



**T. C.**

**ORDU ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKRİLAMİDİN İNSAN AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİ  
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTESİ, GENOTOKSİSİTESİ VE  
KARSİNOJENİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SEVAL KONTAŞ YEDİER**

**DOKTORA TEZİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**ORDU 2021**



## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**SEVAL KONTAŞ YEDİER**

**Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün BD-1704 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### AKRİLAMİDİN İNSAN AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTESİ, GENOTOKSİSİTESİ VE KARSİNOJENİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

SEVAL KONTAŞ YEDİER

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ, 160 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. ZÜLAL ATLI ŞEKEROĞLU)

Kimyasal olarak sentezlenen ve bir vinil monomeri olan akrilamid (ACR), endüstriyel ve ticari olarak çeşitli alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Endüstriyel kullanımının yanı sıra, ACR'nin yüksek sıcaklıklarda hazırlanan gıdalarda oluştuğu ve sigara dumanında bulunduğu deneysel birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle ACR'nin insanlar üzerindeki olası sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkilerinin değerlendirilmesi büyük önem arz etmektedir. ACR ile ilgili bazı çalışmalar kanser oluşumu ile pozitif ilişki kurarken, bazıları ise kanser oluşumu için ACR'nin vücuda alım şeklinin önemli olduğu şeklindeki görüşleri desteklemiştir. ACR maruziyeti ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir. ACR'nin insana ait akciğer hücrelerindeki sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkileri ilk kez bizim çalışmamız ile araştırılmıştır.

ACR'nin sitotoksitesisi MTT testi ile; genotoksitesisi  $\gamma$ -H2AX ve 53BP1 kolokalizasyon testi ve Comet testi ile belirlenmiştir. ACR'nin karsinojenitesi de, neoplastik transformasyon testi (kontakt inhibisyon testi) ve soft agar koloni oluşum testi (ankraj bağımsız büyüme testi) ile değerlendirilmiştir. ACR'nin deneylerde kullanılacak konsantrasyonlarının ve BEAS-2B hücre hattı için IC50 değerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 mM'lık ACR konsantrasyonları 24, 48, 72 saatlik maruziyet sürelerinde hücrelere uygulanmış ve MTT testi gerçekleştirilmiştir. 1 mM'lık konsantrasyona kadarki muamelelerde düşük bir sitotoksitesite gözlenirken, 1 mM'dan itibaren sitotoksitesinin artmaya başladığı ve test edilen en yüksek konsantrasyonlar olan 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda ise sitotoksiteside ciddi artışlar olduğu tespit edilmiştir. Uygulanacak deneyler için kullanılacak ACR konsantrasyonları 0.5, 1 ve 2 mM olarak belirlenmiştir.

ACR'nin 24 saatlik maruziyetinde ko-lokalle olan odaklar hariç,  $\gamma$ -H2AX ve 53BP1 odaklarındaki artışların konsantrasyon artışına bağlı olduğu görülmüştür. 48 ve 72 saatlik uygulamalar sonucu ise, hem  $\gamma$ -H2AX, hem 53BP1 hem de ko-lokalle odak sayıları konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. ACR'nin tüm konsantrasyonlarında ve muamele sürelerinde kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk momenti ve olive kuyruk momenti değerlerinde artışlar tespit edilmiştir. Neoplastik transformasyon testinde, 72 saatlik ACR muamelesini takiben BEAS-2B

hücrelerinde negatif kontrol ile kıyaslandığında çeşitli morfolojik değişikliklerin meydana geldiği görülmüştür. Soft agar koloni oluşum testinde, en yüksek koloni sayısı 2 mM'lık konsantrasyonda saptanmıştır. Sonuçlara göre 72 saatlik ACR uygulaması sonrasında, transformasyona uğrayan ve soft agarda büyüyen kolonilerin sayısında doza bağlı bir artış gözlemlenmiştir.

Sonuçlarımız ACR'nin akciğer bronşial epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere ve DNA hasarına yol açabileceğini göstermiştir. Çalışmamız ACR maruziyetinin, hücrelerin morfolojilerindeki değişimleri, DNA çift zincir kırıklarının oluşumunu, proliferasyonun ve transformasyonun artışını ve transforme hücrelerin ankorajdan bağımsız bölünme ve büyüme yeteneği kazanmalarını indüklediği açıkça görülmektedir. Bu nedenle bu çalışma sonuçları, ACR maruziyetinin akciğer hücrelerinde karsinogenezi indükleyebileceği ve akciğer kanseri oluşumu açısından bir risk olabileceği hipotezini desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** 53BP1, Akrilamid, Comet Testi, Genotoksisite, İnsan Akciğer Hücresi, Karsinojenite, Sitotoksisite,  $\gamma$ -H2AX.

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY AND CARCINOGENICITY OF ACRYLAMIDE ON HUMAN LUNG EPITHELIAL CELLS**

**SEVAL KONTAŞ YEDİER**

**ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED  
SCIENCES**

**MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

**PHD THESIS, 160 PAGES**

**SUPERVISOR: Prof. Dr. ZÜLAL ATLI ŞEKEROĞLU**

Acrylamide (ACR), a vinyl monomer, is chemically synthesized and frequently used in various industrial and commercial areas. In addition to its industrial use, it has been shown in many experimental studies that ACR occurs in foods prepared at high temperatures and is in cigarette smoke. Therefore, evaluation of the possible cytotoxic, genotoxic and carcinogenic effects of ACR on humans is very important. While some studies about ACR have established a positive relationship with cancer formation, the others have supported the routes for ACR to enter the body is important for cancer formation. The relationship between ACR exposure and lung cancer risk is not fully known. The cytotoxic, genotoxic, and carcinogenic effects of ACR in human lung cells are investigated for the first time in our study.

Cytotoxicity of ACR was determined by MTT test, and its genotoxicity was determined by  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 co-localization test and comet Test. The carcinogenicity of ACR was also evaluated by the neoplastic transformation test (contact inhibition test) and soft agar colony formation test (anchorage independent growth test). ACR concentrations of 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, and 0.005 mM were prepared to determine the concentrations of ACR to be used in the further experiments and the IC50 values for the BEAS-2B cell line. The cells were treated with the different ACR concentrations for 24, 48 and 72 hours and then MTT test was performed. While low cytotoxicity was observed in treatments up to 1 mM concentration, it was observed that cytotoxicity started to increase from 1 mM. Significant increases in cytotoxicity were detected at 5 and 10 mM concentrations, the highest concentrations tested. The ACR concentrations to be used for the further experiments were determined as 0.5, 1, and 2 mM.

It was observed concentration-dependent increases in the  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 foci, except for the co-localized foci for 24 hour ACR treatment.  $\gamma$ -H2AX, 53BP1 and co-localized foci numbers also increased in a concentration-dependent manner for 48 and 72 hours. We found increases in the percentage of DNA in the tail, tail moment, and olive tail moment values at all ACR concentrations and treatment times. Various morphological changes were observed in BEAS-2B cells compared to

the negative control after 72 hours of ACR treatment. In the soft agar colony formation test, the highest number of colonies was detected at the 2 mM. According to the results, after 72 hours of ACR treatment, dose-dependent increases were determined in the number of transformed colonies growing on soft agar.

Our results indicated that ACR can show cytotoxic effects and cause DNA damage on lung bronchial epithelial cells. We clearly showed that ACR can induce changes in the cell morphology, formation of DNA double-strand breaks, increases in cell proliferation and transformation, and the ability to divide and grow independently of the anchorage. Therefore, the results of the present study support the hypothesis that ACR exposure may induce carcinogenesis in lung cells and may be a risk for lung cancer formation.

**Keywords:** 53BP1, Acrylamide, Carcinogenicity, Comet Test, Cytotoxicity, Genotoxicity, Human Lung Cell,  $\gamma$ -H2AX.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, alıŐmalarımın yürütölmesi ve yazımı boyunca her zaman bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, her konuda ok değerli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Zölal ATLI ŞEKEROğLU'na, tez çalıŐmam sırasında her konuda büyük yardımlarını gördüğüm her türlü desteği sağlayan Doç. Dr. Vedat ŞEKEROğLU'na teşekkür ederim.

Tez çalıŐmam için vermiş oldukları önerileri ve desteklerinden dolayı jürimde yer alan Prof. Dr. AyŐe YAVUZ KOCAMAN, Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ, Prof. Dr. Filiz KURALAY ve Doç. Dr. Ömer ERTÜRK'e teŐekkürlerimi sunarım.

Hem bu zorlu ve uzun süreçte hem de hayatım boyunca yanımda olan, ideallerimi gerçekleŐtirmemi sağlayan ve maddi manevi desteklerini her an üzerimde hissettiğim babam Baki KONTAŞ, annem Nalan KONTAŞ, ablam Araş. Gör. Dr. Biyolog Seda KONTAŞ ve kardeŐim Betöl Sevilay KONTAŞ'a yürekten teŐekkürü bir borç bilirim. Doktora sürecimde yanımda olan, bu süreci yürütmemde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili eŐim Araş. Gör. Dr. Biyolog Serdar YEDİER'e teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	VI
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	VII
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	X
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	XII
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	XIII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	7
2.1 Akrilamid (ACR) Kaynakları, Kullanım Alanları ve Maruziyeti.....	7
2.2 Akrilamidin Biyolojik ve Kimyasal Özellikleri .....	10
2.3 Gıdalarda Akrilamid Oluşum Mekanizmaları .....	13
2.4 Akrilamidin Toksikokinetiği .....	18
2.5 Akrilamidin Toksisitesi .....	21
2.5.1 Nörotoksisite.....	22
2.5.2 Genotoksisite .....	23
2.5.3 Karsinojenite.....	27
2.5.4 Bakteriyel Mutagenez.....	30
2.5.5 <i>In vitro</i> Memeli Gen Mutasyonu.....	30
2.5.6 <i>In vivo</i> Memeli Gen Mutasyonu .....	30
2.5.7 Fertilitite .....	31
2.5.8 İmmünotoksisite.....	32
2.5.9 Hepatotoksisite.....	32
2.6 Sitotoksisite, Genotoksisite ve Karsinojenitenin Değerlendirilmesinde Uygulanan Bazı Yöntemler.....	33
2.6.1 Sitotoksisite ve Uygulanan Yöntemler.....	33
2.6.1.1 MTT Testi.....	34
2.6.2 Genotoksisite ve Uygulanan Yöntemler.....	34
2.6.2.1 $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Ko-lokalizasyon Testi.....	35
2.6.2.2 Comet Testi.....	36
2.6.3 Karsinojenite ve Uygulanan Yöntemler .....	37
2.6.3.1 Neoplastik Transformasyon Testi (Kontak İnhibisyon Testi) .....	38
2.6.3.2 Soft Agar Koloni Oluşum Testi (Ankraj Bağımsız Büyüme Testi).....	39
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	40
3.1 Kullanılan Cihazlar .....	40
3.1.1 Karbondioksit (CO <sub>2</sub> )'li İnkübatör .....	40
3.1.2 Biyogüvenlik Kabini .....	40
3.1.3 Floresan Filtreli Işık Mikroskobu .....	40
3.1.4 Mikroplaka Okuyucu.....	41
3.1.5 Invert Mikroskop.....	41
3.1.6 Hücre Sayım Cihazı .....	41
3.1.7 Su Banyosu .....	41
3.1.8 Vorteks Karıştırıcı.....	41
3.1.9 Santrifüj .....	41

