

**RATLARDA, AKRİLAMİD KAYNAKLI OLASI
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE KROSİNİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**2017
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

Sema GEDİK

**RATLARDA, AKRİLAMİD KAYNAKLI OLASI OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE KROSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sema GEDİK

**Karabük üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**KARABÜK
Mayıs 2017**

Sema GEDİK tarafından hazırlanan “RATLARDA, AKRİLAMİD KAYNAKLI OLASI OKSİDATİF STRES ÜZERİNE KROSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doc. Dr. Eyüp ALTINÖZ
Tez Danışmanı, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 25/05/2017

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

Başkan : Prof. Dr. Hafize UZUN (İÜ)

Üye : Doç. Dr. Eyüp ALTINÖZ (KBÜ)

Üye : Yrd. Doç. Dr. İsmail HASKUL (KBÜ)

İmzası



...../...../2017

KBÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nevin AYTEMİZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü





“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Sema GEDİK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RATLARDA, AKRİLAMİD KAYNAKLI OLASI OKSİDATİF STRES ÜZERİNE KROSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sema GEDİK

**Karabük Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Eyüp ALTINÖZ

Mayıs 2017, 101 sayfa

Bu çalışmada, ratlara akrilamid uygulanarak oksidatif strese bağlı oluşan oksidatif hasarın güçlü bir antioksidan özelliğe sahip krosin ile tedavi edilmesi amaçlanmıştır. Akrilamidin (AA) yüksek dozları canlılar için genotoksik, kanserojenik ve nörotoksiktir. Besinlerin yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi ile akrilamid oluşmaktadır. Bu besinlerin tüketilmesiyle insanların vücuduna AA alınmaktadır. Gıdalarla alınan akrilamidin insan vücudunda ne tür hasarlara sebep olacağı tam bilinmediğinden dolayı gıda kaynaklı akrilamidin insan sağlığını tehdit edebileceği düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), insanlarda 1mg akrilamidin her 100.000'de 1 kişide kansere sebep olduğunu belirlemiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi akrilamidin insan sağlığı üzerine olan etkisini 'insanlar için büyük olasılıkla bir kanserojen' ifadesini kullanmıştır. Avrupa birliği sınıflandırma sistemine göre akrilamid karsinojen, mutajen ve üreme sistemi üzerinde toksik etki bırakmaktadır.

Doğal olarak bu etkinin oral yolla tek doz alımı sonrası ortaya çıktığı da belirtilmiştir. Oksidatif stres, hücrelerde Serbest Oksijen Radikallerinin (SOR) miktarının çok fazla yükselmesi veya hücrelerde bulunan antioksidanların azalması sonucu oksidanların artması durumudur. Böylece SOR yeterli düzeyde detoksifiye edilemediğinden dolayı hücrenin makromoleküllerine (nükleik asit, protein, karbonhidrat, lipid) zarar vererek oksidatif hasarlar meydana getirirler. Hücrelerin savunmasında redükte glutatyon (GSH) radikallerin oluşturduğu hasara karşı korunmasında çok önemlidir. GSH güçlü nükleofil özelliğinden dolayı SOR ile direk reaksiyona girerek okside ürünlerin süpürülmesini sağlar.Hücrelerin GSH içeriğı farklılık gösterdiği için farklı hücrelerin oksidatif strese karşı cevabıda farklı olmaktadır.

Çalışmamızda 21 gün süre ile ratlara akrilamid ve krosin uygulanarak ince bağırsak, kalın bağırsak, karaciğer ve kan numuneleri alınmıştır. Alınan bu dokuların histopatolojik incelemeleri ve GSH, malondialdehid (MDA), superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), total antioksidan (TAS) ve total oksidan (TOS) seviyelerine ve kanda AST, ALT ve ALP seviyelerine bakılarak ve akrilamid tarafından oluşan değışikliklerin krosin tarafından hangi oranda giderilebildiğine bakılmıştır.

Anahtar Sözcükler : Akrilamid, krosin, oksidatif stres, GSH, MDA, antioksidan.

Bilim Kodu : 201.1.020

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CROCINE ON POSSIBLE OXIDATIVE STRESS WITH ACRYLAMIDE

**Karabük University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

**Thesis Advisor
Assoc. Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ**

May 2017, 101 pages

In this study, it was aimed to treat oxidative damage caused by oxidative stress by applying acrylamide to rats with crocin, which has a strong antioxidant property. High levels of acrylamide (AA) are genotoxic, carcinogenic and neurotoxic for the living. The cooking of foods at high temperatures causes the formation of akrilalids in low quantities and is consumed by the human body by consuming these foods. Food-borne acrylamide is thought to threaten human health because it is not known exactly what causes damage to the human body.

The World Health Organization (WHO) has determined that 1 mg of acrylamide in humans causes cancer in one person every 100,000. The International Center for Cancer Research has used the effect of acrylamide as a carcinogen for humans, most probably for humans. According to the European Union classification system, acrylamide has a toxic effect on carcinogen, mutagen and reproductive system. Naturally, this effect has also been shown to occur after oral administration of a

single dose. Oxidative stress is a condition in which the amount of Free Oxygen Radicals (SOR) in the cells is increased too much or the antioxidants in the cells are reduced and the resulting oxidant / antioxidant balance is destroyed in favor of the oxidants. In this case, SOR causes oxidative damage by attacking the macromolecules of the cell (lipid, protein, carbohydrate, DNA) because SOR can not be sufficiently detoxified. In the defense of cells it is very important to protect against damage caused by reductive glutathione (GSH) radicals. Due to its strong nucleophilic nature, GSH reacts directly with SOR to sweep up the oxidation products. Because the GSH content of cells differs, different cells are different in response to oxidative stress.

In our study, small intestine, large intestine, liver and blood samples were taken by applying acrylamide and crocin to rats for 21 days. The histopathologic analyzes of these tissues and the changes of AH, ALT and ALP levels and the changes caused by acrylamide were investigated in the levels of GSH, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total antioxidant (TAS) and total oxidant It has been looked at by the cross where it can be removed.

Key Word : Acrylamide, crocin, GSH, MDA, oxidative stress, antioxidant.

Science Code : 201.1.020

TEŞEKKÜR

Bu tez alıőmasının planlanmasında, araőtırılmasında, yürütölmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıőmamı bilimsel temeller ışığında őekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Eyüp ALTINÖZ'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Deneylein yapılmasında yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi öğretim üyesi Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e, Zeynep AKSUNGUR'a ve Mehmet Erman ERDEMLİ' ye teőekkürlerimi sunarım.

Bu yolda benimle birlikte yürüyen manevi ve maddi desteğini esirgemeyen başta sevgili eşim ve annem olmak üzere tüm aileme sabır ve yardımları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
GENEL BİLGİLER	4
2.1. AKRİLAMİDİN KİMYASI.....	6
2.2. GIDALARDA AKRİLAMİD OLUŞUMU VE MAİLLARD REAKSİYONU	7
2.3. AKRİLAMİD METABOLİZMASI	12
2.4. AKRİLAMİDİN TOKSİK ETKİLERİ	13
2.4.1. Tek Doz Toksisitesi	13
2.4.2. Kronik Doz Toksisitesi	13
2.4.2.1. Nörotoksik Etkisi	13
2.4.2.2. Genotoksik Ve Karsinojenik Etkisi	14
2.5. OKSİDATİF STRES VE ETKİLERİ.....	15
BÖLÜM 3	17
ANTİOKSİDANLAR VE ETKİLERİ.....	17

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 4	20
TEZ ÇALIŞMASINA DAHİL EDİLEN PARAMETRELER	20
4.1. REDÜKTE GLUTATYON (GSH)	20
4.2. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)	21
4.3. KATALAZ (CAT)	21
4.4. AMİNOTRANSFERAZLAR (AST VE ALT)	22
4.5. ALKALEN FOSFATAZ (ALP).....	24
4.6. LİPİD PEROKSİDASYONU VE MALONDİALDEHİT (MDA)	24
BÖLÜM 5	26
GEREÇ VE YÖNTEM	26
5.1. GEREÇLER	26
5.1.1. Kimyasal Malzemeler	26
5.1.2. Kullanılan Aletler	26
5.1.3. Ratların Temini Ve Bakımı	26
5.2. YÖNTEMLER	27
5.2.1. Grupların Oluşturulması	27
5.2.2. Numune Alınması Ve Hazırlık İşlemleri	27
5.2.3. Redükte Glutatyon (GSH) Analizi.....	28
5.2.3.1. Kullanılan Reaktifler.....	28
5.2.4. MDA Analizi	28
5.2.4.1. Kullanılan Reaktifler.....	28
5.2.5. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü	29
5.2.5.1. Kullanılan Reaktifler.....	29
5.2.6. CAT Aktivitesi Ölçümü.....	29
5.2.7. Total Oksidan Seviyesinin (TOS) Ölçümü.....	30
5.2.8. Total Antioksidan Seviyesinin (TAS) Ölçümü	30
5.2.9. Histolojik İnceleme.....	30
5.2.10. İstatistiksel Analizler	31
BÖLÜM 6	32
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32

	<u>Sayfa</u>
6.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR	32
6.1.1. Grupların Karaciğer MDA Düzeyleri.....	32
6.1.2. Grupların Karaciğer GSH Düzeyleri.....	33
6.1.3. Grupların Karaciğer SOD Aktivite Düzeyleri.....	33
6.1.4. Grupların Karaciğer CAT Aktivite Düzeyleri.....	34
6.1.5. Grupların Karaciğer TAS Düzeyleri	35
6.1.6. Grupların Karaciğer TOS Düzeyleri	36
6.1.7. Grupların İncebağırsak MDA Düzeyleri.....	37
6.1.8. Grupların İncebağırsak GSH Düzeyleri	38
6.1.9. Grupların İncebağırsak SOD Aktivite Düzeyleri	39
6.1.10. Grupların İncebağırsak CAT Aktivite Düzeyleri	40
6.1.11. Grupların İncebağırsak TAS Düzeyleri.....	41
6.1.12. Grupların İncebağırsak TOS Düzeyleri.....	42
6.1.13. Grupların Kalınbağırsak MDA Düzeyleri.....	43
6.1.14. Grupların Kalınbağırsak GSH Düzeyleri	44
6.1.15. Kalınbağırsak SOD Aktivite Düzeyleri.....	45
6.1.16. Grupların Kalınbağırsak CAT Aktivite Düzeyleri	46
6.1.17. Grupların Kalınbağırsak TAS Düzeyleri.....	47
6.1.18. Grupların Kalınbağırsak TOS Düzeyleri.....	48
6.1.19. Serum Biyokimyasal Analizler	49
6.2. HİSTOLOJİK BULGULAR	51
BÖLÜM 7	66
SONUÇLAR	66
EK AÇIKLAMALAR A. BİYOKİMYASAL ANALİZLER VE HASAR SKORLARI.....	76
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Akrilamidin kimyasal yapısı	7
Şekil 2.2. Asparajin ve şekerin karbonil grubunun etkileşimi sonucu ve AA oluşumu	8
Şekil 2.3. Maillard reaksiyonu ve akrilamid oluşumu	9
Şekil 2.4. Akrilamid sentezi	10
Şekil 3.1 Krosin yapı formülü	18
Şekil 4.1. GSH'ın moleküler yapısı	20
Şekil 6.1. Grupların karaciğer MDA düzeyleri	33
Şekil 6.2. Grupların karaciğer GSH düzeyleri	34
Şekil 6.3. Grupların karaciğer SOD aktivite düzeyleri	35
Şekil 6.4. Grupların karaciğer CAT aktivite düzeyleri	36
Şekil 6.5. Grupların karaciğer TAS düzeyleri	37
Şekil 6.6. Grupların karaciğer TOS düzeyleri	38
Şekil 6.7. Grupların incebağırsak MDA düzeyleri	39
Şekil 6.8. Grupların incebağırsak GSH düzeyleri	40
Şekil 6.9. Grupların incebağırsak SOD aktivite düzeyleri	41
Şekil 6.10. Grupların incebağırsak CAT aktivite düzeyleri	42
Şekil 6.11. Grupların incebağırsak TAS düzeyleri	43
Şekil 6.12. Grupların incebağırsak TOS düzeyleri	44
Şekil 6.13. Grupların kalınbağırsak MDA düzeyleri	45
Şekil 6.14. Grupların kalınbağırsak GSH düzeyleri	46
Şekil 6.15. Grupların kalınbağırsak SOD aktivite düzeyleri	47
Şekil 6.16. Grupların kalınbağırsak CAT aktivite düzeyleri	48
Şekil 6.17. Grupların kalınbağırsak TAS düzeyleri	49
Şekil 6.18. Grupların kalınbağırsak TOS düzeyleri	50
Şekil 6.19. Serum AST düzeyleri	51
Şekil 6.20. Serum ALT düzeyleri	51
Şekil 6.21. Serum ALP düzeyleri	52
Şekil 6.22. Kontrol; Santral ven (Cv). H-E, x20	53
Şekil 6.23. Kontrol; Portal alan (ok). H-E, x20	54

Şekil 6.24. Krosin; Santral ven (Cv). H-E, x20	55
Şekil 6.25. Krosin; Portal alan (ok). H-E, x20.....	55
Şekil 6.26. AKR; Santral ven konjesyonu (Cv), snuzoidal konjesyon (ok). H-E, x20	55
Şekil 6.27. AKR; Periportal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve portal ven konjesyonu (ok). H-E, x20.....	56
Şekil 6.28. AKR; Karaciğer parankiminde hemoraji ve hepatosit nekrozu (yıldız), hepatositlerde heterokromatik ve piknotik nukleus (ok), H-E, x20.....	56
Şekil 6.29. AKR; Hepatositlerde vakuolizasyon (ok), sinuzoidal konjesyon (yıldız). H-E, x40	57
Şekil 6.30. AKR+Krosin; Santral ven (Cv). H-E, x20.....	57
Şekil 6.31. AKR+Krosin;Periportal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu.....	58
Şekil 6.32. Kontrol; Villus (V), liberkün h kriptası (Lc). H-E, x10.....	59
Şekil 6.33. Kontrol; Villus (V), villus yüzey epiteli (ok). H-E, x20.....	60
Şekil 6.34. Krosin; Villus (V), liberkün h kriptası (Lc). H-E, x10	60
Şekil 6.35. Krosin; Villus (V), villus yüzey epiteli (ok). H-E, x20	61
Şekil 6.36. AKR; Villus dejenerasyonu (ok), bozulmuş Liberkün h kripta yapısı (Lc). H-E, x10	61
Şekil 6.37. AKR; Villus dejenerasyonu ve yüzey epitel kaybı (ok), villus mukozasında inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız), bozulmuş Liberkün h kripta yapısı (Lc). H-E, x20	62
Şekil 6.38. AKR+Krosin; Villus (V) apikalinde dejenerasyon (ok), Liberkün h kriptası yapısı (Lc). H-E, x10	62
Şekil 6.39. AKR+Krosin;l; Villus (V) apikalinde dejenerasyon (ok). H-E, x20	63
Şekil 6.40. Kontrol; Liberkün h kriptası (Lc), kolon yüzey epiteli (ok). H-E, x10.....	64
Şekil 6.41. Kontrol; Liberkün h kriptası (Lc), kolon yüzey epiteli (ok). H-E, x20.....	64
Şekil 6.42. Krosin; Liberkün h kriptası (Lc), kolon yüzey epiteli (ok). H-E, x10.....	65
Şekil 6.43. Krosin; Liberkün h kriptası (Lc), kolon yüzey epiteli (ok). H-E, x20.....	65
Şekil 6.44. AKR; Kolon mukozası dejenerasyonu (yıldız), yüzey epitel hasarı (ok), bozulmuş liberkün h kripta yapısı (Lc). H-E, x10.....	66
Şekil 6.45. AKR; Kolon mukozası dejenerasyonu (yıldız), yüzey epitel hasarı (ok), bozulmuş liberkün h kripta yapısı (Lc). H-E, x10.....	66

Sayfa

Şekil 6.46. AKR+Krosin; Kolon yüzey epitel hasarı ve intraepiteliyal inflamatuvar hücre infiltrasyonunu (ok), liberkün kriptası (Lc). H-E, x10.....	67
Şekil 6.47. AKR+Krosin; Kolon yüzey epiteli (ok), liberkün kriptası (Lc). H-E, x10.....	67



ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge Ek A.1. Karaciğer dokusu biyokimyasal analizleri	79
Çizelge Ek A.2. İncebağırsak dokusu biyokimyasal analizleri.....	80
Çizelge Ek A.3. Kalınbağırsak dokusu biyokimyasal analizleri.....	81
Çizelge Ek A.4. Serum biyokimyasal analizleri	83
Çizelge Ek A.5. Karaciğer hasar skoru	84
Çizelge Ek A.6. İleum hasar skoru.....	86
Çizelge Ek A.7. Kalınbağırsak hasar skoru	88
Çizelge Ek A.8. Histolojik doku skorlamaları	90

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

- H• : Hidrojen Radikali
O₂ : Singlet Oksijen
O₂• : Süperoksit Radikali
ROO• : Lipid Peroksil Radikali

KISALTMALAR

- ABD : Amerika Birleşik Devleti
AA : Akrilamid
ATP : Adenozin Trifosfat
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Tarım ve Gıda Örgütü)
FDA : U S Food and Drug Administration (Gıda Ve İlaç Dairesi)
GSH : Redükte Glutasyon
GSSG : Okside Glutasyon
H₂O₂ : Hidrojen Peroksit
IARC : International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)
MDA : Malondialdehit
NADP : Niklotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Redükte)
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
SOR : Serbest Oksijen Radikalleri
TAS : Total Antioksidan Seviyesi
TOS : Total Oksidan Seviyesi

TBA : Tiyobarbitürikasit

TÜBİTAK : Türkiye Bilimsel Araştırma Merkezi

WHO : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Akrilamidin (AA) yüksek dozları canlılar için genotoksik, kanserojenik ve nörotoksiktir. Besinlerin yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi AA oluşmaktadır. bu Besinlerin tüketilmesiyle AA insanların vücuduna alınmaktadır. Besinlerle alınan AA insan vücudunda ne tür hasarlara sebep olacağı tam bilinmediğinden dolayı gıda kaynaklı AA'nın insan sağlığını tehdit edebileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar akrilamidin insan sağlığı üzerinde çok fazla olumsuz etkiler yaptığı dikkat çekmiştir. Deney hayvanları üzerinde 1970'li yıllarda yapılan çalışmalarında AA'nın kansere neden olabilecek çok toksik bir madde olduğu bildirilmiştir [1]. AA doğada serbest olarak bulunmayan ancak kimyasal yollarla sentezlenebilen ticari olarak kullanılan bir kimyasal bir maddedir.

AA endüstri alanında atık suların arıtılmasında, tekstil sektöründe, matbaacılıkta, kozmetik ürünlerin üretilmesinde katkı kimyasalları olarak kullanılabilmektedir. Akrilamidin doğal olarak oluşmadığını ve sadece kimyasal olarak sentezlenebileceği görüşü 2000 yılına kadar kabul görmekteydi. Stokholm üniversitesinden bir grup araştırmacı, 2000-2002 yıllarında yüksek derecelerde pişirilen besinlerde yüksek seviyelerde AA'nın oluştuğunun öne sürülmesi ile bir anda tüm dikkatlerin AA üzerine çevrilmesine sebep olmuştur [2, 3]. Bilim adamlarının bu buluşu AA ile ilgili tüm bilinenlerin değişmesine ve AA'nın yalnız kimyasal olarak sentezlenebileceği görüşünün değişmesine sebep olarak gıdalarda da doğal olarak oluşabileceği gerçeğini ortaya çıkarmıştır. İsveçli bilim adamlarının 2002 yılında AA'nın karbonhidratca zengin gıdalarda oluştuğunu ilan etmeleri ile, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) yetkilileri [4] ile Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration; FDA), insan sağlığı için gıda kaynaklı AA'nın ciddi bir sorun oluşturabileceğini açıklamışlardır.

Yapılan araştırmalarda 120°C ve üzerindeki sıcaklıklarda pişirilen gıdalarda AA'in bol miktarda oluştuğu belirtilmiştir. Yüklek sıcaklıklarda pişirilen gıdalarda yüksek düzeylerde AA oluşabilirken haşlanarak pişirilen gıdalarda AA'in meydana gelmediği saptanmıştır [5]. Pişirilme sırasında oluşan AA'in miktarı, pişirme süresi ve sıcaklığına bağlı olarak artış göstermektedir. Sharp [6], karbonhidrat ve protein oranı yüksek olan besinlerin 120°C derece ve üzerindeki derecelerde pişirilmesi esnasında, ortalama 1mg/kg düzeyinde akrilamidin oluştuğunu belirtmiştir.

Oksidatif stres, hücrelerde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) miktarının çok fazla yükselmesi veya hücrelerde bulunan antioksidanların azalması sonucu oksidanların artması durumudur. Böylece SOR yeterli düzeyde detoksifiye edilemediğinden dolayı hücrenin makromoleküllerine (nükleik asit, protein, karbonhidrat, lipid) zarar vererek oksidatif hasarlar meydana getirirler [7]. Hücrelerin savunmasında redükte glutatyon (GSH) radikallerin oluşturduğu hasara karşı korunmasında çok önemlidir. GSH güçlü nükleofil özelliğinden dolayı SOR ile direk reaksiyona girerek okside ürünlerin temizlenmesini sağlar. Hücrelerin GSH içeriği farklılık gösterdiği için farklı hücrelerin oksidatif strese karşı cevabıda farklı olmaktadır. GSH vücudun non-enzimatik antioksidan moleküllerinden biri olup glutamat, glisin ve sisteinden oluşan bir tripeptittir. GSH, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon S-transferazın (GST) enzimlerinde koenzim olarak görev yaparak reaksiyon sonucu okside glutatyonu (GSSG) haline dönüştürülür. Glutatyon redüktaz (GR) reaksiyonlar sonucu oluşan bu GSSG'ı yeniden GSH'a dönüştüren ve antioksidan etki gösteren bir enzimdir. Vücuda alınan AA, sindirim sisteminde GSH'ın bulunması halinde GST ile akrilamid glutatyonu dönüştürülerek detoksifiye edilir ve kolaylıkla vücut dışına atılabilir. Dokularda bulunan GSH'ın % 60'ının karaciğerde bulunması nedeniyle AA karaciğerde akrilamid-glutatyon konjugatına dönüşerek idrarla vücuttan atılır. Ancak, AA'in sudaki çözünürlüğünün yüksek olmasından dolayı ekstrahepatik dokulara da kan yoluyla kolaylıkla dağılmaktadır. Dolayısıyla dokular, GST / GSH düzeylerine bağlı olarak akrilamidi GSH ile konjuge ederek detoksifiye edebilirler. Ayrıca AA'in bir kısmı Sitokrom P450 enzim sistemiyle metabolize edilerek genotoksik ve mutajenik etkisi daha da fazla olan glisidamide dönüştürülür. Karaciğer dokusu AA de olduğu gibi glisidamid molekülünü de GST / GSH sistemiyle bağlayarak detoksifiye ederek idrarla vücut dışına atılır. Tüm dokularda

AA'in detoksifiye edilmesinde en önemli etken, yeterli düzeyde GSH'ın bulunabilmesidir.

Bu araştırmada 21 gün süre ile ratlara 21 gün boyunca akrilamid ve krosin uygulanarak ince bağırsak, kalın bağırsak, karaciğer ve kan numuneleri alınacaktır. Alınacak bu dokuların histopatolojik incelemeleri ve GSH, malondialdehid (MDA), superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), total antioksidan (TAS) ve total oksidan (TOS) seviyelerine ve kanda AST, ALT ve ALP seviyelerine bakılacak ve akrilamid tarafından oluşan değişikliklerin krosin tarafından hangi oranda giderilebileceğine bakılacaktır.



BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

Akrilamidin (AA) kanserojenik ve toksik bir madde olduğundan dolayı sağlığa zararlı etkileri bulunmaktadır. AA 1950'li yıllarda kimyasal olarak sentezlenerek Amerika'da endüstri alanında kullanılmaya başlanmıştır. AA monoakrilamid ve poliakrilamid olmak üzere iki formda bulunmaktadır [8]. Monomer yapıdaki AA, bir amid olup doymamış çift bağ içermektedir. Oda şartlarında kararlıdır, beyaz bir kristal gibi görünmekte olup kokusuz bir maddedir ve sudaki çözünürlüğü yüksektir. Erime noktası 84.56°C, kaynama noktası ise 125 °C'dir [9]. Oksidatif ajanlara maruz kaldığında yüksek polimerize özelliği göstermektedir. AA, poliakrilamid sentezinde kullanılan bir monomer olup, endüstri alanında kozmetik ürünler ve kâğıt yapımı gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Poliakrilamidler, kimyasal olarak tepkisiz, nontoksik ve genellikle kararlı yapılardır. Poliakrilamid, içme suyunun temizlenmesi [6, 10], endüstri alanlarında kullanılan atık sularının arıtılmasında, içme suyu depolarının ve kanalizasyon sistemlerinin yapımında [11], plastik sanayisinde [12], jel elektroforezinde [13], boya sanayinde ve madencilik gibi pek çok alanlarda kullanılmaktadır [14]. Poliakrilamid matbaacılıkta özellikle kâğıtların dayanıklılığını artırmak için kullanılır. Ayrıca Kozmetik sanayisinde özellikle losyon deoderant gibi kişisel bakım ürünlerinde yağlı ve yumuşak bir özellik kazandırmasından dolayı tercih edilmektedir [4]. Ancak poliakrilamid oluşum reaksiyonları sırasında AA'in bir kısmı serbest olarak ortamda kalmaktadır. Bu yüzden losyon ve deoderant gibi kişisel bakım ürünlerinde düşük düzeylerde de olsa AA bulunmakta ve cilt yoluyla emilebildiğinden bir risk oluşturmaktadır. Ancak serbest halde bulunan akrilamid seviyesi düşük olduğu için risk düzeyi düşük olmakla birlikte uzun süreli uygulamalar bir risk oluşturabilir. AA'in monomerik formunun laboratuvar hayvanlarında nörotoksositeye ve anemiye sebep olduğu belirlenmiştir [15]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), insanlarda 1mg AA'in her 100.000'de 1 kişide kansere sebep olduğunu belirlemiştir.

Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi akrilamidin insan sağlığı üzerine olan etkisini ‘insanlar için büyük olasılıkla bir kanserojen’ ifadesini kullanmıştır. Avrupa birliği sınıflandırma sistemine göre AA karsinojen, mutajen ve üreme sistemi üzerinde toksik etki bırakmaktadır. Doğal olarak bu etkinin oral yolla tek doz alımı sonrası ortaya çıktığı da belirtilmiştir [16].

AA’in toksik etkisinin olduğu ve kanserleşmeye sebep olduğu çok önceki yıllardan beri bilinmekteydi. Ancak Stokholm üniversitesinden bir grup araştırmacının 2000’li yılların başlarında AA’in ısı işlemler sonucu gıdalarda oluştuğunu bilim dünyasına duyurmaları bütün dikkatlerin akrilamid üzerine çevrilmesine sebep olmuştur [2, 3]. AA, 120°C ve üzerindeki sıcaklıklarda kızartılmış, fırınlanmış veya ızgara ile pişirilmiş gıdalarda oluşmaktadır [17, 18]. AA gıdalarda doğal olarak bulunan bir kimyasal olmayıp gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi sırasında oluşan kimyasal tepkimeler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Gıdaların yüksek sıcaklıklarda kızartılmasından ziyade haşlanarak pişirilmesi ise AA oluşumuna sebep olmamaktadır. Özellikle karbonhidrat ve proteince zengin gıdalarda bazı şeker ve aminoasitlerin yüksek sıcaklıklarda reaksiyona girerek AA oluşturduğu kanıtlanmıştır [17, 18]. Yüksek sıcaklıklarda işlem görmüş gıdalarda Maillard reaksiyonu sonucunda renk ve lezzet oluşumu AA oluşumu ile ilgili olabilir ve bu durum karaciğerde toksik etkiye neden olabilir [19]. Yüksek sıcaklıklar pişirilen ürünlerde yapı, tad ve koku bileşiklerinde hissedilebilir derecede değişimler gerçekleştirilmesinden kaynaklı olarak besinlerde bu durum istenilmemektedir. Bu durumun ortaya çıkmasında ki en önemli reaksiyon ise Maillard reaksiyonudur [20]. Fakat bu duruma karşın besinlerin pişirilmesi esnasında AA’in hangi oluşum mekanizması ile oluştuğu tam olarak belirlenmemiştir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz etki oluşturan AA’in gıdalarda yeni tespit edilmiş olmasından kaynaklı olarak çok sayıda araştırma yapılmamıştır. Fakat bu durum insan sağlığı açısından önem arz etmesinden dolayı çalışmalar uluslar arası alanda önem kazanmakta ve devam etmektedir. Besinlerdeki AA konusu ile ilgili konular, araştırmalar sınırlı olmasına rağmen yapılan incelemeler sonucunda ki verilerde AA’in genel olarak kızarmış, fırınlanmış, yüksek ısıya maruz bırakılmış tahıl ürünlerinde yüksek miktarlarda olduğu belirlenmiştir [21]. Fakat bu duruma karşı

olarak ise haşlanmış gıdalarda yada çiğ olarak tüketilen besinlerde AA'in oluşmadığı belirlenmiştir.

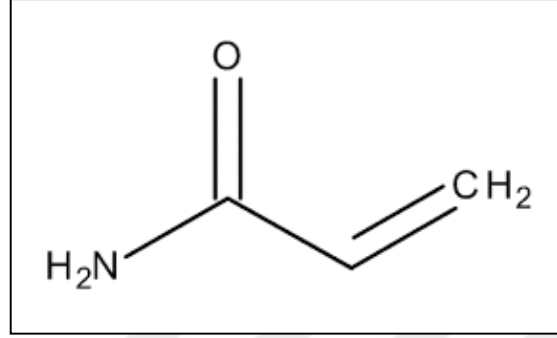
Piştirilme esnasında meydana gelen AA'in piştirme sıcaklığı ve süresi ile doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu durumu Sharp [6], besinleri ortalama 248°F(120°C) piştirilmesi sonrasında yaklaşık olarak protein ve karbonhidratça zengin besinlerde 1mg/kg AA'in oluştuğunu belirtmiştir.

AA besinlere koruyucu olarak katılan bir gıda katkı maddesi olmayıp karbonhidrat ve proteince zengin besinlerin 120°C de ısıl işlem görmesi sonucu oluşan Uluslararası Kanser Araştırmaları kurumunun (International Agency for into Cancer, IAC) kanserojen olduğunu ileri sürdüğü bir maddedir. Bu durum insan sağlığını tehdit etmektedir fakat insanlar karbonhidrat ve protein ağırlıklı beslenmelerinden kaynaklı olarak bu besinlerin tüketilmesine yasaklar getirilmemektedir. Gıdalarda oluşan AA tüm dünyayı etkileyen bir sorun olduğundan dolayı uluslararası pek çok kuruluş [Ulusal Sağlık ve Güvenlik Enstitüsü (National Institute of Occupational Safety and Health –NIOSH, 1976), WHO (1985), IARC (1986 -1994), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) ve Avrupa Birliği (European Union, 2002)] sorunu gündemlerine alarak AA ile ilgili yıllık planlar hazırlayarak kamuoyuna duyurmaktadırlar. Özellikle Amerikan Çevreyi Koruma Kuruluşu (U.S. EPA), AA'in normal ve toksik dozlarıyla ilgili referans değerleri belirleyerek bu değerleri ilan etmişlerdir. İçme sularında bulunabilecek AA düzeyi WHO'nun yönergesine göre 0,5 µg/L iken [22], Avrupa Birliğinde bu rakam 0,1 µg / L'dir [23].

2.1. AKRİLAMİDİN KİMYASI

AA'in monomerik formu akril ve amid gruplarından oluşmaktadır. Polimerik formu ise birçok monomerik formun birleşmesi ile oluşmuş bir bileşiktir. 2-propenoamid etilen karboksamid olarak da bilinen akrilamid doymamış çift bağ içermektedir [24]. AA erime noktası 84.5 °C ve kaynama noktası 125 °C (760 mmHg) olan renksiz, kokusuz, beyaz renkli bir kimyasaldır. Oda koşullarındaki buhar basıncı 0,007 mmHg'dır. Sudaki çözünürlüğü oldukça fazla olan akrilamid aseton, kloroform

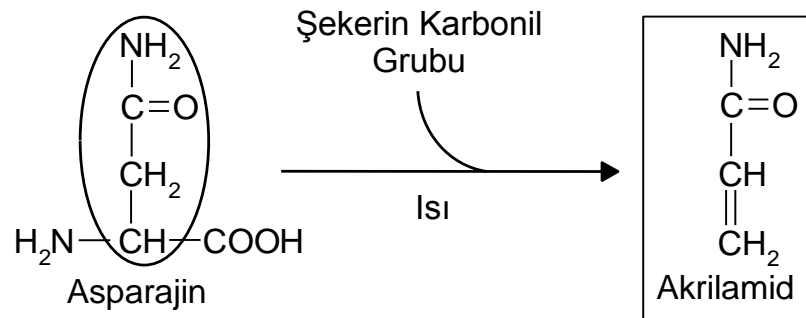
ve etanolde de çözünebilmektedir. Molekül ağırlığı 71.08 g/mol olan AA nükleofillerle kolayca reaksiyona girebilmektedir. AA yakıcı ve tahriş edici değildir. Elektronca zayıf bir amid grubu ve çift bağa sahiptir. Zayıf asidik ve zayıf bazik karakterlidir.



Şekil 2.1. Akrilamidin kimyasal yapısı.

