

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA, AKRİLAMİD KAYNAKLI
OKSİDATİF STRES VE GENOTOKSİSİTE
ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİNİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Eyüp ALTINÖZ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

MALATYA- 2009

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA, AKRİLAMİD KAYNAKLI
OKSİDATİF STRES VE GENOTOKSİSİTE
ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİNİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Eyüp ALTINÖZ

**Danışman
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

**Bu araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2007/10 proje numarası ile desteklenmiştir**

MALATYA- 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

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

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İ.Halil ÖZEROL
İnönü Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
İnönü Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ
Fırat Üniversitesi

Üye: Doç .Dr. İsmail TEMEL
İnönü Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇIĞLI
İnönü Üniversitesi

İmza

ONAY :

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

Prof. Dr. Ali OTLU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Ratlarda, Akrilamid Kaynaklı Oksidatif Stres ve Genotoksisite Üzerine N-asetilsisteinin Etkilerinin Araştırılması

Akrilamidin yüksek düzeyleri, canlılar için genotoksik, kanserojenik ve nörotoksiktir. Gıdaların yüksek sıcaklık derecelerinde pişirilmesi sırasında düşük düzeylerde akrilamid oluşmakta ve gıdalarla birlikte vücuda alınmaktadır. Gıdalarla alınan akrilamidin insan vücudunda ne gibi hasarlar oluşturabileceği konusu tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, gıda kaynaklı akrilamid tüm insanlığı tehdit eden bir problem olarak karşımızda durmaktadır.

Bu araştırmada erkek Wistar ratlara ağız yoluyla akrilamid verilerek, akrilamidin ince ve kalın bağırsak, karaciğer ve kan dokusunda meydana getirebileceği muhtemel hasarların incelenmesi ve bu hasarların N-asetil sisteinle önlenebilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır.

Canlı ağırlıkları ortalama 250 gr olan 40 adet Wistar cinsi erkek ratlar eşit olarak dört gruba ayrıldı: Grup 1 (kontrol grubu); bu gruba normal beslenme uygulandı, grup 2 (akrilamid grubu); bu gruba 21 gün süreyle gavajla 25 mg/kg dozda akrilamid günlük olarak verildi, grup 3 (N-asetilsistein grubu); bu gruba 21 gün süreyle gavajla 250 mg/kg dozda N-asetilsistein günlük olarak verildi, grup 4 (Akrilamid + N-asetilsistein grubu); bu gruba 21 gün süreyle gavajla 25 mg/kg dozda akrilamid ve 250 mg/kg dozda N-asetilsistein günlük olarak verildi.

21 günlük sürenin sonunda tüm ratlar dekapite edildi. Malondialdehid (MDA), redükte glutatyon (GSH), total protein, Glutatyon S-Transferaz (GST) aktivite düzeylerinin analizi ve histopatolojik incelemeler için ince bağırsak, kalın bağırsak, karaciğer ve kan örnekleri alındı.

Biyokimyasal veriler incelendiğinde, akrilamid verilen grubun tüm dokularında GSH (kalın bağırsak hariç) ve GST aktivite düzeylerinin anlamlı derecede düştüğü ($p < 0.05$), ancak akrilamid+NAC grubunda ise GSH ve GST seviyelerinin normale döndüğü görülmektedir ($p < 0.05$). Akrilamid verilen grubun plazma, ince ve kalın bağırsak ve karaciğer MDA düzeyleri

anlamalı derecede artış gösterirken ($p < 0.05$) akrilamidle beraber NAC verilmesi MDA'yı kontrol grubu seviyesine düşürmüştür ($p < 0.05$).

Gruplardan alınana kan örneklerinden izole edilen lenfositlerin Comet analizinde, akrilamid verilen grubun lenfosit DNA'larında ciddi derecede hasarlanmalar gözlenirken akrilamid+NAC grubunun lenfosit DNA'larındaki hasarlanmaların minimal düzeyde gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Grupların tüm histopatolojik bulguları incelendiğinde, akrilamid verilen grubun özellikle ince bağırsak ve karaciğer dokularında ciddi hasarların olduğu, ancak akrilamid+NAC grubundaki doku hasarlanmalarının çok düşük düzeyde meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, akrilamidin tüm dokularda genel bir GSH azalmasına ve bunun sonucunda da oksidatif strese yol açacağı, GSH azalması nedeniyle karaciğerde detoksifiye edilemeyen akrilamidin yüksek derecede genotoksik olan glisidamide dönüşeceği, ancak akrilamidle birlikte N-asetilsistein verilmesinin tüm bu doku hasarlanmalarını önleyebileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Rat, Akrilamid, N-Asetilsistein, Oksidatif stres, GST, Comet analizi

ABSTRACT

Investigation of the Effects of N-acetylcysteine on Acrylamide-Induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Rats

High levels of acrylamide are genotoxic, carcinogenic, and neurotoxic in organisms. Acrylamide could occur in food during high temperature cooking and it can be taken up by humans via diet. Adverse effects of acrylamide on human body are completely not known when taken up via food chain. Therefore, dietary source of acrylamide could pose a great risk for public health.

In this study, it was aimed to investigate the possible toxic effects of orally administered acrylamide on the small and large intestines, blood and liver tissues in male Wistar rats as well as whether the injury induced by acrylamide could be prevented by N-acetylcysteine (NAC).

Forty male Wistar rats with the average weight of 250 g were divided into 4 equal groups as follows: Group 1 (control); animals in this group received normal diet. Group 2 (acrylamide); group 2 animals were given daily acrylamide at 25 mg/kg via oral gavage for 21 days. Group 3 (N-acetylcysteine); rats in group 3 were given daily N-acetylcysteine at 250 mg/kg via oral gavage for 21 days. Group 4 (acrylamide-N-acetylcysteine); animals in group 4 received daily acrylamide at 25 mg/kg and N-acetylcysteine at 250 mg/kg via oral gavage for 21 days.

At the end of 21 day-period, all rats were decapitated. Samples of small intestine, large intestine, blood, and liver were collected for histopathological examination as well as biochemical analyses to measure levels of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), total protein, and glutathione-S-transferase (GST) activity.

With respect to biochemical alterations in the treatment groups, tissue GSH levels (except large intestine) and GST activities in acrylamide group were significantly low ($p < 0.05$), while these parameters in acrylamide+NAC group were normalized ($p < 0.05$). Plasma, liver, small and large intestine MDA levels significantly increased in acrylamide group ($p < 0.05$), whereas

NAC treatment significantly reduced the MDA levels to the control values in rats treated with acrylamide ($p < 0.05$).

Comet analysis of lymphocytes obtained from the blood samples of the groups showed that lymphocyte DNAs obtained from acrylamide group had severe injury, whereas the damage was minimal in acrylamide+NAC group.

In histopathological examination, severe damage was observed especially in the small intestine and liver of acrylamide-treated group. However, the damage prominently reduced in acrylamide+NAC group.

In conclusion, acrylamide caused a decrease in GSH levels of all tissues studied. Acrylamide can not be detoxified in the liver due to decreased level of GSH, which in turn leads to the formation of genotoxic glycidamide. However, administration of N-acetylcysteine with acrylamide could prevent acrylamide-induced tissue alterations.

Keywords: Rat, Acrylamide, N-acetylcysteine, Small Intestine, Liver, Oxidative stress, GSH, MDA, GST, Comet analysis, Histopathology.

TEŞEKKÜR

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

Tıbbi Biyokimya A.D. başkanı sayın Doç. Dr. İsmail TEMEL'e ve anabilim dalı'nın diğer öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve laboratuvar çalışanlarına,

Histopatolojik inceleme ve değerlendirmeler konusundaki kıymetli yardımları için sayın Doç. Dr. Nigar VARDI'ya,

İstatistiksel analizler konusundaki desteklerinden dolayı sayın Doç. Dr. Saim YOLOĞLU'na,

Verilerin grafiklerinin hazırlanması konusunda yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. İbrahim ÖZEROL'a,

Bu projeye maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Başkanlığına içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Akrlamidin Kimyası	
2.1.1. Akrlamidin kimyasal Özellikleri	8
2.1.2. Akrlamidin kimyasal olarak oluşumu	9
2.1.3. Akrlamid'in Hemoglobın ve DNA ile Etkileşimi	12
2.2. Akrlamidin Metabolizması	
2.2.1. Akrlamidin Sindirim Sisteminden Emilimi	15
2.2.2. Akrlamidin Deriden Emilimi	16
2.2.3. Akrlamidin Vücutta Dağılımı	18
2.2.4. Akrlamidin Vücutta Metabolize Edilmesi	21
2.2.5. Akrlamidin Vücuttan Atılımı	26
2.3. Akrlamidin Toksik Etkileri	28
2.3.1. Akrlamidin Nörotoksisitesi	28
2.3.2. Akrlamidin Genotoksisitesi	32
2.3.3. Akrlamidin Kanserojen Etkisi	33
2.3.4. Deney Hayvanlarında Yapılan Kanserojenite Çalışmaları	33
2.3.5. Gıda Kaynaklı Akrlamide Maruz Kalan İnsanlarda Yapılan Çalışmalar	35
2.3.6. Akrlamide Mesleki Açından Maruz Kalan İnsanlar Üzerindeki Çalışmalar	37
2.3.7. Kanserojenik Risk Değerlendirmeleri	38
2.4. Gıdalarda Akrlamid Oluşumunu Etkileyen Faktörler	39
2.5. Akrlamidin Gıdalardaki Sınır Değerleri	41

2.6. Gıda Kaynaklı Akrilamidden Korunma Yolları	44
2.7. Tez Çalışmasına Dahil Edilen Parametreler Hakkında Genel Bilgi	
2.7.1. Glutasyon Metabolizması	45
2.7.2. Glutasyon S-Transferaz (GST)	49
2.7.3. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Gereçler	
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	53
3.1.2. Kullanılan Aletler	53
3.1.3. Ratların temini ve Bakımı	53
3.2. Yöntemler	
3.2.1. Grupların Oluşturulması	54
3.2.2. Numune Alınması ve Hazırlık İşlemleri	54
3.2.3. Redükte Glutasyon (GSH) Analizi	55
3.2.3.1. Numunelerin hazırlanması	55
3.2.3.2. Kullanılan reaktifler	55
3.2.3.3. GSH düzeylerinin tayini	56
3.2.4. MDA Analizi	56
3.2.4.1. Numunelerin hazırlanması	57
3.2.4.2. Kullanılan reaktifler	57
3.2.4.3. MDA düzeylerinin tayini	57
3.2.5. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Analizi	58
3.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması	58
3.2.5.2. Kullanılan Reaktifler	59
3.2.5.3. GST aktivite düzeylerinin tayini	59
3.2.5.4. GST aktivite düzeylerinin hesaplanması	59
3.2.6. Comet analizi	60
3.2.6.1. Lenfosit numunelerinin hazırlanması	61
3.2.6.2. Kullanılan Reaktifler	61
3.2.6.3. Comet analizinin yapılışı	61
3.2.7. İstatistiksel analizler	62

4. BULGULAR	
4.1. Grupların Plazma GSH düzeyleri	62
4.2. Grupların Plazma MDA düzeyleri	63
4.3. Grupların ince bağırsak GSH düzeyleri	64
4.4. Grupların ince bağırsak MDA düzeyleri	65
4.5. Grupların ince bağırsak GST aktivite düzeyleri	66
4.6. Grupların kalın bağırsak GSH düzeyleri	67
4.7. Grupların kalın bağırsak MDA düzeyleri	68
4.8. Grupların kalın bağırsak GST aktivite düzeyleri	69
4.9. Grupların karaciğer GSH düzeyleri	70
4.10. Grupların karaciğer MDA düzeyleri	71
4.11. Grupların karaciğer GST aktivite düzeyleri	72
4.12. Grupların comet analiz sonuçları	73
4.13. Grupların ince bağırsak histopatoloji sonuçları	74
4.14. Grupların karaciğer histopatoloji sonuçları	75
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	89
7.KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Akrilamidin kimyasal yapısı	8
Şekil.2.2. Maillard Reaksiyonu ve Akrilamid Oluşumu	9
Şekil.2.3. Farklı moleküllerden akrilamid sentezi	10
Şekil 2.4. Asparajın ve şekerin karbonil grubunun etkileşimi ve akrilamid oluşumu	11
Şekil 2.5. Akrilamid ve Glisidamidin DNA ile etkileşimi sonucunda oluşan temel bileşikler	13
Şekil 2.6. Akrilamidden glisidamid oluşumu ve glisidamid'in DNA ile etkileşimi	14
Şekil 2.7. Akrilamidin temel metabolik yolları	22
Şekil.2.8. Akrilamidin temel metabolik yolları	23
Şekil 2.9. Patatesin, farklı sıcaklık derecelerinde bekletilmesi ve akrilamid oluşumu	40
Şekil 2.10. Patatesin 180 °C'de farklı sürelerde bekletilmesi ve akrilamid oluşumu	40
Şekil 2.11. GSH'in moleküler yapısı	45
Şekil 2.12. Glutasyon metabolizması	47
Şekil 3.1. GSH Standard Grafiği	56
Şekil 3.2. MDA standart grafiği	58
Şekil 3.3. GST standart grafiği	60
Şekil 4.1. Grupların plazma GSH düzeyleri	63
Şekil 4.2. Grupların plazma MDA düzeyleri	64
Şekil 4.3. Grupların ince bağırsak GSH düzeyleri	65
Şekil 4.4. Grupların ince bağırsak MDA düzeyleri	66
Şekil 4.5. Grupların ince bağırsak GST aktivite düzeyleri	67
Şekil 4.6. Grupların kalın bağırsak GSH düzeyleri	68
Şekil 4.7. Grupların kalın bağırsak MDA düzeyleri	69
Şekil 4.8. Grupların kalın bağırsak GST aktivite düzeyleri	70
Şekil 4.9. Grupların karaciğer GSH düzeyleri	71
Şekil 4.10. Grupların karaciğer MDA düzeyleri	72
Şekil 4.11. Grupların karaciğer GST aktivite düzeyleri	73

Şekil 4.12. Grupların comet analiz sonuçları	74
Şekil 4.13. Grupların ince bağırsak histopatoloji sonuçları	75
Şekil 4.14. Grupların karaciğer histopatoloji sonuçları	76

TABLolar DİZİNİ

Table 2.1. Çeşitli gıdalarda bulunan akrilamid değerleri (FDA)	41
Tablo 2.2. Ölmez ve ark.'nın gıda kaynaklı akrilamid analizi sonuçları	43
Tablo 4.1. Analiz edilen biyokimyasal parametrelerin grup ortalamaları	77
Tablo 4.2. Analiz edilen parametrelerin gruplararası istatistiksel anlamlılık dereceleri	78

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABD: Amerika birleşik devletleri

ACR: Akrilamid

ACGIH: Amerikan devlet endüstri hijyenistleri birliği

AHH: Aril Hidrokarbon Hidroksilaz

BSA: Sığır serum albumini

CDNB: 1-kloro 2,4 dinitrobenzen

dk.: Dakika

DMSO: Dimetil sulfoksid

DNA: Deoksiribonükleik asit

DTNB: 5,5'-Ditiyobis 2-nitrobenzoik asit

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EH: Epoksid hidrolaz

EU: Avrupa birliği

FAD: Flavin adenin dinükleotid

FAO: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

GR: Glutasyon redüktaz

tGSH: Total redükte glutasyon

GSH: Redükte glutasyon

GSHPx: Glutasyon peroksidaz

GSSG: Okside glutasyon

GST: Glutasyon S-transferaz

γ -GT: Gama glutamil transpeptidaz

γ -GCS: Gama glutamil sistein sentetaz

IAC: Uluslararası kanser ajansı

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

LD50: Letal Doz 50

LDH: Laktat dehidrojenaz

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

MDA: Malondialdehid

NAC: N-asetilsistein

NADPH: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NBT: Nitro blue tetrazolyum

NIOSH: Ulusal Sağlık ve Güvenlik Enstitüsü

NO: Nitrik oksid

PBS: Phosphate-Buffered Saline

SDS: Sodyum dodesil sülfat

Sit P450: Sitokrom P450

SOR: Serbest oksijen radikalleri

TBA: Tiyobarbutrik asit

TBTAK: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu

U.S. EPA: Amerikan evre koruma dairesi

U.S. FDA: Amerikan gıda ve ilaç dairesi

WHO: dünya sağlık rgt

1. GİRİŞ

Akrilamid, tabiatta doğal olarak bulunmayan, ancak kimyasal olarak sentez edilerek ticari kullanıma sunulan kimyasal bir maddedir. Akrilamid, araştırma laboratuvarlarında daha çok elektroforez ve kromatografi gibi moleküler biyoloji tekniklerinde yoğun olarak kullanım alanı bulmaktadır. Ayrıca akrilamid, matbacılık ve tekstil sektöründe, atık suların arıtılması işleminde, losyon, deoderant gibi birçok değişik kozmetik ürünlerin hazırlanması sırasında katkı maddesi olarak kullanılabilir.

1970'li yıllarda deney hayvanları üzerinde yapılan toksisite çalışmalarında, akrilamidin çok toksik bir madde olduğu, canlılarda kansere neden olabileceği bildirilmiştir (1). 1980'li yıllarda, bu konuyla ilgili olarak çok sayıda araştırma yapılmıştır. Yapılan bu deneysel araştırmalar da, akrilamidin belli dozda ve belli sürede sistemik olarak alınmasının, toksikasyonlara ve kanserleşmeye neden olabileceği rapor edilmiştir (1,2). Ancak, bu maddenin belirli alanlarda kullanılıyor olması, gıdalara katılan bir madde olmaması ve bu nedenlerle canlıları etkilemeyeceği düşüncesi, akrilamidin canlılar üzerinde meydana getirebileceği zararlı etkilerin derinliğine araştırılmasını ve ortaya konulmasını geciktirmiştir. Daha sonraki yıllarda da, bu konuyla ilgili araştırmalar az sayıda da olsa devam etmiştir.

2000-2002 yıllarında Stokholm üniversitesinden bir grup bilim adamının, gıdaların yüksek sıcaklık derecelerinde pişirilmesi sırasında yüksek miktarlarda akrilamid oluştuğunu ortaya koymaları, akrilamidle ilgili araştırmalar için çok önemli bir dönüm noktası olmuştur. 2000 yılına kadar, akrilamidin doğal olarak oluşmadığı, ancak kimyasal olarak sentez edilebileceği bilgisi kabul görmekteydi. Stokholm üniversitesinden Tareke ve arkadaşları (3,4), bu görüşü tamamen geçersiz kılmış, gıdaların yüksek sıcaklık derecelerinde pişirilmesi sırasında bol miktarda akrilamid oluştuğunu bilim dünyasına duyurmuşlardır.

Bu gelişmeler üzerine, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) yetkilileri 2002 yılında yaptıkları ortak toplantıda (5), akrilamidle ilgili tüm gelişmeleri değerlendirmiş ve konuyla ilgili ortak bir rapor yayınlamışlardır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food

and Drug Administration; FDA) 2002 yılındaki bu gelişmeler üzerine, bu konuyu gündemine almış ve 2002, 2003, 2004 ve 2005 yıllarında (6) gıda kaynaklı akrilamidle ilgili hareket planlarını kamuoyuna açıklamışlardır. FDA ve WHO'nun gıda kaynaklı akrilamidin insan sağlığı için ciddi bir problem oluşturabileceğini açıklamasından sonra, Amerikanın bazı eyaletlerinde (özellikle kaliforniya) tüketiciyi koruma birlikleri, eyalet yasalarına göre kanserojen madde içeren ürünlerin üzerine "kanserojen madde içerir" uyarısının yazılmasının zorunlu olduğunu belirtmişlerdir. Akrilamid içeren özellikle patates cipslerinin üzerine de "insan sağlığı için zararlı olan akrilamid içerir" uyarısının yazılması için kamuoyu baskısı oluşturmuşlardır (7). Tüm bu gelişmeler araştırmacıların ilgisinin, gıda kaynaklı akrilamidin canlılar üzerinde ne gibi zararlar oluşturacağı konusu üzerinde yoğunlaşmasına yol açmıştır.

Son yıllarda sigara içenler üzerinde yapılan çalışmalar, tütünün çok yüksek derecede yanması sırasında da akrilamid oluştuğunu ve içe çekilen dumanla birlikte vücuda akrilamid alındığını ortaya koymuştur (8,9). Konuyla ilgili bilim adamları bu bulguyu, sigara içenlerde çok sık gelişen akciğer kanserinde akrilamidin aktif rolü olabileceği şeklinde yorumlamışlardır.

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

Ağız yoluyla alınan akrilamid, sindirim sistemi boyunca yeterli düzeyde GSH'ın varlığında, GST ile akrilamid-glutatyon formuna dönüştürülerek etkisizleştirilir ve kolaylıkla vücut dışına atılabilir. Tüm vücutta bulunan redükte glutatyonun yaklaşık % 60'ının karaciğerde bulunması nedeniyle çok

daha yüksek bir kapasite ile akrilamid, karaciğerde akrilamid-glutatyon konjugatına çevrilerek büyük oranda idrarla vücut dışına atılır. Ancak, sulu ortamlarda kolaylıkla çözünebilme özelliği nedeniyle akrilamidin bir kısmında bütün vücut dokularına dağılım gösterir. Vücudun tüm dokuları, GST / GSH düzeylerine bağlı olarak akrilamidi GSH ile konjuge ederek etkisizleştirebilir. Akrilamid ayrıca, karaciğerde Sit P450 2E1 (CYP 450 2E1) İle okside edilerek çok daha genotoksik olan glisidamid'e dönüştürülür. Glisidamid molekülünde GST / GSH sistemiyle glisidamid-glutatyon şekline çevrilerek detoksifiye edilir ve idrarla vücut dışına atılır. Ancak, akrilamidin katabolize edilmesi işlemlerinde en önemli sınırlayıcı faktör, ortamda yeterli düzeyde GSH'ın bulunabilirliğidir.

Uzun süre yüksek miktarlarda akrilamidin vücuda alınıyor olması, genel olarak tüm vücut dokularında bir GSH azalmasına neden olur. Bu durum radikallerin nonezimatik detoksifikasyonu ve GSH gerektiren enzimatik detoksifikasyon kapasitesinde düşüşe neden olur. Dokuların oksidan / antioksidan dengesi oksidanların lehine bozulur ve dokuların hasarlanması olarak ifade edilen oksidatif stres tablosu ortaya çıkar. Meydana gelen oksidatif strese bağlı olarak dokuların GSH düzeyinin azalmasıyla ağızdan alınan akrilamidin yeterli düzeyde detoksifiye edilemez. Bu durumda akrilamid karaciğerde Sit P450 2E1 İle okside edilerek çok daha toksik olan glisidamid'e dönüştürülür. Bunun sonucunda da dokularda genotoksik etkiler ortaya çıkabilir.

Bu araştırmada; 21 gün süreyle ratlara akrilamid ve N-asetil sistein (GSH öncülü) verilerek, akrilamidin ince ve kalın bağırsak, karaciğer ve kan dokusunda meydana getirebileceği hasarlanmalar histopatolojik olarak incelendi. Bu amaçla, ince ve kalın bağırsak, karaciğer ve kan dokusunda GSH, malondialdehid (MDA, en önemli lipid peroksidasyon ürünü) ve GST aktivite düzeyleri, ayrıca akrilamidin lenfositler üzerinde meydana getirebileceği muhtemel genotoksik etkiler Comet testiyle analiz edildi. Aynı zamanda bu hasarlanmaların bir GSH öncülü olan N-asetilsisteinle engellenebilirliği denendi.

2. GENEL BİLGİLER

Akrilamid doğal olarak bulunmayan, ancak kimyasal olarak sentezlenebilen ve oldukça toksik bir maddedir. Akrilamid, ilk olarak 1950'li yıllarda özellikle Amerika'da, kimyasal yollarla sentezlenmiş ve tekstil, kâğıt, kozmetik sanayi gibi çok değişik endüstriyel alanlarda kullanılmaya başlanılmıştır.

Akrilamid ve bisakrilamid birimlerinin polimerizasyonu ile yüksek moleküler ağırlıklı polimerik özelliği olan poliakrilamid oluşmaktadır. Bu polimerler, kimyasal olarak inert (tepkisiz), nontoksik ve genellikle kararlı yapılardır. Poliakrilamidin matbaacılık alanındaki asıl kullanım amacı, kâğıdın dayanıklılığını artırmaktır. Poliakrilamid, atık suların arıtılması işleminin yoğunlaştırma basamaklarında sıklıkla kullanılmaktadır. Buna ilaveten poliakrilamid; losyon, deoderant gibi birçok değişik kozmetik ürünlere de katılmaktadır. Poliakrilamidler, kişisel bakım ürünlerine yağlı ve yumuşatıcı bir özellik kazandırmaktadır. Poliakrilamid oluşum reaksiyonları sonrasında, az bir miktar serbest akrilamid (ACR) ortamda bulunmaktadır. Bu nedenle kişisel bakım ürünlerinin kullanımı sırasında, çok düşük seviyede de olsa akrilamide maruz kalma söz konusu olmaktadır. Ancak bu çok düşük düzeydeki akrilamid çok düşük oranda risk oluşturmaktadır.

Son yapılan araştırmalar (3,4), gıdaların 120 °C'nin üzerindeki sıcaklık derecelerinde pişirilmesi (özellikle kızartma, gril, ya da fırınlama) sırasında bol miktarda akrilamidin meydana geldiğini ortaya koymuştur. Pişirilme sırasında meydana gelen akrilamid miktarı, maruz bırakılan sıcaklık derecesi ve süresi ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Sharp (10), karbonhidrat ve protein açısından zengin olan besinlerin ortalama 248 °F (120 °C) derecede pişirilmesi sonrası, ortalama 1 mg/kg düzeyinde akrilamid oluştuğunu bildirmişlerdir. Hollanda da yapılan bir araştırmada, yüksek ısıda pişirilen yemeklerle beslenen insan deneklerinin günlük olarak vücut ağırlığına bağlı olarak ortalama 0,5 µg/kg akrilamidi vücutlarına aldıkları tespit edilmiştir.

Kızartma ve fırınlama ile pişirilme sırasında bol miktarda akrilamid oluşturan gıdaların (11) suda haşlanarak pişirilmesi sırasında ise akrilamid meydana gelmediği tespit edilmiştir (12). Bu bilgi çok önemli ve dikkat

çekicidir. Çünkü gıda kaynaklı akrilamid toksisitesinden korunmak için, gıdaların kızartılarak veya fırınlanarak pişirilmesi yerine haşlanarak pişirilmesinin tercih edilmesi yeterli olacaktır.

Akrilamid, gıdaların yüksek sıcaklık derecelerinde pişirilmesinin doğal bir sonucu olarak oluşan bir madde olması nedeni ile bu tür gıdaların yasaklanmasının mümkün olamayacağı görülmektedir. Çünkü insanlar tarafından tüketilen gıdaların tamamının bileşiminde az ya da çok karbonhidrat ve protein bulunmaktadır. Ancak, akrilamidin sağlık üzerinde meydana getirebileceği riskler dikkate alınarak, gıdalarda izin verilen maksimum akrilamid seviyeleri ile ilgili yasal limitler getirilebilir. Henüz yeterli bilimsel veri olmaması nedeniyle gıdalarla alınan akrilamidin potansiyel sağlık riskleri ile ilgili olarak kesin bir yargıya varmak mümkün değildir. Bu nedenle, söz konusu çalışmalar tamamlanana kadar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO); gıdaların çok yüksek sıcaklıklarda ve uzun sürelerde pişirilmemesi, kızartılmış ve yağlı gıdaların ölçülü tüketilmesi yönünde tavsiyelerde bulunmaktadır (5). Diğer yandan, gıdaların pişirilmesi sırasında oluşan akrilamid miktarının azaltılması veya akrilamid oluşumunun önlenmesi ile ilgili çalışmalar da yoğun bir şekilde sürdürülmektedir.

Gıda kaynaklı akrilamid konusu, Nisan 2002'de, İsveçli bilim adamlarının yüksek ısı işlemine tabii tutulan ve yüksek nişasta içeren gıdaların önemli seviyelerde akrilamid içerdiğini açıklamaları ile gündeme gelmiş (3), bunun ardından dünya bilim çevrelerinde gıda kaynaklı akrilamidin neden olabileceği sağlık risklerinin belirlenmesi amacıyla çok sayıda çalışma başlatılmıştır. Çeşitli araştırma kuruluşları tarafından geçmiş yıllarda fareler üzerinde yapılan deneylerde akrilamidin deney hayvanlarında kötü huylu tümör oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Günlük gıda yoluyla alınan akrilamid miktarının, insan sağlığı üzerine olumsuz etki edebilecek düzeylerin 500–1000 kat altında olduğu bilinmektedir. Ancak akrilamidin bu seviyelerde ve uzun süreli alınımı sonucu oluşabilecek sağlık riskleri ile ilgili ise kesin bir bilgi henüz bulunmamaktadır. Bu konuda, pişirilmiş gıdaların akrilamid içeriği yanında, insanların beslenme şekli ve gıda tüketim alışkanlıkları da önemli rol oynamaktadır.

Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (The International Agency for Research on Cancer, IARC), akrilamidi “insanlar için potansiyel kanserojen madde” olarak sınıflandırmaktadır. Akrilamid, gıda maddelerine katılan bir katkı maddesi değil, pek çok gıda grubunda doğal bileşen olarak bulunan karbonhidrat (glukoz) ve proteinlerin (özellikle asparajin amino asidi) yüksek sıcaklık koşullarında tepkimesi sonucunda oluşan bir maddedir. Bu nedenle karbonhidrat ve proteince zengin, yüksek ısı işlemine tabii tutulmuş ürünler arasında özellikle fırıncılık ürünleri ve kızartmalar dikkat çekmekte ve araştırmalara konu olmaktadır (13,14). Avrupa’da yapılan çalışmalar (15), günlük tüketim miktarlarının yüksekliği dikkate alınarak özellikle kahve, patates ürünleri ve ekmeğin gıda kaynaklı akrilamid alımında ilk sıralarda yer aldığını ortaya koymuştur.

Akrilamidin toksik özellikleri ve potansiyel bir kanserojen madde olduğu aslında yıllardır bilinmekteydi. Ancak ısı işlemler sonucu gıdalarda oluşabildiği 2002 yılı başlarında anlaşılmıştır. Akrilamid, özellikle kızartılmış, kavrulmuş, ızgara veya fırında pişirilmiş gıdalarda 120 °C’nin üstündeki sıcaklıklarda oluşmaktadır. Buna karşın haşlanarak pişirilen gıdalarda akrilamid oluşumu meydana gelmez. Gıdaların yapısında bulunan bazı şeker ve amino asitlerin yüksek sıcaklıklardaki reaksiyonu sonucunda akrilamid oluştuğu kanıtlanmıştır (13,14). Bunun yanı sıra, gıdaların yapısında bulunan bazı yağların da akrilamid oluşumundan sorumlu olduğu bilimsel olarak tespit edilmiştir. Ancak, gıdaların pişirilmesi sırasında akrilamidin nasıl ve hangi mekanizma ile oluştuğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle akrilamid oluşumunu önleyici bir yöntem tanımlamak şu aşamada mümkün görülmemektedir. Ayrıca, gıdaların üretim yöntemlerinde herhangi bir değişiklik öngörülmeden önce, akrilamidin farklı gıdalardaki oluşum mekanizmalarının tam olarak anlaşılması gerekmektedir.

şimdiye kadar tamamlanan çalışmaların sonuçları (15,16), akrilamidin neden olabileceği kanser riskinin göz ardı edilemeyeceğini, ancak “gıda kaynaklı düşük düzeyli akrilamid, kanser riskini artırmaktadır” şeklinde bir tespit de henüz yapılamayacağını öngörmektedir. Çünkü gıda kaynaklı akrilamidin hangi seviyelerinin risk oluşturduğu, hangi seviyenin altının insan

sağlığı için kabul edilebilir olduğu yönünde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu konuda tam bir belirsizlik yaşanmaktadır. Bu nedenle, riskin bilimsel anlamda doğru bir şekilde belirlenebilmesi ve gıdalar için limit değerlerin tanımlanabilmesi için devam eden çalışmaların sonuçları beklenmektedir.

Akrilamidin toksik etkilerini ortaya koymak amacıyla geniş kapsamlı çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Bu araştırmalar, gıda kaynaklı akrilamidin oluşum mekanizmalarının ortaya çıkartılması üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Yapılan çok sayıda araştırma (17), akrilamidin insan ve hayvanlarda nörotoksik etkiler gösterdiğini, üreme sistemi için toksik, germ hücreleri için yüksek derecede kanserojen etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalara göre (18,19) akrilamidin potansiyel toksik etkisi, nükleofillerle etkileşebilen elektrofilik özellikteki α,β - doymamış karbonil gruplarından kaynaklanmaktadır. Bu elektrofilik özellik nedeni ile akrilamid tiyol, imidazol, alkil hidroksil, karboksil ve amin gibi biyolojik nükleofil gruplarla kolaylıkla etkileşim içine girerler. Akrilamidin hücreler üzerinde meydana getirdiği toksikasyonlar, akrilamidin özellikle yüksek derecede nükleofilik olan tiyol (SH grubu) gruplarıyla etkileşime girmesinden kaynaklanmaktadır.