3.1.10 Kuru Blok Isıtıcı.....	42
3.1.11 Shaker.....	42
3.1.12 pH Metre.....	42
3.1.13 Buz Makinası .....	42
3.1.14 Elektroforez Cihazı .....	42
3.1.14 Aspirasyon Cihazı .....	42
3.1.15 Hassas Terazı .....	42
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	43
3.2.1 Akrilamid (Sigma) .....	43
3.2.3 LHC-8 Medium.....	43
3.2.4 Attachment Faktör (AF) (Bağlanma Faktörü) .....	44
3.2.5 Ultra Salın A.....	44
3.2.6 Tripsin-EDTA.....	44
3.2.7 Tripsin Nötrleştirici Solüsyon (TNS).....	44
3.2.8 Tripan Mavisı.....	44
3.2.9 Kozmik Kalf Serum .....	45
3.2.10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) .....	45
3.2.11 Penisilin/Strepomisin Antibiyotiği.....	45
3.2.12 Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) .....	45
3.2.13 Phosphate Buffered Saline (PBS) .....	45
3.2.14 Paraformaldehit Solüsyonu.....	46
3.2.15 Octyl Phenol Ethoxylate (Triton X-100).....	46
3.2.16 Bovine Serum Albümin.....	46
3.2.17 Sodyum Azide.....	46
3.2.18 Horse Serum .....	46
3.2.19 Anti-gamma H2A.X Antibody.....	46
3.2.20 Anti-53BP1 Antibody.....	46
3.2.21 Alexa Fluor 488 Goat Anti-rabbit IgG.....	46
3.2.22 Alexa Fluor 555 Goat Anti-mouse IgG.....	47
3.2.23 Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI .....	47
3.2.24 Trizma Base .....	47
3.2.25 Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA).....	47
3.2.26 SYBR Green I.....	47
3.2.27 Lizis Solüsyonu.....	47
3.2.28 LMAgaroz.....	47
3.2.29 200 mM EDTA .....	48
3.2.30 Metanol.....	48
3.2.31 Kristal Viyole.....	48
3.2.32 Difco bacto agar .....	48
3.2.33 4-Nitro-Blue-Tetrazolium Chloride (NBT) .....	48
3.2.34 Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	48
3.3 Hücre Kültürü .....	49
3.3.1 Kullanılan Hücre Hattı .....	49
3.3.2 Hücre Kültürünün Yönetimi .....	49
3.3.3 Hücrelerin Çözülmesi.....	49
3.3.4 Hücrelerin Pasajlanması .....	50
3.3.5 Hücrelerin Dondurulması .....	51
3.3.6 Deney Planı ve Deney Grupları .....	51

3.3.6.1 Negatif Kontrol Grubu .....	51
3.3.6.2 Pozitif Kontrol Grubu.....	51
3.3.6.3 Akrilamid Grupları.....	52
3.4 Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite .....	52
3.4.1 MTT Testi.....	52
3.5 Genotoksosite .....	53
3.5.1 $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Ko-Lokalizasyon Testi .....	53
3.5.2 Comet Testi.....	54
3.6 Karsinojenite.....	56
3.6.1 Neoplastik Transformasyon Testi (Kontak İnhibisyon Testi) .....	56
3.6.1.1 Kristal Viyole Boyaması .....	57
3.6.2 Soft Agar Koloni Oluşum Testi (Ankraj Bağımsız Büyüme Testi).....	57
3.7 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	58
<b>4.BULGULAR ve TARTIŞMA .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 BULGULAR.....</b>	<b>59</b>
4.1.1 MTT Testi.....	59
4.1.2 IC50 Değerlerine Göre Deneylerde Kullanılacak Dozların Belirlenmesi .....	64
4.1.3 $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Ko-Lokalizasyon Testi .....	65
4.1.3 Comet Testi.....	72
4.1.4 Neoplastik Transformasyon Testi (Kontak İnhibisyon Testi) .....	76
4.1.5 Soft Agar Koloni Oluşum Testi (Ankraj-Bağımsız Büyüme Testi) .....	85
<b>4.2 TARTIŞMA.....</b>	<b>90</b>
4.2.1 Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite .....	91
4.2.2 Genotoksosite .....	99
4.2.3 Karsinojenite.....	108
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>115</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>118</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>141</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 ACR'nin Kimyasal Yapısı.....	10
Şekil 2.2 DNA ile ACR Etkileşimi Sonucunda Meydana Gelen Bileşikler .....	12
Şekil 2.3 DNA ile GA Etkileşimi Sonucunda Meydana Gelen Bileşikler.....	12
Şekil 2.4 ACR'nin GA'ya Dönüştürüldüğü Şematik Metabolik Yol Gösterimi .....	13
Şekil 2.5 Maillard Reaksiyonunun Şematik Gösterimi ve ACR Oluşumu.....	15
Şekil 2.6 Asparajın ve Glukozdan ACR Oluşumu .....	16
Şekil 2.7 Gıdalardaki Farklı Moleküllerden ACR'nin Oluşum Yolları .....	18
Şekil 2.8 ACR'nin Metabolik Şeması .....	21
Şekil 3.1 Floresan Boya ile Boyanmış Hücrede Baş, Kuyruk ve Kuyruk Momentinin İfade Ettiği Bölgeler.....	56
Şekil 4.1 96 Kuyucuklu Kültür Kaplarında MTT Testi İçin Yapılan Uygulama Planı .....	59
Şekil 4.2 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Ortalama Hücre Canlılığı Verileri ve Standart Hata Değerlerinin Grafikselsel Olarak Gösterimi.....	62
Şekil 4.3 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Ortalama Sitotoksitesite Verileri ve Standart Hata Değerlerinin Grafikselsel Olarak Gösterimi .....	63
Şekil 4.4 24 Saat ACR ile Muamele Edilen BEAS-2B Hücre Çekirdeklerindeki $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Kontrol Grupları ve Konsantrasyonlara Bağlı Değişim Örnekleri .....	66
Şekil 4.5 48 Saat ACR ile Muamele Edilen BEAS-2B Hücre Çekirdeklerindeki $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Kontrol Grupları ve Konsantrasyonlara Bağlı Değişim Örnekleri .....	66
Şekil 4.6 72 Saat ACR ile Muamele Edilen BEAS-2B Hücre Çekirdeklerindeki $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Kontrol Grupları ve Konsantrasyonlara Bağlı Değişim Örnekleri .....	67
Şekil 4.7 24 Saatlik Maruziyet Sonucu Hücre Çekirdeklerindeki $\gamma$ H2AX, 53BP1 ve Ko-lokalize Odakların Değişimi.....	70
Şekil 4.8 48 Saatlik Maruziyet Sonucu Hücre Çekirdeklerindeki $\gamma$ H2AX, 53BP1 ve Ko-lokalize Odakların Değişimi.....	71
Şekil 4.9 72 Saatlik Maruziyet Sonucu Hücre Çekirdeklerindeki $\gamma$ H2AX, 53BP1 ve Ko-lokalize Odakların Değişimi.....	71
Şekil 4.10 Negatif Kontrol (1), Pozitif Kontrol (5), 0.5 mM (2), 1 mM (3) ve 2 mM (4) ACR ile 24 Saat Muamele Edilen Hücrelerdeki Cometlerin Görünümü .....	72
Şekil 4.11 Negatif Kontrol (1), Pozitif Kontrol (5), 0.5 mM (2), 1 mM (3) ve 2 mM (4) ACR ile 48 Saat Muamele Edilen Hücrelerdeki Cometlerin Görünümü .....	72
Şekil 4.12 Negatif Kontrol (1), Pozitif Kontrol (5), 0.5 mM (2), 1 mM (3) ve 2 mM (4) ACR ile 72 Saat Muamele Edilen Hücrelerdeki Cometlerin Görünümü .....	73
Şekil 4.13 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyet Sonrası Kuyruktaki DNA Yüzdesinin ACR Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi .....	74

<b>Şekil 4.14</b>	24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyet Sonrası Kuyruk Momentinin ACR Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi.....	75
<b>Şekil 4.15</b>	24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyet Sonrası Olive Kuyruk Momentinin ACR Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi.....	76
<b>Şekil 4.16</b>	Negatif Kontrol BEAS-2B Hücreleri (20x).....	77
<b>Şekil 4.17</b>	ACR Uygulaması Sonrası BEAS-2B Hücrelerinde Meydana Gelen Morfolojik Değişimler-1.....	78
<b>Şekil 4.18</b>	ACR Uygulaması Sonrası BEAS-2B Hücrelerinde Meydana Gelen Morfolojik Değişimler-2.....	78
<b>Şekil 4.19</b>	Transforme Olan BEAS-2B Hücrelerinin İlk Pasajdan Sonraki Morfolojik Görünümleri (10x) 0.5 mM (1), 1 mM (2), 2 mM (3).....	79
<b>Şekil 4.20</b>	İkinci Pasaj Sonrası Transforme Hücrelerin Oluşturduğu Oluşan Çoklu Koloniler.....	80
<b>Şekil 4.21</b>	Transforme Olan BEAS-2B Hücrelerinin İkinci Pasajdan Sonraki Morfolojik Görünümleri (10x) 0.5 mM (1) (4x), 1 mM (2) (4x), 2 mM (3).....	81
<b>Şekil 4.22</b>	2 mM'lık Uygulamada Transforme Olan BEAS-2B Hücrelerinin Üçüncü Pasajdan Sonraki Morfolojik Görünümleri (4x).....	82
<b>Şekil 4.23</b>	ACR Uygulaması Sonrası Transforme Olan Hücrelerinin Oluşturduğu Odakların Mikroskoptaki Genel Görüntüsü (4x).....	83
<b>Şekil 4.24</b>	ACR Uygulaması Sonrası Transforme Olan Hücrelerinin Oluşturduğu Odakların Mikroskoptaki Genel Görüntüsü (10x).....	83
<b>Şekil 4.25</b>	Transforme Hücrelerin Oluşturduğu Ortalama Odak Sayıları.....	85
<b>Şekil 4.26</b>	Transforme BEAS-2B Hücrelerinin Soft Agarda Oluşturduğu Kolonilerin Ortalama 1 Hafta Arayla Büyüme Örneği (4x).....	86
<b>Şekil 4.27</b>	ACR Uygulaması Sonrası Transforme Hücrelerin Softa Agarda Oluşturduğu Odakların Mikroskoptaki Genel Görüntüsü 4x (1), 10x (2), 20x (3).....	86
<b>Şekil 4.28</b>	Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-Kontrol...87	
<b>Şekil 4.29</b>	Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-0.5 mM...87	
<b>Şekil 4.30</b>	Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-1 mM.....87	
<b>Şekil 4.31</b>	Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-2 mM.....88	
<b>Şekil 4.32</b>	Soft Agar Testi ACR Konsantrasyonlarına Göre Ortalama Koloni Sayıları.....	89

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2.1</b> Çeşitli İşlenmiş Gıdalarda ACR Düzeyleri .....	9
<b>Çizelge 4.1</b> 24 Saatlik Maruziyet Sonrası ACR Konsantrasyonlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri .....	60
<b>Çizelge 4.2</b> 48 Saatlik Maruziyet Sonrası ACR Konsantrasyonlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri .....	60
<b>Çizelge 4.3</b> 72 Saatlik Maruziyet Sonrası Konsantrasyonlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri .....	61
<b>Çizelge 4.4</b> ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyetleri Sonucu Elde Edilen Verilerden Hesaplanan Hücre Canlılığı (%) Değerleri.....	61
<b>Çizelge 4.5</b> ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyetleri Sonucu Elde Edilen Verilerinden Hesaplanan Sitotoksisite Değerleri .....	63
<b>Çizelge 4.6</b> ACR İçin MTT Testi Sonuçlarına Göre Belirlenen IC50 Değerleri.....	65
<b>Çizelge 4.7</b> 24 Saatlik Uygulama Sonrası Konsantrasyona Bağlı Olarak Hücre Başına Sayılan Ortalama Odak Sayıları.....	68
<b>Çizelge 4.8</b> 48 Saatlik Uygulama Sonrası Konsantrasyona Bağlı Olarak Hücre Başına Sayılan Ortalama Odak Sayıları.....	68
<b>Çizelge 4.9</b> 72 Saatlik Uygulama Sonrası Konsantrasyona Bağlı Olarak Hücre Başına Sayılan Ortalama Odak Sayıları.....	68
<b>Çizelge 4.10</b> ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulamaları Sonrası Kuyruktaki DNA Yüzdesi Değerleri .....	74
<b>Çizelge 4.11</b> ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulamaları Sonrası Kuyruk Momenti Değerleri.....	75
<b>Çizelge 4.12</b> ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulamaları Sonrası Olive Kuyruk Momenti Değerleri .....	76
<b>Çizelge 4.13</b> BEAS-2B Hücrelerinde ACR Maruziyeti Sonrası Transformasyon (Kontak İnhibisyon) Testi ile Belirlenen Odak Sayıları .....	84
<b>Çizelge 4.14</b> ACR Konsantrasyonlarının BEAS-2B Hücreleri Üzerindeki Etkisi Sonucu Oluşan Odak Sayıları, Odak Frekansları ve İzole Edilen Odak Sayıları.....	84
<b>Çizelge 4.15</b> ACR Uygulaması Sonrası BEAS-2B Hücrelerinin Büyüklüklerine Göre Ankoraj-Bağımsız Büyüme (Soft Agar) Koloni Sayıları .....	88

