 10. İki nükleoplazmik köprü ve bir MN 'lu BN hücre, 11. İki nükleoplazmik köprü ve iki MN'lu BN hücre (56, 59).

Hücre bölünme kinetiği temel alınarak, aşağıda belirtilen modifiye edilmiş yöntemle NDI (Nuclear Division Index: Nükleer Bölünme Frekansı) ve NDCI (Nuclear Division Cytotoxicity Index: Nükleer Bölünme Sitotoksite Frekansı) ile hesaplanabilmektedir. Bu şekilde lenfositlerin mutajenik aktiviteleri belirlenebilmektedir (56, 59).

NDI: $[MI + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$

NDCI: $[Ap+Nec+M1+2(M2)+3(M3)+4(M4)] / N^*$

Ap: Apoptotik hücre

Nec: Nekrotik hücre

M1 : Bir nükleuslu hücre,

M2 : İki nükleuslu hücre,

M3 : Üç nükleuslu hücre,

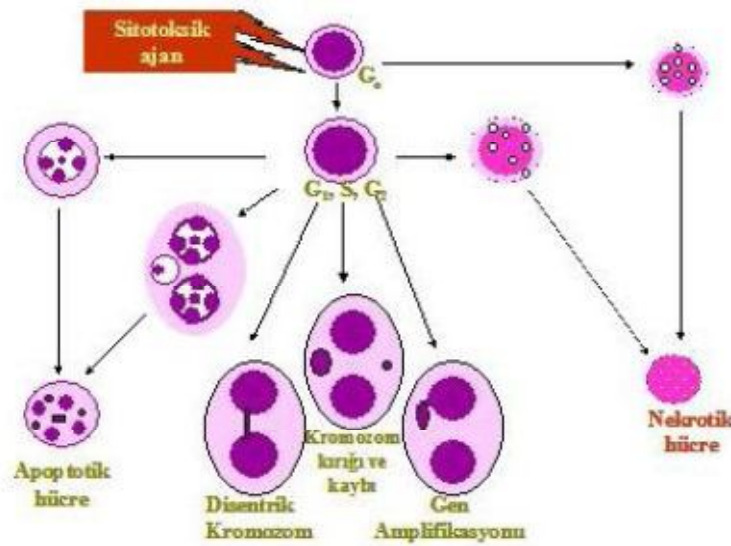
M4 : Dört nükleuslu hücre,

N: Toplam yaşayan hücre,

N* : Toplam hücre (Yaşayan hücre + Apoptotik hücre + Nekrotik hücre)

NDI: Nuclear Division Index (Nükleer Bölünme Frekansı)

NDCI: Nuclear Division Cytotoxicity Index (Nükleer Bölünme Sitotoksite Frekansı)



Şekil 1. 15: Sitotoksik ajanın etkisindeki hücrelerin olası durumları (56).

1.2.3.3. Kardeş Kromatid Değişimi

Kardeş kromatid değişimi, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenite ve kanserojenite etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. KKD (Kardeş kromatid değişimi), eş kromozom lokuslarında iki kromatid arasında meydana gelen ve kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmayan, karşılıklı segment değişimi olarak tanımlanmaktadır. KKD testi sitogenetik bir yöntemdir. KKD sıklığının tespit edilmesi, klastojenite, genotoksisite veya genetik instabilitenin

araştırılmasında kullanılmaktadır. KKD sıklığında artış, mutasyon ve kanser riskinde artışın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (51).

KKD ilk defa 1957 yılında J.H. Taylor tarafından ortaya konmuştur. Yöntem çok zaman alıcı ve radyoaktivite içermesinden dolayı yaygın olarak kullanılmamaktadır. Zacharov ve Egolina 1972 yılında timidin analogu olan 5-bromodeoksiüridin'i (BrdU) kardeş kromatidleri göstermek amacıyla Çin hamster hücre kültürlerinde denemiştir. BrdU replikasyon sırasında yeni yapılan DNA molekülünün yapısına girmekte, bunun sonucunda Giemsa boyası ile iki kardeş kromatid farklı olarak boyanmaktadır. Preparat, Giemsa ile boyandığında BrdU içeren DNA daha açık boyanmakta ve floresan mikroskopta mavi yeşil renk vermektedir. KKD sıklığının belirlenmesi, en çok periferik kanda lenfositler üzerinde gerçekleştirilmektedir. Lenfositlerin, bir antijen olan fitohemaglutinin ile stimule edilerek bölünmeleri sağlanmaktadır (51). KKD süresi boyunca, DNA'nın duplikasyonu sırasında kromatidler arasında parça değişimi ve DNA sarmalında kırıklar oluşmaktadır. Bu olay, hücre siklusunun S fazında normal olarak meydana gelebilmektedir. Ancak DNA replikasyonunu engelleyen mutajenlerin etkisi altında daha sık olmaktadır (51).

KKD sıklığının belirlenmesi hassasiyet gerektiren bir yöntemdir. Kültüre ilave edilen BrdU miktarının değişmesi, sonuçları önemli ölçüde etkilemektedir (51).

KKD, bir kromozomun kardeş kromatidleri arasındaki değişimi ifade etmektedir. Kardeş kromatidler arasındaki parça değişimleri ışık mikroskobu altında kolaylıkla belirlenip, sayılabilmektedir. KKD sıklığı, sayılan kardeş kromatid değişimi sayısının incelenen metafaz sayısına bölünmesiyle elde edilmektedir. Sayılan metafaz en az 30, ideal olarakta 50 olarak bilinmektedir. Kardeş kromatid değişimi sıklığının artması, mutajenik etkinin varlığını göstermektedir. Viral enfeksiyonlar, malign hastalıklarda KKD sıklığı artmaktadır. Ayrıca kimyasal maddeler ve ultraviyole ışığına maruz kalmanın da KKD sıklığını artırdığı gösterilmiştir (51). KKD hücre bölünmesi esnasında kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmamaktadır. Hücre DNA'sı genotoksik ajanlar tarafından zarar gördüğünde KKD sıklığı artmaktadır (5).



Resim 1.2: Kardeş kromatid değişimi örneği

2. MATERYAL ve METOT

2.1. in-vivo çalışma

2.1.1. Materyal

2.1.1.1. Hayvan Materyali (Deney Hayvanları)

*Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 20.01.2010/ 07 sayılı izni ile çalışma onayı alındı.

Çalışmada ağırlıkları 20-30 g arasında değişen, 8 haftalık erkek, *Mus musculus* cinsi albino fareler kullanıldı. Çalışmada, mikronükleus sıklığı, mitotik aktivite ve kromozomal aberasyon analizinin belirlenmesi amacıyla toplam 136 adet fare kullanıldı. Fareler 121° C' de otoklove edilebilen, polikarbon malzemedan yapılmış kafeslerde barındırıldı. Hayvanlar kafeslere 8'li gruplar halinde yerleştirildi. Fareler normal fare yemi ile beslenip, su olarak çeşme suyu kullanıldı. Yem ve sularının ad libitum olması sağlandı. Fareler, 20± 2 ° C sıcaklık, % 50 bağıl neme sahip, sabah 8'den akşam 8'e kadar olan 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyotlu laboratuvar koşullarında barındırıldı. Uygulanacak maddelerin dozu farelerin günlük ağırlıklarına göre tespit edilmiş olup, maddeler distile suda çözülerek intraperinonal yol ile verildi.

2.1.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Akrilamid

Çalışmada farelere uygulanan akrilamid (CAS no. 79-06-1) Sigma'dan temin edildi. Maddenin diğer adları Acrylic acid amide ya da 2-Propenamid'dir. Madde kimyasal olarak C₃H₅NO yapısında olup, 71,08 g/mol molekül ağırlığına sahiptir.

- Akrilamidden 7,5 mg alındı, hacmi 1,5 ml distile suya tamamlanarak çözdürüldü. Bu çözeltiden farelere 50 µl/10 g fare hesabıyla periton içi yolla verildi (25 mg/Kg).

- Akrilamidden 15 mg alındı, hacmi 1,5 ml distile suya tamamlanarak çözdürüldü. Bu çözeltiden farelere 50 µl/10 g fare hesabıyla periton içi yolla verildi (50 mg/Kg).

- Akrilamidden 30 mg alındı, hacmi 1,5 ml distile suya tamamlanarak çözdürüldü. Bu çözeltiden farelere 50 µl/10 g fare hesabıyla periton içi yolla verildi (100 mg/Kg).

- Akrilamidden 45 mg alındı, hacmi 1,5 ml distile suya tamamlanarak çözdürüldü. Bu çözeltiden farelere 50 µl/10 g fare hesabıyla periton içi yolla verildi (150 mg/Kg)

Pelargonidin

Çalışmada farelere uygulanan pelargonidin (CAS no: 134-04-3) Aldrich' ten temin edildi. Fenolik bileşiklerden antosiyanidin grubunda olup, antioksidan etkili bir maddedir. Diğer adı 3,4',5,7-Tetrahydroxyflavylium chlorid olup, 306,7 g/mol molekül ağırlığına ve C₁₅H₁₁ClO₅ formülüne sahiptir.

Pelargonidinden 0,9 mg alındı ve distile suda çözdürülerek hacmi 1,5 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan farelere 50 µl/10 g fare hesabıyla periton içi yolla verildi (3 mg/Kg).

Gallik Asit

Çalışmada farelere verilen gallik asit (CAS no:149-91-7) Sigma'dan temin edildi. Fenolik asit grubundadır. Güçlü antioksidan bir maddedir. Diğer adı: 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid, Formülü: C₇H₆O₅, Molekül ağırlığı: 170,12 g/mol.

Gallik asitten 30 mg tartılarak alındı ve distile suda çözdürülerek hacmi 1,5 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan farelere 50 µl/10 g fare hesabıyla periton içi yolla verildi (100 mg/Kg).

Mitomycin C (MMC)

Mitomycin C bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı (Sigma). Kapalı formülü: $C_{15}H_{18}N_4O_5$ 'dir.

Mitomisin C 0,6 mg alındı ve distile suda çözdürülerek hacmi 1,5 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan farelere ip yolla 50 μ l/10 g fare dozda enjekte edildi (2 mg/Kg).

Kolşisin (Colchicine)

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (kolşisin) (Sigma cat. No. C9754) kullanıldı. Kolşisin çözeltisi steril saf su içerisinde hazırlandı. Kolşisin çözeltisinden 4 mg/kg dozda 2 saat önce hayvanların karın zarına (peritonuna) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kolşisin'in bazı özellikleri aşağıdadır: Kapalı formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$, Molekül ağırlığı: 399.4

-Kolşisinden 1,2 mg alındı ve distile su ile çözdürülerek hacmi 1,5 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan farelere ip yolla 50 μ l/10 g fare dozda enjekte edildi (4 mg/Kg).

Eter (Dietyl Eter, Etoksietan)

Dietyl eter, kısaca eter ya da etoksietan olarak da bilinir (CAS No : [60-29-7]). Kaynama noktası düşük olup, karakteristik bir kokusu vardır. Çalışmada anestezi olarak farelerin servikal dislokasyonundan önce kullanıldı. Dietyl eterin bazı özellikleri aşağıda verilmiştir. Diğer Adları, Etil Eter ve Etil Oksit, Etoksietan, 3-Oksapentan, Kimyasal Formülü, $C_4H_{10}O$ ($C_2H_5OC_2H_5$), Molekül ağırlığı, 74.12 g/mol'dür.

Glasiyal Asetik Asit

KA testinin preparatlarının hazırlanması kullanılan fiksatif solüsyonunda ve ayrıca teratojenik çalışmalarda fetusların boyanması için kullanılan boyanın

hazırlanmasında da kullanılmıştır (Merck). Diğer Adları: Acetyl hydroxide (AcOH), Hydrogen acetate (HAc), Ethylic acid, Methanecarboxylic acid (CAS No : 64-19-7), Kapalı Formülü, $C_2H_4O_2$, CH_3COOH , Molekül Ağırlığı 60.05 g/mol'dür.

Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak % 0,4'lük KCl (Merck) kullanıldı. Eriyik bidistile su içinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı bir cam kapta buzdolabında (+4 °C) saklandı. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeterli miktarda alınıp, 37 °C'deki inkübatörde ısıtıldıktan sonra kullanıldı.

Fiksatif

KA testi için kullanılan fiksatif, 1 kısım glasiyal asetik asit'in 3 kısım metanol ile karıştırılması sonucu hazırlandı. Fiksatif kullanılmadan 15 dakika önce hazırlanmış ve ağzı kapalı cam bir kapta buzdolabında (+4 °C)'de saklandı. Her seferinde preparat yapım işleminden 15 dakika önce taze olarak hazırlanıp, kullanıldı.

Sorensen Tampon (Sorensen Buffer) Çözeltisi

Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup, çalışmanın amacına uygun olarak birbiriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanıldı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında kapalı kaplarda saklandı.

Tampon A: 11. 34 g KH_2PO_4 250 ml saf su içinde çözdürüldü (pH=4.8).

Tampon B: 14. 83 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ 250 ml saf su içinde çözdürüldü. (pH=9.3).

Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan % 5'lik ve % 10'lük boya

eriği halinde preparatların boyanmasında kullanıldı. % 5'lik Giemsa boyasının hazırlanışı: 5 ml Tampon A + 5 ml Tampon B + 5 ml Giemsa + 85 ml distile su.

Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, cat. no. 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanıldı.

Metanol (Methanol, Metil Alkol, Karbinol)

KA testinin preperatlarının hazırlanmasında kullanılan fiksatif solüsyonunda kullanıldı. Burada fiksatif, 1 hacim glasiyal asetik asit, 3 hacim metanol karışımı şeklinde hazırlanarak kullanıldı.

2.1.1.3. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları

Hassas Terazi

Tartım işlemlerinde 0,0001 gr hassasiyetindeki PRECİSA XB 220 A marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanıldı.

Santrifüj

Devir hızı 5000 rpm'e kadar yükselebilen, 15 dk.'lık zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli ELEKTRO-MAG marka santrifüj, çalışmalarda kullanıldı.

Mikroskop

Fotoğraf makinesi ve kamera monte edilebilen, koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemelerinde kullanıldı.

Etüv

Elektro-mag M 420 Bp marka 0 °C - 100 °C ayarlanabilir etüv, deneyde bazı eriyiklerin 37 °C'ye ısıtılmasında kullanıldı.

2.1.2. Metot

Kontrol A hariç bütün gruplara çözeltiler distile su dahil 50 µl/10 g fare dozunda aşağıda planlandığı şekilde ip yolla enjekte edildi.

Grup 1. (Kontrol grubu, n=16). Bu grup, negatif grup olarak tutuldu. İlk 8 fareye hiçbir madde verilmedi (Kontrol A). Diğer 8 fareye distile su i.p. yolla enjekte edildi (Kontrol B).

Grup 2. Pozitif Kontrol grubu (n=8). Bu grup pozitif deney grubu olarak tasarlandı. Farelere intra-peritoneal (i.p) yolla, 24 ve 48 saat önce 2 mg/kg dozda Mitomycin-C (MMC) enjekte edilmiştir (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 3. 25 mg/kg Akrilamid grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 25 mg/kg dozdaki akrilamid i.p yolla enjekte edilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 4. 25 mg/kg Akrilamid + 3mg/kg Pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 3 mg/kg dozda pelargonidin intraperitoneal yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 25 mg/kg dozda akrilamid verilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 5. 25 mg/kg Akrilamid + 100 mg/kg Gallik Asit grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 100 mg/kg dozda Gallik Asit intraperitoneal yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 25 mg/kg dozda akrilamid verilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 6. 50 mg/kg Akrilamid grubu (n=8) Bu gruptaki 8 fareye 50 mg/kg dozdaki akrilamid i.p yolla enjekte edilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 7. 50 mg/kg Akrilamid + 3mg/kg Pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 3 mg/kg dozda pelargonidin intraperitoneal yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 50 mg/kg dozda akrilamid verilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 8. 50 mg/kg Akrilamid + 100 mg/kg Gallik Asit grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 100 mg/kg dozda Gallik Asit intraperitoneal yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 50 mg/kg dozda akrilamid verilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 9. 100 mg/kg Akrilamid grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 100 mg/kg dozdaki akrilamid i.p yolla enjekte edilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 10. 100 mg/kg Akrilamid + 3mg/kg Pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 3 mg/kg dozda pelargonidin intraperitoneal yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 100 mg/kg dozda akrilamid verilip 24-48 saatlik etkisine beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 11. 100 mg/kg Akrilamid + 100 mg/kg Gallik Asit grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 100 mg/kg dozda Gallik Asit intraperitoneal yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 100 mg/kg dozda akrilamid verilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 12. 150 mg/kg Akrilamid grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 150 mg/kg dozdaki akrilamid i.p yolla enjekte edilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 13. 150 mg/kg Akrilamid + 3mg/kg Pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 3 mg/kg dozda pelargonidin intraperitoneal yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 150 mg/kg dozda akrilamid verilip 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 14. 150 mg/kg Akrilamid + 100 mg/kg Gallik Asit grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 100 mg/kg dozda Gallik Asit intraperitoneal yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 150 mg/kg dozda akrilamid verilip 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer dört hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 15. 100 mg/kg Gallik asid grubu (n=8) Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük olarak 100 mg/kg dozda Gallik Asit intraperitoneal yolla verildi.

Grup 16. 3 mg/kg Pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük olarak 3 mg/kg dozda Pelargonidin intraperitoneal yolla verildi.

2.1.2.1. Kromozomal İnceleme ve Mitotik İndeksin Tespiti

Mitotik aktivite, kromozomal incelemeler ve mikronükleus testi için her bir ayrı doz ve kontrol gruplarında 8 adet fare olmak üzere toplam 136 fare kullanıldı (Ağırlıkları 25-40 g, 8 haftalık, erkek *Mus musculus* cinsi albino fareler). Farelere intraperitoneal enjeksiyon yapılmadan önce tartılıp, vücut ağırlıklarına göre 25, 50, 100 ve 150 mg/kg akrilamid, 3 mg/kg pelargonidin, 100 mg/kg dozdaki gallik asit ve pozitif kontrol olarak da 2 mg/kg mitomisin-C i.p yolla farelere uygulandı. (Distile suda hazırlanmıştır).

Bütün gruplardaki farelere 15. günün başlangıcında, ötanaziden 2 saat önce 4 mg/kg dozunda kolşisin distile suda çözülerek intraperitoneal olarak enjekte edildi. Hayvanlar eter ile anestezi edildi. Anestezi altındayken servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülüp, femur kemikleri çıkartıldı. Kemikler kaslarından iyice temizlenerek görünür hale getirildi. Femur kemiklerinden biri kromozomal aberasyon ve mitotik indeksin tespitinde, diğeri ise mikronükleus testinde kullanıldı. Her iki femura ait kemik iliği enjektör yardımı ile santrifüj tüpüne aktarıldı (içerisinde 3 ml fetal dana serumu bulunan).

Femur örneklerinden birine ait tüpler, 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Etüvde 0.075 M 5 ml KCl solüsyonu 37 °C ve 30 dakika ısıtıldı. Isıtılan hipotonik çözeltide hücreler, 20-30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 1100 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edilerek, süpernatant atıldı. Hücreler taze olarak hazırlanmış 5 ml soğuk Carnoy's (metanol:glasiyel asetik asit 3:1) içerisinde fikse edilerek, santrifüjlenip, tekrar

süpernatant kısmı atıldı. Bu fiksasyon işlemi 3 kez tekrarlanıp, santrifüjden sonra süpernatant kısım, tüpün dibinde 0,5 ml kalacak şekilde atıldı. Dipte kalan hücreler pastör pipeti yardımıyla süspansede edildi ve nemli temiz lamlara 3-4 cm yukarıdan damlatılarak yayıldı. Mitotik aktivite ve kromozomal aberasyon için metafaz preparatları Preston'a (1987) göre laboratuvar ve çalışma koşullarımız göz önünde bulundurularak yapılmıştır (121).

Boyama İşlemi

Yayma işlemi bittikten sonra preparatlar oda sıcaklığında kurutuldu ve önceden hazırlanan %10'luk giemsa ile 10 dakika boyandı. Olympus CX21 marka ışık mikroskopunda, mitotik aktivite için 1000'lik büyütmede her hayvan örneğinden rastgele 1000 hücre sayıldı. Sayılan hücrelerin içerisinde metafaz safhasında olanların adetleri tespit edilerek, yüzdeleri belirlendi. Kromozomal aberasyonu tespit etmek için 100 metafaz incelendi.

2.1.2.2. Mikronükleus Testi

Çalışmamızda mikronükleus tespitinde periferel kan yerine, kemik iliği kullanıldı. Çıkarılan femur kemikleinden birinin örneği kromozomal aberasyon tespitinde kullanılırken, diğer femur kemiği mikronükleus testi için kullanıldı. Femur kemiği iki ucundan kesilerek, kemik iliği enjektör yardımı ile içerisinde 3 ml dana serumu bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı. İçerisinde kemik iliği numunesi bulunan tüpler 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı. Tüpte kalan kısmın üzerine bir damla dana serumu konularak süspansede edildi. Bundan alınan bir damla örnek temiz lamlar üzerine yayıldı. Yayma işlemi tamamlanan lamlar havada kurutuldu ve metil alkolde 10 dakika fikse edildi. Kemik iliği preparatları ilk kez Schmid (1975) tarafından geliştirilip, laboratuvar ve çalışma koşullarımıza göre uyarlanan bir yöntem ile hazırlanmıştır (139).

Boyama İşlemi

Fikse edilmiş preparatlar ilk önce % 0,25'lik May Grunwald boyası ile 5 dakika boyanarak saf su ile yıkandı. Daha sonra % 0,125'lik May Grunwald boyası ile 5 dakika tekrar boyanarak saf suda yıkandı. En son % 20'lik Giemsa boyası ile 30 dakika boyanıp, yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Preparatlar Olympus CX21 marka ışık mikroskopunda 1000 büyütmede, her preparattan rastgele 1000 adet PCE sayıldı. Bunların içerisinde MNPCE'lerin sayıları belirlenerek, yüzdeleri çıkartıldı.

2.2. İn-vitro çalışma

2.2.1. Materyal

*Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 24.11.2011/ 08 sayılı izni ile çalışma onayı alındı.

Bu çalışmada test maddesi olarak Akrilamid, Pelargonidin, Gallik Asit ve Mitomisin-C, materyal olarak da sigara içmeyen, rutin ilaç kullanmayan, yaşları birbirine yakın sağlıklı 10 erkek (22-25 yaş) ve 10 bayandan (22-25 yaş) alınan periferik kan kullanıldı.

2.2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

Akrilamid, Gallik Asit, Mitomisin C Sigma ve Pelargonidin Aldrich'ten temin edildi. Bu çalışmada pozitif kontrol maddesi olarak kullanılan, Mitomisin-C mavi-menekşe renkte, kristal şeklinde ve suda çözünebilen bir maddedir. MMC antineoplastik ve geniş spektrumlu bir sitostatik (hücre bölünmesini durduran) ajandır. Mitomisin-C 2 mg ve 10 mg'lık şişelerde toz şeklinde bulunmaktadır. Aşağıda belirtildiği gibi çözeltisi hazırlandı ve kültür ortamına 0.3 µg MMC/ml besi yeri dozda ilave edildi. Bu çözelti (pH=6-9), ışıktan korunduğu ve 5 °C altındaki buzdolabında saklandığı zaman yedi gün özelliğini koruyabildiği bildirilmektedir.

-Mitomisin C'den 0,3 mg tartılarak alındı distile suda çözdürülerek hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan hücre kültürüne 10 µl/ml besi yeri olacak şekilde ilave edildi (toplam 50 µl/ 5 ml besi yeri, 0.3 µg MMC/ml besi yeri).

- Akrilamid'in 0,200 mg/ml besi yeri dozu için: Akrilamidden 20 mg alındı ve üzeri distile suda çözdürülerek 1 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan hücre

kültürüne 10 µl/ml besi yeri olacak şekilde ilave edildi (toplam 50 µl/ 5 ml besi yeri, 0.2 mg/ml besi yeri).

Akrilamid'in 0,150 mg/ml besi yeri dozu için: Akrilamidden 15 mg alındı ve üzeri distile suda çözdürülerek 1 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan hücre kültürüne 10 µl/ml besi yeri olacak şekilde ilave edildi (toplam 50 µl/ 5 ml besi yeri, 0.150 mg/ml besi yeri).

Akrilamid'in 0,100 mg/ml besi yeri dozu için: Akrilamidden 10 mg alındı ve üzeri distile suda çözdürülerek 1 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan hücre kültürüne 10 µl/ml besi yeri olacak şekilde ilave edildi (toplam 50 µl/ 5 ml besi yeri, 0.100 mg/ml besi yeri).

Akrilamid'in 0,050 mg/ml besi yeri dozu için: Akrilamidden 5 mg alındı ve üzeri distile suda çözdürülerek 1 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan hücre kültürüne 10 µl/ml besi yeri olacak şekilde ilave edildi (toplam 50 µl/ 5 ml besi yeri, 0.05 mg/ml besi yeri).

-Pelergonidin'den 0,9 mg alındı ve çözdürülerek hacmi 12 ml'distile suya tamamlandı. Bu solüsyondan hücre kültürüne 10 µl/ml besi yeri olacak şekilde ilave edildi (toplam 50 µl/ 5 ml besi yeri, 0.000750 mg/ml besi yeri).

- Gallik asitten 15 mg alındı distile suda çözdürülerek hacmi 3 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan hücre kültürüne 10 µl/ml besi yeri olacak şekilde ilave edildi (toplam 50 µl/ 5 ml besi yeri, 0.05 mg/ml besi yeri).

Kolşisin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak kolşisin (Sigma Cat. No. C9754) kullanıldı. Kolşisin çözeltisi saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml besi yeri, toplam 0,3 µg/ 5 ml besi yeri) 5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir.

- Kolşisinden 0,3 mg alındı ve distile suda çözdürülerek hacmi 40 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan 8 µl/ml besi yeri hesabıyla kullanıldı (toplam 40 µl/5ml besi yeri, 0.06 µg/ml besi yeri, toplam 0,3 µg/ 5 ml besi yeri).

-Sitokalsin B solüsyonu: Sitokalsin B'den 3 mg alındı distile suda çözdürülerek hacmi 3 ml'ye tamamlandı (30 µg/30 µl distile su). Bu solüsyondan 30 µl/5ml besiyerine ilave edildi.

Kromozom Medyumu (Besi Yeri)

Bu çalışmada Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (Cat. no. F5023), hücre kültürü olarak kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki maddeler bulunmaktadır:

Non essential Amino Acids.....	850 ml
Fetal Calf Serum	150 ml
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin M.....	2.5 mg

Bu medyum her tüpe 5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak % 0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı bir cam kapta buzdolabında (+4 °C) saklandı. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar alınıp, 37 °C'deki inkübatörde ısıtılarak kullanıldı.

Fiksatif

KKD, KA ve MN için kullanılan fiksatif, 1 kısım glisial asetik asit'in 3 kısım metanol ile karıştırılması sonucu hazırlandı.

5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

BrdU Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) temin edildi. BrdU'dan 5 mg alınarak 10 ml Chromosome Medium B'de çözdürüldü (50 µg/100 µl medium). Bu solüsyondan SCE çalışmasında besi yerine 10 µg/ml gelecek şekilde ilave edildi (100 µl).

Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

KKD'ni incelemek amacıyla hazırlanan preparat Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırıldı. Sorensen tamponu % 10'luk Giemsa boyasının hazırlanmasında da kullanıldı. Bu tampon çözelti tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup, bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanıldı.

Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH₂PO₄ 250 ml saf su içinde çözdürülmüştür (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 gr Na₂HPO₄.12H₂O 250 ml saf su içinde çözdürülmüştür (pH=9.3).

Standart Saline Citrate (SSC) Çözeltisi

Bu eriyik ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC eriyiğini hazırlamak için 11.05 gr trisodyum sitrat (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O) ve 21.9 gr NaCl kullanıldı. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözdürüldü, daha sonra aynı kaba aktararak birbirleriyle karıştırıldı. Karışımın üzerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edildi. Hazırlanan bu stok eriyik 5xSSC'dir. Çözelti buzdolabında saklandı. Deneyde, bu stoktan 20 ml alıp, üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlandı (elde edilen 1x SSC kullanıldı).

Giems

Giems boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneyde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan % 10'luk ve % 5'lik çözeltileri preparatların boyanmasında kullanıldı.

Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, Cat. No. 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanıldı.

2.2.1.2. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları**Hassas Terazi**

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 gr hassasiyetindeki PRECİSA XB 220 A marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanıldı.

Santrifüj

Devir hızı 5000 rpm'e kadar yükselebilen, 15 dk. zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli ELEKTRO-MAG marka santrifüj çahşmalarda kullanıldı.

Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanıldı. Fotoğraflar yine Olympus marka mikroskopta dijital olarak çekilmiştir.

Etüv

Elektro-mag M 420 Bp marka, 0 °C - 100 °C ayarlanabilir etüv, deneyde hücre kültürünün yapımında ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye ısıtılmasında kullanıldı.

pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için Selecta marka pH metre kullanıldı.

Vorteks

Deney tüplerinin karıştırılması için Yellowline marka vorteks kullanıldı.

2.2.2. Metot

2.2.2.1. Kromozom Anormallikleri (KA, Chromosomal Aberration, CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı, sigara içmeyen ve rutin ilaç kullanmayan yaşları 22-25 olan 10 erkek ve 10 bayandan alınan periferik kan kullanıldı. Alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına (besi yeri, her tüpte 5 ml) steril şartlarda 12 damla miktarında ekildi. Hücre kültürü inkübatörde 37±1°C'de 72 saat inkübe edildi (bir tüp için, aşağıdaki deney grupları dikkate alınarak, toplam süre). Bu şekilde aşağıda belirtilen adette gruplar oluşturuldu.

Grup 1. Negatif kontrol grubu olarak tutuldu. Hazırlanan deney tüplerine distile su/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi. Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Grup A'ya bir şey ilave edilmezken, Grup B'ye distile su eklendi (10 µl/ml besi yeri, toplam 50 µl/5 ml besi yeri) . Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı. Grup A ve B (distile su) olarak hazırlandı.