Gıda kaynaklı akrilamidin geniş kitleleri etkileyen bir sağlık problemi olması nedeniyle, 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, EU, 2002) gibi kuruluşlar bu konuyu gündemlerine almışlardır. Özellikle US FDA ve WHO, akrilamid ile ilgili olarak yapılması gereken hususlar konusunda yıllık hareket planları hazırlayarak kamuoyuna duyurmuş ve konuyu sürekli gündemde tutmuşlardır. Bunlardan ayrı olarak Amerikan Çevreyi Koruma Kuruluşu (U.S. EPA), akrilamidin kabul edilebilir, toksik ve kanserojen dozları ile ilgili olarak çok sayıda araştırma yaptırarak bazı referans değerler ortaya koymuş ve bu bilgileri kamuoyuna duyurmuştur. İçme suyu kalitesi için, WHO'nun yönergesine göre, bir litre

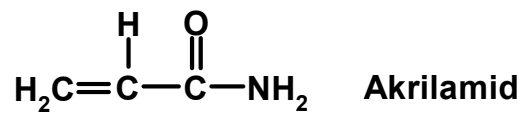
içme suyunda 0,5 µg/L akrilamid olarak bildirilmiştir (20). Avrupa Birliğinde bu rakam 0,1 µg /litre sudur (21).

Amerikan Çevreyi Koruma Ajansı (U.S. EPA) tarafından desteklenen bu araştırmaların temel amacı, elde edilen yeni verileri kullanarak akrilamidin kanser riski değerlerini belirlemek, kanserojen olan ya da olmayan toksik değerleri bulmak ve kamuoyuna sunmaktır. Hayvanlar üzerinde yapılan epidemiyolojik ve toksikolojik çalışmalar, akrilamid etkisi ile ortaya çıkan toksik etkileri belirlemenin yanısıra, doz oranlarını belirleyen anahtar çalışmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak konuyla ilgili sürekli veri girişine rağmen, maalesef net bir bilgi henüz ortaya konulabilmiş değildir.

2.1. AKRİLAMİDİN KİMYASI

2.1.1. Akrilamidin kimyasal Özellikleri

Akrilamid doymamış çift bağ içeren bir amiddir (22). 2-propenoamid, etilen karboksamid, akrilik asit amid, vinil amid, propenoik asid amid olarak da bilinmektedir. Sıvı halde iken beyaz bir kristal gibi görünür, kokusuzdur ve suda yüksek çözünürlüğe sahiptir. Erime sıcaklığı 84,56 °C, kaynama sıcaklığı (25 mm Hg) 125 °C'dir (atmosfer basıncında 192,66 °C) (23). Akrilamid nükleofillerle özellikle tiyolat anyonlarıyla reaksiyona girebilir (24). Akrilamidin kimyasal yapısı Şekil 2.1.'de verilmiştir.



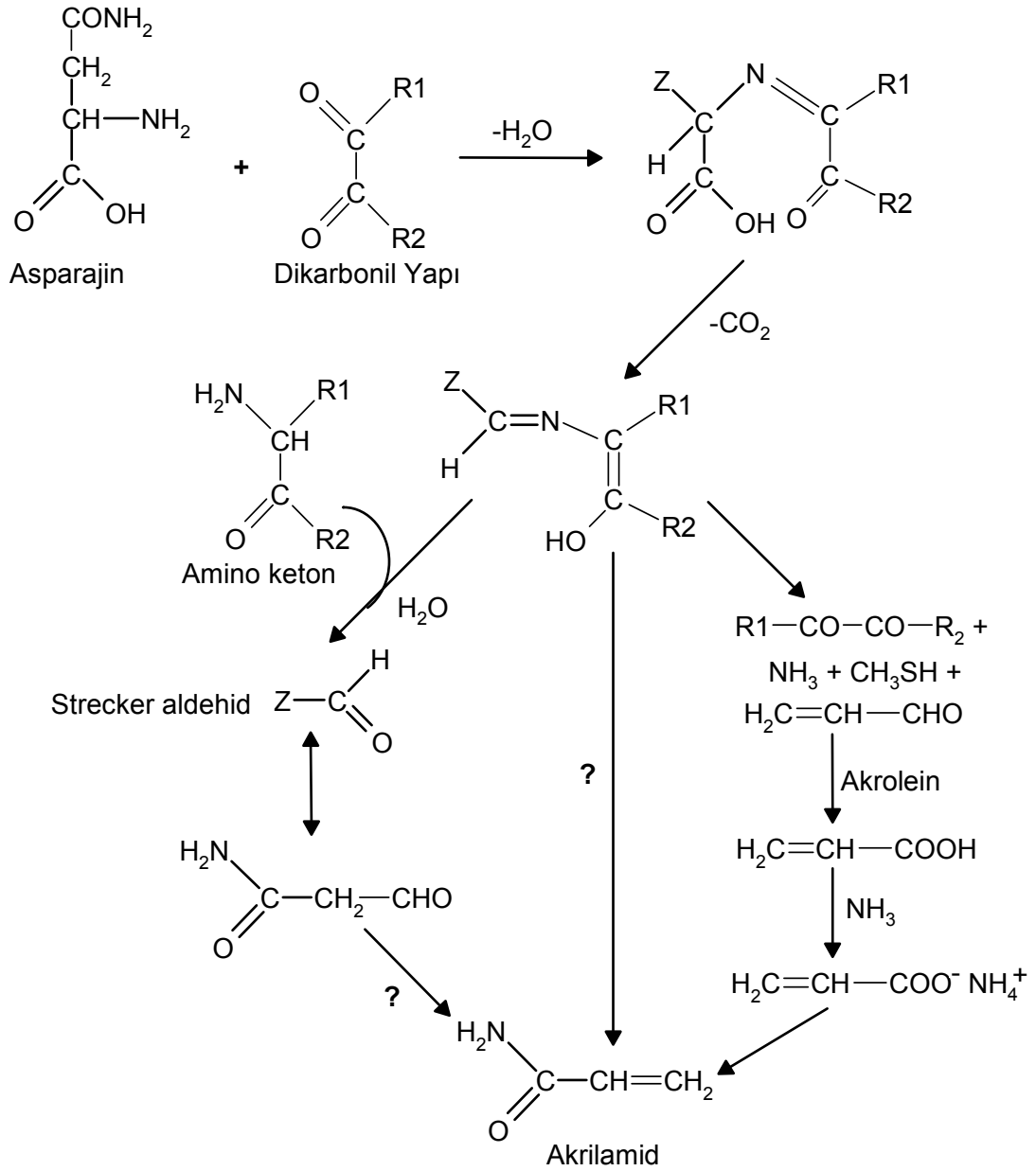
Şekil 2.1. Akrilamidin kimyasal yapısı

Akrilamid üre (CO(NH₂)₂) ve formaldehit (HCHO) veya glioksal (CHO)₂, aldehitler (RCHO), aminler (R₂NH), tiyoller (RSH) gibi küçük reaktif moleküllerle reaksiyona girebilmektedir (23).

2.1.2. Akrilamidin kimyasal olarak oluşumu

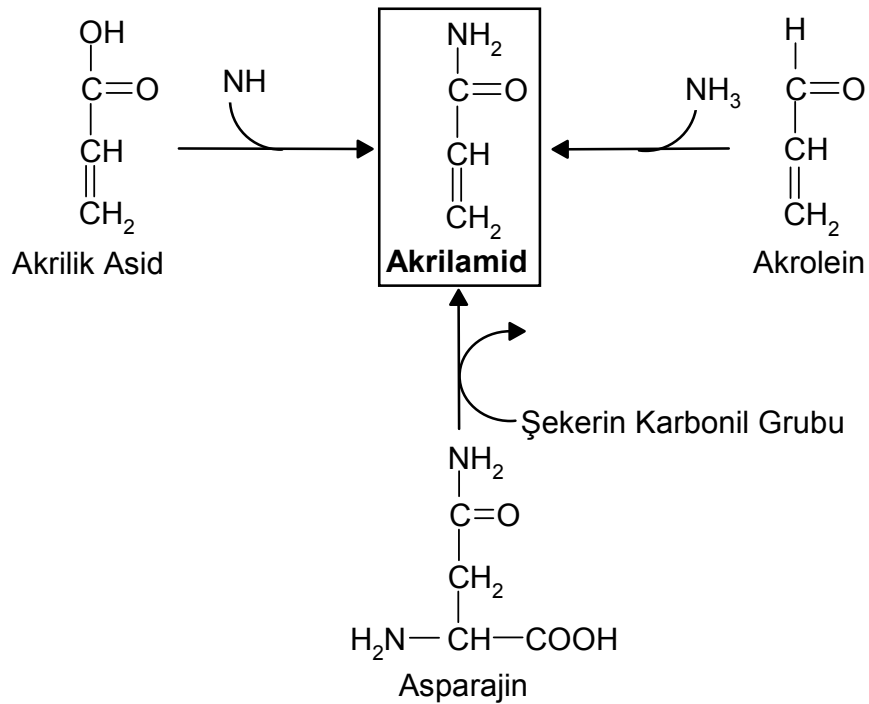
Gıda kaynaklı akrilamid, 120 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda fruktoz ya da glukoz gibi monosakkaritlerle asparajin gibi aminoasitler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu sonucunda oluşur (Şekil 2.2.) (14).

Proteinlerin yapısına giren standart 20 aminoasitten özellikle asparajin, akrilamid oluşumunda kilit rol oynar. Gıdaların haşlanması sırasında akrilamid oluşumu söz konusu değildir (12).



Şekil 2.2. Maillard Reaksiyonu ve Akrilamid Oluşumu (14)

Akrolein (2-propenal, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$) üç karbonlu bir aldehittir ve akrilamidin yapısını ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$) anımsatmaktadır. Bu nedenle akrolein akrilamidin başlangıç molekülü olarak kabul edilmektedir. Temel kimyasal tepkimelerle akrolein akrilamide dönüşebilir, ancak akrilamidin alternatif oluşum mekanizmalarında akrolein gerekli değildir (Şekil 2.3.). Örneğin, proteinler ve/veya amino asitlerin hidrolizi, dekarboksilasyonu gibi transformasyonlar akrilamid oluşumu ile sonlanabilir (23).



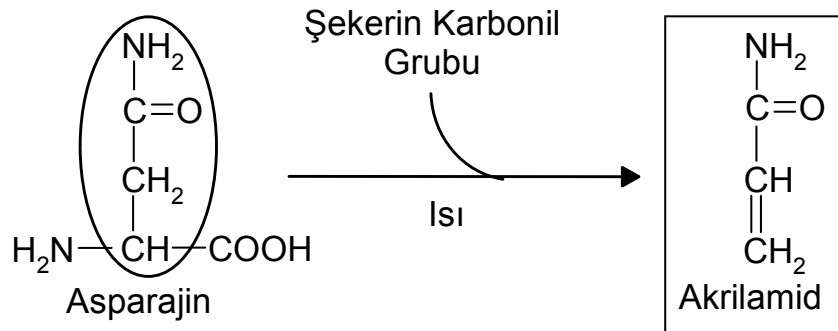
Şekil 2.3. Farklı moleküllerden akrilamid sentezi

Düşük nemli ortamlardaki asıl büyük reaksiyon asparajinle bazı şeker (glukoz, fruktoz, galaktoz gibi) molekülleri arasındaki bir Schiff bazlı hareket, akrilamid oluşumunu tetikleyebilir. Belli koşullar altında asparajinin dekarboksilasyonu veya akrolein'den amonyak açığa çıkmasıyla akrilamid oluştuğu bildirilmiştir (25). Akrolein, kızarmış yağda bulunan trigliseridlerin ısı etkisiyle bozulması sırasında oluşabilmektedir. Akroleine bağlı bu akrilamid oluşum mekanizması, kızarmış patatesteki akrilamid oluşum mekanizmasına benzememektedir (26).

Örnek çalışmalar, akrilamid oluşumunda fruktozun glukoz ya da galaktozdan daha etkili olduğunu göstermiştir. Farklı bir açıklama da erime noktası için verilebilir. Fruktozun az nemli ortamda akışkanlığının arttığı ve buna bağlı olarak tepkimeye girdiği belirtilmiştir (27).

Besinlerin yüksek ısıda pişirilmesi sırasındaki akrilamid oluşum mekanizması, ısının etkisiyle asparajin amino asidi ile şekerin reaksiyona girmesine dayanmaktadır (Şekil 2.4.). Ancak ısıtma sırasında ortamda bulunan amino asit ve şekerin çok küçük bir kısmı reaksiyona girerek akrilamid oluşturmaktadır. Bu oran asparajin için % 0,1 – 0,3 civarlarındadır.

Surdyk (28) , ekmek hamuruna farklı miktarlarda asparajin katarak yaptığı çalışmada, pişirme sonrası ekmekteki asparajinin % 0,3'nün akrilamide dönüştüğünü tespit etmiştir. Mısır nişastası, buğday unu ve patatesteki akrilamid oluşumu üzerine yapılmış diğer araştırmalardaki asparajin-akrilamid dönüşüm oranları biraz daha yüksekti, ancak bu oran genel olarak % 1'in altında bulunmuştur (27).



Şekil 2.4. Asparajin ve şekerin karbonil grubunun etkileşimi ve akrilamid oluşumu.

Şeker, yağ ve sütün yüksek sıcaklıkta pişirilmesiyle gerek bisküvi ve gerekse de muhallebi gibi ürünlerde maillard reaksiyonuyla akrilamid oluşmakta, bu ise sağlığı olumsuz yönde etkilemektedir. Maillard reaksiyonu nedeniyle sütteki bazı proteinlerin yapısı bozulmakta ve karaciğer üzerinde toksik etki oluşturabilmektedir (26).

Besinlerin pişirilerek hazırlanması sırasında oluşan akrilamid oranları, besinde bulunan glukoz, fruktoz gibi indirgen şekerlerin ve asparajin amino

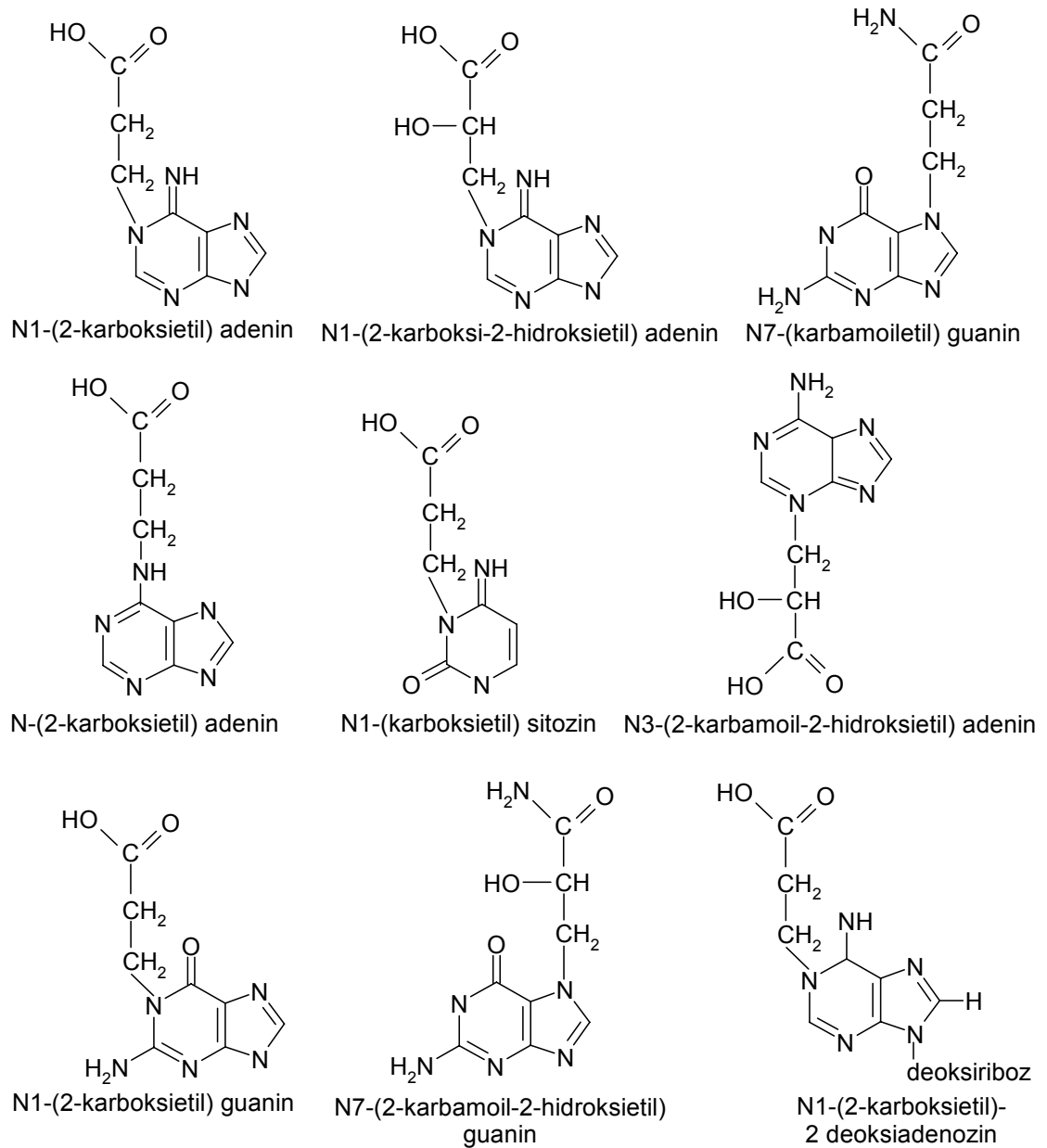
asidinin miktarına, uygulanan sıcaklık derecesine ve uygulama süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin; 180 °C'de kızartılan patatesten, 120 °C derecede kızartılan patatese göre 30 kat daha fazla akrilamid oluşmaktadır. Bu durum bize çeşitli yiyeceklerin pişirilmesi, kızartılması veya kavrulması işleminin yanı sıra, sıcaklık derecesinin ve uygulama süresinin akrilamid oluşum oranı açısından çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Surdyk'nin (28) çalışmaları göstermiştir ki, pişirilme işleminden önce hamurda asparajın yoğunluğunun artırılması, pişirilme sırasında ekmekte oluşan akrilamid miktarını önemli derecede artırmıştır. Buna karşılık asparajın oranının çok yoğun olduğu patates pişirme işleminden önce asparajınaz enzimiyle muamele gördükten sonra pişirildiğinde, akrilamid oluşumunun düştüğü görülmüştür. Besinlerin indirgen şeker ve amino asit içeriğine bakarak tercih edilmesi, pişirme esnasında oluşacak akrilamidin çok düşük seviyelerde kalmasını sağlayabilir.

2.1.3. Akrilamid'in Hemoglobin ve DNA ile Etkileşimi

Akrilamid'in kimyası ve metabolizması geniş bir şekilde araştırılmıştır (15). Akrilamid, karbon-karbon çift bağına Michael eklemeleri ile proteinlerin yapı taşları olan amino asitlerin tiyol gruplarıyla kimyasal olarak tepkimeye girerler. Akrilamid, akrilonitril içeren diğer vinil monomerlerinden daha az tepkiseldir. Akrilamidin bu kimyasal özelliği sayesinde hemoglobinin N-terminalinde bulunan valin amino asidine kimyasal olarak bağlanır. Hemoglobinin N-terminal valini ile akrilamid arasındaki bu etkileşim ve bağlanma reaksiyonu hem deney hayvanlarında (3) hemde insanlarda gözlemlenmiştir (29). Sıçan ve farelere akrilamid verilerek yapılan deneysel çalışmada, akrilamid-hemoglobin kompleksi oluşum düzeyinin sıçanlarda farelere göre önemli derecede yüksek olduğu ortaya konulmuştur (30). Bu durum farelerde sıçanlara göre, akrilamid → glisidamid dönüşümünün çok daha yüksek olduğunu göstermektedir.

İn vitro laboratuvar çalışmaları, akrilamidin DNA'nın adenin ve guanin bazlarının amino grupları ile de tepkimeye girdiğini ve çok sayıda farklı bileşiğin meydana geldiğini göstermektedir (Şekil 2.5.) (31). DNA üzerinde

meydana gelen bu genotoksik etkilerin, akrilamidden ziyade büyük oranda akrilamidin metaboliti olan glisidamidden kaynaklandığı ortaya konulmuştur (32). Fare ve sıçanlara akrilamid verilerek yapılan deneysel çalışmalarda, akrilamidden bol miktarda glisidamid oluştuğu ve glisidamidin bu hayvanların karaciğer, akciğer ve böbrek DNA'larının pürin bazları ile etkileşerek genotoksik etkiler meydana getirdiği gözlemlenmiştir (33,34).

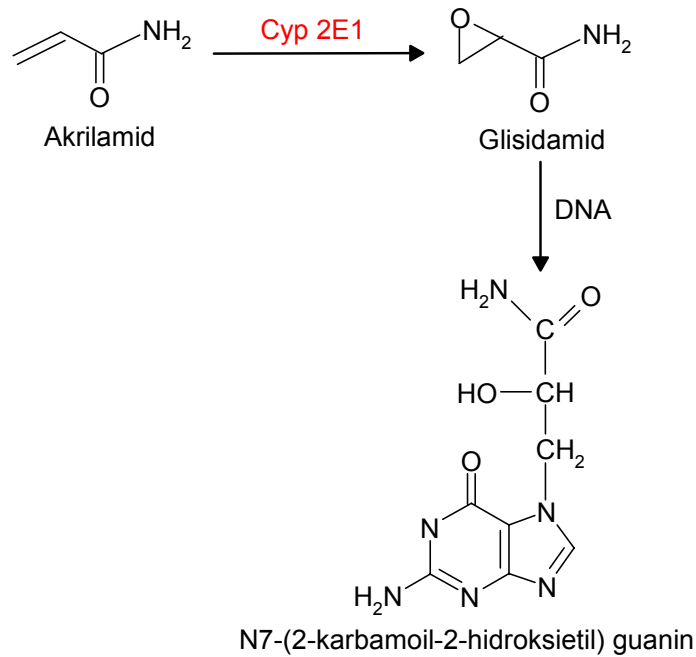


Şekil 2.5. Akrilamid ve Glisidamidin DNA ile etkileşimi sonucunda oluşan temel bileşikler (33,34).

Glisidamid verilen yetişkin farelerde glisidamidin DNA yapısında bulunan purin bazlarına bağlanma düzeyi, akrilamid verilen farelerden önemli oranda yüksek bulunmuştur. Neonatal fareler üzerinde yapılan çalışmalarda da, yetişkin farelerde gözlemlenen benzer sonuçlar elde edilmiştir (34).

Fare ve sıçanlara intraperitoneal olarak akrilamid-(^{14}C) enjekte edilerek yapılan bir çalışmada, DNA üzerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiş ve yoğun konsantrasyonda ve baskın olarak N7-(2-Karbamoil-2-hidroksietil) guanin yapısının olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca DNA'da meydana gelen bu değişikliğin akrilamidden ziyade glisidamidden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (33).

Yapılan başka bir araştırmada, farelere glisidamid verilmiş ve DNA'da meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Bu çalışmada glisidamidin DNA ile yoğun bir şekilde etkileştiği ve baskın olarak N7-(2-karbamoil-2-hidroksietil) guanin, N3-(2-karbamoil-2-hidroksietil) adenin ve N1-(2-karboksi-2-hidroksietil)-2'-deoksiadenosin şeklinde bazı değişikliklere yol açtığı ortaya konulmuştur (Şekil 2.6.) (34). Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, DNA üzerinde meydana gelen genotoksik etkinin akrilamidden ziyade glisidamidden kaynaklandığını göstermektedir.



Şekil 2.6. Akrilamidden glisidamid oluşumu ve glisidamid'in DNA ile etkileşimi.

2.2. AKRİLAMİDİN METABOLİZMASI

2.2.1. Akrilamidin Sindirim Sisteminden Emilimi

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler, akrilamidin mide ve barsaklar yoluyla çok hızlı ve etkili biçimde emildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, türler arasındaki emilim seviyelerinin farklılıklarının da altı önemle çizilmiştir. Örneğin köpeklerde ağız yoluyla verilen akrilamidin gastrointestinal emilimi çok hızlı bir şekilde gerçekleşirken domuzlarda gerçekleşen emilim köpeklere oranla oldukça yavaştır (35).

Akrilamidin emilim oranları, uygulama yöntemlerine (damar içi, sonda ve beslenme alışkanlıkları), zamana ve canlı türüne göre önemli derecede değişiklik gösterebilmektedir. Akrlamidin farelerdeki emilim oranı, akrilamidin sondayla uygulandığı durumlarda % 32-50, besinlerle verildiğinde ise % 23 olarak hesaplanmıştır. Sıçanlardaki emilim oranı ise, akrilamidin sondayla uygulandığında % 60-90 ve besinlerle verildiğinde ise % 28-47 olarak hesaplanmıştır (36-41)

Twaddle ve ark. (41) ile Doerge ve ark. (38) yaptıkları çalışmalarında fare ve sıçanlara oral yolla 50 mg/kg dozda akrilamid tatbik ettiler. Her iki çalışmada da maksimum plazma yoğunluğuna akrilamidde 30 dakikada, glisidamidde ise iki saatte ulaşılmıştır. Doerge ve ark. (37,38), yaptıkları deneysel çalışmalarında benzer protokolleri kullanarak akrilamidin fare ve sıçanlardaki toksikokinetik özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla erkek ve dişi fare ve sıçanlara 0,1 mg/kg akrilamid'i damar içi, sonda ya da oral yoldan tek doz olarak tatbik ederek akrilamidin serum ve dokulardaki toksikokinetik özelliklerini incelemişlerdir. Sıçanlarda akrilamidin en yüksek serum yoğunluğuna ulaşma süresi, uygulama tekniğine bağlı olarak damar içi uygulamada 15 dakika, sondayla uygulamada 1-2 saat ve gıda ile beslenmede 2 saat olarak tespit edilmiştir. Glisidamidin en yüksek serum yoğunluğuna ulaşma süresi ise, sonda ile uygulamada 2 saat, gıda ile beslenmede ise 4 saattir. Glisidamid/akrlamid oranı damar içi uygulamada en düşük, gıda ile beslenmede ise en yüksek seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. Fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalar, akrilamidin oral yolla

uygulanması sonrası büyük oranda emilime uğradını ve çok hızlı bir şekilde vücudun bütün dokularına dağıldığını göstermiştir.

Akrilamid'in insanlardaki emilimi konusunda, gönüllü insan denekleri üzerinde yapılmış olan sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Fennell ve ark. gönüllü insan denekleri üzerinde yaptığı çalışmada, gruplardan birine çeşitli dozlarda akrilamid içeren sudan içirmişler, diğer gruba ise akrilamid içermeyen su içirmişlerdir. Akrilamid tatbikini takip eden 24 saat içinde idrarda yapılan tetkiklerde, uygulanan dozun % 34'ünün idrarla atıldığı tespit edilmiştir. Birkaç gün devam eden serum ve idrar tetkiklerinden elde edilen sonuçlar, akrilamid'in bir bölümünün de hemoglobin ya da serum proteinlerine bağlanmış olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, emilimin aslında % 34'den çok daha fazla olduğunu ortaya koymuştur (42).

Fuhr ve ark. (43) insanlar üzerine yaptıkları çalışmalarında, gönüllülere 0,94 mg akrilamid içeren bir yemek yedirdiler. 72 saat sonra alınan idrar örneklerinin analizi, besinlerle uygulanan akrilamidin % 60'ının idrarla atıldığını göstermiştir. Konunun uzmanları, eldeki tüm bu bulguları değerlendirerek, besinlerle alınan akrilamidin emiliminin en yüksek düzeyde olduğu konusunda hemfikir olmuşlardır. İnsanlar üzerinde yapılan bu çalışmalarda, idrarla atılan akrilamid ve glisidamid metabolitleri analiz edilerek incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, insanlarda glisidamid oluşumunun farelerden 2 ya da 4 kat daha az olduğunu ortaya koymuştur.

2.2.2. Akrilamidin Deriden Emilimi

Ratlarda akrilamid'in deriden emilim karakteristiği, Sumner (44-46), Frantz (47) ve Ramsey (48) tarafından ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Akrilamidin gönüllü insan deneklerinde, deriden emilim çalışmaları Fennell (42) tarafından yapılmıştır.

Fennell yaptığı çalışmada, gönüllü insan deneklerinden iki grup oluşturmuştur. Gruplardan biri kontrol gurubu (0 mg/kg), diğeri ise 5 gönüllüden oluşan ve 3 mg/kg dozda % 50'lik akrilamid-(1,2,3-¹³C) solusyonunu uyguladığı gruptur. Bu gruba 3 gün boyunca temiz ve kuru cilt üzerine uygulama yapılmış ve her bir uygulama sonrası 24 saatlik periyotlar

halinde kan numuneleri toplanarak emilim miktarı hesaplanmaya çalışılmıştır. Uygulama bölgesi her uygulamadan önce iyice yıkanmıştır. Uygulanan total akrilamidin %65 ile % 71'inin yıkama sıvısında ve uygulama bölgesinde kaldığı görülmüştür. Uygulanan akrilamidin %25 ile %29'unun (3 günün ortalaması %26) deriden emildiği görülmüştür. Buda bize uygulanan akrilamidin günlük olarak 0,73 ile 0,86 mg/kg miktarında olduğunu ve 3 günün sonunda toplam 2,35 mg/kg olduğunu göstermiştir (42).

Sumner, radyoaktif işaretli akrilamidi 162 mg/kg dozda 4 erkek sıçana sıvı içinde deri yüzeyine uygulamıştır. Deri uygulaması sonrası yapılan radyoaktivite ölçümleri, uygulamaya tabii tutulan hayvanlarda akrilamidin deriden emilerek sistemik dolaşıma geçiş oranının %14-30 arasında olduğunu göstermiştir (46).

Frantz tarafından yapılan diğer bir deneysel çalışmada, %1 akrilamid- (^{14}C) içeren bir çözelti sıçanlara deriden tatbik edilmiştir. Uygulamayı takip eden 24 saatlik periyodun sonunda, radyoaktivitenin yaklaşık % 30'unun sistemik olarak emildiği ve emilime uğrayan akrilamidin %14'nün idrarda, % 7'sinin ölü dokuda, % 4'ünün deride, %1'den daha düşük kısmının ise dışkı, plazma ve kırmızı kan hücrelerinde biriktiği tespit edilmiştir. 24 saatlik radyoaktivite ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde, plazmadaki ^{14}C aktivitesinin deri uygulamasını takip eden 10. saatte zirveye ulaştığı ve hemen ardından hızla düştüğü gözlenirken, eritrositlerdeki radyoaktivitenin akrilamid uygulamasını takip eden 24. saatte bile en yüksek seviyeye ulaşamadığı görülmüştür. Yapılan bu farmakokinetik çalışma, akrilamidin plazma radyoaktivitesinin ortalama yarılanma ömrünün 15 saat olduğunu ortaya koymuştur (47).

Diembeck ve ark., akrilamidin deriden emilim oranını tespit etmeye yönelik olarak domuz derisine % 2 poliakrilamid içeren bir sıvı uygulamışlar ve tatbik edilen dozun yaklaşık olarak % 1,5'inin deri yüzeyinde, % 15'inin sert deride, % 6'sının epidermiste, % 44,6'sının dermiste ve % 32,3'ünün reseptörlerde bulunduğunu ortaya konulmuştur. 24 saat devam eden deri uygulaması sonrası yapılan analizler, uygulanan akrilamidin yaklaşık olarak

% 32'sinin emilerek sistemik dolaşıma geçtiğini, % 51'inin ise potansiyel olarak deri üzerinde bulunduğunu göstermiştir (49).

Akrilamid ve akrilamidin diğer bütün formlarının (poliakrilamid gibi) çok hızlı bir şekilde ve büyük oranda deriden emilime uğradığı kanıtlanmıştır (49). Akrilamidin deriden emilim oranları, uygulandığı vücut bölgesine göre büyük değişiklikler göstermektedir. Sıçanlarda dermal emilim oranları, akrilamidin uygulandığı deri bölgesine göre ortalama \pm % 60 oranında farklılık gösterirken, insanlarda bu oran yaklaşık olarak \pm % 25 civarındadır.

2.2.3. Akrilamidin Vücutta Dağılımı

Miller ve ark, akrilamid ve glisidamid düzeylerini incelemek için bir toksikokinetik çalışma yapmıştır. Bu çalışmada akrilamidin yarılanma ömrünün 1,7 saat, glisidamidin yarılanma ömrünün ise akrilamide göre çok daha uzun olduğu ortaya konulmuştur (40).

Hashimoto ve Aldridge (50) erkek albino sıçanlara damar yoluyla 100 mg/kg dozda radyoaktif işaretli akrilamid-(^{14}C) uygulayarak yaptıkları çalışmada; kan, plazma ve dokularda (beyin, omirilik, siyatik sinirleri, karaciğer ve böbrek) biriken radyoaktiviteyi ölçmüşlerdir. Analiz sonuçlarına göre en yüksek değerdeki radyoaktiviteyi kanda tespit etmişlerdir. En yoğun radyoaktivitenin kan dokusunda birikmesini, akrilamidin hemoglobine kompleks yapmasına dayandırmışlardır. Çünkü, kanda her 1 mol hemoglobine 4 mol akrilamid molekülü bağlanarak taşınabilmektedir.

Diğer bir deneysel araştırmada Sumner ve ark. sıçan ve farelerden oluşan iki gruba 6 saat boyunca 3ppm yoğunluğundaki akrilamid-(2,3- ^{14}C) ve akrilamid-(1,2,3- ^{13}C) karışımını solunum yoluyla uygulamışlardır. 24. saatte; uygulanan toplam radyoaktivitenin yaklaşık olarak % 56'sının sıçanların vücut dokularında, % 46'sının ise farelerin vücut dokularında biriktiği tespit edilmiştir. Sıçan dokularında ölçülen radyoaktivite düzeyleri en yüksekten en düşüğe doğru; kan > testis > deri > karaciğer > böbrek > beyin > dalak > akciğer > epididimis > yağ şeklinde sıralanmıştır. Fare dokularında ölçülen radyoaktivite düzeylerinin sıralaması ise; testis > deri > karaciğer > böbrek > epididimis > beyin > akciğer > kan > yağ şeklinde gerçekleşmiştir. Bu

sonuçlar, akrilamidin sıçan ve fare dokularına dağılımının çok farklı olduğunu açıkça göstermiştir (46).