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

---

<b>ACR</b>	: Akrilamid
<b>AF</b>	: Attachment Faktör (Bağlantı Faktörü)
<b>ALT</b>	: (Alanin Aminotransferaz)
<b>AST</b>	: (Aspartat Aminotransferaz)
<b>BEAS-2B</b>	: İnsan Bronşiyal Epitel Hücre Hattı
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>EPA</b>	: Environmental Protection Agency (Çevre Koruma Ajansı)
<b>FAO</b>	: Food and Agricultural Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
<b>FISH</b>	: Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon)
<b>GA</b>	: Glisidamid
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GS-MS</b>	: Gas Chromatography Mass Spectrometry (Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi)
<b>GSSG</b>	: Oksitlenmiş GSH
<b>GST</b>	: Glutasyon S-Transferaz
<b>IARC</b>	: International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)
<b>IC50</b>	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>JECFA</b>	: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Gıda Katkı Maddelerine ilişkin Ortak FAO-WHO Uzman Komitesi Raporu)
<b>KA</b>	: Kromozom Anomalisi
<b>KKD</b>	: Kardeş Kromatid Değişimi
<b>LC-MS-MS</b>	: Liquid Chromatography - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MN</b>	: Mikronukleus
<b>MTT</b>	: 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>NBT</b>	: 4-Nitro-Blue-Tetrazolium Chloride
<b>OD</b>	: Optik Density (Optik Yoğunluk)
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)
<b>PCE</b>	: Polychromatic Erythrocytes (Polikromatik Eritrositler)
<b>ROS</b>	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
<b>SH</b>	: Standart Hata
<b>SHE</b>	: Suriye Hamster Embriyosu
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>TEM</b>	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
<b>TNS</b>	: Tripsin Nötrleştirici Solüsyon
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>WHO</b>	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

---

## 1. GİRİŞ

Nüfus artışıyla birlikte dünyada güvenilir besin talebinin karşılanması ve insanlar tarafından gıdaların bozulmadan kullanılmasının sağlanması amacıyla ürünlere uygun işlemlerin uygulanması ve uygun koşullarda muhafaza edilmesi gerekmektedir. Gıda maddelerinin daha uzun süre dayandırılması için uygulanan işlemlerden birisi ısı işlemdir. Bu işlem sayesinde, mikroorganizmaların gelişimi önlenmekte, gıdaların duyu özellikleri, tat, renk, lezzet, doku çeşitliliği ve aroması geliştirilebilmekte ve istenmeyen enzimler inaktive edilebilmektedir. Bu amaçlar doğrultusunda besinler; pişirme, kızartma, sterilizasyon veya pastörizasyon gibi çeşitli ısı işlemlere maruz bırakılabilir (Tareke ve ark., 2002). Gıdanın belirli sıcaklıklarda ısıtılması, ısı kaynaklı toksik maddelere sebep olan çeşitli kimyasal reaksiyonlara neden olmakta ve bu ısı işlemler esnasında istenmeyen birçok karsinojenik veya mutajenik bileşikler oluşabilmektedir (Mogol ve Gökmen, 2016). Canlı organizmalar, insanlar ve çevre için tehlike oluşturabilen bu maddeler insanlarda başta kanser olmak üzere farklı birçok kronik hastalığa neden olan mutasyonlara yol açabilmektedir (Arinç ve ark., 2000). Bu maddelerin başında karbonhidrat, protein ve yağlarla zenginleştirilmiş bileşiklerden oluşan akrilamid (ACR), furan ve türevleri, imidazol ve türevleri, heterosiklik aminler, nitrozamin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, kloropropanol ve esterleri gibi bileşikler gelmektedir (Hamzalıoğlu ve ark., 2018).

Gıdalardaki keşfinden önce kimyasal olarak sentezlenen ACR, plastik maddelerde, biyolojik ve analitik biyokimyasal araştırmalarda, enjeksiyon maddelerinde, matbaacılık ve tekstil ürünlerinde, kozmetik ürünlerinin üretiminde, proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasında, tünel, baraj gibi yapıların inşasında, madencilikte, petrol ve doğal gaz işlemede ve bunun gibi birçok alanda sıklıkla kullanılan endüstriyel bir kimyasal bileşik olarak bilinmektedir ve ticari olarak çeşitli alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Tareke ve ark., 2002). Ayrıca kalafatlama (Tahta döşemelerin aralarını su geçirmeyecek biçimde macunlama), bazı yapıştırıcılar ve gıda paketlenme gibi tüketici ürünlerinde de kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, sigara dumanında da bir bileşen olarak tespit edilmiştir (Sharp, 2003; Rifai ve Saleh, 2020).



Son yıllarda, insanların beslenme alışkanlıkları ve sağlıkları ile ilişkili çalışmaların sayısında önemli artışlar olmuştur. Gıdaların hazırlanması sırasında oluşan birçok reaksiyon sonucu meydana gelen yeni bileşiklerin bir kısmı ürünlerde istenirken (örneğin bazı aroma bileşikleri), bir kısmı ise kötü aroma bırakarak ürünün tüketimini olumsuz yönde etkilemesinden veya insan sağlığı üzerinde oluşturdukları olumsuz etkilerden dolayı istenmemektedir. Endüstriyel kullanımının yanı sıra, beslenme aracılığıyla da sağlık üzerine olumsuz etkileri bulunan bir madde olan ACR deneysel birçok çalışmada ön plana çıkmıştır (Gölükcü ve Tokgöz, 2005).

Deney hayvanları üzerinde 1970'li yıllarda yapılan çalışmalarda, toksik bir madde olarak görülen ACR'nin canlılarda kanser oluşturabileceği bildirilmiştir (Heath ve ark., 1975). Daha sonraki yıllarda ACR ile alakalı çok sayıda araştırma yapılmış ve bu araştırmalar, ACR'nin uzun süreli ve yüksek dozda alınmasının kanserleşmeye neden olabileceği bildirilmiştir (Johnson ve ark., 1986). Ancak, bu maddenin yiyeceklerin içine katılmayıp farklı alanlarda kullanılmasından dolayı canlıları etkilemeyeceği düşünülmüştür. Bu nedenle, ACR'nin canlılardaki zararlı etkileri çok fazla araştırılmamıştır. Stockholm üniversitesinden Tareke ve arkadaşlarının 2000-2002 yılları arasında yaptıkları araştırmalar sonucunda, 120 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda pişirilen gıdalarda yüksek miktarda ACR oluşumunun olduğunu rapor edilmiştir ve ACR'nin doğal olarak oluşmayıp sadece kimyasal olarak sentezlendiği görüşü ortadan kaldırılmıştır (Tareke ve ark., 2000; Tareke ve ark., 2002). Yapılan bazı çalışmalarda da, tütünün yüksek sıcaklıkta yanmasından dolayı ACR'nin oluştuğu ve vücuda ACR alımının olduğu ortaya konulmuştur (Huang ve ark., 2007; Scherer ve ark., 2007).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) yetkilileri tarafından yapılan bir toplantıda, ACR ile ilgili gelişmeler ele alınarak bir rapor yayınlanmıştır (Anonim, 2002a). ACR maruziyeti sonrasında bu bileşiğe maruz kalan insanlarda çeşitli zararların oluştuğunun gözlenmesinden bu yana, ACR üzerinde yoğunlaşılacak bir madde haline gelmiştir (Granath ve ark., 2001; Besaratinia ve Pfeifer, 2007).

Yapılan bir çalışmada, ACR içeren patates cipsini devamlı tüketen 14 sağlıklı gönüllüde bazı proinflatuar durumların ortaya çıktığı görülmüştür (Naruszewicz

ve ark., 2009; Lin ve ark., 2013). ACR' nin beslenmeyle alımının, çocuklarda ve ergenlerde yetişkinlerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Dybing, 2005; Lin ve ark., 2013). Bu nedenle, özellikle çocukların ACR barındıran besinleri fazla miktarda tüketmesi sonucu daha fazla miktarda ACR aldıkları ve daha yüksek risk altında olabileceği endişesi bulunmaktadır (Anonim, 2007; Maronpot ve ark., 2015).

ACR'nin insanlar üzerinde olası karsinojenik etkilerinin değerlendirildiği araştırmalarda farklı sonuçlara rastlanıldığı göze çarpmaktadır. Birçok çalışmada ACR'nin bağırsak, böbrek, mesane, ağız, özofagus, gırtlak, meme, ovaryum veya prostat kanserleri oluşumu ile ilişkili olmadığı belirtilirken (Mucci ve ark., 2003; Pelucchi ve ark., 2006), birçok epidemiyolojik çalışmada ise, ACR maruziyetinin meme kanseri (Olesen ve ark., 2008), böbrek kanseri (Hogervorst ve ark., 2008a) gibi çeşitli kanserler ile ilişkili olduğu desteklenmiştir (Ji ve ark., 2013). İnsanlarda besinlerle ACR alımının artışı ile endometriyum, yumurtalık ve böbrek kanserinin sıklığının arttığı rapor edilmiştir (Hogervorst ve ark., 2009b; Chen ve ark., 2013). ACR'nin ratlarda, meme ve tiroid bezi tümörlerinin oluşumuna neden olduğu da bildirilmiştir (Johnson ve ark., 1986; Friedman ve ark., 1995; Maronpot ve ark., 2015).

Mevcut literatür bilgileri ışığında, deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda ACR'nin çeşitli dokularda özellikle yüksek dozlarda karsinojenik etkiler gösterdiği net olarak ortaya konulmasına rağmen, insanlar üzerine yapılan çalışmalarda oldukça farklı sonuçlara ulaşıldığı görülmektedir. Bazı çalışmalar ACR alımı ile kanser oluşumu arasında pozitif ilişki kurarken (Hogervorst ve ark., 2007; Hogervorst ve ark., 2008a; Olesen ve ark., 2008; Boyacı ve Cengiz, 2012), bazı çalışmalar ise beslenmeyle ACR alımından kaynaklı kanser vakalarında bir artışın olmadığını bildirmektedir (Wilson ve ark., 2008; Hogervorst ve ark., 2008b; Larsson ve ark., 2009c; Boyacı ve Cengiz, 2012). ACR maruziyeti sonucu elde edilen karsinojenite bulgularındaki farklılıkların nedenleri arasında; istatistiksel açıdan yetersiz ölçüde hedef popülasyonda çalışılması, araştırmanın kısa süreli yürütülmesi ve ACR dışında karsinojen olma ihtimali olan diğer kimyasalların da araştırma süresince maruziyete neden olması gösterilmektedir. Bununla birlikte, ACR'nin günlük tüketimdeki birçok gıdada da bulunmasından dolayı, kontrol grubundaki bireyler ile maruziyet olabileceği düşünülen çalışma grubu bireyleri arasında önemli

düzyeyde farklılık tespit edilmesinin zor olması gibi etmenlerin de rol oynayabileceği, bildirilen nedenler arasındadır (Exon, 2006; Besaratinia ve Pfeifer, 2007; Boyacı ve Cengiz, 2012).

ACR'nin karsinojenitesiyle ilgili çalışmaların çoğu kemirgenlerde yapılmıştır ve insanlardaki potansiyel etkileri konusundaki bilgilerimizin çoğu bu çalışmalardan elde edilen verilere dayanmaktadır (Anonim, 1994; Lin ve ark., 2013). Genel populusyonda ACR ve kanser arasındaki ilişki için epidemiyolojik kanıtlar tutarsız ve belirsizdir (Pelucchi ve ark., 2006; Larsson ve ark., 2009c; Mucci ve Adami, 2009; Hogervorst ve ark., 2010; Lin ve ark., 2013). Beslenmeyle alınan ACR'in bazı kanser türlerinin oluşumunu tetikleyebildiğini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. Ancak ACR ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişki bilinmemektedir (Hogervorst ve ark., 2009a).