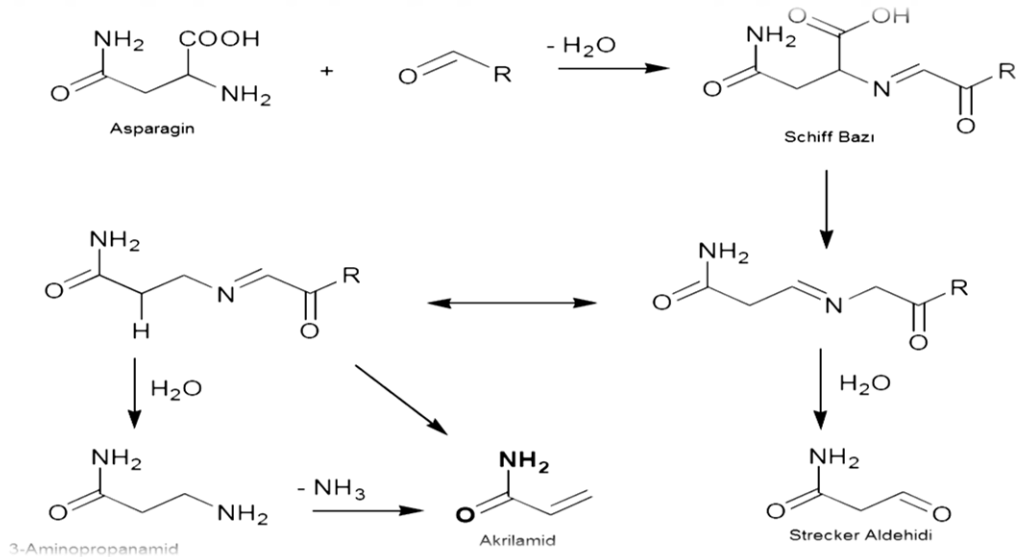
2.2. GIDALARDA AKRİLAMİD OLUŞUMU VE MAİLLARD REAKSİYONU

Gıdalarda AA'in oluşabilmesi için pişirme ortamının sıcaklığının 100°C'yi aşması gerekmektedir. AA'in 120°C civarında gıdalarda bulunan indirgenmiş şeker (glukoz veya fruktoz gibi) ile spesifik aminoasitlerin tepkimeye girmesiyle kahverengi renk oluşumu sırasında (maillard reaksiyonu) oluştuğu rapor edilmiştir [18]. Maillard reaksiyonu Fransız kimyacı Louis Camille tarafından bulunmuştur. Gıdaların sahip olduğu indirgen şekerler ve asparajin yönünden bileşimi, saklama koşulları, türü gibi faktörler AA miktarına etki etmektedir. Aynı gıdalar farklı süre, ortam ve sıcaklıklarda pişirildiğinde aynı gıdalarda farklı miktarlarda akrilamid oluşurken, az pişirilmiş veya fırınlanmamış gıdalarda AA seviyesi daha düşük olmaktadır.



Şekil 2.2. Asparajin ve şekerin karbonil grubunun etkileşimi sonucu ve AA oluşumu.

AA'in tüm oluşum yolları tam olarak bilinmese de oluşumuyla ilgili bilgilerde mevcuttur. Gıdalarda AA'in en etkin oluşumu Maillard reaksiyonuyla meydana gelmektedir. Tepkime reaktif bir karbonil grup ile aminoasitler arasında gerçekleşmektedir. Maillard reaksiyonuna aynı zamanda esmerleşme reaksiyonu da denilmektedir. Kompleks bir reaksiyon olmasına karşın gıdalarda hem lezzet hemde kızarmış olarak hoş görüntüler sunmasından dolayı tercih edilmektedir [25]. Gıdalarda oluşan AA'e ortamın nem ve pH değerinin sebebiyet verdiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir [26]. Hem ısı işlem süresi hem de pişirme derecesi AA oluşumunu etkilediği için birçok resmi kuruluş, gıdalarda oluşan AA'i azaltmaya yönelik çalışmalar başlatmıştır [27]. İndirgen şekerin karbonil grubu ile aminoasidin amino grubu reaksiyona girer ve Schiff bazını oluşturur. Schiff bazından da bir karboksil grubu ayrılarak yeni ara ürünler oluşur. Bunların sonucunda 3-aminopropiamid hidrolize olarak amonyak eliminasyonu sonucu AA ve amonyak oluşur. Sıcaklığın 100-180 °C olduğu nemli ortamlarda 3-aminopropiamidin degradasyonu ile akrilamide dönüşmesi bu bileşiğin AA'in öncü maddelerinden biri olduğunu doğrulamaktadır [28].



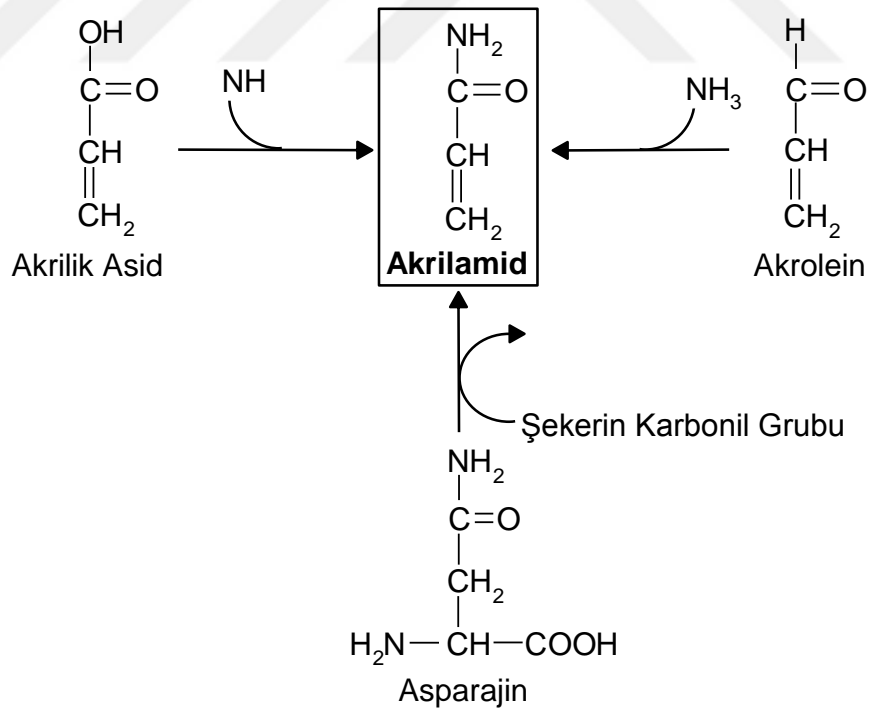
Şekil 2.3. Maillard reaksiyonu ve akrilamid oluşumu [28].

Karbon sayısı fazla olan şekerlerin aminoasitlerle reaksiyona girmesi daha yavaş olmaktadır. 5 karbon taşıyan pentozlar (riboz gibi), 6 karbon taşıyan heksoz (glukoz, fruktoz gibi) ve disakkaritlere (laktöz gibi) göre daha hızlı reaksiyona girerler.

Gıdalarda oluşan AA'nin en önemli öncüsünün asparajin olduğunu belirten kaynaklar, kuşkonmazın en yüksek asparajin içeriğine sahip olduğunu (11000-94000 mg/kg) ve ortam şartları oluştuğunda AA'nin yüksek düzeylerde meydana gelebileceği belirtilmektedir [29].

Akrolein (2-propenal, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$) ve akrilik asidin yapısı AA'yi anımsatmaktadır. Pateteste bulunan asparajin ve glutamin aminoasitlerinden "Strecker" degradasyonu ile ayrılan amonyum ile akrolein ve akrilik asit reaksiyona girerek AA'yi oluşturabilirler. İşte bu oluşumdan dolayı AA oluşumunda en etkili madde olan asparajinin azaltılması yöntemlerine başvurulabilir [9].

Asparajin amino asidi kadar olmasa da AA oluşumunda diğer amino asitlerinde örneğin sistin, glutamin, metiyonin, arginin ve aspartik asit gibi aminoasitlerin etkisi vardır [30]. Farklı yollarla da AA oluşmaktadır. Farklı moleküllerden AA oluşum mekanizması aşağıdaki Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Akrilamid sentezi.

Gıdaların pişirilmesi esnasında oluşan AA miktarı gıdalardaki indirgen şekerlerin (glukoz, fruktoz gibi) ve aminoasit içeriğine (özellikle asparajin aminoasidi) ve

pişirme sırasında uygulanan sıcaklığın derecesi ile pişirme sürelerine göre değişmektedir. Patatesin 180 °C derecede kızartılması 120 °C’de pişirmeye göre daha fazla miktarda AA oluşmaktadır. Bu olay besinlerin pişirilmesinde uygulanan sıcaklık ve pişirme süresinin AA oluşumunu etkilediğini göstermektedir. Ayrıca Surdyk’nin [31] yaptığı çalışmada pişirme işlemine geçmeden önce hamura asparajin aminoasidi eklediğinde ekmekteki AA miktarının çok fazla olduğu anlaşılmıştır. Yine asparajin içeriği yüksek olan patatesin pişirme işleminden önce asparajin içeriğini azaltmak için asparajinaz enzimiyle muamele ettiğimizde ise pişirme işleminden sonra AA miktarında düşüş gözlenmiştir. Bu örnekler bize gıdaların içeriğinin de AA oluşumunda önemli olduğunu göstermiştir.

WHO ve FAO yüksek ısı işlemlere maruz kalan besinlerde yüksek miktarlarda AA oluşabileceği ve bunun insanlar için sağlık problemlerine sebep olabileceğini bildirmişlerdir [32]. Isı derecesi yükseldikçe oluşan AA miktarı artmakta ve ortam sıcaklığı 180°C’ye çıkarıldığında ise AA oluşumu en yüksek düzeye erişmektedir [33]. AA besinlerde doğal olarak bulunmazken yüksek ısılarla pişirilme esnasında açığa çıkan AA miktarı birkaç ppm’e kadar oluşabilmektedir [20].

Besinlerin yüksek ısılarla maruz kalması yapı, koku ve tad değişikliklerine sebep olacağı için kalitenin bozulmasına sebep olabilir. Örneğin, lizin aminoasidi taşıdığı iki amino grubuyla maillard reaksiyonuna daha hızlı girer ve kahverengin oluşmasına sebep olur. Dolayısıyla lizin gibi esansiyel aminoasitlerin maillard reaksiyonuna katılarak kayba uğraması besinlerin biyolojik yararlılığında azalmaya sebep olacaktır [26]. Asparajin amino asidi kadar olmasada AA oluşumunda diğer amino asitlerinde örneğin sistin, , metiyonin ve arginin ve gibi aminoasitlerin etkisi yok denecek kadar azken (oluşum sınırları, 0.5 mg/mol), glutamin ve aspartat ise eser miktarlarda AA oluşturmuşlardır (0.5–1 mg mol⁻¹) [18].

Gıdalarda AA oluşumunu azaltıcı yöntemlerinden biri yüksek pişirme sıcaklıklarına daha az süre maruz bırakmak olabilir. Besinlerin işlenmesi sırasında meydana gelen AA’i azaltmanın diğer yöntemleri şu şekilde sıralanabilir:

- Asparajin aminoasidini azaltmak için asparajinaz enzimi ilave etmek.

- Patatesleri ılık suda bekleterek yüzeydeki asparajini ve şekeri uzaklaştırmak (patatesleri 8°C'nin altında depo etmek).
- Kimyasal kabartıcılar yerine unlu mamullere mayalama yani maya fermantasyonu uygulamak.
- Amonyum hidrojen karbonatı tercih etmek yerine sodyum hidrojen karbonatı tercih etmek.
- Çok yağda kızartma yapmamak.
- Pişirme süresini ve sıcaklığını yüksek tutmamak.
- Maillard reaksiyonunu azaltmak için sülfite ilavesi yapmak.
- pH'yi düşürmek

bunun gibi öneriler üretici ve tüketicilere sunulabilir [34].

Besinlerin AA içeriği ile ilgili ayrıntılı bilgi bulunmamaktadır. 2002 yılından önce AA ile ilgili yalnız 250 veri toplanmış ve nişasta içeriği olan belirli besinlerin analizleri yapılmıştır. Ancak günlük enerjinin geriye kalan kısmını karşılayan gıdaların AA içeriği ile ilgili çok az veri bulunmaktadır. Çeşitli gıdaların (patates cipsi, gevrekler ve tahıllı kahvaltılık ürünler gibi) akrilamid içerikleri tespit edilmiş ancak ürünler arasındaki çeşitliliğin nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır. Verilerin tam olarak aydınlatılamamasından dolayı insanların günlük olarak gıdalarla alabilecekleri toplam AA miktarları hesaplanamamaktadır [32]. Ülkemiz de ise TÜBİTAK'a bağlı Marmara Araştırma Merkezi tarafından çeşitli gıdalar AA yönünden incelenmiş; pirinç pilavı, tahin helvası, kebab, döner, ızgara ve çavdar ekmeği gibi Türk halkının günlük olarak tükettiği bir çok gıda da ölçülebilir değerlerin altında bulunmuştur. Ancak patates kızartması ve çeşitli fırıncılık ürünlerinde ise yüksek düzeylerde AA bulunmuştur. Ekmeğin ise kabuk kısmında yüksek düzeylerde saptanırken, iç kısmında ise AA oluşmadığı gözlenmiştir [35]. Ülkemizde tüketilen gıdalarda bulunan AA miktarları büyükten küçüğe doğru sıralanacak olursa; krakerler > patates cipsi > bisküviler > kekler > bebek besinleri > mısır cipsi > kurabiyeler > kahvaltılık tahıllar > ekmekler > ızgaralar > sebzeler > gofretler > çikolatalar. Türk kahvesinde bulunan akrilamid (29-75 ng/g) diğer kahve çeşitlerine (88-186, 204, 237, 816) göre daha düşük düzeylerde bulunmaktadır [36].

2.3. AKRİLAMİD METABOLİZMASI

AA uygulandığı tüm yollardan emilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda AA'in mide ve bağırsaklardan hızlı bir şekilde emildiğini göstermektedir. Ancak emilim oranları, AA'in alınımlarına (deri, gıdalar ve solunum vb.), zamana ve canlı türlerine göre farklılık gösterebilmektedir [37, 38]. Sumner ve arkadaşları [39] akrilamidin dokulardaki dağılımını göstermek için yaptıkları çalışmada, sıçan ve farelerden oluşan iki gruba 6 saat boyunca 3ppm radyoaktif işaretli AA uygulamışlardır. 24. Saatte, uygulanan akrilamidin yaklaşık % 56'sının sıçanların dokularında, % 46'sının ise farelerin vücut dokularında biriktiği tespit edilmiştir. Dokulardaki akrilamid miktarları sıçanlarda büyükten küçüğe doğru; kan > testis > deri > karaciğer > böbrek > beyin > dalak > akciğer > epididimis > yağ O₂ şeklinde sıralanmıştır. Farelerdeki dağılım ise; testis > deri > karaciğer > böbrek > epididimis > beyin > akciğer > kan > yağ şeklinde gerçekleşmiştir. Sonuçlar AA'in türlere göre doku dağılımlarının farklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca yapılan deneysel çalışmalarda AA'in plasentaya, anne sütüne ve fetüse de geçebildiği kanıtlanmıştır [40].

Vücuda alınan AA sindirim sisteminden emildikten sonra karaciğere 1 mol hemoglobine 4 mol AA olacak şekilde getirilerek iki farklı enzimatik reaksiyon ile metabolize edilir ve yıkıma uğrar. Redükte glutatyonu (GSH) koenzim olarak kullanan Glutatyon-S-Transferaz (GST) tarafından GSH ile AA konjuge edilerek toksik olmayan N-Asetil-S-(2-karbamoiletıl) sisteine çevrilerek idrarla atılabilir. AA'i metabolize eder diğer yolda ise karaciğerde bulunan Sitokrom P450 CYP 2E1 enzim sistemiyle okside edilerek toksik etkileri çok daha fazla olan glisidamide çevrilebilir. GST ile Sitokrom P450 enzimi AA'i substrat olarak kullanmak için birbirleriyle rekabet ederler [41, 42]. Glisidamid ise hemoglobin ile dokulara taşınarak hücrelerin DNA'ları ile etkileşime girerek kanserleşmelere sebep olabilir.

Ağız yoluyla alınan AA miktarı arttıkça, dokulardaki GSH seviyesinin azalmasına ve oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulmasına sebep olarak oksidatif stres sonucunda oksidatif hasar oluşmasına sebep olabilir. GSH azalmasına bağlı olarak GST enzimiyle metabolize edilemeyen AA, karaciğerde Sitokrom P450 CYP 2E1 enzim sistemiyle okside edilerek çok daha toksik olan glisidamide dönüştürülür.

AA'nin glisidamide dönüşüm oranı, türler arasında farklılık gösterip en yüksek farelerde tespit edilmiştir. İnsanlarda ise bu dönüşümün oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Sıçan, fare ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda AA'nin en çok metabolize edildiği ürünün, N-asetil-S-(3-amino -3-oksopropil) sistein olduğunu tespit edilmiştir [43].

AA'nin metabolize edildikten sonra vücuttan en yoğun ve kolay atılım yolunun idrar olduğu deney hayvanlarında yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. İnsanlar üzerinde AA'nin farmakokinetiği üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Ratlarla yapılan çalışmaları da, AA ve glisidamidin çok hızlı bir şekilde vücuttan atıldığını ve yarılanma ömrünün yaklaşık 2 saat olduğunu göstermektedir. Temel atım yolu ise merkaptürik asittir [43].

2.4. AKRİLAMİDİN TOKSİK ETKİLERİ

AA, Avrupa Birliği sınıflandırma sistemine göre toksik etkileri mevcuttur. Bu toksik etkiler tek doz toksisitesi ve kronik toksite olarak tanımlanabilir [44].

2.4.1. Tek Doz Toksisitesi

Tek doz toksisitesinde yaklaşık günlük yiyeceklerden alınan AA'n (AA) 4-5 katı veya daha fazlasının alımı söz konusudur. Normal şartlarda besinlerle 1-10 µg/kg/gün akrilamide maruz kalınırken, tek doz toksisitesinde alınan AA miktarı 100,000 µg/kg/gün vücut ağırlığından daha da fazla olmaktadır. Tek doz AA toksisitesinde insan ve hayvanlarda sinir sisteminde nörotoksite, ratlarda ise erkek üreme organı üzerinde genotoksik etkiler oluşturmaktadır [4].

2.4.2. Kronik Doz Toksisitesi

2.4.2.1. Nörotoksik Etkisi

İnsan ve deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar AA'nin nörotoksik etkilerinin olduğunu göstermektedir [4]. AA'nin nörotoksitesinden ilk etkilenen aksonlar olup

işlevlerinin bozulmasından dolayı sinir geçişlerinin zarar gördüğü gözlenmektedir. Uzun süre AA'e maruz kalındığında halüsinasyonlar, uzun vadeli uyukular, yorgunluk, duygu değişimleri ve çarpıntılar gözlemlenebilir. Fullerton ve Barnes'e göre [45], akut ya da subakut dozda verilen AA nörotoksiteye bağlı olarak arka bacaklarda sürünme, zayıflık ve inmelere neden olabileceği gözlemlenmiştir.

AA ile ilgili yapılan bir çalışma da, 2 yıl boyunca AA uygulanmasıyla nörolojik belirtiler ve AA- hemoglobin bağlanmaları değerlendirilmiş ve çevresel sinirler de gelişen nöropatinin şiddeti ile AA- hemoglobin kompleksi düzeyleri arasında bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda kemirgenler ve primatlarda günlük 1 mg/kg AA'in periferik sinirler de nöropatiye sebep olduğu belirlenmiştir [46].

Yapılan çalışmalar AA'in kemirgen, primatlar ve insanlarda nöropati geliştirebilmesi için günlük 0,5 mg/kg dozunu desteklemektedir. İnsanların besinler yoluyla günlük olarak maruz kaldıkları dozun 0,001 mg/kg/gün olduğu ve bunun nörotoksite için gerekli dozdan 500 kat düşük olduğu dikkate değerdir [9]. Hayvan ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarla AA'in hayat boyu nörotoksik olduğu görülmüştür. Özellikle beyin üzerine olan toksik etkiler beyin fonksiyon bozukluğu şeklinde olup, akut toksisiteelerde felç şeklinde ortaya çıkmaktadır. Kronik ve düşük doza maruz kalındığında ise ya ataksiler şeklinde veya daha çok kas koordinasyon bozukluklarını gösteren periferik nöropatiler (his kaybı ve kaslarda zayıflık gibi) şeklinde ortaya çıkmaktadır [4, 45].

2.4.2.2. Genotoksik Ve Karsinojenik Etkisi

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalara göre hayvanlara oral olarak verilen AA genotoksik olan glisidamide dönüşür. Glisidamidin tam olarak kanserojen yada genotoksik olduğunu kanıtlayan bir çalışma bulunmamaktadır [47]. Ancak AA'in testislerde dejenerasyonlara sebep olarak fertilitte üzerine olumsuz etkiler oluşturduğu görülmüştür. Fertilitte de ki bozulma sperm sayısı ve motilitesiyle ilişkilendirilmiş ve AA'in fertilitteyi azalttığı ile ilgili bilgi nettir. Yapılan in vivo çalışmalar akrilamidin

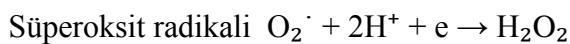
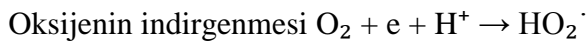
somatik ve germ hücrelerinde genotoksik olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple gen ve kromozom seviyesinde kalıtsal hasarı tetikleme potansiyeline sahiptir [48].

1993-1997 yıllarında yapılan bir çalışmaya göre glisidamid postmenapozal kadınlarda incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda kontrol grubunda üçyüz yetmiş dört kadında meme kanseri belirlenmiştir. Sigara içenlerde hemoglobine bağlanma içmeyenlere göre üç kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Yapılan bu çalışmayla AA'nin Hg düzeyi ve meme kanseri riski arasında bir ilişki söz konusu olmadığı gözlemlenmiştir [4]. Gıda kaynaklı AA'ye maruz kalındığında nörotoksik olarak yoğun bir etki söz konusu olduğu gözlemlenmiş olmasına rağmen aynı durum kanser riski için bahsetmek mümkün olmadığı yapılan çalışmalara yansıdığı görülmüştür [49].

2.5. OKSİDATİF STRES VE ETKİLERİ

Oksiatif stres, antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengenin oksidanların lehine bozulması ve bunun sonucu olarak serbest radikal/reaktif oksijen ürünlerinin açığa çıkması ile vücudun makromoleküllerine (DNA, lipid, protein gibi) saldırarak hücrelerde hasar oluşumuna neden olur [50]. Genellikle bu hasarlar yaşlanma süreci ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser, böbrek hastalıkları, nörolojik hastalıklar, kas ve karaciğer hastalıkları gibi birçok rahatsızlığa yol açabilmektedir [51].

Serbest radikaller, serbest oksijen türleri (ROS) ve serbest nitrojen (RNS) olarak sınıflandırılırlar. Vücudun normal metabolik reaksiyonları sırasında üretilen ROS'lar, superoksit anyon radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (HO^\cdot), hipoklorik asit (HOCl), singlet oksijen (O_2), ozon (O_3), alkil radikali (R), peroksil radikali (POO^\cdot), organik peroksit radikali ($RCOO^\cdot$), perhidroksil radikali (HO_2^\cdot), alkoksil radikali (RO^\cdot)'dir. RNS molekülleri ise nitrik oksit (NO^\cdot), peroksinitrit ($ONOO^\cdot$)'dir [52].



Hidrojen peroksit $\text{H}_2\text{O}_2 + e \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$

Hidroksil radikali $\cdot\text{OH} + e + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$

Oksidatif stres bir hastalık değildir fakat bir hastalığa yol açabilecek yada hastalığı hızlandırabilecek bir etkidir. Oksidatif stresi tehlikeli kılan durum herhangi bir semptomunun olmamasıdır. Eğer bu durum belirlenemez ise oldukça tehlikeli sağlık sorunlarına yol açabilir. Toksinler, radyasyon, sigara, alkol, patojen maddeler, yoğun ve düzensiz yaşam şekli, yoğun egzersiz ve zayıf antioksidan defans sistemi oksidatif strese neden olmaktadır.



BÖLÜM 3

ANTIOKSİDANLAR VE ETKİLERİ

Canlılarda kimyasal prosesler, özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasında oldukça etkilidir. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküllerle kolayca reaksiyona girebilirler ve böylece hücrelere zarar verebilirler. Böyle bir durumda antioksidanlar devreye girerek serbest radikallerle etkileşime girer ve hücrelere zarar vermelerini önler. Bu etkileşim sonucu hücrede toksik etki oluşturma riskini azaltarak daha sağlıklı ve yaşlılık belirtilerinin daha az olduğu bir yaşam sunarlar.

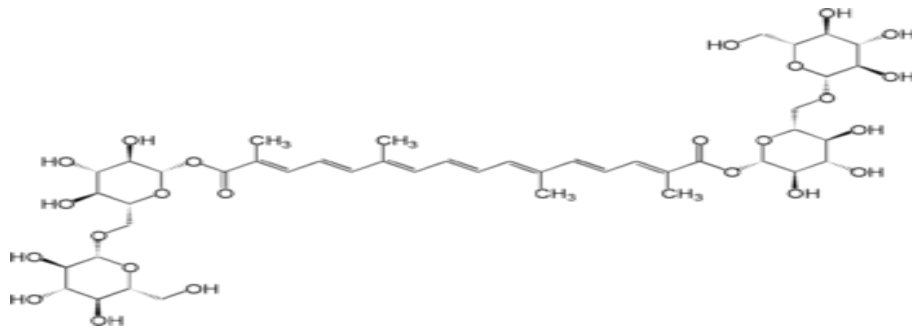
Antioksidanların gıdalardaki işlevleri, belirli bir bileşik, bileşiklerin karışımı veya böyle bileşikleri içeren doğal kaynaklı antioksidanların aktivitesi serbest radikalleri tutabilme, onları bozundurabilme, singlet oksijeni yakalayabilme kabiliyetleri ile öteki bileşikleri sinerjistik veya metal şelatlar olarak etkilemelerine bağlıdır. Doğal kaynaklı antioksidanlar çoğunlukla birçok bileşiğin kombinasyonu olarak bir arada bulunur. Böylece doğal kaynaklı antioksidanların elde edildiği kaynağa bağlı olarak etki şekilleri değişik olabilir [53, 54]. Fenolik bileşikler ve bazı türleri oksidasyonu önlemede oldukça etkilidir. Flavonoidler, süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi oksidan molekülleri temizleme özelliklerine sahiptirler. Ayrıca ksantin oksidaz, NADH oksidaz, glutatyon oksidaz ve protein kinaz gibi enzimleride inhibe ettikleride araştırmalara konu olmuştur [55].

Antioksidanların bir kısmını beslenme yoluyla alırken bir kısmını da vücudun kendisi serbest radikallere karşı savunma sistemi olarak üretir. Vücudun kendisinde bulunan ve enzimatik olan antioksidan sistemi olduğu gibi (CAT, GSH-Px ve SOD gibi) enzimatik olmayan sistemlerde (ürük asit, bilirubin, glutatyon gibi) mevcuttur. Vücudumuzda bulunan bu sistemlerin dışında besinler ile vücudumuza aldığımız

çeşitli antioksidan bileşikler de [E vitamini (tokoferoller), C vitamini (askorbik asit), beta-caroten, flavonoid, safran, koenzim Q, likopen gibi] mevcuttur.

Tezimizde antioksidan olarak safran bitkisinin aktif bileşiklerinden biri olan krosin kullanılmıştır. Safran, safran çiçeğinin (İridaceae familyasından bir bitki olan *Crocus sativus*) tepeciğinin kurutulmasıyla elde edilir ve İran başta olmak üzere Fas, Hindistan, Yunanistan, Türkiye, İspanya ve Fransa da yetiştirilmektedir. Geniş bir şekilde gıdalara katkı maddesi olarak kullanılmasının yanı sıra depresyon, zihinsel bozukluklar ve kanserinde dahil olduğu bir çok hastalıkta geleneksel ilaç olarak tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır [56]. Krosin (crocetin glycoside), krosetin ve safranal safranın ana aktif içerikleridir. Bunlardan başka safran; proteinler, şekerler, vitaminler, flavonoidler, aminoasitler, önemli mineral ve diğer kimyasal bileşenleri içerir [57]. Safran 150'den fazla uçucu ve aroma taşıyan bileşik içerir. Krosin safranın renginden başlıca sorumlu olan kimyasal bileşen olup safran altın sarısı –turuncu rengini α -krosin'e borçludur.

Krosin safran, çiğdem ve gardenya çiçeklerinde karotenoid pigmenti içeren doğal bir bileşendir. Gentiobioz adlı dissakkarit ile krosetin adlı dikarboksilik asitten meydana gelen bir diestir. Parlak kırmızı renklidir ve 186 °C de eriyen kristaller oluşturarak suda turuncu çözelti oluşturur. Krosin trans-krosetin di-ester (β -D-gentiobiyosil) olup sistematik adı 8,8-diapo-8,8-karotenoik asittir. Krosin, krosetin konjuge polien dikarboksilik asit olduğundan dolayı hidrofobik özelliğe sahip olarak yağda çözünebilir özelliğine sahiptir. α -crocin kuru safranın kütlelerinin %10'undan fazlasını sarı renge boyar. Ayrıca güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiştir [58-60]. Krosinin genel yapı formülü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Krosin yapı formülü.

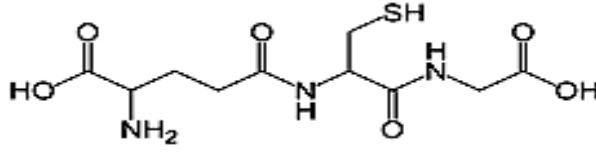
Safranın antioksidan aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada safranın hem kaynatılması hem de suda bekletilerek hazırlanan ekstresinin farklı dozlarda uygulanmasıyla yapılmış ve safranın en yüksek antioksidan etki gösterdiği dozun (hem kaynatma hemde suda bekletilerek uygulandığında) 0.45 mg/ml olan gruplarda olduğu gözlenmiştir [61]. Yine safranın gastrit üzerine etkisine yönelik yapılan bir çalışmada, safran ekstresi 25, 100 ve 250 mg/kg dozda oral olarak, krosin 2.5 , 5 ve 10 mg/kg dozda oral ve safranal 0.25, 2.5 ve 5 ml/kg dozlarında oral olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak safran, krosin ve safranalın gastrik mukozada glutatyon seviyesini artırarak ve lipid peroksidasyonunu düşürerek gastrik mukoza hasarını doz bağımlı olarak önlediği görülmüştür [62]. Hayvan deneylerinde safranın LD50 sinin safranın özütü uygulandığında 20.7 g/kg olduğu ortaya konmuştur [59]. Lorke, farelere 2000, 3000, 4000 ve 5000 mg/kg dozda safranın etanolde hazırlanmış ekstresini uygulamış ve herhangi bir toksisite görülmemiştir [63]. Safranın erkek ratlardaki seks davranışları üzerine yapılan çalışmada safranın sudaki ekstresinden ratlara 80,160 ve 320 mg/kg, krosinden 100,200 ve 400 mg/kg, safranal ise 0.1, 0.2 ve 0.4 ml/kg dozlarında uygulanmış ve çalışma sonucunda safran eksresi ile krosin'in afrodisyak etkisi görülürken safranalın ise bu etkisi gözlenmemiştir [64].

BÖLÜM 4

TEZ ÇALIŞMASINA DAHİL EDİLEN PARAMETRELER

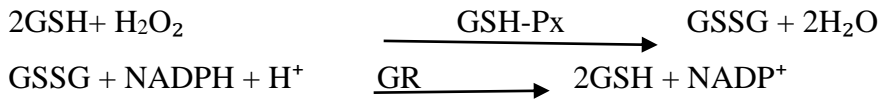
4.1. REDÜKTE GLUTATYON (GSH)

Önemli bir antioksidan özellik taşıyan glutatyon, hücreleri endojen ve egzogen kaynaklı oksidanlardan korur [65]. Glutatyon, glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşmuş bir tripeptittir. Aktif grubu –SH grubudur. Memeli dokularında ve tüm organlarda özellikle karaciğerde bulunmaktadır.



Şekil 4.1. GSH'nin moleküler yapısı.

Dokularda birbiriyle dengede bulunan glutatyon (GSH) ve (GSSG) olmak üzere iki formda bulunur [66]. İndirgenmiş GSH yapısında selenyum bulunduran glutatyon peroksidaz yardımıyla GSSG'ye dönüştürülür. Glutatyon sentezi iki enzim ile gerçekleşir.



Glutatyon serbest oksijen radikallerine karşı engelleyici olarak görev alır. Oksidatif hasarlar sonucu oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2), glutatyon peroksidaz etkisiyle (GSH-Px) suya yıkımlanır. Reaksiyon sonunda GSH ise GSSG dönüşür. Oluşan okside glutatyon daha sonra glutatyon redüktaz (GR) ile GSH dönüşür.

Bu sayede serbest oksijen radikallerini yok ederek H_2O_2 'yi yok eder. Glutatyon, serbest radikallerin yayılmasını engeller. Serbest radikaller tarafından üretilen maddelerinde detoksifikasyonunu sağlar [67]. GSH birçok reaksiyon için redükte özelliğe sahip olmasının yanı sıra hidrojen peroksit, diğer peroksitler ile serbest radikallerin detoksifikasyonun da oldukça önemli role sahiptirler.

4.2. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD) bir metalloenzim olup ROS toksisitesine karşı hücrelerin korunmasında görevli olan ve aerobik prosesler de ortaya çıkan süperoksit serbest radikalının ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen en etkili antioksidan savunma sistemlerinden biridir [68]. SOD enzimi oksijen kullanan tüm hücre ve hücre kompartımanların da (mitokontri, çekirdek, peroksisom gibi) bulunur [69, 70]. SOD enzimi çoğu hücrede 10^{-5} M konsantrasyonda bulunur ve aktif merkezinde bulunan metal kofaktörüne göre üç temel izomer tipi bulunur. Cu/Zn SOD sitozol ve peroksisomlar da lokalize olmuştur. Fe SOD peroksisomlarda bulunurken, Mn SOD mitokondri de bulunur [71]. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır. SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri, $O_2^{\cdot-}$ ve lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku O_2 artışıyla artar. SOD'ın ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. Aktif merkezinde Ni bulunduran dördüncü bir izoenzim (Ni SOD) daha bilinmemektedir. İlk defa Youn ve arkadaşları [72] tarafından *Streptomyces seoulensis*'den izole edilmiş olup diğer izoenzimler de olduğu gibi $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve O_2 'e metabolize etmektedir.

4.3. KATALAZ (CAT)

Katalaz enzimi ($H_2O_2:H_2O_2$ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) bir hemoprotein olup yapısında dört adet hem grubu bulundurmaktadır. CAT hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunup H_2O_2 'yi indirgeyen ve parçalayan, peroksisomların ise yapısal bir bileşeni olarak bulunan bir oksidazdır [73, 74].

Katalaz enzimi canlı organizmasında özellikle eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve birçok muhtelif dokuda bulunmaktadır [75].

Katalaz enzimi hücrelerde ortaya çıkan H₂O₂'yi, hidroksil serbest radikali (OH•) oluşumunu önlemek için suya ve oksijene parçalayarak özellikle hücre membranların da oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemek için antioksidan savunmasında görev alan enzimlerden biridir [76]. Ayrıca granülatöz hücrelerin kendisini respiratuar patlamaya karşı koruma görevini de yapmaktadır. CAT enzimi, hidrojen peroksiti substrat olarak kullanmasının yanında ayrıca hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak kullanılmaktadır [77, 78]. CAT, hidrojen peroksidi iki basamakta katalizlemektedir. Birinci basamakta H₂O₂, katalazın hem demiri ile etkileşerek Ferrik (Fe⁺³) içeren hali (porfirin katyon radikali) oluştururken oksijenden zengin demir peroksit oluşturur.