Grup 2. Pozitif kontrol grubu olarak tutuldu. Hazırlanan deney tüplerine Mitomisin-C (MMC) 0,3 µg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde ilave edildi (50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) MMC eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 3. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,050 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 4. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,100 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 5. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,150 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 6. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,200 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 7. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,050 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) ve Pelargonidin 0,000750 mg/ml besi yeri olacak şekilde olacak şekilde sırasıyla ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid ve Pelargonidin eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 8. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,100 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) Pelargonidin 0,000750 mg/ml besi yeri olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid ve Pelargonidin eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 9. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,150 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) Pelargonidin 0,000750 mg/ml besi yeri olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid ve Pelargonidin eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 10. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,200 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) Pelargonidin 0,000750 mg/ml besi yeri olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid ve Pelargonidin eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 11. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,050 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) ve Gallik asitin 0,05 mg/ml besi yeri olacak şekilde olacak şekilde sırasıyla ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid ve Gallik asit eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 12. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,100 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) Gallik asitin 0,05 mg/ml besi yeri olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid ve Gallik asit eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 13. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,150 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) Gallik asitin 0,05 mg/ml besi yeri olacak şekilde olacak

şekilde ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid ve Gallik asit eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 14. Hazırlanan deney tüplerine Akrilamid 0,200 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) Gallik asitin 0,05 mg/ml besi yeri olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Akrilamid ve Gallik asit eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 15. Hazırlanan deney tüplerine Pelargonidin 0,000750 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Pelargonidin eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Grup 16. Hazırlanan deney tüplerine Gallik asitin 0,05 mg/ml besi yeri (12 damla kan+5 ml besi yeri) olacak şekilde olacak şekilde ilave edildi (herbirinden 50 µl/ 5 ml). Kültürün inkübasyon (72 saat) süresinin dolmasına 24 ve 48 saat kala (yani sırasıyla inkübasyona konduktan 48. saat ve 24 saat sonra ilave edildi) Gallik asit eklendi. Biri 24, diğeri 48 saat kala olmak üzere iki adet deney tüpü için hazırlandı.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden 40 µl (0.06 µg kolşisin/ml besi yeri) ilave edildi (8 µl/ml besi yeri, 40 µl/5 ml besi yeri) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırıldı. Hücreler 2 saat süresince (37 °C'de) kolşisin ile muameleye tabi tutuldu. Kültür süresi sonunda (72. saat) kültür tüpleri, 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra üzerine etüvde 37 °C'de tutulan hipotonik eriyikten her tüpe 5 ml ilave edildi. Hipotonik çözelti damla damla ve karıştırılarak ilave edildi. Hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır. Tüplerin ağzı kapatılarak ağzı etüve kondu. Hücreler 30 dk. hipotonik eriyikte 37 °C'de etüvde

bekletildi. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edilerek, süpernatant kısımları atıldı. Her tüpe hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edildi. Tüpler oda sıcaklığında 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı, sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edildi. Bu işlem 3 kere tekrarlandı. Tekrarlanan bu işlemde (3. fiksatif) sonra tüpte kalan sıvı tamamen berraklaşmaktadır. Son santrifüjden sonra süpernatant tüpün dibinde 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde atıldı. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojenize edildi. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekildi. Pasteur pipetinden sıvı lamın üzerine 50 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere damlatıldı (her lama 3 damla). Bu şekilde hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edildi. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletildi (68, 69).

Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Oda sıcaklığında kuruyan preparatlar, 15 dk. önce hazırlanan % 10'luk Giemsa boya çözeltisi ile boyandı. % 10'luk Giemsa Çözeltisinin Hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 10 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlandı (pH=6.72). Hazırlanan bu çözelti dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzüldü. Kuru preparatlar direkt olarak boya içerisine kondu ve yaklaşık olarak 10 dk. beklendi. Boyadan çıkarılan preparatlar, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskop altında incelendi.

Mikroskobik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar binoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelendi (10x100=1000 büyütmede). İyi dağılmış kromozomlara sahip preparatlardan, 100 tane metafaz sayılarak, kromozom, kromatid kırığı, kromatid birleşmesi, fragment vb. gibi olguları saptamak amacıyla incelendi. Bu hücreler

içinde anormallikler kaydedildi. İncelenen 100 hücre içerisinde anormal hücrelerin sayısı ve yüzdeleri hesaplandı. Gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirildi ve adlandırıldı (119).

Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Akrilamidin mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak için mitotik indeks bulundu. Gallik asit ve pelargonidinin mitotik indeks üzerine etkileri değerlendirildi. Her gruba ait preparatlardan toplam 3 bin hücre incelendi ve bunlar arasındaki metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedildi. 3 bin hücre içerisinde metafazların oranı yüzde olarak hesaplanarak mitotik indeks saptandı.

2.2.2.2. Mikronükleus Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

İn vitro mikronükleus testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır (129). Mikronükleusun oluşumunu saptamak için alınan kanlar 2.2.2.1'de belirtildiği gibi gruplara ayrıldı Kültüre kan damlatıldı ve 37 °C'da 72 saat inkübasyona bırakıldı. Hücre kültürlerinde iki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için inkübasyon süresinin bitimine 24 saat kala bütün tüplere 6 µg/ml (besi yeri) olacak şekilde sitokalsin B (Cytochalasin B, Sigma cat. no. C6762) ilave edildi (30 µl/5 ml besi yeri). Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi, süpernatant kısmı atıldı. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edildi. Hipotonik çözelti damla damla ve karıştırarak her tüpe 5 ml eklendi. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır. Tüplerin ağzı kapatıldı ve inkübatöre konuldu. İnkübatörde 20 dk. 37 °C'de bekletildi. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 1200 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant kısmı atıldı. Her tüpe hipotonik eriyikte olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırarak 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edildi. Fiksatif 1 kısım asetik asit 3 kısım metil alkol karışımı ile hazırlandı. Fiksatif

ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Fiksatif ilave ve santrifüj işlemi 3 kere tekrarlandı. Bu işlemten sonra (3 kez fiksatifle muamelenin sonunda) tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekmektedir. Her fiksatif ilavesinden sonra santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra tüpün dibinde 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldı. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekildi. Daha önce temizlenmiş lamın üzerine farklı alanlara 1'er damla damlatıldı (her lama 4-5 damla ve yüksekte). Hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlandı. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edildi. Hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi.

Preparatların Boyanması

Preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanan % 10'luk giemsa boyası ile boyandı. Kuru preparatlar direkt olarak boya içerisine kondu ve yaklaşık olarak 10 dk. beklendi. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskop altında incelendi.

Mikroskobik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar binoküler ışık mikroskobunda 40'lık objektif ile incelendi (10x40=400 büyütmede). Her bir örnekten hazırlanan preparatlardan 1000 adet iki nukleuslu hücre sayıldı. Sayılan iki nukleuslu hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptandı. Mikronukleuslu iki nukleuslu hücrelerin yüzdeleri bulundu.

2.2.2.3. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (sister chromatid differentiation=SCD) sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır (149). KKD saptamak için alınan kanlar 2.2.2.1'de belirtildiği gibi gruplara ayrıldı Aynı şekilde sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın on erkek ve on bayandan alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına (5 ml) steril şartlarda 12 damla eklendi. Yine steril şartlarda ve daha önce hazırlanan BrdU eriyiğinden her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde (hazırlanan BrdU solüsyonundan 100 µl) ilave edilerek iyice karıştırıldı (50 µg BrdU/100 µl besi yeri) ve hücre kültürü inkübatörde 37 °C'de 72 saat için inkübe edildi.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edildi (0.06 µg/ml) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırıldı. Hücreler 2 saat süresince (37 °C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37 °C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edildi. Bu eriyik tüpe damla damla ve karıştırılarak yapıldı. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra ağızları kapatılarak etüve konuldu. Hipotonik ilave edilmiş tüpler 30 dk.37 °C'de etüvde bekletildi. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüplere hipotonik eriyik ilavesindeki gibi yavaş yavaş ve karıştırarak, her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edildi. Fiksatif ile muamele edilen hücreler 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Fiksatif ilavesi ve peşisıra yapılan santrifüj işlemi 3 kere tekrarlandı. İşlem sonrası tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldı. Tüpte kalan sıvıdan preparat hazırlandı. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Pasteur pipetine 4-5 damla bu hücre süspansiyonundan çekildi. Pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş lamaların üzerine 50 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla damlatıldı (her lama 3-4 damla). Hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde bu şekilde yayılmaları sağlandı. Hücre

süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edildi. Preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi.

Preparatların Boyanması

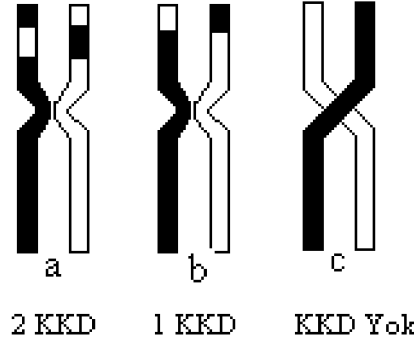
Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (sister chromatid differentiation=SCD) sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metot modifiye edilerek kullanıldı (149). Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtülecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatıldı. Işınlama eriyiği, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı (pH=6.8). Işınlama çözeltisinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Bu nedenle preparatların üzeri ince bir tabaka halinde ışınlama çözeltisi ile örtülmüştür. Örtülmüş preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk. ışınlandı. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58-60 °C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk. inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce % 5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlandı. % 5'lik Giemsa boyası, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa'nın karıştırılarak üzeri 85 ml saf su ile tamamlandı (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıdından süzüldü. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC solüsyonundan alınarak direkt olarak boya içerisine kondu ve yaklaşık olarak 20 dk. beklendi (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürede sağlanmıştır). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarıldı, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlar mikroskop altında incelendi.

KKD ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması

KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 100 metefazda saptandı. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış

kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlendi (164). Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirildi, eğer uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayıldı. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekmektedir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1: Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (164).

Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması

Akrilamid, Pelargonidin ve Gallik Asitin DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile RI hesaplanmıştır. Bunun için tesadüfen seçilmiş 100 hücre incelendi. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayıldı. Bu verilerden yola çıkarak RI aşağıdaki formülle hesaplandı.

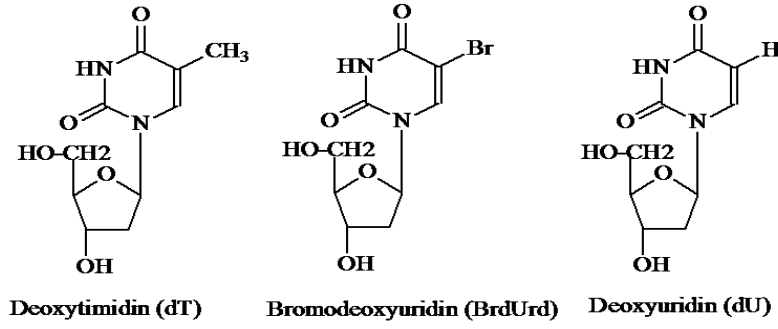
$$RI = (1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3) / 100$$

M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı

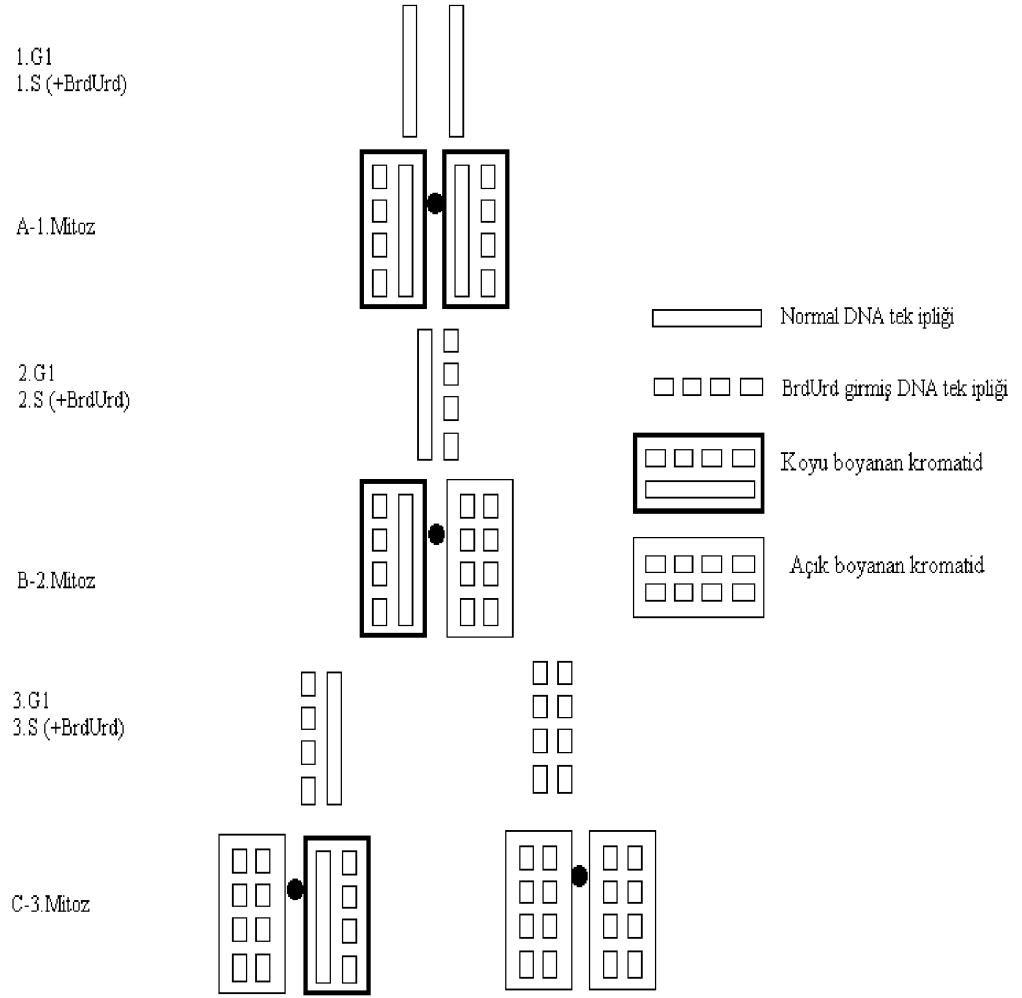
Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir (164): BrdU, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analoğu olan bileşiklerdir. BrdU, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları benzen halkasındaki 5.C atomuna dT'de CH₃, BrdU'de Br ve dU'da H atomunun bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.



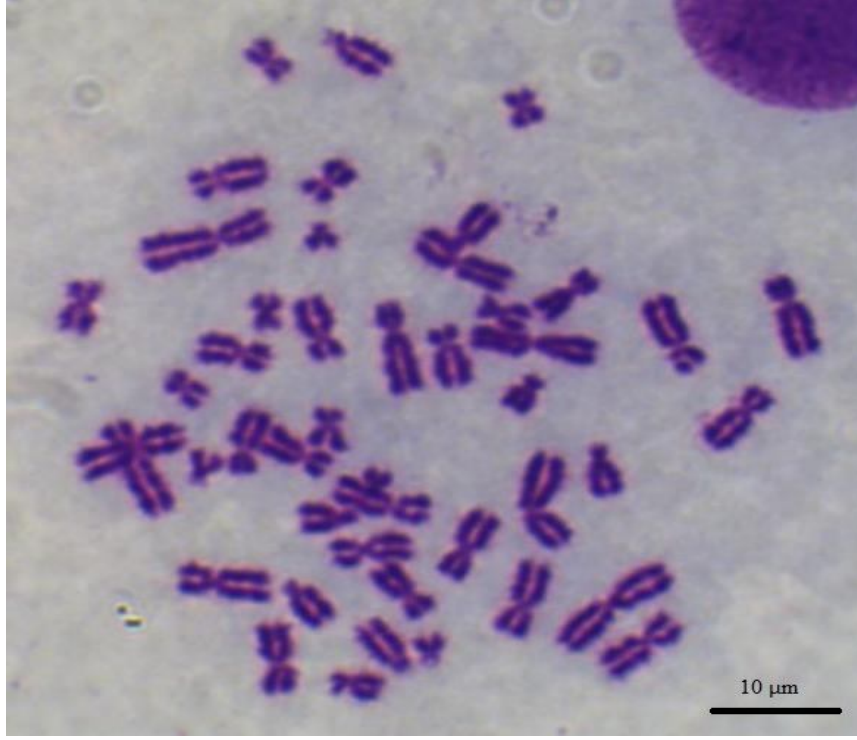
Şekil 2.2: Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdU) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.

Kültür ortamına BrdU koyulduğunda, hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen DNA dallarından birinin (polinükleotid ipliği) içine dT'in yerine BrdU geçmektedir. Böyle hücreler 1. Mitoza uğradıklarında meydana gelen yeni hücrelere ait kromozomların her iki kromatidinde koyu renkte boyanmaktadır. Bu hücreler S (2. S fazı) fazına girdiğinde DNA ipliğinin birisi BrdU diğeri dT taşıdığından, DNA replike olduğunda tekrar ortamda bulunan BrdU'yu yapılarına almaktadırlar. Bu hücreler 2. Mitoza uğradıklarında yavru hücrelerin kromozomlarının kromatidlerinden biri koyu boyanırken diğeri açık boyanmaktadır. Çünkü, kromatidlerden koyu boyananda DNA ipliğinin biri dT taşıırken, diğeri BrdU taşımaktadır. Diğerkromatidi oluşturan DNA ipliğinin ikisi de BrdU taşımaktadır (açık boyanan). Böyle yavru hücreler tekrar BrdU bulunan ortamda S fazına (3. S fazı) girdiklerinde ortamdaki BrdU'yu yapılarına alırlar. Bu hücrelerin kromzomlarından birini oluşturan DNA ipliğinden biri BrdU'yu, diğeri dT'uyu taşıdığından 3. mitoz girdiğinde yavru hücrelerin kromatidlerinden biri koyu diğeri açık boyanmaktadır. Açık boyanan kromatidleri taşıyan hücreler ise 3. Mitoza uğradıklarında kromatidleri oluşturan DNA ipliklerinin her ikisi de BrdU taşıdığından yeni yavru hücrelerin kromozomlarını oluşturan kromatidlerin her ikisi de açık boyanmaktadır. Bu nedenle yeni yavru hücrelerin (3. Mitoz sonucu oluşan) bazılarının her iki kromatidi açık boyanırken, bazılarının kromatidlerinden biri açık diğeri koyu boyanmaktadır. Özetleyecek olursak, BrdU'lu ortamda bulunan hücrelerin kromozomlarını oluşturan kromatidlerin her ikisi, birinci mitoz sonucu

oluşan yavru hücrelerde koyu boyanır. İkinci mitoz sonucu oluşan yavru hücrelerde kromatidlerin biri koyu diğeri açık boyanır. Üçüncü mitoz sonucu oluşan hücrelerde ise hücrelerin bir kısmında kromatidlerin biri açık, diğeri koyu boyanırken, diğeri bir kısmında ise kromatidlerin ikisi de açık boyanmaktadır. Şekil 2.3'de şematik olarak gösterilmiştir. Bu boyanma şeklinde hücrelerin kaçınıcı mitozda olduğu anlaşılabilir. İşte böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğeri kromatidi de koyu renkte boyanmaktadır. Bu hücrelerde 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Metafaz esnasında bulunan 100 hücre incelenerek kaçınıcı mitoz evresinde oldukları belirlendi. Bu sonuca göre formülle replikasyon indeksi (RI) hesaplandı.



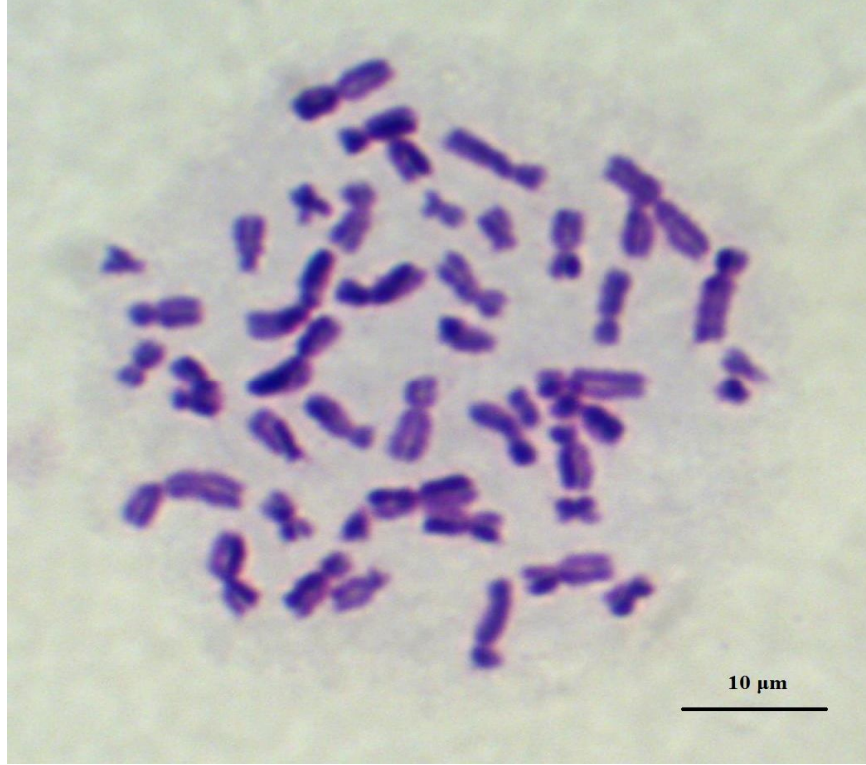
Şekil 2.3: BrdU’ın DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (164).



Resim 2.1: Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.



Resim 2.2: İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.



Resim 2.3: Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.

Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoraflar Olympus marka mikroskopla 1000 büyütmede çekildi. Daha önce 1., 2., ve 3. mitozu geçiren hücrelerin kromozomlarının, bazı ilginç KA'larına ait örneklerin, iki nukleuslu hücrelerden mikronukleusa sahip olanların ve bir, iki, üç ve dört nukleuslu hücrelerin birkaç örneğinin fotoğrafları çekildi.

2.2.2.4. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Tüm istatistiksel analizler Windows 95 GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego California USA) kullanılarak yapılmıştır. Kimyasallarla muameleli gruplar ve negatif kontroller arasında farklılığın tesbiti için Dunnett t testi kullanılmıştır. Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapıldı, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulundu ve regresyon doğrusu çizildi.

3. BULGULAR

3.1. İn vivo grubu

3.1.1.Kontrol ve deney gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyon üzerindeki etkileri

Farelere intraperitoneal yolla Akrilamid (AA), Pelargonidin (PG), Gallik asit (GA) ve (MMC) enjeksiyon yapıldıktan sonra, her doz grubundan elde edilen preparatlardan metafaz safhasında olan toplam 100 hücre 24 saatlik etki süresi için, 100 hücrede 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Bu 100 hücre içerisinde gözlemlenen yapısal kromozom sayıları belirlenerek Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Akrilamidin uygulanan dozları (25-50-100-150 mg/kg), 24-48 saatlik muamele süresinde kromozomal aberasyon yüzdesini negatif kontrole göre artırdığı tespit edildi. Bu artışın pozitif kontrol grubundaki sayı kadar olmadığı gözlemlendi. Gözlenen yapısal kromozom anormallikleri kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, disentrik kromozom ve kardeş kromatid birleşimi şeklinde olduğu tespit edildi. Yapısal kromozom anormallikleri akrilamidin doz artışına bağlı olarak arttığı görüldü.

Farelere uygulanan pelargonidin ve gallik asitin 24-48 saatlik muamele süresinde, negatif ve pozitif kontrolle kıyaslandığında yapısal kromozom anormalliklerine neden olmadığı, diğer bir deyişle herhangi bir genotoksisitelerinin bulunmadığı saptandı.

Akrilamid ile birlikte uygulanan pelargonidin kromozomal aberasyon yüzdesini düşürmediği gözlemlendi. Fakat akrilamid ile birlikte uygulanan gallik asit 24-48 saatlik etki süresince, kromozomal aberasyon yüzdesini düşürdüğü tesbit edildi.

Kromozomal anomaliler Resim 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 ve 3.6’da görülmektedir.

Tablo 3. 1: Kontrol ve Deney Gruplarında 24-48 Saat Sonra Fare Kemik İliği Hücrelerinde Rastlanan Kromozom Anormallik Çeşitleri (sayılan 100 hücrede) ve Yüzde Toplamları

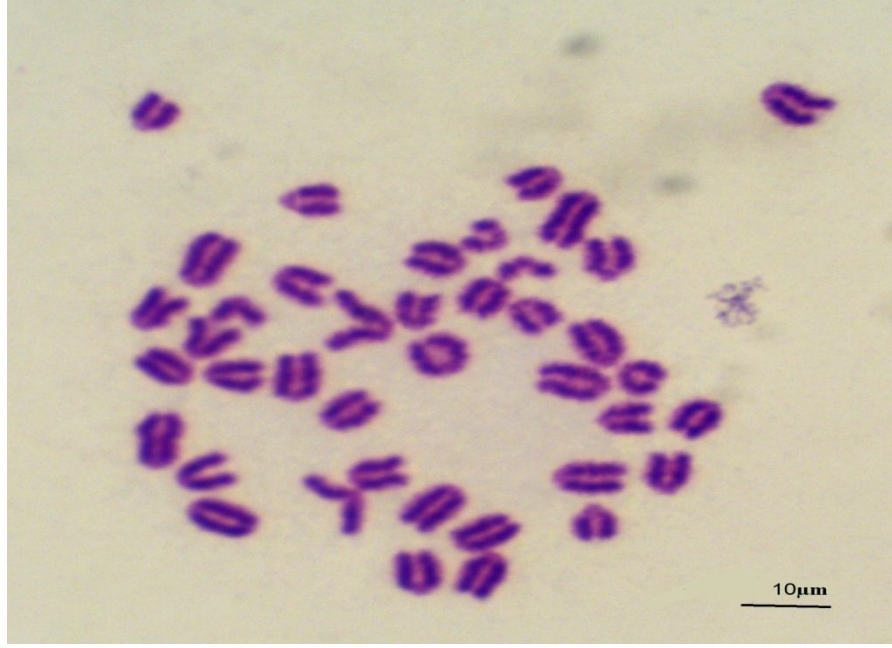
Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Muamele Dozu (mg/kg)	KK	Kk	F	DSK	KKB	Toplam (%)	Toplam KA (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif A			-	-	1	-	2	3	3	3,07±0,04
Negatif B	24	-	-	-	-	-	-	-	1	1,01±0,00
	48	-	-	1	1	-	-	2		
MMC	24	2	6	10	6	8	28	58	68,5	68,4±0,14
	48	2	12	17	9	10	31	79		
AA	24	25	2	1	1	1	6	11	17	16,95±0,06*
	48	25	4	4	3	2	10	23		
	24	50	3	2	2	3	7	17	28,5	28,52±0,06*
	48	50	5	7	4	6	18	40		
	24	100	3	4	2	4	8	21	32,5	32,65±0,13*
	48	100	4	9	9	7	16	44		
	24	150	5	10	3	7	7	32	49,5	49,57±0,04*
	48	150	7	10	7	18	25	67		
AA+PG	24	25AA+3PG	2	2	1	1	6	12	18	18±0,40*
	48	25 AA+3PG	4	5	2	2	11	24		
	24	50AA +3PG	2	1	3	5	7	18	31	31,25±0,47*
	48	50 AA+3PG	6	7	5	7	19	44		
	24	100 AA+3PG	3	3	3	5	8	22	34,5	34,17±0,11*
	48	100 AA+3PG	8	9	7	8	15	47		
	24	150 AA+3PG	5	6	5	6	10	32	49	48,25±0,47*
48	150 AA+3PG	8	6	13	9	30	66			
AA+GA	24	25 AA+100GA	2	1	-	-	3	6	5,5	5,4±0,04*
	48	25 AA+100GA	1	1	-	-	3	5		
	24	50 AA+100GA	1	1	1	1	3	7	13,5	13,57±0,04*
	48	50 AA+100GA	2	1	1	4	12	20		
	24	100 AA+100GA	2	1	1	2	3	9	16,5	16,5±0,07*
	48	100 AA+100GA	5	3	3	3	10	24		
	24	150 AA+100GA	2	2	1	6	10	21	25,5	25,32±0,08*
48	150 AA+100GA	2	1	2	3	22	30			
PG	24	3	-	-	-	-	-	-	0,5	0,82±0,16
	48	3	-	-	-	-	1	1		
GA	24	100	-	-	-	-	-	-	0,5	0,42±0,04
	48	100	-	-	-	-	-	1		

KK: Kromozom kırığı, Kk:Kromatid kırığı

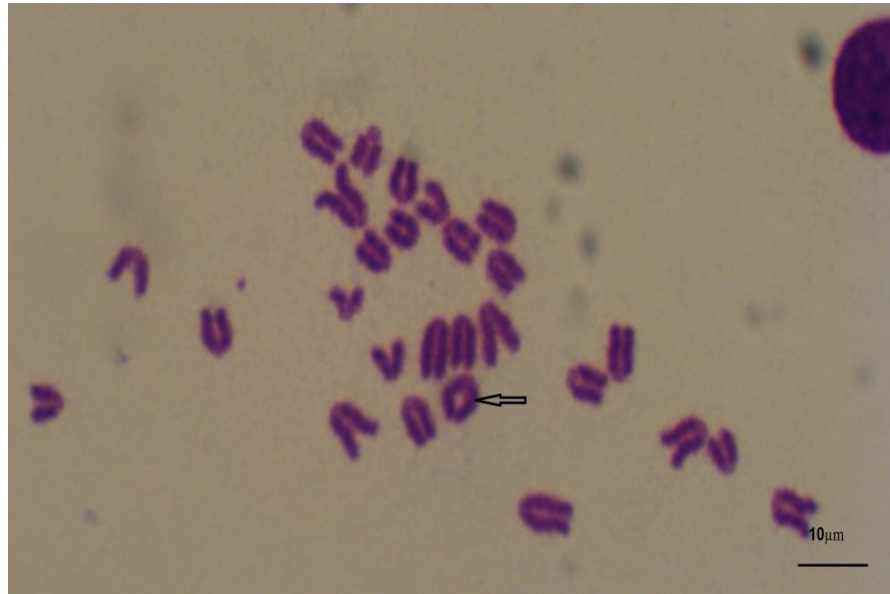
F: Fragment, DSK: disetrik kromozom

KKB: kardeş kromatid birleşmesi

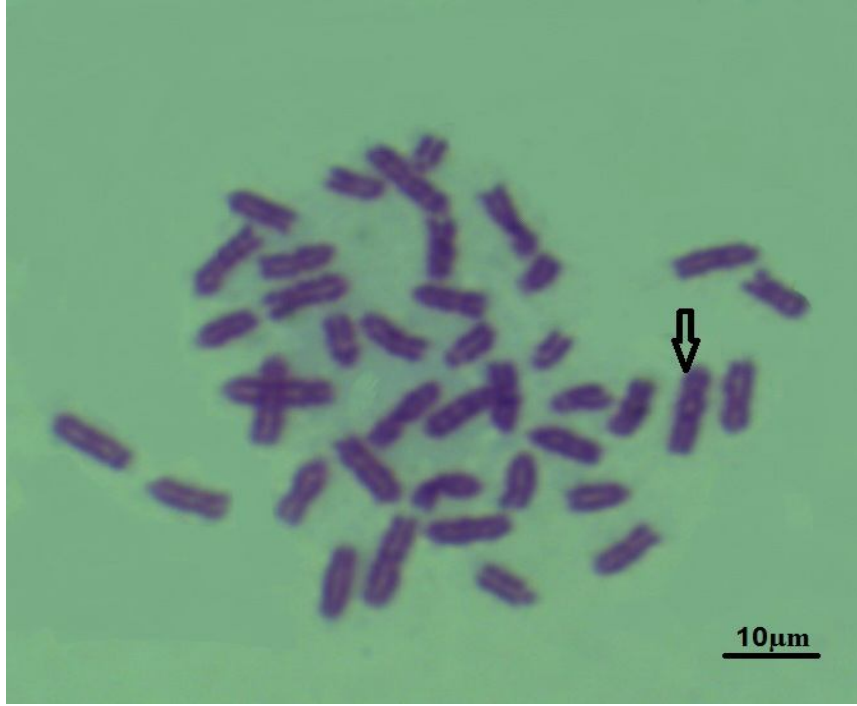
* : p< 0.01 kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.