Çevremizde sayıları her geçen gün artan ve biyolojik etkileri tam olarak bilinmeyen sentetik ve doğal maddelerin kullanımlarının hızla artması ve kanser vakalarındaki artışlar, bu maddelerin karsinojenik ya da mutajenik potansiyelleri yönünden test edilmeleri gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle kanser riskini belirleyebilecek özellikte biyogstergelere ihtiyaç duyulmuş ve genetik toksikolojinin önemi her geçen gün artmıştır (şekeroğlu, 2010). Genetik toksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen hasarları, DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonu, KA (Kromozom Anomalisi), klastojenite ve anöploidi gibi olayları kapsayan genel bir terimdir (Young, 2002; stn, 2007; şekeroğlu, 2010). Genetik toksikoloji; toksikolojinin bir alt dalı olup, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin kromozom ve DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir ve çeşitli ajanların toksikolojik açıdan değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (stn, 2007; şekeroğlu, 2010). Bir maddenin karsinojenik potansiyelinin mutajenik kapasitesi ile yakından ilgili olduğu belirtilmiştir. Son yıllarda, karsinojenik olan birçok maddenin mutajenik; benzeri şekilde mutajenik olan birçok maddelerin de karsinojenik olduğu gösterilmiştir. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında kuvvetli ilişkinin olması, mutagenesis testlerinin endüstri kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılması sonucunu

doğurmuştur. Genetik toksisite testlerinden alınan pozitif sonuçlar kimyasalın kanser oluşumuna neden olabileceğini göstermektedir (Mavournin ve ark., 1990; Vural, 2005; Şekeroğlu, 2010). Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, çevresel etkenlerin (UV (Ultraviyole) ve irradyasyon gibi), endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, çeşitli maddelerin toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Bedir ve ark., 2004; Şekeroğlu, 2010).

DNA çift zincir kırıkları, hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkabilen en tehlikeli lezyon türleridir ve bunların etkili bir şekilde onarılması hücrenin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için son derece önemlidir. Çünkü tamir edilemeyen bu hasar; genomik kararsızlık, kanser gelişimi ve neoplastik transformasyona yol açan mutasyonların oluşumuna neden olabilir (Podhorecka ve ark., 2010; Atlı Şekeroğlu, 2013). DNA çift zincir kırıkları varlığında, 53BP1 ve fosforlanmış H2AX ( $\gamma$ H2AX) gibi DNA tamir ve DNA hasar sinyalizasyonunda görevli çeşitli proteinlerin odaklar oluşturduğu gösterilmiştir. Bu odaklara DNA tamir odakları da denilebilir ve mikroskopik düzeyde bu odakların saptanmasının DNA çift zincir kırıklarının oluşum ve tamir mekanizmalarına bakılmaksızın DNA çift zincir kırıklarının belirlenmesi için oldukça hassas bir yöntem olarak düşünülür. Bu teknik herbir hücredeki tek bir DNA çift zincir kırığının ölçülmesini sağlar (Belyaev ve ark., 2009; Lassmann ve ark., 2010). Çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan diğer bir yöntem de comet testidir. Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da adlandırılan comet yöntemi, birçok memeli hücresinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testidir (Östling ve Johanson, 1984; Singh ve ark., 1988; Olive ve Banath, 2006; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Karsinogeniteyi belirlemek için neoplastik transformasyon testi (Kontak inhibisyon testi) ve soft agar koloni oluşum testi (Ankraj bağımsız büyüme testi) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. DNA hasarı onarımından sorumlu olan genlerdeki

yetersizlik, genlerde yaygın mutasyonlara neden olur ve buna bağlı olarak kolaylıkla neoplastik transformasyonlar meydana gelir. Genlerdeki hasarlar, karsinogenezis olayındaki başlıca hedef noktalarıdır. Bu genlerdeki değişimler sonucu, neoplastik hücreler gelişir. Onkogenik proteinlerin üretimindeki aşırılığı veya antionkogenik proteinlerin üretimindeki eksikliği, dengeyi neoplastik transformasyon ve proliferasyon yönünde dengeyi değiştirebilir. Sonuçta genetik hasarı tamir edilemeyen mutasyona uğramış (mutant) hücrelerde yeni ek mutasyonlar meydana gelir. Bunlar çoğalır, birikir ve hücre artımının yanısıra, malign (kötü huylu) transformasyonlar oluşur. Soft agar koloni oluşum testi, kontak inhibisyon testi sonucu oluşan odaklardaki hücreleri çoğalmak ve bir yüzeye bağımlı olup olmadığını (bağlanma-bağımlı ya da bağlanma-bağımsız) anlamak için uygulanmaktadır (Xie ve ark., 2007).

ACR alımı ve akciğer kanseri riski arasındaki ilişki tam olarak bilinmediğinden, bu çalışmada ACR'nin insan akciğer epitel hücre kültürlerinde; 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi ile sitotoksik etkisinin,  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 kolokalizasyon testi ve comet testi yöntemleriyle DNA hasarı üzerindeki etkilerinin yani genotoksik etkisinin, neoplastik transformasyon testi ve soft agar koloni oluşum testi ile de karsinojenik etkisinin bulunup bulunmadığı araştırılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Akrilamid (ACR) Kaynakları, Kullanım Alanları ve Maruziyeti

1893 yılında Cristian Maureau tarafından Almanya'da kimyasal bir bileşik olarak keşfedilen ACR, uzun yıllar boyunca kimyasal ve ticari olarak kullanılmıştır. ACR doymamış bir karbonil grubu içeren, kokusuz, suda çok iyi çözünen, beyaz, kristalli bir madde olmakla beraber, havada kolayca reaktif olan ve hızla polimerleşebilen, yani ACR molekülleri (monomerler) birbirine bağlanarak yeni özelliklere sahip daha büyük bir molekül (polimer) oluşturabilen (Kuklenyik ve ark., 2005; Besaratinia ve Pfeifer, 2007; Lin ve ark., 2013), polimer ve reçinenin üretiminde kullanılan düşük moleküler ağırlıklı bir vinil monomeridir (Ji ve ark., 2013). Bu bileşik suda, asetonda ve etanolde çözünmektedir. Toprakta ve yeraltı suyunda yüksek hareketliliğe sahiptir ve biyolojik olarak parçalanabilmektedir (Smith ve ark., 1997; Friedman, 2003).

ACR'nin polimerizasyonu ile polimerik özellikli yüksek moleküler ağırlığa sahip poliakrilamid meydana gelmektedir. Poliakrilamid genelde kararlı bir yapıdır ve kimyasal olarak inerttir (Carere, 2006; Besaratinia ve Pfeifer, 2007). Polimerik ACR endüstride yaygın olarak kullanılır; örneğin, kanalizasyon ve atık su işlemede yardımcı çöktürücü olarak, enjeksiyon maddelerinde bağlayıcı olarak, kağıt ve kağıt hamuru yapımında güçlendirici olarak, kozmetik üretiminde yumuşatıcı, bağlayıcı veya dengeleyici olarak, analitik biyokimya ve biyolojik araştırmalar için kromatografide ve elektroforez matriksinde, proteinlerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında, içme suyunu arıtmak için çöktürücü olarak, tünel, baraj ve su rezervuarlarının inşası için sızdırmazlık maddesi olarak (Kuklenyik ve ark., 2005; Carere, 2006; Lin ve ark., 2013), madencilik, petrol ve doğal gaz işlemede (Lipworth ve ark., 2012; Maronpot ve ark., 2015) sıklıkla kullanılmaktadır. ACR polimerleri, özellikle toprak erozyonunu azaltmak için toprak düzenleyiciler olarak veya çamur yoğunlaştırma ve susuzlaştırma sürecini iyileştirmek için topaklaştırıcı olarak da kullanılmaktadır (Friedman, 2003).

ACR'ye endüstriyel olarak maruz kalmanın yanı sıra, gıda maddeleriyle gerçekleşen populasyon maruziyeti de mevcuttur (Vesper ve ark., 2008; Vesper ve ark., 2010; Maronpot ve ark., 2015). ACR'nin yıllık sanayi üretimi 100 milyon kg'a

ulaşmıştır (Parzefall, 2008; Tan ve ark., 2013). ACR'nin yaygın kullanımı ve gelişigüzel boşaltımı, sucul ekosistemlerde ACR'nin birikimine yol açmıştır (Buranasilp ve Charoenpanich, 2011; Liu ve ark., 2013; Tan ve ark., 2013). Dahası, ACR'nin yüksek su çözünürlüğünden dolayı da sudan uzaklaştırılması zordur (Daughton, 1988; Tan ve ark., 2013).

Smith ve ark., (1996) poliakrilamidin ACR'ye depolimerizasyonunu ısı, ışık ve dış ortam koşullarının teşvik ettiğini göstermişlerdir (Friedman, 2003). Wallace ve ark., (1986) toprağa eklenen %1 poliakrilamidin domates ve buğdayın mineral beslenmesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Toprağın fiziksel niteliklerini, doğurganlığını ve mekaniğini geliştirmek için toprağa eklenen %1 oranındaki poliakrilamidin, depolimerizasyondan kaynaklanan yeterli ACR monomeri oluşturmayarak toprağı kirletme ihtimalinin düşük olduğu sonucuna varmışlar ve potansiyel bir tehlike oluşturmadığını rapor etmişlerdir (Friedman, 2003). Erozyonu azaltmak için poliakrilamid ile muamele edilmiş toprakta yetiştirilen fasulye, mısır, patates ve şeker pancarlarında kalıntı ACR analizi <10 µg/kg seviyelerini göstermiştir (Bologna ve ark., 1999; Friedman, 2003). Tarla bitkileri tarafından emilen ACR'nin, 18 saat sonra büyük ölçüde bozulduğu ve ACR'nin mantar veya domatesde biyolojik olarak birikmediğini gözlemlenmiştir (Castle ve ark., 1991; Castle, 1993; Friedman, 2003).

İsveç'te tünel yapımında kullanılan ACR'ye maruz kalan insanlarda ACR'nin olumsuz sağlık etkilerinden sorumlu olabileceğinin gözlenmesi, Tareke ve ark., (2000)'nin ACR ile gıda arasında bir ilişki kurmasına yol açmıştır. Kızarmış bir yemek diyeti ile besledikleri sıçanlarda, kontrol diyeti ile beslenenlere göre, ACR'nin hemoglobine bağlanarak oluşturduğu N-(2-karbamiletıl) valin olarak ölçülen hemoglobin ACR eklentisinin önemli ölçüde yüksek seviyelere sahip olduğunu bulmuşlardır (Tareke ve ark., 2000). Isıl işleme tabi tutulmuş yiyeceklerle beslemenin analiz edilmesi, hemoglobin eklentilerinininkine paralel miktarlarda ACR'nin varlığını ortaya çıkarmıştır. Ancak 2000 yılındaki bu gözlem büyük ölçüde göz ardı edilmiştir. Bununla birlikte, 2 yıl sonra Tareke ve ark., (2002) ısıyla işlenmiş ticari gıdalarda ve özellikle karbonhidrat bakımından zengin gıdalarda yüksek sıcaklıkta pişirilen gıdalarda ACR varlığını göstermiştir. Yaygın olarak duyurulan bu bulgular, gıdalardaki ACR seviyelerinin belirlenmesi ve işlenmemiş gıdalardaki

ACR öncüllerinin doğası üzerine dünya çapında çalışmaları teşvik etmiştir. Çeşitli gıdaların ACR içerikleri Tablo 1’de listelenmiştir.

**Çizelge 2.1** Çeşitli İşlenmiş Gıdalarda ACR Düzeyleri (Friedman, 2003)

Gıda	Akrilamid (µg/kg)
Kavrulmuş badem	260
Kavrulmuş leblebi	12
Kavrulmuş fındık	128
Kavrulmuş fıstık	66
Kavrulmuş kuşkonmaz	143
Pişmiş ürünler: simit, ekmek, kek, kurabiye	70-430
Bira, malt ve peynir altı suyu içecekleri	30-70
Bisküvi, Kraker	30-3200
Çikolata tozu	15-90
Kahve tozu	170-351
Türk kahvesi	266
Mısır cipsi, Cips	34-416
Kraker	247
Gevrek ekmek	800-1200
Poğaç	120
Balık ürünleri	30-39
Et ve kümes hayvanı ürünleri	30-64
Kaplanmış fıstık	140
Fındık ve fındık yağı	64-457
Patates cipsi	170-3700
Kızarmış patates	200-12000
Mısır gevreği	122
Bebe bisküvisi	152
Atıştırmalıklar	30-1915
Kavrulmuş soya fasulyesi	25
Kavrulmuş ayçekirdeği	66

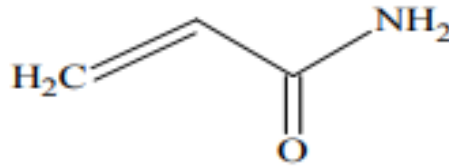
Dünya Sağlık Örgütü (WHO), çok sayıda yapılmış olan çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak, besinlerle birlikte ACR alımının günde ortalama 0.3-0.8 g arasında olduğunu bildirmiştir (Anonim, 2002b; Lin ve ark., 2013). Endüstriyel emisyonlar ve maruziyetten kaynaklı olumsuz sağlık etkileri yoğun olarak incelenmiştir (Lipworth ve ark., 2012; Maronpot ve ark., 2015) ve günlük 2.1 mg/kg maruziyete kadar hiçbir yan etki bildirilmemiştir (Erdreich ve Friedman, 2004; Maronpot ve ark., 2015). Gıda katkı maddeleri üzerine yapılan 64. FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesinde ACR’nin 1 g/kg alımının genel nüfus için ortalama temsil ettiği belirtilmiştir (Anonim, 2005; Maronpot ve ark., 2015). Beslenmeyle alınan ACR insan sağlığı için potansiyel bir risk haline gelmiştir. Bu nedenle, ACR toksisitesini önlemek ya da hafifletmek için etkili bir müdahale yöntemi bulmak son derece arzu edilen bir durumdur (Zhao ve ark., 2015).