Sumner ve ark., 24 saatlik bir süreçte üstü bir bezle örtülen yaraya 162 mg'lık akrilamid-(¹⁴C) tatbik ederek erkek sıçanlardaki akrilamid dağılımını ölçmeye çalışmıştır. Deri yüzeyindeki uygulama bölgesini hariç tutarsak tüm vücuttaki en yüksek radyoaktivite kan hücrelerinde (1 μmol/g) görülmüştür. En düşük radyoaktivite yoğunluğu yağda görülürken deri, karaciğer, dalak, testis ve böbrekte ise bu yoğunluk orta seviyede bulunmuştur (46).

İkeda ve ark., ufak domuzlar ile tazılar arasındaki akrilamid-(¹⁴C)'in doku dağılımını kıyaslamışlardır. Uygulamanın 6. saatinde domuzlardaki en yüksek radyoaktivite düzeyi kaslarda ve gastrointestinal dokularda gözlenirken, köpeklerde en yüksek radyoaktivite kas ve karaciğer dokularında ölçülmüştür. Hem köpeklerde hemde domuzlarda en düşük radyoaktivite değeri ise safra ve beyin dokularında tespit edilmiştir. Köpeklere akrilamid uygulamasının 6. saatinde gastrointestinal dokularda çok düşük düzeyde radyoaktivite ölçülmüş olması, köpeklerde akrilamidin oral yoldan uygulanmasını müteakiben sindirim sisteminden emiliminin çok hızlı olduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık akrilamidin oral uygulanmasını takip eden 2. günde yapılan radyoaktivite ölçümleri, domuzların sindirim sistemi dokularında yüksek düzeyde radyoaktiviteye rastlandığını ortaya koymuştur. İkeda ve ark. bu durumu, domuzlarda akrilamidin sindirim sisteminden emiliminin oldukça düşük düzeyde gerçekleştiği şeklinde yorumlamışlardır (35).

Erkek ve gebe farelere sonda yoluyla 120 mg/kg düzeyde radyoaktif işaretili akrilamid-(¹⁴C) tatbik edilmiş ve akrilamidin zamana göre doku dağılımı takip edilmiştir. Elde edilen veriler, akrilamidin sindirim sisteminden emiliminin uygulamayı takip eden 3. saatte büyük oranda gerçekleştiğini ortaya koynuştur. Erkek farelerde uygulamayı takip eden 24. saatte yapılan ölçümler akrilamidin karaciğer, pankreas, testis, beyin ve safra gibi dokulara dağıldığını göstermiştir. Erkek farelerin üreme sistemindeki radyoaktivite ölçümleri, uygulamayı takip eden 1. saatte radyoaktivitenin artmaya başladığını, 9. saatte üreme kanallarında ve epididimis başında yüksek

düzelere ulaştığını göstermiştir. Uygulamanın 3. ve 24. saatlerinde gebe fareler dekapite edilerek öldürülmüş, dişi fare ve fetusun çeşitli dokularında radyoaktivite ölçümleri yapılmıştır. 17,5 günlük fetüsün derisindeki yüksek radyoaktivite düzeyi hariç tutulursa, fetusun diğer dokularında ölçülen akrilamid düzeyleri anneye ait dokulara yakın değerlerde bulunmuştur. Araştırmacılar bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak, akrilamidin sindirim sisteminden (mide dahil) çok etkili ve hızlı bir biçimde emildiğini ve ardından karaciğer, böbrek ve pankreas yoluyla atılımının gerçekleştiğini söylemişlerdir. Ayrıca gebe farelerde akrilamidin plasentayı kolaylıkla geçerek fetusun dokularında da biriktiği konularında fikir birliğine varmışlardır (51).

Plasenta zarının akrilamide karşı geçirgenliğinin araştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada; gebe sıçan, tavşan, tazi ve minyatür domuzlara ağız yoluyla radyoaktif akrilamid uygulanmış ve her bir türün fetus dokularında akrilamid düzeyleri ölçülmüştür. Araştırma sonuçları dört tür arasında çok önemli bir farkın olmadığını göstermiştir. Ancak domuz fetuslarının beyin dokularında ölçülen akrilamid düzeylerinin, köpek fetuslarında tespit edilen düzeylerden çok yüksek olduğu tespit edilmiştir (52).

Miller ve ekibi (40); akrilamidin sıçanlardaki doku dağılımı üzerine yaptıkları çalışmada, 10 mg'lık akrilamid-(¹⁴C) çözeltisini damar içi yolla erkek sıçanlara tatbik etmişlerdir. Uygulama sonrası yapılan ölçümler, akrilamidin doku dağılımının en yüksek olduğu dokuların; kas (%48), deri (%15), kan (%12) ve karaciğer (% 7) şeklinde sıralandığını göstermiştir. Ölçümün her evresinde beyin, omurilik ya da siyatik sinirlerdeki akrilamid oranının sürekli %1'in altında olduğu gözlemlenmiştir.

Sıçanlara ağızdan ve damar içi yolla çeşitli dozlarda akrilamid-(¹⁴C) verilerek yapılan bir çalışmada, kırmızı kan hücrelerinde en yüksek radyoaktivite yaklaşık olarak uygulamayı takip eden 6. ve 12. saat aralığında ölçülmüştür. Uygulamanın 48. saatinde ise bu oran ilk ölçüme göre 90:1 olmuştur. Sıçanların kan dışı dokularında ölçülen radyoaktivite düzeyleri, kırmızı kan hücrelerine göre daha düşük olarak ölçülmüştür. 4-5 gün süreyle akrilamid uygulaması sonrası günlük radyoaktivite ölçümleri, kırmızı kan

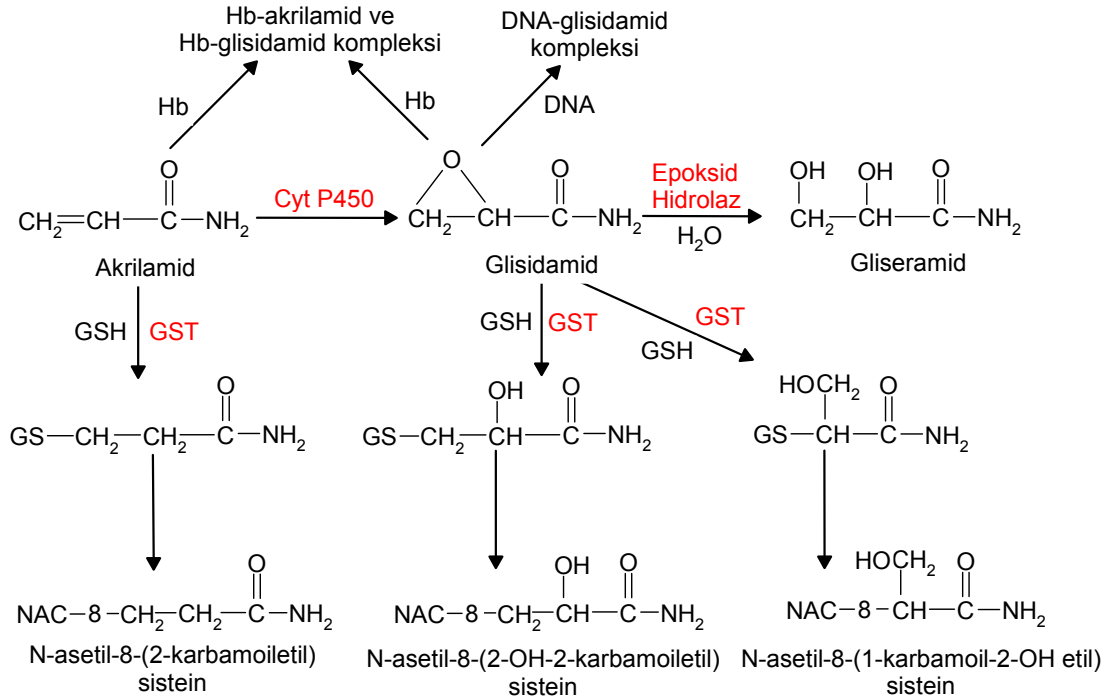
hücrelerindeki radyoaktivite düzeylerinin 1-400 µg/g-doku akrilamid olduğunu ortaya koymuştur. İncelenen diğer dokularda en yüksek radyoaktivite karaciğer, epididimis ve böbreklerde görülmüştür. Buna karşılık daha düşük radyoaktivite ölçümlerine ise beyin ve siyatik sinirlerde rastlanmıştır. En düşük radyoaktivite düzeyleri deri ve plazmada ölçülmüştür. Araştırmacılar, sıçanların akrilamidi hızla katabolize ederek idrar yoluyla vücut dışına atmaları nedeniyle, akrilamidin toksik etkilerinden diğer hayvanlara göre çok daha az etkilendikleri konusunda fikir birliğine varmışlardır (48).

2.2.4. Akrilamidin Vücutta Metabolize Edilmesi

Akrilamid metabolizması fare, sıçan ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarla incelenmiştir. Akrilamid nükleofillerle özellikle tiyolat anyonlarıyla, α-β doymamış amid, imid ve nitrillerle (örneğin akrilonitril, N-etil maleimid) reaksiyona girebilir. Tiyol grupları birçok biyolojik proteinlerin aktivite göstermesi için gereklidir. Ayrıca önemli indirgeyici ajan ve hücre sel antioksidanlardır. GSH hücrelerin başlıca tiyol reaktantıdır (24).

Akrilamidin temel metabolik yolları şekil. 2.7'de verilmiştir. Akrilamidin glisidamide dönüşümü ve sonrasında her iki yapının katabolizması glutatyona bağımlı enzimatik yolla gerçekleşmekte ve idrarla vücut dışına atılmaktadır. Akrilamidin başlıca atılım metaboliti, N-asetil-S-(3-Amino-3-okzopropil) sistein yapısıdır. Akrilamidin glutatyona oluşturduğu bileşiklerin oranı ya da okside olmasıyla oluşan glisidamidin yüzdesi hayvan türleri arasında önemli farklılıklar göstermektedir.

Glisidamidin okside grubu, genellikle akrilamidin çift bağına kıyasla hemoglobin ile daha yüksek derecede etkileşim gösterir (30). Yapılan çalışmalar, glisidamidin DNA ile etkileşim düzeyinin akrilamiddan 100-1000 kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (33).



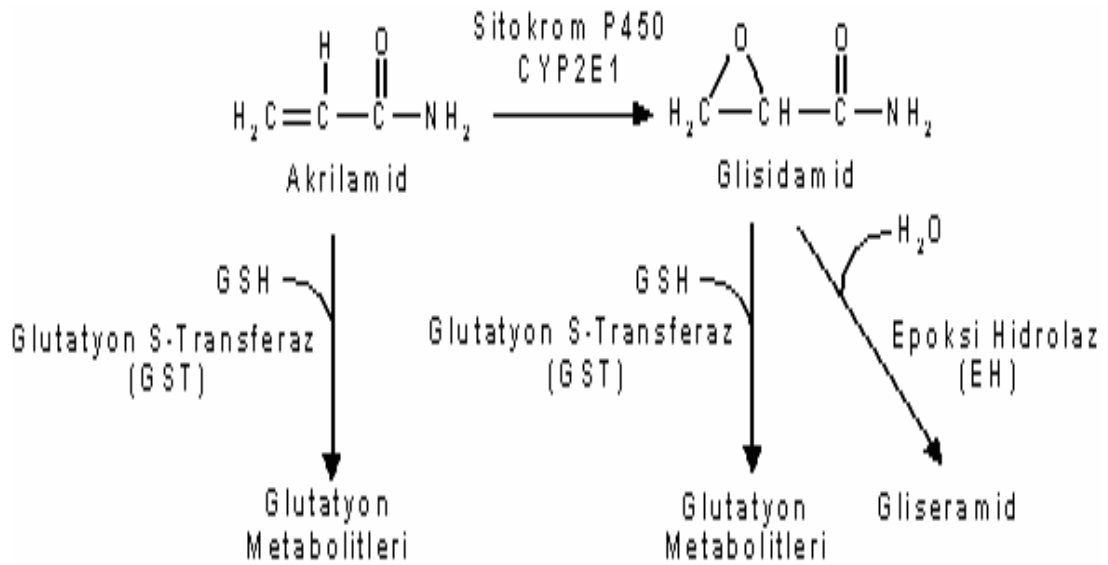
Şekil 2.7. Akrlamidin temel metabolik yolları (53)

Akrlamid, birbiriyle rekabet eden iki farklı enzimatik reaksiyonla yıkılıma uğrar. Akriamid, Glutasyon S-Transferaz tarafından redükte glutasyonla konjuge edilebildiği gibi, Sit P450 enzim sistemi ile de okside edilerek glisidamide dönüştürülebilir. Bu iki enzimatik reaksiyon, akrilamidi substrat olarak kullanma konusunda birbiri ile yarışır (54,55). Farelerde bu reaksiyon, yalnızca sit P450 2E1 tarafından gerçekleştirilir (45). Akrlamid, mide-barsaktan emildikten sonra kanda 1 mol hemoglobin molekülüne 4 mol akrilamid olacak şekilde karaciğere kadar taşınır ve burada iki metabolik yoldan birine dahil olur. Ya glutasyonla konjuge edilerek toksik olmayan bir glutasyon molekülü olan N-Asetil-S-(2-karbamoiletıl) sisteine dönüşerek zararsız bir şekilde idrarla atılımı sağlanır ya da karaciğerde bulunan sitokrom P450 enzim sisteminin CYP 2E1 enzimiyle oksidasyona uğrayarak daha toksik olan glisidamide dönüşür. Oluşan bu glisidamid kanda hemoglobine bağlı olarak dokulara kadar taşınabilir ve dokuların DNA'larına bağlanarak mutasyonlara sebep olabilir. Akrlamid glisidamide dönüştükten sonra redükte glutasyon (GSH) ile reaksiyona girerek glutasyon metabolitleri olan N-asetil-S-(2-hidroksi-2 karbamoiletıl) sistein ve N-asetil-S-(1karbamoil-

2-hidroksietil) sistein metabolitleri şeklinde detoksifiye edilir ve idrarla atılımı sağlanır. Glisidamidin izleyeceği diğer bir yol ise epoksid hidrolaz (EH)'la daha stabil bir metabolit olan 2,3-dihidroksipropionamid (gliseramid)'e dönüşerek vücut dışına atılmasıdır (Şekil 2.8).

Kirman ve ekibi tarafından oluşturulan modele göre akrilamid ve glisidamidin metabolizması karaciğerde gerçekleşmektedir. Hepatik akrilamid metabolizması 2 ana yolda gerçekleşmektedir (56).

1. Akrilamidin sitokrom P-450 enzimiyle glisidamide oksidasyonu (michaelis-menten kinetiğine uyar).
2. Glutatyon-S-transferaz (GST)'in akrilamidi redükte glutation (GSH) ile konjuge ederek N-asetil-S-(3-amino-3-oksopropil)-sisteine dönüştürmesi.



Şekil 2.8. Akrilamidin temel metabolik yolları

Fennel ve ark. (42), yaklaşık 3 mg/kg akrilamid- (^{14}C) içeren suyu gönüllü kişilere ağız yoluyla tatbik ederek yaptıkları araştırmalarında idrarla atılan akrilamid metabolitlerinin düzeylerini incelemişlerdir. İlk 24. saatte, uygulanan dozun % 34'ünün idrarla atıldığı tespit edilmiştir. İdrarla atılan bu metabolitin % 86'sının akrilamid-glutatyon kompleksi, %13,5'inin glisidamid-

glutasyon kompleksi ya da hidroliz metabolitleri, % 3'ünün ise serbest glisidamid olduğu ortaya konulmuştur.

Sit P450 2E1 geni eksik olan erkek farelere 1 hafta süreyle 50 mg/kg'lık dozda akrilamid-(¹⁴C) verilerek yapılan bir çalışmada (45), hayvanlar metabolik kafeslere konularak 24 saat boyunca idrar örnekleri toplanmış ve akrilamidin atılım ürünleri ölçülmüştür. Uygulanan akrilamidin günlük olarak % 50-70'inin idrarla atıldığı tespit edilmiştir. Akrilamide maruz kalan Sit P450 2E1 geni eksik olan farelerin idrarındaki metabolitlerin çok büyük kısmının akrilamid-glutasyon kompleksi şeklinde atılan metabolitlerden oluştuğu gözlenmiştir. Çünkü, Sit P450 2E1 eksik olan hayvanlarda akrilamidin glisidamide oksidasyonu meydana gelmemektedir.

Ghanayem ve ark. (57), benzer bir çalışmada; normal ve Sit P450 2E1 eksik olan iki grup fareye akrilamid tatbik ederek Sit P450 2E1'in akrilamid metabolizmasındaki rolünü araştırmıştır. Akrilamid, her iki gruba 50 mg/kg 'lık tek bir dozda damar içi yolla tatbik edilmiştir. Akrilamid ve glisidamidin fare grupları arasında plazma seviyeleri bakımında önemli farklar tespit edilmiştir. Sit P450 2E1 bakımından normal olan farelerin plazmalarında, Sit P450 2E1 eksik olan farelere göre çok daha yüksek düzeyde glisidamid düzeyleri gözlemlenmiştir. Yine DNA ve hemoglobinle etkileşim açısından da çok önemli farklar ortaya çıkmıştır. Akrilamid-hemoglobin kompleksinin düzeyleri, Sit P450 2E1 eksik farelerde, Sit P450 2E1 normal olan farelere göre, çok daha yüksek oranda gözlemlenmiştir. Glisidamid-hemoglobin ve glisidamid-DNA kompleksinin oluşum oranı ise Sit P450 2E1 normal olan farelerde çok yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Bu iki çalışmanın sonuçları, Sit P450 2E1'in akrilamidin yıkılımlında rol alan en önemli enzim olduğunu ortaya koymuştur.

Fare ve sıçanlara oral olarak 50 mg/kg dozda akrilamid-(¹⁴C) uygulanarak yapılan bir araştırmada (54), idrarla atılan akrilamid ve akrilamidin temel oksidasyon ürünleri incelenmiştir. Metabolik kafeste bakılan hayvanlardan 24 saatlik idrar örnekleri toplanmış ve temel atılım metabolitleri analiz edilmiştir. Sıçan ve farelerde, akrilamidin temel atılım ürününün akrilamid-glutasyon kompleksi olduğu tespit edilmiştir. Sıçanlarda idrarla

atılan metabolitlerin yaklaşık % 67'si, farelerde ise % 41'i akrilamid-glutasyon kompleksinden oluşmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan diğer araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (58). Akrilamidin ileri enzimatik basamaklarda oksidasyonu ile oluşan temel oksidasyon ürünleri ise N-Asetil-S-(3-amino-3-oksopropil) sistein, N-Asetil-S-(3-Amino-2-hidroksi-3-oksopropil) sistein, N-asetil-S-(3 amino-2-hidroksietil-3-oxopropyl) sistein, glisidamid ve 2,3-dihidroksipropionamid olduğu tespit edilmiştir. Akrilamidin glisidamid'e dönüşüm oranı türler arasında farklılıklar göstermektedir.

Akrilamidin glisidamide dönüşüm oranı, diğer hayvanlara göre farelerde en yüksek olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda, akrilamidin glisidamide dönüşüm oranının çok düşük olduğu görülmüştür. Sıçan, fare ve insanlar üzerinde yapılan araştırmalar, akrilamidin oksidasyonu sonucu oluşan en baskın metabolitin, N-asetil-S-(3-amino -3-oksopropil) sistein olduğu ortaya konulmuştur (40). Glisidamidin oksidasyonundan kaynaklanan ve idrarla atılan metabolitlerin glisidamide oranının sıçanlarda % 33, farelerde % 59 olduğu gösterilmiştir. Oral yoldan uygulanan akrilamidin sıçanlarda yaklaşık % 59'u, farelerde % 40'ı ve insanlarda % 86'sı idrarla vücut dışına atılmaktadır (42,54).

Farelere oral yoldan 100 mg/kg akrilamid verilmiş ve 2 ile 4. saatlerden hayvanlar dekapite edilerek çeşitli dokuların redükte glutasyon, Glutation S-transferaz (GST) aktivite ve aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) aktivite düzeyleri ile deri ve karaciğerin protein yoğunluğu ölçülmüştür (59). Uygulamayı takip eden 2. saatte dekapite edilen hayvanların deri ve karaciğer redükte glutasyon seviyelerinin, kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, % 37 ve % 61 oranında düştüğü gösterilmiş, GST aktivite düzeylerinde ise bir değişiklik meydana gelmemiştir. Yine 4. saatte yapılan ölçümler de, deri ve karaciğer redükte glutasyon düzeylerinin kontrol grubuna göre % 59 ve % 80 oranında azaldığı, GST aktivitesinin deride % 35, karaciğerde % 21 oranında düştüğü, AHH aktivitesinin ise deride % 73 ve karaciğerde % 58 oranında inhibe olduğu ortaya konulmuştur.

2.2.5. Akrilamidin Vücuttan Atılımı

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla, akrilamidin vücuttan en yoğun ve kolay atılım yolunun idrar olduğu ortaya konulmuştur. Akrlamid çeşitli yollarla hayvanlara uygulandığında, akrilamid ve akrilamid ürünlerinin % 40-70'inin idrarla, % 5-6'sının dışkıyla, % 6'sının solunum yoluyla ve % 15'inin safrayla atıldığı görülmüştür (48).

Sumner ve ark. (46), erkek fare ve sıçanlara 3 ppm yoğunluğundaki akrilamid-(¹⁴C)'i burundan teneffüs yoluyla 6 saat boyunca ya da 162 mg/kg dozda akrilamid-(¹⁴C)'i dermal yoldan uygulamışlardır. 24 saat boyunca idrar ve dışkı örnekleri ve solunum havası bir tüpte toplanmıştır. Total akrilamid-(¹⁴C) değerleri kıyaslandığında, sıçanlardaki değerlerin farelere göre 2,8 kat daha düşük olduğu görülmüştür. Bu uygulama sürecinde sıçanlara verilmiş olan tüm dozun yaklaşık % 42'si idrar ve dışkıda, % 2'si solunum havasında ve % 56 'sının ise tüm vücut dokularında biriktiği gözlenmiştir. Farelerde ise uygulanan dozun % 51'i idrar ve dışkıda, % 3'ü solunum havasında ve % 46'sı ise vücut dokularında tespit edilmiştir. 24 saat sonra yapılan radyoaktivite ölçümleri, en yüksek düzeylerin % 53 ile vücut dokularında ve % 36 ile idrarda olduğunu ortaya koymuştur. Bu araştırmacılar, sıçanlara teneffüs yoluyla verilen akrilamidin yaklaşık % 50'sinin emildiğini belirtmişlerdir.

Günde 500 gr patates kızartması ya da ekmek kızartması tüketen insanlarda yapılan analizler, idrarla atılan akrilamid miktarının 5 mg'a kadar yükseldiğini göstermektedir. Ancak bu çalışmada, 500 gr patates kızartması ya da ekmek kızartmasında ne kadar akrilamid bulunduğu bilgisi verilmemiştir (60).

Miller ve ark. (40), sıçanlarda akrilamidin idrar ve dışkıyla atılımı üzerine yaptığı çalışmada, ağızdan ya da damar yoluyla uygulama yapıldıktan 24 saat sonra idrarda gözlemlenen oran % 62 iken, 7. günde bu oran % 71 olarak ölçülmüştür. İdrardan alınan sonuçlara göre oral ve damar yolu uygulamalarının her ikisinde de gözlemlenen oranlar birbirine çok yakındı. Akrlamid-(¹⁴C) uygulamasını takip eden birkaç saat içinde alınan dışkı örneklerinde ölçülen akrilamid-(¹⁴C) düzeyi çok düşük; 24. saatte % 4,8

ve 7. günde ise % 6 seviyelerinde idi. Akrilamidin % 2'sinden daha azının bütünlüğü bozulmadan idrar yoluyla atıldığı tespit edilmiştir. Uygulamayı takip eden ilk 6 saatte, solunum havasında herhangi bir radyoaktiviteye rastlanmamıştır.

Kadry ve ark. (58), akrilamidin vücut dışına atılımı konusunda erkek sıçanlar üzerinde yaptıkları araştırmada, akrilamidin atılımını hesaplamaya çalışmışlardır. Plazmada en yüksek akrilamid seviyesine, uygulamadan 28 dakika sonra ulaşılmıştır. Akrilamidin plazmadaki yarılanma ömrü 15,6 saat olarak hesaplanmıştır. Kandan temizlenmesi ise bir yayılma fazı ($t_{1/2} = 7.93$ saat) ve bir de ayrılma fazı ($t_{1/2} = 374$ saat) olmak üzere iki basamaklı bir model olarak tanımlanmıştır. Akrilamidin kanda uzun süre varlığını sürdürmesi, hemoglobin molekülündeki sülfhidroksil parçacıklarıyla reaksiyona girmesinin bir sonucudur. İlk 12 saatte elde edilen idrar örneklerinin analizi, idrarın akrilamidin dışarı atılmasının en temel yolu olduğunu göstermiştir. İdrar ve dışkıyla atılan akrilamidin yaklaşık olarak % 61 ve % 4 oranında olduğu gözlemlenmiştir.

Sumner ve ark. (54); ratlara ve farelere damar içi yolla akrilamid uygulamışlar, uygulanan akrilamidin % 62'si 24 saat içinde idrarla vücut dışına atılmıştır. Bu oranın % 7'si glisidamid ve glisidamid metabolitlerinden kaynaklanmıştır. Aynı araştırmada, akrilamidin deriden uygulamasını takip eden ilk 24 saatte alınan idrar örneklerinde ise atılım oranının % 1,5 olduğu belirtilmiştir. Glisidamid olarak dışarı atılan metabolitlerin yüzdesi ise % 17 seviyesinde bulunmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada, akrilamid çeşitli dozlarda ağızdan uygulanmış ve 72 saat süreyle toplanan idrar örneklerinin analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları, uygulanan akrilamidin yaklaşık % 60'ının idrarla vücut dışına atıldığını göstermektedir. Aynı araştırmada, akrilamid hem damar içi hem dermal yoldan uygulanmış ve kandaki radyoaktivitenin yarılanma ömrünün 2 saat, tamamen vücuttan temizlenme süresinin ise 10 saat olduğunu tespit edilmiştir (48).

2.3. AKRİLAMİDİN TOKSİK ETKİLERİ

Akrilamid'in hayvanlarda kansere sebep olduğu ve belli dozların üzerine çıkıldığında, insan ve hayvan sinir sisteminde nörotoksositeye yol açtığı bilinmektedir. Farelerde yapılan araştırmalar; akrilamidin, gıdaların pişirilmesi sırasında oluşan diğer kanserojenlere benzer bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. İnsanlar için, gıdalardan kaynaklanan kanserojen ajanların etkileri çok iyi bilinmemektedir. Akrilamidin diyetle, diğer gıda kaynaklı kanserojenlere nazaran daha yüksek düzeylerde bulunması, akrilamidin kanserojen olabileceği şüphesini ciddi derecede artırmıştır (61).

Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar da, monomerik bir yapıya sahip olan akrilamidin hem sinir hemde üreme sistemlerinde hücresel hasara neden olduğu ve özellikle hormonal duyarlılığı olan dokularda tümör gelişimini artırdığı gösterilmiştir (2,62). İnsanlar üzerinde yürütülen epidemiyolojik çalışmalarda (63-70), gıda kaynaklı akrilamide yoğun olarak maruz kalan toplumlarda nörotoksitenin önemli oranda ilerlemiş olduğu ancak kanser riskinde böyle bir artışın olmadığı ileri sürülmüştür.

2.3.1. Akrilamidin Nörotoksitesisi

Hem insanlar hem de laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan deneyler, akrilamidin nörotoksik olduğunu göstermektedir (71-73). Elde edilen bulgular, akrilamidin sinir dokusunda etkilediği ilk yapının aksonlar olduğu ve bozulan işlevlerden dolayı sinir geçişlerinin zarar gördüğünü ortaya koymaktadır. Akrilamidin elektrofilik doğası gereği, sinirlerin yapısında bulunan belli başlı proteinlerdeki nükleofilik sülfidril gruplar ile etkileşerek sinirlerde ileti bozuklukları meydana getirir. Ayrıca akrilamidin tiyol grupları ile etkileşiminden kaynaklanan doku hasarlanmaları, üreme sorunlarına ve kansere yol açan patofizyolojide aktif olarak rol oynar.

Akrilamidin nörotoksik etkilerini inceleyen çalışmalar sıçan, fare, maymun, köpek ve kediler üzerinde yoğun olarak sürdürülmektedir (74-76). Bu çalışmalar, akrilamidin farklı doz protokollerinin özellikle oral ve damar içi uygulanması ve meydana gelen doku hasarlarının mekanizmalarının ortaya çıkartılmasına yönelik olmaktadır. Bazı çalışmalarda sinirsel dokulardaki

morfolojik ya da biyokimyasal değişiklikler incelenirken, bazı çalışmalarda sadece nörotoksisite incelenmiştir. Birkaç çalışmada ise akrilamid toksininin zamanla değişimi, biyokimyasal ve morfolojik parametreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Fullerton ve Barnes (74) sıçanlara akut ve subakut dozda akrilamid vererek yaptığı çalışmada, akrilamidin nörotoksik etkilerine bağlı olarak arka ayaklarda zayıflık, arka ayakları sürükleme ve kısmi felçlere neden olabileceğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada dişi sıçanlara 100 mg/kg ya da 203 mg/kg (LD50) dozda akrilamid verilmiştir. 203 mg/kg akrilamid uygulanan grupta 48 saat boyunca bir titremenin açıkça görüldüğü ve ayrıca bu sıçanların ya hemen iyileştikleri ya da 2-3 gün içinde öldükleri belirtilmiştir. Diğer grupta ise verilen ilk 100 mg/kg'lık dozdan sonra sıçanlarda titreme başlamış ve 24 saat sonra uygulanan ikinci dozdan sonra bünyede zayıflık, halsizlik ve devamında da 3 gün içinde ölümlerle sonuçlanan bir tablo ortaya çıkmıştır.

Fullerton ve Barnes (74) aynı araştırmada, erkek ve dişi sıçanlara 15 gün boyunca sonda yoluyla 50 mg/kg akrilamid uygulamışlardır. Bu işlem çok ciddi bünye zayıflığına yol açmış ve sıçanlar ölmüştür. Doz azaltılarak haftanın 5 günü 25 mg/kg akrilamid 20 seans uygulandıktan sonra bacak kaslarında gözle görülür bir zayıflık belirmiş ve ardından 28. dozdan sonra ise vücudun her yerinde ciddi zayıflıklar gözlenmiştir. Tam bir iyileşme ancak uygulama bittikten 4 hafta sonra gerçekleşebilmiştir. 3 dişi sıçana 10 mg/kg dozda akrilamidin 116 seans uygulanmasını takiben nörotoksisiteye ait hiçbir belirtiyeye rastlanmamıştır.

Akrilamidin nörotoksik etkilerini ortaya koymak amacı ile yapılan son 30 yıllık araştırmaların ortaya çıkardığı morfolojik bulgular, erken gelişen ve sinir terminallerinin hasarıyla sonuçlanan patolojik süreçte akrilamidin ciddi şekilde rol alabileceğini düşündürmektedir.

Goldsitein ve ark. (77) elektrofizyolojik çalışmalarında, akrilamidin kedilerde neden olduğu bozukluğun en erken belirtisinin sinir transmisyonunun zarar görmesi ve sonrasında sinaptik anormalliğe yol

açması şeklinde olduğunu belirtmişlerdir. Akrilamidin nörotoksik etkisinin primer olarak sinir terminallerinde yoğunlaştığı tespit edilmiştir.

LoPachin (78), akrilamidden kaynaklanan sinir tahribatını ortaya çıkarmak için gümüş boyama tekniğini kullanmıştır. Farelerden elde edilen gümüş boyama bulguları, günlük 50 mg/kg akrilamid uygulanması sonrası ciddi nörotoksisite bulgularının ortaya çıktığını, omirilik, beyincik ve beyindeki sinirlerin terminal uçlarının önemli derecede hasarlandığını tespit etmiştir.

Gold ve ark. (79), sıçanlara akut ve subakut dozda akrilamid uygulayarak aksonlardaki değişimi incelemişlerdir. Bu çalışmada, ağır sinir ileti bozulmasının genç hayvanlarda daha hızlı olması nedeniyle 3 haftalık sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlarda klinik olarak nörotoksisiteye dair belirgin hiçbir bulguya rastlanmamıştır. Akrilamid uygulandıktan 7 gün sonra hayvanlar kesilerek incelenmiş ve akrilamide maruz kalmış sıçanların vücudunun ön alt kısmında merkeze yakın bölgelerinde miyelinli aksonların sayısı ve yoğunluğunun artmış olduğu, küçük olan aksonların çaplarının ise oldukça büyümüş olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık merkezden uzak bölgelerde ise akson çaplarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Sinir ileti çalışmalarına bakıldığında, akrilamide maruz kalmış hayvanlarda sinir iletinin zamana göre kat ettiği mesafe anlamında önemsenmeyecek derecede bir düşüş gözlenmiştir.