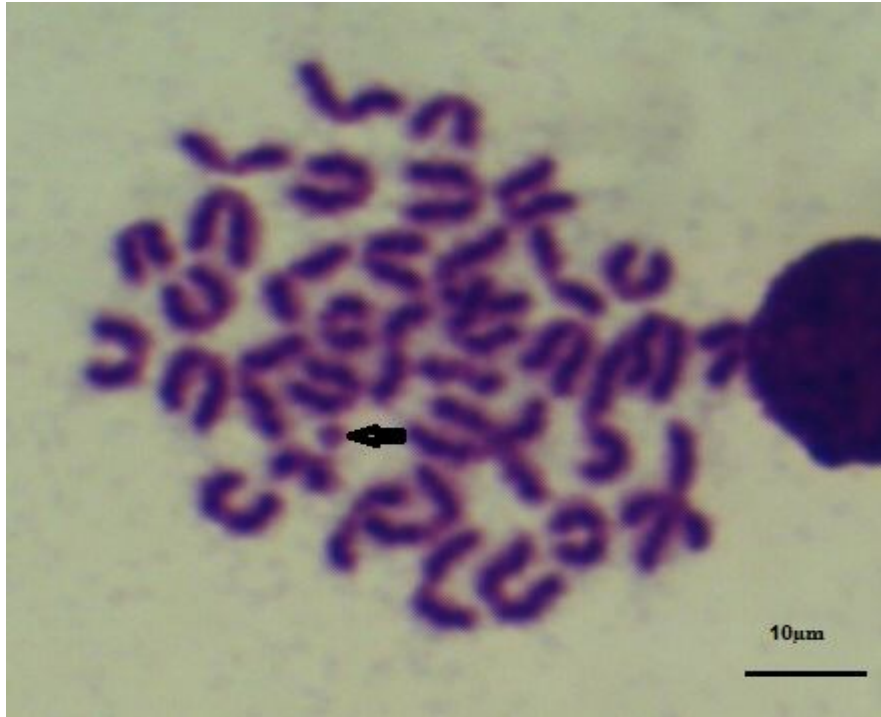
Resim 3.1: Fareye ait normal metafaz örneği (n=40)(x1000)



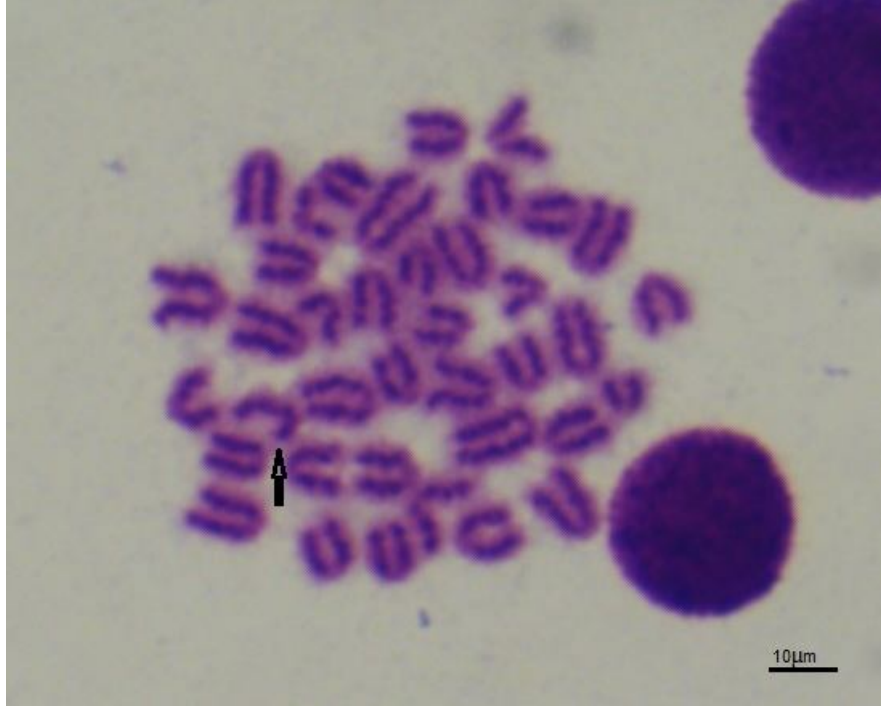
Resim 3.2: Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatid birleşmesi (x1000)



Resim 3.3: Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde disentrik kromozom (x1000).



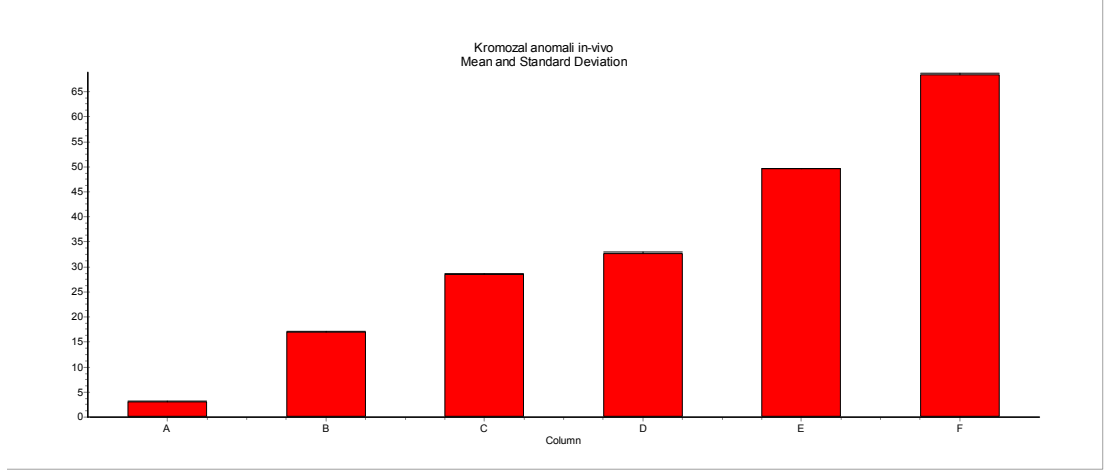
Resim 3.4: Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde kromozom kırığı (x1000).



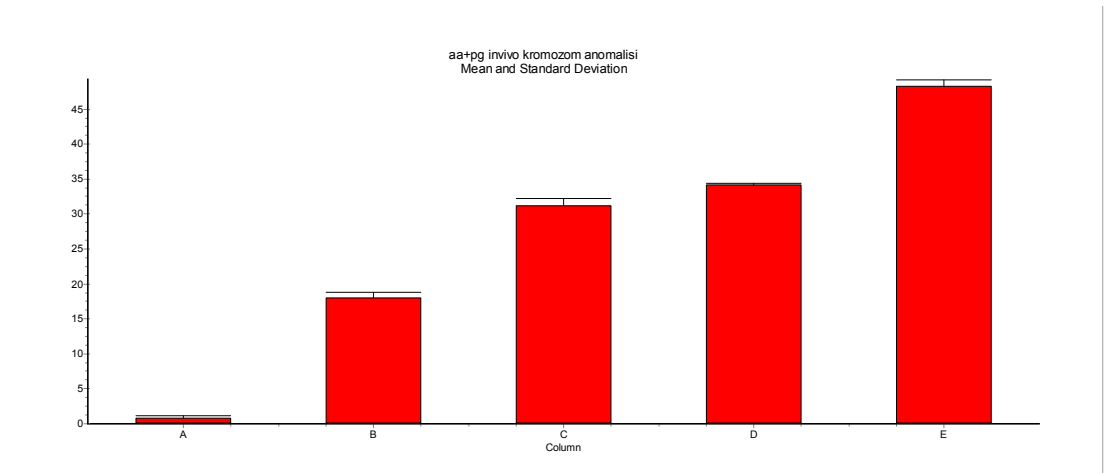
Resim 3.5: Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde kromatid kırığı (x1000).



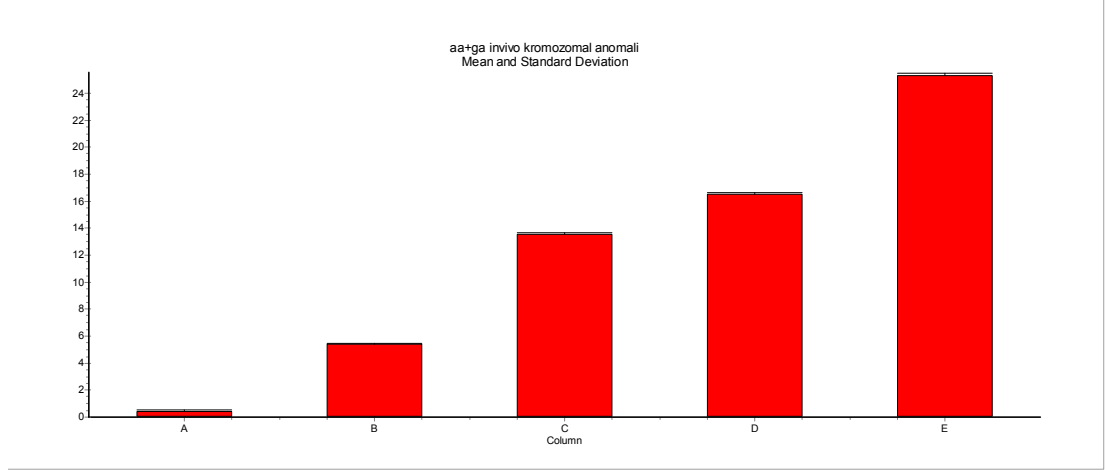
Resim 3.6: Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde fragment (x1000)



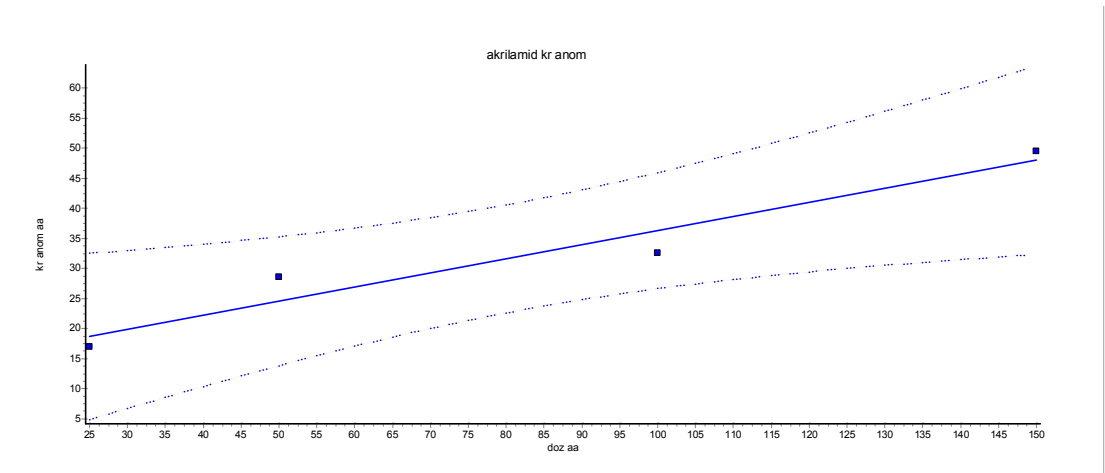
Şekil: 3.1: Akrilamidin değişik dozları (25-50-100-150 mg/kg) ve kontrol gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde, kromozom aberasyon oranları (A: N.Kontrol, B: 25AA, C: 50AA, D: 100AA, E: 150AA, F: MMC)



Şekil: 3.2: AA+ PG ve PG grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, kromozom aberasyon oranları (A: Pelargonidin, B: 25AA+P, C: 50AA+P, D: 100AA+P, E: 150AA+P)



Şekil: 3.3: AA+GA ve GA grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, kromozom aberasyon oranları (A: Gallik Asit, B: 25AA+GA, C:50AA+GA, D:100AA+GA, E: 150AA+GA)



Şekil: 3.4: Akrilamidin farklı konsantrasyonları ile kromozomal aberasyon arasındaki regresyon ($r= 0,96$) çizelgesi

3.1.2. Kontrol ve Deney Gruplarının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik Aktivite Oranları

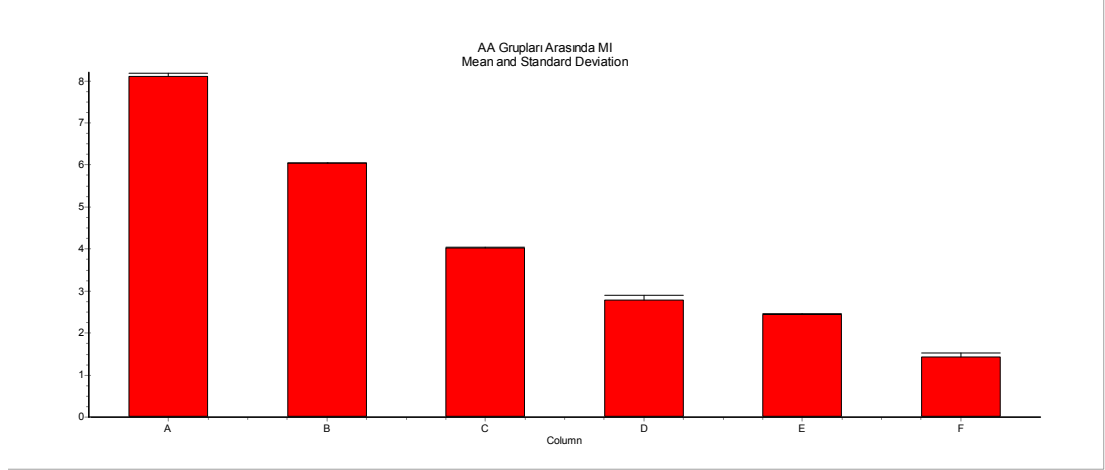
Farelere intraperitoneal yolla AA, PG, GA ve MMC enjeksiyon yapıldıktan sonra, her doz grubundan elde edilen preparatlardan rasgele toplam 1000 hücre 24 saatlik etki süresi için, 1000 hücre de 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Bu 1000

hücre içerisinde gözlemlenen metafaz sayıları belirlenerek Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

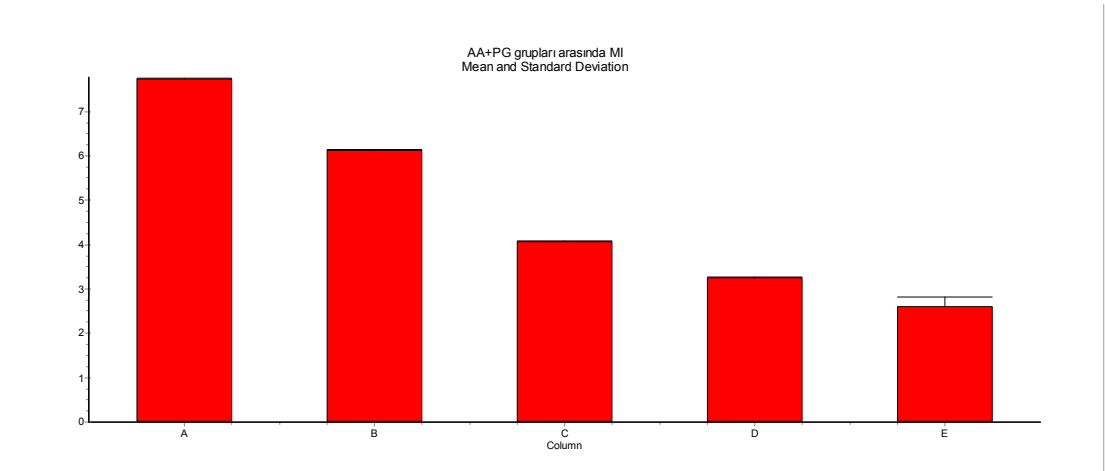
Tablo 3.2: Kontrol ve Deney Gruplarında 24-48 Saat Sonra Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik Aktivite Oranları

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Top.Hüc	Metafaz hücre sayısı	Metafaz hüç. oranı ortalaması (%)	Toplam Metafaz oranı (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif Kontrol A	24	1000	80	8	8,1	8,1±0,04
	48	1000	82	8,2		
Negatif Kontrol B	24	1000	83	8,3	8,4	8,37±0,08
	48	1000	85	8,5		
P.Kontrol (MMC) 2mg/kg	24	1000	16	1,6	1,5	1,42±0,04
	48	1000	14	1,4		
PG 3mg/kg	24	1000	78	7,8	7,75	7,73±0,01
	48	1000	77	7,7		
GA 100mg/kg	24	1000	77	7,7	7,65	7,64±0,00
	48	1000	76	7,6		
25mg/kg AA	24	1000	60	6	6,05	6,04±0,00*
	48	1000	61	6,1		
50mg/kgAA	24	1000	40	4	4,05	4,02±0,01*
	48	1000	41	4,1		
100mg/kgAA	24	1000	30	3	2,9	2,77±0,06*
	48	1000	28	2,8		
150mg/kgAA	24	1000	26	2,6	2,45	2,44±0,00*
	48	1000	23	2,3		
25mg/kg AA+3mg/kgPG	24	1000	61	6,1	6,15	6,13±0,00*
	48	1000	62	6,2		
50mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	41	4,1	4,05	4,07±0,00*
	48	1000	40	4		
100mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	33	3,3	3,25	3,25±0,00*
	48	1000	32	3,2		
150mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	23	2,3	2,4	2,6±0,10*
	48	1000	25	2,5		
25mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	72	7,2	7,15	7,12±0,00*
	48	1000	71	7,1		
50mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	52	5,2	5,25	5,23±0,01*
	48	1000	53	5,3		
100mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	42	4,2	4,5	4,3±0,09*
	48	1000	48	4,8		
150mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	36	3,6	3,55	3,52±0,01*
	48	1000	35	3,5		

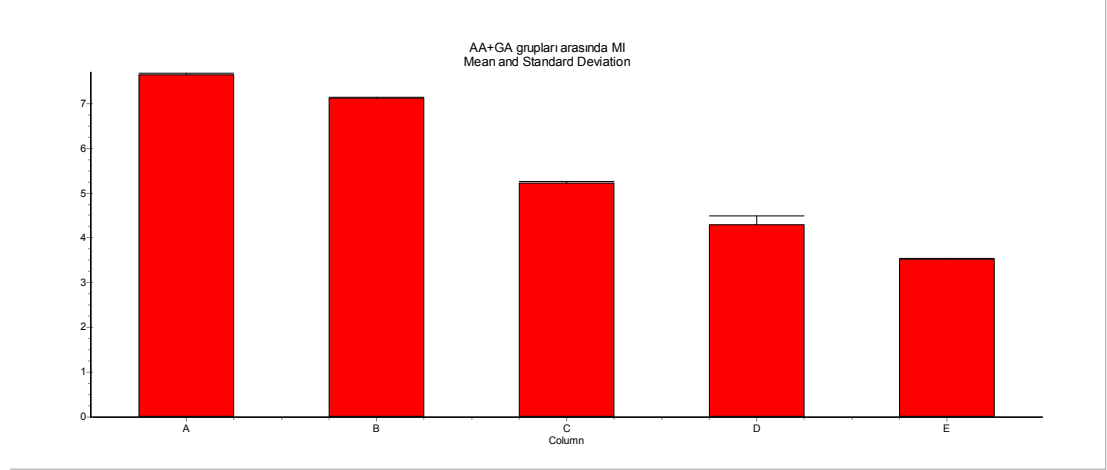
* $p < 0.01$ kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.



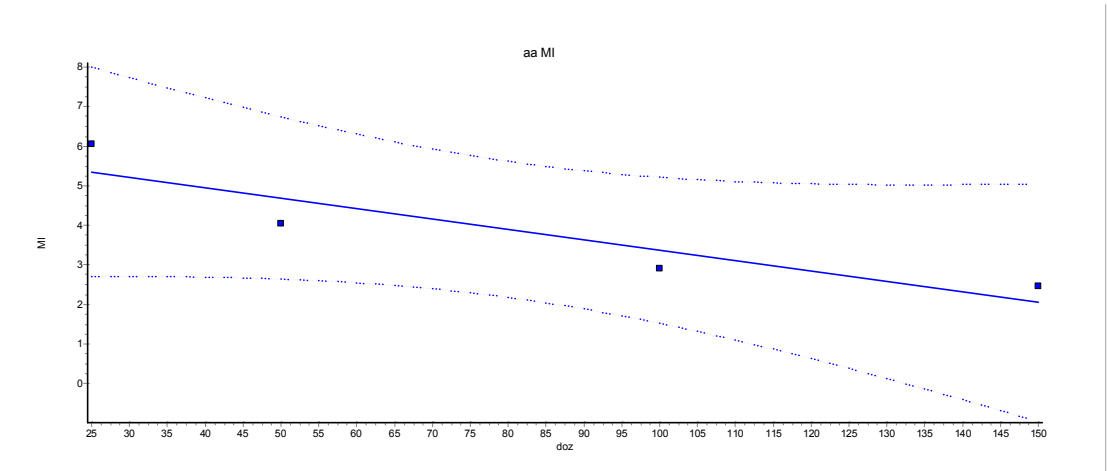
Şekil: 3.5: Akrilamidin değişik dozları (25-50-100-150 mg/kg) ve kontrol gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde, mitotik indeks oranları (A:N.Kontrol, B:25AA, C:50AA, D: 100AA, E: 150AA, F:MMC)



Şekil: 3.6: AA+ PG ve PG grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mitotik indeks oranları (A: Pelargonidin, B:25AA+PG, C:50AA+PG, D:100AA+PG, E:150AA+PG)



Şekil: 3.7: AA+GA ve GA grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mitotik indeks oranları (A: Gallik Asit, B:25AA+GA, C:50AA+GA, D:100AA+GA, E:150AA+GA)



Şekil: 3.8: Akrilamidin farklı konsantrasyonları ile mitotik indeks arasındaki regresyon ($r = -0,91$) çizelgesi

3.1.3. Kontrol ve deney gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus sıklığı üzerindeki etkileri

Farelere intraperitoneal yolla AA, PG, GA ve MMC enjeksiyon yapıldıktan sonra, her doz grubundan elde edilen preparatlardan rastgele toplam 1000 PCE (polikromatik eritrosit) 24 saatlik etki süresi için, 1000 PCE (polikromatik eritrosit) 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Bu 1000 PCE içerisinde gözlemlenen MNPCE sayıları tespit edilerek Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

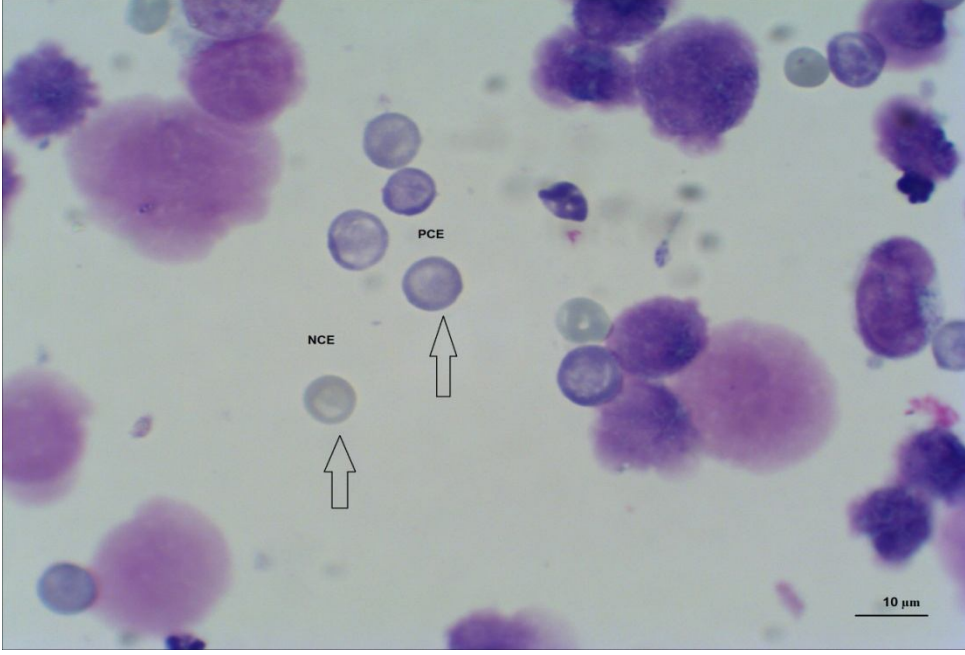
Tablo 3.3: Kontrol ve Deney Gruplarının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığı

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE oranı %	Toplam MNPCE oranı (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif kontrol A	24	1000	30	3	3	3,2±0,10
	48	1000	30	3		
Negatif Kontrol B	24	1000	34	3,4	3,3	3,45±0,06
	48	1000	32	3,2		
P.Kontrol (MMC) 2mg/kg	24	1000	251	25,1	26,1	26,47±0,13
	48	1000	271	27,1		
PG 3mg/kg	24	1000	32	3,2	3,2	3,45±0,11
	48	1000	32	3,2		
GA 100mg/kg	24	1000	31	3,1	3,1	3,27±0,08
	48	1000	31	3,1		
25mg/kg AA	24	1000	40	4	4	4,25±0,10*
	48	1000	40	4		
50mg/kgAA	24	1000	58	5,8	5,9	5,67±0,08*
	48	1000	60	6		
100mg/kgAA	24	1000	100	10	10,05	10,06±0,00*
	48	1000	101	10,1		
150mg/kgAA	24	1000	178	17,8	17,75	17,76±0,00*
	48	1000	177	17,7		
25mg/kg AA+3mg/kgPG	24	1000	40	4	4,05	4,06±0,00*
	48	1000	41	4,1		
50mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	59	5,9	5,8	5,67±0,19*
	48	1000	57	5,7		
100mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	102	10,2	10,1	10,35±0,11*
	48	1000	100	10		
150mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	175	17,5	17,5	17,67±0,08*
	48	1000	175	17,5		
25mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	38	3,8	3,8	3,65±0,18
	48	1000	38	3,8		
50mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	42	4,2	4,15	4,16±0,00*
	48	1000	41	4,1		
100mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	95	9,5	9,45	9,50±0,02*
	48	1000	94	9,4		
150mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	160	16	16,2	16,37±0,08*
	48	1000	164	16,4		

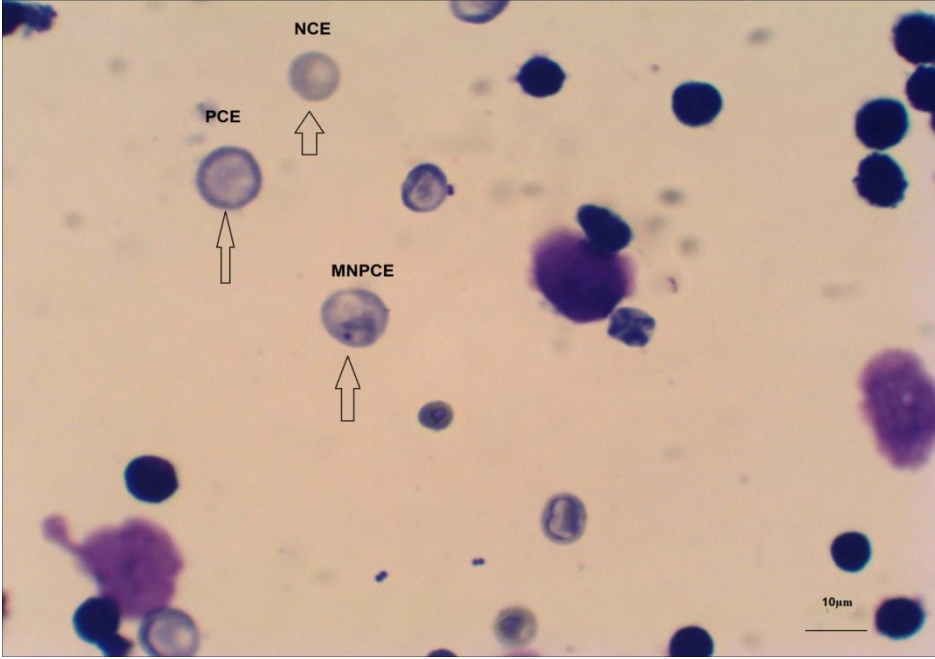
PCE: Polikromatik eritrosit, MNPCE: Mikronükleuslu polikromatik eritrosit

* :p< 0.01 kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.