ACR'ye kozmetik katkı maddelerindeki aerosol solüsyonlarından (örneğin kremler, vücut losyonları, şampuanlar) dermal emilim yoluyla ve tütün dumanından inhalasyon yoluyla da maruz kalınmaktadır (Weng ve ark., 2009; Fazendeiro, 2013). Ayrıca, ACR sigara başına 1.1-2.34 µg arasındaki konsantrasyonlarda sigara dumanından da emilebilmektedir (Smith ve ark., 2000; Lin ve ark., 2013).

## 2.2 Akrilamidin Biyolojik ve Kimyasal Özellikleri

Sıvı halde beyaz bir kristal gibi görünen ve kokusuz olan ACR doymamış çift bağ içeren bir amiddir (Blasiak, 2004) (Şekil 2.1). ACR'nin düşük moleküler ağırlığı ve sudaki yüksek çözünürlüğü, bu bileşiğin çeşitli biyolojik membranlardan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır (Friedman, 2003). Erime sıcaklığı 84,56 °C, kaynama sıcaklığı ise 125 °C'dir. Zayıf asidik ve bazik özellik gösteren ACR, hem suda hem de polar organik çözücüler olan metanol, etanol, dietil eter ve asetonunda iyi çözünmektedir. Ancak, polar olmayan çözücülerde (hekzan ve heptan gibi) çok az çözünmektedirler (Gölkücü ve Tokgöz, 2005; Nizamlıoğlu ve Nas, 2019). %50.69 karbon, %19.71 azot, %7.09 hidrojen ve %22.51 oksijen elementlerinin bileşiminden oluşmaktadır. Yakıcı veya tahriş edici değildir (Nizamlıoğlu ve Nas, 2019).

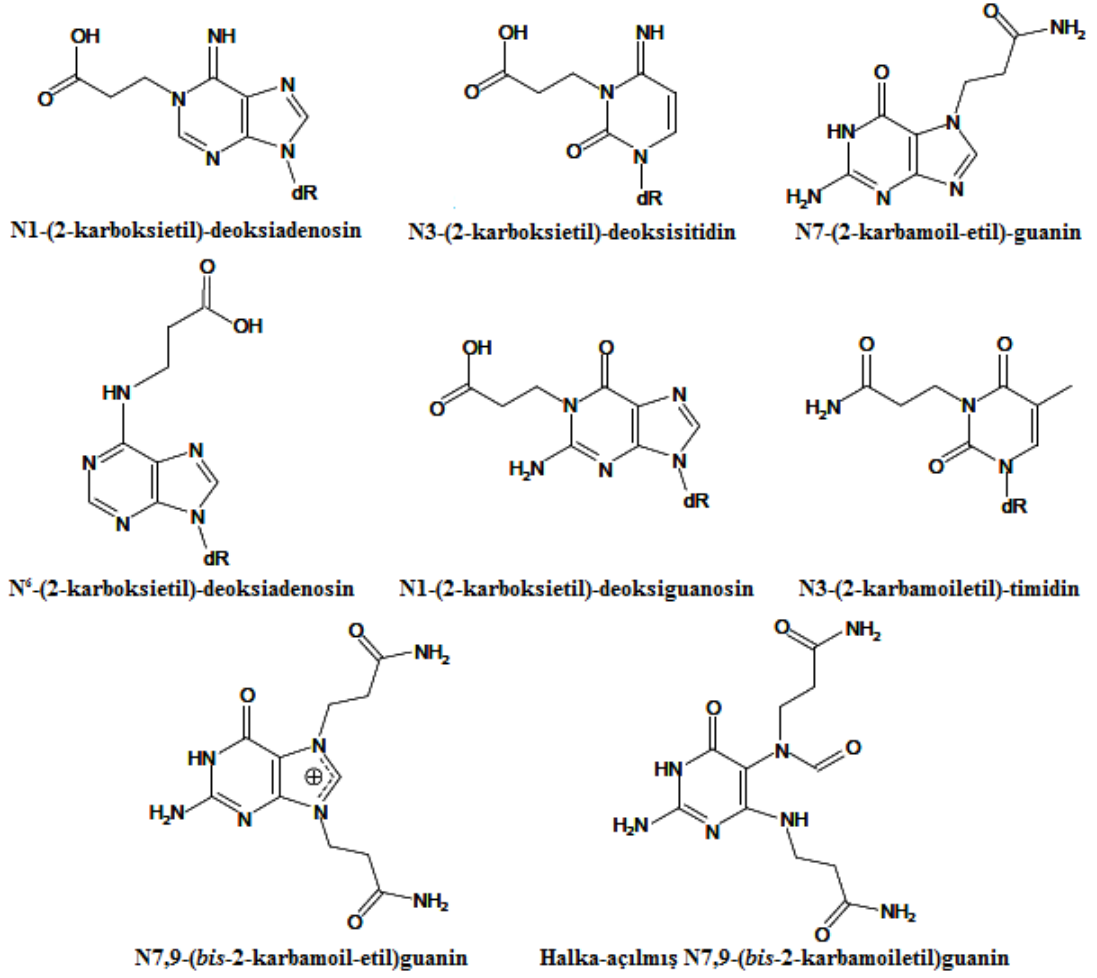


**Şekil 2.1** ACR'nin Kimyasal Yapısı  
(Nizamlıoğlu ve Nas, 2019)

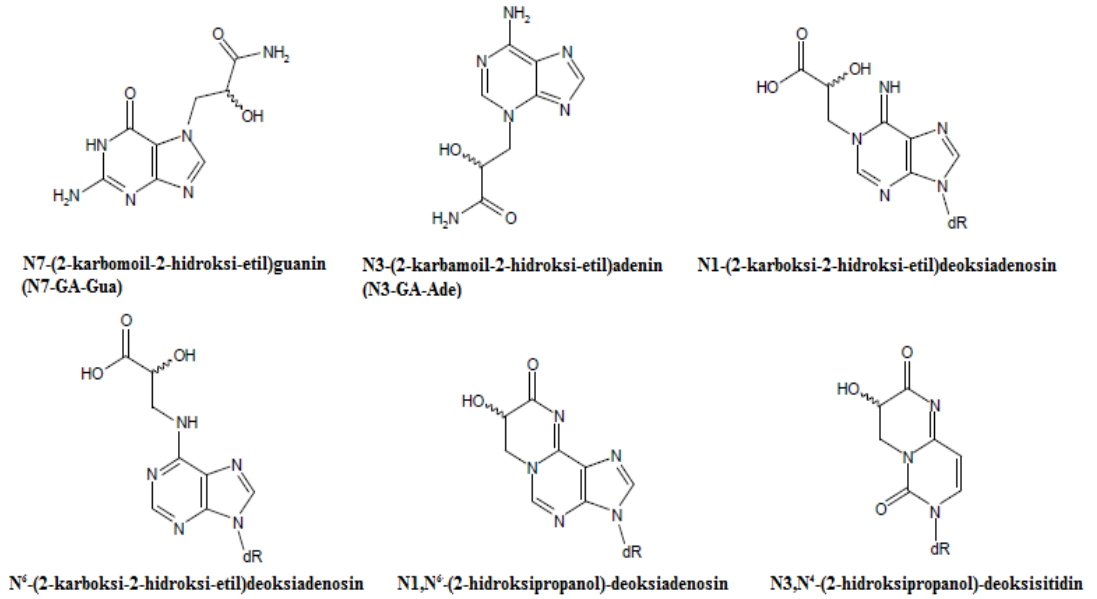
Maruz kaldığı oksidatif ajanlar veya erime sebebiyle ACR hemen polimerize olabilmektedir. Polimerizasyon sonucu oluşan polimerik form, ACR'yi su geçirmez ve jel özellikte bir bileşik haline getirmektedir (Kısabay ve ark., 2004; Arusoğlu, 2015). Monomer ve polimer (poliakrilamid) olarak iki farklı formda olabilen ACR'nin, monomer yapıdayken toksik özellik gösterip, polimer yapıda ise göstermediği belirtilmiştir. Monomerik yapıdaki ACR'nin memeli hayvanlarda karsinogenik ve mutajenik etkiler meydana getirdiği ve sinir sisteminde zararlı etkilere yol açtığı bildirilmiştir (Lasekan ve Kassim, 2011; Nizamlıoğlu ve Nas, 2019).

ACR üre ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), formaldehit ( $\text{HCHO}$ ), glioksal ( $\text{CHO}$ )<sub>2</sub>, aldehitler ( $\text{RCHO}$ ), aminler ( $\text{R}_2\text{NH}$ ), tiyoller ( $\text{RSH}$ ) gibi küçük reaktif moleküllerle reaksiyona girebilmektedir (Lingnert, 2002). ACR'nin karakteristik kimyasal yapısı ve metabolik dönüşüme (Sumner ve ark., 1999) girebilme kabiliyeti, farklı hücrel hedeflerle reaksiyona girmesine neden olmaktadır (Dearfield ve ark., 1995; Friedman, 2003).

Bir  $\alpha,\beta$ -doymamış karbonil grubu ile ayırt edilen ACR'nin kimyasal yapısı, hidroksil veya amino gruplarına ve DNA'daki nükleofilik merkezlere bağlanmasına yol açmaktadır. ACR nükleofillerle özellikle tiyolat anyonlarıyla reaksiyona girmektedir. Bununla birlikte, protaminler gibi proteinlere ACR eklenmesi alkilasyona neden olabilir ve bu da potansiyel olarak epigenetik etkilere neden olabilmektedir (Friedman, 2003). Ayrıca ACR, başta hemoglobin olmak üzere plazma proteinlerine de bağlanabilmektedir (Besaratina ve Pfeifer, 2007). ACR ve metabolite olan glisidamidin (GA)'nın DNA ile etkileşimi sonucu meydana gelen bileşikler Şekil 2.2 ve 2.3'de görülmektedir.

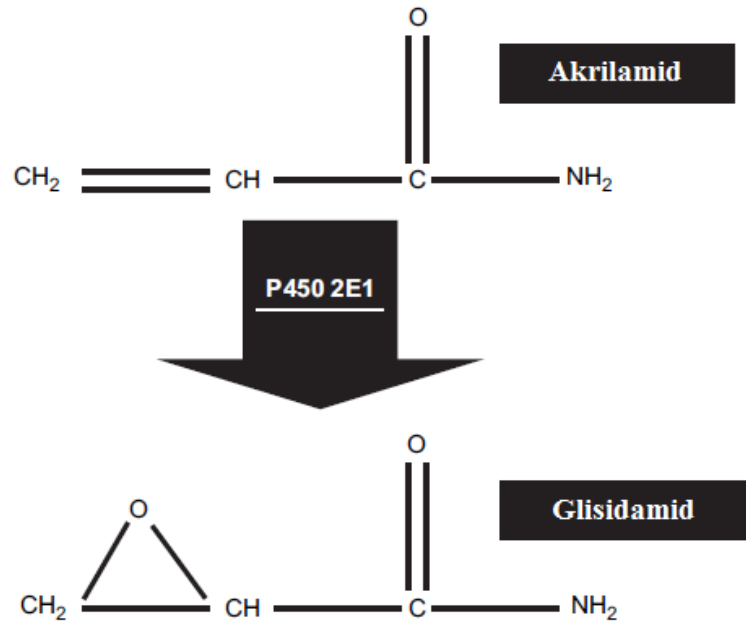


Şekil 2.2 DNA ile ACR Etkileşimi Sonucunda Meydana Gelen Bileşikler (Anonim, 2012)



Şekil 2.3 DNA ile GA Etkileşimi Sonucunda Meydana Gelen Bileşikler (Anonim, 2012)

ACR, sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) (Sumner ve ark., 1999) tarafından oksidatif biyotransformasyona uğramaktadır ve GA meydana gelmektedir (Şekil 2.4). GA, ana bileşik olan ACR'ye göre DNA ve proteinlere karşı daha reaktiftir (Dearfield ve ark., 1995; Besaratinia ve Pfeifer, 2007). Yapılan *in vitro* laboratuvar çalışmaları, ACR'nin adenin ve guanin bazlarının amino grupları ile tepkimeye girerek farklı bileşikler meydana getirdiğini göstermektedir (Solomon ve ark., 1985). DNA üzerinde oluşan bu genotoksik etkilerin, ACR'nin biyotransformasyona uğramasıyla meydana gelen GA'dan kaynaklandığı rapor edilmiştir (Paulsson ve ark., 2003).