İkinci basamakta ise başka bir hidrojen peroksit molekülü okside olarak bileşik doğal halini almaktadır. Tepkimelerde hidrojen peroksit, hem elektron donörü hemde elektron alıcısı olarak görev yapmaktadır [79, 80].



Farelerde bu enzimin birçok şekli saptanmıştır [80]. Vucuda dışarıdan alınan çeşitli ilaç ve kimyasallar belli dokularda serbest radikal oluşumuna sebep olabilir [81]. Bu sebepten dolayı dokularda bulunan antioksidan enzimler hücrelerde hasar oluşmadan serbest radikalleri yok etmede çok önemli rol oynamaktadır [82, 83].

4.4. AMİNOTRANSFERAZLAR (AST VE ALT)

Aminotransferazlar; aspartat aminotransferaz (AST, serum glutamik oksaloasetik transaminaz, SGOT) ve alanin aminotransferaz (ALT, serum glutamik pürivik transaminaz, SGPT), karaciğer hasarını ve karaciğer hücrelerinde oluşan nekrozu tespit etmek için en çok kullanılan enzimlerdir. Her iki enzim de koenzim olarak

piridoksal fosfatı kullanır. Piridoksal fosfat enzim proteinindeki lizin kalıntısını bağlar ve amino asitler ile geçici Schiff temelli reaksiyon oluştururlar ve amino grubunu alarak bir α ketoaside transfer eder. AST enzimi, aspartatın alfa amino grubunu, ketoglutarik asitin alfa keto grubuna transfer ederek glutamik asit ve oksaloasetik asit oluşturmaktadır.

AST enzimi, başlıca karaciğer, kalp ve iskelet kasında, böbrek, pankreas ve eritrositler dokularında yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Bu dokularda herhangi bir hasar meydana geldiğinde, AST hücrelerden kana geçerek serumdaki seviyelerinde ciddi düzeyde yükselmeler görülmektedir. Ancak serum AST düzeyinin hangi organdan kaynaklandığını tespit edebilecek bir yöntem bulunmamaktadır. Hepatositler de bulunan AST enziminin %80'i mitokondride bulunurken %20'si ise sitoplazma da bulunur. ALT enzimi alanin aminoasidinin alfa amino grubunu ketoglutarik aside transfer ederek glutamik asit ve pürivik asit oluşturur [84]. ALT enzimi ise sadece hepatositlerin sitoplazmasında bulunmaktadır ve karaciğer dışı dokularda çok düşük miktarlarda olmasından dolayı karaciğer hasarı için spesifiktir. Karaciğer hasarında, serumda ALT enzimi genellikle AST enzimi ile birlikte yükselme gösterir. Ancak AST'de herhangi bir yükselme olmadan ALT'nin hafif veya orta derecede yükselmesi kronik hepatitin (özellikle hepatit C) ve karaciğer yağlanması bir göstergesidir [84, 85].

AST ve ALT enzimleri, hasar oluşan hücrelerden hücre membranlarında oluşan permeabilite artışı ve nekrozun şiddetine bağlı olarak seruma çıkarak serumdaki seviyeleri yüksek değerlere çıkar. Serumdaki AST, ALT'den daha hızlı uzaklaştırılır ve olasılıkla RES hücreleri tarafından yıkılmaktadır. Mitokondrideki AST enziminin salınımı, stoplazmik AST izoenziminin veya ALT enziminin salınımına göre daha şiddetli bir hasarı gerektirmektedir. Bu sebeple mitokondriyal/sitoplazmik AST oranı veya mitokondriyal/total AST oranının belirlenmesi şiddetli hücre nekrozu ve alkolik karaciğer hastalıklarında tanısal önemi olduğu ileri sürülmektedir. Ancak AST'nin iki izoenzimini (mitokondriyal ve sitoplazmik) ayırt eden çok az laboratuvar bulunmaktadır.

4.5. ALKALEN FOSFATAZ (ALP)

Alkalen fosfatazlar, bir metalloenzim olup aktif merkezinde serin içeren çinko bulundurur. Özellikle alkali pH'da katalitik aktivite gösterip birçok organik fosfat esterini hidrolize edebilme kabiliyeti gösteren bir enzim grubudur. Hemen hemen vücuttaki çoğu dokuda mevcut olup reaksiyon sonunda çeşitli ortofosfatlardan inorganik fosfatların salınımına sebep olur. Alkalen fosfataz'ın substratları, pirofosfat, fosfoserin ve fosfoditiletanolamin içermektedir ve intestinal mukoza da bulunan izoenzimi Ca^{+2} 'ye bağımlı olup ATPaz gibi çalışmaktadır. Bunun dışında karaciğer dokusunda bulunan alkalen fosfataz ise hepatositlerin sinüsoidel yüzeylerinde ve safra kanallüküllerinin mikrovilluslarında lokalize olmuştur. Dokularda bulunan alkalen fosfataz enzimleri için gen sekansları yapılmış ve sonuç olarak; karaciğer, kemik ve böbrek kökenli olan alkalen fosfatların aynı genden, intestinal ve plasenta da bulunan enzimin ise farklı genlerden transkripsiyona uğradığı tespit edilmiştir [86]. serumda tespit edilen alkalen fosfataz başlıca kemik ve karaciğerden kaynaklı izoenzimlerdir. İntestinal dokularda bulunan alkalen fosfataz, normal bireylerin %20'sinde mevcut olup enzimin total aktivitesinin en fazla %'sinden sorumlu olabilir [86, 87]. Bağırsakta bulunan alkalen fosfataz, iki farklı mRNA ile 2 farklı izoenzim olacak şekilde lokalize olmuştur. Bu izoenzimlerden biri bağırsak villuslarının fırçamsı kenar üzerinde bulunurken, diğer izoenzimi ise plazmaya salınmaktadır [84].

4.6. LİPİD PEROKSİDASYONU VE MALONDİALDEHİT (MDA)

Kompleks ürünler DNA ve proteinler ile mutajenik ve toksik etkiler meydana getirirler. Lipid peroksidasyonu aktif elektrofillerden oluşan kompleks ürünlerin meydana gelmesiyle oluşur.

Peroksil radikalleri doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşmuştur. İki radikal ajan elektronlarını paylaşarak kendi aralarında kovalent olarak bağ kurarlar. Fakat hücredeki çoğu molekül radikal değildir ancak radikal olan moleküllerle elektron alışverişine girerek kendilerini radikal bileşiklere dönüştürebilirler [83].

Hidrojen atomu da radikal olarak isimlendirilir çünkü bir proton ve bir elektrona sahiptir.



Reaksiyon oluşturulurken yüksek reaktif radikaller, biyomoleküllerin hidrojenlerini ayıracak şekilde saldırırlar [88]. Vücutta devamlı olarak üretilen serbest radikaller hidrojen proksit (H_2O_2) ve $O_2^{\cdot-}$ dir. Vücut bunlara karşı antioksidan koruyucu sistem ile ve hasar yapıcı moleküllerin birikmesini engelleyici sistem ile de bu maddelere karşı koyarlar.

$\cdot OH$ çok reaktif bir tür olduğu için serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatabilirler. $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 , $\cdot OH$ 'ye göre daha az reaktiftir. Ancak fazla miktarda oluşurlarsa da oksidatif hasara da sebep olabilecekleri söylenebilir [89].

Lipid peroksitleri yüksek sıcaklıkta hoş tat ve kokusu olmayan keton, asit ve aldehit ürünlerine dönüşerek ayrışırlar. Doymamış yağ asitleri özellikle 20 karbonlu ve daha uzun araşidonatlar gibi serbest radikallerin etki etmesi ile okside edilir ve lipid peroksitlerini meydana getirirler. Lipid peroksitleri toksiktir bu özelliğinden dolayıda hücre içi hasar yapma kapasitesine de sahiptirler [90].

Aerobik organizmalarda fazla $O_2^{\cdot-}$ 'nin SOD (süperoksit dizmutaz) tarafından O_2 ve H_2O_2 'ye dönüştürülmesi bir antioksidan koruma mekanizmasıdır [90].

Lipid peroksidasyonunda, aldehitler (MDA ve 4-hidroksinonenal), pentan, etan, 2,3 trans konjuge dienler ve kolesterolsidler gibi son ürünler reaktif ara ürünler yoluyla oluşmaktadır [91]. Aldehitler, lipidhidoperoksidlerinin yıkımı sırasında oluşurlar ve biyolojik olarak aktiftirler. Bunlara iyi bir örnek MDA ve 4-hidroksinonenal' dir. Bu oluşan MDA bir aldehittir ve doymamış yağ asiti oksidasyonunun bir parçası olup lipid peroksidasyonunun önemli göstergesidir [52]. Bu aldehitler hücredeki protein ve DNA'larla çapraz bağlar kurarak onların işleyişini bozarak aksaklıklara sebep olurlar.

BÖLÜM 5

GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. GEREÇLER

5.1.1. Kimyasal Malzemeler

Araştırmamızda krosin, fosforik asit, tiobarbutirik asit (TBA), n-butanol, triklorasetik asit (TCA), disodyumhidrojenfosfat (Na_2HPO_4), 5,5' dithiobis 2 nitrobenzoik asit (DTNB), trisodyum sitrat, ksantin, ksantin oksidaz, Na_2EDTA , NBT, Na_2CO_3 , BSA, KH_2PO_4 , H_2O_2 , Potasyum tartarat, bakır sülfat, NaOH, Folin Ciocalteu-Fenol ayırıcı, TAS (Total Antioksidan Kapasitesi) ve TOS (Total Oksidan Kapasitesi) kitleri kullanıldı.

5.1.2. Kullanılan Aletler

Araştırmalarda gilson marka (10, 100 ve 1000 μL) otomatik pipetler, cenco whirlmix vorteks, libor-AEG 320 marka hassas terazi, hermler marka soğutmalı santrifüj, LKB biochrom ultraspec marka UV/visible spektrofotometre, hanna marka pH metre, clifton marka manyetik karıştırıcı, IKA ultra turrax, T 25 basic homojenizatör.

5.1.3. Ratların Temini Ve Bakımı

Bu araştırma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden (İNÜ TF-DEHÜM) 40 adet canlı ağırlığı 250-300 g aralığında erkek Wistar rat temin edilmiştir. Ratlar 21 gün boyunca rat yemi ve suyu sınırsız bir şekilde tüketmeleri sağlanmıştır. Ratlar sıcaklığın 21°C , ortam neminin %

55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri) ve 12 saat karanlık uygulanan odalarda bakıldı.

5.2. YÖNTEMLER

5.2.1. Grupların Oluşturulması

Çalışmamızda “Ratlarda Akrilamid kaynaklı olası oksidatif stres üzerine Crocin’in etkilerinin araştırılması” amaçlanmıştır. Deney hayvanları biriminden temin edilen 40 adet Wistar rat random olarak her grupta 10 hayvan olacak şekilde dört gruba ayrılmıştır. Bu gruplar;

- 1.grup (Kontrol grubu); 1 ml serum fizyolojik uygulandı.
- 2.grup (Akrilamid grubu); 25 mg/kg akrilamid uygulandı.
- 3.grup (Krosin grubu); 50 mg/kg krosin uygulandı.
- 4.grup (Akrilamid+krosin grubu): 25 mg/kg akrilamid ve 50 mg/kg krosin uygulandı.

Uygulanan tüm kimyasallar her sıçana 1 ml hacimde ve ağız yoluyla (gavajla) uygulandı. Yapılan tüm uygulamalar her gün aynı saatte düzenli olarak 21 gün boyunca tekrarlanmıştır.

5.2.2. Numune Alınması Ve Hazırlık İşlemleri

Deney sonunda ratlar ksilazin-ketamin anestezisi altında laparotomi yapılarak kalp içinden heparinize tüplere kan alındı. Daha sonra, tüm ratlar dekapite edilerek ince ve kalın bağırsak, karaciğer doku örnekleri alındı, doku örnekleri serum fizyolojikle yıkanarak fazlalık kanın uzaklaştırılması sağlandı.

Dokuların bir parçası histopatolojik incelemeler için %10’luk formol içersine kondu. Diğer parçası ise çalışma gününe kadar -80 C°’de saklandı. Çalışma günü dokular derin dondurucudan çıkarılarak tartıldı. %10’luk homojenat oluşacak şekilde fosfat tamponu ilave edilerek buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi (IKA, Germany). Elde edilen homojenatlarda MDA düzeyleri ölçüldü. Doku homojenatları 5000 rpm’de, +4 derecede, 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant

elde edildi. Elde edilen bu süpernatantlarda; GSH, SOD, CAT, TAS, TOS ve protein düzeyleri ölçüldü. Alınan kan örneklerinde ise Hastanenin rutin Biyokimya laboratuvarında AST, ALT ve ALP düzeylerine bakıldı.

5.2.3. Redükte Glutasyon (GSH) Analizi

5.2.3.1. Kullanılan Reaktifler

- 1.% 10'luk triklor asetik asit
- 2.% 1'lik trisodyum sitrat
- 3.% 0.4'lük 5,5'-Ditiyobis 2-nitrobenzoik asit
- 4.0.3 molar disodyum hidrojen fosfat

GSH analizi Ellman'ın [92] tarif ettiği yöntemle yapıldı. Kimyasalların deney tüplerine eklenmesiyle ortamdaki glutasyonun, 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyon vermesi sonucunda sarı-yeşilimsi bir renk oluşmaktadır. Oluşan bu rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okunarak redükte glutasyonun miktarı tayin edilebilmektedir.

5.2.4. MDA Analizi

5.2.4.1. Kullanılan Reaktifler

1. % 8,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. % 20'lik asetik asit
3. %0,8'lik 2-tiyobarbutürik asit (TBA)
4. 2 mmol/L 1,1',3,3' tetraetoksipropan

MDA analizi Ohkawa ve ark'larının [93] tarif ettiği yöntemle yapıldı. Temel prensib homojenattan alınan numuneki MDA'nın 95 °C'de tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli ürünün n-butanol fazından ekstrakte edilen süpernatantın spektrofotometre ile 535 nm'de ölçülmesiyle belirlendi.

5.2.5. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

5.2.5.1. Kullanılan Reaktifler

1. Çalışma reaktifi (Assay reaktifi)
 - 1.1. 0.3 mmol/L ksantin
 - 1.2. 0.6 mmol/L Na₂EDTA
 - 1.3. 150µmol/L NBT
 - 1.4. 400 mmol/L Na₂CO₃
 - 1.5. 1gr/L BSA
2. Ksantin oksidaz (167 Ü/L)
3. 0.8 mmol/L CuCl₂
4. 2M (NH₄)₂SO₄

SOD enzim aktivite ölçümü Sun ve arkadaşlarının [94] yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz tarafından süperoksit radikalleri üretilir. Süperoksit radikali NBT'yi (nitro blue tetrazolium) indirgeyerek renk oluşturur. Bu indirgenme mavi renkli formazon oluşturur. Böylece oluşan formazonun 560 nm'de verdiği absorbanstan SOD aktivitesi hesap edilmektedir.

5.2.6. CAT Aktivitesi Ölçümü

1. EDTA'sız fosfat tamponu (pH=7,50): 600 ml 50 mM Na₂HPO₄ ile 50 mM KH₂PO₄'in 400 ml'si karıştırılarak hazırlanır.
2. Hidrojen peroksitli EDTA'sız , absorbansı 0.500 olan fosfat tamponu: Hidrojen peroksitli EDTA'sız fosfat tamponu hazırlanırken absorbansın 0.500 olmasına dikkat edilir.
3. CAT enzim aktivite ölçümü Aebi ve arkadaşlarının [95] yöntemine göre yapıldı. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ultraviole spektrumunda absorpsiyon veren bir maddedir. Maksimal absorbans 240 nm'de meydana gelmektedir. Deney ortamına ilave edilen hidrojen peroksidin katalaz tarafından su ve oksijene parçalanması 240 nm'de absorbans azalması ile kendini gösterir. absorbansta gözlenen bu azalma 1 dakika boyunca kayıt altına alınarak enzimin aktivitesi ölçülmektedir.

5.2.7. Total Oksidan Seviyesinin (TOS) Ölçümü

Total oksidan seviyesinin ölçümünde, ticari TOS ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile renk oluşturması esasına dayanır [96]. TOS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, ELİZA 25 °C'ye ayarlanarak, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 µL serum karıştırılıp 530 nm'de absorbanı ölçüldü. Karışıma 25 µL reaktif 2 (pro-kromojen solüsyon) eklenerek 10 dk. inkübasyondan sonra tekrar 530 nm'de absorbanı ölçülmesiyle TOS düzeyleri belirlendi.

5.2.8. Total Antioksidan Seviyesinin (TAS) Ölçümü

Ticari TAS ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS formuna indirgemesine dayanır [97]. TAS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, ELİZA cihazı 25 °C'ye ayarlanarak, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 µL serum karıştırılıp 660 nm'de absorbanı ölçüldü. Karışıma 75 µL reaktif 2 (renkli ABTS solüsyonu) eklenerek 10 dk. inkübasyondan sonra tekrar 660 nm'de absorbanı ölçülmesiyle TAS düzeyleri belirlendi.

5.2.9. Histolojik İnceleme

Karaciğer, kalın ve ince bağırsak dokusu örnekleri %10'luk formaldehit ile tespit edildi. Daha sonra rutin histolojik doku takip prosedürlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin-eosin (H-E) ile boyandı. Boyanmış olan kesitler, Nikon Optiphot-2 ışık mikroskop, Nikon DS-Fi2 kamera ve DS L3 görüntü analiz sisteminde (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) incelenerek fotoğraflar alındı. Karaciğer dokusunun histopatolojik hasarı (inflamasyon, vasküler konjesyon, hemoraji, intrasitoplazmik vakuolizasyon ve nekroz), ince bağırsak (villus boylarında kısalma ve küntleşme, villusta epitel hasarı, Liberkuhn kripta yapılarında bozulma ve inflamasyon) ve kalın bağırsak (Goblet hücre yoğunluğunda azalma, epitelyum doku

hasarı, mukoza alanlarında fibrozis ve Liberkühn kripta yapılarında bozulma ve inflamasyon) dokuları incelenerek 0 ile 3 arasında (Normal histoloji = 0, hafif= 1, orta= 2, şiddetli = 3) skorlamalar yapıldı.

5.2.10. İstatistiksel Analizler

İstatistik için SPSS 21 paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelendi, tanımlayıcı olarak ortalama ve standart sapma verildi. Varyansların homojenliğini test etmek için Levene testi kullanıldı. Varyansları homojen olan grupları karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi ve sonrasında Tukey HSD ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Varyanslar homojen olmadığı durumda ise Welch testi ve Tamhane T2 ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Histolojik skorlama için Veriler medyan, minimum ve maksimum değerler ile özetlendi. Grupların karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmalarda Conover yöntemi kullanıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edildi.

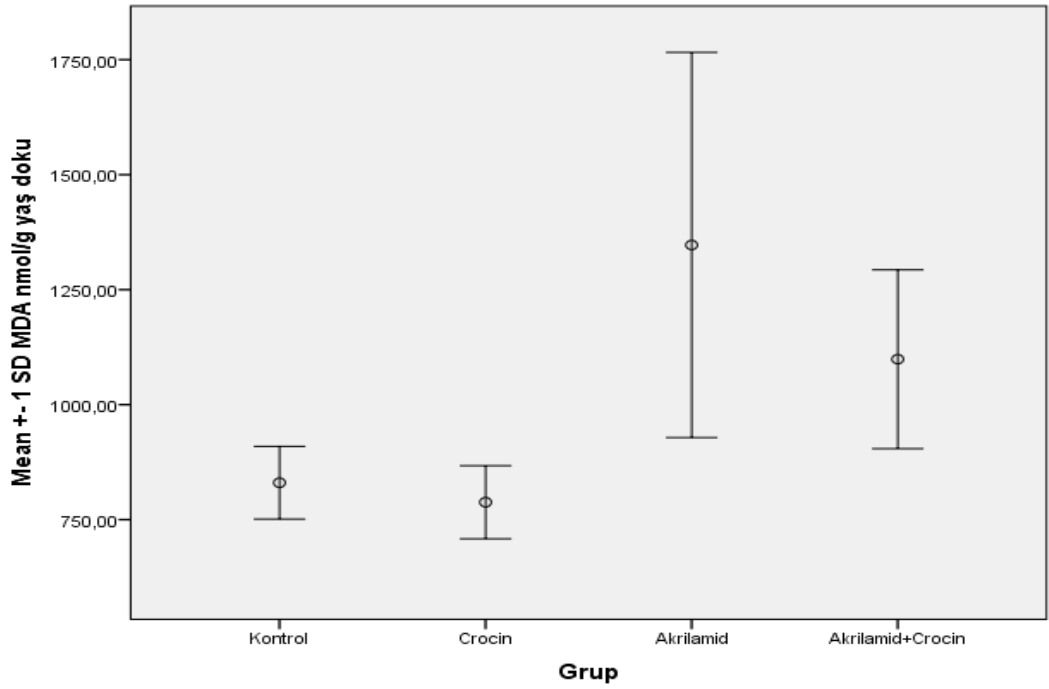
BÖLÜM 6

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR

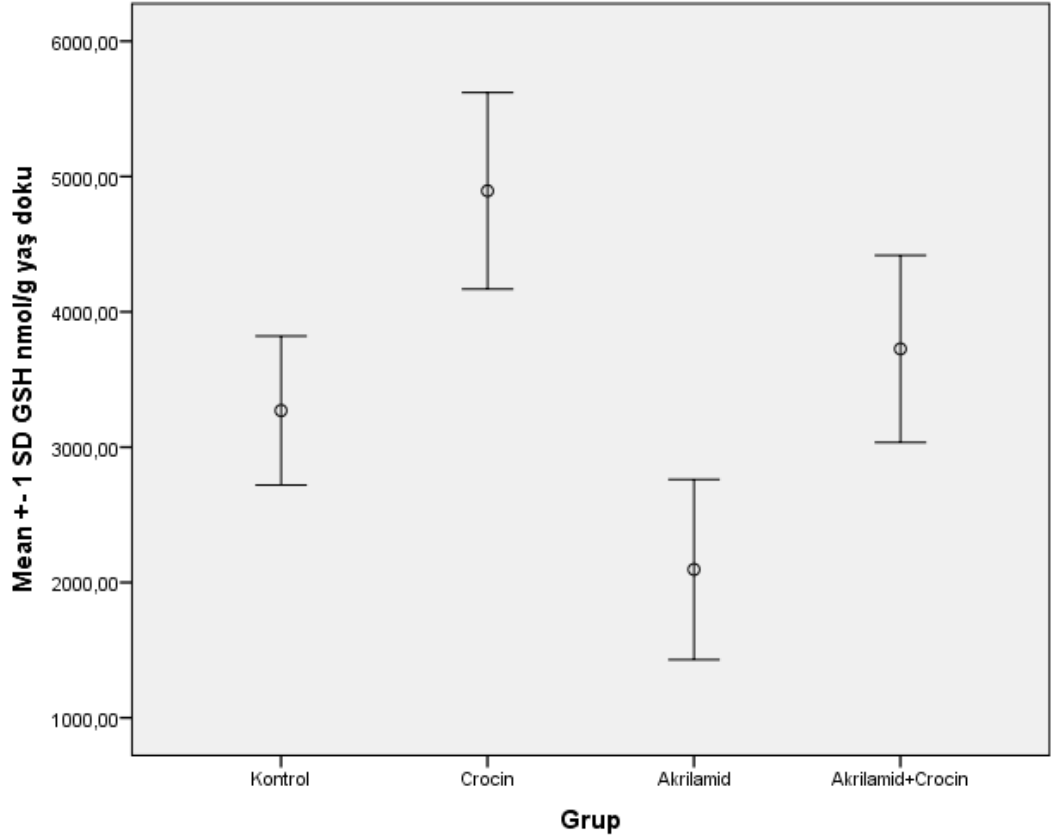
6.1.1. Grupların Karaciğer MDA Düzeyleri

AA grubunun MDA seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırılıp bakıldığında istatistiki olarak anlamlı derecede ($p < 0.05$) artış gösterdiği, ancak AA ile beraber krosin uygulandığında düşüş olduğu ancak bunun istatistiki olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Grupların karaciğer MDA düzeyleri.

6.1.2. Grupların Karaciğer GSH Düzeyleri

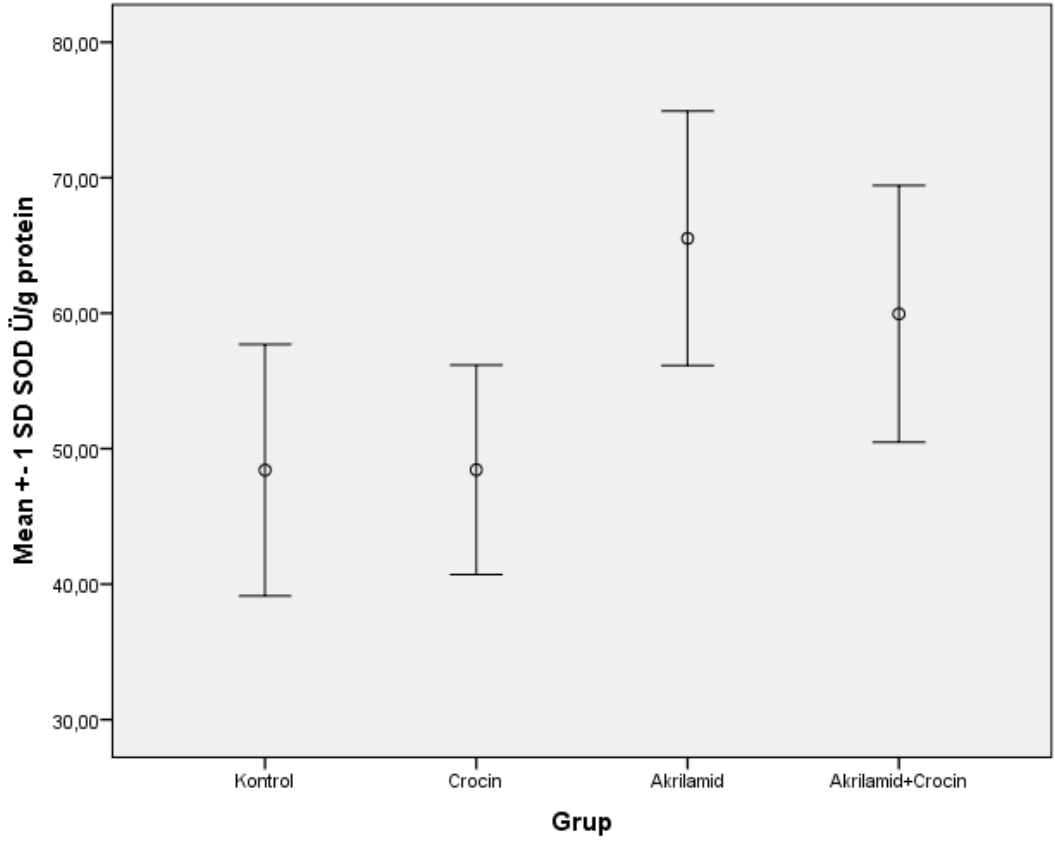


Şekil 6.2. Grupların karaciğer GSH düzeyleri.

Karaciğer dokusu GSH düzeyleri yönünden Kontrol/Krosin, Kontrol/AA, AA/ AA + krosin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p < 0.05$) olduğu ve Aa ile birlikte krosin uyguladığımızda GSH değerlerini kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığı belirlendi (Şekil 6.2).

6.1.3. Grupların Karaciğer SOD Aktivite Düzeyleri

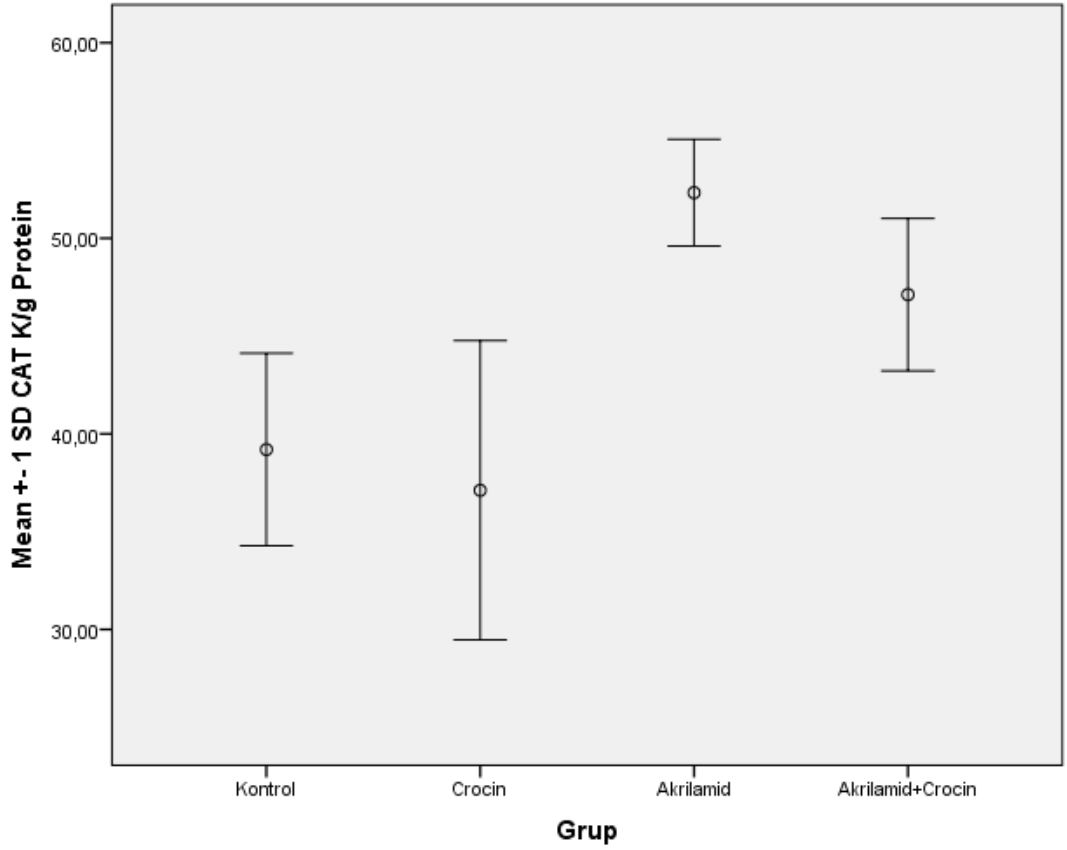
AA uygulaması karaciğer SOD aktivitesinde kontrol ve krosin gruplarına göre belirgin bir artış gözlenirken ($p < 0.05$), krosin ile beraber AA uygulandığında SOD aktivitesinde bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. Grupların karaciğer SOD aktivite düzeyleri.

6.1.4. Grupların Karaciğer CAT Aktivite Düzeyleri

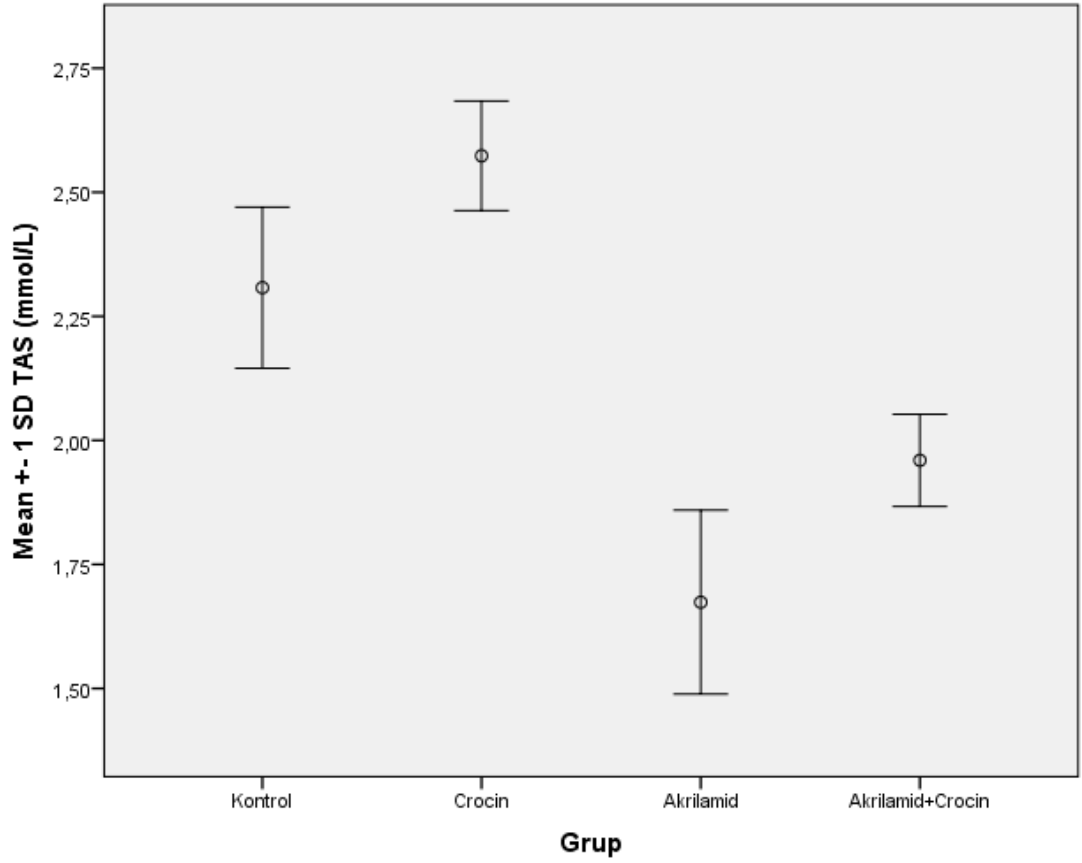
Karaciğer CAT aktivitesi AA uygulandığında kontroll grubuna kıyasla istatistiki olarak artış gözlemlenirken ($p < 0.05$), AA ile krosin uygulaması aktivitede ki bu artış da anlamlı bir düşüşe ($p < 0.05$) sebep olmuştur (Şekil 6.4).



Şekil 6.4. Grupların karaciğer CAT aktivite düzeyleri.