Hem labaratuvar hayvanları hem de insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda akrilamidin nörotoksik etkilerinin kaslarda koordinasyon bozukluğu ve zayıflığı şeklinde de ortaya çıktığı görülmüştür (80-83). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, akrilamidin hem toksik etkisinin hemde kanserojenik etkisinin insan sağlığını önemli derecede etkileyebileceğini göstermektedir. Büyük insan kitlelerini sağlık yönünden etkilemesi beklenen gıda kaynaklı akrilamid sorununa çare bulmak amacıyla 20. Uluslararası Nörotoksikoloji Konferansında bu konu derinliğine tartışılmıştır (84). Bu kongrede akrilamidin nörotoksik etkileri ve neden olduğu nöropatinin mekanik anlamdaki mekanizması tartışmaların odak noktası olmuştur. Akrilamidin ve nörotoksisitenin insan sağlığı açısından kanıtlanmış bir risk olup olmadığını araştıran çok sayıda epidemiyolojik çalışmanın

sonuçları sunulmuştur. Yapılan bu tartışmalarda, deneysel ACR nörotoksitesinin kümülatif ve Haber'in kuralına uygun bir yapıda gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca akrilamidin, nöronların fonksiyonunu bozduğu ve bunun sonucunda da sinir terminallerini etkileyerek tahribat yaptığı fikri kabul görmüştür.

Yapılan bir çalışmada; 3-4 aylık dişi sıçanlara sondayla 100 mg/kg dozda akrilamid farklı zaman aralıklarında uygulanmış, erken dönemde hayvanların arka ayaklarında gevşeklik ve tutmama gibi belirtiler ortaya çıkmıştır (74). Uygulanan doz aralığı uzadığında belirtilerin daha geç geliştiği tespit edilmiştir. Hayvanlar, ilaç verme işlemi kesildikten 3 hafta sonra iyileşmeye başlamışlardır. Aynı araştırmacılar akrilamidin nörolojik etkilerinin yaşla bağlantısını incelemişler, 5 ve 8 haftalık sıçanlar hafif derecede etkilenirken (bacak zayıflığı gibi) 26 haftalık sıçanlar ciddi şekilde ve en yaşlı (52 haftalık) sıçanlar ise ancak 3 hafta sonra ciddi olarak etkilenmişlerdir.

Hasimoto ve ekibi (85), akrilamide maruz bırakılmış farelerde meydana gelen nörotoksik etkileri araştırmak için çalışmalar yapmışlar ve nörotoksite belirtilerinin 2-3 hafta içinde oluştuğunu not etmişlerdir. Akrilamid verilen hayvanlarda ortaya çıkan arka ayak zayıflığı ve kaslardaki koordinasyon bozukluğu fenobarbital verilmesiyle tamamen ortadan kaldırılmıştır.

Akut akrilamid uygulanan hayvanların rotor performansını incelemek için yapılan araştırmada Schotman (86), yüksek dozda akrilamid uygulanan hayvanların rotor performans sonuçlarının önemli derecede düşüş gösterdiğini ortaya koymuştur. Daha düşük dozlarda akrilamid uygulandığında ise herhangi bir etki gözlenmemiştir

Hayvanlarda yapılan çalışmalara ek olarak mesleki ya da farklı zehirlenme vakalarıyla akrilamide maruz kalmış işçilerde de nörotoksite görülmüştür (82,87). Hayvanlarda görülen nörotoksitite (arka ayakların eğriliği ya da rotor performansında değişiklik gibi), biyokimyasal değişimler (iyon seviyelerinin, bazı sinirlerde bulunan enzimlerin ya da nörotransmitterlerinin azalması gibi) ya da morfolojik değişimler (histopatolojik incelemelerde görülen değişiklikler) incelenmiştir. Akrilamid, benzer dozlarda ve sürelerde

test edildiğinde insanlarda da benzer nörotoksik bozukluklar oluşturduğu anlaşılmıştır (76,88-90).

Fare ve sıçanlara periton içi akrilamid verilerek yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (86).

2.3.2. Akrilamidin Genotoksitesisi

Akrilamid ve metabolitleri hem genotoksik (mutajenik) hemde kanserojendir. Bu iki etkisiyle ilgili olarak memelilerde yapılmış olan çok sayıdaki araştırma da, akrilamidin memeliler için genotoksik ve kanserojen olduğunu ortaya koymaktadır (91,92). İnsanlarda glisidamid oluşumunun çok düşük düzeylerde gerçekleşmesi nedeniyle akrilamidin insanlar üzerindeki mutajenik etkisi hayvanlara göre oldukça düşüktür.

Akrilamidin insanlarda 2A grubu bir kanserojen olduğunu belirten Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC), bu kararını akrilamidin kemirgenlerin üreme ve somatik hücrelerinde yaptığı kromazomal anormalliklere ve gen mutasyonlarına dayandırmıştır (93). Ayrıca laboratuvarında hücre kültüründe yapılan çalışmalarda da akrilamidin gen mutasyonları ve kromazomal anormallikler yaptığı görülmüştür (94).

Son zamanlarda yapılan birçok çalışma (34,45,92), akrilamid'in canlılarda genotoksik olduğunu ve genotoksitesinin akrilamidden ziyade glisidamidden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Hayvanlara verilen glisidamidin aynı dozdaki akrilamidden daha mutajenik olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada glisidamid ya da akrilamid ile muamele edilen hücreler, kendiliğinden mutasyona uğrayan kontrol hücrelerinden daha fazla A→G geçişleri ve G→C tranversion'ları göstermişlerdir. Glisidamid ile muamele edilen hücrelerde G→T transversion'ları çok daha yüksek düzeylerde gerçekleşmiştir. Bilim adamları, akrilamidin insan ve fare hücrelerindeki mutajenitesinin, akrilamid metabolitleri ve glisidamidin DNA ile yaptıkları promutajenik bağlanma kapasitesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir (34,95).

2.3.3. Akrilamidin Kanserojenik Etkisi

Akrilamid, fare ve sıçanlar için kanserojendir. Akrilamidin içme suyu veya diğer yollarla uzun süre verilmesi, her iki türde de çeşitli organlarda tümör gelişmesine neden olmaktadır (2,62,96). Akrilamid, farelerde alveol kaynaklı akciğer tümörlerinin gelişim oranını artırır. Dermal uygulamadan sonra deri tümörlerinin oluşumunda da bir artış gözlenmiştir. Sıçanlarda yapılan bu akrilamid uygulaması testis, tiroid ve memeyele ilgili tümör oluşumunu tetiklediğini ortaya koymuştur.

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada (62); hipofiz ve klitoral salgı bezlerinin adenoması, ağız boşluğunun papilloması, rahmin adenokarsinoması ve böbreküstü bezine ait tümörlere rastlanmıştır.

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

Akrilamid içeren gıdalarla beslenen toplumlar ve mesleklerinden dolayı akrilamide maruz kalan işçiler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, akrilamidin insanlarda kanser riskini arttırdığına dair tutarlı ve kesin bir delil bulunamamıştır (63,65,67). Yüksek miktarda akrilamide maruz bırakılan işçilerde pankreas kanseri insidansı ikiye katlanmış, fakat tutarlı bir maruz kalma-etki ilişkisi saptanamamıştır (65) .

Çeşitli avrupa ülkelerinde kanser oranları üzerine yapılan çalışmalar, akrilamid içeren yiyecek ve içeceklerin tüketimi ile böbrek, kalın bağırsak, idrar kesesi, ağız boşluğu, yutak, gırtlak, yemek borusu, göğüs ve yumurtalığı kapsayan çeşitli yerlerdeki kanser oranları arasında direkt bir ilişki olmadığını göstermiştir (68,70,97) .

2.3.4. Deney Hayvanlarında Yapılan Kanserojenite Çalışmaları

Farelerde ve sıçanlarda akrilamid'in kanserojenitesi ile ilgili birçok çalışma 1980'lerde yayımlanmıştır. Sıçanlarda iki yıllık bir çalışmayı ve farelerde daha kısa süreli birçok çalışmayı içeren bu deneylerde akrilamid,

çeşitli yollarla sistemli bir şekilde verildiği zaman hem farelerin (1,98), hem de sıçanların (2) çeşitli dokularında tümörlere neden olmuştur.

Akrilamid, vucuda girdikten sonra oksidasyona uğrayarak genotoksik bir metabolit olan glisidamide (55) dönüştürülür. Akrilamidin memeli dokularında genotoksik bir metabolit olan glisidamide dönüştürülmesi ve fareler ile sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli dokularda tümör oluşturması akrilamidin 1994'te Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından "muhtemelen insanlar için kanserojen (Grup 2A)" olarak değerlendirilmesine neden olmuştur (94).

Yapılan çalışmalar, önce akrilamidin hayvan yemlerinin (3) yüksek sıcaklıkta pişirilmesi esnasında önemli miktarlarda oluştuğunu daha sonra ise insan yiyeceklerinde de yüksek ısıda pişirilen kızartma ve fırıncılık ürünlerinde yüksek miktarlarda ortaya çıktığını tespit etmiştir. Svensson ve ark. yaptıkları bu çalışmada, yüksek sıcaklık derecelerinde pişirilen gıdalarda bol miktarda akrilamid oluştuğunu ortaya koymuş ve kanserojenik risk değerlendirmelerine yeni ve beklenmedik bir boyut kazandırmıştır (99).

Yapılan bir çalışmada, yiyeceklerin pişirilmesi esnasında özellikle bir amino asit olan asparagin ile glukoz gibi şekerler (13,14) arasındaki Maillard reaksiyonu sonucunda akrilamidin oluştuğu gösterilmiştir. Gıda kaynaklı akrilamidden dolayı insanlarda oluşabilecek olası kanser risklerini saptamak için geniş toplum kesimini içine alan çok sayıda epidemiyolojik çalışma planlanmış ve bir kısmında yapılmaya başlanmıştır.

Akrilamidin akciğer tümörü gelişimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, erkek ve dişi farelere sondayla çeşitli dozlarda akrilamid verilmiş, hayvanlar yedi ay sonra dekapite edildiğinde, akciğer adenoma'lı farelerin sayısında ve fare başına akciğer adenomaları sayısında doz ile alakalı önemli bir artış olduğu saptanmıştır (96).

Yapılan başka bir çalışmada, 8 haftalık 16 erkek ve 16 dişi fareye vücut ağırlıklarına göre çeşitli dozlarda akrilamid uygulanmıştır. Uygulama periton içine sekiz hafta boyunca haftada üç defa olacak şekilde yapılmıştır. Ayrıca bir de kontrol grubu oluşturulmuştur. Akrilamid uygulaması, en yüksek doz seviyesinde (60 mg/kg) hayvanlarda nöropati ve düşük hayatta kalma

yüzdesine neden olmasından dolayı bitirildi. Diğer gruptaki hayvanlar uygulamayı takip eden 6. aya kadar yaşadılar, ancak 6. ayın sonunda dekapite edildiklerinde erkeklerdeki akciğer adenoma gelişim oranlarının doza bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir (96).

Yapılan başka bir çalışmada 5–6 haftalık erkek ve dişi sıçanlara, iki yıl boyunca içme suyunda akrilamid verilmiş ve çalışmanın sonunda en yüksek dozu alan heriki cinsiyetten hayatta kalan hayvan sayısı oldukça azalmıştır. Erkeklerde tiroid bezi ile testis tümörü oranlarında ve dişilerde meme, merkezi sinir sistemi, tiroid bezi, ağız boşluğu, rahim ve klitoral salgı bezi tümörlerinin oranlarında da önemli artışlar tespit edilmiştir (2).

Yang ve ark. (61), akrilamid verilen sıçanların testislerinde meydana gelen toksik etkileri araştırmış ve akrilamidin sperm kalitesini etkilediğini ve sperm konsantrasyonunu azalttığını görmüşlerdir. Ayrıca histopatolojik incelemeler de, testislerde çok sayıda histopatolojik değişiklik şekillendiğini ve toksik etki nedeniyle çok sayıda Leyding hücrelerinin öldüğünü, sperm noksanlıklarının ve çeşitli histopatolojik anormalliklerin meydana geldiği ortaya konulmuştur.

2.3.5. Gıda Kaynaklı Akrilamide Maruz Kalan İnsanlarda Yapılan Çalışmalar

Akrilamidin besinlerle vücuda alınışı konusunda İsveç, Hollanda, Norveç ve diğer Avrupa ülkelerinde çok sayıda çalışma yapılmış ve sonuçları yayınlanmıştır (99-101). Bu çalışmalar, yiyeceklerdeki akrilamid miktarının ürüne ve hazırlama şekline göre büyük değişiklikler gösterdiğini ortaya koymuştur.

Hollanda'da 344 yiyecek maddesi üzerinde yapılan bir araştırmada, yiyeceklerin içerdiği akrilamid miktarının 30-3100 mg/kg arasında değiştiği tespit edilmiştir (100). Gıda kaynaklı akrilamidin vücuda alınım miktarları konusunda yapılan araştırmalar, bir çok toplumda yetişkinlerde günlük ortalama 0.5 mg/kg akrilamidin vücuda alındığını göstermektedir (99,100).

Çeşitli yiyecek ve içeceklerin tüketimiyle alınan günlük akrilamid miktarları ve çeşitli organlarda kanser gelişim riskini inceleyen çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Akrilamid kaynaklı kanser gelişim riski olan organlar;

böbrek, kalın bağırsak, idrar torbası, ağız boşluğu, yutak, yemek borusu, gırtlak, göğüs ve yumurtalıklar olduğu belirtilmiştir (62,102).

Mucci ve ark, 591 kalın bağırsak kanseri, 213 idrar torbası kanseri, 133 böbrek kanseri ve 538 sağlıklı kontrolleri içeren 51–77 yaşlarındaki İsveçli kadın ve erkekte oluşan deneşler üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Bu kontrol çalışması, aslında kızarmış yiyeceklerde açığa çıkan heterosiklik aminler tarafından oluşturulan kalın bağırsak ve üriner sistem kanserleri arasındaki olası bir ilişkiyi araştırmak için yapıldı. İsveç Ulusal Yiyecek Yönetimi tarafından besinlerle alınan akrilamidin seviyeleri değerlendirilmiş ve yüksek (300-1200 mg/kg) veya ılımlı (30-299 mg/kg) akrilamid içeren gıdaların bu kanserlerden herhangi biri için yüksek bir risk taşımadığı ileri sürülmüştür (103).

Hagmar ve Törnqvist (104), Mucci ve diğerlerinin (103) bulduğu sonuçların güven verdiğini söylemişlerdir. Ancak bu konuda bir hata yapmamak adına, önemli miktarlarda akrilamide maruz kalan insanlar üzerinde yapılan çalışmaların sonuçlarını değerlendirmede çok dikkatli olunması gerektiği konusundaki kaygılarını vurgulamışlardır. Çünkü yiyeceklerin hangi sıklıkta tüketildiği ve yiyeceklerdeki akrilamid miktarları çok iyi bilinmemektedir. Üstelik günlük olarak alınan akrilamid miktarının tam olarak tespit edilmesinin çok güç olması bu kaygıları artırmaktadır. Örneğin, yüksek oranda akrilamid içeren yiyecekleri tüketen İsveç nüfusunun tahmini % 2'lik kısmında kanser riskiyle ilgili bir artışın tespit edilmesi bu kaygıyı desteklemektedir.

Pelucci ve ark. (105) İtalya ve İsviçre'de 1991–2000 yılları arasında yürüttükleri çalışmalarında, kızarmış/haşlanmış patatesin kanser riski ile ilişkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada takip edilen ve kanser gelişme olasılığı olan dokular; ağız boşluğu ve yutak (749 olay, 1772 kontrol), yemek borusu (395 olay, 1066 kontrol), gırtlak (527 olay, 1297 kontrol), kalın bağırsak (1225 kolon ve 728 rektum olayı, 4154 kontrol), meme (2569 olay, 2588 kontrol) ve yumurtalık (1031 olay, 2411 kontrol) idi. Yapılan bu çalışmada, düşünülen bütün kanser çeşitlerinin oluşması bekleniyordu. Akrilamid girişi en düşük olanından (0 porsiyon/hafta) en yüksekine(>1

porsiyon/hafta) kadar tüm olasılık oranları 0,8 ve 1,1 arasında ayarlandı. Yaş, cinsiyet veya alkol ve tütün kullanımıyla ilgili etkileşime dair hiçbir kanıt bulunamadı. Pelucci ve ark. (105); elde ettikleri verilerin ışığında, kızarmış ya da haşlanmış patates tüketimi ve kanser riski arasında önemli bir ilişkinin olmadığını ve daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen bulguları doğruladığını söylediler.

Beer ve ark. (106), Pelucci ve ark. (105)'nin yaptığı çalışmadaki sınırlılıklara dikkat çekmişler, özellikle toplam akrilamid girişinin tahmininde kızarmış/haşlanmış patateslere farklı yiyeceklerin dâhil edilmemesi ve pişirme esnasında patateslerin hazırlanmasında esmerleşme derecesinin tanımlanmasının ihmal edildiğini belirtmişlerdir.

İsviçre'deki çalışmalar, kahvenin günlük akrilamid girişinin %36' sını oluşturabileceğini, dolayısıyla düşük miktarda kızarmış patates tüketen ağır bir kahve tiryakisinin, hiç kahve içmeyen ama haftada iki porsiyon kızarmış patates tüketen birinden önemli ve yüksek akrilamid girişine sahip olabildiğini göstermiştir. Derin yağda kızartılmış patateslerde oluşan akrilamid miktarı kızarmış patatesin rengi ile doğru orantılıdır ve 20-1000 mg/kg arasında değişebilmektedir.

Mucci ve ark. (107) tarafından İsveç halkı üzerinde yapılan böbrek hücre kanseri çalışmasında; yiyeceklerin alım sıklığı verileri, ulusal yiyecekler ile kahve, gevrek ekmekler ve kızarmış patatesler gibi yüksek oranda akrilamid içeren yiyecekler çalışmaya dâhil edilerek günlük akrilamid girişini hesaplamışlardır. Tahmin edilen günlük akrilamid girişi ve kanser riski arasında hiçbir ilişki bulunamamıştır. Bu araştırmacılar çalışmanın sonuçlarını, böbrekle ilgili hücre kanseri riski ve beslenmeyle ilgili akrilamid arasında hiçbir ilişkinin bulunmadığı şeklinde yorumlamışlar ve daha önceki çalışmalarla (103,105.) paralellik gösterdiğini belirtmişlerdir.

2.3.6. Akrilamide Mesleki Açından Maruz Kalan İnsanlar Üzerindeki Çalışmalar

Akrilamid, önemli endüstriyel bir monomerdur ve 1950'lerin ortasından beri çok geniş bir ticari kullanım alanı bulmuştur. Akrilamid, büyük bir ölçekte

imal edilmektedir (1990'ların başında Japonya, ABD ve Avrupa'da yıllık 50000–77000 ton). Bu bileşik, mesleki yönden başka bir monomer olan vinil kloride (1) maruz kalan fabrika işçilerinde olağan dışı kanserlerin, özellikle 1970'lerin başlarında karaciğerin anjiyosarkomasının rapor edilmesinden sonra, deney hayvanlarında kanser çalışmalarında kullanılmaya başlanılmıştır.

Mesleki açıdan akrilamide maruz kalan işçilerdeki kanser riskinin epidemiyolojik değerlendirme sonuçları 1980'lerde ortaya çıkmıştır. Monomer üretiminde ve polimerizasyon endüstrisinde akrilamide maruz kalan işçiler arasında iki büyük grup oluşturuldu ve bu işçilerdeki kanser riski değerlendirildi. Bu işçilerde, kanser oluşumu ile akrilamide maruz kalma arasında bir bağlantı bulunamamıştır (63,108).

2.3.7. Kanserojenik Risk Değerlendirmeleri

Geniş kapsamlı yapılan kanser çalışmalarında; akrilamid miktarları ile hemoglobinin yapısında bulunan valin amino asidi ile akrilamid ve glisidamid bağlanmaları arasındaki doz-etki ilişkileri ve kanserojenik risk değerlendirmeleri konusunda bir takım bilgiler elde edilmiştir (42). Genelde genotoksik kimyasallar için (109) ve belirli yerlerde akrilamid için (110,111) kanser riski tahminine yönelik çeşitli modeller önerilmiştir. Yapılan çalışmalarda, akrilamidin glisidamide metabolik dönüşümü kanserojenik süreçte kritik bir adım olarak kabul edilmekte ve bu dönüşümün akrilamidin genotoksik etkileri için çok önemli olduğu söylenmektedir.

Ruden (112), 1976-2002 yılları arasında çeşitli uzman grupları tarafından yapılan 14 kanserojenik risk değerlendirme çalışmasının sonuçlarını karşılaştırmıştır. Bu başarılı çalışmalardan bazıları şöyle sıralanabilir; Alman MAK Komisyonu tarafından 1985 ve 1990 yıllarında yapılan 2 çalışma, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından 1986 ve 1994'te yapılan 2 çalışma (93,113), Amerikan Devlet Endüstri Hijyenistleri Birliği (ACGIH) tarafından 1991 ve 2001'de yapılan 2 çalışma (114,115), The Arbetsmiljöinstitutet Kurumunca (AMI) 1992 yılında yapılan 1 çalışma, ve Avrupa Komisyonunun 2002'de yaptırdığı 1 çalışmayı örnek

olarak sayabiliriz. Bu 14 değerlendirmede adı geçen altı kuruluş ile İsveç Milli Kimyasal Kontrol Otoriteleri (116) ve Molak (117), şu şekilde bir sonuca varmışlardır: Akrilamid deney hayvanlarında kanserojendir ve insanlarda da kanserojen olduğu muhtemeldir. Amerikan Çevre Koruma Ajansı tarafından içme suyundaki akrilamid için yapılan değerlendirmeler (118), Amerikan Ulusal Toksikoloji Programı tarafından akrilamidin “insanlar için muhtemelen kanserojen” olarak listelenmesi (119), Norveç Yiyecek Kontrol Otoritesi (120) ve Dybing ve Sanner ile Konings ve diğerlerinin kanser risk değerlendirme sonuçları da, yukarıda adı geçen 14 kuruluşun yaptığı değerlendirmeyle paralellik göstermiştir (100,101).

Akrilamidin kanserojenik bir tehlike olduğu konusunda birçok uluslararası düzenleyici kurumun hemfikir olmasına rağmen, FAO ve WHO'nun ortak görüşü ise: İnsan risk miktarlarını hesaplamak için kullanılan teorik modeller ve özellikle de herhangi bir pozitif epidemiyolojik bulgu olmadan akrilamidin kanserojen olduğu kanısına varmanın mümkün olamayacağıdır (5).

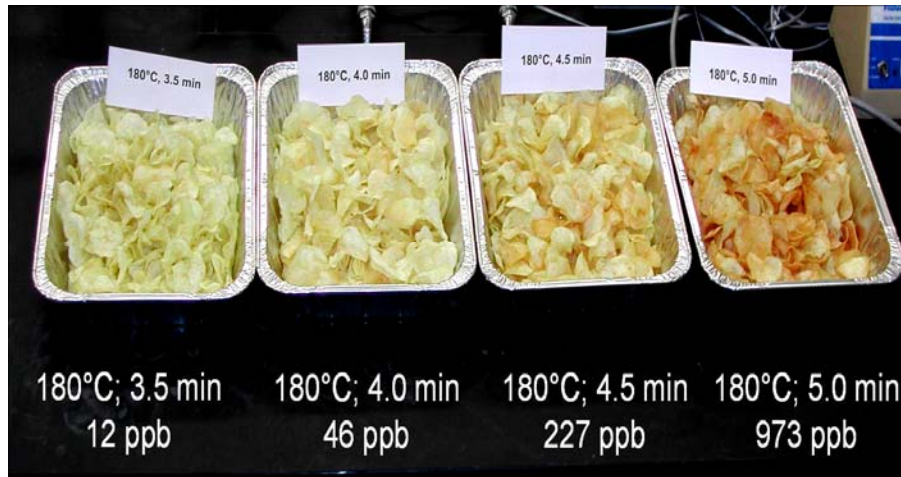
2.4. GIDALARDA AKRİLAMİD OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Halen, akrilamidin gıdalarda nasıl oluştuğuna dair bilgi ve anlayış çok azdır ve bilinen şu ki; 120 °C'nin üzerindeki sıcaklık derecelerinde pişirilmiş veya işlem görmüş bazı gıdalarda tabii olarak oluşmaktadır. Gıdalarda akrilamid oluşumunu etkileyen faktörler; sıcaklık derecesi, yüksek sıcaklıkta bekletme süresi ve ortamın pH'sı olarak sıralanabilir. Gıdaların işlem gördüğü sıcaklık dereceleri ve bekletme süreleri ile oluşan akrilamid miktarlarının artış gösterdiği rapor edilmiştir (121). Bu konuyla ilgili olarak patatesin; 160 °C'de 4 dk., 170 °C'de 4 dk., 180 °C'de 4 dk. kızartılması işleminde sırasıyla 27, 70 ve 326 ppb düzeyinde akrilamid oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 2.9.). Ayrıca 180 °C'de 3.5, 4, 4.5 ve 5 dk süreyle kızartılan patateslerde sırasıyla 12, 46, 227, 973 ppb düzeyinde akrilamid oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 2.10.). Sıcaklık derecesi ve bekletme süresi arttıkça oluşan akrilamid miktarında artış göstermektedir.

Bugüne kadar yapılan gıda analizleri, en yüksek akrilamid oluşumunun nişastalı (patates ve mısır gevreği, patates kızartması, tost edilmiş ekmek, bisküvi, kraker ve cips gibi) ürünlerde meydana geldiğini göstermiştir.



Şekil 2.9. Patatesin, farklı sıcaklık derecelerinde bekletilmesi ve akrilamid oluşumu (121)



Şekil 2.10. Patatesin 180 °C'de farklı sürelerde bekletilmesi ve akrilamid oluşumu (121)

2.5. AKRİLAMİDİN GIDALARDAKİ SINIR DEĞERLERİ

Akrilamid, toksik etkilerinin başlangıç konsantrasyonlarının tam olarak bilinemediği kimyasallar grubunda değerlendirilmektedir. Akrilamidin de yer

aldığı bu grup kimyasal maddeler, çok düşük konsantrasyonlar da dahi bir risk taşırlar ve bunlar için tamamen zararsız denmesi mümkün değildir. Vücuda alınan akrilamid miktarı arttıkça ve maruz kalınan süre uzadıkça oluşan hastalık riskide o oranda artış göstermektedir.

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

Amerikan gıda ve ilaç dairesi (U.S. FDA) 2002 yılından beri periyodik olarak her yıl piyasadan örnekleme şeklinde aldığı gıda maddelerinde akrilamid ölçümleri yapmakta ve bu sonuçları kendi Web sitesinden kamuoyuna duyurmaktadır (6). Örnek olması bakımından Tablo 2.1'de FDA'nın 2002 yılında yapmış olduğu gıda analizlerinin sonuçları verilmiştir.

Tablo 2.1. Çeşitli gıdalarda bulunan akrilamid değerleri (6)

ÜRÜN ADI		AKRİLAMİD (ppb)
Bebek Gıdaları	Gerber Tender Harvest Organic Sweet Potatoes	121
	Beech Nut Stage 2 Vegetables & Chicken	75
	Gerber Finger Foods Biter Biscuits	130
	Nabisco Arrowroot Biscuit (baby food)	113
Patates Kızartması	Arby's french fries	252
	Burger King french fries (çeşitli ürünleri)	197-369
	Checkers french fries (çeşitli ürünleri)	257-407
	KFC french fries (çeşitli ürünleri)	117-313
	McDonald's french fries (çeşitli ürünleri)	155-497
Patetes Cipsi	Good Health Natural Foods Olive Oil Potato Chips Plain	385
	Lay's Classic Potato Chips (çeşitli ürünleri)	257-549
	Kettle Chips Lightly Salted Natural Gourmet Potato Chips	1265
	Lay's WOW! Original potato chips	415
Proteinli Gıdalar	Checkers Chicken Pieces	22
	Boca Burgers Grilled Vegetable burgers (baked)	116
	Worthington Veja-Links (microwaved)	ND

**Tablo 2.1. Çeşitli gıdalarda bulunan akrilamid değerleri (6)
devamı**

	ÜRÜN ADI	AKRİLAMİD (ppb)
Ekmek ve fırıncılık Ürünleri	Pepperidge Farm Dark Pump Pumpnickel (toasted)	364
	Pepperidge Farm Original White Bread (toasted)	216
	Sara Lee Plain Mini Bagels (toasted)	343
	Boboli Italian Pizza Crust (not baked)	33
Tahıllar	General Mills Cheerios	266
	General Mills Lucky Charms	176
	Kellogg's Corn Flakes	77
	Kellogg's Corn Pops	71
	Kellogg's Raisin Bran	156
Çerezler (Cips dışındakiler)	Good Health Natural Foods Honey Dijon Mustard Julienne Potato Stix	1168
	Snyder's of Hanover Veggie Crisps	832
	Terra Stix	990
Salça ve Baharatlar	Heinz Home Style Savory Beef Gravy (canned)	ND
	McCormick Turkey Gravy Mix	ND
	Colgin Natural Hickory Liquid Smoke	54
	Colgin Natural Pecan Liquid Smok	151
Fındıklar	Blue Diamond Roasted Salted Almonds	236
	Blue Diamond Smokehouse Almonds	457
	Planters Smoked Almonds	339
Kraker	Red Oval Farms Mini Stoned Wheat Thins	26
	Dare Breton Thin Wheat Crackers	300
	Keebler Town House Crackers Reduced Fat	130
	Wasa Original Crispbread Fiber Rye	504
Çikolatalı Ürünler	Droste Cocoa	ND
	Ghirardelli Unsweetened Cocoa	316
	Hershey's Cocoa	909
	Nestle Nesquik Chocolate Flavor	45
Kahve	Maxwell House Slow Roast (ground, not brewed)	209
	Super G Instant Coffee (powdered, not brewed)	188
	Folgers Classic Decaf Coffee Crystals (crystals, not brewed)	351
Dondurulmuş Sebzeler	Hanover Premium Petite Asparagus Spears	<10
	Hanover Blue Lake French Style Green Beans	<10
Kurutulmuş Gıdalar	Knorr Taste Breaks Soup Chicken Noodle Flavor	22
	Lipton Asian Side Dishes Teriyaki Noodles	34
	Lipton Recipe Secrets Onion Soup & Dip Mix	1184
Sütlü Ürünler	Grace Sweetened Condensed Milk	ND
	Carnation Malted Milk Original	43
Diğerleri	Fuddruckers Onion Rings	13
	Kraft Quick Cooking Minute Tapioca	<10

Türkiye’de çok dar çerçevede de olsa benzer bir çalışma yapılmıştır. Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu’nun (TÜBİTAK) Marmara Araştırma Merkezi araştırmacılarından Hülya Ölmez ve ekibi tarafından yapılan bu araştırmada (122) tesadüfi yöntemle ev yemekleri, kavrulmuş çerezler, ekmek ve fırıncılık mamülleri, cipsler, kahve, bisküvi, kraker, çikolata, bebek mamaları, patetes kızartmaları, geleneksel Türk tatlıları, pekmez, ızgara, kebab, döner ve köfte gibi geleneksel gıdalardan örnekler alınmıştır. 9 ay süren çalışmasının sonunda bu gıda ürünlerinin akrilamid düzeyleri tespit edilmiş ve dikkat çekici sonuçlar çıkmıştır. Dr. Hülya Ölmez’in yaptığı bu araştırmanın sonuçları Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Ölmez ve ark.’nın gıda kaynaklı akrilamid analiz sonuçları

GIDA MADDESİ	AKRİLAMİD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Pirinç pilavı	Ölçülebilir değerin altında
Tahin helvası	Ölçülebilir değerin altında
Kebab,döner,ızgara	Ölçülebilir değerin altında
Çavdar Ekmeği	Ölçülebilir değerin altında
Beyaz ekmek (kabukta)	40-160
Kızarmış ekmek (hazır)	200
Hazır çorbalar	40-60
Tulumba tatlısı	40-45
Bebe bisküvisi	400-600
Bisküvi	70-130
Kraker	70-200
Kahvaltılık gevrekler	80-350
Ekmek	40-160
Kızarmış ekmek	90-1430
Sade kek	150-400
Zencefilli kek	1070-1410
Bisküviler	260-1450
Krakerler	180-420
Çeşitli fırıncılık ürünleri	230-3200
Kahvaltılık tahıllar	30-1400
Bebek bisküvileri	150-610
Patetes kızartması	330-3700
Kahve (bir bardakta)	25

Cips, kraker, kahvaltılık gevrekler, bisküvi ve bebe bisküvileri ile patates ve ekmek kızartmalarında yüksek miktarlarda akrilamid maddesi tespit edilmiştir. Tulumba tatlısı ve beyaz ekmeğin kabuğunda da kayda değer miktarda akrilamid bulunduğu ortaya konulmuştur. Ancak ekmeğin iç kısmında, ızgara, döner, tahin helvası, çavdar ekmeği, baklava ve pilavda ise akrilamid düzeyleri ölçülebilir değerlerin altında bulunmuştur. Dr. Hülya Ölmez ve ark., yüksek düzeyde akrilamid içeren gıdaların insan sağlığını tehdit etmesi nedeniyle yasaklanması ya da bu gıdaların ambalajlarına “insan sağlığına zararlı akrilamid maddesi içerir” uyarı yazısının konulması gerektiği yönünde görüş bildirdiler (122).