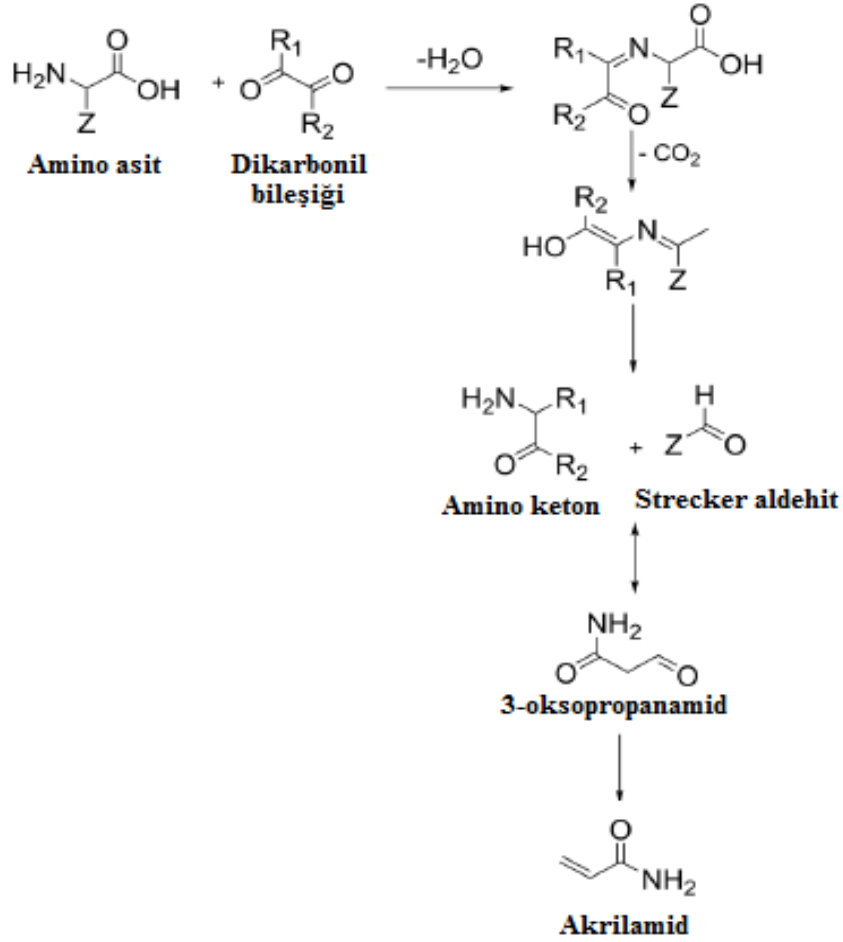
**Şekil 2.4** ACR'nin GA'ya Dönüştürüldüğü Şematik Metabolik Yol Gösterimi (Besaratinia ve Pfeifer, 2007)

### 2.3 Gıdalarda Akrilamid Oluşum Mekanizmaları

Gıdalarda akrilamidin, lipid, karbonhidrat veya serbest aminoasitlerin degradasyonu sonucu oluşan akrolein veya akrilik asit yoluyla, malik, laktik ve sitrik asit gibi organik asitlerden su veya karboksil grubu kaybedilmesiyle ve amino asitlerden doğrudan oluşum mekanizmasıyla ortaya çıkabileceği belirtilmektedir. Yaygın olan görüş ise, gıdalarda akrilamidin bir aminoasit olan asparajin ile basit şekerlerin (indirgen) reaksiyonu sonucu oluştuğu şeklindedir (Nizamlioğlu ve Nas, 2019).

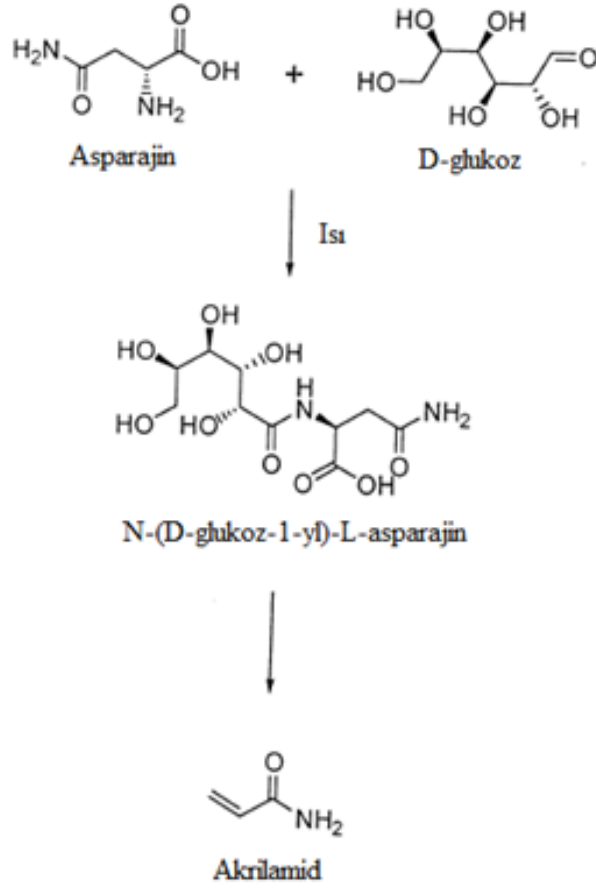
ACR oluşumuyla ilgili genel teori, gıdalarda ACR oluşumunun Maillard reaksiyonu ile yakından ilişkili olduğu ve bu reaksiyonun bir yan reaksiyon ürünü olarak oluştuğudur (Nizamlioğlu ve Nas, 2019). Gıda maddeleri arasındaki ısı kaynaklı etkileşimler olarak adlandırılan Maillard reaksiyonu, gıdaları saklama ve işleme aşamaları sırasında meydana gelen, gıdalarda renk değişikliklerine neden olan ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonudur (Friedman, 1996; Friedman, 2005; Friedman, 2015). Bunlar; indirgeyici şekerler, glukoz, fruktoz ve askorbik asit (C vitamini) ile amino asitler, peptidler ve proteinler arasındaki reaksiyonları içermektedir. Maillard reaksiyonunun ürünleri, pişirme ve kavurma sırasında oluşan lezzet ve rengin çoğundan sorumludur. Bu reaksiyon, amino asitin dekarboksilatlandığı ve bir aldehit oluşturmak üzere deamine edildiği bu ara maddeler tarafından amino asitlerin bozunmasıdır (Mottram ve ark., 2002).

ACR, Maillard esmerleşme ürünlerinin oluşumuna neden olan koşullar altında, gıdaların işlenmesi sırasında meydana gelmektedir (Friedman, 2003; Friedman ve Levin, 2008; Friedman, 2015). ACR; tahıl, kahve, badem, zeytin, patates ve yer elması gibi bitkisel kaynaklı gıdaların 120°C'yi aşan sıcaklıklarda kızartılması, pişirilmesi ve kavrulması gibi ısıl işlemler sırasında (Tardiff ve ark., 2010; Prasad, 2013), asparajinin amino grubu ile şekerlerin karbonil grupları arasında ısı indükleyici reaksiyonlar sonucu ortaya çıkabilmektedir (Şekil 2.5) (Friedman, 2015).



**Şekil 2.5** Maillard Reaksiyonunun Şematik Gösterimi ve ACR Oluşumu (Xu ve An, 2016)

ACR, belirli amino asitlerin (örneğin; asparajın), özellikle indirgeyici şekerler ve erken Maillard reaksiyon ürünleri (N-glikozitler) ile kombinasyon halinde ısıtılardan geçirilerek salınmaktadır (Stadler ve ark., 2002). Bu nedenle, asparajın açısından zengin olan tahıllar ve patates gibi pişmiş bitki bazlı gıdalar ACR oluşumuna sebep olmaktadır (Mottram ve ark., 2002). Düşük miktarlarda ACR üreten diğer amino asitler arasında alanin, arjinin, aspartik asit, sistein, glutamin, metiyonin, treonin ve valin de bulunmaktadır (Friedman, 2003). Yapılan biyokimyasal analizler, serbest amino asitlerin, özellikle asparajın ve şekerlerin gıda işleme sırasında (120-180C°) ısıtılmasının ACR oluşumuyla sonuçlandığını göstererek yiyeceklerle vücuda alınan ACR'nin kaynağını belirlemişlerdir (Şekil 2.6) (Mottram ve ark., 2002; Stadler ve ark., 2002; Besaratinia ve Pfeifer, 2006; Krishnakumar ve Visvanathan, 2014).



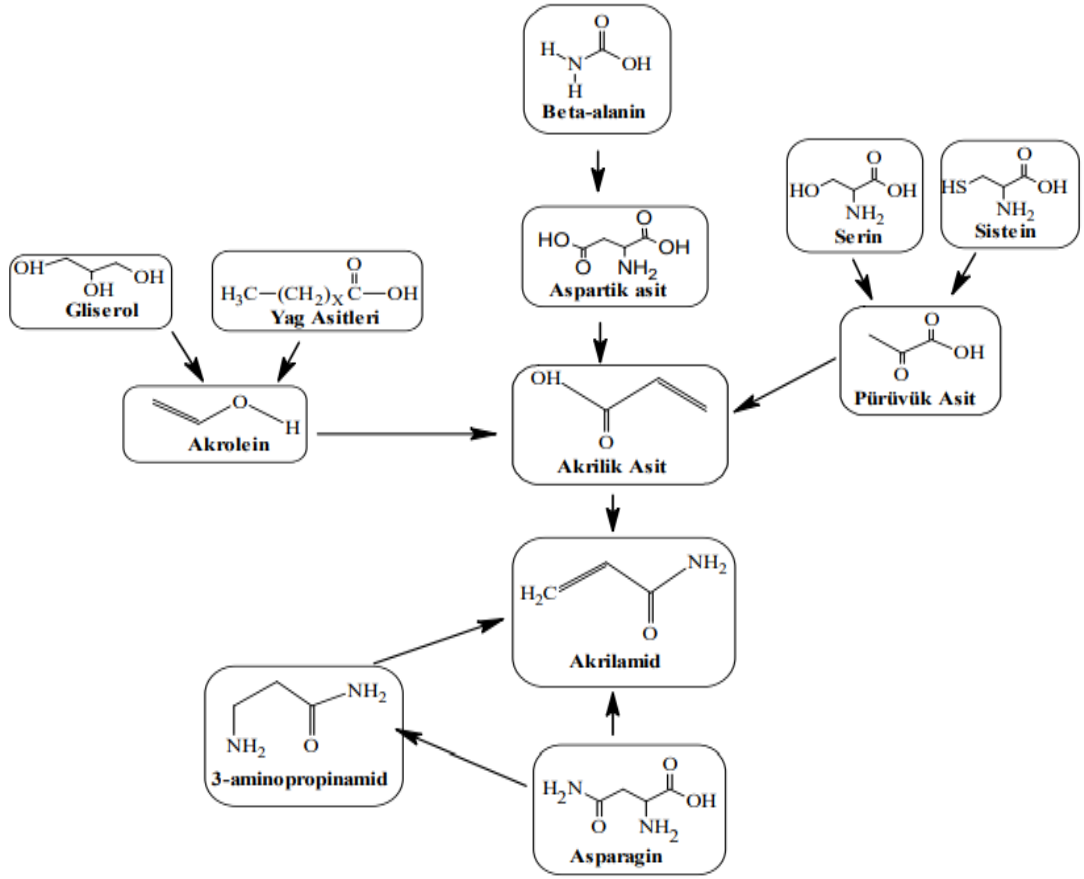
**Şekil 2.6** Asparajin ve Glukozdan ACR Oluşumu  
(Friedman, 2003)

Gıdalarda ACR oluşumunda asparajin yolu baskın yol olsa da Maillard reaksiyon sistemi aracılığıyla alternatif yollar da bulunmaktadır. Alternatif olarak önerilen diğer yollar şunları içermektedir:

- ✓ Akrolein (1-propenal), basit bir  $\alpha$ - veya  $\beta$ -doymamış aldehittir (Casella ve Contursi, 2004). Özellikle sıvı ve katı yağda, akrilik asit yoluyla ACR oluşumu için alternatif bir mekanizma olarak görülmektedir (Stadler ve ark., 2003). Aslında, asparajin ile birlikte akroleinin belirli koşullar altında kayda değer seviyelerde ACR üretebileceğini ortaya koymaktadır. Bu da akroleinin lipit bakımından zengin gıdalarda ACR oluşumunda kritik bir rol oynadığını düşündürmektedir (Yasuhara ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2005; Keramat ve ark., 2011).