6.1.5. Grupların Karaciğer TAS Düzeyleri

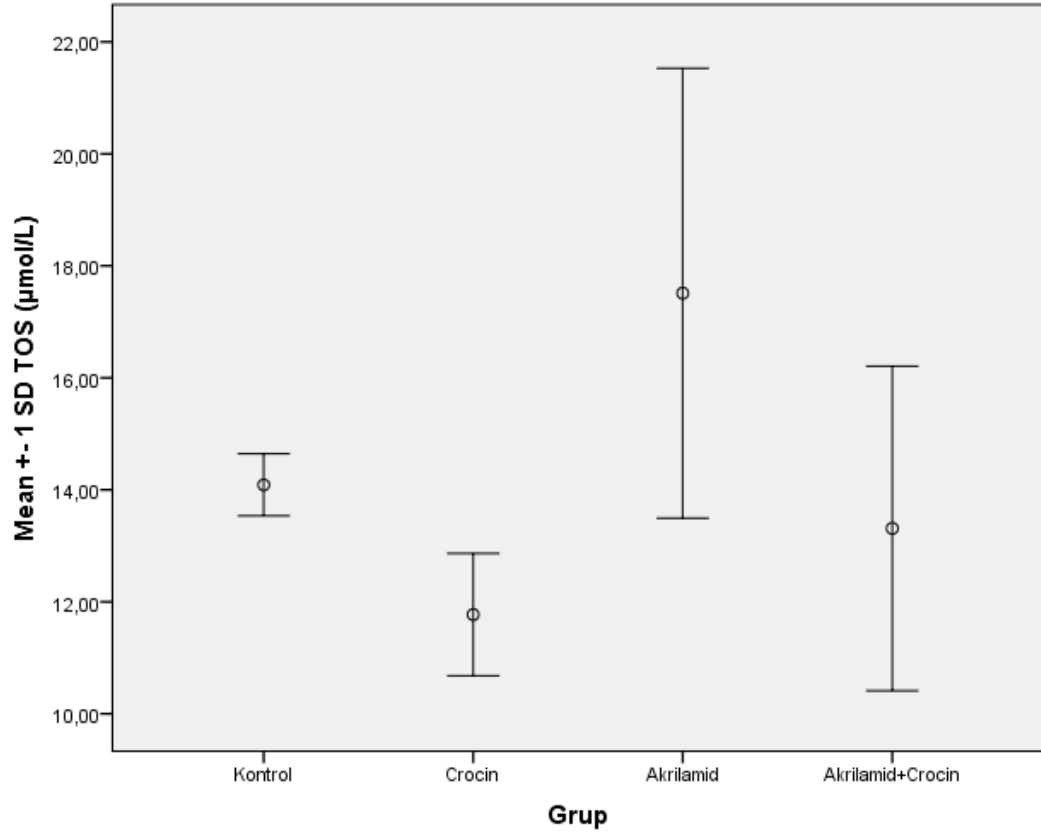
Krosin uygulamasının karaciğer TAS düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselttiği ($p < 0.05$), AA uygulandığında ise karaciğer TAS düzeyinin belirgin bir şekilde düştüğü görüldü. AA ile birlikte krosin uyguladığımız da ise TAS seviyesinin AA grubuna göre anlamlı derecede yükseldiği ($p < 0.05$) görüldü (Şekil 6.5).



Şekil 6.5. Grupların karaciğer TAS düzeyleri.

6.1.6. Grupların Karaciğer TOS Düzeyleri

Karaciğer dokusunda AA uygulaması TOS düzeylerinde artışa sebep olurken, AA ile beraber krosin uygulandığında TOS seviyelerinde bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 6.6).

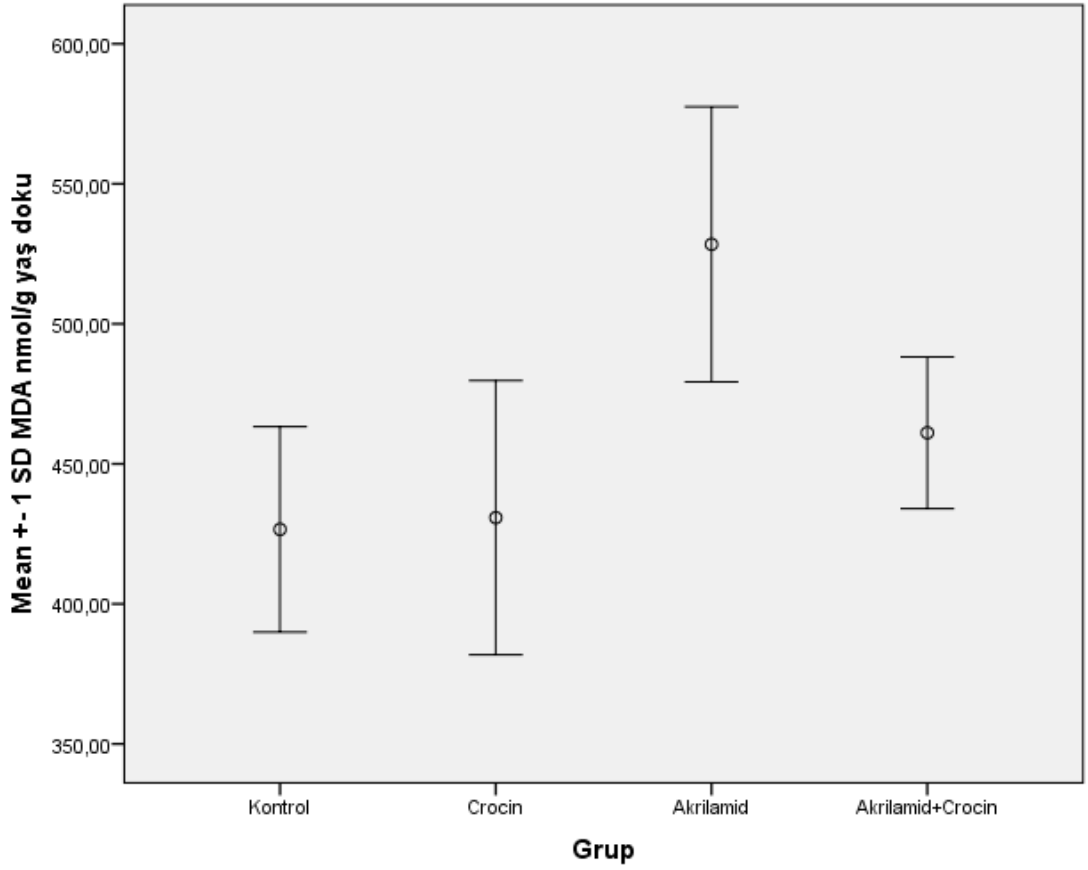


Şekil 6.6. Grupların karaciğer TOS düzeyleri.

Farklı üst indise sahip gruplar istatistiksel olarak birbirinden farklı. P değeri italik olanlar welch testi, ikili karşılaştırma Tamhane T2 testi, diğerleri anova sonrası Tukey HSD.

6.1.7. Grupların İncebağırsak MDA Düzeyleri

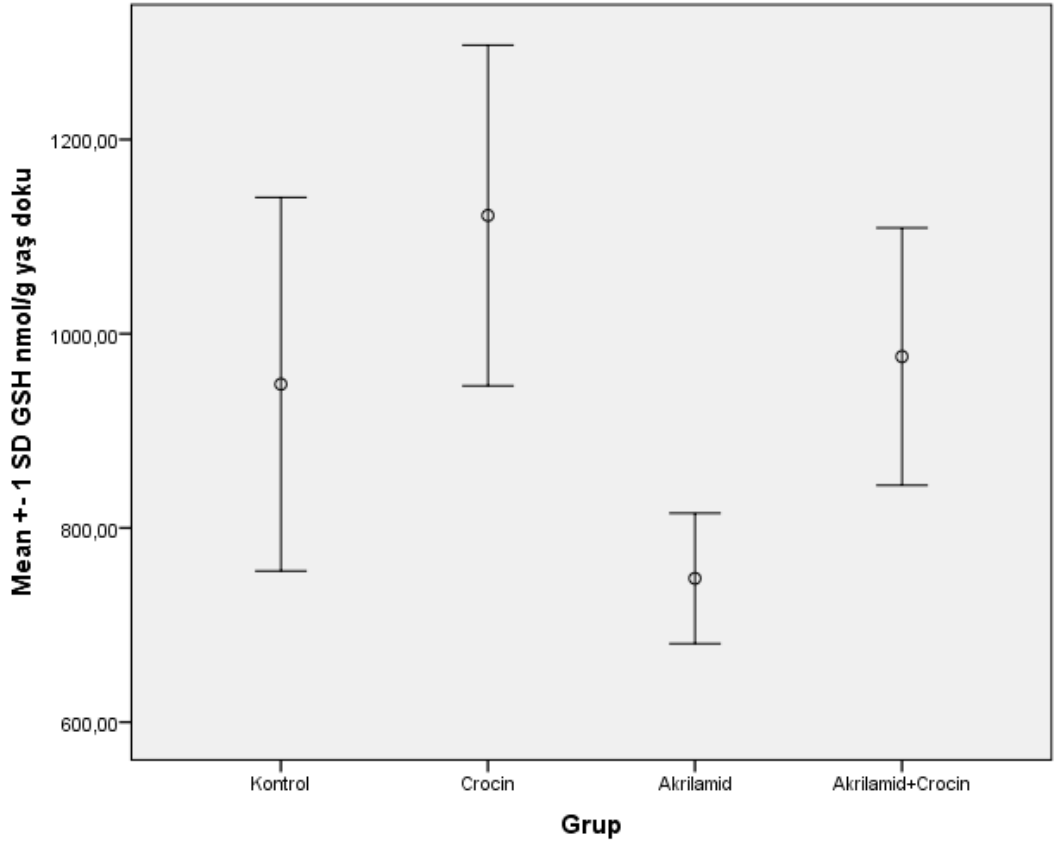
AA grubunun MDA düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derece ($p < 0.05$) artış gösterdiği, ancak AA ile beraber krosin uygulandığında kontrol grubu değerlerine yakın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 6.7).



Şekil 6.7. Grupların incebağırsak MDA düzeyleri.

6.1.8. Grupların İncebağırsak GSH Düzeyleri

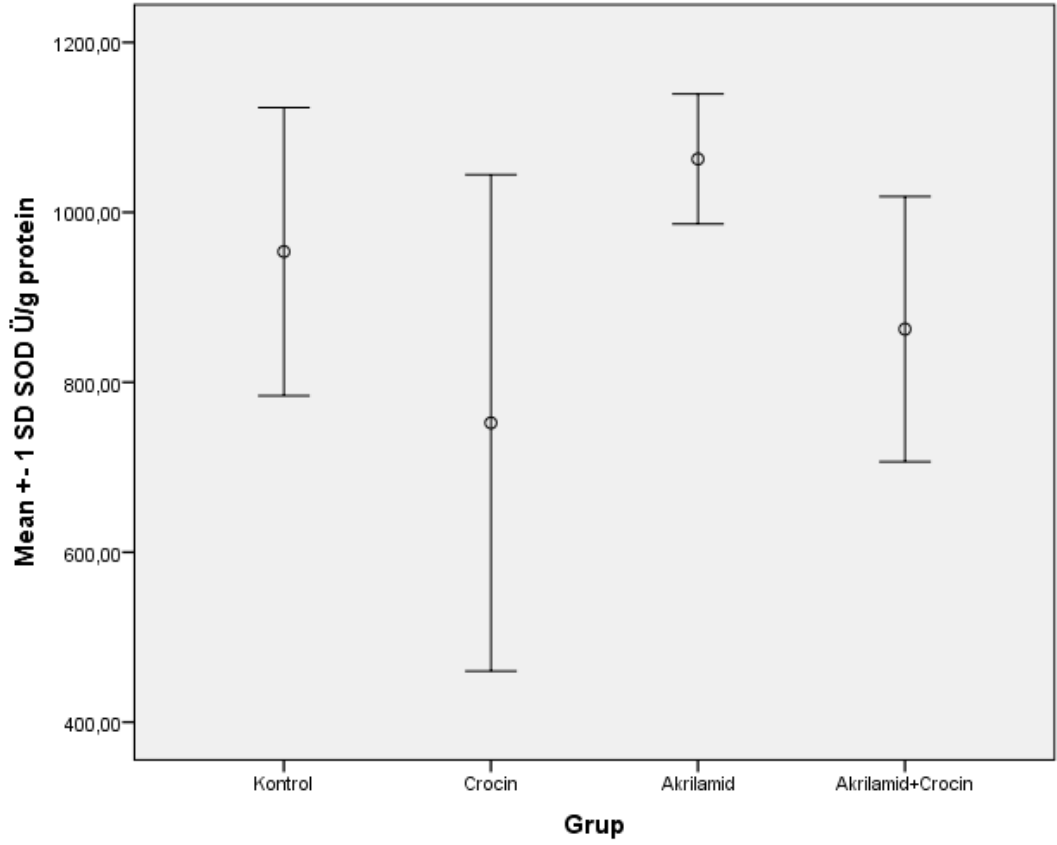
İncebağırsak GSH düzeyleri AA uygulandığında kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş ($p < 0.05$) gözlenirken, krosin uygulaması düşmüş olan GSH düzeylerini anlamlı derecede artırarak ($p < 0.05$) kontrol grubu değerlerine yükseltmiştir (Şekil 6.8)



Şekil 6.8. Grupların incebağırsak GSH düzeyleri.

6.1.9. Grupların İncebağırsak SOD Aktivite Düzeyleri

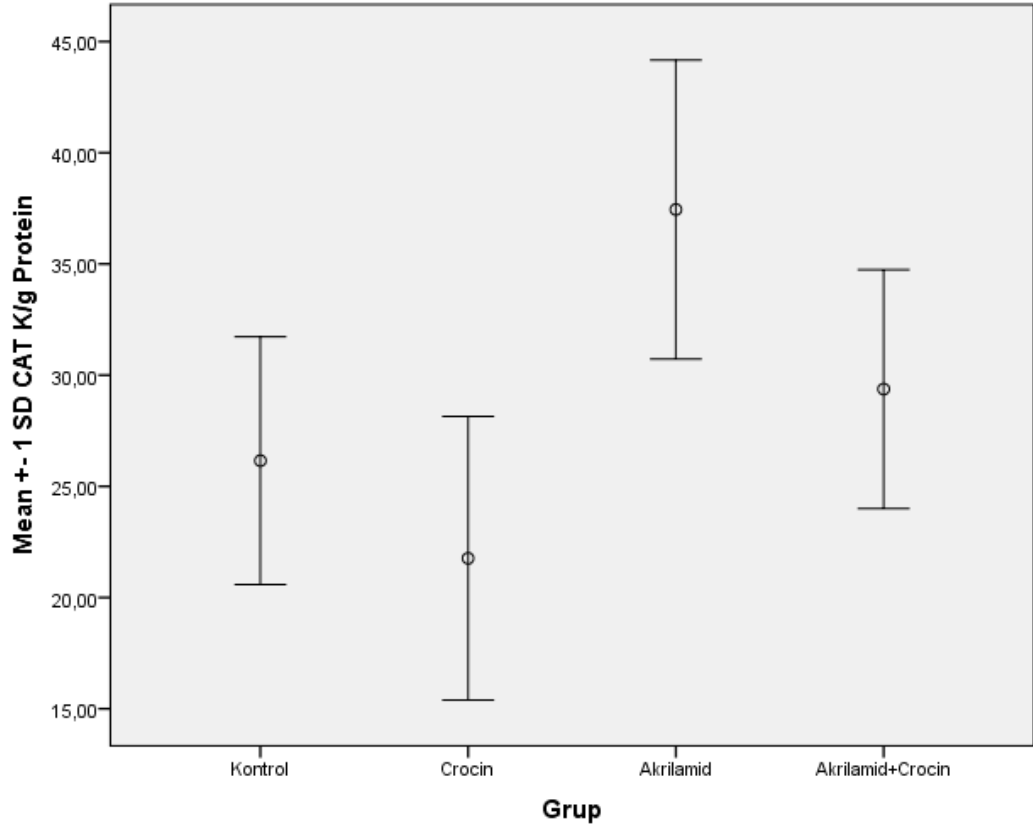
İncebağırsaklarda SOD aktivitesi AA uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0.05$) gözlenirken krosin uygulaması enzim aktivitesini kontrol grubu seviyelerine ($p < 0.05$) düşürmüştür (Şekil 6.9).



Şekil 6.9. Grupların incebağırsak SOD aktivite düzeyleri.

6.1.10. Grupların İncebağırsak CAT Aktivite Düzeyleri

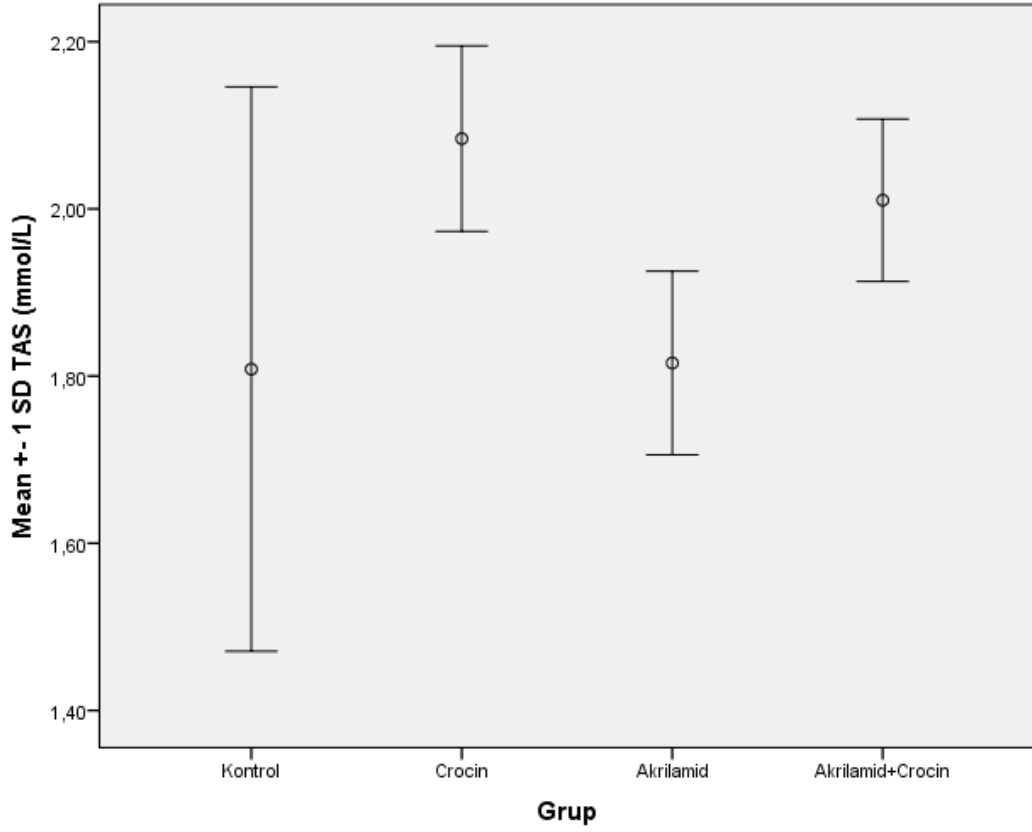
CAT enzim aktivitesi AA uygulamasıyla birlikte kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artışa sebep olurken ($p < 0.05$), krosin enzim aktivitesini anlamlı derecede ($p < 0.05$) düşürmüştür (Şekil 6.10).



Şekil 6.10. Grupların incebağırsak CAT aktivite düzeyleri.

6.1.11. Grupların İncebağırsak TAS Düzeyleri

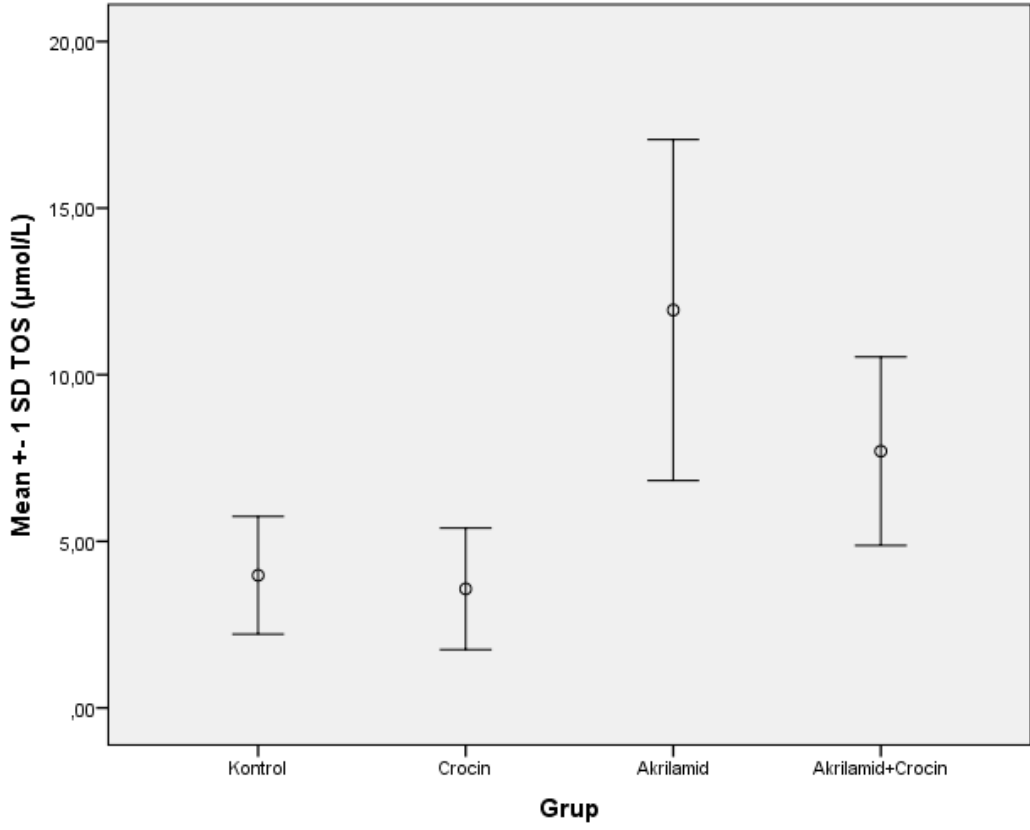
AA uygulaması TAS düzeylerinde belirgin bir düşüğe ($p < 0.05$) sebep olurken, krosin TAS düzeylerinde yükselme gözlenmiştir (Şekil 6.11).



Şekil 6.11. Grupların incebağırsak TAS düzeyleri.

6.1.12. Grupların İncebağırsak TOS Düzeyleri

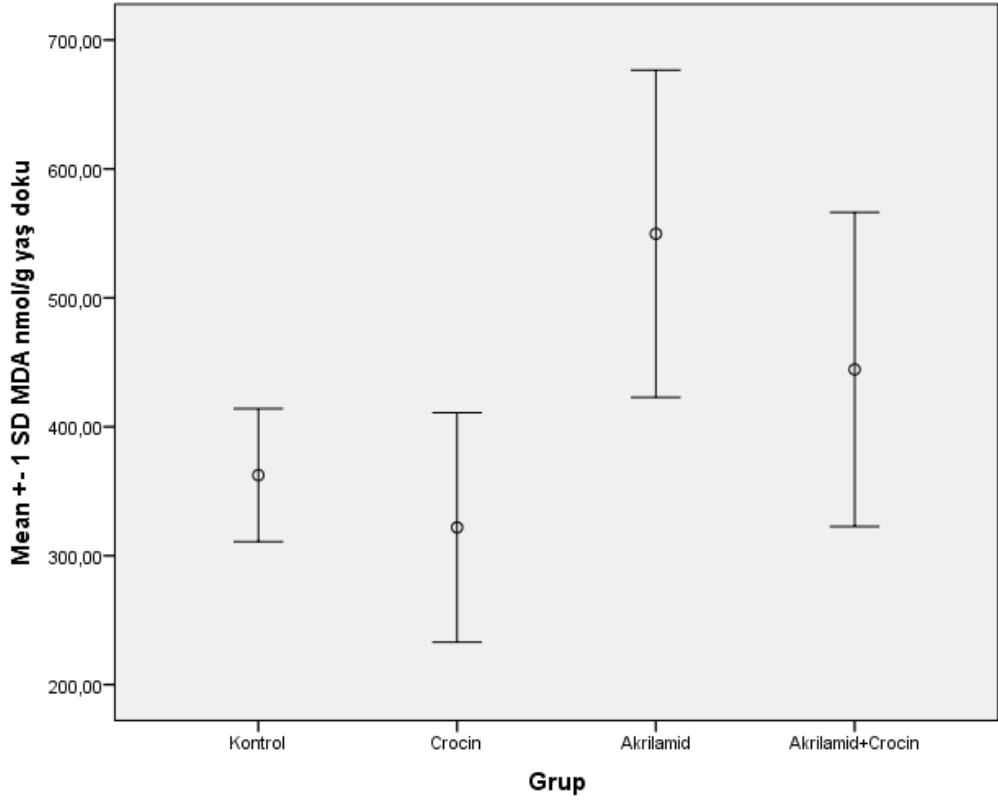
İncebağırsaklardaki TOS düzeyleri, AA uygulamasıyla birlikte anlamlı derecede ($p < 0.05$) artış gösterirken, krosin uygulaması ise TOS düzeylerinde düşüşe sebep olmuştur (Şekil 6.12).



Şekil 6.12. Grupların incebağırsak TOS düzeyleri

6.1.13. Grupların Kalınbağırsak MDA Düzeyleri

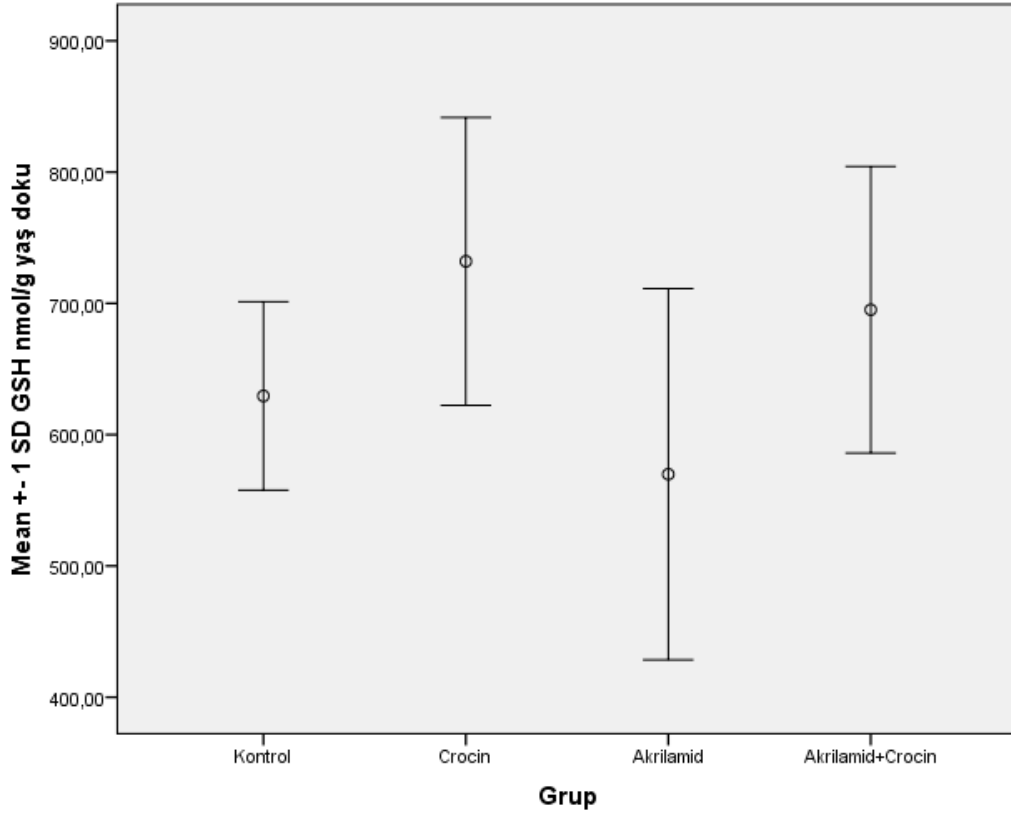
MDA düzeylerinde AA uygulaması ile birlikte anlamlı bir artış ($p < 0.05$) gözlenirken, krosin uygulaması ise MDA düzeylerinde düşüşe sebep olmuştur (Şekil 6. 13).



Şekil 6.13. Grupların kalınbağırsak MDA düzeyleri.

6.1.14. Grupların Kalınbağırsak GSH Düzeyleri

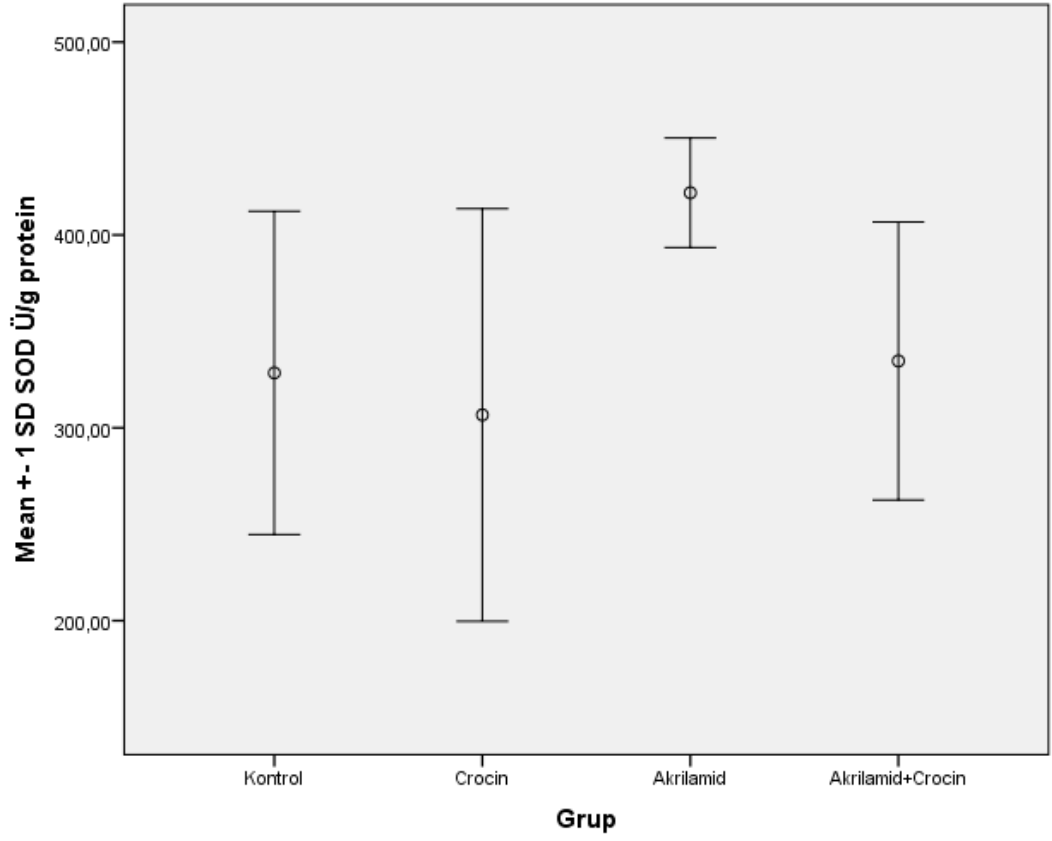
Kalınbağırsak GSH düzeyleri AA uygulaması ile birlikte anlamlı bir düşüşe uğrarken ($p < 0.05$), krosin uygulandığında GSH düzeylerinde artış gözlenmiştir (Şekil 6.14).



Şekil 6.14. Grupların kalınbağırsak GSH düzeyleri.

6.1.15. Kalınbağırsak SOD Aktivite Düzeyleri

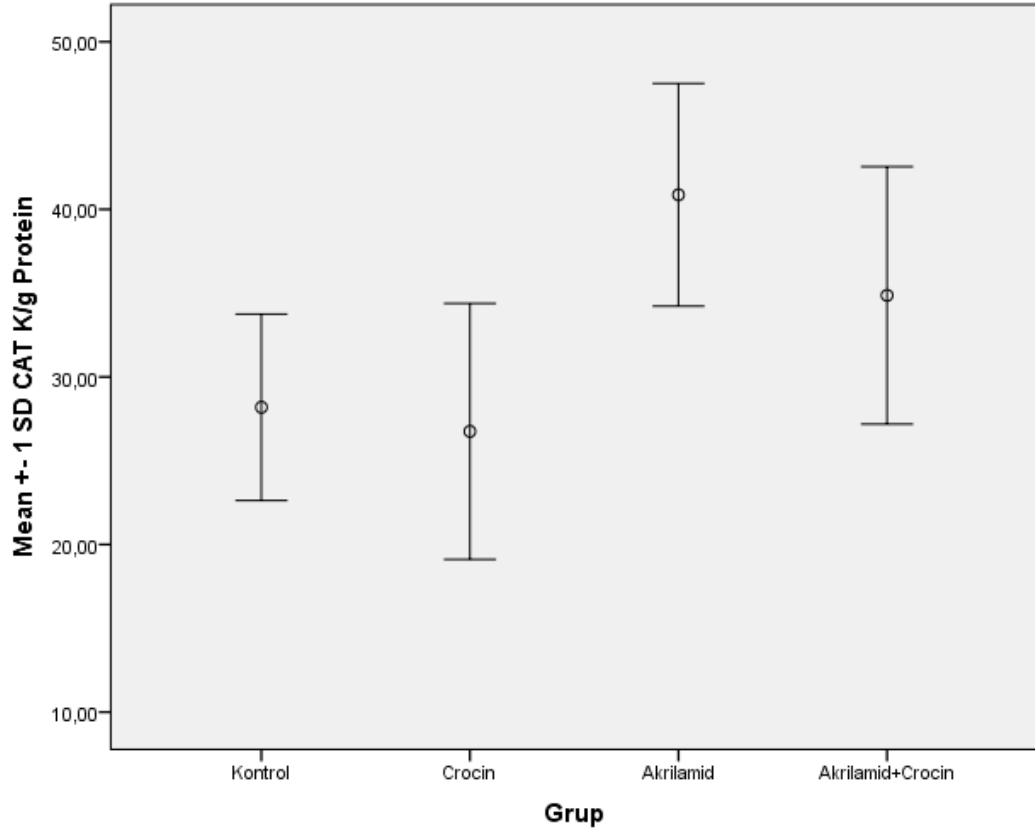
SOD enzim aktivitesi AA uygulanmasıyla beraber anlamlı derece de artışa uğrarken ($p < 0.05$), krosin SOD aktivitesini kontrol grubu değerlerine indirmiştir (Şekil 6.15).