2.6. GIDA KAYNAKLI AKRİLAMİDEN KORUNMA YOLLARI

120 °C'nin üzerindeki sıcaklık derecelerinde kızartılmış veya pişirilmiş yiyeceklerde yoğun miktarlarda akrilamid oluştuğu tam olarak ispat edilerek ortaya konulmuştur (10). Ancak, 120 °C'nin altındaki sıcaklıklarda haşlanarak hazırlanmış gıdalarda ise akrilamid oluşmadığı tespit edilmiştir (12). Bu nedenlerden dolayı gıdalar hazırlanırken uzun süre çok yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmamalı ve aşırı derecede kızartılmamalıdır. Ancak bilhassa et ve et ürünleri, gıda zehirlenmelerine sebep olan bakterileri öldürmeye yetecek şartlarda pişirilmelidir. Akrilamid konusunda yapılan çalışmaların sonuçlarına dayanarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Tarım Örgütü (FAO), insanları akrilamid toksikasyonlarından korumak için yüksek sıcaklık derecelerinde kızartılmış ve yağlı gıdaların (akrilamid içeriği yüksek) mümkün olduğunca tüketilmemesini, beslenmede sebze ve meyve ağırlığının artırılması gerektiğini tavsiye etmektedirler (5).

Avrupa Sağlık Komisyonu (European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General) akrilamid konusunda yapılan araştırmaların sonuçlarını da göz önüne alarak, gıdaların akrilamid içeriğini azaltmak amacıyla üretici ve tüketicilere bazı tavsiyelerde bulunmuştur (123).

Yüksek sıcaklıklarda kızartılarak tüketilen patates, gıdalar içersinde en yüksek akrilamid içeren ürün olarak bilinmektedir. Patates kızartmalarında

akrilamid oluşumunu artıran en önemli faktör patatesin şeker içeriğidir. Bu nedenle patates ürünlerinin hazırlanmasında;

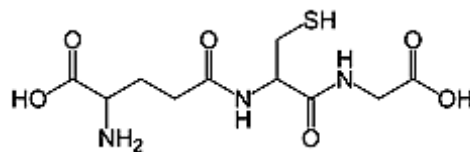
- 1- Şeker içeriği düşük yeni patates türlerinin geliştirilmesi,
- 2- Kızartma işleminden önce patateslerin beyazlatılması, pH seviyesinin düşürülmesi ve nem oranının yükseltilmesi,
- 3- Evde yapılan patates kızartmalarında, patateslerin kahverengi yerine altın sarısı renk alana kadar yağda bekletilmesi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

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

2.7. TEZ ÇALIŞMASINA DAHİL EDİLEN PARAMETRELER HAKKINDA GENEL BİLGİ

2.7.1. Glutasyon Metabolizması

Glutasyon non protein tiyol olup hücrenin antioksidan savunmasında görev alır. Aktif gurubu sistein kalıntısındaki tiyol (-SH) grubudur (Şekil 2.11.). Tüm organlarda özellikle karaciğerde sentezlenir ve tüm memeli dokularında bulunur (124).



Şekil 2.11. GSH'ın moleküler yapısı

Memeli hücrelerinde bulunan GSH, milimolar konsantrasyonda iken (0,5-10 mM) plazmada bu oran mikromolar konsantrasyonda'dır. Total GSH'ın çoğu sitozolde (%85-90) bulunurken geri kalanı ise (%10-15) mitokondri ve diğer organellerde bulunur. Bazı durumlarda mitokondride sitozoldeki oranlara ulaşıldığı görülmüştür (125). Mitokondride GSH

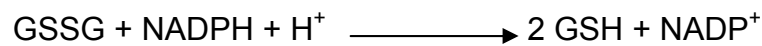
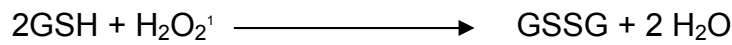
sentezleyen enzimlerde eksiklik oluştuğunda sitozolden alınarak devamlılığı sağlanır (126).

Hücrelerde total glutatyon, serbest veya proteinlere bağlı (%15) olarak bulunur. Serbest glutatyon çoğunlukla redükte formda bulunur ve oksidatif stres anında okside forma dönüştürülür. Hücrelerde redoks halinde okside ve redükte formların oranı (GSH/GSSG) kritik öneme sahiptir. Normalde memeli hücrelerinde, glutatyon redoks çifti 1-10 mM konsantrasyon aralığında bulunur ve redükte glutatyon, okside forma göre daha üst seviyededir. Hücre dinlenme halindeyken bu oran 100'ü aşarken oksidatif stres modellerinde bu oran 10 ile 1 mM'a düşer (127).

Organlar arası GSH sirkülasyonunun devamlılığını sağlayan en önemli organlar karaciğer ve böbrektir. Fakat dalak, lens, eritrosit ve lökositler tarafından da kısmen sağlanır (128). Geri dönüşümü olmayan hücre hasarı meydana geldiğinde, hücredeki GSH içeriği devamlılığını kaybeder. Biyolojik kompartmanlarda GSH'ın çeşitli değerlerde ölçülmesi çeşitli patolojik durumların anlaşılması için önemli bir parametredir (129).

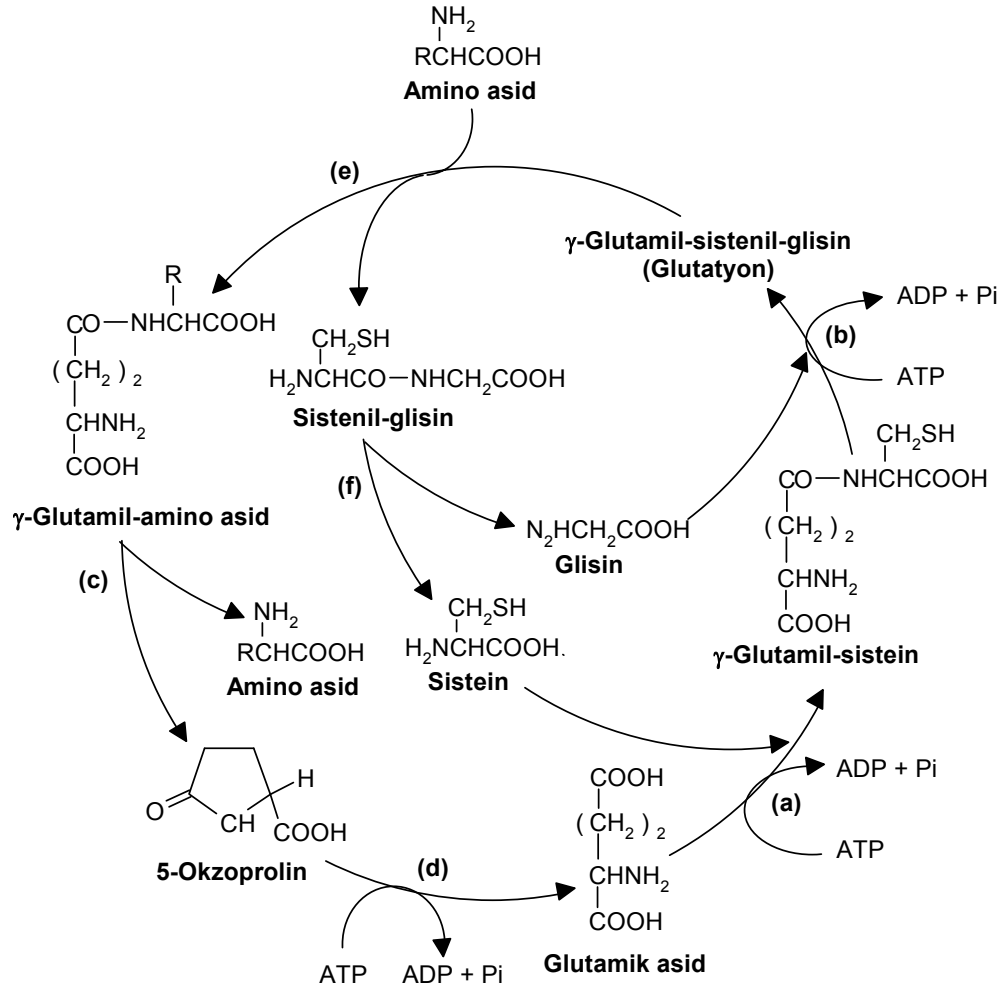
Glutatyon, birincil olarak ROS'a karşı engelleyici olarak görev alır. Bu amaçla serbest radikalleri süpürür ve H₂O₂'yi azaltır.

Hücrelerde oksidatif stresin etkisiyle oluşan hidrojen peroksit (H₂O₂), glutatyon peroksidaz (GSH Px) enzimi ve GSH'ın etkisiyle suya yıkımlanır. Ancak redükte glutatyon (GSH), okside glutatyon (GSSG) dönüşür. Okside glutatyon daha sonra glutatyon redüktaz (GR) ile GSH'a dönüştürülür.



Glutatyon bağımlı enzimler, hücrelerin korunmasındaki ikinci basamağı oluştururlar. Bunlar serbest radikallerin yayılmasını engelleyeceği gibi ROS tarafından üretilen ürünlerin detoksifikasyonunu da sağlarlar. GSH bağımlı proteinlerin çoğu antioksidan ajanlar tarafından indüklenerek oksidatif stres anının aşılmasını sağlarlar. Glutatyon S-Transferaz enziminin birçok pro-oksidan ajan tarafından indüklendiği görülmüştür (130).

Glutasyon hücrede altı enzim serisinin katalizlediği reaksiyonlarda, γ -glutamilsistein sentetaz (GCS) ve Glutasyon sentetaz (GS)'in etkisiyle sentezlenir. Bu reaksiyonlar γ -glutamil döngüsü (131,132) olarak isimlendirilir (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Glutasyon metabolizması. (a) Glutamilsistein sentetaz; (b) glutasyon sentetaz; (c) γ -glutamil siklotransferaz; (d) okzoprolinaz; (e) γ -glutamil transpeptidaz; (f) peptidaz (133).

Glutasyon, merkezi sinir sisteminin fonksiyonu için önemlidir. γ -glutamil döngüsünde defekt olan hastalarda zekâ geriliği ve diğer beyin defektleri meydana gelmektedir (124).

Glutasyon sentezlenmesindeki birinci basamak γ -glutamil sistein sentetaz enziminin katalizlediği reaksiyon olup hız sınırlayıcı basamaktır.

Glutasyon konsantrasyonuna bağlı olarak feedback inhibisyonla kontrol edilir. γ -GCS, heterodimer yapıda olup katalitik aktiviteden sorumlu ağır subünite (katalitik subünite, GCS_h) ve enzimin glutamat için K_m 'inin düzenlenmesi ve feedback inhibisyondan sorumlu hafif subünite (regülatör subünite, GCS_i) olmak üzere iki üniteden oluşur. Heriki subünite pro-oksidant ajanlar (tert-butilhidroquinon ve β -naftoflavon) tarafından indüklenir.

İkinci basamak γ -glutamil sistein dipeptidine glisin eklenmesiyle gerçekleşir ve glutasyon sentetaz tarafından katalizlenir. Bu basamakta ürün inhibisyonu yoktur, fakat doku spesifik salınım söz konusu olup ençok böbrekte bulunmuştur.

Glutasyon, γ -glutamil transpeptidaz enzimi aracılığıyla enzime bağlı olarak belli hücrelere taşınır. γ -glutamil transpeptidaz enzimi, γ -glutamil amino asit ve sisteinil glisin oluşumuna önderlik eder. Daha sonra ise dipeptidaz ile sistein ve glisine ayrılır. γ -glutamil amino asitleri, intraselüler enzim γ -glutamil siklotransferaz enziminin substratı olup bu enzim tarafından serbest amino asitlere ve 5-okzoprolin'e dönüştürülür. 5-okzoprolin, glutamat oluşturmak için tekrar döngüye döner. 5-okzoprolin ve glutamat arasındaki denge nötral pH'da döngünün devamlılığı yönündedir, ancak bunun için enerjiye gereksinim vardır (134,135).

γ -glutamil transpeptidaz enzimi, dokuların epitellerinde bulunur ve çoğunlukla transportta (nefron, koroid pleksus, jejunum) görev alır (136). Bu enzim hücre membran yüzeyinin dış kısmında lokalize olurken glutasyon intraselüler (137) olarak bulunur. Bu nedenle glutasyonun transportu γ -glutamil döngüsünün önemli bir basamağını oluşturur.

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

Böbreklerde kullanılan glutasyonun büyük kısmı organın kendi iç döngüsünden, böbrek hücrelerinden tubullere transfer edilerek karşılanırken geri kalan miktar plazmanın glomerular filtrasyonu ile karşılanır (138).

Glutasyon birçok fizyolojik role sahiptir ve hücre fonksiyonunda önemli görevleri vardır. Amino asitlerin transportu, proteinlerin ve nükleik asitlerin sentezinde, enzimlerin aktif formlarının devamlılığında, heksoz mono fosfat yolunun düzenlenmesinde, radyasyon ve endotoksinlere maruz kalmalarda bunlara karşı koruyucu etkisi vardır. Ayrıca septik ve kardiyojenik şokun önlenmesinde de görevlidir. Glutasyon transhidrojenasyon reaksiyonlarına katılarak diğer moleküllerin (Koenzim A, çeşitli enzimler ve proteinlerin) sülfidril gruplarının devamlılığını ve yapısının korunmasını sağlar. Birçok reaksiyon için redükte kapasiteye sahiptir ve hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Çeşitli ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görevli olup bunlarla etkileşerek markaptürik asit olarak dışkı ve idrarla atılmasını sağlarlar (130).

2.7.2. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-transferaz (GST) enziminin izoenzimleri bakterilerden insana kadar bütün organizmalarda bulunmaktadır. Glutasyon S-transferaz enzim sistemleri, ksenobiyotikler ile hücrelerde oluşan endojen toksinlerin yok edilmesinde veya değişime uğratılmasında önemli rol oynayan Faz II metabolizması enzimlerindedir (139). Hücre sitozolünde bulunan GST enziminin primer yapısını oluşturan amino asit zincirine göre alfa, mu, pi, sigma, theta, zeta ve omega olmak üzere yedi izoenzimi bulunur. Ayrıca memeli hücrelerinde bunlardan farklı olarak mitokondriyal GST olan kapa izoenzimi de bulunur (140).

Glutasyon S-transferaz enzimi, farklı bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bu özelliğini spesifik olmayan hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin varlığına ve çok sayıda izoenziminin bulunmasına borçludur. Bu sayede GST enzimi; birçok kanserojenik bileşiği, çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanabilmektedir. GST, ksenobiyotik için ve GSH için birer bağlanma bölgesi taşıyan iki protein alt birimine sahip bir dimerdir (141).

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

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

Son yıllarda yapılan çalışmalarda GST'nin Pi izoenziminin akciğer tümörogenezinde önemli rolü olduğu ortaya çıkmıştır ve insan akciğerinde en fazla bulunan GST izoenzimidir. GST Pi1 en çok insan akciğerinin bronşiol epitelyumundaki Clara hücrelerinde bulunur (142). Aynı şekilde GST Pi1'in fare akciğer dokusuna lokalize olduğu görülmüştür (143). GST Pi1'in, sigara tütününde bulunan kimyasalları (polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi) detoksifikasyona uğrattığı görülmüştür (144,145). Ayrıca sigaranın sitotoksik etkisini inhibe etmek için insan akciğer fibroblastlarında GST Pi1 sentezinde çok fazla miktarda artış olduğu görülmüştür (146). Yapılan bir epidemiyolojik çalışmada bilinen akciğer subtiplerinde GST Pi1 geninde polimorfizm olduğu gösterilmiştir (147,148).

Glutasyon S-transferaz, faz II ksenobiyotik metabolizmasında çok önemli rol oynamaktadır. Genelde GST'nin aktivitesi, Sit P450'nin katalizlediği tepkimeleri takip etmektedir. Bu enzimler, akrilamid gibi elektrofilik merkezli ksenobiyotikler ile nükleofilik GSH'ı konjuge ederek bu maddelerin detoksifikasyonunu gerçekleştirirler. GSH ile moleküler olarak işaretlenen bu ksenobiyotik konjugatlar, ilaç taşıyıcı proteinler aracılığıyla hücreden uzaklaştırılmak üzere faz III metabolizmasına dahil edilirler. Hücre dışına atıldıktan sonra ksenobiyotik-GSH konjugatının γ -glutamil ve glisin rezidüleri, γ -Glutamil Transpeptidaz (γ -GT) ve Sisteinilglisin Dipeptidaz ile yapıdan uzaklaştırılır. Ksenobiyotiğin açığa çıkan bu sisteinil formu, *N*-asetilasyon tepkimelerine uğrar ve ksenobiyotiğin idrarla atılan formu olan markaptürik aside dönüştürülür (149).

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

konjugasyon oluşturduktan sonra çok daha aktif bir forma dönüşür ve omurgalılarda özellikle böbrek dokusunda ana bileşiğe oranla çok daha ciddi hasarlar oluşturabilmektedir (150).

GST, hidroksialkenaller, bazı propenaller (lipid peroksidasyonu yıkım ürünleri) ve hidroperoksitler gibi endojen bileşikleri de detoksifiye ederek antioksidan etki göstermektedir. GST'nin peroksidaz aktivitesi selenyum-bağımlı değildir, fakat GSH'a şiddetle gereksinim duymaktadır (149).

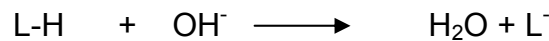
2.3.3. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonu çoğunluğu reaktif elektrofillerden oluşan çeşitli kompleks ürünler açığa çıkarır. Bu ürünlerin çoğunluğu DNA ve proteinlere bağlanarak toksik ve mutajenik etkiler meydana getirirler (151).

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

Serbest radikaller diğer moleküllerle birçok yolla reaksiyona girerler (152,153). Eğer iki radikal ajan bir araya gelirse elektronlarını paylaşırlar ve kovalent olarak birbirine bağlanırlar. Hücrelerde bulunan birçok molekül radikal değildir. Ancak radikaller ile elektron alışverişinde bulunduğu anda kendileride radikal bileşiklere dönüşürler. Lipid peroksidasyonu buna uyumlu en iyi örnektir.

Hidrojen atomu bir proton ve bir elektrona sahiptir. Bu nedenle radikal olarak isimlendirilir. Yüksek reaktif radikaller ($\cdot\text{OH}$ gibi) sıklıkla biyolojik moleküllerin hidrojenlerini ayıracak şekilde saldırırlar. Lipid peroksidasyonunun açığa çıkarılma mekanizmalarından biride budur (153).



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

yapıcı moleküllerin birikmesini engelleyici tamir sistemiyle bu bileşiklere karşı koruma sağlarlar (152).

$\cdot\text{OH}$ radikali çok reaktif bir türdür, bütün biyolojik moleküllere saldırabilir ve böylece serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatır (152,154) OH^- radikali organizmada iki şekilde oluşur. Ya H_2O_2 ile metal iyonlarının transisyon reaksiyonuyla ya da suyun iyonize radyasyonla fizyona uğramasıyla oluşur (155).

O_2^- ve H_2O_2 radikalleri $\cdot\text{OH}$ radikaline göre daha az reaktiftirler (152,155). Fakat tamamen zararsız da değildirler. Eğer fazla miktarlarda oluşursa belli hücrelerde direk hasara sebep olabilirler. Buna ilave olarak O_2^- , birçok hücre tarafından (özellikle fagositler ve damar endotel hücreleri) üretilen NO (Nitrik oksid) ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuna sebep olurlar (156). Peroksinitrit toksik etkiye sahip olmasının yanı sıra (-SH grubunun güçlü oksidanıdır) aynı zamanda OH^- vermek üzere ayrışır (157).

Aerobik organizmalarda fazla O_2^- 'nin süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından O_2 ve H_2O_2 'ye dönüştürülmesi önemli bir fizyolojik antioksidan koruma mekanizmasıdır (155). H_2O_2 birçok metabolik fonksiyona sahiptir. H_2O_2 , hücre membranını kolaylıkla geçer ve spesifik proteinlerin tiyol guruplarını okside ederek hücre içi olayların başlamasını tetikler (152).

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

Lipid peroksidleri, yüksek ısıda hoş olmayan tat ve kokuya sahip ürünler (keton, asitler ve aldehytler) oluşturmak üzere ayrışır (158,159). Yüksek sıcaklıkta lipid peroksidlerinin ayrışması insan kanındaki proseslerde mümkün değildir. Çünkü çoğu lipid peroksidi 37°C 'de metal iyonlarının yokluğunda stabildirler.

Peroksidatif yol boyunca reaktif ara ürünler yoluyla aldehytler (MDA ve 4-hidroksinonenal), pentan ve etan, 2,3 trans konjuge dienler, isoprostanlar ve kolesteroloksidler gibi son ürünler şekillenmektedir. Aldehytler, lipid

hidroperoksidlerinin yıkımı sırasında daima oluşurlar ve birçoğu biyolojik olarak aktiftir. Bunlardan en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenal'dir (160). Oluşan bu ürünler kolayca difuze olarak hücrenin diğer bölümlerinde hasara yol açarlar. Oluşan bu aldehitlerden MDA, membran doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun bir işareti olup, lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir (161). MDA ve 4-hidroksinonenal gibi aldehitler, hücrede bulunan DNA ve proteinlerle çapraz bağlar oluşturarak onların fonksiyonlarını bozarak bir takım bozukluklara sebep olurlar.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Bu araştırmada, analitik saflıkta olan N-asetilsistein, redükte glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, ksantin oksidaz, ksantin, 5,5, ditiyo 2-nitrobenzoik asit, laktat dehidrojenaz (LDH), redükte NADP, FAD, nitro blue tetrazolyum (NBT), 1-kloro 2,4 dinitrobenzen, sığır serum albumini (BSA), triton-x, brij-35, low melting point agarose (LMP), normal melting point (NMP) agarose, calcium chloride, dimetilsulfoksit (DMSO), ethidium bromide, *N*-laurilsarkozil kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Araştırmanın laboratuvar analizlerinin yapılması sırasında 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, biorad marka agaroz elektroforez tankı ve güç kaynağı kullanılmıştır.

3.1.3. Ratların temini ve Bakımı

Bu araştırma için canlı ağırlığı ortalama 225-250 gram olan 40 adet erkek Wistar rat, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma

Biriminden temin edildi. Ratlar; her grupta 10 rat olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Grup 1; kontrol grubu, grup 2; gavajla 25 mg/kg/gün akrilamid uygulanan grup, grup 3; gavajla 250 mg/kg/gün N-asetilsistein uygulanan grup, grup 4; 25 mg/kg/gün akrilamid ve 250 mg/kg/gün N-asetilsistein uygulanan grup. Akrilamid ve N-asetilsistein çözeltileri serum fizyolojikte hazırlanmıştır. Akrilamid ve N-asetilsistein uygulamasına 21 gün süreyle devam edilmiştir. Ratlar sıcaklığın 21°C ve ortam neminin % 55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda bakıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Grupların oluşturulması

1. grup kontrol grubu olarak kullanıldı. Hergün 1 ml serum fizyolojik gavajla uygulandı. 2. grup; akrilamid uygulanan grup. 80 mg akrilamid 10 ml serum fizyolojikte çözüldükten sonra her sıçana 1 ml'lik çözelti (8 mg/ml akrilamid) gavajla günlük olarak verildi. 3. grup; N-Asetil sistein uygulanan grup. N-asetil sistein, mL'de 80 mg olacak şekilde serum fizyolojikte çözüldü ve her rata 1 ml çözelti günlük olarak gavajla verildi. 4. grup; akrilamid ve N-asetil sistein uygulanan grup. 1 ml serum fizyolojik içinde 80 mg NAC ve 8 mg akrilamid bulunduran çözülden her rata 1 ml hacimde günlük olarak gavajla uygulandı. Uygulamalar hergün aynı saatlerde olmak üzere düzenli olarak 21 gün süreyle devam ettirildi.

3.2.2. Numune alınması ve hazırlık işlemleri

Sürenin 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 kısmı histopatolojik incelemeler için alkolle tespit edildi. Geriye kalan dokular ise Tris-HCl tamponu içinde homojenize edildi. Doku homojenatlarının 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmesinden sonra elde edilen süpernatantlarda glutatyon S-transferaz (GST) aktivite düzeyleri ile

redükte glutasyon (GSH), malondialdehid (MDA) ve protein düzeyleri ölçüldü. GST, GSH, MDA ve Protein düzeyleri, spektrofotometrik ölçüm yöntemleri ile analiz edildi. Heparinize kan örnekleri 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, elde edilen plazma numuneleri GSH ve MDA analizi için, buffy-coat tabakası ise akrilamidin genotoksik etkilerini incelemek amacıyla Comet analizinde kullanıldı.

3.2.3. Redükte Glutasyon (GSH) analizi

GSH analizi, Ellman'ın tarif ettiği (162) metoda göre yapıldı. Metodun GSH ölçüm prensibi, analiz tüpünde bulunan glutasyonun 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi ve oluşan bu rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyunda olduğu spektrofotometrede okunarak redükte glutasyon miktarının tayin edilmesi şeklindedir.

3.2.3.1. Numunelerin Hazırlanması

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

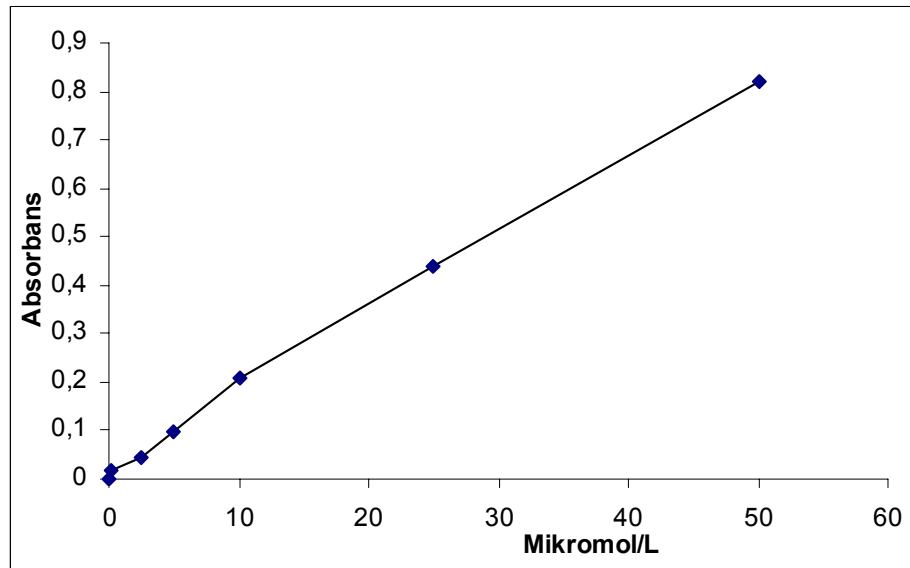
3.2.3.2. Kullanılan Reaktifler

- 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

3.2.3.3. GSH düzeylerinin tayini

	Numune	Kör
%10'luk Homojenat	500µl	-----
Na ₂ HPO ₄ (0,3M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 µl	500 µl
Distile su	-----	500 µl

Yukardaki tabloda belirtilen çalışma şemasına göre deney tüpleri hazırlandı, çözeltilerin iyice karışması için tüpler vorteksledi. Spektrofotometre kör ile 410 nm'de sıfır absorbansa ayarlandı. Oda ısısında 5 dakika bekletilen numunelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve glutasyon standard grafiğinden yararlanılarak µmol/L cinsinden GSH düzeyleri bulundu (Şekil 3.1.). Serum GSH düzeyleri mikromol/L, doku GSH düzeyleri ise nmol/gr yaş doku olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.1. GSH Standard Grafiği

3.2.4. MDA analizi

Lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi olan MDA, Ohkawa ve ark (163)'nın tarif ettiği metoda göre analiz edildi. Analizin temel prensibi, ortamda bulunan MDA'nın asit ortamda tiyobarbutürik asit ile ısıtıldığında

reaksiyona girerek pembe renkli bir kromojen oluşturmasına dayanmaktadır. Pembe rengin şiddeti, numunedeki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.2.4.1. Numunelerin hazırlanması

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

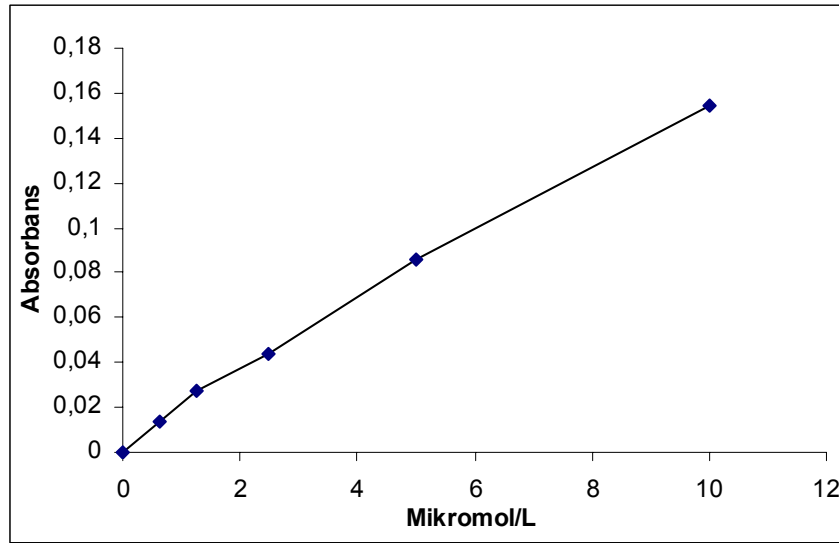
3.2.4.2. Kullanılan reaktifler

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' tetraetoksiopropan

3.2.4.3. MDA düzeylerinin tayini

	Numune	Kör
Homojenat	100 µl	-----
% 8,1 SDS	200 µl	200 µl
% 20'lik asetik asit	1500 µl	1500 µl
% 0,8'lik TBA	1500 µl	1500 µl
Distile su	700 µl	800 µl

Hazırlanan çözelti ler yukarıdaki çalışma tablosunda belirtildiği şekilde deney tüplerine eklendi, çözelti lerin karışması için iyice vortekslendi. Tüpler kaynar suda (en az 95 derecede) 1 saat bekletildi, akan çeşme suyunda soğutuldu ve 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometre 532 nm'de körle sıfır absorbansa ayarlandı. Pembe renkli süpernatantların absorbansları 532 nm'de okundu ve 1.1',3,3' tetraetoksiopropanla hazırlanan standart grafiğinden yararlanılarak µmol/L cinsinden MDA düzeyleri bulundu (Şekil 3.2.). Serum MDA düzeyleri mikromol/L, doku MDA düzeyleri ise nmol/gr yaş doku olarak ifade edilmiştir.

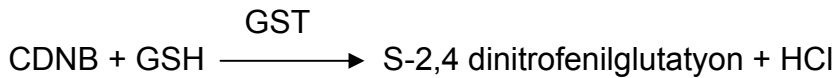


Şekil 3.2. MDA standart grafiği

3.2.5. Glutasyon S-Transferaz aktivitesinin analizi

Glutasyon S-transferaz, elektrofilik bileşiklerin GSH'ın -SH grubu ile tepkimesini katalizleyerek bu bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar. GST aktivitesi, Habig ve ark.'nın (164) tarif ettiği metoda göre tayin edilmiştir. GST aktive düzeyleri, 340 nm dalga boyunda 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB)'nin GSH ile konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbans artışlarının takip edilmesi ile ölçülür.

Enzim aktivitesi 340 nm'de 37 °C'de GSH ve CDNB kullanılarak dakikada oluşan S-2,4 dinitrofenilglutasyonun 1 µmol'unu katalizleyen enzim miktarının ölçülmesiyle belirlenir.



3.2.5.1. Numunelerin hazırlanması

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

3.2.5.2. Kullanılan reaktifler

1. 100 mM Tris Tamponu (pH 7.4)
2. 1 mM 1-kloro 2,4 dinitrobenzen (CDNB)
3. 5 mM Redükte Glutasyon

3.2.5.3. GST aktivite düzeylerinin tayini

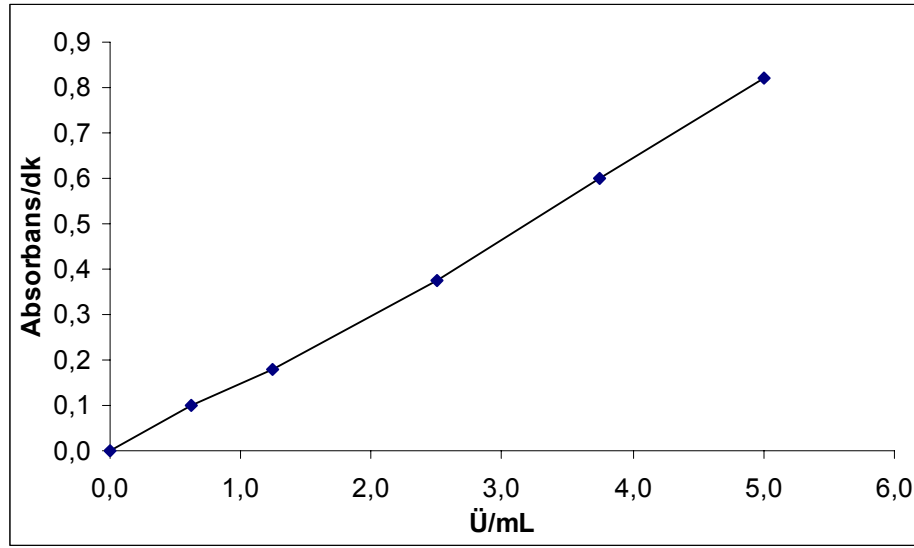
Glutasyon S-transferaz aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir.

	Numune	Kör
Tris Tamponu	1050 µl	1100 µl
CDNB	50 µl	50 µl
GSH	50 µl	50 µl
Tüplere alınan çözeltiler iyice karıştırılır		
Homojenat	50 µl	-----

Numune küvetine GST kaynağı olan süpernatant numunesinden 50 µl ilave edildi, hafifce karıştırıldı ve 340 nm'de 3 dk boyunca meydana gelen absorbans artışları ölçüldü. 3 dakika sonunda ölçülen absorbans 3'e bölünerek dakika başına düşen absorbans değeri tespit edildi.