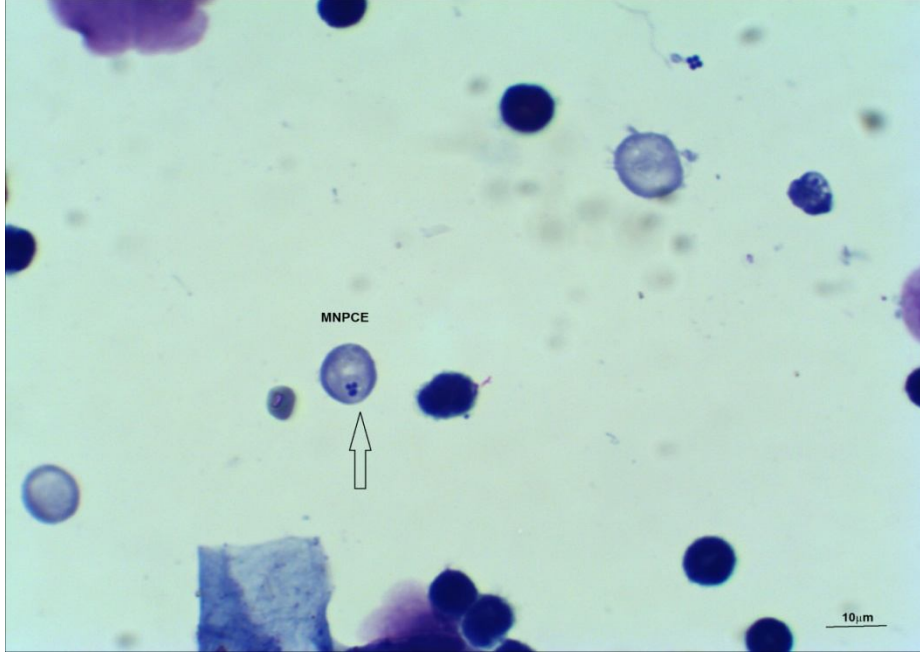
Aşağıdaki resimlerde PCE, NCE ve MNPCE'ler gösterilmiştir (Resim 3.7, 3.8 ve 3.9).



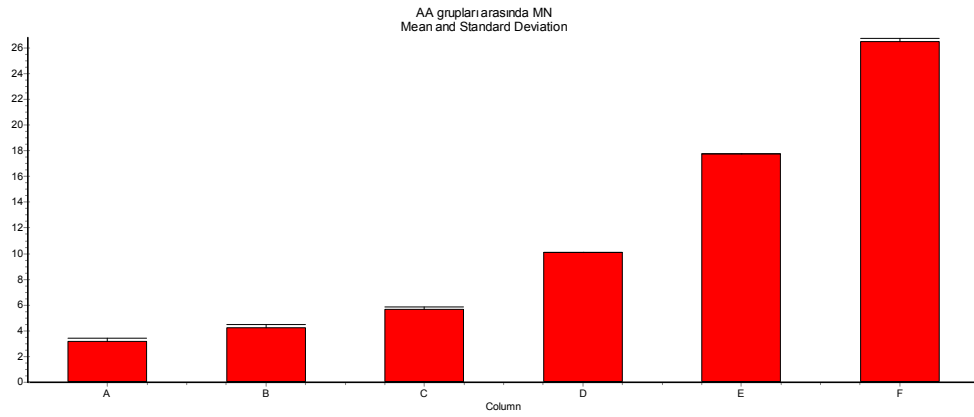
Resim 3.7: Muamele görmemiş fare kemik iliginde mikronükleuslu olmayan PCE ve NCE'ler (x1000)



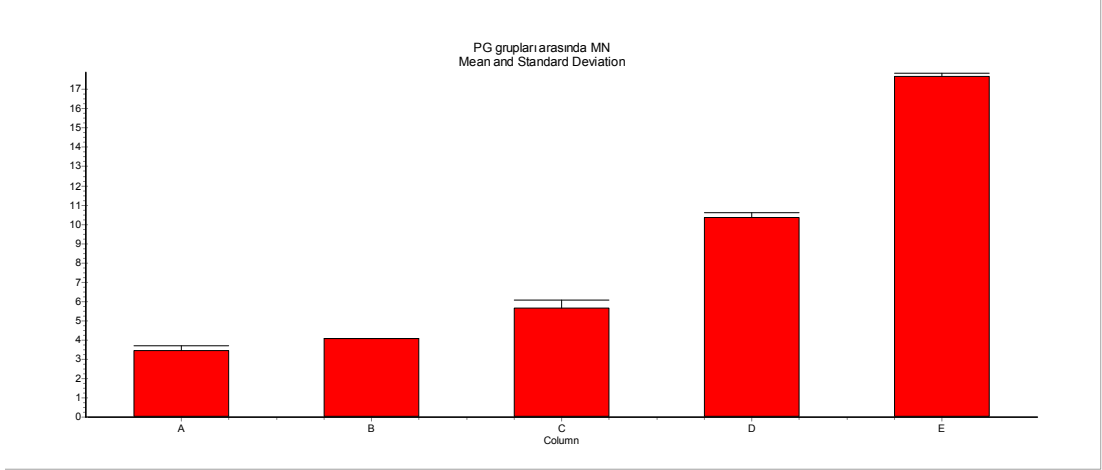
Resim 3.8: Deney grubu farelerin kemik iliginde MNPCE ve normal PCE ve NCE'ler (x1000)



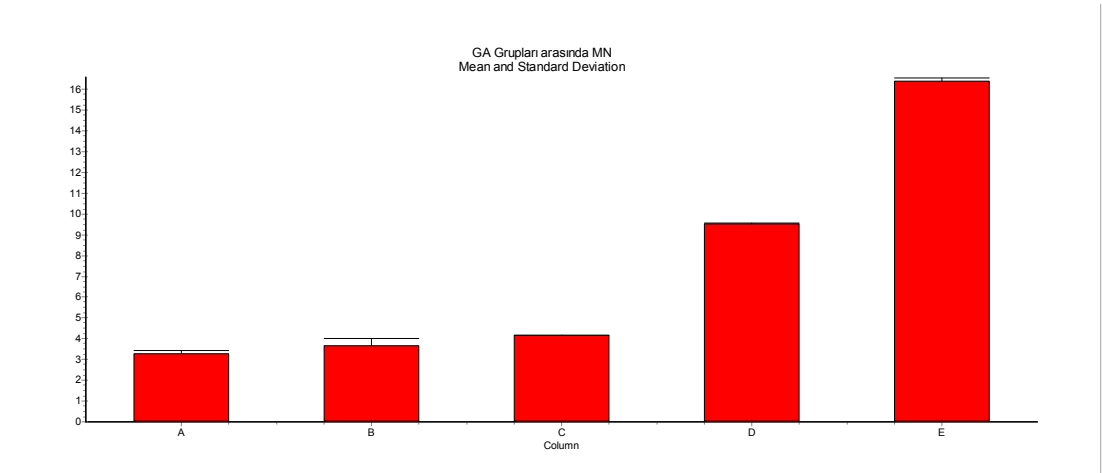
Resim 3.9: Deney grubu farelerin kemik iliği hücrelerinde 3 mikronükleuslu PCE (x1000)



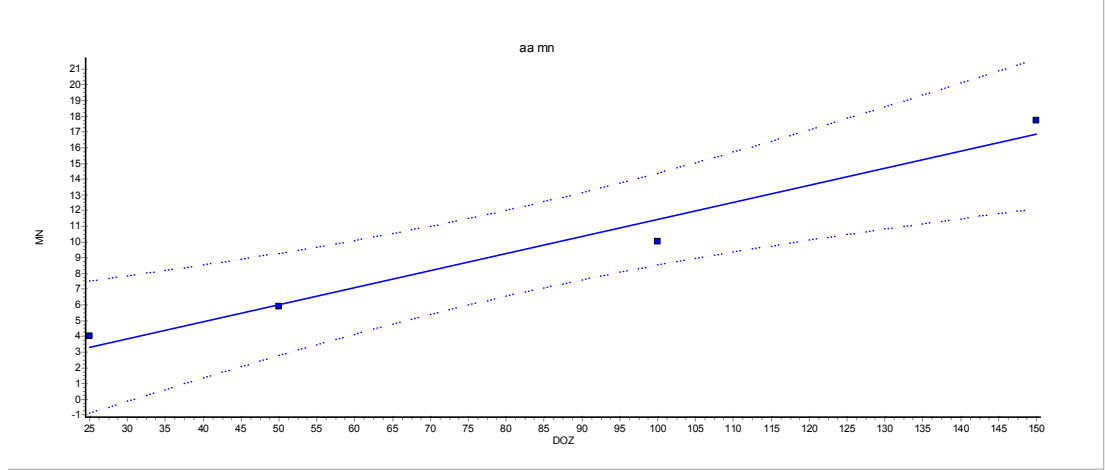
Şekil: 3.9: Akrilamidin değişik dozları (25-50-100-150 mg/kg) ve kontrol gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde, mikronükleus oranları (A:Nkontrol, B:25AA, C:50AA, D:100AA, E: 150AA, F:MMC)



Şekil:3.10: AA+ PG ve PG grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mikronükleus oranları (A: Pelargonidin, B:25AA+PG, C:50AA+PG, D:100AA+PG, E: 150AA+PG)



Şekil: 3.11: AA+GA ve GA grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mikro nükleus oranları (A: Gallik Asit, B:25AA+GA, C:50AA+GA, D:100AA+GA, E:150AA+GA)



Şekil: 3.12: Akrilamidin farklı konsantrasyonları ile mikro nükleus arasındaki regresyon ($r=0,98$) çizelgesi

3.2. İn vitro grubu

3.2.1. Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Kültürü Kromozomlarında Aberasyon Oranları

Normal sağlıklı bir bireye ait kromozom görüntüsü, kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment ve kardeş kromatid birleşmesi resimlerde gösterilmiştir (Resim 3.10, 3.11, 3.12., 3.13, 3.14). Lenfosit hücre kültürüne AA, PG, GA ve MMC eklendi. Her doz grubundan elde edilen preparatlardan metafaz safhasında olan toplam 100 hücre 24 saatlik etki süresi için, 100 hücre de 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Mikroskopik inceleme sonucunda gözlemlenen kromozom aberasyon sayıları Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

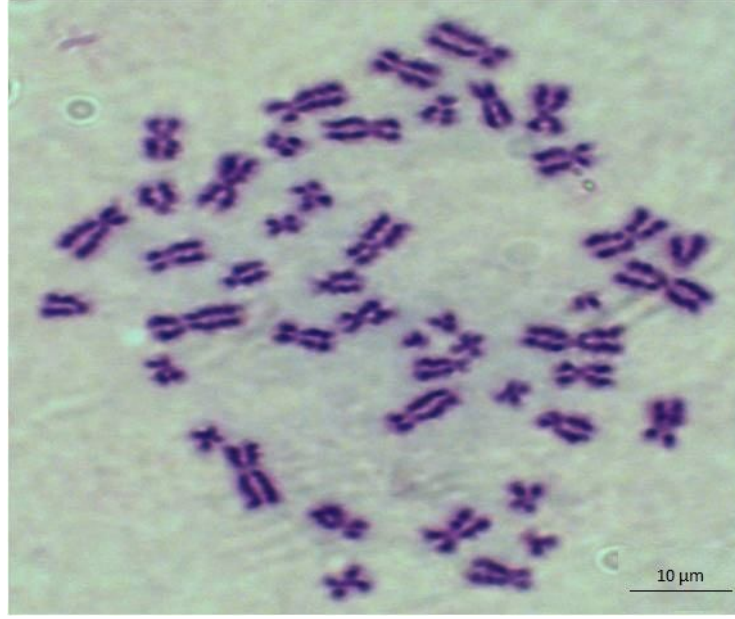
Akrilamid uygulanmış tüm deneme grupları, negatif kontrol gruplarından daha fazla sayıda kromozomal aberasyon sıklığına neden olmuştur. Bu artış pozitif kontrol grubundaki sayılardan az bulunmuştur.

Akrilamid ve pelargonidinin birlikte uygulandığı tüm deneme gruplarında kromozomal aberasyon sayısında, akrilamid grubundaki aberasyon sayısına göre önemli bir değişime gözlenmedi. Akrilamid ile birlikte verilen gallik asit aberasyon sayısını verilmeyen gruba göre azalttığı tespit edildi.

Tablo 3.4.: Kontrol ve Deney Gruplarının Değişik Dozları ile Etkileşime Sokulan İnsan Lenfosit Kültürü Kromozomlarında Aberasyon Oranları

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Doz	KK	Kk	F	DSK	KKB	Toplam (%)	Toplam KA (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif A	24	-	-	-	-	-	-	-	3	3,27±0,11
	48	-	1	1	1	-	-	3		
Negatif B	24	-	1	-	-	-	-	1	1,5	1,65±0,06
	48	-	2	-	-	-	-	2		
MMC (µg/ml)	24	0,3	67	80	18	11	14	190	194	196,5±1,19
	48	0,3	70	82	18	10	18	198		
AA (mg/ml)	24	0,050	6	3	1	1	1	12	15,5	15,62±0,09*
	48	0,050	9	5	2	1	2	19		
	24	0,100	11	9	1	2	3	26	34	35,75±0,62*
	48	0,100	16	18	1	3	4	42		
	24	0,150	20	31	2	8	4	65	70,5	70,67±0,08*
	48	0,150	22	34	6	7	7	76		
	24	0,200	48	65	4	9	11	137	147,5	147,65±0,06*
	48	0,200	56	70	10	9	13	158		
AA+PG (mg/ml)	24	0,050 0,000750	5	2	-	2	3	12	15	16,25±0,47*
	48	0,050 0,000750	10	4	1	2	1	18		
	24	0,100 0,000750	10	9	-	2	4	25	31	32,5±0,64*
	48	0,100 0,000750	15	17	-	1	4	37		
	24	0,150 0,000750	18	30	2	7	5	62	66,5	66,67±0,08*
	48	0,150 0,000750	20	32	5	8	6	71		
	24	0,200 0,000750	46	63	5	9	10	133	141,5	141,67±0,06*
	48	0,200 0,000750	55	69	9	4	13	150		
AA+GA (mg/ml)	24	0,050 0,05	3	1	-	1	1	6	8	8,12±0,04*
	48	0,050 0,05	8	1	-	-	1	10		
	24	0,100 0,05	6	4	-	1	2	13	17,5	17,65±0,06*
	48	0,100 0,05	9	9	1	-	3	22		
	24	0,150 0,05	10	23	3	5	4	45	49	49,27±0,12*
	48	0,150 0,05	15	25	3	5	5	53		
	24	0,200 0,05	38	48	3	6	10	105	107	107,2±0,10*
	48	0,200 0,05	40	50	6	3	10	109		
PG (mg/ml)	24	0,000750	1	-	2	1	1	5	3	3,27±0,11
	48	0,000750	-	-	-	-	1	1		
GA (mg/ml)	24	0,05	-	-	-	-	-	-	1	1,2±0,09
	48	0,05	1	-	1	-	-	2		

KK: Kromozom kırığı, Kk:Kromatid kırığı, F: Fragment, DSK: disetrik kromozom
KKB: kardeş kromatid birleşmesi * p< 0.01 kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli



Resim 3.10: Sağlıklı Bir Bireye Ait Kromozom Görüntüsü (x1000)



Resim 3.11: Kromatid Kırığı (Kk) (x1000)



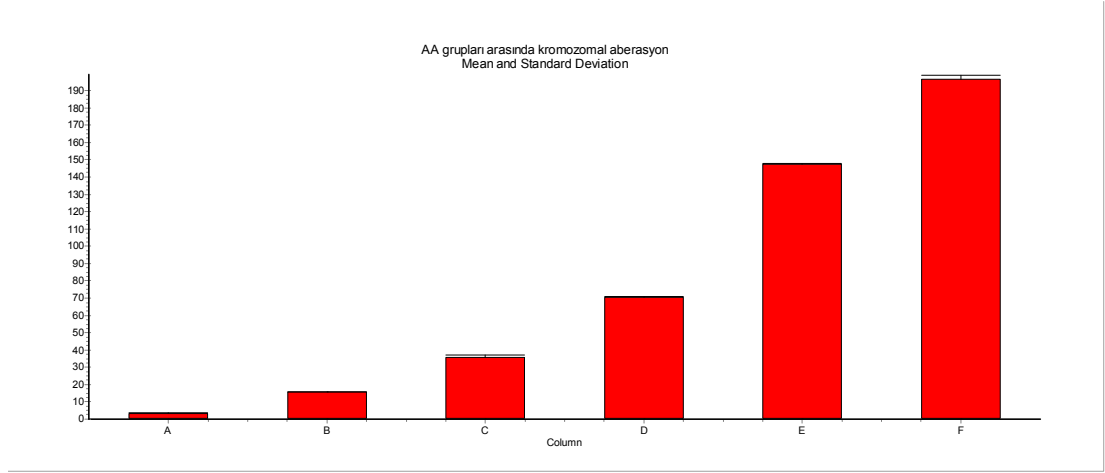
Resim 3.12: Kromozom Kırığı (KK)(x1000)



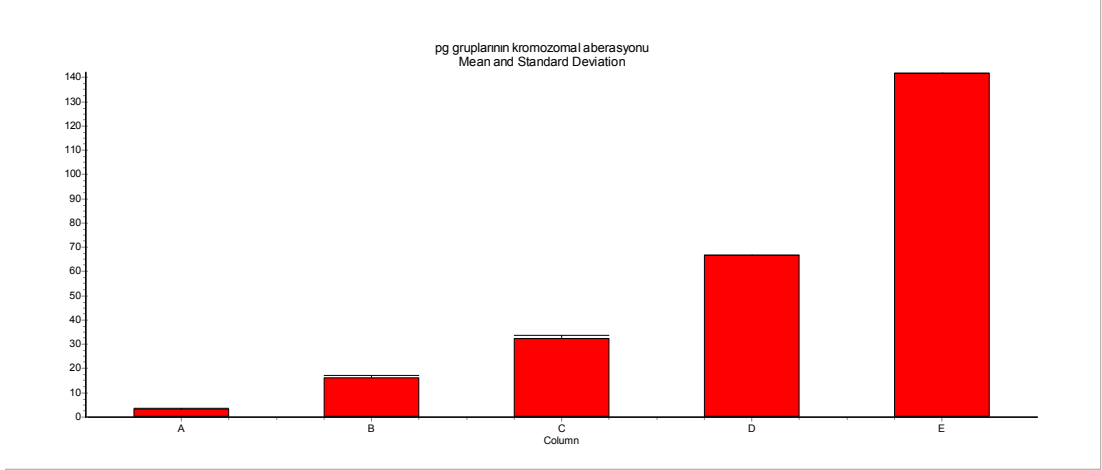
Resim 3.13: Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB)(x1000)



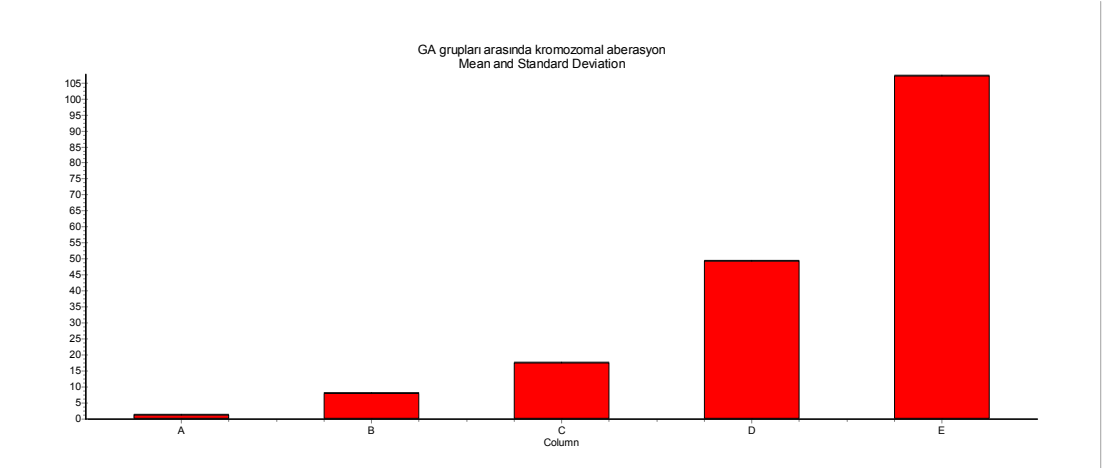
Resim 3.14: A= Kromozom Kırığı (KK), B= Fragment (F)(x1000)



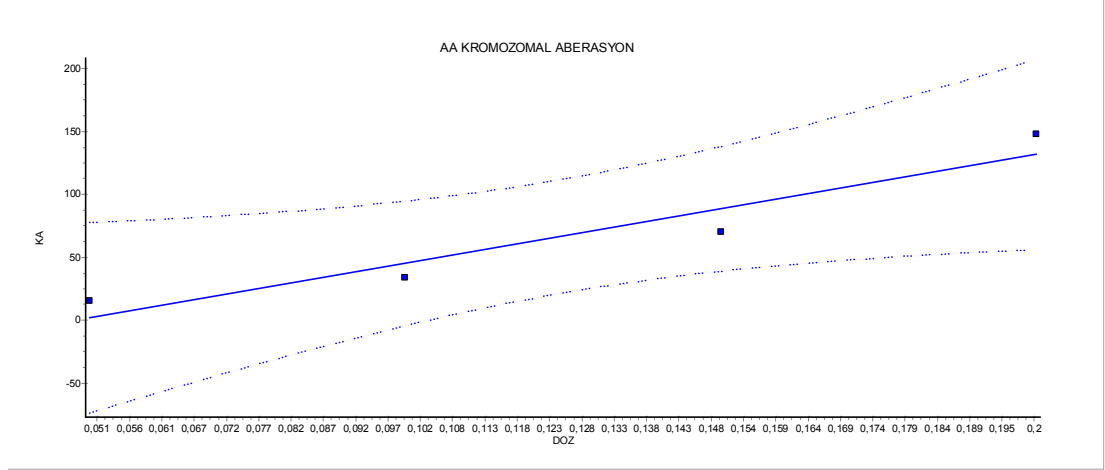
Şekil: 3.13: Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kromozomal aberasyon oranları(A:N.Kontrol, B:0.050AA, C:0.100AA, D:0.150AA, E:0.200AA, F:MMC)



Şekil.3.14: AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kromozomal aberasyon oranları(A: Pelargonidin, B: 0.050AA+PG, C: 0.100AA+PG, D: 0.150AA+PG, E: 0.200AA+PG)



Şekil.3.15: AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kromozomal aberasyon oranları(A: Gallik Asit, B: 0.050AA+GA, C: 0.100AA+GA, D: 0.150AA+GA, E: 0.200AA+GA)



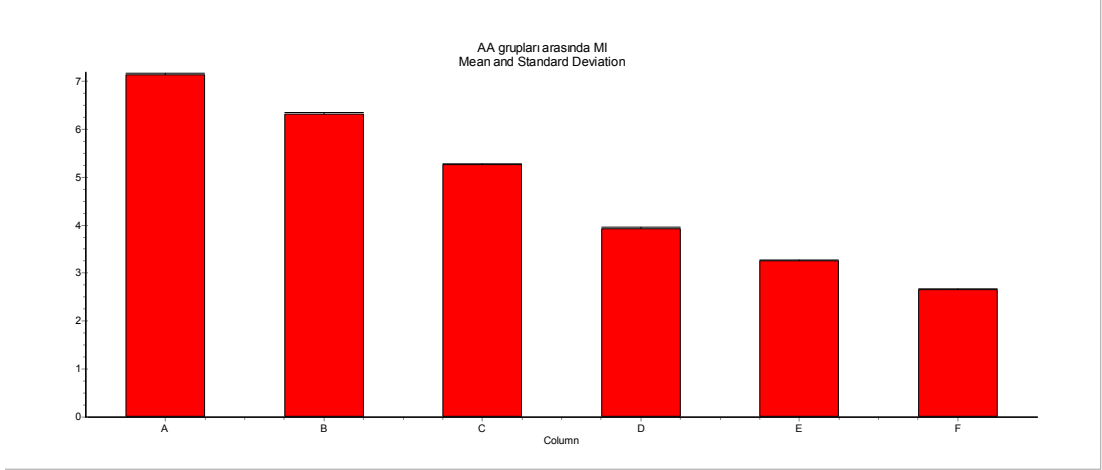
Şekil: 3.16: AA'nın farklı konsantrasyonları ile kromozomal aberasyon arasındaki regresyon ($r=0.91$) çizelgesi

İnsan lenfosit kültürlerinde deneyde kullanılan ilaçların mitotik aktivite üzerine etkileri Tablo 3.5'de, mikronükleus sayısı üzerine etkileri ise Tablo 3.6'da gösterilmiştir. Resim 3.15, 3.16, 3.17'de ise sırasıyla mikronükleus ve mono-bi-tri-tetra-nükleuslu hücre resimleri verilmiştir.

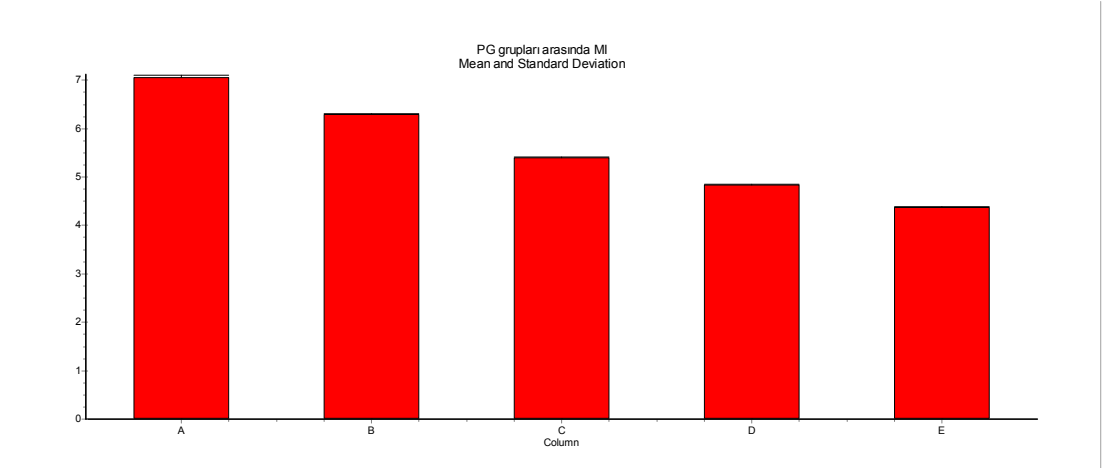
Tablo 3.5: Kontrol ve Deney Gruplarının Değişik Dozları İle Etkileşime Sokulan İnsan Lenfosit Kültüründe Mitotik Aktivite Oranları

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Top.Hüc	Metafaz hücre sayısı	Metafaz hüç. oranı ortalaması (%)	Toplam Metafaz oranı (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif Kontrol A	24	3000	213	7,1	7,11	7,13±0,01
	48	3000	214	7,13		
Negatif Kontrol B	24	3000	200	6,66	6,81	6,83±0,01
	48	3000	209	6,96		
P.Kontrol MMC(0,3 µg/ml)	24	3000	80	2,66	2,63	2,65±0,01
	48	3000	78	2,6		
PG (0,000750 mg/ml)	24	3000	210	7	7,01	7,06±0,02
	48	3000	211	7,03		
GA (0,05 mg/ml)	24	3000	209	6,96	6,94	6,97±0,01
	48	3000	208	6,93		
AA (0,050 mg/ml)	24	3000	190	6,33	6,29	6,31±0,01*
	48	3000	188	6,26		
AA (0,100 mg/ml)	24	3000	160	5,33	5,23	5,26±0,01*
	48	3000	154	5,13		
AA (0,150 mg/ml)	24	3000	118	3,93	3,88	3,92±0,02*
	48	3000	115	3,83		
AA (0,200 mg/ml)	24	3000	100	3,33	3,23	3,25±0,01*
	48	3000	94	3,13		
AA (0,050 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	3000	187	6,23	6,26	6,29±0,01*
	48	3000	189	6,3		
AA (0,100 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	3000	163	5,43	5,38	5,4±0,00*
	48	3000	160	5,33		
AA (0,150 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	3000	119	3,96	3,91	4,83±0,01*
	48	3000	116	3,86		
AA (0,200 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	3000	103	3,43	3,49	4,36±0,01*
	48	3000	107	3,56		
AA (0,050 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	3000	198	6,6	6,53	6,55±0,01*
	48	3000	194	6,46		
AA (0,100 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	3000	159	5,3	5,36	5,37±0,00*
	48	3000	163	5,43		
AA (0,150 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	3000	145	4,83	4,81	4,84±0,01*
	48	3000	144	4,8		
AA (0,200 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	3000	130	4,33	4,34	4,36±0,01*
	48	3000	131	4,36		

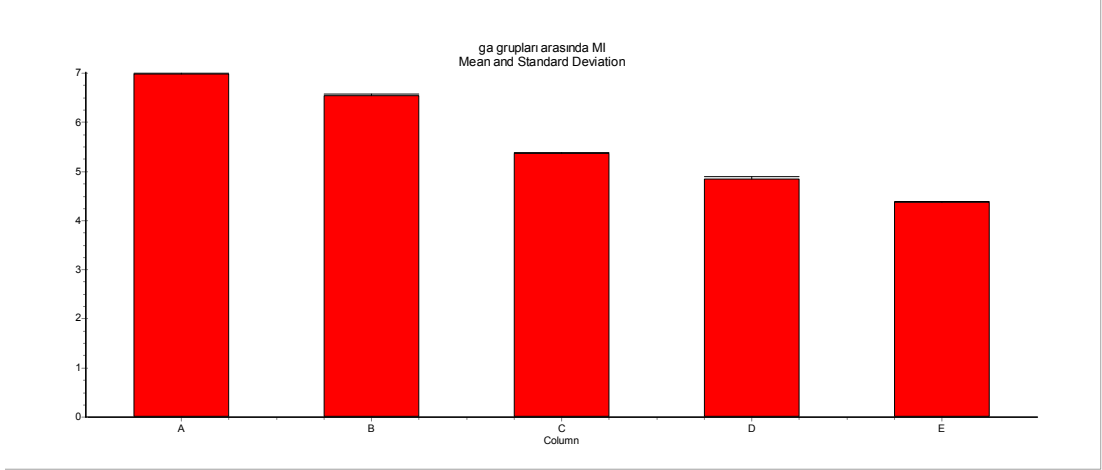
* p< 0.01 kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.