- ✓ Aspartik asit, karnosin ve  $\beta$ -alanin, akrilik asidi ACR'ye dönüştürmek için mevcut amonyakla kombinasyon halinde termal ayrışma esnasında akrilik asit oluşumu yoluyla ACR'yi meydana getirmektedir (Stadler ve ark., 2003; Keramat ve ark., 2011).
- ✓ Aminopropionamid, asparajinden ACR oluşumu sırasında bir ara ürün olarak tanımlanmıştır. Bu bileşik asparajin ve pirüvik asit arasındaki reaksiyonlarda da oluşmaktadır ve ACR oluşumunun etkili bir faktörüdür (Zyzak ve ark., 2003; Keramat ve ark., 2011).
- ✓ Pirüvik asit, serin ve sisteinin dehidrasyonu ile üretilebilmektedir. Daha sonra pirüvik asidin laktik aside indirgenmesi ve akrilik aside dehidrasyonu ile devam eden bu reaksiyon sonunda akrilik asit ACR'ye dönüştürülmektedir (Yaylayan ve ark., 2005; Keramat ve ark., 2011).
- ✓ ACR,  $\alpha$ -dikarboni sınıflı Strecker dehidrasyonu ile meydana gelebilmektedir (Stadler ve ark., 2004; Keramat ve ark., 2011).
- ✓ Benzaldehit ve stiren, Amadori bileşiklerinin pirolizi sırasında uçucu bileşikler olarak oluşmaktadır. ACR asparajin dekarboksilatlı Amadori bileşiklerinden de oluşturulabilmektedir (Stadler ve ark., 2004; Keramat ve ark., 2011).
- ✓ Şeker-asparajin eklentileri, yüksek miktarlarda ACR üretmektedir ve bu da erken Maillard reaksiyonunun ana ACR kaynağı olduğunu düşündürür (Stadler ve ark., 2002; Keramat ve ark., 2011). ACR'nin gıdalardaki hangi moleküllerlerden sentezlendiği Şekil 2.7'de gösterilmiştir.





**Şekil 2.7** Gıdalardaki Farklı Moleküllerlerden ACR'nin Oluşum Yolları (Nizamlioğlu ve Nas, 2019)

Gıdalar pişirildiğinde oluşan ACR oranları, gıdalarda bulunan glukoz, fruktoz gibi şekerlerin ve asparajin amino asidinin miktarına, uygulama süresine ve uygulanan sıcaklık derecesine göre değişiklik göstermektedir. Buna örnek olarak; 180°C'de kızartılmış patatesten, 120°C derecede kızartılmış patatesdeki ACR miktarının 30 kat daha fazlası oluşmaktadır. Bu örnek bize, yiyeceklerin kızartılması ve pişirilmesi gibi işlemlerin yanı sıra, sıcaklık derecesinin ve sürenin de ACR miktarında önemli olduğunu göstermektedir (Nizamlioğlu ve Nas, 2019). Ancak ACR'nin gıdaların haşlanması esnasında oluşmadığı bildirilmiştir (Mottram, 2002).

#### 2.4 Akrilamidin Toksikokinetiği

ACR ile yapılan çalışmalar sonucunda, ACR ve ACR'nin diğer formlarının (poliakrilamid gibi) deriden çok hızlı ve büyük oranda emildiği ve deriden emilim oranının uygulandığı vücut bölgesine göre değiştiği belirlenmiştir (Sumner ve ark.,

2003). Ancak sıçan derisinden absorpsiyonun çok yüksek oranlarda olmadığı bildirilmektedir. Ramsey ve ark., (1984) ACR'nin ciltten emiliminin uygulanan dozların (2 veya 50 µg/kg) %25'i kadar olduğunu hesaplamıştır (Dearfield ve ark., 1988; Zamani ve ark., 2017; Ghamdi ve ark., 2020). ACR'nin mide ve barsaklarda çok daha hızlı emildiği görülmüştür. Ancak, emilim yerleri türler arasında değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca, emilim oranları ACR'nin uygulama yollarına (damar içi, sonda, dış maruziyet ve gıdalarla), zamana ve türe göre de önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir (Doerge ve ark., 2005a; Doerge ve ark., 2005b). ACR'nin insanlardaki emilimi ise, gönüllü insanlar üzerinde yapılan deneylerle araştırılmaya çalışılmıştır. Fennell ve ark., (2005)'nin yaptığı bir çalışmada insan gruplarının bir kısmına ACR içeren su verilmiş ve bir kısmına ise ACR'siz su içirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, uygulanan ACR konsantrasyonunun %34'ünün idrarla atıldığı tespit edilmiştir. Birkaç gün sonra sonuçlara bakıldığında ise, ACR'nin bir kısmının da hemoglobine ya da serum proteinlerine bağlanmış halde olduğu ortaya çıkmış ve ACR emiliminin aslında %34'den daha fazla olduğu rapor edilmiştir.

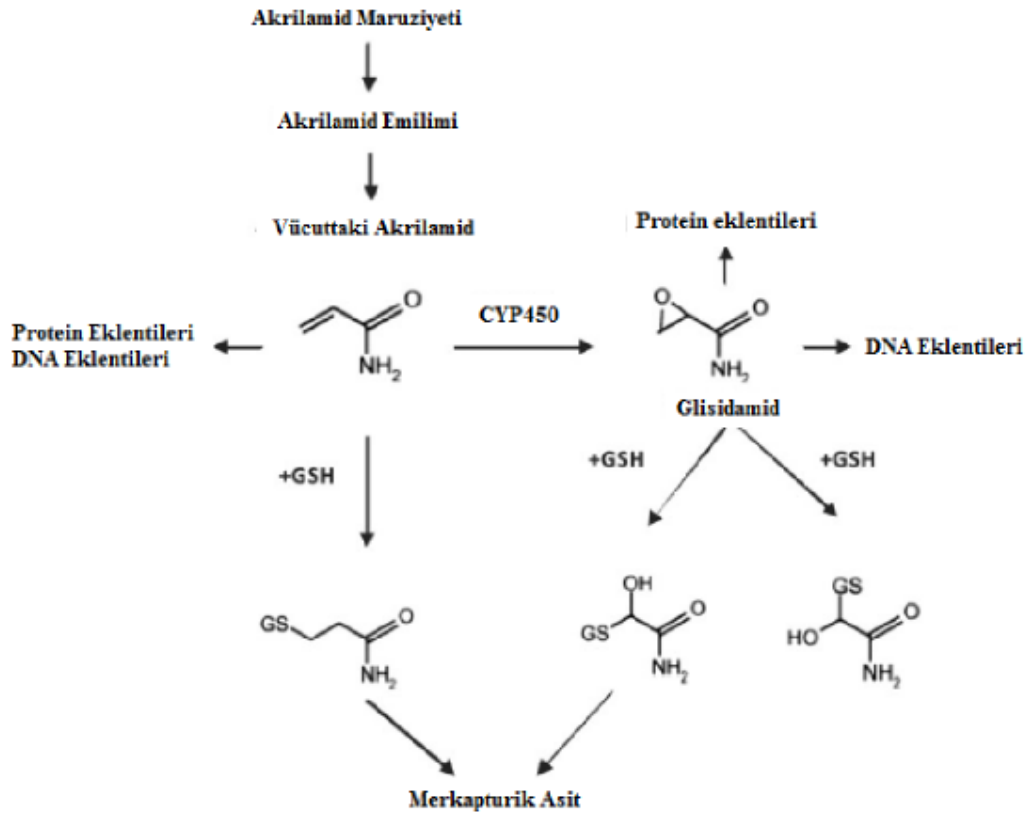
Yapılan çalışmalarda ACR için vücutta en yoğun ve kolay atılım yolu idrar olarak belirlenmiştir. ACR ve ACR ürünlerinin atımının %40-70'i idrarla, %5-6'sı dışkıyla, %6'sı solunum yoluyla ve %15'i ise safrayla olduğu tespit edilmiştir (Sumner ve ark., 2003). İnsanlardaki toksikokinetik çalışmalar, ACR için 2.4-7.0 saatlik bir yarılanma ömrünün olduğunu göstermiştir (Sorgel ve ark., 2002; Fuhr ve ark., 2006). İdrardaki değişmemiş ACR, alınan ACR'nin yaklaşık %4.4'ünü oluşturmaktadır (Fuhr ve ark., 2006; Boettcher ve ark., 2006). Vücut tarafından alınan ACR'nin %60'ından fazlası idrardan vücuda geri kazanılabilir (Fuhr ve ark., 2006; Boettcher ve ark., 2006) ve bunların %86'sı glutatyon (GSH) konjugatlarıdır. Bunlar arasında ACR'nin merkaptürik asit metabolitleri (N-asetil-S-(2-karbamoiletıl)-sistein), GA (N-asetil-S-(2-hidroksi-2-karbamoiletıl)-sistein) ve az miktarda da diğer türevler bulunmaktadır (Fennell ve ark., 2005).

Hem ACR hem de GA, plazma proteinlerine, özellikle hemoglobine bağlanmak için önemli bir afiniteye sahiptir. Hemoglobine bağlı ACR ve GA, ACR'ye maruz kalmanın dahili doz belirteçleri olarak bilinen N-terminal valin eklentileridir (Friedman, 2003). ACR insan plasentasında (Schettgen ve ark., 2004)

ve anne sütünde (Sorgel ve ark., 2002) de bulunabilmektedir ve dolayısıyla fetüse veya yenidoğan bebeklere kolayca aktarılabilmektedir (Besaratina ve Pfeifer, 2007).

Erkek albino sıçanlara radyoaktif işaretli ACR-(<sup>14</sup>C) uygulanarak yapılan bir çalışmada, çeşitli dokularda biriken radyoaktivite ölçülmüştür. En yüksek değerin kanda olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi, kanda her 1 mol hemoglobine 4 mol ACR'nin bağlanmasına dayandırılmıştır (Hashimoto ve Aldridge, 1970). Sıçan ve fareler kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise, hayvanlar solunum yoluyla ACR'ye maruz bırakılmıştır. Sıçanların dokularında biriken ACR düzeyleri yüksekten düşüğe doğru; kan > testis > deri > karaciğer > böbrek > beyin > dalak > akciğer > epididimis > yağ olarak bulunmuştur. Fare dokularında ise; testis > deri > karaciğer > böbrek > epididimis > beyin > akciğer > kan > yağ şeklinde sıralanmıştır. Sonuçlara bakılarak ACR'nin sıçan ve fare dokularında farklı şekilde dağıldığı rapor edilmiştir (Sumner ve ark., 2003).

Vücut içerisine giren ACR iki temel metabolik yolu izleyerek metatabolize olur. Bunlardan birincisi glutatyon S-transferaz (GST) enziminin katalizlediği GSH ile birleşmesidir (Sumner ve ark., 1992; Yener, 2008). Bu yol ratlar ve farelerin idrarlarında bulunan bir metabolit olan N-asetil-S-(3-amino-3-oksopropil)-sistein oluşumu ile sonuçlanır. Hem rat hem de farelerde oluşan temel metabolit olan bu ürün, ratlarda gözlenen idrar metabolitlerinin %70'i ve farelerde gözlenen idrar metabolitinin %40'ını oluşturur. N-asetil-S-(2-karbamoletil)-sistein ise insan idrarından atılan temel metabolittir (Friedman 2003; Yener, 2008). ACR'nin ikinci metabolik yolu ise GA'yı oluşturacak epoksidasyondur (Calleman ve ark., 1990; Sumner ve ark., 1992; Ghanayem ve ark., 2000). Kemirgenlerde GA'yı veren epoksidasyon reaksiyonu, CYP2E1 ile katalize edilmekte olup (Sumner ve ark., 1999; Yener, 2008), GA'ya merkapturik asiti oluşturmak için GSH ile birleşmekte ya da epoksit hidrolaz yardımıyla metabolize olmaktadır (Kirman, 2003; Yener, 2008) (Şekil 2.8).