Şekil 6.15. Grupların kalınbağırsak SOD aktivite düzeyleri

6.1.16. Grupların Kalınbağırsak CAT Aktivite Düzeyleri

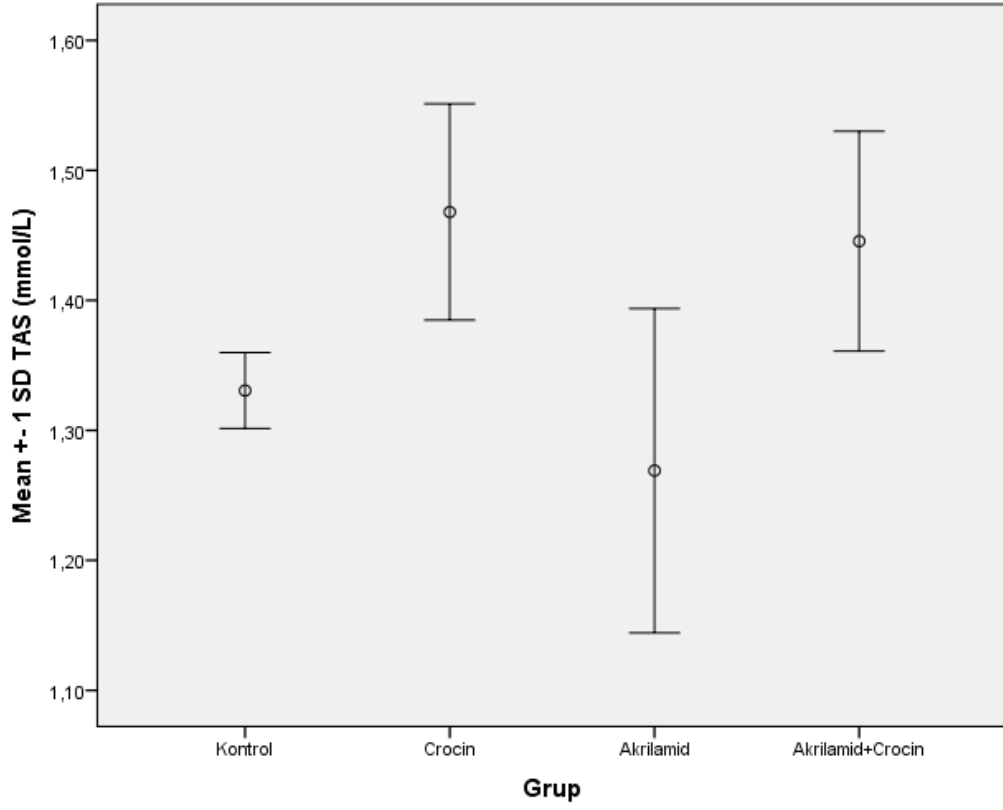
CAT enzim aktivitesi AA uygulamasıyla birlikte istatistiki olarak anlamlı bir artışa uğramış ($p < 0.05$), krosin ise kontrol grubu değerlerine indirmiştir (Şekil 6.16).



Şekil 6.16. Grupların kalınbağırsak CAT aktivite düzeyleri.

6.1.17. Grupların Kalınbağırsak TAS Düzeyleri

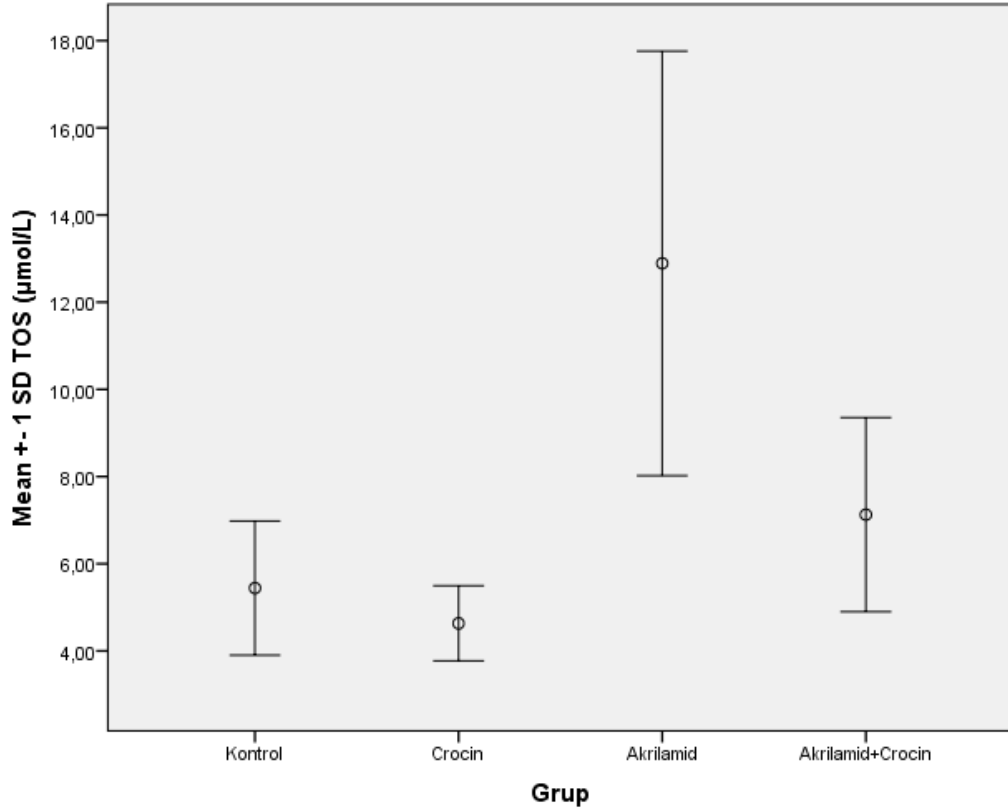
Kalınbağırsak TAS düzeyleri AA ile birlikte anlamlı bir düşüğe uğrarken ($p < 0.05$), krosin ise düşmüş olan TAS değerlerinde anlamlı bir artışa ($p < 0.05$) sebep olmuştur (Şekil 6.17).



Şekil 6.17. Grupların kalınbağırsak TAS düzeyleri.

6.1.18. Grupların Kalınbağırsak TOS Düzeyleri

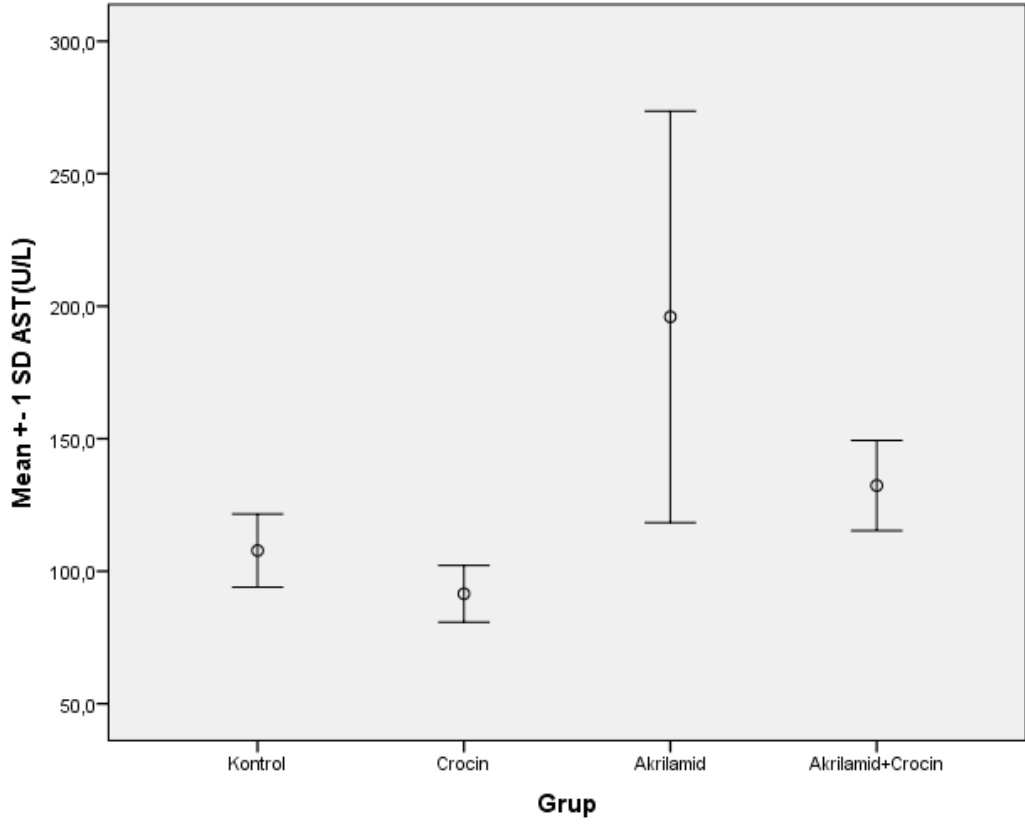
TOS değerleri AA uygulamasıyla birlikte anlamlı bir artışa uğrarken ($p < 0.05$), krosin uygulaması ile TOS değerlerinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 6.18).



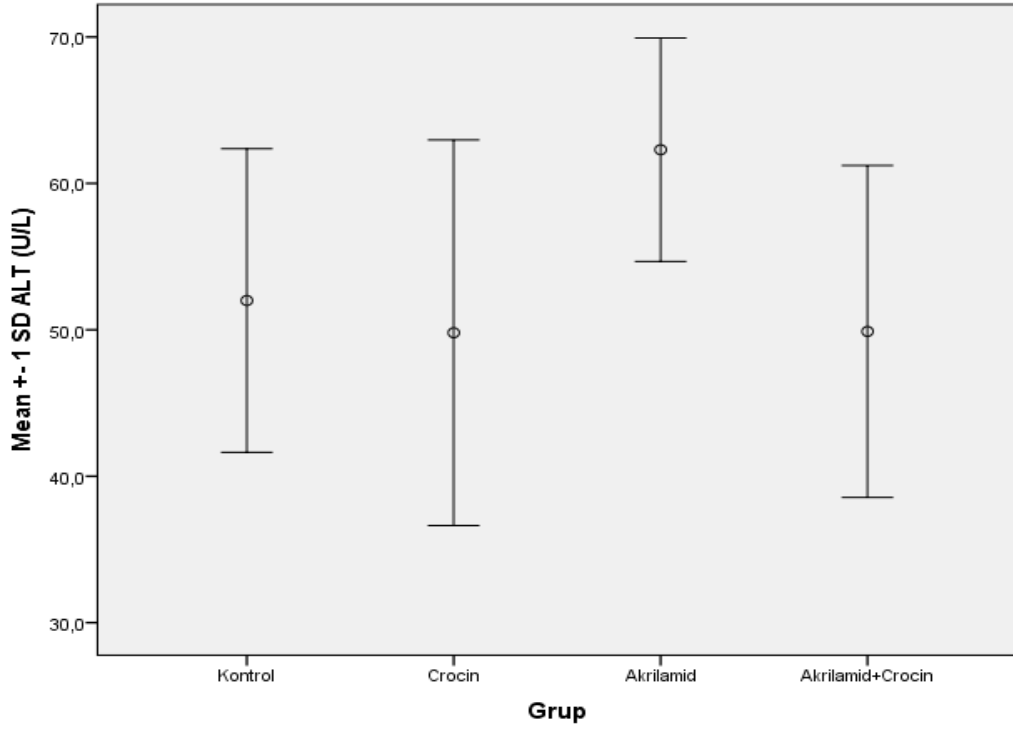
Şekil 6.18. Grupların kalınbağırsak TOS düzeyleri.

6.1.19. Serum Biyokimyasal Analizler

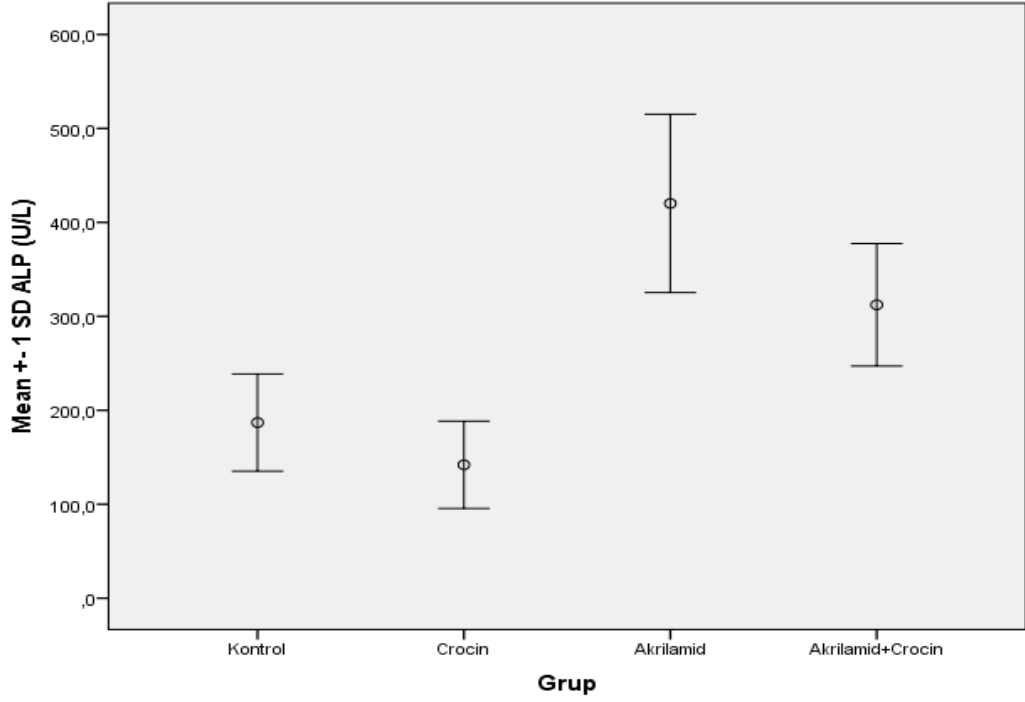
Serum AST değerleri AA uygulaması ile birlikte anlamlı bir artış gösterirken ($p < 0.05$), krosin AST değerlerinde düşüşe sebep olmuştur (Şekil 19). ALT değerleri AA uygulamasıyla beraber anlamlı bir yükseliş gösterirken ($p < 0.05$), krosin ALT değerlerini anlamlı bir derece de düşürerek ($p < 0.05$), kontrol grubuna yaklaştırmıştır (Şekil 20). Serum ALP değerleri AA ile birlikte yükselirken ($p < 0.05$), krosin ALP değerlerini anlamlı derecede düşürerek ($p < 0.05$) normal değerlere yaklaşmıştır (Şekil 6.21).



Şekil 6.19. Serum AST düzeyleri.



Şekil 6.20. Serum ALT düzeyleri.



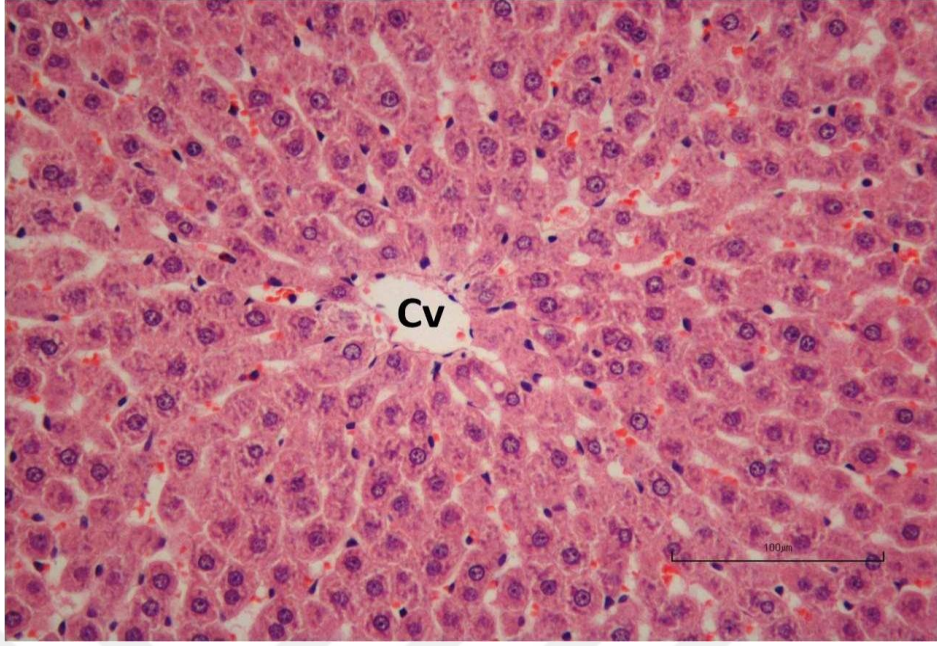
Şekil 6.21. Serum ALP düzeyleri.

6.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

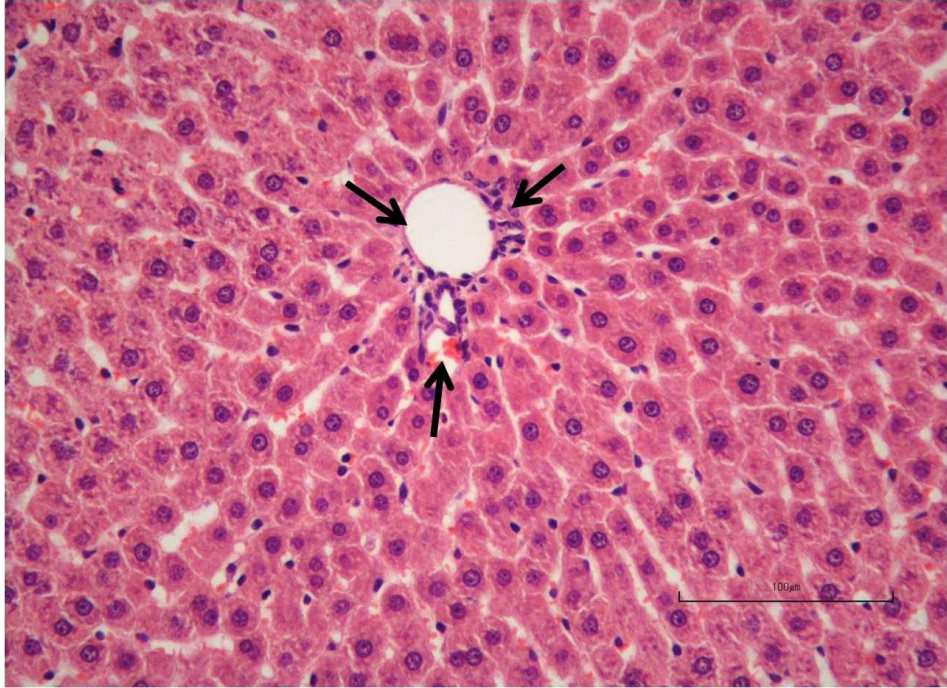
Kontrol (Şekil 6.22.a,b) ve Krosin(Şekil 6.23.a,b) gruplarına ait karaciğer kesitleri normal histolojik yapıda izlendi.

AA grubundaki karaciğer kesitlerinde santral ven, sinuzoidler ve portal alandaki vasküler yapılarda konjesyon izlendi. Portal alan bağ dokusu içinde ve periportal alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptandı. Karaciğer parankimi içinde farklı genişliklerde hepatoselüler nekroz ve hemoraji alanları izlendi. Parankim içindeki geniş alanlarda hepatositlerde sitoplamik eosinofili artışı ve heterokromatik-piknotik nukleus yapısı dikkati çekti. Ayrıca hepatositlerde intrasitoplazmik vakuolizasyon saptandı (Şekil 6.24.a, b, c, d).

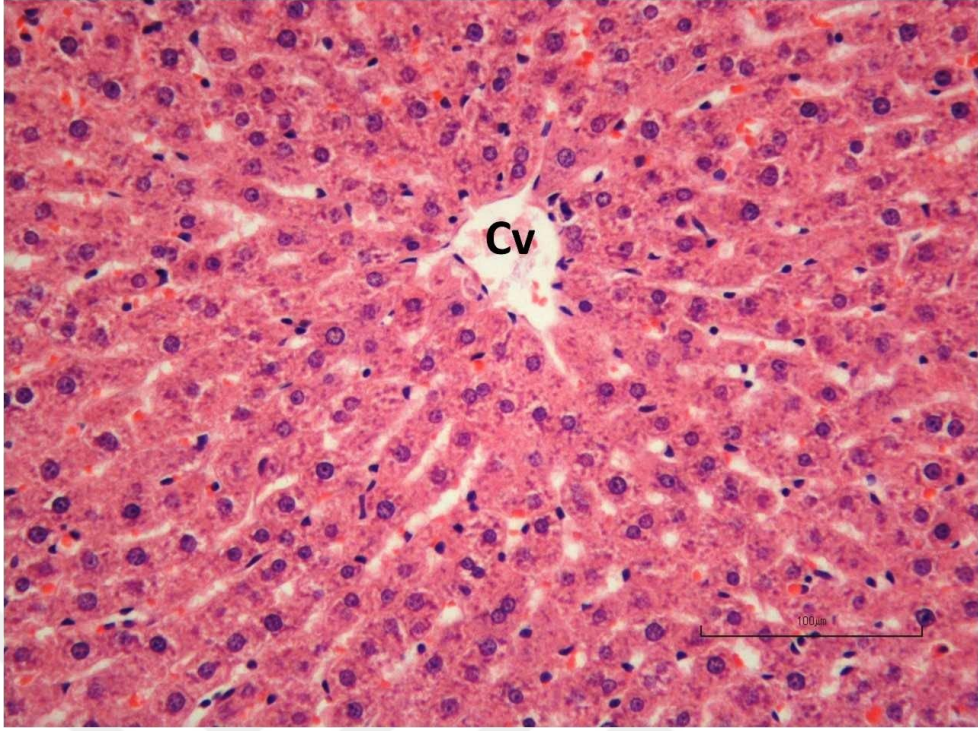
AA+Krosin grubundaki karaciğer kesitlerinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve hepatositlerdeki intrasitoplazmik vakuolizasyon bulgularında akrilamid grubundakine göre belirgin azalma gözlenirken hepatoselüler nekroz ve hemoraji izlenmedi (Şekil 6.25a, b).



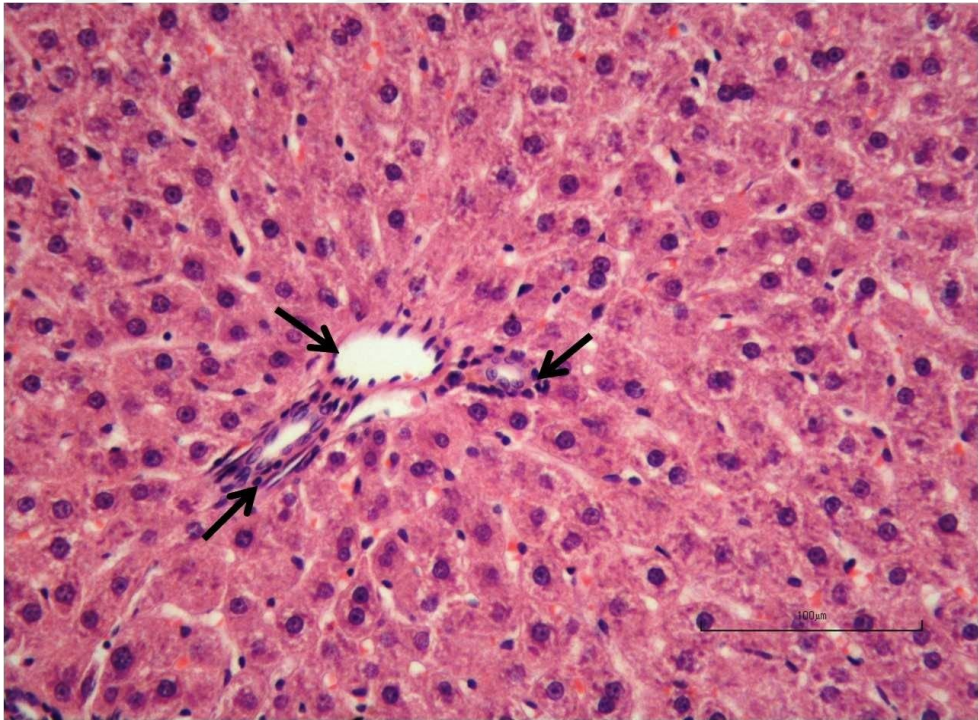
Şekil 6.22. Kontrol; Santral ven (Cv). H-E, x20.



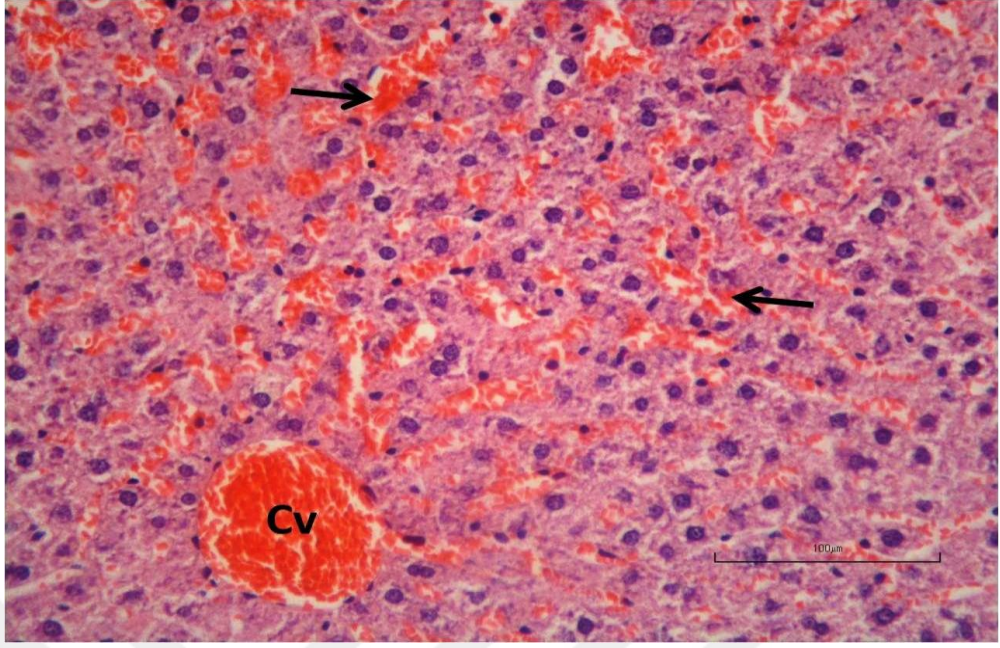
Şekil 6.23. Kontrol; Portal alan (ok). H-E, x20.



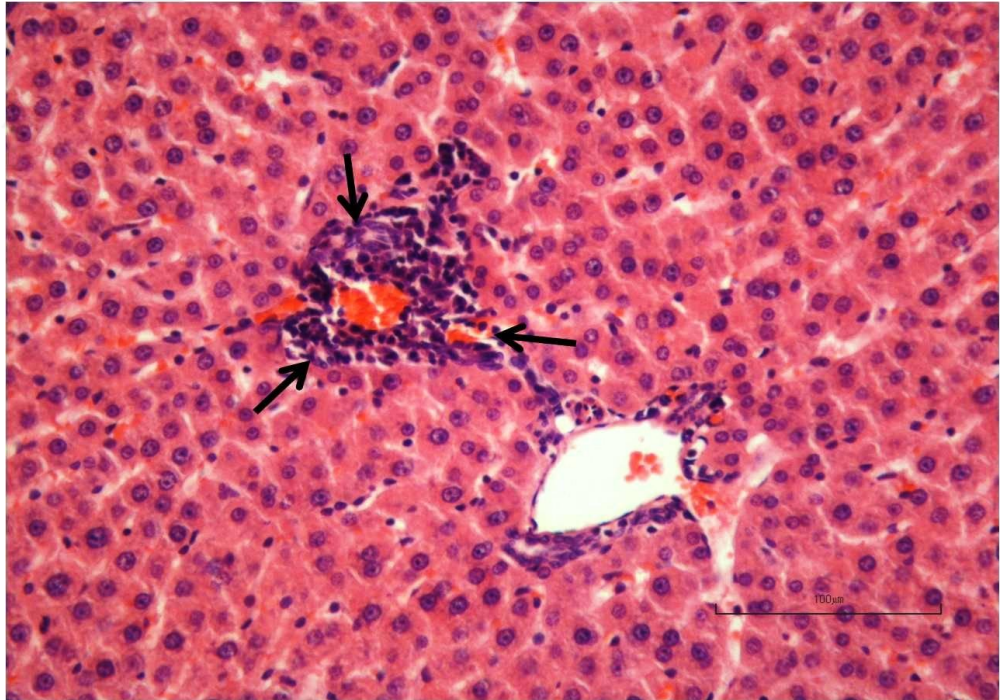
Şekil 6.24. Krosin; Santral ven (Cv). H-E, x20.



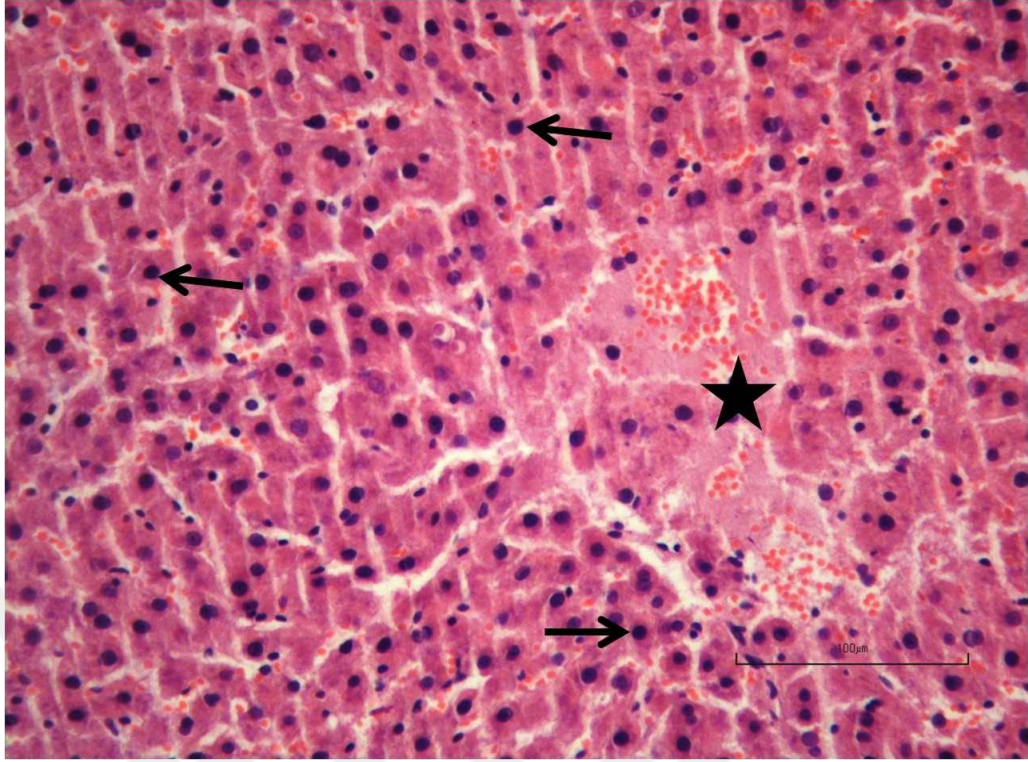
Şekil 6.25. Krosin; Portal alan (ok). H-E, x20.



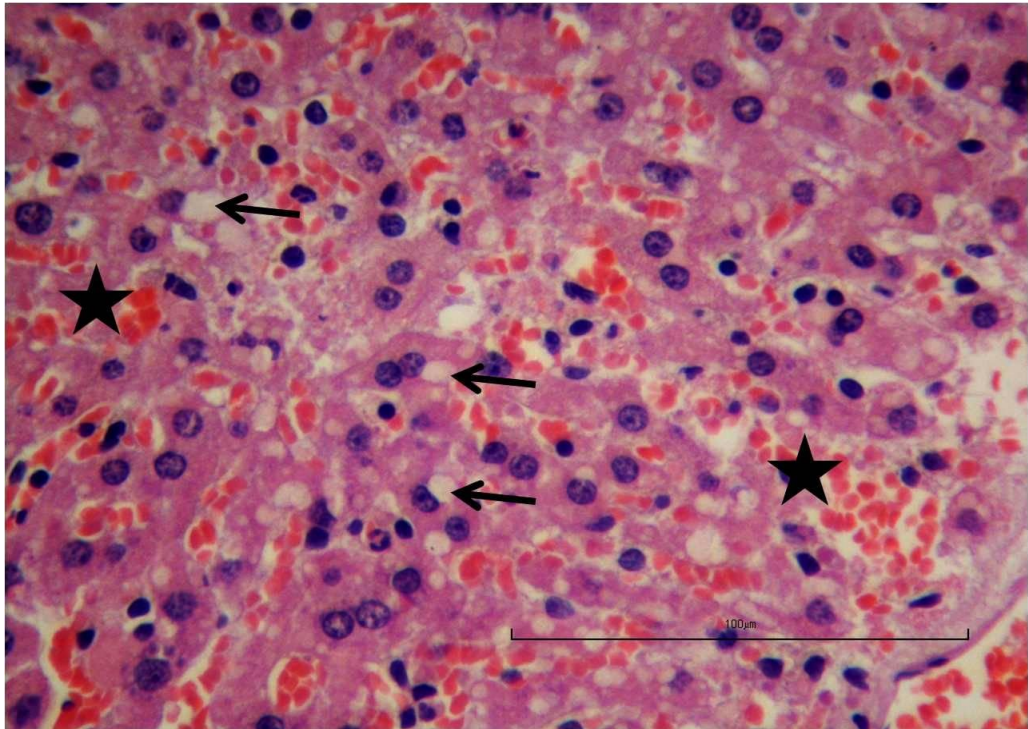
Şekil 6.26. AKR; Santral ven konjesyonu (Cv), snuzoidal konjesyon (ok). H-E, x20.