3.2.5.4. GST aktivite düzeylerinin Hesaplanması

Ticari preparat olarak satın alınan liofilize GST serum fizyolojik içinde çözüldü ve mL'de 5, 3.75, 2.5, 1.25 ve 0.63 ünite GST olacak şekilde seri enzim standartları hazırlandı. Bu standartların her biri, yukarıda GST çalışma tablosunda gösterildiği şekilde numune gibi çalışıldı ve her enzim standardı için absorbans ölçümleri yapıldı. Daha sonra GST standart grafiği hazırlandı ve süpernatant numunelerinin GST aktivite düzeyleri bu grafikten Ü/mL olarak hesap edildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. GST standart grafiği

GST'nin Ü/mL aktivite düzeyleri aşağıda verilen formülle spesifik aktiviteye çevrildi. Doku süpernatant numunelerinin protein düzeyleri, sığır serum albümin'inin standart olarak kullanıldığı biüret metoduna göre ölçüldü (165).

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

3.2.6. Comet analizi

Ksenobiyotikler (vücuda dışarıdan alınan ve vücut için zararlı olan kimyasal maddeler) vücuda alındıktan sonra hücrelerin karbonhidrat, protein, lipid ve DNA gibi makro moleküllerinde çok farklı hasarlanmalar meydana getirebilirler. Bu moleküllerdeki hasarlanmalar öncelikle oksidasyon şeklinde başlar, daha sonra üç boyutlu yapının bozulması, DNA zincir kırıkları, enzim inhibisyonu şeklinde sonuçlanabilmektedir. Comet analizi, oksidan maddelerin hücre DNA'sında meydana getirdiği zincir kırıklarının düzeyini (genotoksisite) kalitatif olarak ortaya koymak amacıyla yapılan elektroforetik bir tekniktir. Bu teknik çok kolay, güvenilir, tekrarlanabilirliği yüksek ve ucuz olması nedenlerinden dolayı genotoksisite çalışmalarında çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bizim bu çalışmamızda da akrilamidin rat lenfosit DNA'sında meydana getirdiği genotoksik hasarları tespit etmek amacıyla, Singh ve ark (166) 'nın tarif ettiği comet analiz metodu kullanılmıştır.

3.2.6.1. Lenfosit numunelerinin hazırlanması

Her gruptan 4'er hayvandan alınan heparinli kanlar ticari histopak-1077 çözeltisi (sigma) ile tabakalandırıldı ve santrifüj işlemleri sonrası lenfosit sedimenti elde edildi. Lenfosit sedimenti PBS'le çözüldü, CBC cihazında hücre sayımı yapıldı ve hücre sayısı $2 \times 10^3/\mu\text{L}$ olacak şekilde PBS ile sulandırıldı.

3.2.6.2. Kullanılan reaktifler

1. % 0.7 low melting point agar (LMP), PBS ile hazırlandı
2. % 0.7 normal melting point agar (NMP), PBS ile hazırlandı
3. Lizis çözeltisi: İçerisinde 2.5 m NaCl, 100 mM EDTA, % 1 triton-x ve % 10 DMSO bulunan tris-HCl tamponu (pH 10, 10 mM)
4. Elektroforez tamponu: pH 13 olan 300 mM NaOH ve 1 mM EDTA
5. Nötralizasyon tamponu: pH 7.5 olan 0.4 M tris-HCl tamponu
6. Etidiyum bromid (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

3.2.6.3. Comet analizinin yapılışı

Mikroskop lamları (75 x 26 mm) toz ve yağ kalıntılarından metanolle temizlendi ve kurumaya bırakıldı. 45 °C'de sıvı halde olan NMP agar çözeltisinden 100 μL alındı ve lamın tek tarafı 1 mm kalınlığında bir agar tabakası ile kaplandı, + 4 °C'de 10 dk. bekletilerek agar tabakasının jelleşmesi sağlandı. Daha sonra 37 °C'de sıvı halde olan LMP agar çözeltisinden 75 μL ve lenfosit çözeltisinden ($2 \times 10^3/\mu\text{L}$) 15 μL alınarak iyice karıştırıldı. Bu lenfosit agar karışımı çözelti, lamın jelle kaplı tarafında 1 mm kalınlığında ikinci bir tabaka oluşacak şekilde lamın üzerine yayıldı. Yine + 4 °C'de 10 dk. bekletilerek agarın jelleşmesi sağlandı. Bir tarafı iki tabaka agarla kaplı olan lamlar 1 saat süreyle, + 4 °C'de soğutulmuş lizis çözeltisinde bekletilerek lenfosit membranlarının erimesi ve DNA'nın açığa çıkması sağlandı. Daha sonra lize edilmiş lamlar, elektroforez tamponu ile doldurulmuş yatay tip agar elektroforez tankında 20 dk süreyle 25 volt ve 300 mA'de elektroforez işlemine tabii tutuldu. İşlemin sonunda lamlar karanlık ortamda 5-10 dk süreyle nötralizasyon tamponunda bekletildi. Bekletme süresince nötralizasyon tamponu 3 defa değiştirildi. Hafifce kurutulan lamlar

etidiyum bromid çözeltisinde 5-10 dk bekletilerek DNA'ların boyanması sağlandı. Etidiyum bromidle boyanan DNA'lar, floresans mikroskopunda (Nikon), 515-560 filtre ile 400x büyütmede değerlendirildi ve incelenen alanların fotoğrafları çekildi.

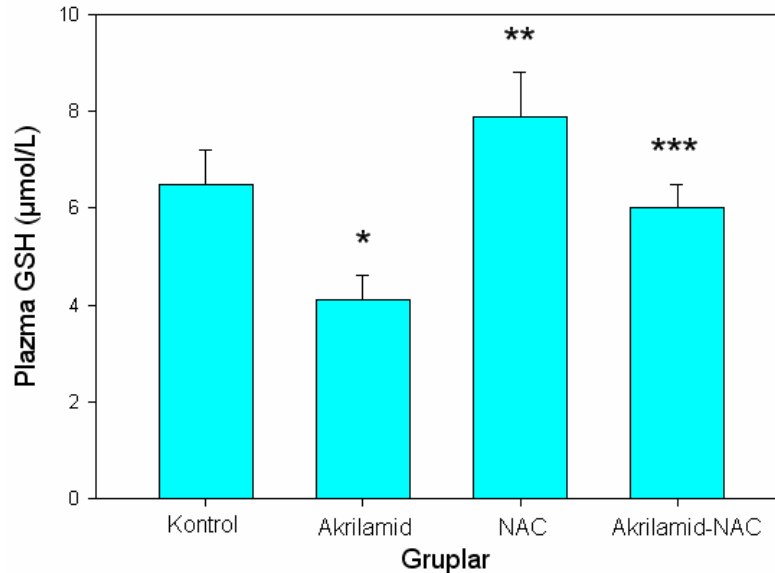
3.2.7. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS programı (SPSS for Windows version 11.0) ile yapıldı. Tüm sonuçlar ortalam \pm standart sapma (mean \pm SD) olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği, Shapiro Wilk testiyle incelendi ve verilerin normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p < 0.05$). Bu nedenle grupların karşılaştırılmasında, Mann-Whitney U testi kullanıldı. ($p < 0.05$) değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Grupların plazma GSH düzeyleri

Akrilamid verilen grubun GSH düzeyleri kontrol grubuna göre önemli derecede ($p < 0.05$) düştüğü, ancak akrilamidle beraber N-asetilsistein (NAC) verilen grupta ise GSH'ın kontrol grubu değerlerine yakın bir seviyeye ulaştığı ve istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).

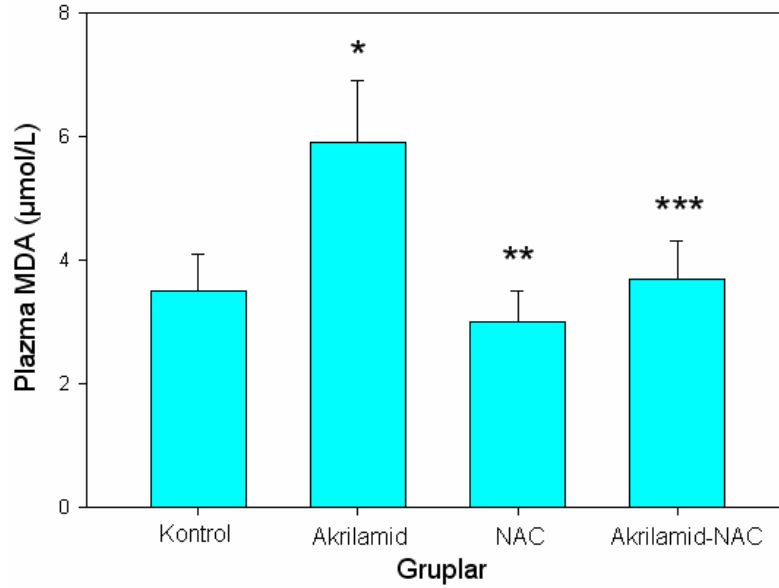


Şekil 4.1. Grupların plazma GSH düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **; NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***; akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

Grupların plazma MDA düzeyleri

Akrilamid grubunun MDA seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı derecede ($p < 0.05$) artış gösterdiği, ancak akrilamidle beraber N-asetilsistein (NAC) verilen grupta ise MDA düzeylerinin önemli derecede ($p < 0.05$) azalarak kontrol grubu değerlerine yakın bir seviyeye düştüğü görülmüştür (Şekil 4.2.).

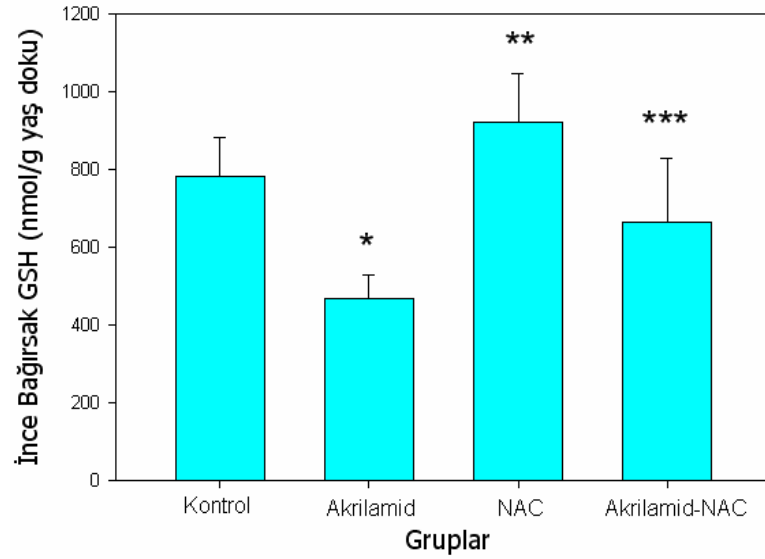


Şekil 4.2. Grupların plazma MDA düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **; NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***; akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

Grupların ince bağırsak GSH düzeyleri

İnce bağırsak GSH düzeyleri açısından; kontrol / akrilamid, akrilamid / NAC, akrilamid / akrilamid-NAC grupları arasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.05$) olan farkların bulunduğu ortaya konulmuştur (Şekil 4.3.).

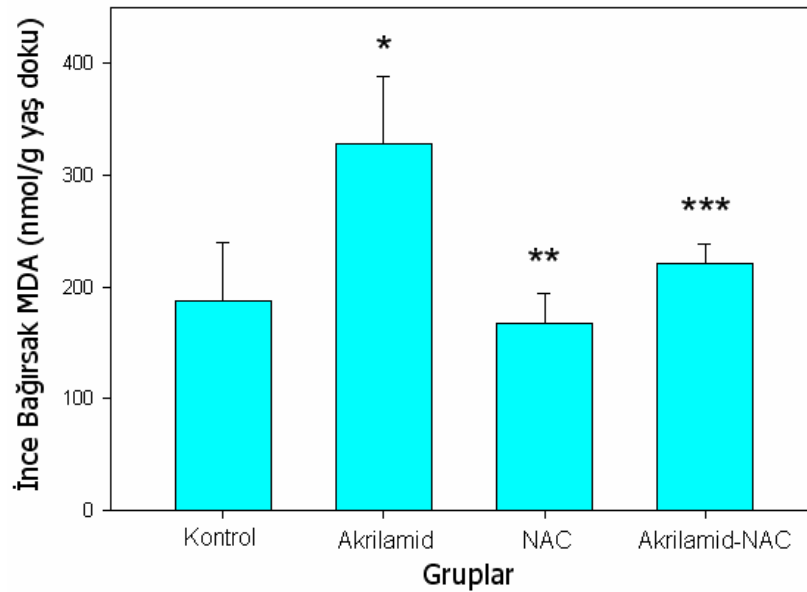


Şekil 4.3. Grupların ince bağırsak GSH düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **;NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***;akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

Grupların ince bağırsak MDA düzeyleri

Akrilamid verilen grupta ince bağırsak MDA seviyeleri anlamlı derece ($p < 0.05$) artış gösterirken, akrilamid+NAC grubunda NAC'nin MDA düzeylerini önemli derecede ($p < 0.05$) azaltarak kontrol grubu değerlerine yakın bir seviyeye düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).

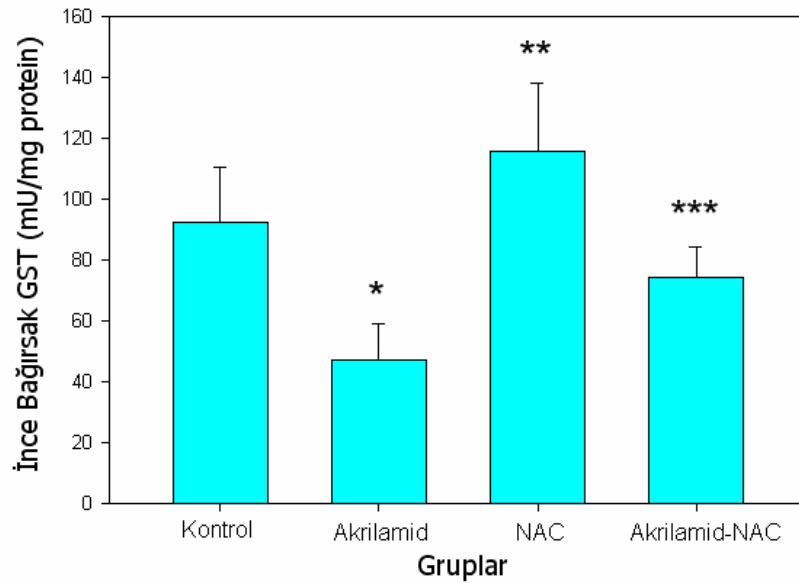


Şekil 4.4. Grupların ince bağırsak MDA düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **; NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***; akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

Grupların ince bağırsak GST aktivite düzeyleri

Grupların GST aktivite düzeyleri karşılaştırıldığında, ratlara akrilamid verilmesinin GST aktivitesini önemli derecede ($p < 0.05$) düşürdüğü, ancak ratlara akrilamidle beraber NAC uygulamasının GST aktivitesini anlamlı derecede ($p < 0.05$) artırarak normal seviyelere getirdiği görülmüştür (Şekil 4.5.).

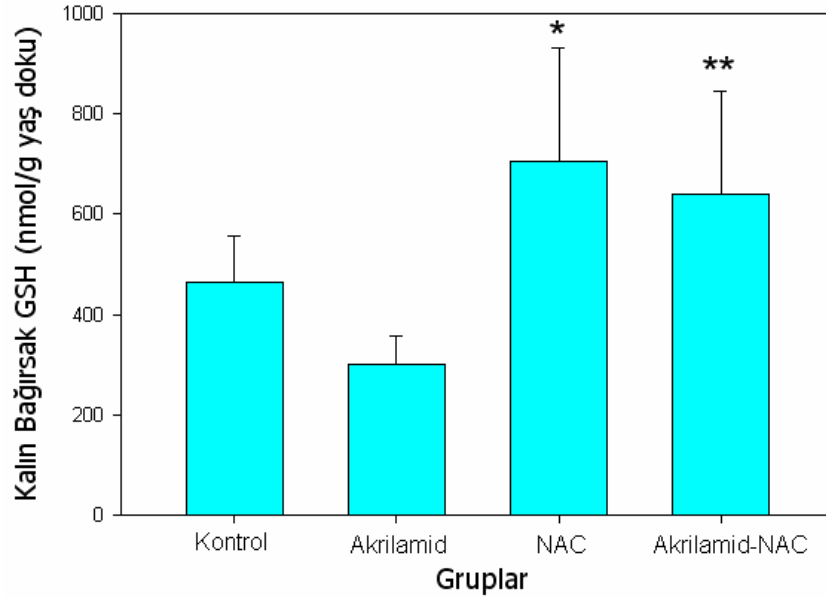


Şekil 4.5. Grupların ince bağırsak GST aktivite düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **;NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***;akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

4.6. Grupların kalın bağırsak GSH düzeyleri

Akrilamid uygulamasının kalın bağırsak GSH seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir derecede düşürdüğü, ancak NAC verilmesinin bu GSH düşüklüğünü engellediği ortaya konulmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.6.).

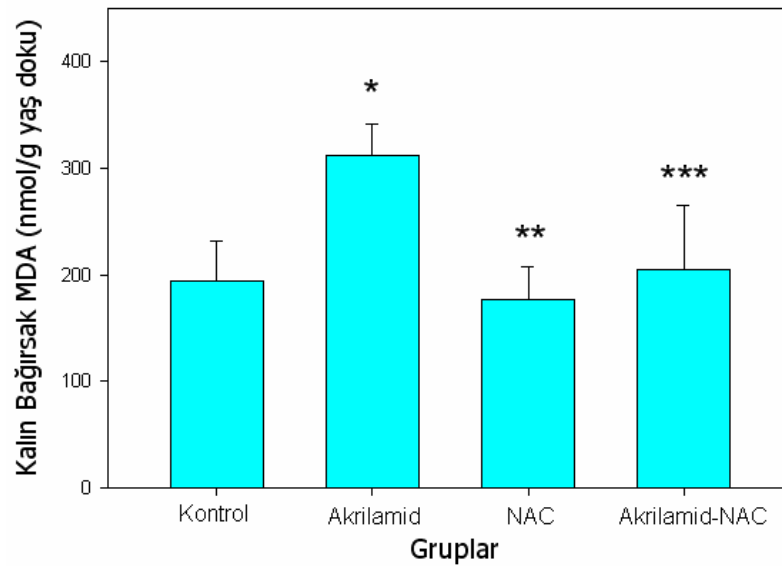


Şekil 4.6. Grupların kalın bağırsak GSH düzeyleri

*; NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **; akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

4.7. Grupların kalın bağırsak MDA düzeyleri

Akrilamid verilen grupta kalın bağırsak MDA seviyeleri anlamlı derece ($p < 0.05$) artış gösterirken, NAC verilmesinin MDA düzeylerini önemli derecede ($p < 0.05$) azaltarak kontrol grubu değerlerine yakın bir seviyeye düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.7.).

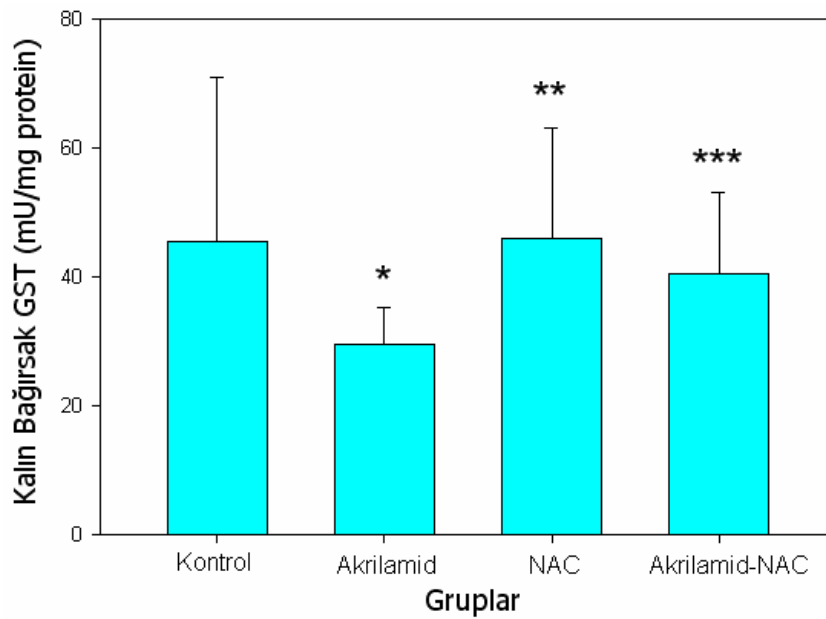


Şekil 4.7. Grupların kalın bağırsak MDA düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **; NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***; akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

4.8. Grupların kalın bağırsak GST aktivite düzeyleri

Gruplar GST aktivite düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, akrilamid verilmesi kalın bağırsak GST aktivitesini düşürdüğü, ancak bu düşüşün istatistiki açıdan önemli olmadığı, akrilamidin NAC'le beraber uygulanmasının GST aktivite seviyelerini anlamlı derecede ($p < 0.05$) artırdığı görülmüştür (Şekil 4.8.).

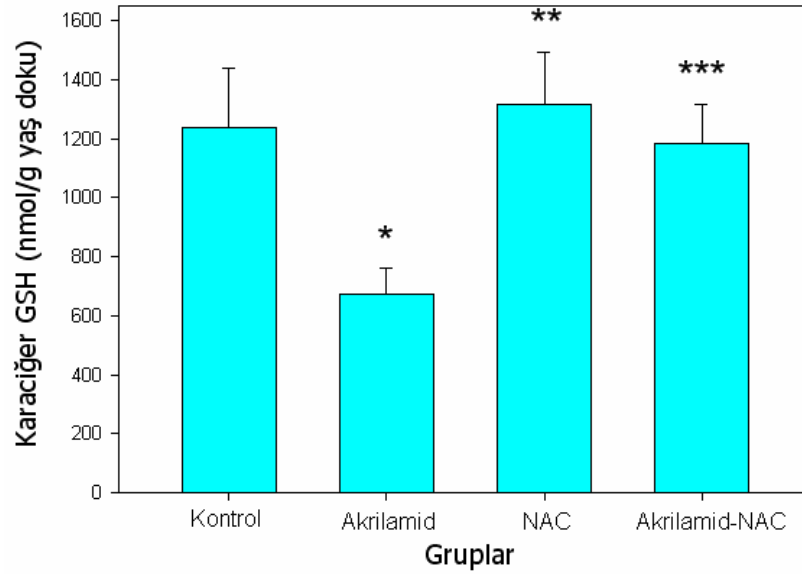


Şekil 4.8. Grupların kalın bağırsak GST aktivite düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **; NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***; akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

4.9. Grupların karaciğer GSH düzeyleri

Akrilamid uygulaması karaciğer GSH düzeylerini ciddi derecede ($p < 0.05$) düşürürken, akrilamid+NAC grubunda GSH düzeyleri anlamlı derecede ($p < 0.05$) artış göstermiştir (Şekil 4.9.).

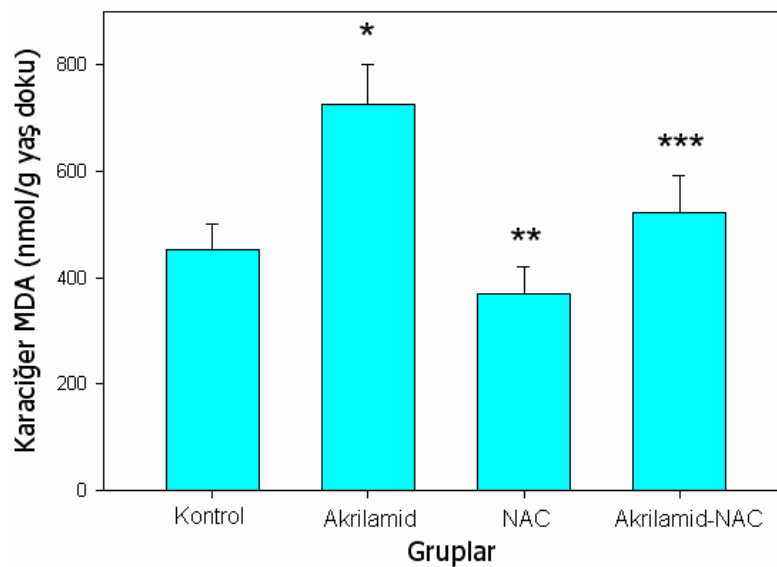


Şekil 4.9. Grupların karaciğer GSH düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **; NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***; akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

4.10. Grupların karaciğer MDA düzeyleri

Karaciğer MDA düzeyleri açısından; kontrol / akrilamid, kontrol / NAC, akrilamid / NAC ve akrilamid / akrilamid-NAC grupları arasında istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.05$) olan farkların bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10.).

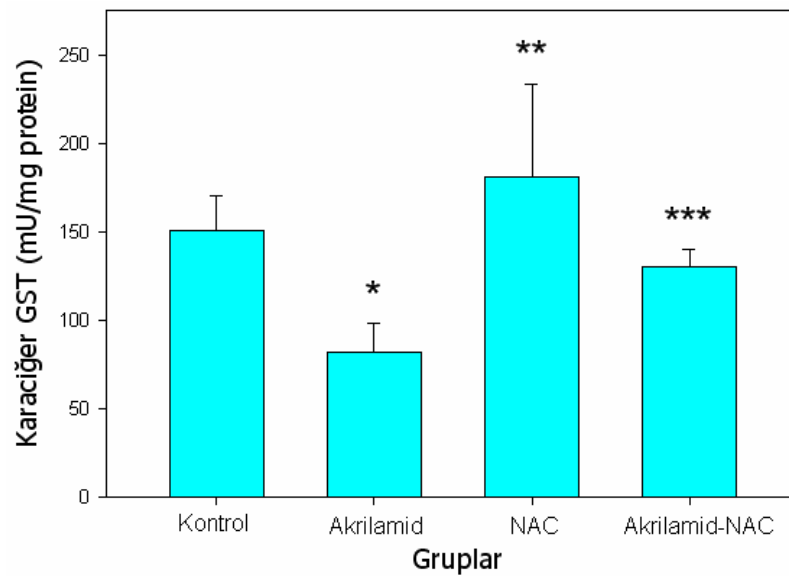


Şekil 4.10. Grupların karaciğer MDA düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **; NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***; akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

4.11. Grupların karaciğer GST aktivite düzeyleri

Grupların GST aktivite düzeyleri karşılaştırıldığında, ratlara akrilamid verilmesinin karaciğer GST aktivitesini önemli derecede ($p < 0.05$) düşürdüğü, ancak ratlara akrilamidle beraber NAC uygulamasının GST aktivitesini anlamlı derecede ($p < 0.05$) artırarak bu düşüşü önlediği görülmüştür (Şekil 4.11.).

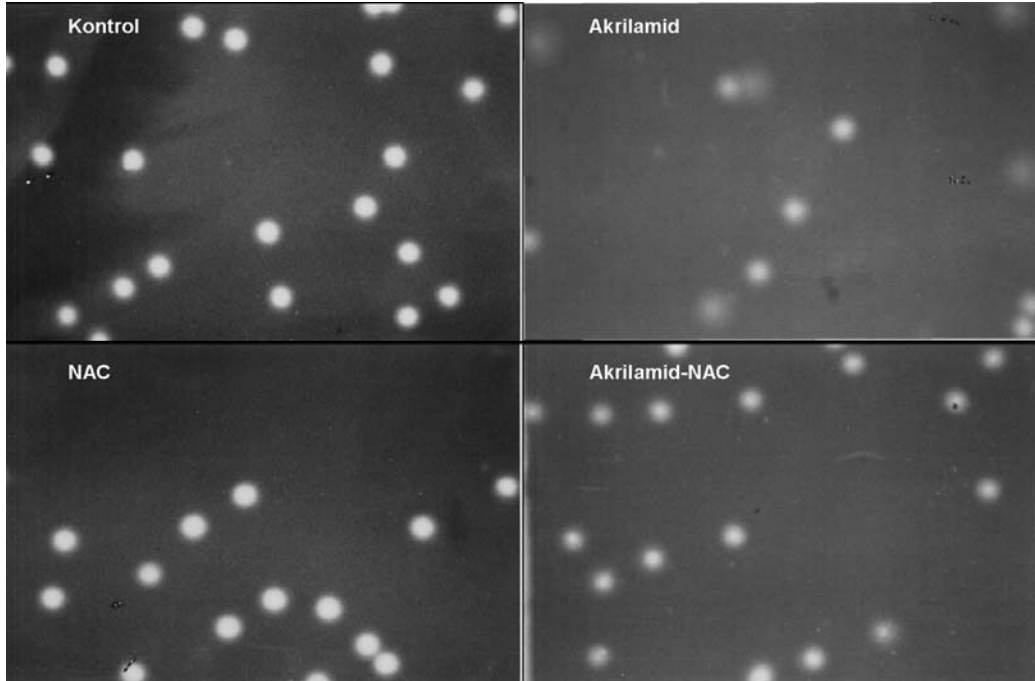


Şekil 4.11. Grupların karaciğer GST aktivite düzeyleri

*; kontrol grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, **; NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında, ***; akrilamid-NAC grubuyla akrilamid grubu karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu.