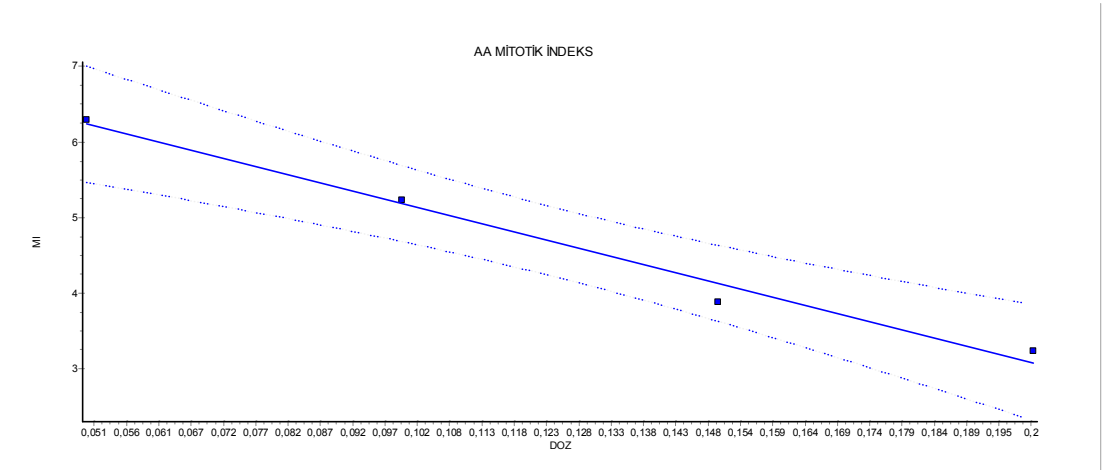
Şekil: 3.17: Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mitotik indeks oranları (A:N.Kontrol, B:0.050AA, C:0.100AA, D:0.150AA, E:0.200AA, F:MMC)



Şekil: 3.18: AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mitotik indeks oranları (A: Pelargonidin, B:0.050AA+PG, C:0.100AA+PG, D:0.150AA+PG, E:0.200AA+PG)



Şekil: 3.19: AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mitotik indeks oranları (A:Gallik Asit, B:0.050AA+GA, C:0.100AA+GA, D:0.150AA+GA, E:0.200AA+GA)



Şekil: 3.20: AA in farklı konsantrasyonları ile mitotik indeks arasındaki regresyon ($r = -0.99$) çizelgesi

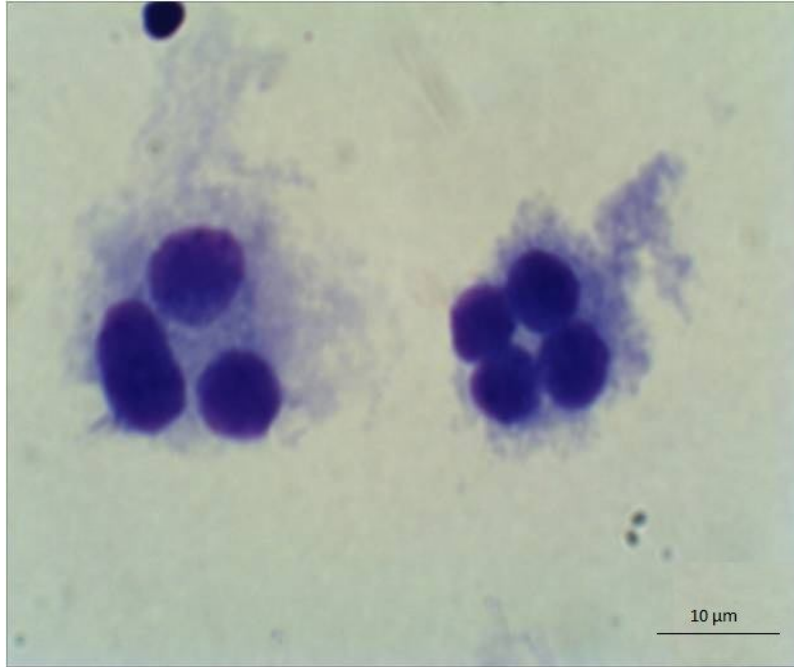
Tablo 3.6: Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığı Üzerindeki Etkileri

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Top.Hüc	Binükleer hücre Sayısı	MN sayısı	MN ortalaması (%)	Toplam MN oranı (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif Kontrol A	24	2000	970	1	0,05	0,05	0,07±0,00
	48	2000	972	1	0,05		
Negatif Kontrol B	24	2000	980	1	0,05	0,075	0,07±0,00
	48	2000	984	2	0,1		
P.Kontrol MMC(0,3 µg/ml)	24	2000	690	132	6,6	6,55	6,58±0,01
	48	2000	695	130	6,5		
PG (0,000750 mg/ml)	24	2000	980	2	0,1	0,075	0,07±0,00
	48	2000	977	1	0,05		
GA (0,05 mg/ml)	24	2000	968	1	0,05	0,025	0,031±0,00
	48	2000	960	-	-		
AA (0,050 mg/ml)	24	2000	800	11	0,55	0,5	0,7±0,09*
	48	2000	853	9	0,45		
AA (0,100 mg/ml)	24	2000	895	15	0,75	0,7	0,85±0,06*
	48	2000	808	13	0,65		
AA (0,150 mg/ml)	24	2000	959	67	3,35	3,5	3,72±0,08*
	48	2000	990	73	3,65		
AA (0,200 mg/ml)	24	2000	930	92	4,6	4,67	4,69±0,00*
	48	2000	964	95	4,75		
AA (0,050 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	2000	803	10	0,5	0,45	0,48±0,02*
	48	2000	805	8	0,4		
AA (0,100 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	2000	890	16	0,8	0,7	0,85±0,06*
	48	2000	800	12	0,6		
AA (0,150 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	2000	896	69	3,45	3,475	3,479±0,00*
	48	2000	890	70	3,5		
AA (0,200 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	2000	903	91	4,55	4,525	4,529±0,00*
	48	2000	906	90	4,5		
AA (0,050 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	2000	855	11	0,55	0,575	0,578±0,00*
	48	2000	874	12	0,6		
AA (0,100 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	2000	799	13	0,65	0,6	0,825±0,08*
	48	2000	869	11	0,55		
AA (0,150 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	2000	900	50	2,5	2,325	2,330±0,00*
	48	2000	780	43	2,15		
AA (0,200 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	2000	950	57	2,85	2,975	2,976±0,00*
	48	2000	963	62	3,1		

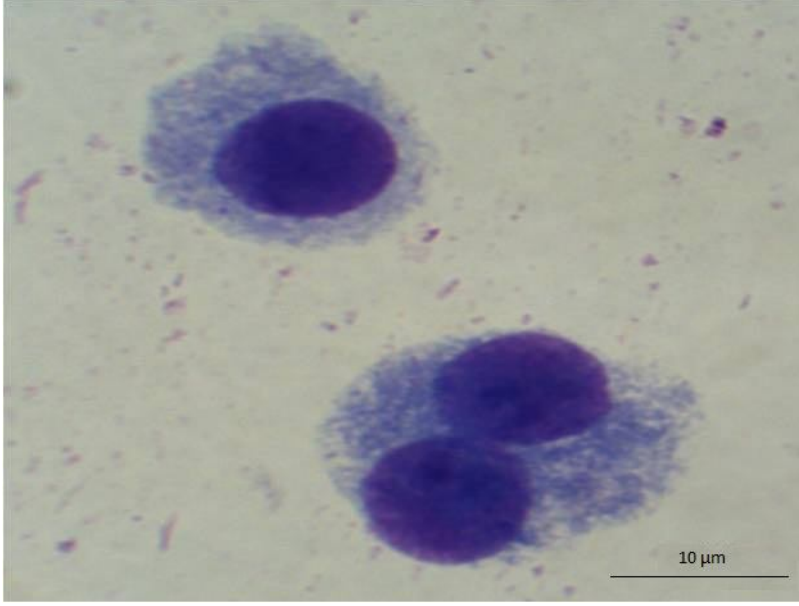
* p< 0.01 kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.



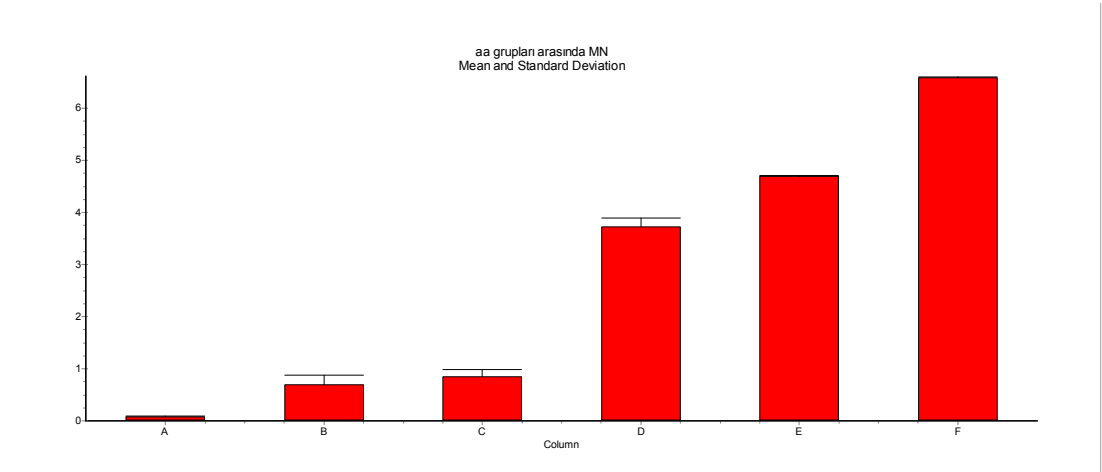
Resim 3.15: İnsan Periferel Lenfositlerinde Bir Mikronükleus İçeren Binükleer Hücre (x1000)



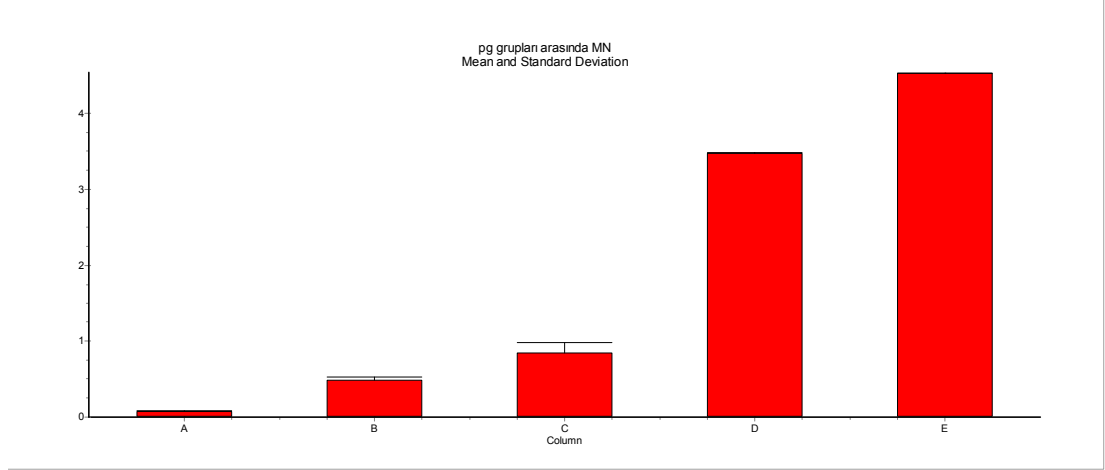
Resim 3.16.: insan Periferel Lenfositlerinde 3 ve 4 Nükleus İçeren Hücre (x1000)



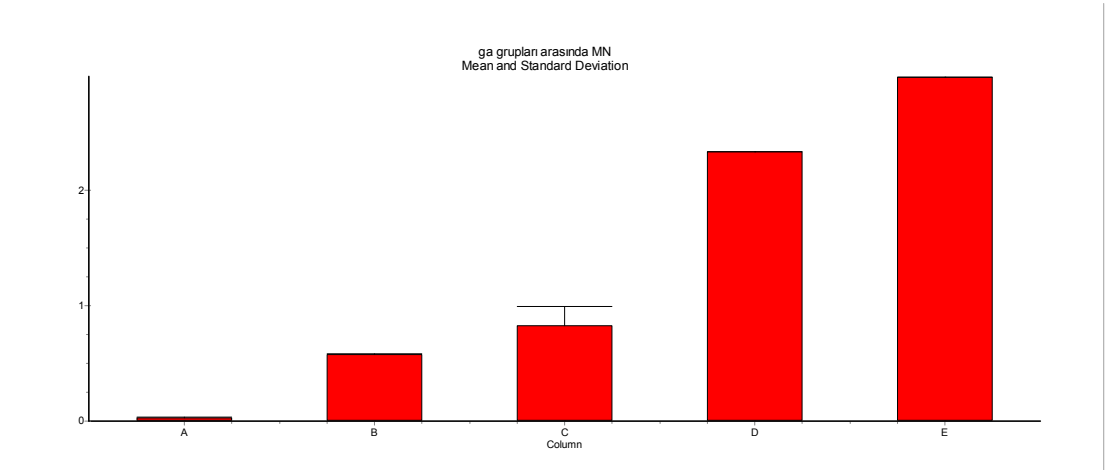
Resim 3.17: İnsan Periferel Lenfositlerinde 1 ve 2 Nükleus İçeren Hücre (x1000)



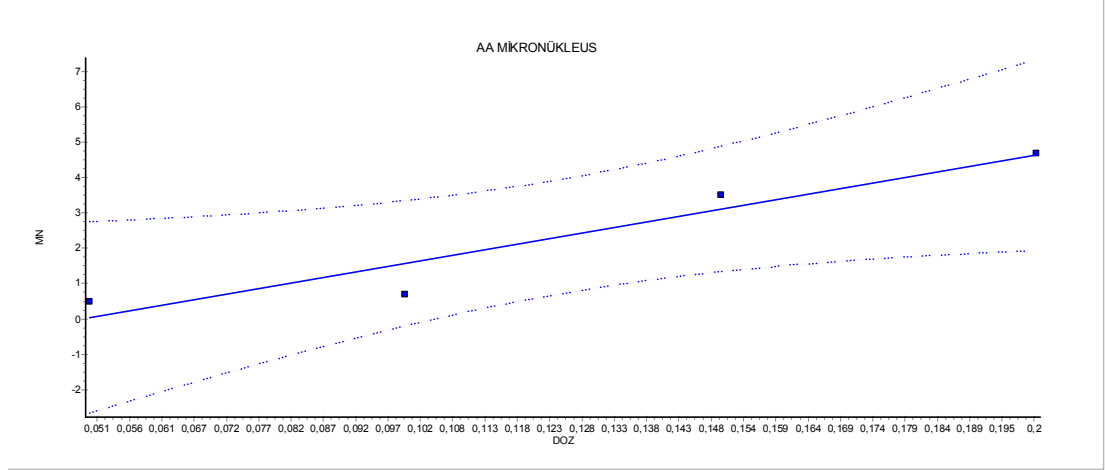
Şekil 3.21: Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mikro nükleus oranları (A:N.Kontrol, B:0.050AA, C:0.100AA, D:0.150AA, E:0.200AA, F:MMC)



Şekil 3.22: AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mikronükleus oranları (A: Pelargonidin, B: 0.050AA+PG, C: 0.100AA+PG, D: 0.150AA+PG, E: 0.200AA+PG)



Şekil 3.23: AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe mikronükleus oranları (A: Gallik Asit, B: 0.050AA+GA, C: 0.100AA+GA, D: 0.150AA+GA, E: 0.200AA+GA)



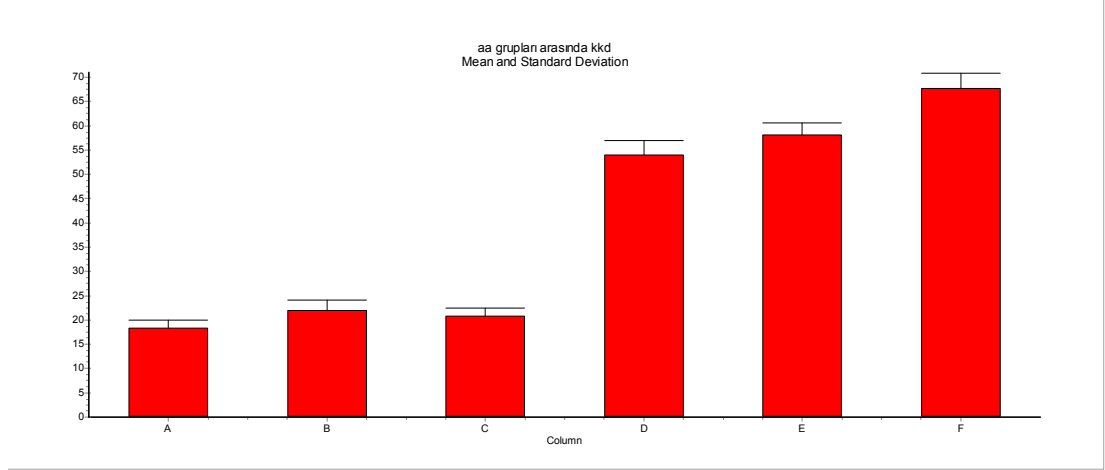
Şekil 3.24: AA'nın farklı konsantrasyonları ile mikronükleus arasındaki regresyon ($r=0.95$) çizelgesi

İnsan İnefosit kültürlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD) ve replikasyon oranları in vitro deney gruplarında sırasıyla Tablo 3.7 ve Tablo 3.8'de sunulmuştur. Deneyde tespit edilen kardeş kromatid değişimleri Resim 3.18 ve Resim 3.19'da gösterilmiştir.

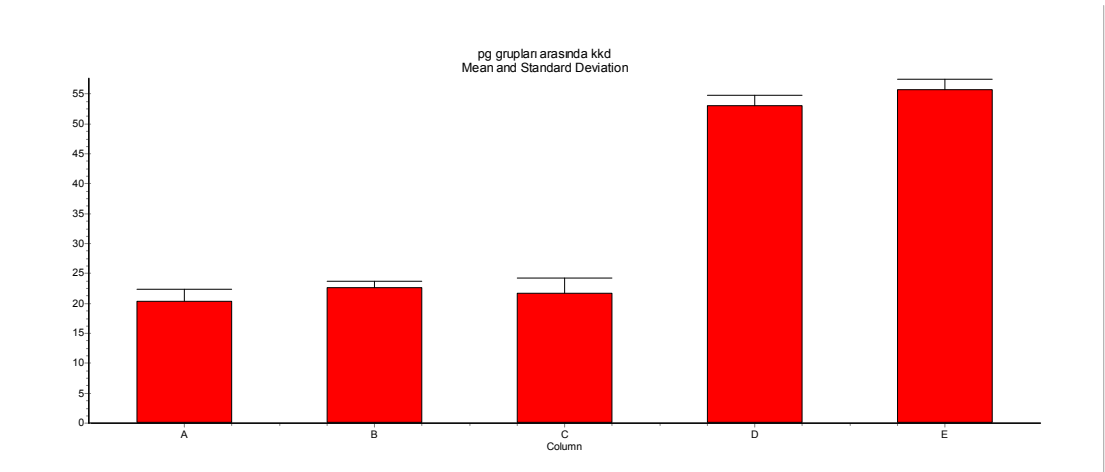
Tablo 3.7: Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişimi (%)

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Top.Hüc	KKD sayısı	Toplam KKD oranı (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif Kontrol A	24	100	15	16	18,25±0,85
	48	100	17		
Negatif Kontrol B	24	100	18	17,5	20,12±1,50
	48	100	17		
P.Kontrol MMC (0,3 µg/ml)	24	100	64	63,5	67,62±1,59
	48	100	63		
PG (0,000750 mg/ml)	24	100	18	18,5	20,37±1,02
	48	100	19		
GA (0,05 mg/ml)	24	100	17	16	18,5±1,04
	48	100	15		
AA (0,050 mg/ml)	24	100	19	20	22±1,08
	48	100	21		
AA (0,100 mg/ml)	24	100	17	19,5	20,87±0,77
	48	100	22		
AA (0,150 mg/ml)	24	100	47	51	54±1,47*
	48	100	55		
AA (0,200 mg/ml)	24	100	53	55,5	58,12±1,19*
	48	100	58		
AA (0,050 mg/ml)	24	100	22	21,5	22,62±0,55
PG (0,000750 mg/ml)	48	100	21		
AA (0,100 mg/ml)	24	100	22	19	21,75±1,25
PG (0,000750 mg/ml)	48	100	16		
AA (0,150 mg/ml)	24	100	46	51	53±0,91*
PG (0,000750 mg/ml)	48	100	56		
AA (0,200 mg/ml)	24	100	55	54	55,75±0,85*
PG (0,000750 mg/ml)	48	100	53		
AA (0,050 mg/ml)	24	100	22	22,5	24,25±0,66*
GA (0,05 mg/ml)	48	100	23		
AA (0,100 mg/ml)	24	100	17	19	21,5±1,04
GA (0,05 mg/ml)	48	100	21		
AA (0,150 mg/ml)	24	100	45	46,5	48,62±0,94*
GA (0,05 mg/ml)	48	100	48		
AA (0,200 mg/ml)	24	100	55	57	58,75±0,85*
GA (0,05 mg/ml)	48	100	59		

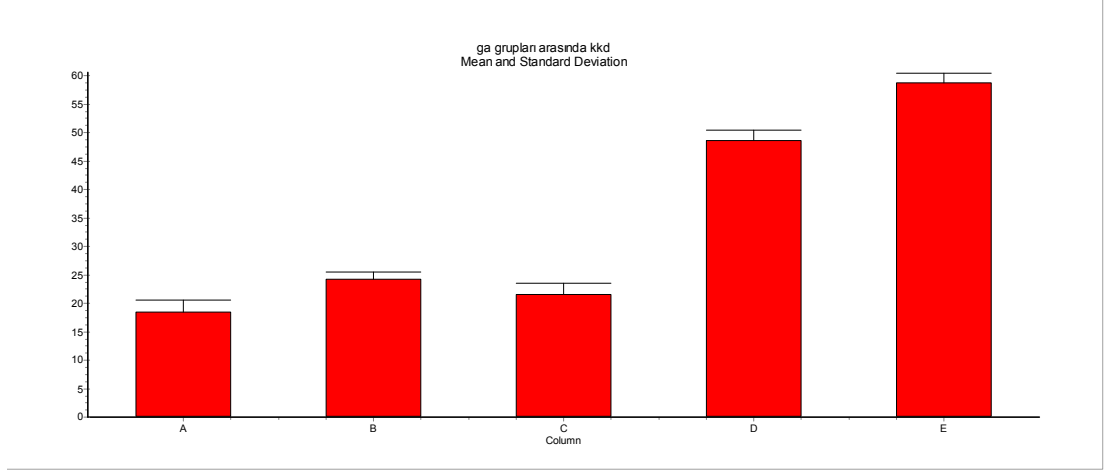
* p< 0.01 kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.



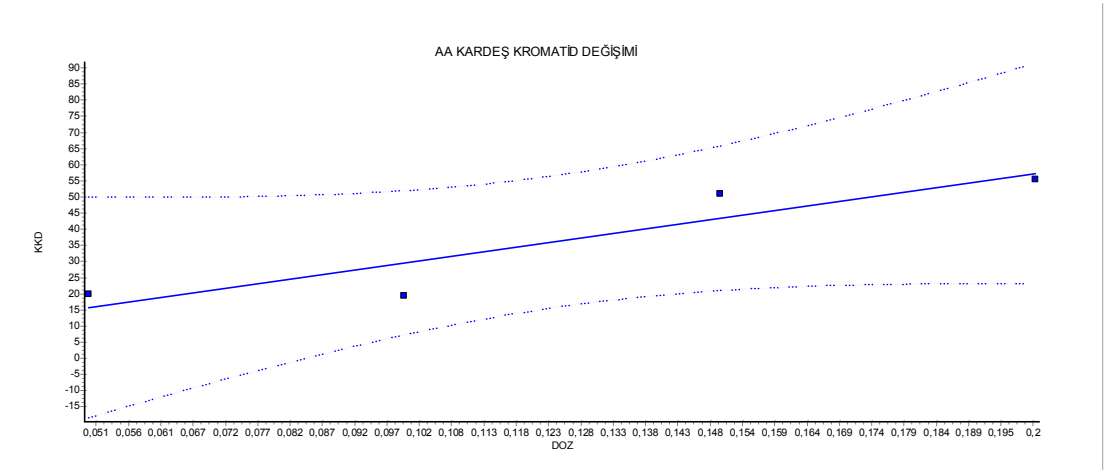
Şekil 3.25: Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kardeş kromatid değişim oranları (A:N.Kontrol, B:0.050AA, C:0.100AA, D:0.150AA, E:0.200AA, F:MMC)



Şekil 3.26: AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kardeş kromatid değişim oranları (A: Pelargonidin, B:0.050AA+PG, C:0.100AA+PG, D:0.150AA+PG, E:0.200AA+PG)



Şekil 3.27: AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe kardeş kromatid değişim oranları (A:Gallik Asit, B:0.050AA+GA, C:0.100AA+GA, D:0.150AA+GA, E:0.200AA+GA)

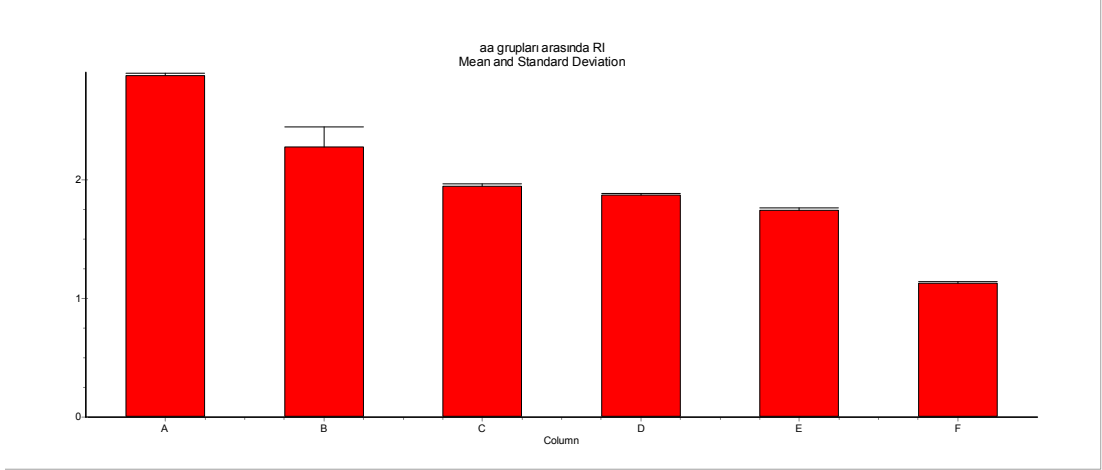


Şekil 3.28: AA in farklı konsantrasyonları ile kardeş kromatid değişimi arasındaki regresyon ($r=0.91$) çizelgesi

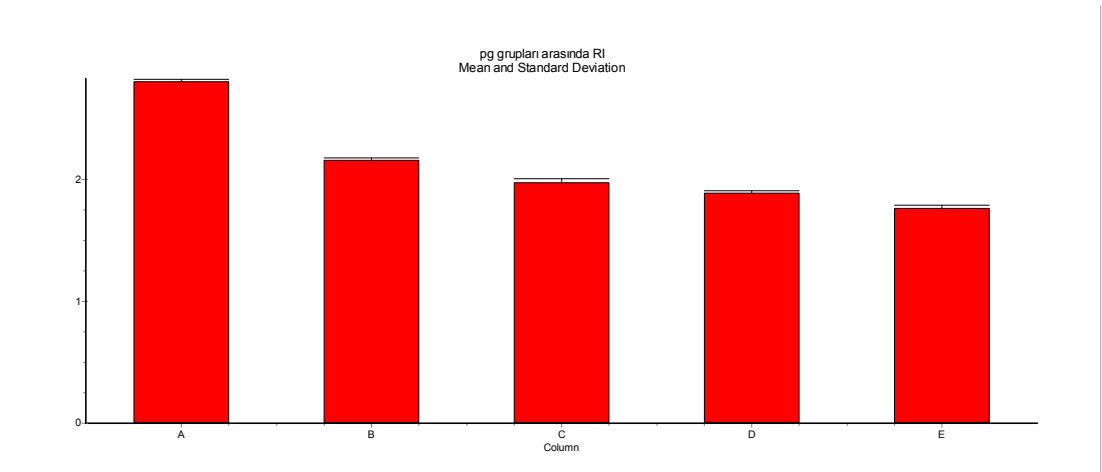
Tablo 3.8: Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi (%)

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Top.Hüc	M1	M2	M3	RI sayısı	Toplam RI oranı (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif Kontrol A	24	100	5	5	90	2,85	2,86	2,88±0,00
	48	100	3	6	91	2,88		
Negatif Kontrol B	24	100	3	5	92	2,89	2,86	2,88±0,00
	48	100	5	6	89	2,84		
P. Kontrol MMC (0,3 µg/ml)	24	100	93	3	4	1,11	1,11	1,12±0,00
	48	100	89	10	1	1,12		
PG (0,000750 mg/ml)	24	100	6	8	86	2,8	2,78	2,8±0,01
	48	100	7	9	84	2,77		
GA (0,05 mg/ml)	24	100	8	7	85	2,77	2,82	2,85±0,01
	48	100	5	3	92	2,87		
AA (0,050 mg/ml)	24	100	28	30	42	2,14	2,1	2,27±0,08*
	48	100	30	34	36	2,06		
AA (0,100 mg/ml)	24	100	29	50	21	1,92	1,93	1,94±0,01*
	48	100	30	45	25	1,95		
AA (0,150 mg/ml)	24	100	42	30	28	1,86	1,85	1,87±0,00*
	48	100	40	35	25	1,85		
AA (0,200 mg/ml)	24	100	44	40	16	1,72	1,72	1,74±0,01*
	48	100	43	42	15	1,72		
AA (0,050 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	100	29	29	42	2,13	2,13	2,15±0,01*
	48	100	28	30	42	2,14		
AA (0,100 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	100	30	49	21	1,91	1,93	1,97±0,01*
	48	100	30	44	26	1,96		
AA (0,150 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	100	41	31	28	1,87	1,86	1,88±0,01*
	48	100	42	30	28	1,86		
AA (0,200 mg/ml) PG (0,000750 mg/ml)	24	100	44	39	17	1,73	1,72	1,76±0,01*
	48	100	44	40	16	1,72		
AA (0,050 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	100	25	25	50	2,25	2,32	2,35±0,01*
	48	100	20	21	59	2,39		
AA (0,100 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	100	29	21	50	2,21	2,22	2,26±0,01*
	48	100	27	22	51	2,24		
AA (0,150 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	100	28	19	53	2,25	2,27	2,29±0,00*
	48	100	25	20	55	2,30		
AA (0,200 mg/ml) GA (0,05 mg/ml)	24	100	31	18	51	2,20	2,21	2,23±0,01*
	48	100	30	17	53	2,23		

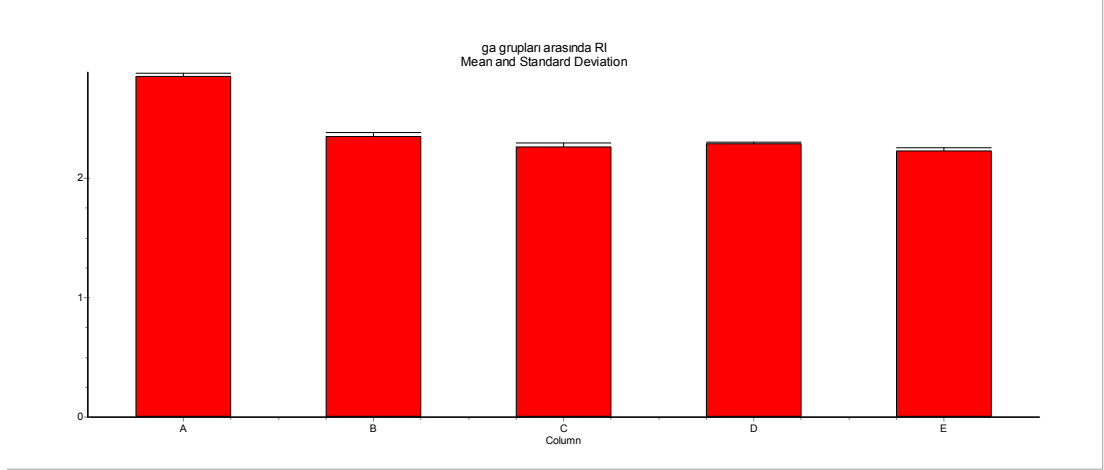
* p< 0.01 kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.