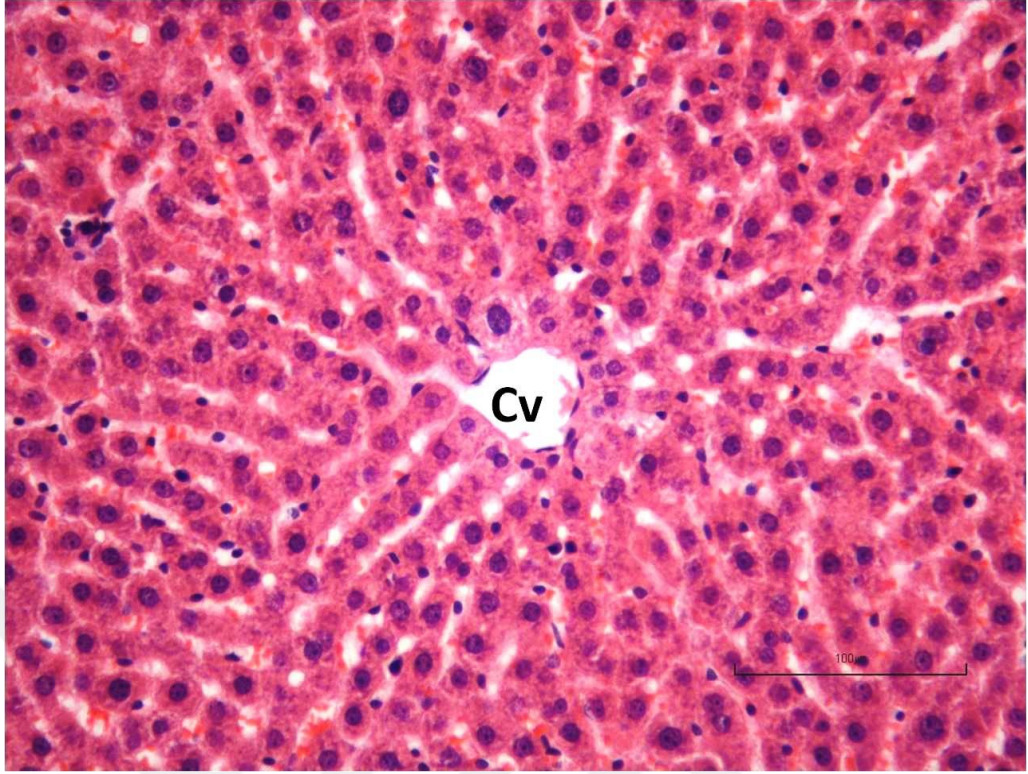
Şekil 6.27. AKR; Periportal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve portal ven konjesyonu (ok). H-E, x20.



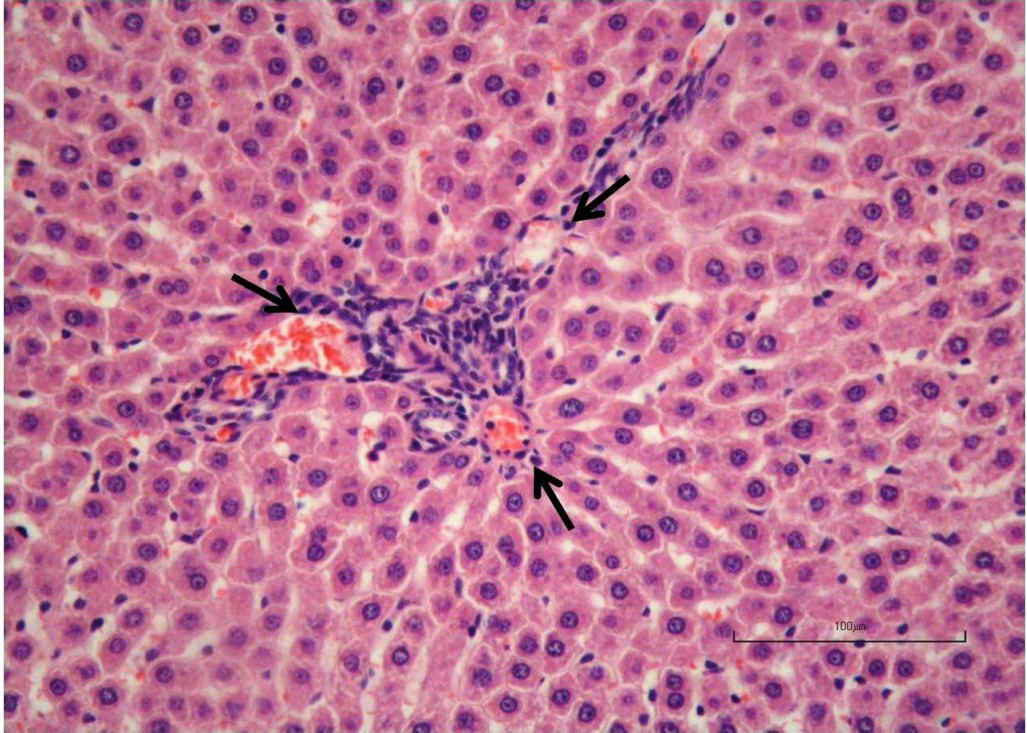
Şekil 6.28. AKR; Karaciğer parankiminde hemoraji ve hepatosit nekrozu (yıldız), hepatositlerde heterokromatik ve piknotik nükleus (ok), H-E, x20.



Şekil 6.29. AKR; Hepatositlerde vakuolizasyon (ok), sinuzoidal konjesyon (yıldız). H-E, x40.



Şekil 6.30. AKR+Krosin; Santral ven (Cv). H-E, x20.



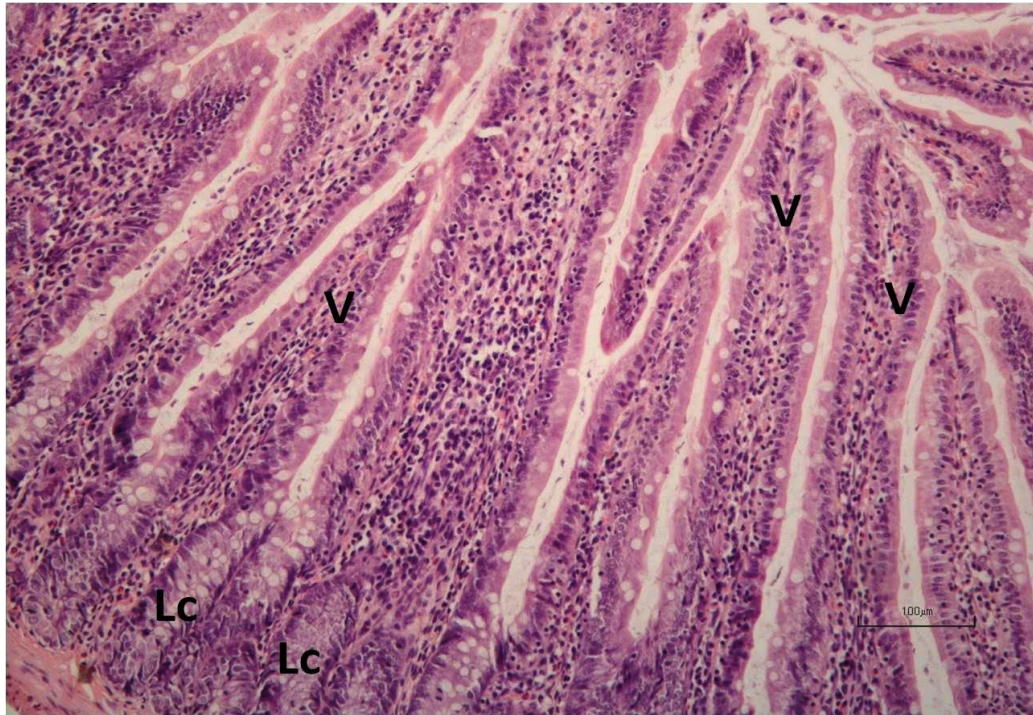
Şekil 6.31. AKR+Krosin; Periportal alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve portal ven konjesyonu (ok). H-E, x20.

Veriler medyan, minimum ve maksimum değerler ile özetlendi. Grupların karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmalarda Conover yöntemi kullanıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edildi.

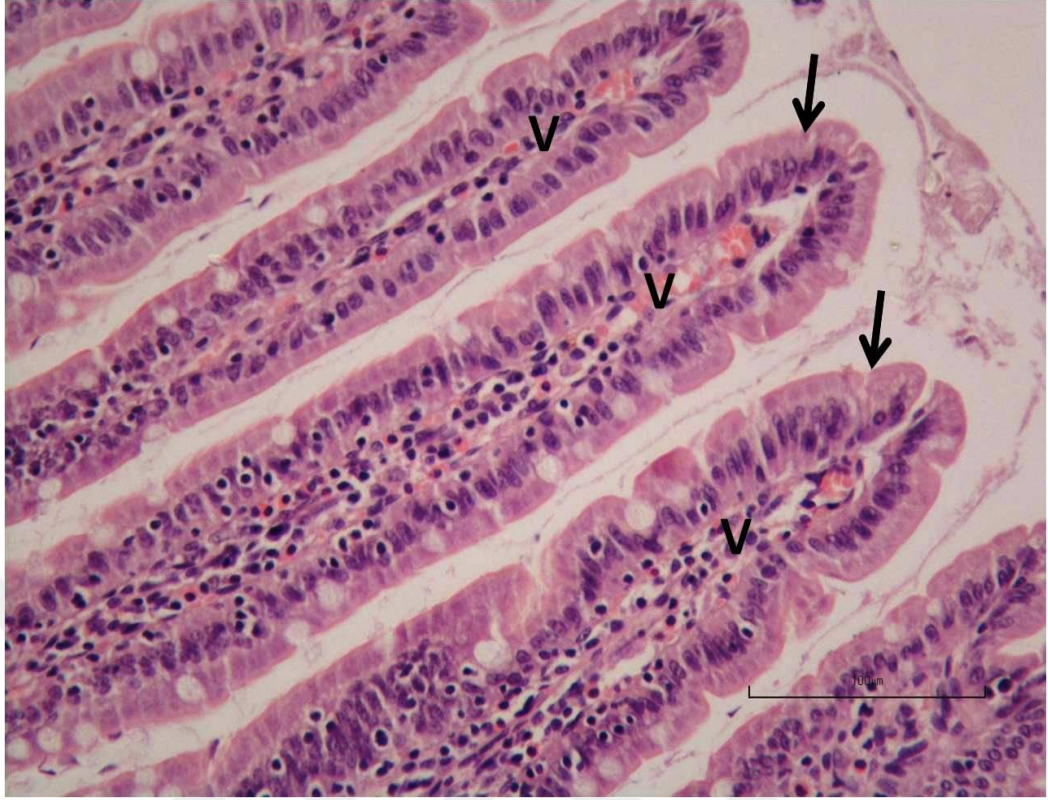
Kontrol (Şekil 6.26.a, b) ve Krosin (Şekil 6.27.a, b) gruplarına ileum kesitleri normal histolojik yapıda değerlendirildi.

AA grubundaki ileum kesitlerinde yaygın olarak villus boylarında kılma ve küntleşme saptandı. Çok sayıda villusta epitel hasarı ve apikal yarılmasına kadar ilerleyen villus dejenerasyonu dikkati çekti. Lamina propria inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcuttu. Liberkühn kripta yapılarında bozulma ve yer yer krita dejenerasyonu izlendi Şekil 6.28.a, b).

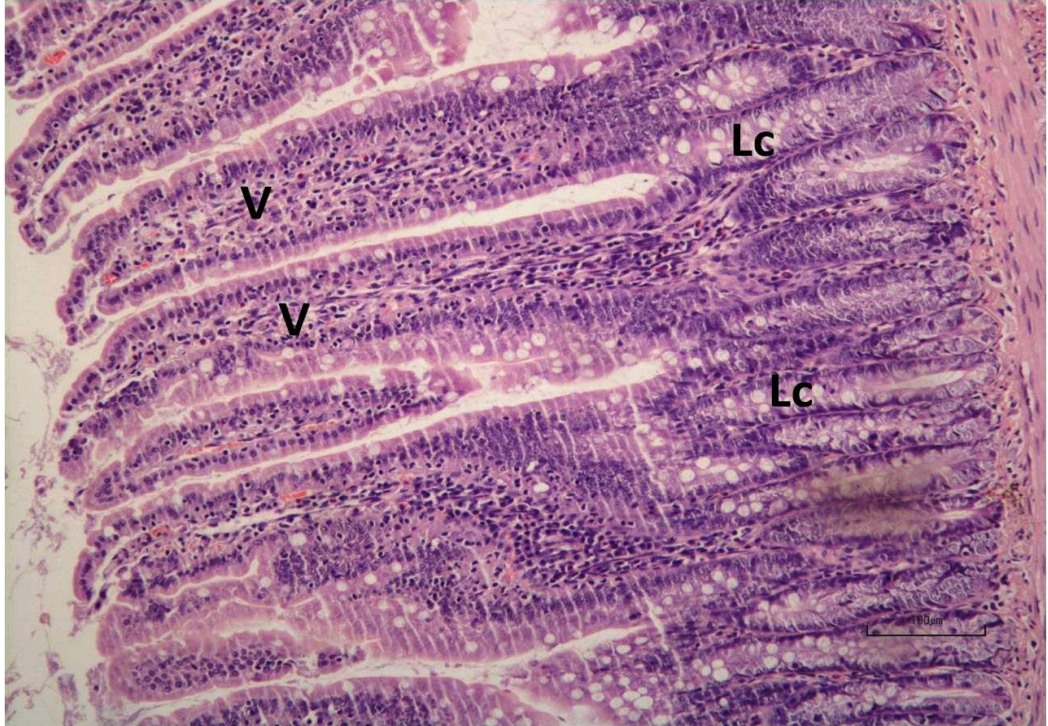
AA+Krosin grubundaki ileum kesitlerinde villus şekillerinde küntleşme, epitel hasarı, Liberkühn crypt hasarı ve inflamasyon bulgularında akrilamid grubundakine göre belirgin gerileme saptandı (Şekil 6.29.a, b).



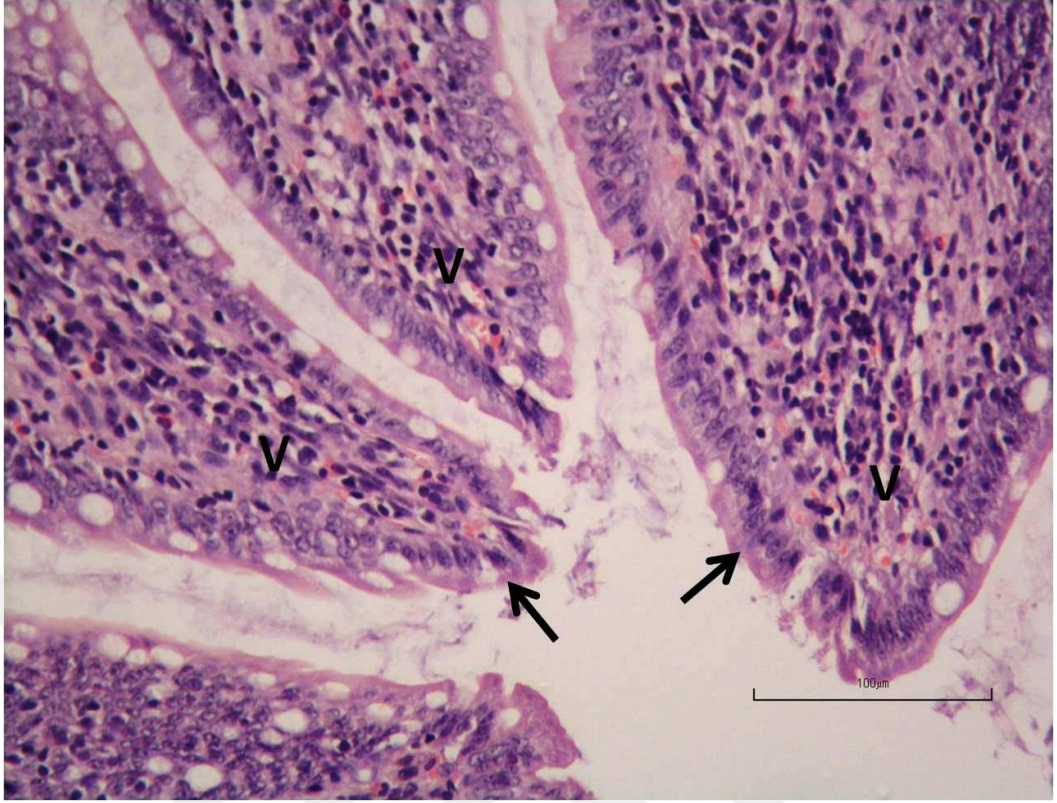
Şekil 6.32. Kontrol; Villus (V), liberkühn kriptası (Lc). H-E, x10.



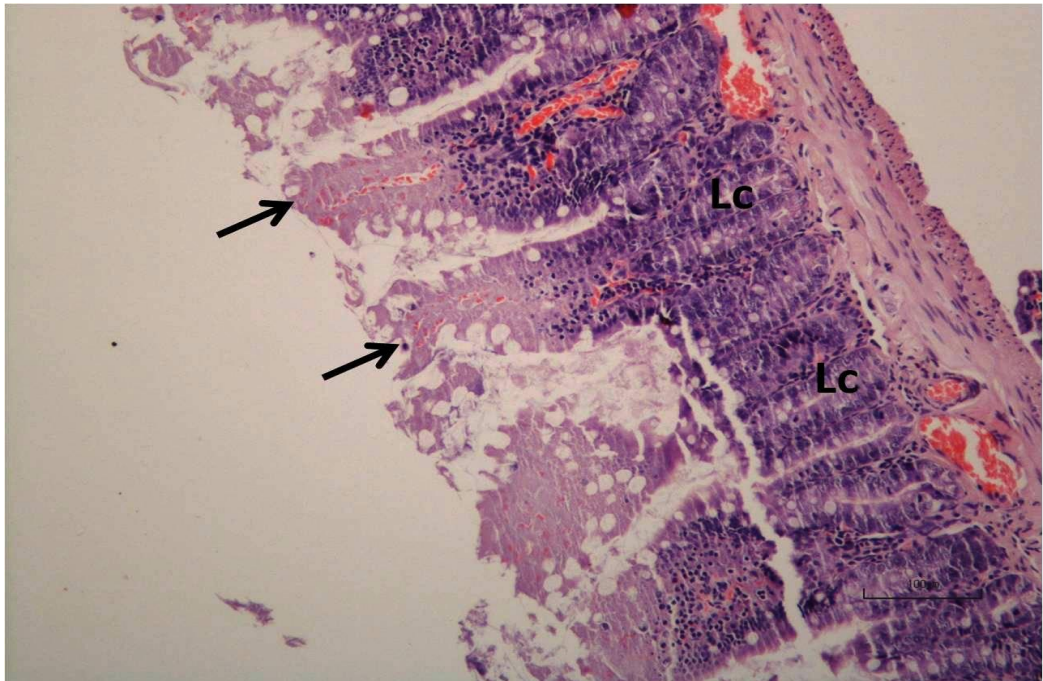
Şekil 6.33. Kontrol; Villus (V), villus yüzey epiteli (ok). H-E, x20.



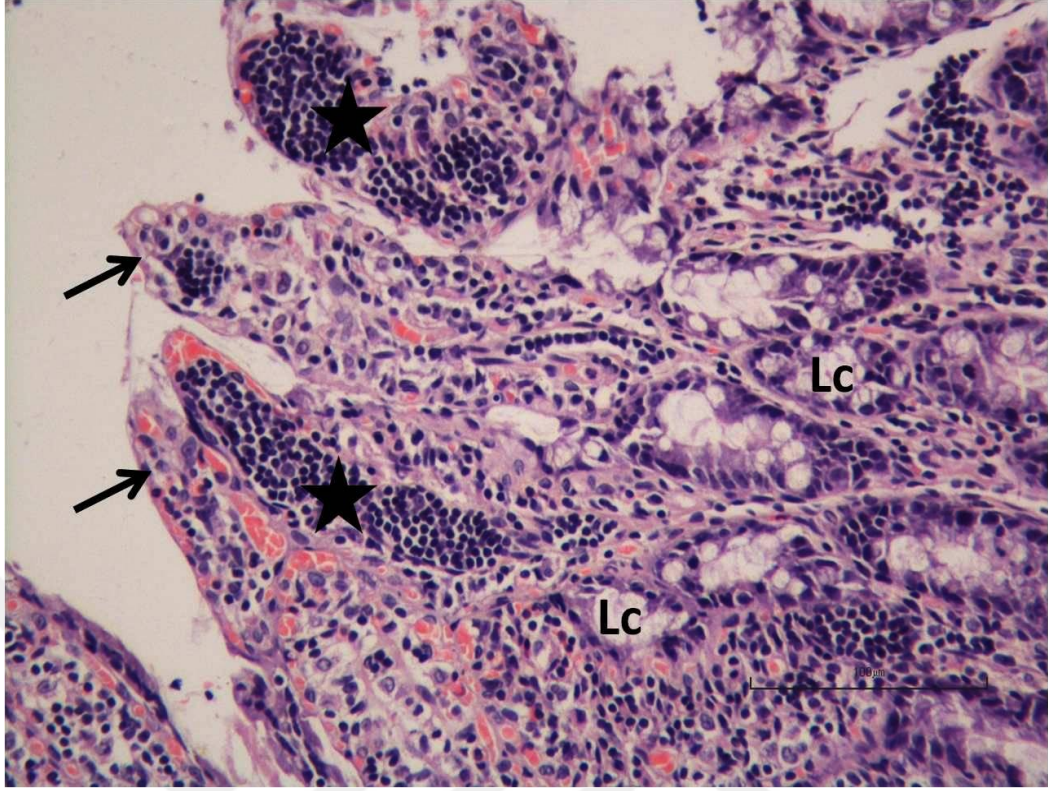
Şekil 6.34. Krosin; Villus (V), liberkün kriptası (Lc). H-E, x10.



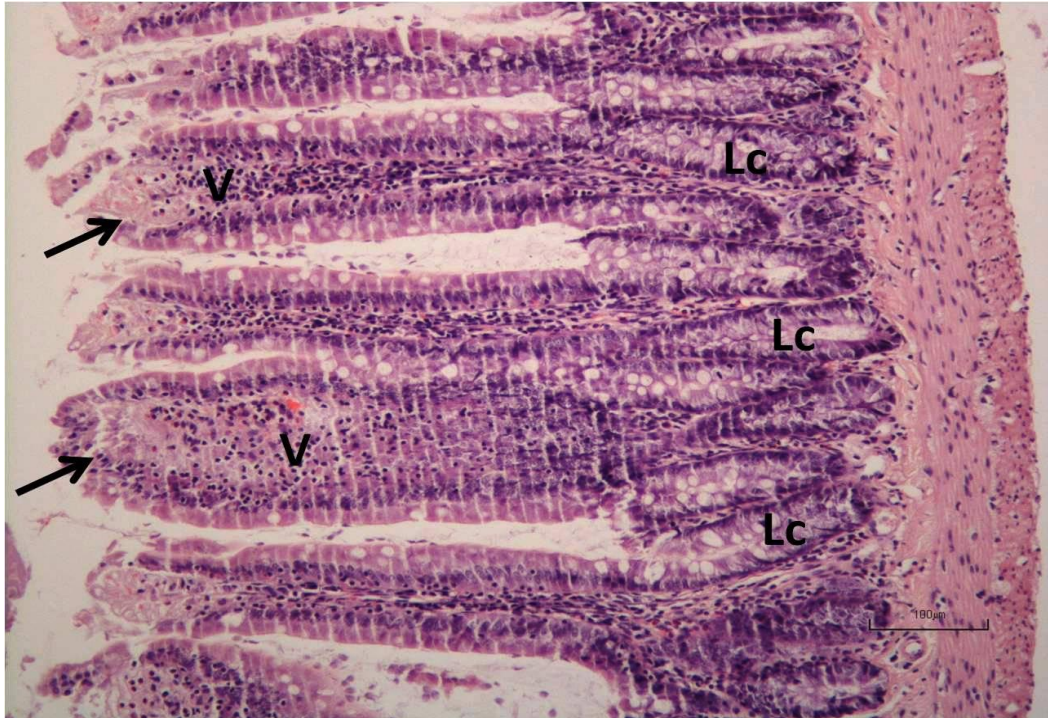
Şekil 6.35. Krosin; Villus (V), villus yüzey epiteli (ok). H-E, x20.



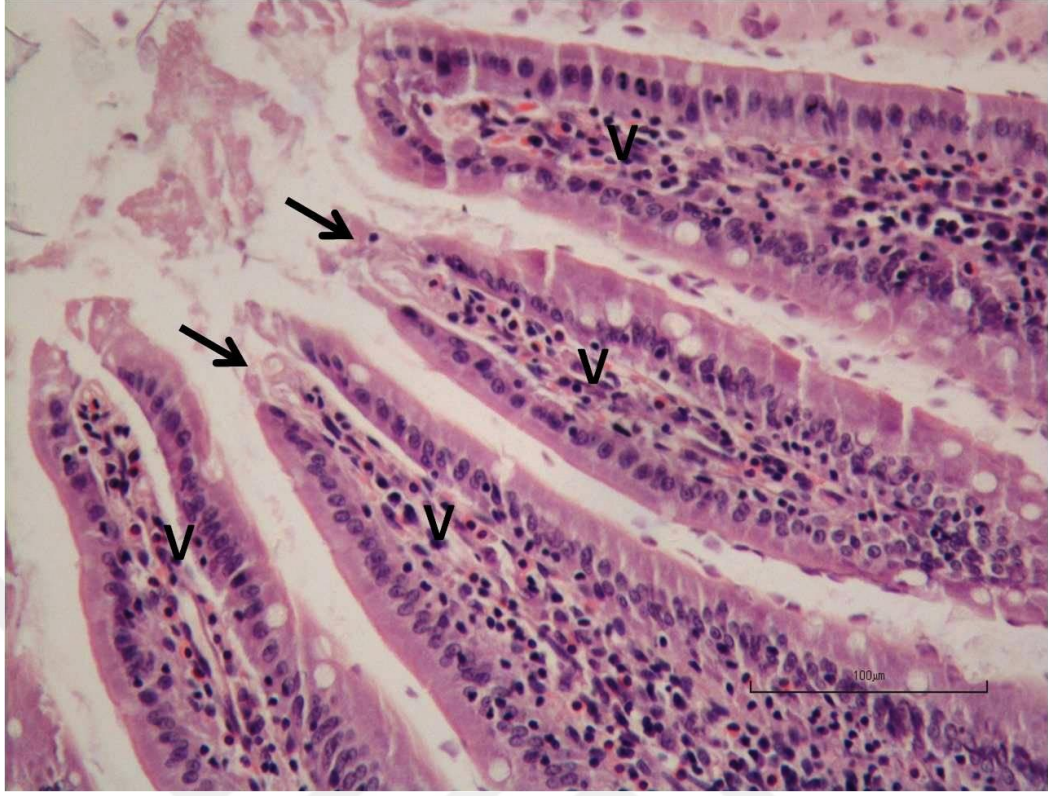
Şekil 6.36. AKR; Villus dejenerasyonu (ok), bozulmuş liberkün h kripta yapısı (Lc). H-E, x10.



Şekil 6.37. AKR; Villus dejenerasyonu ve yüzey epitel kaybı (ok), villus mukozasında inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız), bozulmuş liberkün kriptası yapısı (Lc). H-E, x20.



Şekil 6.38. AKR+Krosin; Villus (V) apikalinde dejenerasyon (ok), liberkün kriptası yapısı (Lc). H-E, x10.



Şekil 6.39. AKR+Krosin;I; Villus (V) apikalinde dejenerasyon (ok). H-E, x20.

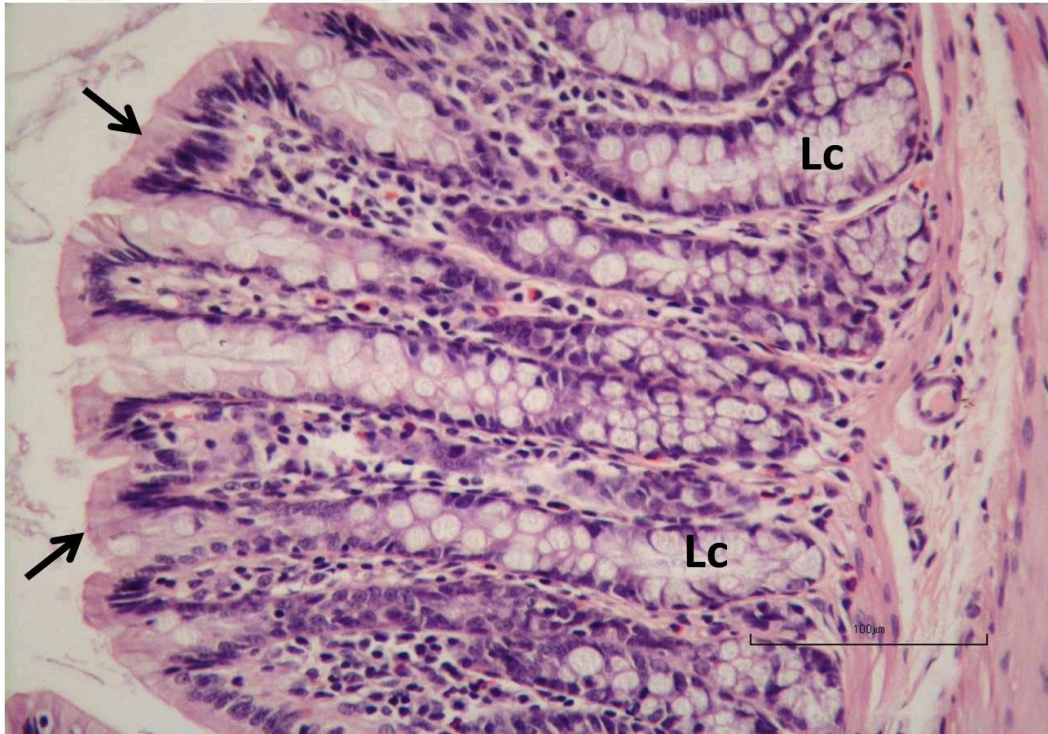
Kontrol (Şekil 6.30.a, b) ve Krosin (Şekil 6.31.a, b) gruplarına kolon kesitleri normal histolojik yapıda izlendi.

AA grubundaki kolon kesitlerinde yaygın yüzey epiteli ve Liberkuhn crypt dejenerasyonu ile bazı kesitlerde total mukoza dejenerasyonu saptandı. Dejenere mukoza alanlarında fibrozis ve yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi. Yüzey epitelindeki Goblet hücre yoğunluğunda belirgin azalma dikkati çekti (Şekil 6.32.a, b).

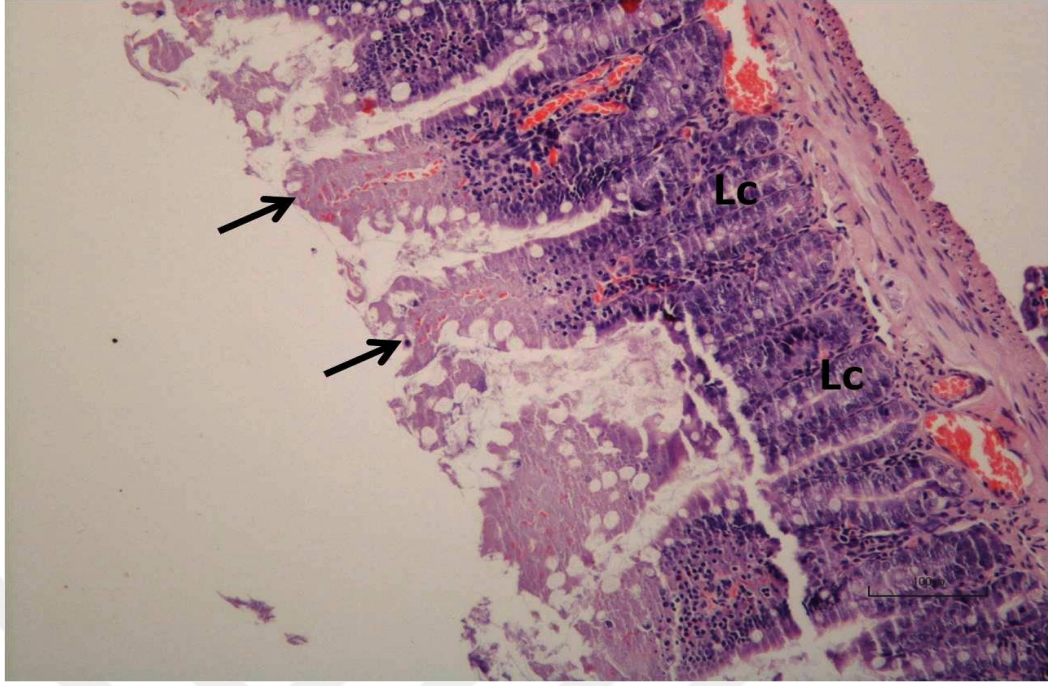
AA+Krosin grubundaki kolon kesitlerinde akrilamid grubunda izlenen hasar ve dejenerasyon bulgularında gerileme ile Goblet hücre yoğunluğunda artış gözlemlendi (Şekil 6.33.a, b).



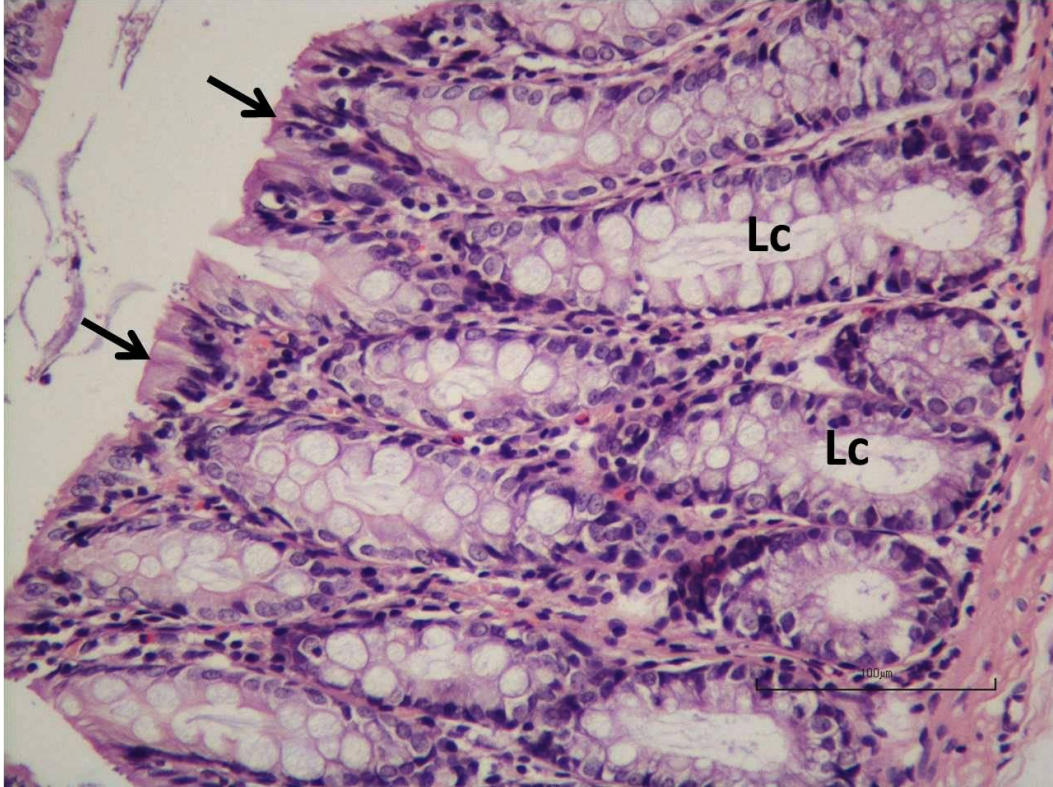
Şekil 6.40. Kontrol; Liberkün h kriptası (Lc), kolon yüzey epiteli (ok). H-E, x10.