4.12. Grupların comet analiz sonuçları

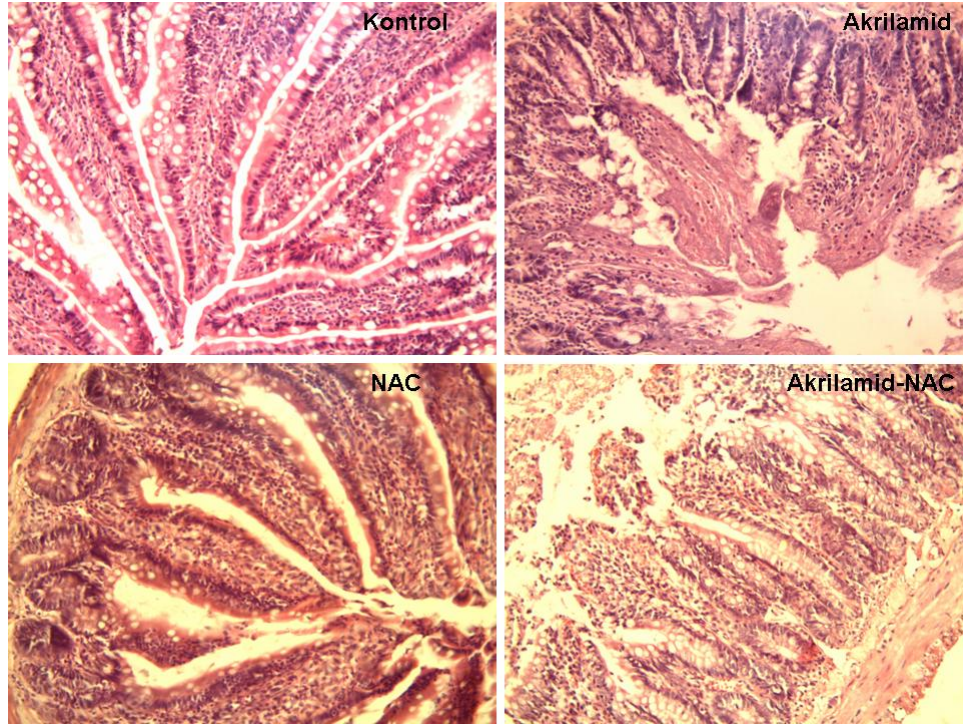
Grupların comet analiz sonuçları incelendiğinde, kontrol ve NAC gruplarının lenfosit DNA'larının normal olduğu, akrilamid verilen ratların lenfosit DNA'larının ileri derecede parçalanmaya uğradığı, hatta bazı lenfositlerin apoptotik bir görünüm verdiği, akrilamidle beraber NAC verilmesinin lenfosit DNA'larındaki hasarlanmaları ciddi derecede önlediği görülmektedir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Grupların comet analiz sonuçları

4.13. Grupların ince bağırsak histopatoloji sonuçları

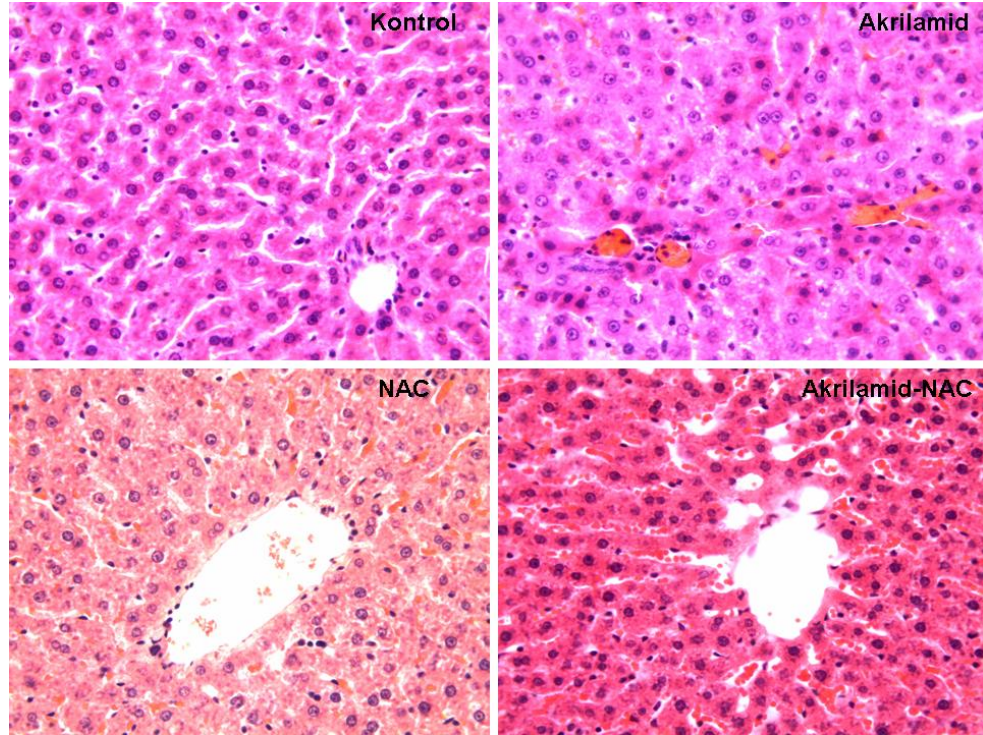
Kontrol grubunda villus yapıları ve üzerini döşeyen tek katlı prizmatik epitel normal histolojik görünümdeydi. Akrilamid grubunda villus yapıları bozulmuş ve enterositler dökülmüştü. Villus yüzeyini kaplayan epitel dökülmüş ve lamina propriyada hücre yoğunluğu azalmıştı. NAC grubunda ince bağırsak normal görünümdeydi. Akrilamid+NAC grubunda; villusların tepe bölümleri dökülmüş olmasına rağmen villusların lateral yüzlerinde epitel sağlandı (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Grupların ince bağırsak histopatoloji sonuçları (H&E x20)

4.14. Grupların karaciğer histopatoloji sonuçları

Kontrol grubunda hepatositler normal histolojik görünümdeydi. Fakat akrilamid grubunda, hepatositlerin sitoplazmalarında yer alan farklı büyüklükteki vakuoller dikkat çekti. Bazı hepatosit sitoplazmaları diğerlerine göre daha eozinofilik olarak izlendi. Eozinofilik sitoplazmalı hepatositlerin nukleusları da heterokromatikti. NAC grubunda histolojik görünüm kontroller ile benzerdi. Akrilamid+NAC grubunda vakuoler değişiklikler yer yer gözlenmesine rağmen akrilamid grubuna göre hafiflemişti. Eozinofil sitoplazmalı hepatositler akrilamid grubuna göre daha nadir olarak gözlemlendi (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Grupların karaciğer histopatoloji sonuçları (H&E X40)

Tablo 4.1. Analiz edilen biyokimyasal parametrelerin grup ortalamaları (mean±SD)

	Plazma		İnce bağırsak			Kalın bağırsak			Karaciğer		
	GSH (μ mol/L)	MDA (μ mol/L)	GSH (nmol/g yaş doku)	MDA (nmol/g yaş doku)	GST (mU/ mg Protein)	GSH (nmol/g yaş doku)	MDA (nmol/g yaş doku)	GST (mU/ mg Protein)	GSH (nmol/g yaş doku)	MDA (nmol/g yaş doku)	GST (mU/ mg Protein)
Kontrol (n:8)	6.5±0.7	3.5±0.6	781±100	188±52	92.4±18.2	465±91	195±37	45.6±25.3	1239±200	453±48	150.3±20.3
Akrilamid (n:7)	4.1±0.5	5.9±1.0	468±61	328±60	47.4±11.9	302±56	312±29	29.6±5.6	672±91	726±74	81.7±16.6
NAC (n:10)	7.9±0.9	3.0±0.5	920±127	168±26	115.6±22.7	704±229	177±31	45.9±17.3	1315±177	371±51	181.1±52.3
Akrilamid-NAC (n:7)	6.0±0.5	3.7±0.6	663±164	221±18	74.4±10.0	639±206	205±60	40.5±12.6	1183±136	523±68	130.6±9.5

Tablo 4.2. Analiz edilen parametrelerin gruplararası istatistiksel anlamlılık dereceleri (p değerleri)

Gruplararası karşılaştırma	Plazma		İnce bağırsak			Kalın bağırsak			Karaciğer		
	GSH	MDA	GSH	MDA	GST	GSH	MDA	GST	GSH	MDA	GST
Kontrol / Akrilamid	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p > 0.05	p < 0.05	p > 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05
Kontrol / NAC	p < 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.05	p > 0.05
Kontrol / Akrilamid-NAC	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.05
Akrilamid / NAC	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05
Akrilamid / Akrilamid-NAC	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05
NAC / Akrilamid-NAC	p < 0.05	p > 0.05	p < 0.05	p > 0.05	p < 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05	p < 0.05	p > 0.05

5. TARTIŞMA

Ksenobiyotikler vücuda dışarıdan alınan ve vücut için az ya da çok zararlı olan kimyasal maddelerdir. Bu tür kimyasal maddeler, büyük oranda ağız yoluyla daha az oranda da solunum havası ve deriden emilerek vücuda alınırlar. Tedavi amacıyla alınan ilaçları, bir gıdanın bileşeni olan kimyasal madde/maddeleri ya da sigara dumanında bulunan bazı kimyasal molekülleri ksenobiyotiklere örnek olarak verebiliriz. Ayrıca hücresel ortamda bazı makromoleküllerin metabolizması sırasında da bazı zararlı maddeler oluşabilmektedir (Malondialdehid gibi).

Ksenobiyotikler, moleküler yapı olarak daha çok hidrofobik (sudaki çözünürlüğü düşük) özellik gösterirler ve kan sıvısında ki çözünürlükleri de oldukça zayıftır. Bu tip maddeler vücuda alındıktan sonra karaciğerde detoksifikasyon reaksiyonları ile bir takım dönüşüm ve değişimlere (biyotransformasyon) uğrarlar. Ksenobiyotiklerin karaciğerdeki metabolizması faz I ve faz II reaksiyonlarından oluşmaktadır. Faz I reaksiyonları ksenobiyotiklerin, sitokrom P450 enzim sistemiyle (150'den fazla enzimden oluşmaktadır) oksidasyona uğratarak farklı moleküler yapıdaki maddelere dönüşmesi sağlanmaktadır. Faz I reaksiyonları ile bazı maddeler detoksifiye edilirken bazı maddeler ise daha toksik bir hale dönüşebilmektedir (akrilamid'in glisidamide dönüşümü gibi). Bu oksidasyon reaksiyonları molekülün yapısını az ya da büyük oranda değiştirebilmekte, ancak genellikle yeni oluşan molekülün de kan sıvısındaki çözünürlüğü oldukça düşük düzeyde olmaktadır. Kan sıvısında çok düşük düzeyde çözünmeleri nedeniyle, ksenobiyotiklerin vücut dışına atılma oranları oldukça düşüktür. Bu nedenle, faz II reaksiyonları ile ksenobiyotiklerin kan sıvısındaki çözünürlükleri artırılarak kolaylıkla idrar, safra, dışkı veya ter yoluyla vücut dışına atılmaları sağlanmaktadır. Herhangi bir ksenobiyotiğin; bağırsaklar, karaciğer, böbrek ve diğer organlarda GSH'la konjuge edilmesi, zararlı bu maddenin ileri düzeydeki yıkım reaksiyonlarının başlamasını yada hücre dışına atılmalarını hızlandırmaktadır (167-170).

Akrilamid, endüstri alanında sık olarak kullanılan ve insanların istemeden maruz kalabildikleri ancak henüz genetik riskleri tam olarak

belirlenememiş bir ksenobiyotiktir (91). İnsan sağlığı için esas tehlikeli olan akrilamid, gıda kaynaklı olan akrilamiddir. Çünkü günlük tüketilen gıdalarla vücuda sürekli olarak akrilamid alınması söz konusudur. Gıdalarda akrilamid, 120 C'den yüksek sıcaklık derecelerinde hazırlanan gıdalarda yüksek ısının etkisiyle bazı amino asitler ile şekerler arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu ile oluşmaktadır. Maillard reaksiyonunda; gıdaların yüksek sıcaklık derecelerinde pişirilmesi sırasında, asparajin amino asidinin amino grubuyla glukozun karbonil grubunu reaksiyona girmekte ve akrilamid oluşmaktadır. Akrilamid oluşumunda asparajin amino asidi ile glukoz ve fruktoz çok önemli bir rol oynamaktadır. Ancak model çalışmalar, akrilamid oluşumunda fruktoz'un glukoz ya da galaktoza oranla daha etkili olduğunu ortaya koymuştur (27). Yiyecek türlerinde akrilamid oluşumu, gıdaların yapılarında buldukları amino asitlerin içeriği ve düzeyleriyle direkt ilişkili olan bir olaydır. Patates yüksek oranda asparajin amino asidi içermesi nedeniyle, yüksek sıcaklık derecelerinde kızartılmış patates ürünleri en yoğun miktarda akrilamid içeren gıdalardır Ancak haşlanarak hazırlanan gıdalarda herhangi bir akrilamid oluşumuna rastlanmamıştır (12,13,15).

İnsanların günlük olarak gıdalarla aldıkları akrilamid miktarını tespit etmek amacı ile Amerikada yapılan araştırmalarda; insanlarda gıda tüketimiyle alınan günlük ortalama akrilamid miktarının, iki yaşından ilerleyen yaşlara kadar 0.4 µg/kg'nin altında olması gerektiğini, ancak vücuda alınan günlük akrilamid miktarının 2 µg/kg ve hatta 5 µg/kg'ye kadar çıktığını ortaya koymaktadır (171). Yapılan bir araştırmada, sağlıklı gönüllülere kg başına değişik miktarlarda radyoaktif işaretli akrilamid verilerek güvenli ve tehlikeli doz aralığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu araştırmanın sonuçları, 0.5 µg/kg'dan düşük olan akrilamid dozlarının iyi derecede tolere edilebildiğini, 0.5 µg/kg'dan yüksek olan miktarların ise insan sağlığı için çok zararlı olduğunu göstermiştir (172). İsveç'te yapılan bir araştırmada, bir kişinin yiyeceklerle aldığı akrilamid miktarının günlük olarak ortalama 35 mg olduğu tespit edilmiştir. Yetişkin bir insanın vücut ağırlığının ortalama 70 kg olduğunu düşünürsek, kg canlı ağırlık başına ortalama 0.5 µg akrilamidin

günlük olarak vücuda alındığı görülmektedir (99). Avrupanın diğer ülkelerinde yapılan araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (100,101).

İnsanlar açısından diğer bir akrilamid kaynağıda sigaradır. Yapılan araştırmalar sigara içenlerde sigara dumanı ile yoğun miktarlarda akrilamidin akciğerler kanalıyla vücuda alındığını göstermektedir. Hatta bazı araştırmacılar, sigara içenlerde çok sık rastlanan akciğer kanserinin ana sebebinin, sigara ile akciğere alınan akrilamid olabileceğini ileri sürmektedirler (173,174).

Akrilamid, diğer ksenobiyotiklerin tersine suda iyi derecede çözünmesi nedeniyle, ağız yoluyla vücuda alındıktan sonra çok hızlı bir şekilde tüm dokulara dağılım gösterir. Akrilamid, sindirim kanalı boyunca tüm dokularda (özafagus, mide, ince ve kalın bağırsak) GST/GSH sistemiyle konjuge edilerek akrilamid-glutasyon kompleks bileşiğine çevrilmekte ve sindirim kanalı dokularının akrilamidin zararlı etkilerinden korunması sağlanmaktadır. Böylece gıdalarla ağızdan alınan akrilamidin bir kısmı sindirim kanalında etkisiz hale getirilmiş olmaktadır. Ancak akrilamidin sindirim kanalı boyunca etkili bir şekilde konjuge edilebilmesi, büyük oranda dokunun GST aktivite ve GSH düzeylerine bağlıdır. Bu konuyla ilgili olarak Lieshout ve ark. (175), ratları bir süre; α -tokoferol, β -karoten, likopen, flavonoid, limonen gibi antioksidan ve antikanserojen madde ilave edilmiş diyetle beslemişlerdir. Çalışma sonucunda yaptıkları analizlerde, sindirim sistemi boyunca; özafagus, mide, ince ve kalın bağırsak dokularında GST aktivitesinin önemli derecede arttığını gözlemlemişlerdir. Lieshout ve ark., bu sonuçları antioksidan ve antikanserojen etkili moleküller açısından zengin olan sebze ve meyvelerin yeterli düzeyde tüketiminin, ağız yoluyla alınan toksik ve kanserojen maddelerin sindirim kanalı boyunca GSH ile konjugasyonunu ve vücut dışına atılımını hızlandıracağı ve bunun sonucunda da vücutu zararlı etkilerden koruyabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Bu araştırmanın sonuçları, gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan kişilerin, yoğun miktarda antioksidan ve antikanserojen madde içeren bu sebze ve meyveleri yeterince tüketmesinin akrilamid kaynaklı kanserojenik, mutajenik ve oksidatif etkileri engelleyebileceğini düşündürmektedir.

Bağırsaklardan emilerek kana geçen akrilamid büyük oranda karaciğer ve diğer dokulara çok hızlı bir şekilde dağılım gösterir. Akrilamid, yarılanma süresinin kısa olması nedeniyle kandan çok hızlı bir şekilde temizlenmektedir. Karaciğere alınan akrilamidin bir kısmı GST/GSH sistemiyle konjuge edilerek detoksifiye edilir, bir kısmı ise sitokrom P450 enzim sistemiyle okside edilerek glisidamide dönüştürülmektedir. Glisidamid, akrilamidin okside edilmiş formudur. Kan serumunda değişikliğe uğramamış akrilamid oranının ise çok düşük (% 0.5) olduğu görülmüştür. Ayrıca kana geçen akrilamidin bir kısmının, kanda bulunan proteinler ile hemoglobine yüksek affinite göstermesi nedeniyle bu proteinlere bağlandığı tespit edilmiştir (40). Glisidamidin katabolizması iki enzimatik yolla meydana gelmekte ve glisidamidin etkisizleştirilerek vücut dışına atılması sağlanmaktadır. Birinci reaksiyonda glisidamid, Epoksi Hidrolaz (EH) ile gliseramide okside edilerek yıkıma uğratılmakta ve büyük oranda idrarla dışarı atılmaktadır. İkinci enzimatik yıkım yolu ise, GST'nin glisidamidi GSH ile konjuge ederek detoksifiye etmesi şeklinde gerçekleşir (54). Ancak hücrelerin glisidamidi detoksifiye etme kapasitelerinin büyük oranda yüksek GST aktivite ve GSH düzeylerine bağımlı olduğunu açıkça belirtmek gerekir.

Pupel ve ark.; yaptıkları çalışmada, hücre içi GSH seviyelerinin, akrilamid ve glisidamidin meydana getireceği genotoksikite düzeyleri açısından önemli bir faktör olup olmadığını test etmişlerdir. Hücre içi yüksek düzeydeki GSH, akrilamidin GSH'la konjugasyonunu artırarak glisidamid oluşumunu azalttığı ve glisidamid kaynaklı genotoksik hasarları önemli derecede engellediği ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra, GSH sentez inhibitörü verilen hayvanlara düşük düzeyde akrilamid uygulaması (1 mM) bile, hücre DNA'larında önemli derecede zincir kırıkları, baz kayması ve baz değişikliklerinin meydana gelmesine yol açmıştır. Bu sonuçlar, gerek akrilamid ve gerekse de glisidamid kaynaklı genotoksik etkilerin önlenmesinde hücre içi GSH düzeylerinin çok önemli olduğunu göstermektedir (176).

Bizim araştırmamızda da, akrilamid uygulaması sonrası ratların ince bağırsak ve karaciğer dokularında GSH düzeyleri ciddi derecede azalmıştır.

Ancak akrilamidle beraber NAC uygulaması GSH düzeylerini kontrol grubu seviyelerine getirmiştir. Puppel ve ark.'nın sonuçları bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Akrilamidin glisidamide okside olma oranı türler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Sıçanlara 3 mg/kg dozda akrilamid uygulandığında idrarla atılan metabolitlerin % 20'sinin glisidamid ve ürünlerinden oluştuğu, ancak aynı dozun gönüllü insanlara uygulanması sonrası, idrarla atılan glisidamid ve ürünlerinin ölçülebilecek düzeylerin çok altında olduğu bildirilmiştir (177).

Comet analizi, oksidan maddelerin hücre DNA'sında meydana getirdiği zincir kırıklarının düzeyini (genotoksisite) kalitatif olarak ortaya koymak amacıyla yapılan elektroforetik bir tekniktir. Bu teknik çok kolay, güvenilir, tekrarlanabilirliği yüksek ve ucuz olması nedenlerinden dolayı genotoksisite çalışmalarında çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Comet analiz tekniği ilk defa 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından, DNA'larda meydana gelen genotoksik hasarları tespit etmek amacıyla kullanılmış ve standart metod haline getirilmiştir (178).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, akrilamid ve glisidamid'in hücre DNA'sı üzerinde genotoksik (mutajenik) etki meydana getirerek DNA zincirinde kırılmalar, çapraz zincir bağlanmaları, baz kayması ve baz değişiklikleri gibi çok ciddi hasarlara neden olduğunu göstermektedir. Aslında DNA üzerinde meydana gelen bu genotoksik etkilerin, akrilamidden ziyade büyük oranda akrilamidin metaboliti olan glisidamidden kaynaklandığı bildirilmiştir. Fare ve sıçanlara akrilamid verilerek yapılan deneysel çalışmalarda, akrilamidden bol miktarda glisidamid oluştuğu ve glisidamidin bu hayvanların karaciğer, akciğer ve böbrek DNA'larının pürin bazları ile etkileşerek genotoksik etkiler meydana getirdiği gözlemlenmiştir (32-34).

Koyama ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, akrilamid ve glisidamidin insan lenfoblastoid hücrelerinde meydana getirdiği hasarları comet analizi ile incelemişlerdir. Akrilamidin lenfoblastoid hücrelerde orta derecede genotoksik bir hasar meydana getirdiği, ancak aynı denemeyi glisidamidle yaptıklarında akrilamide göre çok daha güçlü bir genotoksik

etkinin ortaya çıktığı, çok sayıda kromozomda önemli derecede hasarlanmaların olduğu, hatta glisidamiden kaynaklanan bu güçlü mutajenik etkinin insanlarda kansere bile neden olabileceği gösterilmiştir (179). Ancak, insanlarda akrilamidin glisidamide dönüşümünün çok düşük düzeyde olması nedeniyle glisidamid kaynaklı mutajenik hasarın çok düşük seviyede olacağı aşikârdır.

Sağlıklı yetişkin insanlardan alınan kanlardan izole edilen lenfositlerin in vitro şartlarda 0.1-0.5 µmol akrilamidle muamele edilmesi sonrası yapılan hücre içi GSH ölçümünde ve comet analizinde, akrilamidin hücre içi GSH düzeyini önemli derecede düşürdüğü ve lenfosit DNA'larında önemli genotoksik hasarlanmalar meydana getirdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca hücre ortamına akrilamidle beraber antioksidan etkili N-tert-butil- α -fenilnitron ilavesinin, akrilamid kaynaklı DNA hasarını ciddi oranda azalttığı tespit edilmiştir (22).

Mani'ere ve ark. yaptıkları çalışmada, ratlara kg başına 18, 36 veya 54 mg akrilamidi ağızdan tek doz olarak uygulamışlardır. Uygulamayı takip eden 24. saatte ratlar dekapite edilerek kan, beyin, karaciğer, kemik iliği, testisler numune olarak alınmıştır. Comet analizi ile yapılan incelemelerde, kandan izole edilen lenfositlerin ve diğer dokuların DNA'larında kontrol grubuna göre ciddi genotoksik hasarların meydana geldiği ortaya konulmuştur (180).

Rat ve farelerin germ hücrelerinde yapılan in vivo genotoksisite çalışmalarında elde edilen hücrelerin comet analizleri, akrilamidin germ hücre DNA'larında ciddi mutajenik hasarlar oluşturduğunu göstermiştir (181,182).

Bizim yaptığımız araştırmada; ratlara 25 mg/kg dozda akrilamid, 21 gün süreyle ağızdan verilmiştir. 21 günlük akrilamid uygulamasının sonunda; ratlardan alınan kan numunelerinden izole edilen lenfositlerin comet analizinde, akrilamid grubu ratlarda kontrol grubuna göre ciddi derecede DNA hasarının meydana geldiği, hatta bazı lenfositlerin apoptozise uğradığı açıkça görülmüştür (Şekil 4.12.). Ancak akrilamidle beraber 250 mg/kg dozda N-asetilsistein (GSH öncülü) uygulanmasının, akrilamid grubuna göre DNA hasarını ciddi derecede önlediği, apoptotik hücre sayısını önemli oranda azalttığı ortaya konulmuştur (Şekil 4.12.).

Tüm ökaryotik hücrelerde, normal fizyolojik metabolizma sırasında belli düzeyde serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşmaktadır. Bu radikallerin başlıcaları; süperoksid anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksid (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$), singlet osijen (1O_2) ve peroksil radikali (LOO^{\cdot})'dir. Ancak normal metabolizma sırasında oluşan belli düzeydeki SOR, hücrenin antioksidan sistemlerince detoksifiye edilerek hücrenin makromoleküllerinde (proteinler, enzimler, lipidler, karbonhidratlar, DNA ve RNA gibi) meydana gelebilecek oksidatif hasarları ortadan kaldırırlar. Diğer bir ifade ile fizyolojik şartlarda hücrede oluşan oksidanların düzeyi ile total antioksidan kapasite arasında bir denge bulunmaktadır. Biz buna hücrenin oksidan/antioksidan dengesi adını veriyoruz (183,184).

Ökaryot hücrelerin total antioksidan kapasitesi, nonenzimatik ve enzimatik antioksidanlardan meydana gelmektedir. Nonenzimatik antioksidanlar hücrenin su veya yağ fazında çözünen redükte glutatyon, vitamin C, ürik asit, sistein, bilirubin, seruloplazmin, albumin, E ve A vitaminleri, melatonin gibi güçlü antioksidan moleküllerden oluşmaktadır. Bu antioksidan etkili maddeler, hücrenin oksidanlara karşı ilk cephesini oluşturmakta ve SOR'ları detoksifiye ederek hücre komponentlerini oksidatif yıkımlanmadan korumaktadır. En önemli enzimatik antioksidanlar ise süperoksid anyon radikalini hidrojen perokside yıkan süperoksid dismutaz (SOD), hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalayan glutatyon peroksidaz (GSH-PX) ve katalaz (CAT), glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz enzimlerinden meydana gelmektedir (185).

Oksidatif stres, hücrelerde SOR'ların aşırı artışı veya antioksidanların düzeyinin düşmesi sonucunda oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulması durumudur. Bu durumda, SOR'lar yeterli düzeyde detoksifiye edilemediği için hücrenin lipid, protein, karbonhidrat, DNA gibi yapısal makromoleküllerinde oksidatif hasarlanmalar meydana gelir (186). Oksidatif stresin; aterosklerozun, yangının, şeker hastalığının, iskemi/reperfüzyon hasarının patogenezinde, gen mutasyonunda, kanser gelişiminde ve ksenobiyotiklerin dokularda meydana getirdiği hasarlanmalarda aktif olarak rol oynadığı gösterilmiştir (185,187).

Deney hayvanları, insanlar ve hücre kültürleri üzerinde yapılan araştırmalar, akrilamid uygulanmasının serbest oksijen radikallerinin üretimini artırarak oksidan/antioksidan dengelyi bozduğunu ve oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Akrilamidin hücrelerde özellikle GSH ve GST aktivite düzeylerini azaltarak oksidan/antioksidan dengelyi oksidanların lehine bozduğu ve bunun sonucunda da hücrelerde oksidatif hasarlanmalar meydana geldiği bildirilmiştir (22, 176,187-197).

Naruszewicz ve ark., gönüllü insan deneklerine 4 hafta süreyle 157 mg akrilamidi gıda ile uygulamışlardır. 4 hafta sonra alınan kan örneklerinin biyokimyasal analizlerinde; hsCRP, γ -GT, ox-LDL ve IL-6 düzeylerinin önemli derecede arttığı, kandan izole edilen monosit, lenfosit ve granüositlerde aşırı bir SOR üretiminin meydana geldiği, hücre içi GSH seviyelerinin ciddi derecede azaldığı tespit edilmiştir. Bu araştırmacılar, uzun süre gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan insanlarda akrilamidin; oksidatif stres, inflamasyon ve ateroskleroz gelişimini tetikleyebileceğini bildirmişlerdir (197).

İnsan hepatoma hücre kültüründe yapılan araştırmalar da; akrilamidin kültür ortamına ilave edilmesi serbest oksijen radikallerinin üretimini artırarak oksidatif strese ve hücre hasarlanmalarına (gerek oksidatif ve gereksede genotoksik hasarlanmalar) neden olur. Ancak kültür ortamına akrilamidle beraber antioksidan özellik gösteren curcumin ve hidrokstitirosol maddelerinin katılması oksidatif stresi önlediği ve genotoksik etkileri önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da, NAC'nin akrilamidle beraber uygulanmasının ratlarda oksidatif stresi baskıladığı ve lenfositlerde oluşan akrilamid kaynaklı genotoksik hasarlanmaları ciddi derecede önlediği gösterilmiştir (194,195).

Srivastava ve ark. ratlara tek ve tekrarlayan dozlarda akrilamid uyguladıkları çalışmalarında, akrilamid'in beyin dokusunda GST aktivite ve GSH düzeylerini önemli derecede azalttığını, bunun sonucunda ise akrilamid kaynaklı oksidatif hasarlanmaların meydana geldiğini belirtmişlerdir (188).

Suriye Hamsterı Embriyo (SHE) kültürü kullanılarak yapılan bir araştırmada, 0.5 molar akrilamidin 7 gün süreyle uygulanması sonrası embriyo hücrelerinde bazı morfolojik değişiklikler meydana gelmiştir.

Akrilamid ile N-asetilsistein beraber uygulandığında morfolojik değişiklikler en düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Bir süre butionone sulfoksimin (GSH sentez inhibitörü) uygulanan embriyo kültürüne akrilamid ilave edilmesi, çok ciddi morfolojik değişikliklere neden olmuştur. Bu çalışmada, akrilamidin hücresele GSH seviyesini azalttığı, akrilamid uygulaması öncesi kültür ortamına butionone sulfoksimin ilave edilmesinin GSH seviyesini ciddi derecede düşürdüğü, akrilamidle NAC'nin beraber uygulanmasının hücresele GSH seviyesini artırdığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar, morfolojik değişikliklerin derecesinin hücresele GSH düzeyleri ile önemli bir korrelasyon gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır (191).

Bjorge ve ark. akrilamid uygulaması sonrası meydana gelen aşırı serbest oksijen radikallerinin, akrilamidin DNA'da meydana getirdiği hasarlanmalarda önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Ancak, antioksidan vitaminlerin akrilamidle beraber uygulanmasının, SOR'ları ortadan kaldırması nedeniyle akrilamid kaynaklı DNA hasarlarını önemli derecede azalttığı sonucuna varmışlardır (190).

Yapılan bir araştırmada, akut dozda akrilamid uygulanan ratlardan alınan karaciğer numunelerinde yapılan analizlerde tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinin düzeyini önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. Lipid peroksidasyonundaki bu artışın, karaciğer GSH düzeylerindeki azalmadan kaynaklandığı belirtilmiştir (198).

Akrilamid kaynaklı oksidatif hasarlanmaları ortaya koymak amacıyla yapılan en ciddi çalışma, Yousef ve El-Demerdash tarafından yapılmıştır. Bu araştırma erkek ratlara değişik dozlarda akrilamid uygulamasının farklı dokularda antioksidan enzim düzeyleri ve lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla ratların içme suyuna 0.5, 5, 25, 50, 250 ve 500 µg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde akrilamid ilave edilmiş ve 10 hafta süreyle uygulanmıştır. Akrilamid, plazma protein seviyelerini ve kreatin kinaz aktivitelerini önemli oranda azaltırken plazma fosfatazlarının seviyesini yükseltmiştir. Karaciğer ve testislerde transaminaz ve fosfataz aktiviteleri ciddi anlamda düşerken laktat dehidrojenaz seviyesinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Akrilamid uygulanan ratlarda,

tiyobarbitürik asit reaktifi ürünlerinde, glutatyon S-transferaz aktivite düzeylerinde ve plazma, karaciğer, testis, beyin ve böbrek dokusu süperoksit dismutaz seviyelerinde, uygulanan akrilamid dozuyla uyumlu bir artış, GSH düzeylerinde ise ciddi bir düşüş tespit edilmiştir. Bu araştırma sonuçları, akrilamidin toksik etkileri sebebiyle oksidatif strese ve enzim aktivitelerinde bir düzensizliğe sebep olduğunu ve bunun sonucunda da akrilamid kaynaklı doku hasarlanmalı meydana geldiği şeklinde yorumlanmıştır (199). Bizim yaptığımız araştırmada da akrilamid uygulaması sonrası, ince ve kalın bağırsak, karaciğer dokularında MDA düzeyleri ciddi derecede artarken GST aktivite ve GSH seviyeleri azalmıştır. Yousef ve El-Demerdash'ın yaptığı çalışmada ise, akrilamid uygulaması sonrası dokularda GST aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç bizim bulgularımızla uyum göstermemektedir. Bu uyumsuzluğun, Yousef ve El-Demerdash'ın uyguladığı akrilamid dozlarının çok düşük olmasından ve uygulama süresinin farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Bizim yaptığımız araştırmada, ratlara günlük 25 mg/kg dozda akrilamid 21 gün süreyle uygulanmıştır. Akrilamid uygulanan gruptan alınan ince bağırsak ve karaciğer doku örnekleri üzerinde yapılan histopatolojik incelemeler, akrilamid kaynaklı önemli doku hasarlanmalarının meydana geldiğini göstermektedir. Ancak Akrilamid+NAC grubu ratların histopatoloji sonuçları, NAC'ın akrilamid kaynaklı doku hasarlarını önemli derecede azalttığını ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada; akrilamid grubu serum, ince bağırsak ve karaciğer dokusu GSH ve GST aktivite düzeylerinin kontrol grubuna göre ciddi derecede düştüğü, MDA seviyelerinin ise önemli derecede artış gösterdiği, akrilamid+N-asetilsistein verilen ratlarda ise GSH ve GST aktivite düzeylerinin kontrol grubu değerlerine yaklaştığı, MDA'nın ise akrilamid grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir.

Elde edilen biyokimyasal, histopatolojik ve comet analiz sonuçları, akrilamidin ratlarda oksidatif strese neden olduğunu açıkca göstermektedir. Akrilamid grubu ratlardan alınan kan örneklerinden elde edilen lenfositlerde, akrilamidin ciddi derecede genotoksik etki meydana getirdiği görülmektedir. Akrilamidin N-asetilsistein ile beraber verildiği ratlarda, N-asetilsisteinin akrilamid kaynaklı genotoksisiteyi önemli derecede azalttığı ortaya konulmuştur (Şekil 4.12.).

Akrilamid verilen ratlardan alınan dokuların histopatolojik inceleme sonuçları, akrilamidin ince bağırsak ve karaciğerde önemli derecede doku hasarına yol açtığını göstermektedir. Ratlara N-asetilsistein verilmesi, bu doku hasarlanmalarını anlamlı derecede azaltmıştır (Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.).

Bu sonuçların ışığında, gıda kaynaklı akrilamid toksikasyonlarından korunabilmek için:

- 1- Gıdalar 120 °C'den yüksek sıcaklıklarda pişirilmemelidir. Eğer gıdaların 120 °C'den yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi tercih ediliyorsa, pişirme işlemi uzun sürede devam ettirilmemelidir.
- 2- Özellikle asparajın amino asidi bakımından zengin olan gıdaların (patates gibi) kızartılması yerine haşlanarak tüketilmesi tercih edilmelidir.
- 3- Gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan insanlar, sindirim kanalı dokularında ve karaciğerde GST aktivitesini artıran flavonoidlerden zengin sebze ve meyveleri yeterli miktarlarda ve günlük olarak tüketmelidir.
- 4- Gıdalar ile vücuda alınan akrilamid GSH ile konjuge edilerek vücut dışına atılırken, genel olarak hücrelerde bir GSH azalması meydana gelmekte ve akrilamid kaynaklı bir oksidatif stres oluşmaktadır. Ayrıca GSH azalması,

akrilamidin glisidamide dönüşümünü hızlandırmaktadır. Glisidamid yüksek derecede mutajen olan bir moleküldür. Akrilamid kaynaklı oksidatif stresin oluşumunu engellemek ve glisidamid kaynaklı genotoksisiteyi azaltmak için insanların, önemli bir GSH öncülü olan sistein amino asidinden zengin gıdaları yeterli miktarlarda ve günlük olarak tüketmesi gerekir.