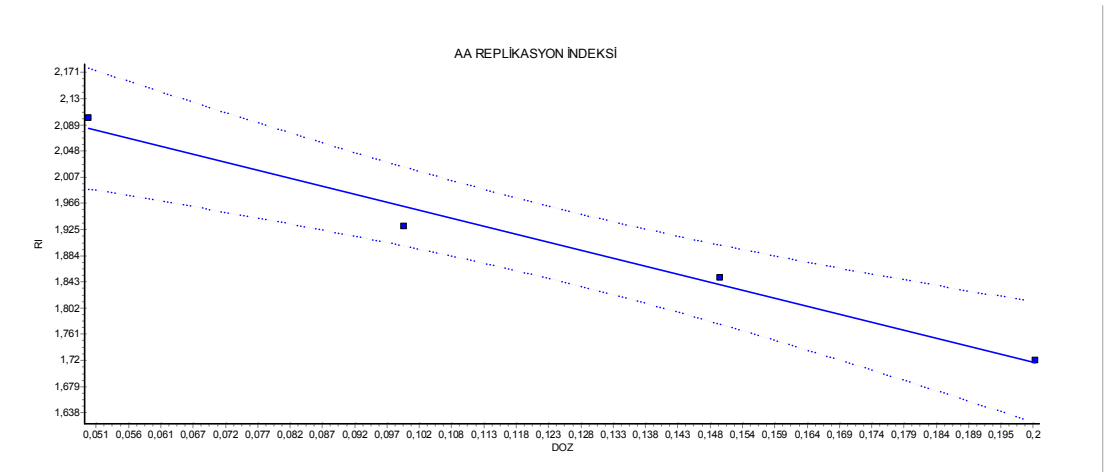
Şekil 3.29: Akrilamidin değişik dozları (0.050-0.100-0.150-0.200 mg/ml) ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe replikasyon indeks oranları (A:N.Kontrol, B:0.050AA, C:0.100AA, D:0.150AA, E:0.200AA, F:MMC)



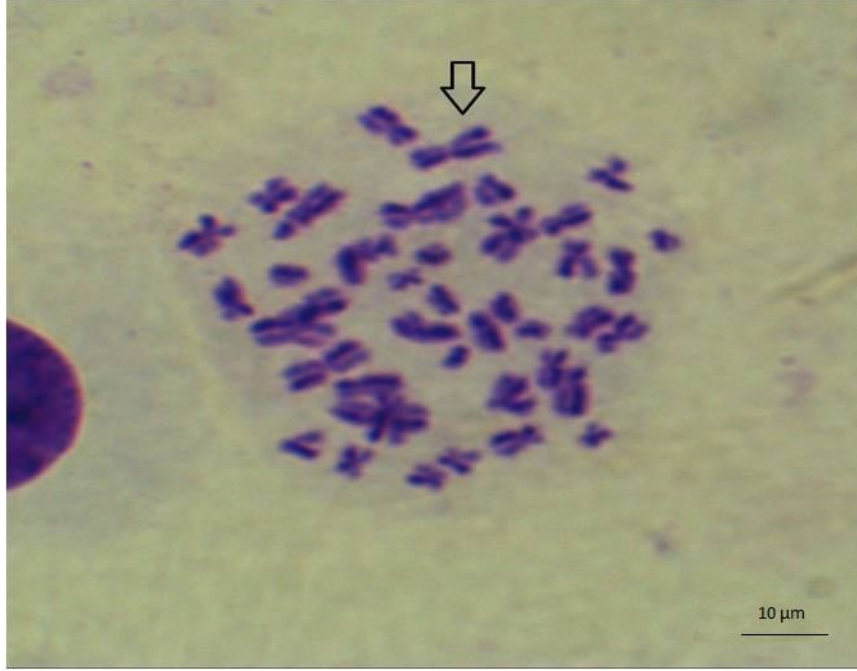
Şekil 3.30: AA+PG ve PG grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe replikasyon indeks oranları (A:Pelargonidin, B:0.050AA+PG, C:0.100AA+PG, D:0.150AA+PG, E:0.200AA+PG)



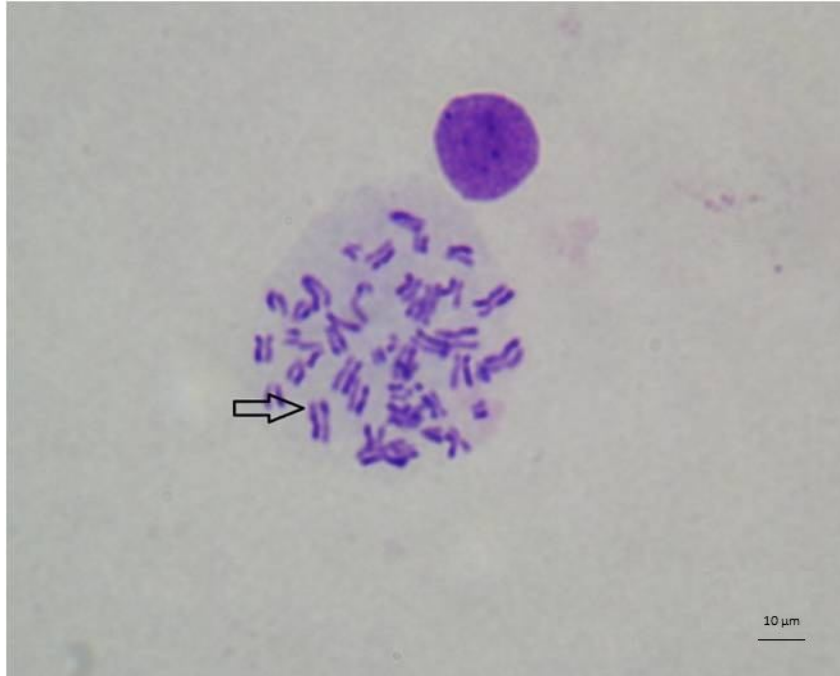
Şekil 3.31: AA+GA ve GA grupları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültüründe replikasyon indeks oranları (A:Gallik Asit, B:0.050AA+GA, C:0.100AA+GA, D:0.150AA+GA, E:0.200AA+GA)



Şekil 3.32: AA in farklı konsantrasyonları ile replikasyon indeks arasındaki regresyon ($r=-0.99$) çizelgesi



Resim 3.18: Kontrol ve Deneş Grularında Kardeş Kromatid Değişimi (x1000)



Resim 3.19: Kontrol ve Deneş Grularında Kardeş Kromatid Değişimi (x1000)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hayvanlar üzerinde yapılan birçok çalışmada akrilamidin karsinojen ve mutajen etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Akrilamid insanlar için ise muhtemel karsinojen ve mutajen olarak tanımlanmaktadır (16). Zararlı etkileri gösterilen akrilamidin insanlarda nörolojik bozukluklara da neden olabileceği tartışılmaktadır. Ancak, normal şartlarda gıdalarda oluşan akrilamid miktarının sinir sistemini etkileyecek düzeyde olmadığı çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu etkinin ortaya çıkması için çok daha yüksek dozlara gereksinim duyulmaktadır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, sinir dokusu ve üremeyi etkileyen kronik toksisitenin görülebilmesi için günde 0.5-2 mg/Kg'dan daha fazla akrilamidin alınması gerektiği bildirilmektedir (100).

Dünya Sağlık Örgütü günde 0.3-0.8 µg/kg dozda akrilamidin alınabileceğini açıklamaktadır. İsveç'te yapılan araştırmalarda, diğer faktörler de dikkate alındığında akrilamid alınımının bir günde 100 µg'a kadar çıkabileceği tespit edilmiştir. Gıdalar dışında da insanların akrilamide maruz kalabileceği bilinmektedir. Örneğin, ambalaj materyalinde ve kozmetik ürünlerinde de düşük miktarlarda akrilamid bulunmaktadır. Bir sigaranın 1-2 µg akrilamid oluşturduğu dikkate alındığında, sigaranın bu açıdan daha fazla önem arz ettiği söylenebilir (29, 176).

Akrilamidin gıdalarda bulunuşu ve birçok yolla bu maddeye maruz kalma riskinin saptanması, insanların akrilamide olan ilgilerini arttırmış olup, bu maddenin zararlı etkileri ile bu zararlara karşı alınabilecek önlemler üzerine ilgiyi arttırmış ve bu konuda çalışmaların hızlanmasına neden olmuştur. Bu maddenin zararlı etkilerinin ortaya konulması amacıyla in vivo ve invitro deneylerin yapılması önem kazanmıştır.

Bu araştırmada, akrilamidin hem in vivo hem de in vitro genotoksitesini ortaya konmuştur. Ayrıca bu genotoksite üzerine fenolik antosiyanin bileşiklerinden olan pelargonidin ile fenolik asit türevi olan gallik asitin etkileri tespit edilmiştir.

Farelere i.p yolla AA, PG, GA ve MMC enjeksiyon yapıldıktan sonra, her doz grubundan elde edilen preparatlardan metafaz safhasında olan toplam 100 hücre 24 saatlik etki süresi, 100 hücre de 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Bu 100 hücre

içerisinde gözlemlenen yapısal kromozom sayıları belirlendi. Kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, disentrik kromozom ve kardeş kromatid birleşmesi gözlemlendi.

Akrilamid farelere 25-50-100-150 mg/kg dozda, intraperitoneal olarak uygulanmasından sonra fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyon oranında doza bağlı olarak bir artış göstermiştir ($r=0.96$). Yani kromozomal aberasyon ve dozlar arasında pozitif bir korelasyon söz konusudur. Uygulanan akrilamidin dozu arttıkça, kromozomal aberasyon yüzdesi de artmaktadır. Akrilamidli gruplar negatif ve pozitif kontrollerle karşılaştırıldığı zaman gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Farelere 25 mg/kg dozda uygulanan akrilamid, kromozomlarda %17, 50 mg/kg dozda uygulanan akrilamid, % 28.5, 100 mg/kg dozda uygulanan akrilamid, %32.5 ve 150 mg/kg dozda uygulanan akrilamid ise % 49.5 oranında aberasyon artışına neden olmuştur.

Çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerin (Pelargonidin ve Gallik Asit) önce genotoksisitesi kontrol edildi. Daha sonra akrilamidin genotoksisitesi üzerinde koruyucu etkisinin olup, olmadığı araştırıldı. Bu nedenle düzenlenen gruplara pelargonidin ve gallik asitin intraperitoneal uygulamaları yapıldı. Bu gruplardaki farelerin fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyon, mitotik indeks ve mikronükleus değerlerinde kontrollere oranla önemli bir değişiklik gözlenmedi.

Akrilamid ile birlikte pelargonidin uygulanan gruplarda kromozomal aberasyon yüzdelerinde çok önemli bir düşüş saptanmazken, akrilamid ile birlikte uygulanan gallik asit gruplarının kromozomal aberasyon yüzdelerinde önemli bir düşüş belirlenmiştir.

Akrilamidin 25 mg/kg doz grubunun kromozomal aberasyonu % 17 iken, gallik asit ile birlikte uygulandığında bu oran % 5.5'e, 50 mg/kg doz grubunda % 28.5'ten 13.5'e, 100 mg/kg doz grubunda % 32.5'ten % 16.5'e ve 150 mg/kg doz grubunda ise % 49.5 'ten % 25.5'e düştüğü belirlenmiştir.

Aynı preparatlardan 1000 hücre 24 saatlik etki süresi için, 1000 hücrede 48 saatlik etki süresi için sayılarak mitotik aktivite oranları belirlenmiştir. Değişik dozlarda uygulanan akrilamid ile mitotik aktivite arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r= -0.91$). Yani uygulanan akrilamid dozu arttıkça, mitotik aktivite oranları azalmıştır. Akrilamidin bütün dozları kontrollerle karşılaştırıldığında mitotik

aktiviteyi pozitif kontrol kadar düşürmediği, fakat negatif kontrole kıyasla önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır ($p<0.01$).

Akrilamidin 25 mg/kg doz grubunun mitotik aktivite oranı % 6.05'iken, gallik asid ile birlikte uygulandığında bu oran % 7.15'e, 50 mg/kg doz grubunda % 4.05'ten % 5.25'e, 100 mg/kg doz grubunda % 2.9'dan % 4.5'e ve 150 mg/kg doz grubunda ise % 2.45 'ten % 3.55'e yükseldiği belirlenmiştir.

PCE (polikromatik eritrosit)'ler gelişimlerinin ara aşamasında olan ve olgun olmayan eritrositlerdir. Yapılarında ribozom bulundurlar Ribozomların boyanma özelliklerinden dolayı olgun olan NCE (normokromatik eritrosit)'lerden ayırt edilebilirler. NCE'ler ise gelişimlerini tamamlamış olgun olan eritrositlerdir. Yapılarında ribozom bulundurmazlar. Bunun için boyanma özelliklerinden dolayı olgun olmayan PCE'lerden ayırt edilebilmektedirler. Bu bilgiler ışığı altında; NCE'ler ışık mikroskobunda incelendikleri zaman sarımsı turuncu bir renkte görülürken, PCE'ler ışık mikroskobunda incelendikleri zaman, mavi-mor arası bir renkte görülmektedirler. Ayrıca genellikle PCE'ler yapı itibariyle, NCE'lerden daha büyüktürler. PCE'lerin içerisinde oluşan mikronükleuslar ise, ana çekirdeğin üçte bir ya da daha az çapında, boyanma özelliği ana çekirdeğin boyanma özelliği ile aynı, yuvarlak şekilli, koyu mavi renkli olması nedeni ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler (184).

Yukarıda adı geçen maddeler i.p yolla farelere uygulandıktan sonra, her doz grubundan elde edilen preparatlardan rasgele toplam 1000 PCE (polikromatik eritrosit) 24 saatlik etki süresi, 1000 PCE' de 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Bu sayılan hücreler arasında mikronükleus içeren polikromatik eritsositler belirlendi. Değişik dozlarda uygulanan akrilamid grupları ile mikronükleus frekansı arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi ($r=0.98$). Doz arttıkça mikronükleus oranı da artmaktadır. Akrilamidin bütün dozları kontrollerle karşılaştırıldığında mikronükleus oranını pozitif kontrol kadar yükseltmediği, fakat negatif kontrole kıyasla önemli derecede artırdığı saptanmıştır ($p<0.01$).

Akrilamidin 25 mg/kg doz grubunun mikro nükleus oranı % 4 iken, gallik asid ile birlikte uygulandığında bu oran % 3.8'e, 50 mg/kg doz grubunda % 5.9'dan % 4.15'e, 100 mg/kg doz grubunda % 10.05'den % 9.45'e ve 150 mg/kg doz grubunda ise % 17.75 'ten % 16.2'ye yükseldiği belirlenmiştir.

Araştırma bulgularına göre akrilamidin fare kemik iliği hücrelerinde genotoksik etkilerinin olduğu saptanmıştır. Sonuçlar kontrol grupları ile kıyaslandığında, akrilamidin dozunun artışına bağlı olarak kromozomal aberasyon sayısında ve mikro nükleus oranında yükselme, mitotik aktivitede ise düşme görülmektedir. Pelargonidin, akrilamidin genotoksik etkilerinin çok az önlerken, gallik asit yüksek oranda antigenotoksik etki gösterdiği çalışma sonucundan çıkarılabilir. Polifenollerin serbest radikal yakalayıcı bileşikler olduğu ve bu bileşiklerin antioksidan özellik gösterdikleri bildirilmektedir (44, 82, 97). Bu durum çok sayıda araştırmayla gösterilmiştir. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkiye sahip olduklarını bildirilmiş ve daha önce yapılan çalışmalar çeşitli araştırmacılar tarafından desteklenmiştir (75, 103). Bu araştırma sonucuna göre Akrilamidin kromozomlarda oluşturduğu hasarı fenolik bileşikler engelleyebilmektedir. Bu durumun ortaya çıkmasında serbest radikalleri engelleyici etkileri veya diğer mekanizmalar bir rol oynayabilir. Serbest radikal yakalayıcı maddelerin antioksidan enzimlerin sentezini artırdıkları, DNA iplikleri arasında çapraz bağ oluşumunu engellemek suretiyle mutasyon oluşumunu bloke ettikleri, DNA'nın tamir mekanizmasını uyardıkları ve sitokrom P-450 gibi birçok enzimin sentezini düzenledikleri bildirilmektedir (17, 92, 148).

Mutajenik ya da klastojenik etkiye sahip olan genotoksik ajanlarda doz-cevap ilişkisi arasında doğrusal bir bağlantı söz konusudur (belirli dozlar arasında). Böyle mutajenik ajanlardan biri de akrilamiddir. Bu çalışmada akrilamidin dozunun artışıyla birlikte genotoksik etkide de bir artma görülmüştür. Akrilamidin genotoksik etkisi bu çalışmanın dışında çok sayıda gerçekleştirilen diğer mikronükleus çalışmaları ile de ortaya konmuştur (36, 32, 118). Akrilamidin mutajenik etkilerinin gösterilmesinde diğer testlerden de yararlanılmıştır. İnsan lenfosit kültürü kromozomal aberasyon, mikronükleus testi, Ames testi, SCE testi gibi diğer test sistemlerinde akrilamidin açık bir şekilde klastojenik aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir (1). Bu çalışmada kromozomal aberasyon, miktonükleus ve SCE testlerinden yararlanılmıştır.

Mei ve ark.(105), fare lenfoma hücrelerinde glisidamid (GA) ve akrilamidin genotoksik etkilerini çalışmışlardır. Hücreleri 2-18 mM AA ve 0,125-4 mM GA ile muamele etmişlerdir. Kromozomal aberasyon gibi çeşitli genotoksisite testleri ile

sonuçları değerlendirmişler. Akrilamidin metaboliti olan glisidamid ve akrilamid arasında genotoksisite karşılaştırması yapmışlardır. Sonuçlarına göre, fare lenfoma hücrelerinde glisidamid, akrilamide göre daha mutajenik olduğunu tespit etmişlerdir.

Adler ve ark. (3), 50-150 mg/kg dozundaki akrilamidin intraperitoneal olarak verilen farelerin, kemik iliği hücrelerindeki mikronükleus sıklığında uygulanan doza bağlı olarak artma gözlemiş ve 100 mg/kg akrilamid uygulamasından 24 saat sonra da en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Bu çalışma da benzer bulgular gözlenmiştir.

Titenko-Holland ve ark. (161), 50 mg/kg dozundaki akrilamidi i.p. olarak farelere beş gün boyunca uygulamışlar. Akrilamidin morfolojik olarak normal ve anormal embriyolardaki mikronükleus içeren hücrelerin sıklığını negatif ve pozitif kontrolle kıyasladıklarında 10-20 kat artışa sebep olduğunu tespit etmişlerdir.

Dobrzynska ve Gajewski (47), X ışını ve akrilamidi birlikte kullanarak mutajenik etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada fare kemik iliği mikronükleus testini kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, akrilamidin X ışını ile birlikte uygulanmasının fare kemik iliği polikromatik eritrositlerinde mikronükleus oluşumunu önemli derecede arttırdığını tespit etmişlerdir.

Paulsson ve ark. (118) yaptıkları çalışmalarında, 100 mg/kg akrilamidi fare ve Sprague Dawley cinsi sıçanlara i.p. olarak uyguladıktan sonra farelerin dolaşım kanında, sıçanların da kemik iliğinde mikronükleus oluşum sıklığını incelemişlerdir. Araştırma sonucunda farelerde mikronükleus sıklığında artış gözlerken, sıçanların kemik iliğinde akrilamidin mikronükleus sıklığını etkilemediğini tespit etmişlerdir.

Abramsson-Zetterberg (1), uygulanan akrilamidin bir seri düşük dozunun fare periferik kanında mikronükleus testi ile etkisini incelemiş ve deneylerde kontrole kıyasla uygulanan tüm dozlarda mikronükleuslu eritrositlerin sıklığında belirgin bir artış gözlemiştir.

Yang ve ark. (180), farelere gavaj yolu ile uyguladıkları akrilamidin dolaşım kanında 72,5, 100 ve 145 mg/kg dozlarında mikronükleus sıklığında artış gözlemişlerdir. Bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğunu tespit etmişlerdir.

Yang ve ark. (180), sıçan testislerine akrilamidin toksik etkisini araştırmışlardır. Akrilamidin sperm kalitesini etkilediğini ve sperm konsantrasyonunu azalttığını görmüşlerdir. Akrilamidin histopatolojik doku

bozukluğuna neden olduğunu bulmuşlardır. Akrilamidin toksik etkisi nedeniyle Leyding hücresinin öldüğünü, sperm noksanlıklarının ve çeşitli histopatolojik anormalliklerin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

Roy ve ark.(130) streptozotocin ile diabet oluşturulan ratlarda hiperglisemi ve oksidatif hasara karşı pelargonidinin etkisini incelemişlerdir. Ratlara i.p yolla 3mg/kg dozda Pelargonidin verip oksidatif stres ve hiperglisemi yönünden araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda pelargonidin enjekte edilen ratlarda oksidatif stresin azaldığını ve hipergliseminin önlendiğini rapor etmişlerdir.

Siddique ve Afzal (145) fare kemik iliği hücreleri üzerinde mitomisin-c nin meydana getirdiği genotoksik hasarlara karşı apigeninin anti genotoksik etkisini araştırmışlardır. Parametre olarak kromozomal aberasyonlar ve SCE yi kullanmışlardır. Apigeninin (10, 20 ve 40 mg/kg) üç farklı dozda çalışıp ve bu üç dozun hiçbir genotoksik özelliğinin bulunmadığını tespit etmişlerdir. MMC 2 mg/kg olarak apigenin üç dozu ile birlikte i.p olarak verilmiştir. Fare kemik iliği hücrelerinde MMC'nin genotoksisitesine karşı apigeninin koruyucu bir rolünün olduğu, SCE ve kromozomal aberasyon oranlarında önemli bir azalmanın gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Yener ve Dikmenli (185), Sprague Dawley cinsi erkek ratlara akrilamidin 125-150-175 mg/kg tek oral doz olarak uygulamışlardır. Uygulamadan 48 saat sonra kemik iliği örneklerinde MNPCE oranlarına bakmışlardır. Ratlara gavaj yolu ile tek doz olarak verilen akrilamid kemik iliği hücrelerinde MNPCE sayısını artırdığını rapor etmişlerdir.

Seyed ve ark. (142), alıç meyve ekstraktının fare kemik iliği hücrelerinde siklofosfamidin yol açtığı genotoksisiteye karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Farelere oral yolla 7 gün boyunca 5 farklı dozda (25-50-100-200 ve 400 mg/kg) hazırlanan alıç ekstraktı solüsyonu verilmiştir. 7. Gün 50 mg/kg siklofosfamid intraperitonal olarak enjekte edilmiştir. Kontrol grubuyla siklofosfamid uygulanan tüm gruplar karşılaştırıldığında MNPCE frekansında artış gözlenmiştir. Yalnızca siklofosfamid uygulananlarla hem siklofosfamid hem alıç ekstraktı uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise MNPCE sayısında azalma görülmüştür. Yedi günlük alıç ekstraktı muamelesi kemik iliği hücrelerinde siklofosfamidin neden olduğu MN oluşumunu inhibe etmiştir. Bu ekstrakt MNPCE

frekansını önemli derecede azaltmıştır. Antiklastojenik etki göstermiştir. Ayrıca siklofosfamidin yan etkilerine karşı koruyucu olduğu tespit edilmiştir. Alıç yüksek konsantrasyonda fenolik bileşikler içeren bir bitkidir. Bu yüzden alıç ekstraktının siklofosfamidin yol açtığı genotoksisite ve oksidatif stresi azalttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da fenolik bileşiklerin antiklastojenik etkileri gösterilmiştir.

Padma ve ark. (117) linden'in neden olduğu hepatik ve renal toksisiteye karşı gallik asidin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Lindan çevrede kalıcı olan, besin zincirinde biriken ve insan sağlığı ve çevreye zararlı etkileri olma riski bulunan organik klorlu bir pestisiddir. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle hücre hasarına neden olur. Karaciğer hasarı SGOT, SGPT ve ALP gibi hepatik serumun marker enzimleri ve histopatolojik gözlemlerle değerlendirilmiştir. Böbreklerdeki hasar histopatolojik incelemelerle ve kreatin ve üre gibi serum markerlarıyla gözlenmiştir. Lindan ile uygulama, lipid peroksidasyon seviyesini arttırmıştır. Lindan uygulamasıyla birlikte karaciğer ve böbrek dokularında da histolojik değişiklikler gözlenmiştir. Gallik asidin aynı anda uygulanması, lindenin neden olduğu karaciğer ve böbrekteki değişiklikleri, LPO'da, serumun marker enzim aktivitesindeki düşme ve antioksidan seviyelerinde önemli ölçüdeki artışla önlemiştir. Bu sonuçlar, gallik asidin rat karaciğer ve böbreğindeki lindenin neden olduğu oksidatif hasar üzerine koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Ritesh ve Sanmati (125), farelerde oksidatif stres ve genotoksisiteye neden olan siklofosfamide B. lanzan'ın etanoldeki kabuk ekstraktının etkisini araştırmışlardır. Yedi gün boyunca 250, 500 ve 1000 mg/kg'lık B. lanzanla yapılan ilk uygulamada, antioksidan ve detoksifikasyon sistemlerinde değişiklik, kromozomal hasar ve lipid peroksidasyonunda önemli derecede azalma görülmüştür. Bu sonuçlar ham ekstrakttaki kemopreventif fitobiyokimyasalların varlığına bağlanmıştır. Bu nedenle farelerde siklofosfamide bağlı oksidatif stres ve genotoksisiteye karşı koruyucu bir etkinin ortaya çıktığı belirtilmektedir. Farelere farklı konsantrasyonlarda yalnızca B. lanzan'ın yanı sıra siklofosfamidle birlikte B. lanzan da uygulanmıştır. Kontrol grubunda ve 1000 mg/kg B. lanzan uygulanan farelerin MNPCE frekansında önemli farklar gözlenmemiştir. Kontrol grubuyla, 75mg/kg siklofosfamid uygulanan farelerin MNPCE frekansı karşılaştırıldığında yüksek bir

artış saptanmıştır (siklofosfamidli grupta). Farklı konsantrasyonlarda eş zamanlı olarak gerçekleştirilen siklofosfamid ve B. lanzan uygulamalarından elde edilen sonuçlar yalnızca siklofosfamid uygulanan gruptan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında MNPCE frekansında azalmanın ortaya çıktığı görülmüştür. B. lanzan'ın 250, 500 ve 1000 mg/kg lık dozları ile birlikte siklofosfamid uygulaması MNPCE frekansında sırasıyla % 37,2, % 56,14 ve % 69,99'luk bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar bir doz-yanıt korelasyonunu ortaya çıkarmaktadır. B. lanzan konsantrasyonu arttıkça mutajenite azalmaktadır. Yine araştırmada Siklofosfamid'in 75mg/kg uygulaması ile kemik iliği hücrelerindeki MNPCE frekansında önemli derecede artış saptanmıştır. Bu sonuç siklofosfamidin genotoksik etkili olduğunu kanıtlamaktadır. Yedi günlük B. lanzan uygulaması kemik iliği hücrelerinde mikronükleus oluşumunu inhibe etmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre B. lanzan MNPCE frekansını önemli derecede azaltmış ve siklofosfamide karşı antiklastojenik ve koruyucu etki göstermiştir. Yine yapılan diğer çalışmalarda siklofosfamidin fare ve ratların karaciğer, akciğer ve serumlarında lipid peroksidasyonunda artışa ve antioksidan enzimlerin aktivitelerinde ise azalmaya neden olduğunu ortaya konmuştur. Siklofosfamid prooksidan bir karaktere sahip ilaç olup, antitümöral olarak kullanılmaktadır. Oksidatif strese yol açar. B. lanzan farelerde siklofosfamidin yol açtığı genotoksisiteye karşı koruyucu bir etki göstermektedir. B.lanzan potansiyel bir antigenotoksik antioksidan ve kemopreventif ajandır. Antioksidan özellikteki enzimlerin düzeyini artırır. Bu nedenle bitki ve ekstraktları kemoterapötik uygulamalarda bir adjuvan ajan olarak kullanılabilir.