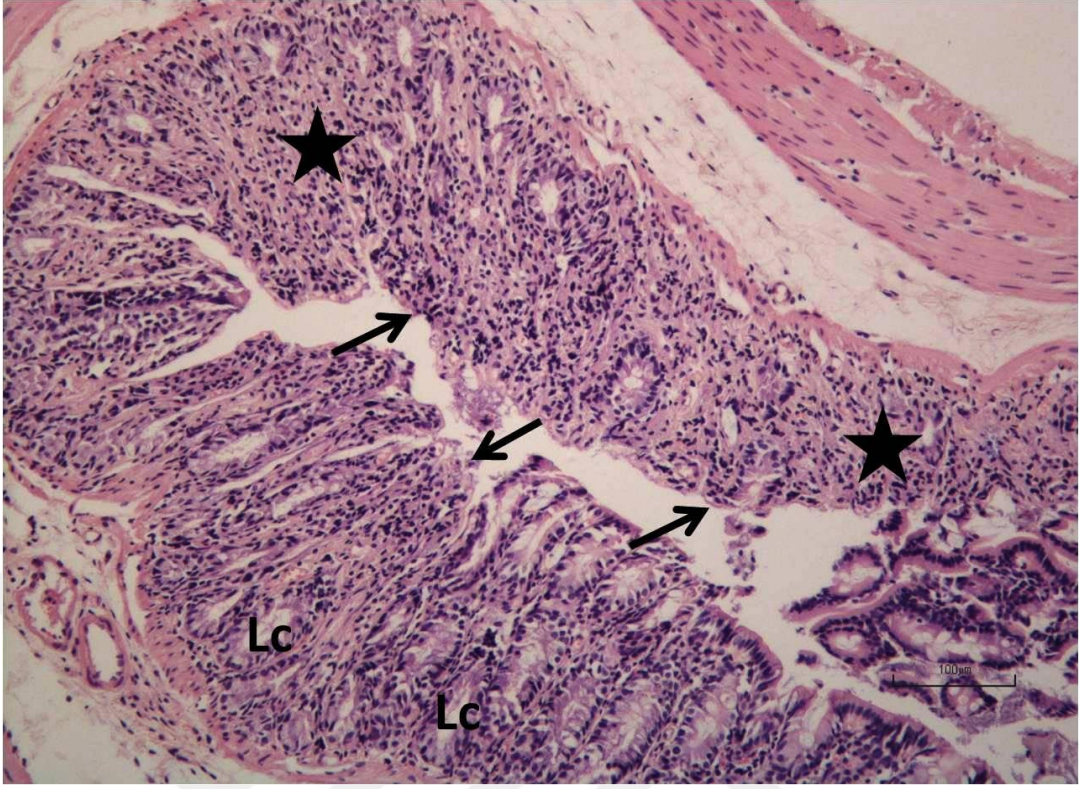
Şekil 6.41. Kontrol; Liberkün h kriptası (Lc), kolon yüzey epiteli (ok). H-E, x20.



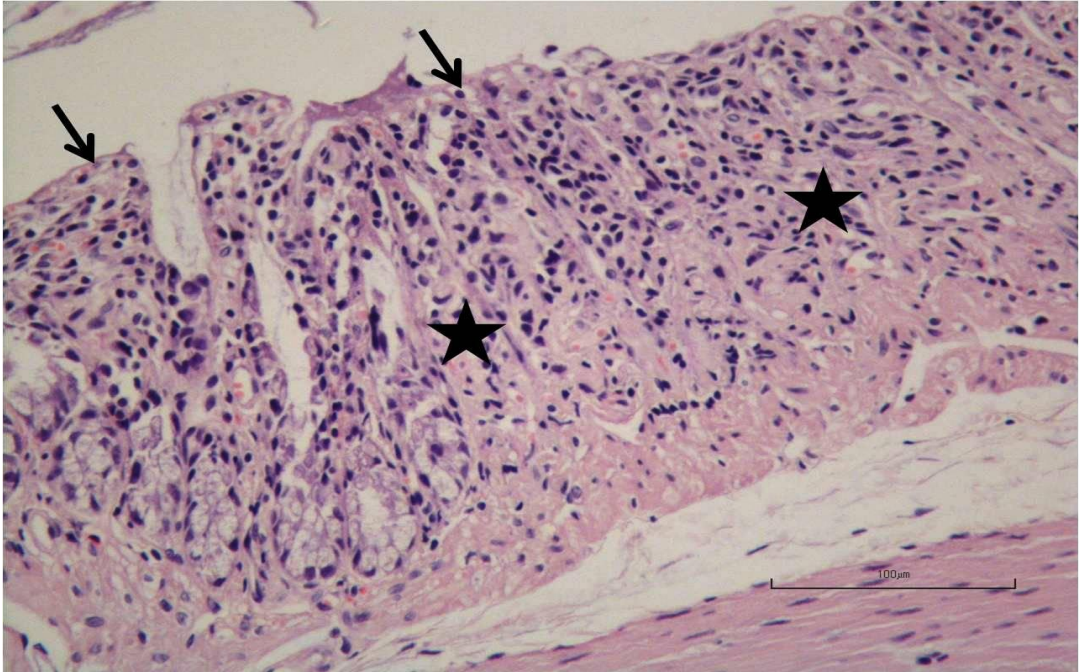
Şekil 6.42. Krosin; Liberkün h kriptası (Lc), kolon yüzey epiteli (ok). H-E, x10.



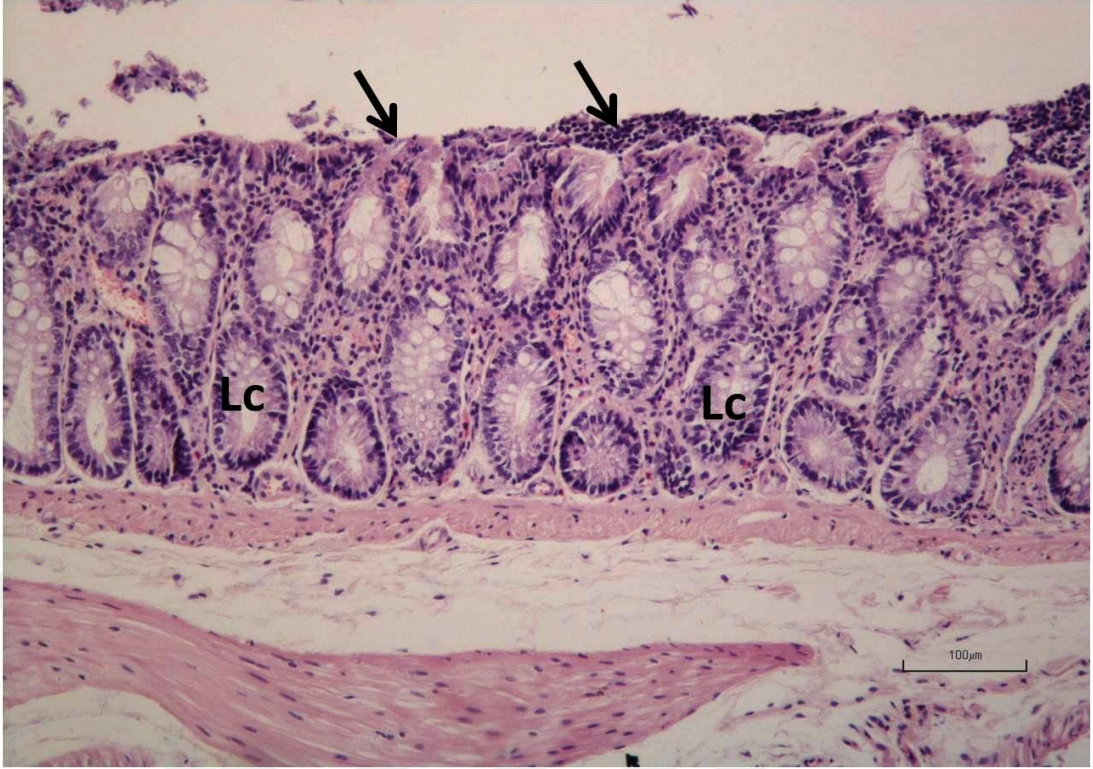
Şekil 6.43. Krosin; Liberkün h kriptası (Lc), kolon yüzey epiteli (ok). H-E, x20.



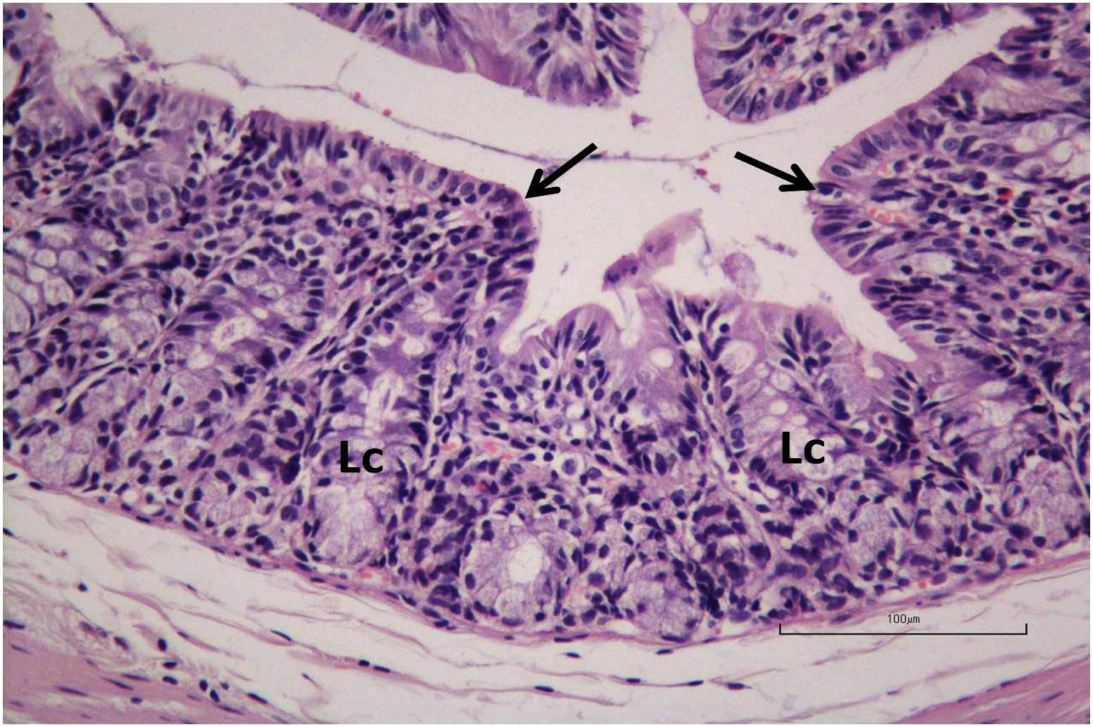
Şekil 6.44. AKR; Kolon mukozası dejenerasyonu (yıldız), yüzey epitel hasarı (ok), bozulmuş liberkün kriptası yapısı (Lc). H-E, x10.



Şekil 6.45. AKR; Kolon mukozası dejenerasyonu (yıldız), yüzey epitel hasarı (ok), bozulmuş liberkün kriptası yapısı (Lc). H-E, x10.



Şekil 6.46. AKR+Krosin; Kolon yüzey epitel hasarı ve intraepitelyal inflamatuvar hücre infiltrasyonunu (ok), liberkün kriptası (Lc). H-E, x10.



Şekil 6.47. AKR+Krosin; Kolon yüzey epiteli (ok), liberkün kriptası (Lc). H-E, x10

BÖLÜM 7

SONUÇLAR

Yaptığımız deneysel çalışmamızda daha öncede belirtildiği gibi AA tarafından oluşturulan olası oksidatif stres üzerine krosin'in koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. AA oldukça zararlı bir toksik madde olup suda hızlı bir şekilde çözünebilmesinden dolayı vücuda girdiği andan itibaren dokular arasında kolaylıkla dağılabilmektedir. AA, kızartma veya pişirme gibi yüksek ısı işlem görmüş gıdalarda kendiliğinden oluşan kimyasal bir maddedir. Ayrıca, AA ile kontamine sulara ve gıdalara maruz kalan insanlarda uzun süreli alımlarda insan vücudu bu toksik kimyasala maruz kalmaktadır. AA'nın sağlık üzerine toksikolojik ve karsinojenik etkileri vardır. AA düşük düzeyli vakalarda baş dönmesi ,kusma,uyuşukluk,terleme,kol ve bacaklarda karıncalanma ve halsizlik gibi belirtilere neden olduğu yüksek düzeyli vakalarda ise halüsinasyonlar,konuşma bozuklukları,kas zayıflığı ve üriner sistem bozukluklarına yol açtığı bildirilmiştir [98].AA gıdalarda doğal olarak bulunmayıp protein ve karbonhidratça zengin besinlerin 120 °C üzerinde pişirilmesi ile meydana gelmektedir.Haşlanmış gıdalarda AA'nın oluşmadığı açık bir şekilde ortaya konulurken fırınlama,kızartma ve ızgara yapılmış gıdalarda AA oluştuğu bildirilmektedir. Endreich ve Freidman [99] 'ın çalışmalarına göre ızgara, fırınlama ve kızartma gibi yapılan çeşitli pişirmelerde uygulanan işlem süresi ve sıcaklığa bağlı olarak AA oluşumu tespit edilmiştir.

Vücuda dışarıdan alınan ve vücut için zararlı olan maddelere ksenobiyotikler denilmektedir. Ksenobiyotikler vücuda ağız yoluyla ve deriden emilim şeklinde alınabilirler. AA her ne kadar genotoksisite üzerinde meydana getirdiği hasar tam olarak belirlenememiş olsada ksenobiyotik olarak kabul edilmiştir [100]. Ksenobiyotikler kan sıvısında yeteri kadar çözünemezler ve vücuda alınan ksenobiyotikler karaciğerde detoksifiye edilerek farklı yapılara dönüştürülerek hasar

daha düşük seviyeye indirilebilir. Ancak AA kan sıvısında oldukça iyi çözünme göstererek dokular arasında çok hızlı bir şekilde yayılırlar [101].

Son yıllarda AA'in gıdalardaki miktarları ve akrilamid oluşum mekanizması üzerine yapılan araştırmalarda insan sağlığı üzerindeki etkileri merak uyandırmış ve çok sayıda araştırmalara konu olmuştur. Bunun için çeşitli deney hayvanlarına AA uygulanarak gözlemler yapılmıştır [14].

İnce bağırsakların en önemli fonksiyonu besinlerin emilimini sağlayarak dolaşıma vermektir. Bağırsak mukozası, lumende bulunan okside olmuş gıda kalıntıları, metal iyonları (demir, bakır v.s.) bakteriyel metabolitler, oksidanlar gibi içerikler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerine (ROS) maruz kalarak oksidatif stres hasarına uğrayabilir [102].

AA vücutta iki farklı yol ile metabolize edilir. Birinci yol akrilamidin, karaciğerde stokrom P450'ye (CYP450) bağımlı bir izoenzim olan P4502E1 ile metabolize olarak genotoksik ve mutajenik aktif bir madde olan glisidamide dönüştürülmesidir [103]. CYP450 enzim sistemi hem karaciğerde hemde sindirim kanalı mukoza epitellerinde bulunur [104].

CYP2E1, CYP450'nin temel izoenzimi olup hem dışarıdan alınan ksenobiyotiklerin (AA gibi) hemde iç kaynaklı bileşiklerin metabolizmasında önemli rol almasının yanında [105], ROS üretimine sebep olarak lipid peroksidasyonunu başlatabilir [106]. ROS'un ve lipid peroksitlerinin [107] hücreler üzerinde toksik etkiler oluşturması ve CYP2E1'in çeşitli zararlı ara ürünler üretme kapasitesinden dolayı [108], doku hasarlanmalarının patogenezinde anahtar rol oynayan bir enzim gibi durmaktadır. CYP3A karaciğer ve bağırsak dokusunda eksprese edilen bir altgrup olup, ksenobiyotikleri ve iç kaynaklı bileşiklerin değişik gruplarını yapısal olarak okside edebilir ve CYP3A ksenobiyotiklerin ilk etkisizleştirilmesinde önemli rolü vardır.

Karaciğerde stokrom P4502E1 tarafından glisidamide dönüştürülen AA mutajenik bir etki göstererek deney hayvanlarında akciğer, beyin, böbrek, uterus, testis gibi birçok organda kansere sebep olmaktadır [103].

AA'nin bir diğer metabolize edilme yolu ise GSH ile konjuge edilerek meydana gelmektedir [109, 110] Bu yollar ile AA'nin zararlı etkileri en aza indirgenmiştir.

Son yıllarda, sigara, alkol ve daha farklı ksenobiyotik maddelerin hücrelerde oluşturduğu oksidatif hasarları akrilamidinde meydana getirebileceği üzerinde çok sayıda çalışma bulunmamaktadır. Oksidatif hasarlar oksidan/antioksidan dengesinin oksidan lehine bozulmasıyla meydana gelmektedir. Organizmada oluşan serbest radikalleri kontrol altında tutmak için antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir [111]. Ancak bu antioksidan savunma sistemleri bazen serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıramaz. Bu durumda meydana gelen olaya oksidaif hasar denilmekte ve oksidatif hasarları ortadan kaldırmak için antioksidanlar devreye girmektedir. [112].

Serbest radikallerin indüklediği hasarı nötralize etmek ve korumak amacıyla etkili bir savunma sistemi içeren vücutta iç kaynaklı antioksidan enzimler bulunmaktadır [113]. SOD ve CAT; oksidatif strese karşı endojen savunma sisteminde görevli enzimler olup, lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksidin vücuda zararlı etkilerine karşı önemli role sahiptir [114]. Nonenzimatik antioksidan olarak, GSH vücudun antioksidan savunma mekanizmasını dengelemede önemli rol üstlenmektedir [115].

Çalışmamızda karaciğer dokusunda bulunan antioksidan enzimlerin (SOD ve CAT) aktivitelerini ölçerek, krosinin antioksidan etkisini belirlemeye çalıştık. Akrilamid uygulaması sonucu oluşan karaciğer hasarının yıkıcı proseslerini lipid peroksidasyonu sebebiyle ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda, ratlara oral yolla AA verildiğinde, ortaya çıkan serbest radikaller karaciğerde hücre hasarına sebep olmuştur. AA uygulanan grupların karaciğer dokularında, MDA (lipid peroksidasyonu son ürünlerinden biri), SOD, CAT, TOK seviyeleri artarken, GSH ve TAS seviyeleri ise azalarak lipid peroksidasyonuna

sebepe olmuş ve doku hasarı oluşturmuştur. Karaciğer dokusundaki SOD ve CAT aktiviteleri ile MDA ve TOS seviyelerindeki yükselme; artmış lipid peroksidasyonunun öncülük ettiği doku hasarını ve artmış serbest radikal oluşumunu engellemede görevli antioksidan savunma mekanizmasının zayıfladığını göstermektedir. Bu sonuçlar Gangarapu ve ark. [116], Öztürk vd .[117] ve Ranjbar vd [118]'nın sonuçları ile uyumlu olup, araştırmacılar ksenobiyotik olarak karbon tetraklorür (CCl₄) uyguladıktan sonra karaciğer dokusunda, MDA seviyeleri ile SOD ve CAT aktivitelerinde dikkat çeken bir yükselme ve GSH içeriklerinde azalmayla sonuçlanmıştır. CCl₄ ile oluşturulan karaciğer toksisitesinin aracılık ettiği serbest radikal ve oksidatif stresin oluşumu, antioksidan enzim aktivitesinin ve glutatyon içeriğinin yok edilmesi veya azalması, karaciğer dokusunda MDA artışı gibi etkiler, yükselen karaciğer enzimlerinin seviyelerini ve karaciğerde meydana gelen hasarı açıklamaktadır [119, 120].

Mottram vd. yaptıkları çalışmada, akrilamid uygulamasından sonra, akrilamidin metabolize edilmesi esnasında glisidamide yükseltgenmesi ve GSH ile konjugasyona uğramasından dolayı karaciğer dokusundaki GSH seviyelerinde azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir [17]. Bizim çalışmamızın sonucunda da AA uygulaması sonucunda karaciğer GSH seviyesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiş olup, yapılan çalışmalarla sonuçlarımız uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda, AA'e karaciğerden önce maruz kalan ince ve kalın bağırsak dokularında da karaciğerdeki sonuçlara benzer sonuçlar elde ettik. İnce ve kalın bağırsak dokularında SOD ve CAT aktiviteleri ile MDA ve TOS seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı artışlar gözlenirken, GSH ve TAS içeriklerinde ise AA kaynaklı oksidatif stresten dolayı düşüşler tespit ettik ve ince ve kalın bağırsak hasarının sebebinin lipid peroksidasyonunun sonucu olduğunu düşünmekteyiz.

Dokularda ortaya çıkan oksidatif stres mevcut antioksidan sistemler (enzimatik ve nonenzimatik) tarafından düzenlenmektedir [121]. Daha önce yapılan çalışmalarda [122] olduğu gibi yaptığımız çalışmada da krosinin antioksidan savunma sistemini düzenleyici mekanizmaları izleyerek dokuları koruyucu etki gösterebilir. Vucudun antioksidan savunmasında aktif rol üstlenen nonenzimatik antioksidan olan GSH,

serbest radikalleri nötralize edebilir, sülfidril gruplarını stabilize edebilir ve hidrojen peroksidi indirgeyebilir.

Hosseinzadeh vd. [123] yaptıkları çalışmalarında safran ekstresi ve krosinin, ratların böbreklerinde iskemi-reperfüzyon indüklemesiyle meydana gelen oksidatif hasarı önemli bir şekilde ortadan kaldırdıklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar safran ekstresi ve krosinin antioksidan özelliklerinden dolayı serbest radikallerin indüklemesiyle oluşan lipid peroksidasyonu ve MDA seviyelerini düşürdüklerini göstermişlerdir. Bu çalışmalar bizim sonuçlarımızla uyumluluk göstererek AA'e maruz kalan ratlarda değerleri yükselen enzimatik antioksidanlar olan SOD ve CAT ile TOS ve lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri ve nonenzimatik olan antioksidan azalmış GSH ve TAS seviyeleri krosin tedavisi sonrası normal düzeylerine yaklaşmıştır. Enzimatik antioksidanların ve MDA seviyelerinin azalması ile GSH seviyesindeki yükselmenin eş zamanlı olması antioksidan düzenleme mekanizmalarının işbirliğini ortaya koyar. Ghadrdoost vd [124] safran ve krosinin hipokampüste oksidatif markerleri düzenlediklerini ortaya koymuşlardır. Bu araştırmalar bizim sonuçlarımızla tutarlılık göstererek çalışmamızda AA uygulanan ratlardaki SOD ve CAT aktivitelerinde ciddi artışlar meydana gelirken krosin uygulaması enzim aktivitelerinde düşmeye neden olmuştur. Daha önceki çalışmalarda krosinin karaciğer GSH içeriğinde artış görülürken, yükselen MDA seviyelerini ise önemli bir şekilde düşürdüğü ratlarda cisplatin [125], siklofosfamid [126] ve diazinon [127] toksisiteleriyle oluşturulmuş hayvan modellerinde gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmalarla antioksidan olarak kullanılan krosin hücre hasarını önemli ölçüde kontrol gruplarına yakın seviyelere getirmiştir. Bu konu hakkında Lieshout vd [128].antioksidan açısından oldukça zengin gıda tüketiminde toksik maddelerin GSH ile konjugasyonunu ve vücuttan atılımının artacağını bildirmişlerdir. Böylece antioksidanlar koordineli bir şekilde çalışarak canlı dokuları oksidatif hasardan korurlar.

Tong vd. [129] lipid peroksidasyonunun arttırılması ile GSH'ın azaldığını ve dokularda oksidatif hasarlar oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Benzer çalışma yapan Muhammad Rashid Khan ve ark. AA uygulanan grupların histolojik incelemesinde yüksek düzeyde hasar görülürken DME ile tedavi edilen grupta hasarın kontrol

grubuna yakın değere ulaştığını bildirmişlerdir. Karaciğer histopolojisinde AA'in DME ile iyileştirilmesi ile hepatositler çok daha iyi olduğu görülmüştür.

Deneysel çalışmamızda AA'in oluşturduğu hücre hasarlarını en aza indirgeyebilmek için antioksidan olarak krosin kullanılmıştır. Krosin, krosetin ve safranal safran bitkisinin temel aktif içerikleridir. Bunlardan başka safran; proteinler, şekerler, vitaminler, flavonoidler, aminoasitler, önemli mineral ve diğer kimyasal bileşenleri içerir. Safranın antioksidan aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada safranın hem kaynatılması hem de suda bekletilerek hazırlanan ekstresinin farklı dozlarda uygulanmasıyla yapılmış ve safranın en yüksek antioksidan etki gösterdiği dozun (hem kaynatma hemde suda bekletilerek uygulandığında) 0.45 mg/ml olan gruplarda olduğu gözlenmiştir [112].

Serum veya plazmadaki amino transferazlar gibi enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler, karaciğer hücre hasarının göstergesi olarak kabul edilir, ALT, AST ve ALP enzimlerinin plazmadaki aktivitelerindeki artış mevcut karaciğer hasarını yansıtmaktadır [130, 131]. AA'in oluşturduğu karaciğer hasarına serbest radikal üretiminin yol açtığı iyi bilinmekle birlikte, krosinin antioksidan aktivite göstererek radikal temizleyici etkisinden dolayı karaciğer ve diğer dokuları koruyucu olarak seçilmiştir [132, 133]. AA'in oluşturduğu serbest radikaller hücre membranlarındaki çoklu doymamış yağ asidnei, özellikle fosfolipidlerle ilişkili olanlara saldırarak onların yapısını bozarlar. Bu durum, hücre bütünlüğünün bozulmasına ve daha sonra serum ALT ve AST düzeylerinin belirgin olarak yükselmesine yol açar. Çalışmamızda, karaciğer harabiyeti oluşturmak için AA uyguladığımız sıçanların karaciğer hücrelerinde harabiyete bağlı olarak plazma ALT AST ve ALP enzim seviyeleri yüksek gözlenmiştir. Sebep olarak, karaciğer hücre membranında, oksidatif stres ile meydana gelen bozukluktan dolayı ALT, AST ve ALP gibi enzimlerin dolaşıma geçmesi ve serumdaki seviyelerinin yükselmesi düşünülmektedir. Bizim çalışmamızın sonuçları ile benzerlik gösteren diğer çalışmalarda da karbon tetraklorürün karaciğer harabiyeti oluşturmasından sonra serumda bu enzimlerin seviyelerinin yükseldiği görülmüştür [116, 134]. AA gibi hepatotoksikanlar tarafından meydana getirilen karaciğer hasarını azaltmak veya

normal değerlere dönmesini sağlamak amacıyla hepatoprotektif ilaçlar kullanılmaktadır[135].

Çalışmamızda hepatoprotektif olarak kullanılan krosin uygulamasından sonra serum AST, ALT ve ALP seviyelerinin AA'e bağlı yükselmelerinin iyileştiğii gözlenmiştir. ALT, AST ve ALP seviyelerindeki azalma krosinin antioksidan ve serbest radikal süpürücü özelliğinden kaynaklanan karaciğer hücre membran bütünlüğünü düzeltmesinin bir sonucudur. Bu durum krosinin hepatoprotektif etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla uyumluluk gösterip araştırmacıların hayvan modellerinde morfin [136], amiodarone [137], patulin [138] ve acetaminophen [139] ile oluşturdukları hepatotoksisite ile birlikte yükselen AST, ALT ve ALP seviyelerinin krosin tarafından önemli bir şekilde düşürüldüğünü göstermişlerdir.

Manna vd [140], AA uygulanan dokularda transaminazlar ve LDH seviyelerinin karaciğer enzimlerinde artış gösterdiği fakat yaptıkları çalışmada kullandıkları Ginseng özütü ile artan seviyerin normal seyretmeye başladığını kaydetmişlerdir. Karaciğer dokuları üzerinde yapılan bu çalışmalar histopatolojik sonuçlar ile de uyum göstermiştir.

Bu çalışmamızda krosin'in AA tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonuna karşı karaciğer ile ince ve kalın bağırsak mukozalarının hücre membranlarını koruduğunu ve doku hasarlarını tersine çevirdiğini ortaya koyduk. Ksenobiyotikler tarafından oluşturulan doku toksisiteleri çeşitli bitki türlerii, örneğın rosemary [141], Cnestis ferruginea ekstresi [142] gibi, tarafından ortadan kaldırılmıştır. Bu bitki türlerinde olduğu gibi krosinde AA tarafından üretimi artan MDA düzeylerini dikkat çekici bir şekilde düşürmüştür. Krosin'in dokular üzerindeki bu etkisi kuvvetli antioksidan ve radikal süpürücü etkisinden kaynaklanmaktadır [143].

Paolini ve arkadaşları [144] yaptıkları çalışmalarında beta caroten takviyesinin CYP450'nin belirli izoformlarının, ki bunlar CYP1A1, CYP3A1, CYP2E1, CYP2B1 olarak isimlendirilir, aktivitesini uyardığını belirtmişlerdir. Ksenobiyotikleri metabolize eden enzimleri uyarıcı etkiye sahip diğer karotenoidler canthaxanthin,

astaxanthin ve beta apo-8'-carotenol'dir. Diğer yandan likopen CYP2E1 üzerine invitro olarak inhibe edici etki gösterirken bu enzim belirli ksenobiyotiklerin karsinojenlere dönüştürülmesinden sorumludur. Çalışmamızda kullanılmış krosinin de likopen gibi bir karotenoid olduğu ve AA'in metabolizmasından sorumlu olan AA'den daha da toksik olan glisidamide dönüşmesini sağlayan CYP2E1 üzerinde inhibe edici etkiye sahip olabileceğini düşünmekteyiz. Bu sayede krosin'in karaciğer ve bağırsak dokularını koruyucu etkisinin diğer bir mekanizması, CYP2E1 izoenzim aktivitelerini inhibe etmesi olarak da açıklanabilir [145]. Böylece CYP2E1 enziminin inhibe olması AA'in karaciğer ve bağırsak dokularında toksik metabolit glisidamide dönüşmesini engelleyerek oksidatif hasarlanmaları engellemiş olabilir.

Çalışmamızın en önemli bulgularından bir diğeri ise biyokimyasal ve histolojik sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. AA uygulaması sonucunda karaciğer kesitlerinde santral ven, sinuzoidler ve portal alandaki vasküler yapılarda konjesyon izlendi. Portal alan bağ dokusu içinde ve periportal alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptandı. Karaciğer parankimi içinde farklı genişliklerde hepatoselüler nekroz ve hemoraji alanları izlendi. Parankim içindeki geniş alanlarda hepatositlerde sitoplamik eosinofili artışı ve heterokromatik-piknotik nukleus yapısı dikkati çekti. Ayrıca hepatositlerde intrasitoplazmik vakuolizasyon saptandı. Krosin uygulanan ratlarda karaciğer histolojik hasar parametrelerinde belirgin bir iyileşme olduğu görülmüştür. Krosin tedavisinden sonra karaciğer kesitlerinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve hepatositlerdeki intrasitoplazmik vakuolizasyon bulgularında AA grubundakine göre belirgin azalma gözlenirken, hepatoselüler nekroz ve hemoraji ise izlenmemiştir.

Çalışmamızda, karaciğer dokularında olduğu gibi ince ve kalın bağırsaklarda da AA varlığında hücresel hasarlara rastlanmıştır. AA grubundaki ileum kesitlerinde yaygın olarak villus boylarında kısalma ve küntleşme saptandı. Çok sayıda villusta epitel hasarı ve apikal yarılmasına kadar ilerleyen villus dejenerasyonu dikkati çekti. Lamina propria inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcuttu. Liberkühn kripta yapılarında bozulma ve yer yer krita dejenerasyonu izlendi. Krosin ise doku hasarlarında belirgin iyileşmeler yaparak ileum kesitlerinde villus şekillerinde küntleşme, epitel hasarı,

Liberkühn crypt hasarı ve inflamasyon bulgularında AA grubundakine göre belirgin gerileme saptandı.

AA grubundaki kolon kesitlerinde yaygın yüzey epiteli ve Liberkühn crypt dejenerasyonu ile bazı kesitlerde total mukoza dejenerasyonu saptandı. Dejenere mukoza alanlarında fibrozis ve yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi. Yüzey epitelindeki Goblet hücre yoğunluğunda belirgin azalma dikkati çekti. Krosin tedavisinden sonra ise kolon kesitlerinde AA grubunda izlenen hasar ve dejenerasyon bulgularında gerileme ile Goblet hücre yoğunluğunda artış gözlemlendi. Sun vd. [125] cisplatin ile oluşturdukları karaciğer hasarında oluşan hepatik fokal nekrozun krosin ile agiderildiğini göstermişlerdir.

Farr ve Kogoma [146], hücre hasarlarına neden olan ROS'ların moleküler oksijene göre çok daha reaktif olduğunu ve aynı zamanda nükleik asitler, hücre zarları ve proteinlere ciddi hasarlar verdiklerini belirtmişlerdir. Oksidatif stres, ROS oluşumunun en büyük etkenlerindendir.

Speit vd. oksidatif stresin mutasyon, kromozom sapması, tümör teşviki ve kanser gelişiminde rol aldığı ve bundan dolayı genotoksitenin önemli bir mekanizması haline geldiğini kanıtlamışlardır [147]. Önceki çalışmalar ve bizim yapmış olduğumuz çalışmalarda oksidatif stres sonucu oluşan ROS'ların dokuların hem biyokimyasal parametrelerde değişikliklere ve hemde histolojik hasarlara sebep olduğu ortaya konmuştur.

Wang vd.[148] yapmış oldukları çalışmalarında alisinin in vitro ve in vivo glisidamid kaynaklı doku hasarının ve DNA hasarının önlenmesinde ilk defa etkili olduğu kanıtlamıştır. Bu çalışmada Allicinin, 8-OHdG, ROS, BUN, kreatinin, LDH, AST, ALT, MDA'nın birikimini önlediğini, aynı zamanda erkek ve dişi fare böbrek, karaciğer, beyin ve akciğerlerindeki SOD ve GSH, GST aktivitelerini desteklediğini göstermişlerdir.