5- Sürekli gıda kaynaklı akrilamide maruz kalan insanların, genel olarak vücudun antioksidan kapasitesini artıran maddeleri içeren gıdaları (özellikle domatesin likopeni, havucun β -karoteni, siyah üzümün resveratrolü gibi) günlük diyetlerinde yeterli miktarlarda tüketmelerini özellikle tavsiye ediyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Heath, Jr. CW., Falk, H., Creech, Jr. JL. (1975). Characteristics of cases of angiosarcoma of the liver among vinyl chloride workers in the United States. *Ann NY Acad Sci*, 246: 231–236.
2. Johnson, KA., Gorzinski, SJ., Bodner, KM., Campbell, R., Wolf, C., Friedman, M.A., and Mast, R.W. (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 85: 154–168.
3. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M. (2000). Acrylamide: a cooking carcinogen. *Chemical Res Toxicol*, 13: 517–522.
4. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agri Food Chem*, 50: 4998–5006.
5. Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization. (2002). Health Implications of Acrylamide in Food, Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Health Organization, Geneva. Available at <http://www.who.int/fsf/acrylamide/SummaryReportFinal.pdt>
6. U.S. Food and Drug Administration. The Action Plans for Acrylamide in Food. 2002-2005. Erişim: 18 Mayıs 2007. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/pestadd.html#acrylamide>
7. Erişim: 6 Eylül 2007. <http://www.news-medical.net/news/2005/06/19/11112.aspx>
8. Scherer, G., Engl, J., Urban, M., Gilch, G., Janket, D., Riedel, K. (2007). Relationship between machine-derived smoke yields and biomarkers in cigarette smokers in Germany. *Regul Toxicol Pharmacol*, 47: 171–183.
9. Huang, CCJ., Li, CM., Wu, CF., Jao, SP., Wu, KY. (2007) Analysis of urinary N-acetyl-S-(propionamide)-cysteine as a biomarker for the assessment of acrylamide exposure in smokers. *Environ Res*, 104: 346–351
10. Sharp, D. (2003). Acrylamide in food. *Lancet*, 361: 361-362.
11. Rosen, J., Hellenas, KE. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, 127: 880–882

12. Margaretha, J' agerstad., Kertsin, Skog b. (2005). Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res*, 574: 156-172
13. Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, AT. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419: 448-449
14. Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P.A., Robert, M.C., Riedikr, S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419: 449-450
15. Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety or acrylamide. *J Agric Food Chem*, 51: 4504 4526
16. Rice, J.M. (2005). The Carcinogenicity of acrylamide. *Mutat Res*, 3-20; 580.
17. Shipp, A., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T., Bartow, H., Bounds, J., Macdonald, N., Clewell, H., Allen, B., Van Landingham, C. (2006). Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Critical Rev Toxicol*, 36: 481–608
18. Calleman, C. (1996). The metabolism and pharmacokinetics of acrylamide: Implications for mechanisms of toxicity and human risk estimation. *Drug Metab Rev*, 28: 527–590
19. Dearfield, K., Douglas, G., Ehling, U., Moore, M., Sega, G., and Brusick, D.(1995). Acrylamide: A review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat Res*; 330: 71–99,
20. WHO. (1993). Revision of the WHO guidelines for drinking water quality. *Ann Ist Super Sanita*, 29(2): 335-45
21. Cavalli, S., Polesello, S., and Saccani, G. (2004). Determination of acrylamide in drinking water by large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography–mass spectrometry. *J Chromatog A*; 1039: 155-159
22. Blasiak J., Gloc, E., Wozniak, K., Czechowska, A. (2004). Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *Chemico-Biological Interac*, 149: 137-149
23. Lingnert, H., Grivas, S., Jagerstad, M., Skog, K., Törnqvist, M., Aman, P. (2002). Acrylamide in food: mechanism of formation and influencing factors during heating of foods. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 46(4): 159-172.

24. Tong, G.C., Cornwell, W.K., Means, G.E. (2004). Reactions of acrylamide with glutathione and serum albumin. *Toxicol Letters*, 147: 127-131
25. Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M. (2003). Shibamoto Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *T J Agric Food Chem*, 51(14): 3999-4003
26. Becalski, A., Lau, B.P., Lewis, D., Seaman, S.W. (2003). Acrylamide in French fries: influence of free amino acids and sugars. *J Agric Food Chem*, 51(3): 802-8
27. Biederman, M., Grob, K. (2003). Model studies on acrylamide formation in potato, wheat flour and corn starch: ways to reduce acrylamide contents in bakery ware. *Mitteilungen fu" r Lebensmittel Hygiene*, 94: 406-422
28. Surdyk, N., Rosén, J., Andersson, R., Aman, P. (2004). Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. *J Agric Food Chem*, 52(7): 2047-51
29. Bergmark, E., Calleman, C.J., He, F., Costa, L.G. (1993). Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol Appl Pharmacol*, 120: 45-54
30. Paulsson, B., Grawe, J., Tornqvist, M. (2002). Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or *N*-methylolacrylamide treatment. *Mutat Res*, 516: 101-111
31. Solomon, J.J., Fedyk, J., Mukai, F., Segal, A. (1985). Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res*, 45: 3465-3470.
32. Paulsson, B., Kotova, N., Grawe, J., Henderson, A., Granath, F., Golding, B., Tornqvist, M. (2003). Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutat Res*, 535: 15-24
33. Segerback, D., Calleman, C.J., Schroeder, J.L., Costa, L.G., Faustman, E.M. (1995). Formation of *N*-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide. *Carcinogenesis*, 16: 1161-1165
34. Gamboa da Costa, G., Churchwell, M.I., Hamilton, L.P., Beland, F.A., Marques, M.M., Doerge, D.R. (2003). DNA adduct formation from acrylamide

via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem Res Toxicol*, 16: 1328–1337

35. Ikeda, G., Miller, E., Sapienza, P., Mchel, T., and Inskeep, P. (1987). Comparative tissue distribution and excretion of [1–¹⁴C]-acrylamide in beagle dogs and miniature pigs. *Food Chem Toxicol*, 25(11): 871–875

36. Barber, D., Hunt, J., Ehrich, M., Lehning, E., and LoPachin, R. (2001). Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. *Neurotoxicol*; 22: 341–353.

37. Doerge, D., Young, J., McDaniel, L., Twaddle, N., and Churchwill, M. (2005a). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 208: 199–209..

38. Doerge, D., Young, J., McDaniel, L., Twaddle, N., and Churchwell, M. (2005b). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 202: 258–267

39. Doerge, D., Costa, G., McDaniel, L., Churchwell, M., Twaddle, N., and Beland, F. (2005c). DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat Res*, 580: 131–141

40. Miller, M.J., Carter, D.E., and Sipes, I.G. (1982). Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 63: 36–44

41. Twaddle, N., McDaniel, L., Costa, G., Churchwell, M., Beland, F., and Doerge, D. (2004). Determination of acrylamide and glycidamide serum toxicokinetics in B6C3F mice using LC-ES/MS/MS. *Cancer Lett*, 207: 9–17.

42. Fennell, T., Sumner, S., Snyder, R., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W., and Friedman, M. (2005). Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol Sci*, 85: 447–459.

43. Fuhr, U., Doettcher, M., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., Taubert, D., Tomalik-Scharte, D., Paurana, P., Jakob, V., Harlfinger, S., Klaassen, T., Berkessel, A., Angerer, J., Sorgel, F., and Schomig, E. (2006). Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(2): 266–271

44. Sumner, S.C., Selvaraj, L., Nauhaus, S.K., Fennell, T.R. (1997). Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 days. *Chem Res Toxicol*, 10: 1152–1160.
45. Sumner, S., Fennell, T., Moore, T., Chanas, B., Gonzalez, F., and Ghanayem, B. (1999b). Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol*, 12: 1110–1116
46. Sumner, S., Williams, C., Snyder, R., Krol, W., Asgharian, B., and Fennell, T. (2003). Acrylamide: A comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicol Sci*, 75(2): 260–270
47. Frantz, S., Dryzga, M., Freshour, N., and Watanabe, P. (1985). In vitro/in vivo determination of cutaneous penetration by residual acrylamide monomer from polyacrylamide water solutions. *Toxicologist*, 5: 39
48. Ramsey, J., Young, J., and Gorzinski, S. (1984). Acrylamide: Toxicodynamics in the Rat. Dow Chemical Company. Midland, Michigan 48640, USA.
49. Diembeck, W., Dusing, H., and Akhiani, M. (1998). Dermal absorption and penetration of acrylamide ([C14]-acrylamide as tracer) in different cosmetic formulations and polyacrylamide-solution after topical application to excised pig skin. Beiersdorf: Report 7061/PEN.203 for the Acrylamide Monomer Producers Association
50. Hashimoto, K., and Aldridge, W. (1970) Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochem Pharmacol*, 19(9): 2591–2604
51. Marlowe, C., Clark, M., Mast, R., Friedman, M., and Waddell, W. (1986). The distribution of (14C)acrylamide in male and pregnant swiss-webster mice by whole body autoradiography. *Toxicol Appl Pharmacol*, 86: 457–465.
52. Ikeda, G.J., Miller, E., Sapienza, P., Michel, T.C., King, M., Turner, V.A., Blumenthal, H., Jackson, W.E.3rd., and Levin, S. (1983). Distribution of 14C-labelled acrylamide and betaine in fetuses of rats, rabbits, beagle dogs and miniature pigs. *Food Chem Toxicol*, 21(1): 49–58
53. Dybing, E., Farmer, P.B., Andersen, M., Fennell, T.R., Lalljie, S.P., Müller, D.J., Olin, S., Petersen, B.J., Schlatter, J., Scholz, G., Scimeca, J.A., Slimani,

N., Törnqvist, M., Tuijelaars, S., Verger, P. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol*, 43(3): 365-410.

54. Sumner, S.C., MacNeela, J.P., and Fennell, T.R. (1992). Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]-acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Res Toxicol*, 5: 81-89

55. Calleman, C.J., Bergmark, E., Costa, L.G. (1990). Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem Res Toxicol*, 3: 406-412.

56. Kirman, C., Gargas, M., Deskin, R., Tonner-Navarro, L. and Andersen, M. (2003). A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat. *J Toxicol Environ Health*, 66(3): 253-274

57. Ghanayem, B., Witt, K., Kissling, G., Tice, R., and Recio, L. (2005). Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CYP2E1-null mice: Evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. *Mutat Res*, 578(1-2): 284-297

58. Kadry, A., Friedman, M., and Abdel-Rahman, M. (1999). Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 7: 127-133

59. Mukhtar, H., Dixit, R., and Seth, P. (1981). Reduction in cutaneous and hepatic glutathione contents, glutathione-S-transferases and aryl hydrocarbon hydroxylase activities following topical application of acrylamide to mouse. *Toxicol Lett*, 9: 153-156.

60. Sörgel, F., Wiessenbacher, R., Knizig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M., Skott, A., Landersdorfer, C. (2002). Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy*, 48: 267-274.

61. Yang, H.J., Lee, S.H., Jin, Y., Choi, J.H., Han, D.U., Chae, C., Lee, M.H., and Han, H.C. (2005). Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reproductive Toxicol*, 19: 527- 534

- 62.** Friedman, M.A., Dulak, L.H., Stedham, M. (1995). A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundam Appl Toxicol*, 27: 95–105
- 63.** Collins, J.J., Swaen, G.M., Marsh, G.M., Utidjian, H.M., Caporossi, J.C., Lucas, L.J. (1989). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide. *J Occup Med*, 31: 614–617
- 64.** Swaen, G.M., Haidar, S., Burns, C.J., Bodner, K., Parsons, T., Collins, J.J., Baase, C. (2007). Mortality study update of acrylamide workers. *J Occup Environ Med*, 64: 396–401
- 65.** Marsh, G.M., Lucas, L.J., Youk, A.O., Schall, L.C. (1999). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *J Occup Environ Med*, 56: 181–190.
- 66.** Marsh, G.M., Youk, A.O., Buchanich, J.M., Kant, I.J., Swaen, G. (2007). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: updated follow up. *J Occup Environ Med*, 49: 82–95
- 67.** Mucci, L.A., Wilson, K.M. (2008). Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *J Agric Food Chem*, 56: 6013–6019
- 68.** Hogervorst, J.G., Schouten, L.J., Konings, E.J., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A. (2008a). Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. *Am J Clin Nutr*, 87: 1428–1438
- 69.** Hogervorst, J.G., Schouten, L.J., Konings, E.J., Goldbohm, R.A., van den Brandt, R.A. (2008b). Dietary acrylamide intake is not associated with gastrointestinal cancer risk. *J Nutr*, 138: 2229–2236
- 70.** Olesen, P.T., Olsen, A., Frandsen, H., Frederiksen, K., Overvad, K., Tjønneland, A. (2008). Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *Int J Cancer*, 122: 2094–2100
- 71.** Spencer, P.S., Sabri, M.I., Schaumburg, H.H., Moore, C.L. (1978). Does a defect of energy metabolism in the nerve fiber underlie axonal degeneration in polyneuropathies? *Ann Neurol*, 5: 501–507
- 72.** Sickles, D.W., Goldstein, B.D. (1986). Acrylamide produces a direct dose dependent and specific inhibition of oxidative metabolism in motoneurons. *Neurotoxicol*, 7: 187–196

- 73.** Clements, R.S. (1979). Diabetic neuropathy new concepts in its etiology. *Diabetes*, 28: 604–611
- 74.** Fullerton, P., and Barnes, J. (1966) Peripheral neuropathy in rats produced by acrylamide. *Br J Ind Med*, 23: 210–221
- 75.** Tilson, H., Cabe, P., and Spencer, P. (1979). Acrylamide neurotoxicity in rats: A correlated neurobehavioral and pathological study. *Neurotoxicol*, 1(1): 89–104.
- 76.** Yoshimura, S., Imai, K., Saitoh, Y., Yamaguchi, H., and Ohtaki, S. (1992). The same chemicals induce different neurotoxicity when administered in high doses for short term or low doses for long term to rats and dogs. *Mol Chem Neuropathol*, 16: 59–84
- 77.** Goldstein, BD. (1985). Acrylamide neurotoxicity: altered spinal monosynaptic response to quipazine, a serotonin agonist in cats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 78: 436–44.
- 78.** LoPachin, RM., Ross, JF., Lehning, EJ. (2002a). Nerve terminals as the primary site of acrylamide action. *NeuroToxicology*, 23: 43–59
- 79.** Gold, B., Griffin, J., and Price, D. (1985). Slow axonal transport in acrylamide neuropathy, different abnormalities produced by single dose and continuous administration. *J Neurosci*, 5(7): 1755–1768
- 80.** Tani, H., and Hashimoto, K. (1983). Neurotoxicity of acrylamide and related compounds in rats: Effects on rotarod performance, morphology of nerves and neurotubulin. *Arch Toxicol*, 54(3): 203–213
- 81.** Crofton, KM., Padilla, S., Tilson, HA., Anthony, DC., Raymer, JH., MacPhail, RC. (1996) The impact of dose rate on the neurotoxicity of acrylamide: the interaction of administered dose, target tissue concentrations, tissue damage, and functional effects. *Toxicol Appl Pharmacol*, 139: 163–76
- 82.** LoPachin, RM., Ross, JF., Reid, ML., Dasgupta, S., Mansukhani, S., Lehning, EJ. (2002b). Neurological evaluation of toxic axonopathies in rats: acrylamide and 2,5-hexanedione. *NeuroToxicology*, 23: 95–110

- 83.** Tilson, HA., Cabe, PA. (1979). The effects of acrylamide given acutely or in repeated doses on fore- and hindlimb function of rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 47: 253–60.
- 84.** Cranmer, JM., Atchison, WD., Canday, RA., Lawler, CP., LoPachin, RM., O’Shaughnessy, DC., Rice, DC., Slikker, W. (2003). International Neurotoxicology Conference, Little Rock, AR. *NeuroToxicology*, 24(2): 269-317
- 85.** Hashimoto, K., Sakamoto, J., and Tanii, H. (1981). Neurotoxicity of acrylamide and related compounds and their effects on male gonads in mice. *Arch Toxicol*, 47: 179–189
- 86.** Schotman, P., Gipon, L., Jennekens, F., and Gispen, W. (1978). Polyneuropathies and CNS protein metabolism. III. Changes in protein synthesis rate induced by acrylamide intoxication. *J Neuropathol Exp Neurol*, 37(6): 820–837
- 87.** He, F., Zhang, S., Wang, H. (1989). Neurological and electroneuromyographic assessment of the adverse effects of acrylamide on occupationally exposed workers. *Scand J Work Environ Health*, 15: 125–9
- 88.** Lehning, E., Persaud, A., Dyer, K., Jortner, B. and Lopachin, R. (1998). Biochemical and morphologic characterization of acrylamide peripheral neuropathy. *Toxicol Appl Pharmacol*, 151(2): 211–221
- 89.** Aldous, C., Farr, C. and Sharma, R. (1983). Evaluation of acrylamide treatment on levels of major brain biogenic amines, their turnover rates, and metabolites. *Fundam Appl Toxicol*, 3(3): 182–186.
- 90.** Deng, H., He, S., Zhang, S. (1993). Quantitative measurements of vibration threshold in healthy adults and acrylamide workers. *Int Arch Occup Environ Health*, 65: 53–6
- 91.** Dearfield, K.L., Douglas, G.R., Ehling, U.H., Moore, M.M., G.A., Brusick, D.J. (1995). Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat. Res*, 330: 71-99
- 92.** Favor, J., Shelby, MD. (2005). Transmitted mutational events induced in mouse germ cells following acrylamide or glycidamide exposure. *Mutat Res*, 580: 21–30

- 93.** International Agency for Research on Cancer (IARC). (1994). Acrylamide, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Industrial Chemicals. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 60: 389-433
- 94.** Besaratinia, A., Pfeifer, GP. (2003). Weak yet distinct mutagenicity of acrylamide in mammalian cells. *J Natl Cancer Inst*, 95: 889–896
- 95.** Besaratinia, A., Pfeifer, GP. (2004). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. *J Natl Cancer Inst*, 96: 1023–1029
- 96.** Bull, R.J., Robinson, M., Laurie, R.D., Stoner, G.D., Greisiger, E., Meier, J.R., Stober, J.(1984). Carcinogenic effects of acrylamide in SENCAR and A/J mice. *Cancer Res*, 44: 107–111
- 97.** Hogervorst, J.G., Schouten, L.J., Konings, E.J., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A. (2007). A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomar Prev*, 16: 2304–2313
- 98.** Bull, R.J., Robinson, M., Stober J.A. (1984). Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice. *Cancer Lett*, 24: 209-212
- 99.** Svensson, K., Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellenas K.E., Lind, Y., Rosen, J.(2003). Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem Toxicol*, 41: 1581-1586
- 100.** Konings, E.J.M., Baars, A.J., van Klaveren, J.D., Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Hiemstra, M., van Kooij, J.A., Peters, P.W.J. (2003). Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks. *Food Chem Toxicol*, 41: 1569-1579
- 101.** Dybing, E., Sanner, T. (2003). Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicol Sci*, 75: 7-15
- 102.** Pelucchi, C., Galeone, C., Levi, F., ve diğerleri. (2006). Dietary acrylamide and human cancer. *Int J Cancer*, 118: 467 – 71
- 103.** Mucci, L.A., Dickman, P.W., Steineck, G., Adami, H.-O., Augustsson, K. (2003). Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder. Absence of an association in a population-based study in Sweden. *Br J Cancer*, 88: 84-89

- 104.** Hagmar, L., Tornqvist, M. (2003). Letter to the editor: inconclusive results from an epidemiological study on dietary acrylamide and cancer. *Br J Cancer*, 89: 774-776
- 105.** Pelucchi, C., Franceschi, S., Levi, F., Trichopoulos, D., Bosetti, C., Negri, E., La Vecchia, C. (2003). Fried potatoes and human cancer. *Int J Cancer*, 105: 558-560
- 106.** Beer, M.U., Schlatter, J., Dudler, V., Zoller, O. (2004). Letter to the editor: fried potatoes and human cancer. *Int J Cancer*, 108: 634-635
- 107.** Mucci, L.A., Lindblad, P., Steineck, G., Adami, H.-O. (2004). Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. *Int J Cancer*, 109: 774-776
- 108.** Sobel, W., Bond, G.G., Parsons, T.W., Brenner, F.E. (1986). Acrylamide cohort mortality study. *Br J Ind Med*, 43: 785-788
- 109.** Granath, F.N., Vaca, C.E., Ehrenberg, L.G., Tornqvist, M.A. (1999). Cancer risk estimation of genotoxic chemicals based on target dose and a multiplicative model. *Risk Anal*, 19: 309-320
- 110.** Calleman, J., Stern, L.G., Bergmark, E., Costa, L.G. (1992). Linear versus nonlinear models for hemoglobin adduct formation by acrylamide and its metabolite glycidamide: implications for risk estimation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1: 361-366
- 111.** Paulsson, B., Granath, F., Grawe, J., Ehrenberg, L., Tornqvist, M. (2001). The multiplicative model for cancer risk assessment: applicability to acrylamide. *Carcinogenesis*, 22: 817-819
- 112.** Ruden, C. (2004). Acrylamide and cancer risk-expert risk assessments and the public debate. *Food Chem Toxicol*, 42: 335-349
- 113.** International Agency for Research on Cancer (IARC). (1986). Acrylamide, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Chemicals Used in Plastics and Elastomers. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 39: 41-66
- 114.** American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). (1991). Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices for 1988-1989. Cincinnati, OH, 14: sixth ed, 23-25

- 115.** American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). (2001). Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH, 7th Ed.
- 116.** Swedish National Chemicals Inspectorate. (1989). Utvardering av cancerframkallande amnen I. KEMI rapport 11/89
- 117.** Molak, V. (1991). NIOH (National Institute of Occupational Health, Solna, Sweden) and NIOSH Basis for an Occupational Health Standard. Acrylamide: A Review of the Literature (DHHS (NIOSH). Cincinnati, OH, National Institute for Occupational Safety and Health, Publ. No. 91-115.
- 118.** US Environmental Protection Agency. (1993) Integrated Risk Information System (IRIS), Acrylamide. Available at <http://www.epa.gov/iris>
- 119.** US National Toxicology Program. (2002). 10th Report on Carcinogens, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, Research Triangle Park, North Carolina
- 120.** Norwegian Food Control Authority. (2002). Risk Assessment of Acrylamide Intake from Foods with Special Emphasis on Cancer Risk, Report from the Scientific Committee of the Norwegian Food Control Authority, Oslo. Available at <http://www.snt.no>
- 121.** Troxell T, and Posnick L. U.S. Action Plan for Acrylamide Activities and Progress. FAO/WHO Seminar on Acrylamide in Food. U.S. FDA, March 16, 2003. Erişim, 7 Temmuz 2008, www.fao.org/ag/agn/jecfa/acrylamide/troxell/Troxell.ppt
- 122.** Gıdalarda akrilamid. Erişim: 25.05.2008. <http://www.zaman.com.tr/haber.do?haberno=143461>
- 123.** EU. (2003). Information on Ways to Lower the Levels of Acrylamide Formed in Food (note of the meeting of experts on industrial contaminants in food: acrylamide workshop, 20–21 October 2003). Available at http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/acryl_guidance.pdf
- 124.** Meister, A., Larsson, A. (1989). Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the γ -glutamyl cycle. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS,

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

125. Griffith, OW., Meister, A. (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82:4668–72

126. Martensson, J., Lai, JCK., Meister, A. (1990). High affinity transport of glutathione is part of a multi-component system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87:7185–9.

127. Chai, YC., Ashraf, SS., Rokutan, K., Johnston, Jr. RB., Thomas, JA. (1994). S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*, 310:273– 81

128. Chen, Z., Lash, LH. (1998). Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J Pharmacol Exp Ther*, 285: 608– 18

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

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

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

132. Meister, A., Anderson, ME. (1983). Glutathione. *Ann Rev Biochem*, 52: 711 –60.

133. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. (2003). Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333: 19–39

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

135. Meister, A., Bukenberger, MW. (1962). Enzymatic conversion of D-glutamic acid to D-pyrrolidone carboxylic acid by mammalian tissues. *Nature*, 194: 557–61

- 136.** Meister, A., Tate, SS., Ross, LL. (1976). Membrane bound γ -glutamyl transpeptidase. In: Martinosi A, editor. The enzymes of biological membranes, vol. 3. *New York: Plenum*, 315–47
- 137.** Meister, A. (1978). Current status of the γ -glutamyl cycle. Functions of glutathione in liver and kidney. *Berlin: Springer-Verlag*, 43–59
- 138.** Griffith, OW., Meister, A. (1979). Glutathione: Interorgan translocation, turnover and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 5606–10
- 139.** Danielson, UH., Mannervik, B. (1985). Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *Biochem J*, 231: 263-267
- 140.** Hayes, J.D. and Pulford, D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30: 445-600
- 141.** Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., van Zanden, J., van Bladeren, P.J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol*, 10: 141-152.
- 142.** Fryer, A.A., Hume, R., and Strange, R. C. (1986). The development of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in human lung. *Biochim Biophys Acta*, 883: 448–453
- 143.** Forkert, P. G., D'Costa, D. and El-Mestrah, M. (1999). Expression and inducibility of alpha, pi, and Mu glutathione S-transferase protein and mRNA in murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 143–152
- 144.** Hu, X., Xia, H., Srivastava, S. K., Herzog, C., Awasthi, Y. C., Ji, X., Zimniak, P. and Singh, S. V. (1997). Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun*, 238: 397–402
- 145.** Sundberg, K., Johansson, A. S., Stenberg, G., Widersten, M., Seidel, A., Mannervik, B. and Jernstrom, B. (1998). Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*, 19: 433–436

- 146.** Ishii, T., Matsuse, T., Igarashi, H., Masuda, M., Teramoto, S. and Ouchi, Y. (2001). Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: Protective effect of glutathione S-transferase P1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280: 1189–1195
- 147.** Harries, L.W., Stubbins, M.J., Forman, D., Howard, G.C. and Wolf, C.R. (1997). Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, 18: 641–644
- 148.** Ryberg, D., Skaug, V., Hewer, A., Phillips, D.H., Harries, L.W., Wolf, C. R., Ogreid, D., Ulvik, A., Vu, P. and Haugen, A. (1997). Genotypes of glutathione transferase m1 and p1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*, 18: 1285–1289
- 149.** Sherratt, P.J., Hayes, J.D. (2002). Glutathione S-transferases In Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics (Ionnides C, Editor). John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, UK, 319-352.
- 150.** Dekant, W. (2001). Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S conjugate formation. *Toxicology Letters*, 124: 21-36
- 151.** Porter, N.A. (1986). Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc Chem Res*, 19: 262–268
- 152.** Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1989). Free radicals in biology and medicine (2nd ed). Oxford. Clarendon Press.
- 153.** Sies, H. (1991). Oxidative stress, oxidants and antioxidants, New York: Academic Pres
- 154.** Von Sonntag, C. (1987). The chemical basis of radiation biology. London: Taylor and Francis
- 155.** Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutase: an adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*, 264: 7761-4
- 156.** Saran, M., Michael, C. Bors, W. (1989). Reactions of NO with O₂⁻. Implications for the Action for the action of endothelium-derived relaxing factor. *Free Radic Res Commun*, 10: 221-6

- 157.** Radi, R., Beckman, iS., Bush, KM. et al. (1990). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*, 266: 4244-50
- 158.** Frankel, EN. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Int Sci Food Agric*, 54: 495-511
- 159.** Esterbauer, H. Schaur, RG., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde, and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11: 81-128
- 160.** Lawrence, J.M. and Adrienne, B. (1987). Free radical tissue damage : protective role of antioxidant nutriens. *FASEB J*, 1: 441-445
- 161.** Slater, F.T. (1984). Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*, 222: 1-15
- 162.** Elman, G.L. (1979). Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 95: 351-358
- 163.** Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbutiric acid reaction. *Anal Biochem*, 95: 351-358
- 164.** Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby. W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249: 7130-7139
- 165.** Eisenthal, R. And Danson, M.J. (1998). Enzyme assays, Oxfort University Pres, 330
- 166.** Singh, NP., Tice, RE., Stephens, RE., Schneider, EL. (1993). A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat. Res*, 252 (3): 289–296
- 167.** Testa, B. and Kramer SD. (2008). The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction: Reactions of Conjugation and Their Enzymes. *Chem Biodiver*, 5: 2171-2336.
- 168.** Testa, B. and Kramer SD. (2007). The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction: Redox Reactions and Their Enzymes. *Chem Biodiver*, 4: 252-405.

- 169.** Dekant, W. and Vamvakas, S. (1993). Glutathione-dependent bioactivation of xenobiotics. *Xenobiotica*, 23: 873–887.
- 170.** Commandeur, JNM., Stijntjes, GJ., Vermeulen, NPE. (1995). Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Pharmacol Rev*, 47: 271–330.
- 171.** WHO. (2005) . ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf
- 172.** Kopp, EK., Sieber, M., Kellert, M., Dekant, W. (2008). Rapid and sensitive HILIC-ESI_MS/MS quantitation of polar metabolites of acrylamide in human urine column switching with an on-line trap column. *J Agr Food Chem*, 56 (21); 9828-9834
- 173.** Bergmark, E. (1997). Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chem Res Toxicol*, 10(1); 78-84
- 174.** Schettgen, T., Weiss, T., Drexler, H., Angerer, J. (2003). A first approach to estimate internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *Int J Hyg Environ Health*, 206; 9-14
- 175.** Lieshout, EMMV., Bedaf, MMG., Pieter, M., Ekkel, C., Nijhoff, WA. and Peters, WHM. (1998). Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1-1 levels. *Carcinogenesis*, 11(4); 2055-2057
- 176.** Puppel, N., Tjaden, Z., Fueller, F., Makro, D. (2005). DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutation Research*, 580; 71–80
- 177.** Fennel, T.R., Friedman, M.A. (2005). Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. In: Friedman, Mottram (Eds.). Chemistry and Safety of Acrylamide in Food. *Springer Science*, 51(16): 4504-4526
- 178.** Östling, O., Johanson, KJ. (1984). Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123; 291–298.
- 179.** Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinai, N., Honma, M.

(2006). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res*, 603; 151-158

180. Mani`ere, I., Godard, T., Doerge, DR., Churchwell, MI., Guffroy, M., Laurentie, M., Poul, JM. (2005). DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutat Res*, 580; 119–129

181. Sega, GA., Alcota, RPV., Tancongco, CP., Brimer, PA. (1989). Acrylamide binding to the DNA and protamines of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage. *Mutat Res*, 216; 221–230.

182. Sega, GA. and Generoso, EE. (1990). Measurement of DNA breakage in specific germ cell stages of male mice exposed to acrylamide, using an alkaline-elution procedure. *Mutat Res*, 242; 79–87.

183. Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human. *Am J Med*, 91; 314-22.

184. Cheeseman, KH., Slater, TF. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49(3); 479-80.

185. Akkuş, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza Basın Yayın dağıtım. Konya; 32-42.

186. Bast, A., Haenen, GRMM., Doelman, CJA. (1991). Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am J Med*, 91; 302-313

187. Speit, G., Dennog, C., Radermacher, P., Rothfuss, A. (2002). Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat Res*, 512 (2-3); 111–9.

188. Srivastava, S., Sabri, MI., Agrawal, AK., Seth, PK. (1986). Effect of single and repeated doses of acrylamide and bis-acrylamide on glutathione-S-transferase and dopamine receptors in rat brain. *Brain Res*, 371; 319- 323.

189. Odland, L., Romert, L., Clemedson, C.,Walum, E. (1994). Glutathione content, glutathione transferase activity and lipid peroxidation in acrylamide-treated neuroblastoma N1E 115 cells. *Toxicol In Vitro*, 8; 263–267.

190. Bjorge, C., Brunborg, G., Wiger, R., Holme, JA., Scholz, T., Dybing, E. and Soderlund, EJ. (1996). A comparative study of chemically induced DNA damage in isolated human and rat testicular cells. *Reprod Toxicol*, 10; 509–519.

- 191.** Park, J., Kamendulis, LM., Friedman, MA. and Klauning, JE. (2002). Acrylamide-Induced Cellular Transformation. *Toxicol Sci*, 65; 177-183
- 192.** Shukla, PK., Khanna, VK., Ali, MM., Maurya, RR., Handa, SS. and Srimal, RC. (2002). Protective Effect of *Acorus calamus* Against Acrylamide Induced Neurotoxicity. *Phytother Res*, 16; 256–260.
- 193.** Biswas, S.K., McClure, D., Jimenez, L.A., Megson, I.L., Rahman, I. (2005). Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: Mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxid Redox Signal*, 7; 32-41
- 194.** Cao, J., Liu, Y., Jia, L., Jiang, L.P., Geng, C.Y., Yao, X.F., Kong, Y., Jiang, B.N. and Zhong, L.F. (2008). Curcumin Attenuates Acrylamide-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in HepG2 Cells by ROS Scavenging. *J Agric Food Chem*, 56; 12059-12063.
- 195.** Zhang, X., Jiang, L., Geng, C., Yoshimura, H., Zhong, L. (2008). Inhibition of acrylamide genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by the antioxidant hydroxytyrosol. *Chemico-Biological Interactions*, 176; 173–178.
- 196.** Zhu, Y.J., Zeng, T., Zhu, Y.B., Yu, S.F., Wang, Q.S., Zhang, L.P., Guo, X. and Xie, K.Q. (2008). Effects of Acrylamide on the Nervous Tissue Antioxidant System and Sciatic Nerve Electrophysiology in the Rat. *Neurochem Res*, 33; 2310–2317
- 197.** Naruszewicz, M., Zapolska-Downar, D., Kośmider, A., Nowicka, G., Kozłowska-Wojciechowska, M., Vikström, A.S., Törnqvist, M. (2009). Chronic intake of potato chips in humans increases the production of reactive oxygen radicals by leukocytes and increases plasma C-reactive protein: a pilot study. *Am J Clin Nutr*, 89(3); 773-777.
- 198.** Srivastava, S.P., Das, M., Seth, P.R. (1983). Enhancement of lipid peroxidation in rat liver on acute exposure to styrene and acrylamide. A consequence of glutathione depletion. *Chemico-Biol Int*, 45; 373–380.
- 199.** Yousef, M.I., El-Demerdash, F.M. (2006). Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*, 219; 133–141

ÖZGEÇMİŞ

05.07.1979 yılında Karabük'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Karabük'te tamamladıktan sonra 1996 yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı. 2001 yılında mezun oldu. 2001-2002 yıllarında İstanbul Teknik Üniversitesi Vakfının İngilizce Dil Eğitim Kursuna katıldı. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Doktora Başladı.