Alzahrani (7), farelerin vücut ve eşey hücrelerinde akrilamidin meydana getirdiği DNA hasarına karşı L-carnitinin koruyucu etkisini araştırmıştır. Fare kemik iliği hücrelerinde, mikronükleus, kromozomal aberasyonuna ve sperm morfolojisi parametreleri incelenmiştir. Fareleri üç gruba ayırarak, oral yolla 10, 20 ve 30 mg/kg akrilamidi uygulamış ve 24 saat sonra fare kemik iliği numunesi olarak kromozomal aberasyon ve mikronükleus oranlarını rapor etmiştir. Diğer taraftan iki L-carnitin grubu oluşturarak 1-2 hafta boyunca oral olarak 100-200 mg/kg 'lık L-carnitin uygulaması yapmıştır. Bu süreler sonunda 10 mg/kg akrilamid uygulamış ve mikronükleus, kromozomal aberasyon ve sperm anomalisi parametrelerine bakmıştır. Araştırmacı yalnızca 10, 20 ve 30 mg/kg akrilamid uyguladığı fare kemik iliği

hücrelerinde doza bağlı olarak hem mikronükleus hemde kromozomal aberasyonlarda artış saptamıştır. Diğer taraftan L-carnitin verilmiş gruplarda, akrilamidli ve kontrol gruplarına göre mikronükleus ve kromozomal aberasyon oranlarında bir azalma meydana geldiğini gözlemlemiştir. Ayrıca akrilamidli gruplarda, morfolojik olarak sperm anomalisi artarken, L-carnitin ile birlikte uygulanan akrilamid gruplarında sperm anomalilerinde azalma kaydedilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ışığı altında, akrilamidin mutajenesine karşı L-carnitinin koruyucu etkisinin olduğunu anlaşılmaktadır. Gelecekteki çalışmalarda L-carnitin, akrilamidin epoksidasyonunu engelleyip engellemediğinin tespit edilmesi önerilmektedir. Epoksit türevlerinin genetik yapıları bozduğu bilinmektedir.

Akrilamidin genotoksitesisi çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla desteklenirken, Pelargonidin ve Gallik asitin, kromozom hasarlarına karşı koruyucu etkisinin çalışılmadığı tespit edildi. Çalışma sonuçlarımız, önceki çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Akrilamidin 0.050,0.100, 0.150 ve 0.200 mg/ml'lik dozları insan lenfosit kültüründe, 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir. Kromozomal aberasyonu belirlemek için rastgele seçilmiş 100 metafaz örneği incelenmiştir. Kromozomal aberasyon oranında doza bağlı olarak bir artış gözlemlenmiştir ($r=0.91$). Yani kromozomal aberasyon ve dozlar arasında pozitif bir korelasyon söz konusudur. Uygulanan akrilamidin dozu arttıkça, kromozomal aberasyon yüzdesinde artmaktadır. Akrilamidli gruplar negatif ve pozitif kontrollerle karşılaştırıldığı zaman gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Kültüre 0.050 mg/ml dozda uygulanan akrilamid, kromozomlarda %15.5, 0.100 mg/ml dozda uygulanan akrilamid, % 34, 0.150 mg/ml dozda uygulanan akrilamid, %70.5 ve 0.200 mg/ml dozda uygulanan akrilamid ise % 147.5 oranında aberasyon artışına neden olmuştur.

Çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerin (pelargonidin ve gallik asit) önce genotoksitesisi kontrol edildi. Daha sonra akrilamidin genotoksitesisi üzerinde koruyucu etkisinin olup, olmadığı araştırıldı. Bu nedenle düzenlenen gruplara pelargonidin ve gallik asitin uygulamaları yapıldı. Kontrollerle karşılaştırıldığında kromozomal aberasyon, mitotik indeks ve mikronükleus oranlarında önemli bir değişiklik gözlenmedi.

Akrilamid ile birlikte pelargonidin uygulanan gruplarda kromozomal aberasyon yüzdelerinde gallik aside oranla çok az bir değişme saptanırken, akrilamid ile birlikte uygulanan gallik asit gruplarının kromozomal aberasyon yüzdelerinde önemli bir düşüş belirlenmiştir.

Akrilamidin 0.050 mg/ml doz grubunun kromozomal aberasyonu % 15.5 iken, gallik asit ile birlikte uygulandığında bu oran % 8'e, 0.100 mg/ml doz grubunda % 34'ten 17.5'e, 0.150 mg/ml doz grubunda % 70.5'ten % 49'a ve 0.200 mg/ml doz grubunda ise % 147.5'ten % 107'e düştüğü belirlenmiştir.

Aynı preparatlardan 3000 hücre 24 saatlik etki süresi için, 3000 hücrede 48 saatlik etki süresi için sayılarak mitotik aktivite oranları belirlenmiştir. Değişik dozlarda uygulanan akrilamid ile mitotik aktivite arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r = -0.99$). Yani uygulanan akrilamid dozu arttıkça, mitotik aktivite oranları azalmıştır. Akrilamidin bütün dozları kontrollerle karşılaştırıldığında mitotik aktiviteyi pozitif kontrol kadar düşürmediği, fakat negatif kontrole kıyasla önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır ($p < 0.01$).

Akrilamidin 0.050 mg/ml doz grubunun mitotik aktivite oranı % 6.29'iken, gallik asid ile birlikte uygulandığında bu oran % 6.53'e, 0.100 mg/ml doz grubunda % 5.23'ten % 5.36'ya, 0.150 mg/ml doz grubunda % 3.88'den % 4.81'e ve 0.200 mg/ml doz grubunda ise % 3.23'ten % 4.34'e yükseldiği belirlenmiştir.

Mikronükleus, hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmenti, kromozom parçasıdır. Bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında yer almaktadır Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucu DNA harabiyetine bağlı olarak oluşmaktadır. Diğer bir değişle hücrelerde görülen MN, DNA hasarının bir göstergesidir. Genetik hasar tespitinde kullanılmaktadır (58).

Mikronükleus frekansını belirlemek için, preparatlardan toplam 2000 iki nükleuslu hücre 24 saat, 2000 iki nükleuslu hücre ise 48 saatlik etki süresi için sayılmış, bu iki nükleuslu hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Bundan da mikronükleuslu iki nükleuslu hücrelerin yüzdeleri bulunmuştur. Değişik dozlarda uygulanan akrilamid grupları ile mikronükleus frekansı arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi ($r = 0.95$). Doz arttıkça mikronükleus oranı da artmaktadır. Akrilamidin bütün dozları kontrollerle karşılaştırıldığında mikronükleus oranını

pozitif kontrol kadar yükseltmediği, fakat negatif kontrole kıyasla önemli derecede artırdığı saptanmıştır ($p<0.01$).

Akrilamidin 0.050 mg/ml doz grubunun mikronükleus oranı % 0.5 iken, gallik asid ile birlikte uygulandığında bu oran % 0.575'e, 0.100 mg/ml doz grubunda % 0.7'den % 0.6'ya, 0.150 mg/ml doz grubunda % 3.5'ten % 2.325'e ve 0.200 mg/ml doz grubunda ise % 4.67 'den % 2.975'e yükseldiği belirlenmiştir.

Kardeş kromatid değişimi, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenite ve kanserojenite etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. KKD (Kardeş kromatid değişimi), eş kromozom lokuslarında iki kromatid arasında meydana gelen ve kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmayan, karşılıklı segment değişimi olarak tanımlanmaktadır. KKD testi sitogenetik bir yöntemdir. KKD sıklığının tespit edilmesi, klastojenite, genotoksisite veya genetik instabilitenin araştırılmasında kullanılmaktadır. KKD sıklığında artış, mutasyon ve kanser riskinde artışın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (51).

KKD sayısı ve kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 100 metafazda saptanmıştır. Ayrıca replikasyon indeksini hesaplarkende 100 hücre değerlendirilmiştir. Kromozomal aberasyon ve mikronükleus testlerinde olduğu gibi bu testlerde de 24 ve 48 saatlik etki süreleri için ayrı ayrı hücre sayılmıştır. Değişik dozlarda uygulanan akrilamid grupları ile KKD sayısı arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi ($r=0.91$). Doz arttıkça KKD sayısı da artmaktadır. Akrilamidin bütün dozları kontrollerle karşılaştırıldığında KKD sayısını pozitif kontrol kadar yükseltmediği, fakat negatif kontrole kıyasla önemli derecede artırdığı saptanmıştır ($p<0.01$). Akrilamid uygulanan grupları ile replikasyon indeksi arasında negatif bir korelasyon vardır ($r=-0.99$). Doz arttıkça RI düşmektedir. Bütün dozlar kontrollerle karşılaştırıldığında RI'ni pozitif kontrol kadar düşürmediği fakat negatif kontrole kıyasla önemli derecede düşürdüğü tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Akrilamidin 0.050 mg/ml doz grubunun KKD sayısı % 20 iken, gallik asid ile birlikte uygulandığında bu oran % 22.5'e, 0.100 mg/ml doz grubunda % 19.5'ten % 19'a, 0.150 mg/ml doz grubunda % 51'den % 46.5'e ve 0.200 mg/ml doz grubunda ise % 55.5 'ten % 57'e düşürdüğü, akrilamidle birlikte pelargonidin uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında önemli bir farkın olmadığı belirlenmiştir.

Akrilamidin 0.050 mg/ml doz grubunun RI'i % 2.1 iken, gallik asid ile birlikte uygulandığında bu oran % 2.32'e, 0.100 mg/ml doz grubunda % 1.93'ten % 2.22'ye, 0.150 mg/ml doz grubunda % 1.85'ten % 2.27'ye ve 0.200 mg/ml doz grubunda ise % 1.72 'den % 2.21'e yükselttiği, akrilamidle birlikte pelargonidin uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında önemli bir farkın olmadığı belirlenmiştir.

Genotoksisite üzerine çok sayıda in vitro araştırmalar yapılmaktadır.

Bitkisel polifenolik bileşikler ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve bu bileşiklerin çok güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları, vücutta oluşan serbest radikalleri nötralize ederek kalp-damar hastalıklarını engelledikleri ve hatta yaşlanmayı geciktirdikleri rapor edilmiştir. Polifenolik bileşiklerin, yüksek kimyasal aktiviteye sahip olmaları, ayrıca DNA, enzimler ve proteinlere bağlanabilme özelliği göstermeleri nedeniyle serbest radikallere karşı önemli bir savunma mekanizması oluşturdukları bilinmektedir (27).

İpek ve ark. (88), carvacrol'ün metabolik aktivitenin yokluğunda önemli bir mutajenik aktivite gösterdiğini, her iki türde hem S9 bulunan hem de bulunmayan ortamlarda sırasıyla 4-nitro-o-phenylenediamine ve 2- aminofluorene tarafından meydana getirilen mutajenitenin güçlü bir şekilde inhibe edildiğini ve carvacrol'ün önemli bir şekilde antimutajenik aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır.

İpek ve ark. (87), insan lenfosit hücrelerinde MMC'nin varlığında carvacrol'ün bütün dozlarda SCE'nin oluşumunu artırmadığı, hatta MMC'nin neden olduğu SCE oranlarını inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Jiang ve ark. (90) akrilamidin genotoksik/antigenotoksik bileşenleri belirlemede uygun hücreler olan insan hepatoma G2 (HepG2) hücrelerinde, tek hücre jel elektroforez (SCGE) assay and mikronükleus testlerini kullanarak muhtemel genotoksik etkisini çalışmışlardır. Bu mekanizmanın nasıl çalıştığını açığa çıkarmak için reaktif oksijen türlerinin hücre içi üretimini ve oksidatif DNA hasarı seviyesini 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)ın immunositokimyasal analiziyle değerlendirmişlerdir. AA'nın neden olduğu oksidatif strese glutatyon (GSH) varlığı buthionine sulfoximine (BSO)uygulamasının GSH'ı azaltmasıyla (baskılamasıyla) incelenmiştir. Sonuçlar, AA'nın neden olduğu DNA zincir kırılmalarının ve HepG2 hücrelerinde MN frekansı yükselmesinin doza bağlı olduğunu göstermiştir. Bu olaylardaki muhtemel mekanizma AA uygulanan HepG2 hücrelerinde artan ROS

seviyesi, GSH'nin azalması ve 8-OHdG oluşumudur. AA'nın HepG2 hücrelerinde muhtemelen hücre içi ROS GSH depleksiyonuyla (azalması, baskılaması) genotoksik etkisini gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Gasiorowski ve ark (63) *Aronia melanocarpa*'dan izole etikleri antosiyaninleri Ames testi ve insan lenfosit kültürü kullanarak benzo (a) piren ve 2-aminoflorene'in etkileri üzerine kullanmışlardır. İnvitro insan lenfosit kültüründe yapılan SCE testinde, antosiyanin varlığında benzo (a) pyrenenin neden olduğu SCE frekansında önemli bir düşüş saptandı. Ames testinde ise antosiyaninlerin çok güçlü antimutajenik özelliklerinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Aydın ve ark. (11), yaptıkları çalışmada thyme yağının ana komponentlerinden olan carvacrol'ün 0.05 mM konsantrasyonlarda IQ ve MMC'nin neden olduğu genotoksik aktivitelere karşı koruyucu olduğu halde 0.1mM konsantrasyondaki carvacrol DNA'da zararlara neden olduğu, thymol'ün ise yaklaşık 0.1mM konsantrasyonlarda DNA ipliklerinde kırılmaya neden olmazken 0.2mM konsantrasyonda DNA'da önemli zararlara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Siddique ve ark. (146). *Ocimum sanctum*'dan elde edilen infüzyonun klormadinon asetat (CMA)'nın insan lenfositlerinde neden olduğu genotoksik hasarlar üzerindeki etkilerinin araştırmışlardır. Klormadinon asetat sentetik bir progesteron analogudur. Genellikle oral olarak gebeliği önleyici olarak kullanılmaktadır. CMA 40 µM dozda insan periferik lenfositlerinde kromozom aberasyonlarını arttırdığı, fakat 40 µM dozda CMA, bitki infüzyonunun 1.075x10⁻⁴, 2.125x10⁻⁴ ve 3.15x10⁻⁴ g/l bitki ayrı ayrı dozlarıyla birlikte lenfositlerle muamele edildiğinde anormal metafaz sayısını sırasıyla % 2,67, % 2,0 ve % 1.67 oranlarına kadar düşürdüğü saptanmıştır. Kardeş kromatid değişimi de aynı şekilde 40 µM CMA ile muamele edilmiş hücrelerde % 6.43 iken, bitki infüzyonuyla ayrı ayrı 1.075x10⁻⁴, 2.125x10⁻⁴ ve 3.15x10⁻⁴ g/l dozlarında 1:1 oranında muamele edilen hücrelerde sırasıyla % 3.76, 3.01 ve 2.94 oranlarında azalmıştır. Bitki infüzyonunun kullanılan dozlarında gözlenen kromozom aberasyonları ve kardeş kromatid değişimleri kontrol grubuna göre artırmadığı belirtilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda bitki infüzyonunun genotoksik potansiyeli artırmadığı ve insan lenfosit hücrelerinde klormadinon asetatın neden olduğu genotoksisiteyi düzeltebileceği ileri sürülmüştür.

Kimyasalların hücre enerji üretim merkezlerinin fonksiyonlarını baskı altında tuttukları ve dolayısıyla ATP sentezinin azaltması sonucu hücre bölünmesinin yavaşladığı ve sitotoksik etkinin ortaya çıktığı bilinmektedir. Bazı araştırmacılar da kimyasal maddelerin KA'yı uyarma yoluyla sitotoksik etkiye sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir (10, 81, 62). Vock ve ark. (174) ile Kirkland ve Müller (93) bazı kimyasalların in vitro sitotoksik etkilerinin DNA çift iplik kırıklarının oluşmasına bağlı olarak ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Ayrıca Madle (102), KA içeren hücrelerin mitotik seleksiyon yoluyla döngüden çıkartılacağını ve dolayısıyla MI'in düşürüleceğini bildirmiştir. Mitotik seleksiyon, bölünme yönünden aktif olan hücrelerde kromozom aberasyonlu hücrelerin eliminasyonu olarak tanımlanabilir. Yani mitotik seleksiyon tamir edilemeyecek kromozom aberasyonu içeren hücrelerin hücre döngüsünden uzaklaştırılması ve öldürülmesi olayıdır. Bu araştırmacılara göre mitotik seleksiyona, DNA fragmentasyonu ve bunun sonucunda oluşan köprü oluşumu, asentrik (kinetokorsuz) fragmentlerin kaybolması ile oluşan gen kaybı veya bunların sonucunda mikronükleus oluşumu dolayısıyla genetik materyalin kaybı gibi anormallikler sebep olmaktadır.

Gül ve ark. (68) *Urtica dioica* (ısırgan otu)'nun insan periferel lenfosit kültüründe, sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Araştırmada ısırgan otunun esansiyel yağının kimyasal kompozisyonu çıkarılmıştır. Araştırma sonucunda tıbbi bitki olarak geniş bir kullanım alanına sahip olan ısırgan otunun, kromozomal aberasyon ve mikronükleus oranında artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Nefic (110), insan periferel lenfositlerinde in vitro KA test metodu ile sisplastin'e karşı askorbik asit'in koruyucu potansiyelini araştırmıştır. Araştırmacı askorbik asitin, sisplastin ile uyarılan anormal metafaz ve kromozomal anormali sayısında istatistik bakımdan önemli derecede azalma meydana geldiğini belirtmiştir. Ayrıca çalışmada askorbik asit'in antimitojen etkisinin ortaya çıkmasında konsantrasyonun önemli olduğunu açıklamıştır. Askorbik asit yüksek konsantrasyonlarda serbest radikal üreterek genetik hasara neden olduğu bildirilmiştir.

Blasiak ve ark.(19) normal insan lenfositlerinde akrilamidin potansiyel DNA hasarı yapma özelliğini comet testinin alkalın, nötral ve 12.1 versiyonlarıyla ve pulsed-field gel elektroforeziyle araştırmışlardır. Akrilamidin normal hücre

DNA'sında özellikle DNA baz modifikasyonları ve apoptosisi kapsayan bir çok zararlı etkiye neden olduğunu, ayrıca DNA onarımını bozduğunu rapor etmişlerdir.

Aly ve Donya (6), tüberküloz tedavisinde kullanılan rifampisin'in genotoksik etkilerine karşı askorbik asit ve vit E'nin etkilerini araştırmışlardır. Farelere oral yoldan verilen 10, 50, 150, 300 mg/kg rifampisin'in kromozom anormalliklerini arttırdığı saptamışlardır. Bu artış farelere 10 mg/kg dozda 30 gün peşpeşe uygulanan rifampisin gruplarına göre daha az olduğu gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar askorbik asitin 25, 50 ve 75 mg/kg dozlarının rifampisin'in yaptığı kromozom anomalilerini önemli derecede azalttığını belirlemişlerdir. Askorbik asitin uygulanan dozlarının artışı ile elde edilen sonuçlar arasında aynı yönde olumlu bir etki elde edilmiştir.

Egel ve ark. (49), toksoplazma ve malarya tedavisinde kullanılan pirimetamin'e karşı askorbik ve folinik asit'in aktivitesini araştırmışlardır. İnsan lenfosit kültürüne 0.025 mg/ml pirimetamin ile birlikte 20, 40 ve 80 mM askorbik asit ya da 25, 50 ve 100 mM folinik asit ilave eden araştırmacılar, pirimetamin tarafından oluşturulan aberasyonların askorbik ve folinik asit tarafından doza bağlı olarak azaltıldığı sonucunu elde etmişlerdir.

Sonuç olarak değişik dozlarda akrilamid uygulanan farelerin, kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyon sayısı ve mikronükleus oluşumunda artış, mitotik indekste ise düşüş saptanmıştır. Ayrıca bu araştırmanın in vitro safhasında akrilamidin doz artışına bağlı olarak kromozomal aberasyon, mikronükleus ve KKD oranında artışa neden olduğu belirlenmiştir. Replikasyon ve mitotik indeksi düşürdüğü gözlenmiştir. DNA molekülünün şeker fosfat omurgasındaki fosfodiester bağlarını koparması yoluyla yapısal kromozom anormalliklerine sebep olması genotoksik, replikasyon ve mitotik indeksi düşürmesi ile de sitotoksik risk taşıyabileceği söylenebilir. Hem in vivo hem in vitro çalışmada uygulanan pelargonidin dozlarının akrilamidin genotoksitesini fazla önlemezken, gallik asitin çalışılan dozunda bu toksisiteyi önlediği saptanmıştır. Daha önce yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, bizim çalışmadan elde ettiğimiz sonuçları desteklemiş ve akrilamidin özellikle yüksek dozlarda DNA kırıklarına sebep olduğu tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerin, DNA, enzimler ve proteinlere bağlanabilme özelliği göstermeleri nedeniyle serbest radikallere karşı önemli bir savunma mekanizması oluşturdukları bilinmektedir. Çeşitli çalışmalarda fenolik bileşiklerin antioksidan,

antimutajenik ve antiklastojenik etki yarattığı gözlenmiştir. Çalışmamız, önceki çalışmalarla kıyaslandığında çalışılan gallik asit dozunun, akrilamidin genotoksisitesini düşürdüğü ve koruyucu bir rolünün olduğu söylenebilir.

5. ÖZET

Akrilamid (AA) genotoksik etkili olup, muhtemel karsinojenler arasında sınıflandırılmıştır. Akrilamid endüstride kullanım alanı bulunmaktadır. Ayrıca yüksek ısıda üretilen gıdalarda ortaya çıkmaktadır. DNA ile etkileşime girdiği kaydedilmiştir. Fakat bu etkileşimin mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. AA insanlarda olduğu gibi deney hayvanlarında da nörotoksik ve mutajenik etkilidir. Bunun yanında karsinojenik etkili olduğu da gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, fare kemik iliği hücreleri ile insan lenfosit hücre kültüründe Akrilamidin genotoksik etkisine karşı Pelargonidin (PG) ve Gallik asit (GA)'in etkilerini ortaya çıkarmaktır.

Akrilamidin genotoksik etkilerini araştırmak için kardeş kromatid değişimi (SCE), kromozom aberasyonu (CA), mikronükleus (MN) testleri kullanılmıştır. Sitotoksik etkilerini belirlemek için ise replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeks (MI) değerlerinden yararlanılmıştır. Ayrıca AA'nın genotoksitesine karşı PG ve GA'nın antijenotoksik etkisi araştırılmıştır.

Araştırma sonucunda AA'nın in vivo ve in vitro klastojenik etkisinin olduğu saptandı. AA'nın spesifik olan bu etkilerinin doza bağlı olduğu görüldü. Bu bulgular AA'nın genotoksik ve sitotoksik bir bileşik olduğunu göstermektedir. İn vitro (insan kanı lenfosit kültürü) ve in vivo (kemik iliği hücreleri) CA, MN, SCE, RI, MI testlerinde Gallik asitin AA'nın neden olduğu genotoksikite frekansında (sıklığında) önemli derecede düşüşe neden olduğu gözlemlendi. GA'nın, muhtemelen antioksidan aktivitesiyle hem fare kemik iliği hücrelerinde hem de insan lenfosit kültüründe AA'nın oluşturduğu genotoksikiteyi düşürdüğü görülmektedir. GA genotoksik ve sitotoksik etkili olmadığı belirlendi. AA'nın etkilerini azaltarak antijenotoksik etkiye sahip olduğu tespit edildi. PG'nin genotoksik ve sitotoksik etkileri bulunmadı. Bu araştırmada CA, MN, SCE, MI and RI frekansları sonucuna göre, GA'nın PG'den daha güçlü antimutajenik etkisi olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, Gallik asit, Pelargonidin, Kromozomal aberasyon, Mikronükleus, Kardeş kromatid değişimi, Replikasyon indeksi, Mitotik indeks.

6. SUMMARY

Acrylamide (AA) is genotoxic and has been classified as a probable human carcinogen. Acrylamide is used in the industry and can be a by-product in a high-temperature food processing. It is reported to interact with DNA, but the mechanism of this interaction is not fully understood. Acrylamide is mainly neurotoxic in experimental animals as well as humans and has also been shown to be mutagenic and carcinogenic.

The aim of this study was to investigate the influence of Pelargonidin (PG) and Gallic acid (GA) on genotoxic effects of Acrylamide (AA) on bone marrow cells of mice and human lymphocytes cultured.

The sister chromatid exchange (SCE), chromosome aberration (CA) and micronucleus (MN) tests were used for investigating the effects genotoxicity of AA. Replication index (RI) and mitotic index (MI) were also calculated to determine the cytotoxicity of AA. In addition, the anti-genotoxic effects of PG and GA against genotoxicity of AA were also investigated in the absence and presence AA.

These results demonstrate the clastogenic activity of AA *in vivo* and *in vitro* and suggest that its specific effects depend on the dose. AA was observed as a cytotoxic and genotoxic compound. In the, CA, MN, SCE, RI, MI test with (human blood lymphocytes cultured) *in vitro* and (bone marrow cells) *in vivo*, a significant decrease of genotoxicity frequency induced by acrylamide was observed in the presence of gallic acid. It is obvious that GA, may with antioxidative activity, reduced the genotoxicity induced by AA, both in mouse bone marrow cells and human lymphocytes cultured. GA was not genotoxic and cytotoxic however, it had an antigenotoxic effect via decreasing the effects of AA. PG was not genotoxic and cytotoxic. So, we concluded that GA showed a stronger antimutagenic effect than PG according to the frequency of CA, MN, SCE, MI and RI.

Keywords: Acrylamide, Gallic acid, Pelargonidin, Chromosome aberration, Micronucleus, Sister chromatid exchange, Replication index, Mitotic index

7. KAYNAKLAR

1. Abramsson-Zetterberg, L.: The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *J. Mutat. Res.* 535:215-222, 2003.
2. Adler, I. D., Schmid, T. E., Baumgartner, A.: Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the presented data base. *J. Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagens.* 504, 173-182, 2002.
3. Adler, I., Ingwersen, U., Kliesch, A.: Clastogenic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells. *J. Mutat. Res/Gen.Tox.* 206,3,379-385, 1988.
4. Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A.: IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety.* 463,2: 111-72, 2000.
5. Altıntaş, N., Örenay, S., Aşçı, M., Reyhan, E., Türk, M., Yolasığmaz, A.: Karaciğer kist hidatiği tedavisinde albendazol kullanan hastalarda kardeş kromatid değişimi (KKD) Çalışması. *Türkiye Parazitol. Derg.* 29, 4: 235-237, 2005.
6. Aly, F.A., Donya, S.M.: In vivo antimutagenic effect of vitamins C and E against rifampicin-induced chromosome aberrations in mouse bone-marrow cells. *J. Mutat. Res.* 518,1:1-7, 2002.
7. Alzahrani, H.A.S.: Protective effect of l-carnitine against acrylamide-induced DNA damage in somatic and germ cells of mice. *J. Biol. Sci.* 18,1: 29-36, 2011.
8. Amrein, T. M., Bachmann, S., Noti, A., Biedennann, M., Barbosa, M. F., Biedermann-Brem, S., Grob, K., Keiser, A., Realini, P., Escher, F., Amado, R.: Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems. *J. Agric. Food Chem.* 51,5556-5560, 2003.
9. Anderson, D.: Human Biomonitoring. *J. Mutation Res.* 204: 353-541, 1988.