Sonuç olarak biyokimyasal ve histopatolojik verilere göre AA'in oksidatif strese neden olduğu ve dokularda oksidatif hasar oluşturduğu saptanmıştır. Bu araştırma

sonunda ratlara ağız yoluyla uygulanan akrilamidin karaciğer,ince ve kalın bağırsak dokusunda GSH ve TAK seviyelerini kontrol grubuna oranla anlamlı olarak düştüğü, aksine AST, ALT, ALP, SOD ve CAT düzeyleri ile TOK ve MDA seviyelerinin ise yükseldiği bulunmuştur. Dokulardaki bu hasarın tedavisi için antioksidan özelliğe sahip krosin uygulanan gruplarda ise GSH ve TAK seviyelerini artırırken, AST, ALT, ALP, SOD ve CAT düzeyleri ile TOK ve MDA seviyelerinin düşürdüğü tespit edilmiştir.

Krosinin bu etkisinin kuvvetli antioksidan etkiden ve AA metabolizmasında görev alan CYP2E1 enziminin krosin tarafından inhibe edilerek ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Çalışmamızın sonuçları literatür ile uyumlu bir şekilde, biyokimyasal ve histopatolojik metotları kullanarak krosin tedavisi ile AA tarafından karaciğer, ince bağırsak ve kalın bağırsakta oluşan hasarın giderildiğini göstermiştir.

Sonuç olarak krosinin oksidatif stresi engelleyerek AA tarafından indüklenen karaciğer, ince bağırsak, kalın bağırsak hasarı üzerine koruyucu etkiye sahip olduğunu ortaya koyduk. Krosin serbest oksijen radikallerini temizleyerek antioksidan etki gösteriyor olabilir. Bu antioksidan etki sonucunda MDA ve TOS düzeyleri ile AST, ALT, ALP, SOD ve CAT düzeyleri azalırken, GSH ve TAS, düzeyleri krosin tedavisinden sonra artmıştır. Ayrıca, AA tarafından bağırsak dokusunda oluşturulan hasarın ve bunun krosin tarafından tedavi edici etkisi ortaya konmuş ve bu etkinin krosinin antioksidan etkiden ve CYP450 enzim sistemindeki AA metabolizmasında görevli izoenzimlerin aktivitesinin inhibe edilerek ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

EK AÇIKLAMALAR A.

BİYOKİMYASAL ANALİZLER VE HASAR SKORLARI

Çizelge Ek A.1. Karaciğer dokusu biyokimyasal analizler.

	Grup	N	Mean	Std. Deviation	P
MDA nmol/g yaş doku	Kontrol ^a	10	830,23	79,06	<0,001
	Krosin ^a	10	787,92	79,52	
	Akrilamid ^b	10	1347,03	418,63	
	Akrilamid+Krosin ^b	9	1098,80	194,42	
GSH nmol/g yaş doku	Kontrol ^a	10	3270,38	551,03	<0,001
	Krosin ^b	10	4894,04	725,93	
	Akrilamid ^b	10	2096,07	665,82	
	Akrilamid+Krosin ^b	9	3726,35	691,94	
SOD Ü/gprotein	Kontrol ^a	10	48,42	9,28	<0,001
	Krosin ^a	10	48,44	7,74	
	Akrilamid ^b	10	65,53	9,38	
	Akrilamid+Krosin ^b	9	59,95	9,48	
CAT K/g Protein	Kontrol ^a	10	39,20	4,93	<0,001
	Krosin ^a	10	37,11	7,65	
	Akrilamid ^b	10	52,33	2,73	
	Akrilamid+Krosin ^b	9	47,12	3,90	
TAS (mmol/L)	Kontrol ^a	6	2,31	0,16	<0,001
	Krosin ^a	6	2,57	0,11	
	Akrilamid ^b	6	1,67	0,19	
	Akrilamid+Krosin ^b	6	1,96	0,9	
TOS (µmol/L)	Kontrol ^a	6	14,09	,55	0,006
	Krosin ^a	6	11,77	1,09	
	Akrilamid ^b	6	17,51	4,02	
	Akrilamid+Krosin ^b	6	13,31	2,90	

Çizelge Ek A.2. İncebağırsak dokusu biyokimyasal analizler.

	Grup	N	Mean	Std.Deviation	P
MDA nmol/g yaş doku	Kontrol ^a	10	426,60	36,66	<0,001
	Krosin ^a	10	430,80	48,99	
	Akrilamid ^b	10	528,40	49,13	
	Akrilamid+Krosin ^a	9	461,11	27,07	
GSH nmol/g yaş doku	Kontrol ^a	10	948,04	192,33	<0,001
	Krosin ^a	10	1121,75	175,47	
	Akrilamid ^b	10	748,05	67,10	
	Akrilamid+Krosin ^a	9	976,45	132,62	
SOD Ü/g protein	Kontrol ^{a,b}	10	953,75	169,55	0,003
	Krosin ^a	10	752,23	292,19	
	Akrilamid ^b	10	1062,76	76,51	
	Akrilamid+Krosin ^a	9	862,58	156,08	
CAT K/g Protein	Kontrol ^{a,c}	10	26,15	5,57	<0,001
	Krosin ^a	10	21,77	6,38	
	Akrilamid ^b	10	37,45	6,72	
	Akrilamid+Krosin ^c	9	29,37	5,37	
TAS (mmol/L)	Kontrol ^{a,b}	6	1,81	,34	0,011
	Krosin ^a	6	2,08	,11	
	Akrilamid ^b	6	1,82	,11	
	Akrilamid+Krosin ^{a,b}	6	2,01	,10	
TOS (µmol/L)	Kontrol ^a	6	3,98	1,77	0,001
	Krosin ^a	6	3,57	1,82	
	Akrilamid ^b	6	11,94	5,12	
	Akrilamid+Krosin ^{a,b}	6	7,70	2,83	

Çizelge Ek A.3. Kalınbağırsak dokusu biyokimyasal analizleri

	Grup	N	Mean	Std. Deviation	P
MDA nmol/g yaş doku	Kontrol ^a	10	362,47	51,60	<0,001
	Krosin ^a	10	321,93	88,92	
	Akrilamid ^b	10	549,74	127,00	
	Akrilamid+Krosin ^{a,b}	9	444,43	121,85	
GSH nmol/g yaş doku	Kontrol ^{a,b}	10	629,46	71,81	0,013
	Krosin ^a	10	732,02	109,61	
	Akrilamid ^b	10	569,85	141,36	
	Akrilamid+Krosin ^{a,b}	9	695,13	109,12	
SOD Ü/g protein	Kontrol ^{a,b}	10	328,47	83,80	0,012
	Krosin ^a	10	306,69	106,98	
	Akrilamid ^b	10	421,89	28,38	
	Akrilamid+Krosin ^{a,b}	9	334,65	72,07	
CAT K/g Protein	Kontrol ^a	10	28,19	5,56	<0,001
	Krosin ^a	10	26,75	7,64	
	Akrilamid ^b	10	40,87	6,65	
	Akrilamid+Krosin ^{a,b}	9	34,87	7,68	
TAS (mmol/L)	Kontrol ^{a,b}	6	1,33	,03	0,002
	Krosin ^a	6	1,47	,08	
	Akrilamid ^b	6	1,27	,12	
	Akrilamid+Krosin ^a	6	1,45	,08	
TOS (µmol/L)	Kontrol ^{a,b}	6	5,44	1,54	0,010
	Krosin ^a	6	4,63	,86	
	Akrilamid ^b	6	12,89	4,87	
	Akrilamid+Krosin ^{a,b}	6	7,13	2,23	

Çizelge Ek A.4. Serum biyokimyasal analizler.

	Grup	N	Mean	Std. Deviation	P
AST(U/L)	Kontrol ^a	10	107,80	13,81	<0,001
	Krosin ^a	10	91,50	10,72	
	Akrilamid ^b	10	196,00	77,64	
	Akrilamid+Krosin ^b	9	132,33	17,04	
ALT (U/L)	Kontrol ^a	10	52,00	10,37	0,043
	Krosin ^a	10	49,80	13,17	
	Akrilamid ^b	10	62,30	7,63	
	Akrilamid+Krosin ^a	9	49,89	11,33	
ALP (U/L)	Kontrol ^a	10	186,90	51,68	<0,001
	Krosin ^a	10	142,00	46,52	
	Akrilamid ^b	10	420,20	94,85	
	Akrilamid+Krosin ^c	9	312,22	65,20	

Çizelge Ek A.5. Karaciğer hasar skoru

Gruplar	İnflamasyon	Vascular Konjesyon	Hemoraji	Hepatoselüler vakuolizasyon	Nekrozis	Total Hasar
Kontrol						
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
Krosin						
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
AKR						
1	1	1	1	1	0	4
2	1	1	1	2	1	6
3	2	2	1	0	0	5
4	2	2	1	1	1	7
5	1	1	1	2	0	5

Çizelge Ek A.5. (devam ediyor).

6	1	1	1	1	1	5
7	1	1	0	0	1	3
8	2	2	1	1	0	6
9	2	2	1	1	1	7
10	1	1	0	2	0	4

AKR+KRS

1	0	1	0	1	0	2
2	0	1	0	0	0	1
3	1	1	0	0	0	2
4	1	1	0	0	0	2
5	0	1	0	0	0	1
6	1	1	0	1	0	3
7	1	1	0	0	0	2
8	0	1	0	0	0	1
9	0	1	0	0	0	1
10	1	1	0	1	0	3

Çizelge Ek A.6. İleum hasar skoru.

Gruplar	Villus Kısalması	Epitel hasarı	Villus Hasarı	Liberkühn crypt dejenerasyonu	İnflamasyon	Total Hasar Skoru
Kontrol						
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	1
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	1	1
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	1	0
Krosin						
1	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
AKR						
1	2	2	2	1	2	9
2	2	3	2	2	2	11
3	3	2	3	2	2	12
4	2	2	2	1	3	10

Çizelge Ek A.6. (devam ediyor).

5	3	2	3	2	2	12
6	3	3	2	3	3	14
7	2	3	3	2	2	12
8	2	2	3	1	2	10
9	2	2	2	1	2	9
10	1	2	2	1	2	8

AKR+KRS

1	0	1	0	1	1	3
2	1	1	1	1	1	5
3	0	1	0	0	1	2
4	1	0	1	0	1	3
5	2	1	1	1	1	6
6	1	2	0	1	1	5
7	2	1	1	0	0	4
8	1	0	1	0	1	3
9	0	1	2	0	0	3
10	1	1	1	0	1	4

Çizelge Ek A.7. Kalınbağırsak hasar skoru.

Grup	Goblet Hücre Kaybı	Epitel doku hasarı	Mukozal fibrozis	Liberkühn crypt dejenerasyonu	İnflamasyon	Total Hasar Skoru
Kontrol						
1	0	0	0	0	1	1
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	1	1
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
Krosin						
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1	1
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	1	1
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
AKR						
1	2	3	2	1	2	10
2	1	2	2	1	3	9
3	2	2	2	2	2	10
4	2	2	3	2	2	11

Çizelge Ek A.7. (devam ediyor).

5	2	2	2	2	2	10
6	1	3	2	2	2	10
7	1	2	2	1	3	9
8	2	2	2	2	2	10
9	1	3	3	2	3	12
10	2	2	2	1	2	9

AKR+KRS

1	1	1	1	0	1	4
2	0	1	0	1	1	3
3	0	1	1	0	1	3
4	1	0	0	1	0	2
5	1	0	1	1	1	4
6	0	1	0	1	1	3
7	1	0	1	0	1	3
8	0	1	1	0	1	3
9	0	1	1	0	1	3
10	1	2	1	1	0	5

Çizelge Ek A.8. Histolojik doku skorlamaları.

	Grup	N	Mean	Minimum	Maximum	P
karaciğer_total_damae	Kontrol ^a	10	0	0	0	
	Krosin ^a	10	0	0	0	<0,001
	Akrilamid ^b	10	5	3	7	
	Akr+Krs ^c	10	2	1	3	
İncebağırsak	Kontrol ^a	10	0	0	1	
	Krosin ^a	10	0	0	0	<0,001
	Akrilamid ^b	10	10,5	8	14	
	Akr+Krs ^c	10	3,5	2	6	
Kalınbağırsak	Kontrol ^a	10	0	0	1	
	Krosin ^a	10	0	0	1	<0,001
	Akrilamid ^b	10	10	9	12	
	Akr+Krs ^c	10	3	2	5	



EK AÇIKLAMALAR B.

ETİK KURULU KARARI



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 07-11-2015
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2015/A-97
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Sıçan
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı :

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Eyüp ALTINÖZ 'ün yürütücüsü olduğu "Ratlarda Akrilamid Kaynaklı Olası Oksidatif Stres Üzerine Krosin'in Etkilerinin Araştırılması" isimli 2015/A-97 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

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

 Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Başkan	 Prof. Dr. Nigar VARDI Üye	 Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mehmet KARATAŞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
 Salih AVCI Sivil Üye	 Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	

KAYNAKLAR

1. Heath, C.W., Falk H., and Creech J.L., "Characteristics of cases of angiosarcoma of the liver among vinyl chloride workers in the United States." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 246(1): p. 231-236 (1975).
2. Tareke, E., "Acrylamide: a cooking carcinogen?" *Chemical research in toxicology*, 13(6): p. 517-522 (2000).
3. Tareke, E., "Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs." *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17): p. 4998-5006 (2002).
4. Organization, Health, W.H., "implications of acrylamide in food." Report of a joint FAO/WHO consultation, WHO headquarters, Geneva, *Switzerland*, p. 25-27 (2002).
5. Altınöz, E., "Ratlarda, akrilamid kaynaklı oksidatif stres ve genotoksisite üzerine N-asetilsisteinin etkilerinin araştırılması." (2009).
6. Sharp, D., "Acrylamide in food." *The Lancet*, 361(9355): p. 361-362 (2003).
7. Adewole, S., "Effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced kidney injury in Wistar rats." *African Journal of Biomedical Research*, 10(2) (2007).
8. Backe, W.J., Yingling V., and Johnson T., "The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection-hydrophilic-interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 1334: p. 72-78 (2014).
9. Lingnert, H., "Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods." *Scandinavian Journal of Nutrition*, 46(4): p. 159-172 (2002).
10. LoPachin, R.M. and Canady R.A., "Acrylamide toxicities and food safety: Session IV summary and research needs." *Neurotoxicology*, 25(4): p. 507-509. (2004).
11. Rudén, C., "Acrylamide and cancer risk—expert risk assessments and the public debate." *Food and Chemical Toxicology*, 42(3): p. 335-349 (2004).
12. Shaw, I. and Thomson B., "Acrylamide food risk." *The Lancet*, 361(9355): p. 434 (2003).
13. Barber, D.S., "Determination of acrylamide and glycidamide in rat plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 758(2): p. 289-293. (2001).

14. Konings, E., "Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks." *Food and Chemical Toxicology*, 41(11): p. 1569-1579 (2003).
15. Kısabay, A., "Kısa süreli akrilamid maruziyeti sonucu gelişmiş toksik polinoropati olgusu." *Causa Pedia*, 3: p. 701-702 (2004).
16. Bull, R.J., "Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice." *Cancer Research*, 44(1): p. 107-111 (1984)
17. Mottram, D.S Wedzicha, B.L. and Dodson A.T., "Food chemistry: acrylamide is formed in the Maillard reaction." *Nature*, 419(6906): p. 448-449 (2002).
18. Stadler, R.H., "Food chemistry: acrylamide from Maillard reaction products." *Nature*, 419(6906): p. 449-450 (2002).
19. Gökmen, V. and Şenyuva H.Z., "A simplified approach for the kinetic characterization of acrylamide formation in fructose-asparagine model system." *Food additives and contaminants*, 23(4): p. 348-354 (2006).
20. Skog, K., "The HEATOX project: Heat-generated food toxicants: Identification, Characterisation and Risk Minimisation." *Food Science and Technology*, 21(1): p. 25-27 (2007).
21. Murkovic, M., "Acrylamide in Austrian foods." *Journal of biochemical and biophysical methods*, 61(1): p. 161-167 (2004).
22. S'witzerland, G., "Revision of the WHO guidelines for drinking water quality." *Ann. Ist. Super. Sanita*, 29(2): p. 335-345 (1993).
23. Ljubic, B. and Sundac L., "[[Council] Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption: review and integral translation [from English into Serbian]]." *Voda i sanitarna tehnika (Serbia and Montenegro)*. (of 3 November 1998)
24. Friedman, M., "Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review." *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(16): p. 4504-4526 (2003).
25. Stadler, R.H. and Scholz G., "Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control." *Nutrition reviews*, 62(12): p. 449-467 (2004).
26. Becalski, A., "Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): p. 802-808 (2003).
27. İnternet: Joint, F. and Additives W.E.C.o.F., "Summary and Conclusion. Sixty-Fourth meeting, Rome, 8-17 February, 2005". JECFA/64/SC, <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en>. (2005),
28. Yaylayan, V.A. and Stadler R.H., "Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective." *Journal of AOAC International*, 88(1): p. 262-267 (2005).

29. Mottram, D., Low M. and Elmore J., "The Maillard reaction and its role in the formation of acrylamide and other potentially hazardous compounds in foods." *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*, p. 3-22 (2006)
30. Gertz, C. and Klostermann S., "Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products." *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(11): p. 762-771 (2002).
31. Surdyk, N., "Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7): p. 2047-2051 (2004).
32. İnternet: WHO, "WHO consultation on the health implications of acrylamide in food." *World Health Organization, Geneva, Switzerland*, p. 25-27. (2002).
33. Zhang, Y., "Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(5): p. 521-542 (2007).
34. Food, U. and Administration D., "The updated exposure assessment for acrylamide". in "*JIFSAN 2004 Acrylamide in food workshop*". (2004).
35. Kaplan, O., "Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry." *Microchemical Journal*, 93(2): p. 173-179 (2009).
36. Gökmen, V. and Şenyuva H.Z., "Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating." *Food Chemistry*, 99(2): p. 238-243 (2006).
37. Twaddle, N.C., "Determination of acrylamide and glycidamide serum toxicokinetics in B6C3F 1 mice using LC-ES/MS/MS.", 207(1): p. 9-17. *Cancer letters* (2004).
38. Doerge, D.R., "DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1): p. 131-141 (2005).
39. Sumner, S.C., "Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure." *Toxicological Sciences*, 75(2): p. 260-270 (2003).
40. Capuano, E. and Fogliano V., "Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies." *LWT-Food Science and Technology*, 44(4): p. 793-810. (2011).
41. Calleman, C.J. Bergmark E. and Costa L.G., "Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation." *Chemical research in toxicology*, 3(5): p. 406-412 (1990).

42. Sumner, S.C., MacNeela J.P. and Fennell T.R., "Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1, 2, 3-¹³C] acrylamide in rats and mice using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Chemical research in toxicology*, 5(1): p. 81-89 (1992).
43. Miller, M., Carter D. and Sipes I., "Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 63(1): p. 36-44 (1982).
44. Friedman, M. and Mottram D., "Chemistry and safety of acrylamide in food". Vol. 561. *Springer Science & Business Media*. (2006).
45. Fullerton, P.M. and Barnes J., "Peripheral neuropathy in rats produced by acrylamide." *British Journal of Industrial Medicine*, 23(3): p. 210-220 (1966).
46. Sickles, D. and Goldstein B., "Acrylamide produces a direct, dose-dependent and specific inhibition of oxidative metabolism in motoneurons." *Neurotoxicology*, 7(1): p. 187-195. (1985).
47. Kısabay, A., "Toxic Polyneuropathy Case Developed as a Result of Short Term Acrylamide Exposure" (2004).
48. Wang, H., "Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats." *Reproductive Toxicology*, 29(2): p. 225-230 (2010).
49. Thonning Olesen, P., "Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study." *International Journal of Cancer*, 122(9): p. 2094-2100 (2008).
50. Naruszewicz, M., "Chronic intake of potato chips in humans increases the production of reactive oxygen radicals by leukocytes and increases plasma C-reactive protein: a pilot study." *The American journal of clinical nutrition*, 89(3): p. 773-777 (2009).
51. Freeman, B.A. and Crapo J.D., "Biology of disease: free radicals and tissue injury." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(5): p. 412-426 (1982).
52. Slater, T.F., "Free-radical mechanisms in tissue injury." *Biochemical Journal*, 222(1): p. 1 (1984).
53. Gutteridge, J., "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." *Clinical chemistry*, 41(12): p. 1819-1828 (1995).
54. Shahidi, F., "Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications." *The American Oil Chemists Society*. (1997).
55. Rice-Evans, C.A., Miller N.J., and Paganga G., "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free radical biology and medicine*, 20(7): p. 933-956 (1996).

56. Schmidt, M., Betti G., and Hensel A., "Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses." *WMW Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(13): p. 315-319 (2007).
57. Bathaie, S.Z. and Mousavi S.Z., "New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients." *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(8): p. 761-786 (2010).
58. WINTERHALTER, P. and STRAUBINGER M., "Saffron—renewed interest in an ancient spice." *Food Reviews International*, 16(1): p. 39-59. (2000).
59. Abdullaev, F.I., "Biological effects of saffron." *BioFactors (Oxford, England)*, 4(2): p. 83 (1993).
60. Rios, J., "An update review of saffron and its active constituents." *Phytotherapy Research*, 10(3): p. 189-193 (1996).
61. Papandreou, M.A., "Inhibitory activity on amyloid- β aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23): p. 8762-8768 (2006).
62. Kianbakht, S. and Mozaffari K., "Effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, on prevention of indomethacin induced gastric ulcers in diabetic and nondiabetic rats." *دارویی گ یاھن پ ژوھشی علمی ف صل نامہ*, 1(29): p. 30-38 (2009).
63. Lorke, D., "A new approach to practical acute toxicity testing." *Archives of toxicology*, 54(4): p. 275-287 (1983).
64. Hosseinzadeh, H., Ziaee T. and Sadeghi A., "The effect of saffron, *Crocus sativus* stigma, extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats." *Phytomedicine*, 15(6): p. 491-495 (2008).
65. Mitchell, J. and Russo A., "The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity." *The British journal of cancer*. Supplement, 1987. 8: p. 96. (1987).
66. Arrick, B.A. and Nathan C.F., "Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review." *Cancer Research*, 44(10): p. 4224-4232. (1984).
67. Hayes, J.D. and McLELLAN L.I., "Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress." *Free radical research*, 31(4): p. 273-300 (1999).
68. McCord, J.M. Keele B.B. and Fridovich I., "An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(5): p. 1024-1027 (1971).
69. Alscher, R.G. Erturk N. and Heath L.S., "Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants." *Journal of experimental botany*, 53(372): p. 1331-1341 (2002).

70. Fink, R.C. and Scandalios J.G., "Molecular evolution and structure–function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399(1): p. 19-36 (2002).
71. Corpas, F.J., "The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves." *Plant and cell physiology*, 47(7): p. 984-994 (2006).
72. Hong-Duk. Y., "A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp." *Biochemical Journal*, 318(3): p. 889-896 (1996).
73. Higashi, T., Kawamata F., and Sakamoto T., "Studies on rat liver catalase. VII. Double-labeling of catalase by ¹⁴C-leucine and ³H-. DELTA.-aminolevulinic acid." *The Journal of Biochemistry*, 76(4): p. 703-708 (1974).
74. Halliwell, B. and Gutteridge J.M., "[1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." *Methods in enzymology*, 186: p. 1-85. (1990).
75. DEMİR, Ç. and SAVRAN A., "Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi." (2005).
76. Keha, E.E. and Küfrevioğlu Ö.İ., "Biyokimya". *Aktif Yayınevi* (2010).
77. Lanir, A. and Schejter A., "On the sixth coordination position of beef liver catalase." *FEBS letters*, 55(1-2): p. 254-256 (1975).
78. Robertson, D.E. Sanyal I. and Adhikary R.S., "Catalases". *Google Patents*. (1999).
79. Lardinois, O.M., "Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide." *Free radical research*, 22(3): p. 251-274 (1995).
80. Switala, J. and Loewen P.C., "Diversity of properties among catalases." *Archives of biochemistry and biophysics*, 401(2): p. 145-154 (2002).
81. MatÉs, J.M. Pérez-Gómez C. and De Castro I.N., "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clinical biochemistry*, 32(8): p. 595-603 (1999).
82. Carson, P.E., "Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes." *Science*, 124(3220): p. 484-485. (1956).
83. Halliwell, B. and Gutteridge J.M., "Lipid peroxidation: a radical chain reaction." *Free radicals in biology and medicine*, 2: p. 188-218 (1989).
84. Friedman, S., Martin P., and Munoz J., "Laboratory evaluation of the patient with liver disease." *Hepatology, a textbook of liver disease*, 1: p. 661-709 (2003).

85. Bircher, J., "Oxford textbook of clinical hepatology. 2. Sections 14-32 and index". *Oxford university press*. (1999).
86. McIntyre, N. and Rosalki S., "Biochemical investigations in the management of liver disease", in "Hepatobiliary diseases". *Springer*. p. 39-71 (1992),
87. Pratt, D.S. and Kaplan M.M., "Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients." *New England Journal of Medicine*, 342(17): p. 1266-1271 (2000).
88. Sies, H. "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants". in "Journal of Physiology-London". *Cambridge Univ Press 40 West 20th Street, New York, Ny 10011-4211*. (1996).
89. Radi, R., "Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." *Journal of Biological Chemistry*, 266(7): p. 4244-4250 (1991).
90. Frankel, E.N., "Review. Recent advances in lipid oxidation." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4): p. 495-511 (1991).
91. Machlin, L.J. and Bendich A., "Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients." *The FASEB Journal*, 1(6): p. 441-445 (1987).
92. Ellman, G.L., "Tissue sulfhydryl groups." *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1): p. 70-77 (1959).
93. Ohkawa, H., Ohishi N., and Yagi K., "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." *Analytical biochemistry*, 95(2): p. 351-358 (1979).
94. Sun, Y. Oberley L.W. and Li Y., "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase." *Clinical chemistry*, 34(3): p. 497-500 (1988).
95. Aebi, H., "Catalase: In: Bergmeyer." *Methods in enzymatic analysis Academic Press Inc., New York*, p. 673-686 (1974).
96. Erel, O., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status." *Clinical biochemistry*, 38(12): p. 1103-1111 (2005).
97. Erel, O., "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation." *Clinical biochemistry*, 37(4): p. 277-285 (2004).
98. Karagöz, A., "Akrilamid ve Gıdalarda Bulunuşu." *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 8(2) (2009).
99. Erdreich, L.S. and Friedman M.A., "Epidemiologic evidence for assessing the carcinogenicity of acrylamide." *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2): p. 150-157 (2004).

100. Testa, B. and Krämer S.D., "The Biochemistry of Drug Metabolism—An Introduction." *Chemistry & biodiversity*, 5(11): p. 2171-2336 (2008).
101. Kopp, E.K., "Rapid and sensitive HILIC-ESI-MS/MS quantitation of polar metabolites of acrylamide in human urine using column switching with an online trap column." *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21): p. 9828-9834 (2008).
102. Halliwell, B. Zhao K. and Whiteman M., "The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action?" *Free radical research*, 33(6): p. 819-830 (2000).
103. Arinç, E., "Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung." *Food and chemical toxicology*, 45(1): p. 107-118 (2007).
104. Shimizu, M., "Immunohistochemical localization of ethanol-inducible P450IIE1 in the rat alimentary tract." *Gastroenterology*, 99(4): p. 1044-1053. (1990).
105. Nelson, D.R., "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature." *DNA and cell biology*, 12(1): p. 1-51 (1993).
106. Lieber, C.S., "Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role." *Physiological reviews*, 77(2): p. 517-544 (1997).
107. Lee, K.S., "Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression." *Journal of Clinical Investigation*, 96(5): p. 2461 (1995).
108. Dai, Y., "Stable Expression of Human Cytochrome P4502E1 in HepG2 Cells: Characterization of Catalytic Activities, Cytotoxicity with Acetaminophen and Degradation by Carbon Tetrachloride". *City University of New York*. (1994).
109. Sumner, S.C., "Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice." *Chemical research in toxicology*, 12(11): p. 1110-1116. (1999).
110. Ghanayem, B.I. Wang H. and Sumner S., "Using cytochrome P-450 gene knock-out mice to study chemical metabolism, toxicity, and carcinogenicity." *Toxicologic pathology*, 28(6): p. 839-850 (2000).
111. Halliwell, B. and J Gutteridge. M., "Free radicals in biology and medicine".: *Oxford University Press, USA* (2015).
112. Makhlof, H., "Determination of antioxidant activity of saffron taken from the flower of *Crocus sativus* grown in Lebanon." *African Journal of Biotechnology*, 10(41): p. 8093-8100 (2011).

113. Bansal, A.K., "Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver." *Chemico-biological interactions*, 156(2): p. 101-111 (2005).
114. Zhu, R., "Oxidative stress and liver disease." *Hepatology Research*, 42(8): p. 741-749. (2012).
115. He, J., "In vitro and in vivo antioxidant activity of the ethanolic extract from *Meconopsis quintuplinervia*." *Journal of ethnopharmacology*, 141(1): p. 104-110 (2012).
116. Gangarapu, V., "Combined effect of curcumin and vitamin E against CCl₄ induced liver injury in rats." *American Journal of Life Sciences*, 1(3): p. 117-124 (2013).
117. Ozturk, F., "Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats." *Urology*, 62(2): p. 353-356 (2003).
118. Ranjbar, A., "Propofol attenuates toxic oxidative stress by CCl₄ in liver mitochondria and blood in rat." *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 13(1): p. 253 (2014).
119. Hassan, M.H., "Antioxidant and antiapoptotic effects of capsaicin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats." *Toxicology and Industrial Health*, 28(5): p. 428-438 (2012).
120. Kalender, S., "Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes." *Toxicology*, 211(3): p. 197-206 (2005).
121. Saxena, A.K., "Impaired antioxidant status in diabetic rat liver: effect of vanadate." *Biochemical pharmacology*, 45(3): p. 539-542 (1993).
122. Zheng, Y.Q., "Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia." *Brain research*, 1138: p. 86-94 (2007).
123. Hosseinzadeh, H., "Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats." *J Pharm Pharm Sci*, 8(3): p. 387-93 (2005).
124. Ghadrdoost, B., "Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats." *European journal of pharmacology*, 667(1): p. 222-229 (2011).
125. Sun, Y., "Crocicn attenuates cisplatin-induced liver injury in the mice." *Human & experimental toxicology*, 33(8): p. 855-862 (2014).
126. Jnaneshwari, S., "Crocicn, a dietary colorant mitigates cyclophosphamide-induced organ toxicity by modulating antioxidant status and

- inflammatory cytokines.“ *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(4): p. 604-614 (2013).
127. Lari, P., “Evaluation of diazinon-induced hepatotoxicity and protective effects of crocin.“ *Toxicology and industrial health*, 31(4): p. 367-376 (2015).
 128. Van Lieshout, E.M., “Effects of the sulforaphane analog compound 30, indole-3-carbinol, D-limonene or relafen on glutathione S-transferases and glutathione peroxidase of the rat digestive tract.“ *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1379(3): p. 325-336 (1998).
 129. Tong, G.C., Cornwell W.K. and Means G.E., “Reactions of acrylamide with glutathione and serum albumin.“ *Toxicology letters*, 147(2): p. 127-131 (2004).
 130. Sheweita, S. El-Gabar M.A. and Bastawy M., “Carbon tetrachloride changes the activity of cytochrome P450 system in the liver of male rats: role of antioxidants.“ *Toxicology*, 169(2): p. 83-92 (2001).
 131. Stryer, L., “Biosynthesis of membrane lipids and steroids.“ *Biochemistry*,: p. 685-712 (1995).
 132. Dahiru, D., Mamman D. and Wakawa H., “Ziziphus mauritiana fruit extract inhibits carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in male rats.“ *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(10): p. 990-993 (2010).
 133. El-Beshbishy, H.A., “Crocine “saffron” protects against beryllium chloride toxicity in rats through diminution of oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes.“ *Ecotoxicology and environmental safety*, 83: p. 47-54 (2012).
 134. El-Meligy, R.M. Zain M.E. and Ahmed F.A., “Protective role of Cynanchum acutum L. extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat.“ *International Journal*, 1(1): p. 9 (2014).
 135. Mani Senthilkumar, K. Raj Kapoor B. and Kavimani S., “Protective Effect of Enicostemma littorale. against CCl₄-Induced Hepatic Damage in Rats.“ *Pharmaceutical biology*, 43(5): p. 485-487 (2005).
 136. Salahshoor, M.R., “Protective effect of crocin on liver toxicity induced by morphine.“ *Research in pharmaceutical sciences*, 11(2): p. 120 (2016).
 137. Riaz, H., “Hepatoprotective Effect of Crocus sativus on Amiodarone-Induced Liver Toxicity.“ *British Journal Of Pharmaceutical Research*, 12(4) (2016).
 138. Boussabbeh, M., “Crocine protects the liver and kidney from patulin-induced apoptosis in vivo.“ *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10): p. 9799-9808 (2016).
 139. Omidi, A., “Hepatoprotective effect of Crocus sativus (saffron) petals extract against acetaminophen toxicity in male Wistar rats.“ *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(5): p. 330-336 (2014).

140. Manna, F., "Protective role of Panax ginseng extract standardized with ginsenoside Rg3 against acrylamide-induced neurotoxicity in rats." *Journal of Applied Toxicology*, 26(3): p. 198-206 (2006)
141. Botsoglou, N., "Potential of long-term dietary administration of rosemary in improving the antioxidant status of rat tissues following carbon tetrachloride intoxication." *Food and chemical toxicology*, 48(3): p. 944-950 (2010).
142. Rahmat, A.A. Dar F.A. and Choudhary I.M., "Protection of CCl4-induced liver and kidney damage by phenolic compounds in leaf extracts of Cnestis ferruginea (de Candolle)." *Pharmacognosy research*, 6(1): p. 19 (2014).
143. Assimopoulou, A. Sinakos Z. and Papageorgiou V., "Radical scavenging activity of Crocus sativus L. extract and its bioactive constituents." *Phytotherapy Research*, 19(11): p. 997-1000 (2005).
144. Paolini, M., "Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats." *Carcinogenesis*, 22(9) p. 1483-1495. (2001).
145. Tsujimoto, M., "The structure–activity correlation on the inhibitory effects of flavonoids on cytochrome P450 3A activity." *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(4): p. 671-676 (2009).
146. Farr, S.B. and Kogoma T., "Oxidative stress responses in Escherichia coli and Salmonella typhimurium." *Microbiological reviews*, 55(4): p. 561-585 (1991).
147. Speit, G., "Genotoxicity of hyperbaric oxygen." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 512(2): p. 111-119 (2002).
148. Wang, E.T., "Protective effect of allicin against glycidamide-induced toxicity in male and female mice." *General physiology and biophysics*, 34(2): p. 177-187 (2015).

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1991 Karabük'te doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Karabük'te tamamladı.2014 yılında Karabük Üniversitesi Kimya Bölümünden mezun oldu.2014 yılında aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Kimya A.B.D Yüksek lisansa başladı.

ADRES BİLGİLERİ

Adres : Merkez/KARABÜK

Tel : (541 786 3867)

e posta : sema_can_hsg@hotmail.com