10. Armstrong, M.J., Bean, C. L., Galloway, S.M.: A quantitative assessment of cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells. *J. Mutat. Res.* 265. 45-60, 1992.
11. Aydın, S., Başaran, AA., Başaran, N.: The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *J. Mutat. Res./Gen. Tox. En.* 58,1-2:43-53, 2005.
12. Barch, J.M.: *The act cytogenetic laboratory manual*, Gustashow KM, Ed., Second edition, Raven Press, 1185 avenue of the America, New York, 1991.
13. Becalski, A., Lau, B.P., Lewis, D., Seaman, S.W.: Acrylamide in foods: occurrence, sources and modeling. *J. Agric. Food Chem.* 51,3, 802-808, 2003.
14. Becalski, A., Lau, BP., Lewis, D., Seaman, SW.: Acrylamide in foods; occurrence, source. Los Angeles CA. AOAC. Annual Meeting, 22-26, 2002.
15. Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P.: Phenolic compounds. *J. Food Chem.* 822-835, 2002.
16. Besaratinia, A., Pfeiffer, GP.: DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *J. Mutat Res.* 580: 31-40, 2005.
17. Bianchini, F., Vainio, H.: Allium vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer. *J. Environ. Health. Perspect.* 109,9: 893-902, 2001.
18. Bilaloğlu, G. V., Harmandar, M.: Flavonoidler. *Aktif Yayınevi, İstanbul*, 334-354, 1999.
19. Blasiak, J., Gloc, E., Wozniak, K., Czechowska, A.: Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *J. Chemico-Biological Interac.* 149:137-149, 2004.
20. Bolognesi, C., Filiberti, R., Neri, M., Perrone, E., Landini, E., Canessa, P.A., Simonassi, C., Cerrano, P.G., Mutti, L., Puntoni, R.: High frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes as index of susceptibility to pleural malignant mesothelioma. *J. Cancer Res.* 62: 5418-5419, 2002.
21. Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkilä, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., Norppa, H.: Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human

- cancer independently of exposure to carcinogens. *J. Cancer Res.* 60: 1619-1625, 2000.
22. Bonassi, S., Hansteen, I-L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Šrám, R. J., Kunudsen, L. E., Barale, R., Fucic, A., Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. *J. Mutat. Res.* 600, 1-2: 37-45, 2006.
23. Bonassi, S., Ugolini, D, Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Tucker, J.D.: Human population with cytogenetic biomarkers: Review of the literature and future perspectives. *J. Environ. and Mol. Mutagen.* 45: 258-270, 2005.
24. Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M.: An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *J. Carcinogenesis.* 28: 625-631, 2007.
25. Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H., Hagmar, L.: Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an Epidemiologic Perspective. *J. Cytogenet. Genome Res.* 104: 376-382, 2004.
26. Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Volders, M.K., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Tia, C., Giorgio, D.M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarfi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A.: Human micronucleus project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *J. Environ. Mol. Mutagen.* 37: 31-45, 2001.

27. Bozdoğan, A., A. Canbaş.: Üzümlerin antosiyan bileşiminin şarapçılık açısından önemi. *Dünya Gıda Dergisi*. 7:63-672, 2006.
28. Brown, R.: Formation, occurrence and strategies to address acrylamide in food. Food advisory committee meeting: Acrylamide, U. S. Department of health and human services, U. S. Food and drug administration, center for food safety and applied nutrition, office of plant & dairy foods & beverages 24-25, 2003.
29. Burdurlu, H.S., Karadeniz, F.: Gıdalarda akrilamid oluşumu ve önemi, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, 24-26 Mayıs 2006.
30. Calleman, C. J., Bergmark, E., Stern, L. G., Costa, G. A.: Nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by the neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide. *J. Environ. Health Perspect.* 99, 221-223, 1993.
31. Can, N.Ö.: Akrilamidin gıda maddelerinde oluşumuna etki eden faktörlerin incelenmesi ve miktarının tayini. Anadolu üniversitesi. Sağlık Bil. Ens. Doktora Tezi, Eskişehir, 2007.
32. Cao, J., Beisker, W., Nüsse, M., Adler, I.D.: Flow cytometric detection of micronuclei induced by chemicals in poly-and normochromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *J. Mutagenesis*. 8,6:533-541, 1993.
33. Carrano, A.V., Natarajan, A.T.: Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. *J. Mutation Res.* 204: 379-406, 1988.
34. Cemeroglu, B.: Meyve ve sebze işleme teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara. 77-88, 2004.
35. Chapin, R. E., Fail, P. A., George, J. D., Grizzle, T. B., Heindel, J. J., Harry, G. J., Collins, B. J., Teague, J.: The reproductive and neural toxicities of acrylamide and three analogues in Swiss mice, evaluated using the continuous breeding protocol. *J. Fundam. Appl. Toxicol.* 27, 9-24, 1995.
36. Cihák, R., Vontorková, M.: Cytogenetic effects of acrylamide in the bone marrow of mice. *J. Mutation Res.* 209,1-2:91-4. 1988.
37. Claeys, W.L., Vleeschouwer, K.D., Hendrickx, M.E.: Quantifying the formation of carcinogens during food processing acrylamide. *J. Food. Sci. and Tech.* 16, 181-193.1, 2005.

38. Cole, R.J., Taylor, N.A., Cole, J., Arlett, C.F.: Short terms tests for transplacentally active carcinogens. I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. *J. Mutation Res.* 80, 141-157, 1981.
39. Cole, R.J., Taylor, N.A., Cole, J., Arlett, C.F.: Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test. *J. Nature.* 277, 317-318, 1979.
40. Costa, L. G.: Biomarker research in neurotoxicology: the role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *J. Environ. Health Perspect.* 104,55-67, 1996.
41. Çelik, A., Mazmancı, B., Çamlıca, Y., Aşkın, A., Çömelekoğlu, Ü.: Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. *J. Mutation Res.* 539, 91-97, 2003.
42. Çelik, E., Çelik, G.Y.: Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi.* 5,2: 1-6. 2007.
43. Çıkrıkçı, S.: 4'-dioktilamino-3-hidroksiflavon temelli floresans problemlerin sentezleri ve özelliklerinin incelenmesi. İ.T.Ü. Fen Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2005.
44. Delazar, A., Çelik, S., Göktürk, R.S., Ünal, O., Nahar, L., Sarker, S.D.: Two acylated flavonoid glycosides from *stachys bombycina*, and their free radical scavenging activity. *J. Pharmazie.* 60,11: 878-880, 2005.
45. Dellarco, V. L., Mavourın, K. H., Tice, R. R.: Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *J. Environ. Mutagen.* 7: 405-424, 1985.
46. Demirel, S., Zamani, A.G.: Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg.* 12, 3, 123-127, 2002.
47. Dobrzyńska, M., Lenarczyk, M., Gajewski, A.K.: Induction of dominant lethal mutations by combined X-ray-acrylamide treatment in male mice. *J. Mutation Res. Fund. Mol. Mutagenes.* 232, 2, 209-215, 1990.
48. EEC.: Directive 79/831 Part B: Methods for the determination of toxicity. B.12. Other effects, Mutagenicity, Micronucleus test. 251, 137-139, 1984.

49. Egel, C., Bilaloğlu, R., Aydemir, N.: Inhibitory effects of ascorbic acid and folic acid on chromosome aberrations induced by pyrimethamine in vitro. *J. Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22,5:353-62, 2002.
50. Elhajouji, A., Tibaldi, F., Volders, K.M.: Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human Lymphocytes. *J. Mutagenesis.* 12:133-140, 1997.
51. Ergün, S.: Sjögren Sendromlu hastalarda genomik instabilitenin sitogenetik bir biomarker olan kardeş kromatid değişim sıklığı yöntemiyle araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bil. Ens. Ağız, Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2005.
52. Eryiğit, F.: *Mentha Pulegium L.* ve *Salvia Tomentosa Miller* bitkilerinin metanol Özütlelerinin in vitro antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2006.
53. European Union Risk Assessment Report: Acrylamide. Luxemburg, 210. European Union. 2002.
54. FAO/WHO, Acrylamide in food network. Acrylamide Infonet. <http://www.acrylamide-food.org/index.htm>, 2012.
55. Fenech, M, Morley, AA.: Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation. *J. Mutat. Res.* 161, 193-198, 1986.
56. Fenech, M., Crott, W.J.: Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *J. Mutat. Res.* 504: 131-136, 2002.
57. Fenech, M., Morley, A.A.: Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *J. Cytobios.* 43, 233-246, 1985.
58. Fenech, M.: Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *J. Toxicol.* 181: 411-416, 2002.
59. Fenech, M.: The in micronucleus technique. *J. Mutat. Res.* 455: 81-95, 2000.

60. Fenech, M.: The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *J. Health Phys.* 98,2: 234-243 2010.
61. Frank, J.: Dietary phenolic compounds and vitamin E bioavailability model studies in rats and humans. Doctoral dissertation ISSN 1401-6249, isbn 91-576-6453-6, 2004.
62. Galloway, S.M., Miller, J.E., Armstrong, M.J., Bean, C.L., Skopek, T.R., Nichols, W.W.: DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and nonDNA-reactive clastogens. *J. Mutat. Res.* 400,169-186, 1998.
63. Gasiowski, K., Szybaa, K., Brokosa, B., Kolaczyńska, B., Jankowiak-Włodarczyka, M., Oszmiański, J.: Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *J. Cancer Lett.* 119,1,37-4628, 1997.
64. Gertz, C., Klostermann, S.: Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deepfried products. *J. Lipid Sci. Technol.*, 104:762-771, 2002.
65. Gollapudi, B.B., McClintock, M.L., Linscombe, V.A., Sinha, A.K.: Evaluation of the effect of food deprivation on micronucleus test results. *J. Toxicol Lett.* 21, 353-356, 1984.
66. Göç Rasgele, P.: Delvosid'in *Mus musculus* Üzerine Toksik Etkisi. Trakya Üniversitesi. Fen Bil. Ens. Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Edirne, 2008.
67. Gutierrez-Esplata, G. A., Hughes, L. A., Piegorsch, W. W., Shelby, M. D., Generoso, W. M.: Acrylamide: dermal exposure produces genetic damage in male mouse germ cells. *J. Fundam. Appl. Toxicol.* 18, 189-192, 1992.
68. Gül, S., Demirci, B., Başer, K.H.C., Akpulat, H.A., Aksu, P.: Chemical composition, and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *J. B. Environ. Contam. Tox.* 88,5, 666-671, 2012.
69. Gül, S., Savsar, A., Tayfa, Z.: Cytotoxic and genotoxic effects of sodium hypochlorite on human peripheral lymphocytes in vitro. *J. Cytotechnology.* 59,2, 113-119, 2009.
70. Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Mikoczy, Z., Lando, C., Hansteen, IL., Montagud, AH., Knudsen, L., Norppa, H., Reuterwall, C., Tinnerberg,

- H., Brogger, A., Forni, A., Hogstedt, B., Lambert, B., Mitelman, F., Nordenson, I., Salomaa, S., Skerfving, S.: Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *J. Mutat Res.* 405,2:171-8, 1998.
71. Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Högstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S., Sorsa, M.: Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *J. Cancer Res.* 54: 2919-2922, 1994.
72. Hagmar, L., Tornqvist, M., Nordander, C., Rosen, I., Bruze, M., Kautianen, A., Magnusson, A.L., Malmberg, B., Aprea, P., Granath, F., Axmon, A.: Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *J. Work Environ. Health.* 27, 219-226, 2001.
73. Hamurcu, Z., Altunbaş-Dönmez, H., Patiroğlu, T.: Basal level micronucleus frequency in stimulated lymphocytes of untreated patients with leukemia. *J. Cancer Genet. Cytogen.* 180,140-144, 2008.
74. Hart, J.W., Hartley-Asp, B.: Introduction of micronuclei in the mouse. Revised timing of the final stage of erythropoiesis. *J. Mutat. Res.* 120, 127-132, 1983.
75. Háznagy-Radnai, E., Czige, S., Zupkó, I., Falkay, G., and Máthe, I.: Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six stachys species. *J. Fitoterapia.* 77,7-8: 521-524, 2006.
76. He, F. S., Zhang, S. L., Wang, H. L., Li, G., Zhang, Z. M., Li, F. L., Dong, X. M., Hu, F.: Neurological and electroneuromyographic assesment of the adverse effects of acrylamide on occupational exposed workwers. *J. Work Environ. Health.* 15, 125-129, 1989.
77. Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., VanparyS, P.,Mac Gregor, J.T.: Micronuclei as an index of

- cytogenetic damage: Past, present, and future. *J. Environ. and Mol. Mutagen.* 18: 277-291, 1991.
78. Heddle, J.A., Countryman, R.I.: The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *J. Mutat. Res.* 41, 321-332, 1976.
79. Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W., Salamone, M.F.: The induction of micronuclei as measure of genotoxicity. A report of the U.S.Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *J. Mut. Res.* 123, 61-118, 1983.
80. Heddle, J.A.: A rapid in vivo test for chromosomal damage. *J. Mutat. Res.* 18, 187-190, 1973.
81. Hilliard, C.A., Armstrong, M.L., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K., Galloway, S.M.: Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of non-mutagenic chemicals and metabolic poisons. *J. Environ. Mol. Mutagen.* 31,4:316-26, 1998.
82. Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B.: Analysis and Health Effects of Flavonoids. *J. Food. Chem.* 57: 43-46, 1996.
83. Högstedt, B., Karlsson, A.: The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *J. Mutat. Res.* 156, 229-232, 1985.
84. Hudson, B., *Food Antioxidants.* J. Elsevier Science. 173-188, 1990.
85. IARC (International Agency for Research on Cancer) : IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 60: Some Industrial Chemicals, Geneva, Switzerland. 389-433, 1997.
86. IARC (International Agency for Research on Cancer): Acrylamide, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, some industrial chemicals, vol. 60. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 60, 389- 443, 1994.
87. İpek, E., Tüylü, B.A., Zetinoğlu, H.: Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *J. Cytotechnology.* 43,1-3:145-148, 2003.

88. İpek, E., Zeytinoğlu, H., Okay, S., Tüylü, B.A., Kürkcüoğlu, M., Başer, K.H.C.: Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *J. Food Chem.* 93:551-556, 2005.
89. Jamet, A., Ebeling, P.W.: Stabilization mechanisms for anthocyanin: The case for copolymerization reactions. *Engineering and Food for the 21st Century*. 1-4, 2002.
90. Jiang, L., Cao, J., An, Y., Geng, C., Qu, S., Jiang, L., Zhong, L.: Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *J. Toxicol. in Vitro.* 21,8,1486-1492, 2007.
91. Johnson, K.A., Gorzinski, S.J., Bodner, K.M., Campbell, R.A., Wolf, D.C., Friedman, M.A., Mast, R.W.: Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Appl. Pharm.* 85: 154-168, 1986.
92. Khanum, F., Anilakumar, K.R., Viswanathan, K.R.: Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *J. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44,6: 479-488, 2004.
93. Kirkland, D.J., Muller, L.: Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *J. Mutat. Res.* 464, 2000.
94. Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P.: The In vitro micronucleus test: A multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *J. Mutat. Res.*, 392,1-2: 19-30, 1997.
95. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, J.M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrales, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A.: Report from the in vitro micronucleus assay working group. *J. Mutat. Res.* 540, 153-163, 2003.
96. Konings, E.J.M., Baars, A.J., van Klaveren, J.D., Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Hiemstra, M., van Kooij, J.A., Peters, P.W.J., Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *J. Food Chem. Toxicol.* 41: 1569-1579, 2003.

97. Kukić, J., Petrović, S., Niketic, M.: Antioxidant activity of four endemic stachys taxa. *J. Biol. Pharm. Bull.* 29,4: 725-729, 2006.
98. Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J.: Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sisterchromatid exchanges and micronuclei. *J. Mutat. Res.* 491, 163-172, 2001.
99. Lindholm, C., Norppa, H., Hayashi, M., Sorsa, M.: Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures. *J. Mutat. Res.* 260: 369-375, 1991.
100. LoPachin, RM., Canady, RA., Acrylamide toxicities and food safety: Session IV Summary and Research Needs. *J. NeuroToxicology.* 25: 507-509, 2004.
101. Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K.: Food Antioxidants: Technological, toxicological and health perspectives. *Markel Dekker, Newyork*, 41-50, 1996.
102. Madle, S., Beek, B., Nowak, C.: Zum Verständnis von chromosomenmutationstests an somazellen. *Mutationsforschung und Genetische Toxikologie.* In: Fahrigr R.ed, Wissenschaftliche Buchgesellschaft Publishers, 224-242, 1993.
103. Matkowski, A., Piotrowska, M.: Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *J. Fitoterapia.* 77: 346-353, 2006.
104. Mavournin, KH., Blakey, DH., Cimino, M.C., Salamone, M.F., Heddle, J.A.: The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *J. Mutat. Res.* 239, 29-80, 1990.
105. Mei, N., Hu, J., Churchwell, M.I., Guo, L., Moore, M.M., Doerge, D.R., Chen, T.: Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells. *J. Food Chem. Tox.* 46. 2: 628-636, 2008.
106. Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T.: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *J. Nature.* 419, 448-449, 2002.
107. Mucci, L., Dickman, P., Steineck, G., Adami, H., Augustsson, K.: Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney and bladder: Absence of an

- association in a population-based study in Sweden. *J. Brit. Cancer.* 88, 84-89, 2003.
108. Naczki, M., Shahidi, F.: Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.* 1054, 95-111, 2004.
109. Natarajan, A. T., Obe, G.: Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Cytogenetic Assays. In: Heddle JA(ed) *Mutagenicity. New Horizons in Genetic Toxicology.* Academic Press, New York, 1-213, 1982.
110. Nefic, H.H.: Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. *J. Mutat Res* 498,1-2:89-98, 2001.
111. Norppa, H., Falck, G.M.: What do human micronuclei contain. *J. Mutagenesis*, 18,3: 221-233, 2003.
112. Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C.: Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis- blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *J. Mutagenesis.* 8, 519-525, 1993.
113. OECD. Guideline for testing of chemicals. *Genetic Toxicology: Micronucleus test, Document, 474, 1-6, 1983.*
114. OECD.: Environment, health and safety publications series on testing and assessment. No. XX, draft detailed review paper on transgenic rodent mutation assays, environment directorate organisation for economic co-operation and development, Paris, 1-593, 2005.
115. Okur, Ö.D., Seydim, Z.G.: Gıdalarda ısıll işlem sonucunda oluşan kanserojen ve mutajen maddeler. Süleyman Demirel Üniversitesi. *Fen Bil. Ens. Dergisi.* 8-3, 80-85, 2004.
116. Özalpan, A.: Temel Radyobioloji, Haliç Üniversitesi Yay. No: 3001, 1. Basım, 67-74, 2001.
117. Padma, V.V., Sowmya, P., Arun, T. Felix., Baskaran, R., Poornima, P.: Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. *J. Food Chem. Tox.* 49, 4: 991-998 2011.
118. Paulsson, B., Grawe, J., Törnqvist, M.: Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-

- methylolacrylamide treatment. *J. Mutat. Res. Gen.Tox. En.* 516,1-2: 101-111, 2002.
119. Paz-y-mino, C., Bustamante, G., Sanchez, M.E., Leone, P.E.: Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in ecuador. *J. Environ. Health Perspective.* 110: 1077-1080, 2002.
120. Peterson, J., Dwyer, J., Bhagwat, S., Haytowitz, D., Holden, J., Eldridge, A.L., Beecher, G., Aladesanmi, J.: Major flavonoids in dry tea. *J. Food Compos. Anal.* 18, 487-501,137-147, 2005.
121. Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F., Shelby, M.: Mammalian in vivo cytogenetic assays Anaylsis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *J. Mutat. Res.* 189:157-165, 1987.
122. Rabbani, S.I., Devi, K., Zahra, N.: Anticlastogenic effects of citral. *Iranian J. Pharmacology & Therapeuticsijpt.* 4, 28-31, 2005
123. Rice, J.M.: The carcinogenicity of acrylamide. *J. Mutat. Res.* 580:3-20, 2005.
124. Richmond, P., Borrow, R.: Acrylamide in Food. *J. The Lancet.* 361,2: 361-362, 2003.
125. Ritesh, J., Sanmati, K. J.: Effect of buchanania lanzan spreng. bark extract on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *J. Asian Pac. J. Trop. Med.* 5,3.187-191, 2012.
126. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W.: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *J. Food Chem.* 66, 401-436, 1999.
127. Robert, F., Vuataz, G., Polien, P., Saucy, F., Alonso, M. I., Bauwens, I., Blank, I.: Acrylamide formation from asparagine under low-moisture Maillard reaction conditions. 1. Physical and chemical aspects in crystalline model systems. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6837-6842, 2004.
128. Rothfub, A., Schütz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W.: Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCAI Mutation in Breast Cancer Families. *J. Cancer Res.* 60: 390-394, 2000.

129. Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Elberhard, E., Kreinberg, R., Vogel, V., Speit, G.: Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. *J. Cancer Res.*, 60:390-394, 2000.
130. Roy, M., Sen., Chakraborti.A.S.: Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: Implication for glycation-induced hemoglobin modification. *J. Life Sci.* 82, 21-22: 1102-1110, 2008.
131. Ruden, C.: Acrylamide and cancer risk—expert risk assessments and the public debate. *J. Food Chem. Toxicol.* 42, 335-349, 2004.
132. Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., Törnqvist, M.: Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7012-7018, 2003.
133. Sakamoto, J., Hashimoto, K.: Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice-effects on fertility and sperm morphology. *J. Arch. Toxicol.* 59, 201- 205, 1986.
134. Salamone, MF., Heddle, J.A.: The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol.in:F.J. de Serres, Ed. *Chemical Mutagens*. Plenum, New York, 1983.
135. Saldamlı, İ. *Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 2007.
136. Sato, S., Tomita, I.: Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances: Current status and problems of an in vivo rodent micronucleus Assay. *J. Health Sci.* 4,1,1-8, 2001.
137. Savage, J.R.K., Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *J. Env. Mol. Mutagen.* 22: 198-207, 1993.
138. Schmid, W.: The micronucleus test for cytogenetic analysis. in: A. Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, Plenum, New York, 1976.
139. Schmid, W.: The micronucleus test. *J. Mutat. Res.* 31:9-15, 1975.
140. Sellapan, S., Akoh, C.C., Krewer, G.: Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia grown blueberries and blackberries. *J. Agr. Food Chem.* 50, 2432-2438, 2002.

141. Seoane, A.I., Dulout, F.N.: Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *J. Mutat. Res.* 490: 99-106, 2001.
142. Seyed, J.H., Mohammad A.: Atefeh Jahan Abadic Protective effect of hawthorn extract against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mouse bone marrow cells. *J. Environ. Toxicol. and Phar.* 25,1: 51-56, 2008.
143. Shahidi, F., Naczk, M.: Food Phenolics. Technomic publishing company book, Lanchester, USA, 1995.
144. Shelby, M. D., Cain, K.T., Cornett, C.V., Generoso, W. M.: Acrylamide: induction of heritable translocations in male mice. *J. Environ. Mutagen.* 9, 363-368, 1987.
145. Siddique, Y. H., Afzal, M.: Antigenotoxic effect of apigenin against mitomycin C induced genotoxic damage in mice bone marrow cells. *J. Food Chem. Toxicol.* 47,3: 536-539, 2009.
146. Siddique, Y.H., Ara, G., Beg, T., Afzal, M.: Possible Modulating Action of plant infusion of *Ocimum sanctum* L. on chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges induced by chlormadinone acetate in human lymphocytes in vitro. *J. Environ. Biol.* 29,6: 845-848, 2008.
147. Smimizu, N., Shimura, T., Tanaka, T.: Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *J. Mutat. Res.* 448: 81-90, 2000.
148. Sowjanya, B.L., Devi, K.R., Madhavi, D.: Modulatory effects of garlic extract against the cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocytes in vitro. *J. Environ. Biol.*, 30,5: 663-666, 2009.
149. Speit, G., Haupter, S., On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences Between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *J. Hum. Genet.* 70, 126-129, 1985.
150. Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M.C., Riediker, S.: Acrylamide from maillard reaction products. *J. Nature* 419, 449-450, 2002.

151. Stadler, R., Scholz, G.: Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation and potential strategies of control. *J. Nutrition Reviews*. 62,12: 449-467, 2004.
152. Stadler, R.H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J. Blank, I.: In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction, *J. Agric. Food Chem.* 52, 5550-5558, 2004.
153. Stadler, R.H., Verzeegnassi, L., Varga, N., Grigorov, M., Studer, A., Riediker, S., Schilter, B.: Formation of vinylogous compounds in model maillard reaction systems. *J. Chem. Res. Toxicol.* 16, 1242-1250, 2003.
154. Surrallés, J., Carbonell, E., Puig, M., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R.: Induction of mitotic micronuclei by the pyrethroid insecticide fenvalerate in cultured human lymphocytes. *J. Toxicol. Lett.* 54: 151-155, 1990.
155. Svensson, K., Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellenas, K.E., Lind, Y., Rosen, J.: Dietary intake of acrylamide in Sweden. *J. Food Chem. Toxicol.* 41,1581-1586, 2003.
156. Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Starller, R. H., Gonde, P., Van Eijck, P., Lalljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Muller, D., Talmadge, D., O'Brien, J., Thompson, S., Silvani, D., Whitnmore, T.: A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation and control. *J. Food Sci.* 44,323-347, 2004.
157. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M.: Acrylamide: a cooking carcinogen. *J. Chem. Res. Toxicol.* 13,6: 517-522, 2000.
158. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M.: Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50,17: 4998-5006, 2002.
159. Tawn, E.J., Whitehouse, C.A.: Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. *J. Mutat. Res.* 490: 171-177, 2001.

160. Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E. K., Fenech, M.: Buccal micronucleus cytome assay. *J. Nat. Protoc.* 4,6: 825-837, 2009.
161. Titenko-Holland, N., Ahlborn, T., Lowe, X., Shang, N., Smith, M.T., Wyrobek, A.J.: Micronuclei and developmental abnormalities in 4-day Mouse embryos after paternal treatment with acrylamide. *J. Environ. Mol. Mutagen.* 31:206-217, 1998.
162. Toksi, G., Stankovi, M., Radovanovi, S., Dragi, M.: The use of cytochalasin block (CB) micronucleus test to identify clastogenic and antiproliferative action. *J. Archi ve of Oncology.* 9: 47-48, 2001.
163. Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E.: Sitogenetik. Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü. s. 68. 1995.
164. Topaktaş, M., Speit, G.: Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. *Ç. Ü. Sağlık Bil. Der.* 5,1, 2, 3, 73-84, 1990.
165. Tornqvist, M., Acrylamide in food: The discovery and its implications, In: Chemistry and safety of acrylamide in food, Friedman, M., Mottram, D., Springer Science Business Media, Inc., New York, 1-19, 2005.
166. Tritscher, A.: Human health risk assessment of processing-related compounds in food. *J. Toxicol. Lett.* 149 177-186, 2004.
167. Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Dearfield, K.L., Jacobsonkram, D., Tice, R.R., Carrano, A.V.: Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. *J. Mutat. Res.* 297: 101-180, 1993.
168. Turker, N., Aksay, S., Ekiz, H.I.: Effects of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: shalgam. *J. Agr. Food Chem.* 52, 3807-3813, 2004.
169. Umegaki, K., Fenech, M.: Cytokinesis-block micronucleus assay in WILZ-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *J. Mutagenesis*, 15: 261-269, 2000.
170. Vainio, H.: Acrylamide in heat-processed foods- a carcinogen looking for human cancer. *J. Epidemiol.* 18: 1105-1106, 2003.

171. Vanderkerken, K., Vanparys, P., Verschaeve, L., Kirsch-Volders, M.: The Mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *J. Mutagenesis*, 4, 6-11, 1989.
172. Vanparys, P., Deknudt, G., Vermeiren, F., Sysmans, M., Marsboom, R.: Sampling times in micronucleus testing. *J. Mutat. Res.* 282, 191-196, 1992.
173. Vijayalaxmi, K.K., Venu, R.: In-vivo anticlastogenic effects of L-Ascorbicacid in mice. *J. Mutat. Res.* 438, 47-51, 1999.
174. Vock, E.H., Lutz, W.K., Hormes, P., Hoffmann, H.D., Vamvakas, S.: Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100 and γ -irradiation. *J. Mutat. Res.* 413, 83-94, 1998.
175. Von Ledebur, M., Schmid, W.: The micronucleus test, Methodological Aspects. *J. Mutat. Res.* 19, 109-117, 1973.
176. Von Mühlendahl, K.E., Otto, M.: Acrylamide: more than just another food toxicant. *J. Pediatr.* 162: 447-448, 2003.
177. Wise, L. D., Gordon, L. R., Soper, K. A., Duchai, D. M., Morissey, R. E.: Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dawley rats. *J. Neurotoxicol. Teratol.* 17, 189-198, 1995.
178. Wnorowski, A., Yaylayan, V.: Monitoring carbonyl-amine reaction between pyruvic acid and α -amino alcohols by FTIR spectroscopy – A possible route to Amadori products. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6537-6543, 2003.
179. Wu, J., Lyons, G.H., Graham, R.D., Fenech, M.: The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *J. Mutat. Res.* 24,3 :225-232, 2009.
180. Yang, H.J., Lee, S.H., Jin, Y., Choi, J.H., Han, C.H., Lee, M.H.: Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *J. Vet. Sci.* 6, 2:103-109, 2005.
181. Yang, R., Tsao, R., Optimization of a new mobile to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a tool phenolic index using high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1018, 29-40, 2003.

182. Yaylayan, V.A., Locas, C.P., Wnorowski, A., O'Brien, J.: Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids, In: Chemistry and safety of acrylamide in food, Friedman, M., Mottram, D.S., Eds.: Springer Science Business Media, Inc., New York, US, 191-203, 2005.
183. Yaylayan, V.A., Stadler, R.H.: Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective. *J. AOAC Int.*, 88, 262-267, 2005.
184. Yener Y.: Akrilamit uygulanan sıçanların kemik iliği hücrelerinde mitotik aktivite ile emperipolez ve mikronükleus sıklığının belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bil. Ens. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya, 2008.
185. Yener, Y., Dikmenli, M.: Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment. *J. Food Chem. Toxicol.* 47, 8, 2120-2123, 2009.
186. Zhang, Y., Dong, Y., Ren, Y., Zhang, Y.: Rapid determination of acrylamide contaminat in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector. *J. Chromatogr. A.* 1116, 1-2:209-16, 2006.
187. Zyzak, D.V., Sanders, R.A., Stojanovic, M., Tallmadge, D.H., Eberhart, B.L., Ewald, D.K., Gruber, D.C., Morsch, T.R., Strothers, M.A., Rizzi, G.P., Villagran, M.D.: Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4782-4787, 2003.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kars'ın Kağızman ilçesinde, 15.03.1983 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kağızman' da tamamladı. 2001 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ordu Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2005 yılında bu bölümden Biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zooloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. Haziran 2007' de Uzman Biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı. 2010 yılı Ocak ayında Doktora yaptığı Ana Bilim Dalı'na Araştırma görevlisi olarak atandı.