**Şekil 2.8** ACR'nin Metabolik Şeması (Rifai ve Saleh, 2020)

Kemirgenlerde yapılan toksikokinetik çalışmalar, farelerin sıçanlara göre önemli ölçüde ve daha düşük miktarda idrarla atılan ACR-GSH konjugat seviyelerine sahip olduğunu ve farelerde ACR'nin detoksifikasyonunun daha düşük olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, farelerde serbest ve GSH ile konjuge edilmiş GA seviyeleri sıçanlara göre önemli ölçüde yüksek görülmüştür (Sumner ve ark., 1997). Ayrıca, uygulanan ACR konsantrasyonu başına GA-hemoglobin eklenti oluşumunun derecesi farelerde sıçanlara göre 3 ila 10 kat daha fazla bulunmuştur (Paulsson ve ark., 2001). Bu nedenle, kemirgenlerin insanlardan daha etkili bir şekilde ACR'yi GA'ya metabolize ettiği sonucuna varılabilir (Fuhr ve ark., 2006; Boettcher ve ark., 2006; Besaratinia ve Pfeifer, 2007).

## 2.5 Akrilamidin Toksisitesi

1994 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından, fare ve ratlardaki pozitif biyoanaliz sonuçlarına dayanarak, ACR'nin "insanlar üzerinde muhtemel bir karsinojenik" madde olduğu belirtilip Grup 2A'ya dahil edilmiştir (Anonim, 1994; Fazendeiro, 2013). Düşük ve yüksek dozlarda ACR'nin toksisitesini

incelemek için yapılan bir çalışmada, histopatolojik incelemeler sonucu ACR toksisitesinden en fazla etkilenen organların karaciğer ve böbreği takiben beyin, tiroid bezi ve testis olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca ACR toksisitesinin doza bağımlı olduğu da belirtilmiştir (Abd El-Mottaleb ve Rashed, 2008). ACR'nin biyomakromoleküllere yönelik bir reaktif olduğu ve genotoksisiteye sebep olan şüpheli moleküllerden birisi olduğu ileri sürülmüştür (Paulsson ve ark., 2003; Ji ve ark., 2013). Kemirgenler ile yapılan deneylerde ACR'nin nörotoksitesi, gelişimsel ve üreme toksisitesi, genotoksitesi ve karsinojenitesi belgelenmiştir (Parzefall, 2008; Kutting ve ark., 2009; Lin ve ark., 2013). Yüksek miktarda ACR'ye mesleki maruziyet sonucu maruz kalan insanlarla yapılan çalışmalar, hayvanlarda gözlenen nörotoksik etkiler ile tutarlılık göstermiştir (Anonim, 2005; Lin ve ark., 2013). Deney hayvanlarında, ACR'nin nörotoksik, genotoksik ve karsinojenik olmasının yanı sıra gelişimsel ve üreme toksisitesini de indüklediği belirtilmiştir (Tardiff ve ark., 2010; Prasad, 2013).

Kemirgenlerde somatik ve germ hücrelerinde nörotoksik (LoPachin ve ark., 2003), klastojenik (Ghanayem ve ark., 2005) ve mutajenik (Mucci ve Wilson, 2008; Klaunig, 2008) etkileri bulunan ACR'nin, insanlarda da muhtemel bir karsinojen olabileceği ifade edilmektedir (Anonim, 1994; Lee ve ark., 2014).

### **2.5.1 Nörotoksisite**

Nörotoksisite, ACR maruziyetinin önemli bir sonucudur ve önemli ölçüde dikkat çekmektedir. Yapılan birçok çalışma, ACR'nin güçlü bir nörotoksik ajan olabileceğini göstermiştir.

İnsanlarda ACR nörotoksitesinin genel semptomları, karakteristik bir ataksi, iskelet kası zayıflığı, kilo kaybı, distal şişlik ve merkezi ve periferik sinir sistemlerinde aksonların dejenerasyonudur. Örneğin, İsveç'in güneybatısına yakın bir demiryolu tüneli inşaatı sırasında işçilerde sinir fonksiyonlarında bozulma belirtilerinin gelişmeye başladığı tespit edilmiş ve bunun da tünel duvarındaki sızıntıları su geçirmez hale getirmek için kullanılan ACR içeren Rhoca-Gel adlı özel bir jelin olduğu bulunmuştur. Bu ACR ve N-metilolakrilamid içeren enjeksiyon maddesinin kısa süreli ancak yoğun dozlarına maruz kalan işçilerde periferik nöropatinin oluştuğu bildirilmiştir. Periferik sinir semptomları ile biyobelirteç olarak

kullanılan hemoglobin eklentileri arasında önemli bir doz-yanıt ilişkisi olduğu gözlemlenmiştir (Hagmar ve ark., 2001).

Kemirgen toksisite çalışmalarında, ACR'nin 10 mg/kg ile 50 mg/kg canlı ağırlık/gün olarak tekrarlanan dozlarına maruz kalmanın çoğu laboratuvar hayvanı türünde nöropatiye neden olduğu bildirilirken, 100 mg/kg ile 200 mg/kg'lık tek dozlara maruz kalmanın ise çoğu hayvanda ölümcül olduğu bildirilmiştir (Anonim, 2010).

ACR'ye mesleki olarak maruz kalan popülasyonlardaki nörotoksik etkiler ise birçok epidemiyolojik çalışmayla belirlenmiştir (He ve ark., 1989; LoPachin ve ark., 2003; Zamani ve ark., 2017). Laboratuvar hayvanlarında ACR nörotoksitesisi için en düşük gözlemlenebilir yan etki düzeyi ise 2 µg/kg/gün olarak bildirilmiştir (Zamani ve ark., 2017). Kediler, sıçanlar, fareler, kobaylar, tavşanlar ve maymunlar gibi bazı laboratuvar hayvanı türünde yapılan araştırmalar, ACR'nin tekrarlanan günlük maruziyetinin ataksi ve iskelet kası zayıflığı gibi etkilere yol açtığı ortaya konulmuştur. Liu ve ark., (2015) ACR'nin sıçan primer astrositlerinde apoptozu indüklediği, BV-2 mikroglia (merkezi sinir sisteminde bulunan makrofajlar) hücrelerinde de mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (Zamani ve ark., 2017).

Erdemli ve ark., (2016) tarafından yapılan araştırmalar, annelerin ACR'ye maruz kalmasının fetal beyin dokusundaki nöronal yapılarda dejenerasyona, hemorajik hasara ve beyinden kaynaklanan nörotrofik faktör düzeylerinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarla, ACR'nin progenitör nöral hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve nöral biyobelirteçlerin ekspresyonunu azalttığı öne sürülmüştür (Attoff ve ark., 2016; Matosoa ve ark., 2019). Chen ve Chou (2015)'nin yaptığı başka bir çalışmada ise, ACR'nin insan nöroblastomunu ve glioblastoma hücrel farklılaşmasını inhibe ederek sinir sistemini bozduğunu rapor etmiştir (Rifai ve Saleh, 2020).

### **2.5.2 Genotoksisite**

Yapılan çeşitli araştırmalar ile ACR'nin genotoksik, karsinojenik ve üreme sistemi üzerinde etkileri olduğu gözlenmiştir (Daughton, 1988; Tan ve ark., 2013). ACR, genotoksisite bakımından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak geniş ölçüde

incelenmiş ve ACR'nin DNA hasarı, gen mutasyonu, kromozom anormallikleri (KA), mikronukleus (MN), kardeş kromatid değişimi (KKD), programsız DNA sentezi, DNA tek zincir kırıkları, anoploidi, poliploidi oluşumu ve diğer mitotik bozukluklara neden olduğu belirtilmiştir (Adler ve ark., 1988; Mei ve ark., 2008; Hansen ve ark., 2010; Zhao ve ark., 2015).

ACR ve metabolitleri ile ilgili olarak memelilerde yapılmış çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (Favor ve Shelby, 2005). ACR ve onun metaboliti olan GA'nın DNA hasar potansiyeli comet yöntemi ile karşılaştırılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra V79 ve Caco-2 hücrelerinde ACR'nin en yüksek konsantrasyonunda DNA hasarında önemli bir artış gözlenmiştir. Bununla birlikte, primer fare hepatositlerinde DNA zincir kırıklarının olduğu bölgelerde indüklenen CYP2E1'de de önemli miktarda artış bulunmuştur. GA ile doğrudan muamelelerde, 100 M ve üzerindeki konsantrasyonlarda V79 hücreleri ve fare primer hepatositlerinde DNA hasarında önemli bir artış meydana geldiği görülmüştür. Caco-2 hücrelerinde GA'nın 300 M ve üzerindeki konsantrasyonlarında DNA kırıklarının artışına neden olduğu gözlenmiştir. Bu verilere göre ACR'ye kıyasla GA'nın daha yüksek bir genotoksik potansiyeli olduğu doğrulanmıştır (Puppel ve ark., 2005). Jiang ve ark., (2007)'nin yaptığı bir çalışmada, comet ve MN testi kullanılarak insan hepatoma G2 (HepG2) hücrelerinde ACR'nin olası genotoksitesini değerlendirilmiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksidatif DNA hasarı seviyesinin hücre içi oluşumları 8-hidroksideoksiguanozinin (8-OHdG) immünohistokimyasal analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ACR dozlarına bağlı olarak HepG2 hücrelerinde MN sıklığında ve DNA zincir kırıklarının oluşumunda artışlar olduğunu göstermiştir. ACR'nin *in vivo* genotoksitesinin erkek ve dişi fare gruplarında araştırıldığı bir çalışmada, içme suyu yoluyla verilen 100 ve 500 mg/lt dozlarındaki ACR'nin ya da GA'nın MN'li retikülosit sıklığını önemli derecede arttırdığı görülmüştür. *In vivo* ve *in vitro* olarak gerçekleştirilen laboratuvar testlerinde ACR'nin ve temel metabolitlerinden olan GA'nın yüksek dozlarda genotoksik etki gösterdiği de belirlenmiştir (Manjanatha ve ark., 2006; Besaratinia ve Pfeifer, 2007). Hücre kültürü çalışmalarında ACR'nin ve GA'nın kromozom kırıklarına ve kromozomlarda nokta mutasyonlarına sebep olduğu (Rice, 2005; Yener, 2008), bazı test sistemlerinde ise anöploidiye sebep olan KA ve mitotik bozukluklara yol açtığı

görülmüştür (Dearfield ve ark., 1995; Yener, 2008). ACR'nin fare spermatositlerinde ve rat kemik iliğinde anöploidiye sebep olduğunun gösterildiği bir çalışmada, 120 mg/kg dozundaki ACR'nin hem üreme hem de vücut hücrelerinde hücre döngüsünde gecikmelere sebep olduğu belirlenmiştir (Gassner ve Adler, 1996; Yener, 2008). Ayrıca uygulanan aynı dozun fare kemik iliğinde KA'yı arttırdığı ve mitotik indekste ise azalmaya neden olduğu da tespit edilmiştir (Adler ve ark., 1988; Yener, 2008). Hem dolaşım kanındaki eritrositlerde hem de kemik iliği polikromatik eritrositlerinde (PCE) gerçekleştirilen çok sayıdaki MN çalışmalarında ACR'nin genotoksik etkisinin olduğu ortaya konulmuştur (Cao ve ark., 1993; Paulsson ve ark., 2002; Yener, 2008). Fare ve ratlar kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda ACR'nin farelerde MN oluşumunu arttırdığı (Paulsson ve ark., 2002; Yang, 2005b; Manjanatha ve ark., 2006), buna karşın ratlarda MN oluşumunu etkilemediği belirlenmiştir (Paulsson ve ark., 2002; Yener, 2008). ACR'nin farklı dozları ile 24 ve 48 saatliğine maruziyete bırakılmış insan kan lenfosit hücreleri pozitif kontrol (mitomisin C) ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, tüm ACR maruziyetlerinin KA'ların sıklığını belirgin bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. Tüm uygulama dozlarında mitotik indeksin önemli derecede düştüğü, kromozom ve kromatid kırıkları, kardeş kromatid birleşmeleri ve kromatid değişimlerinin arttığı saptanmıştır. Bazı ACR konsantrasyonlarında poliploidi de gözlenmiştir. Bu sonuçlar ACR'nin insan lenfositlerinde kromozomlar üzerine *in vitro* olarak klastojenik etkisinin olduğunu göstermiştir (Aksu ve ark., 2010). Alzahrani (2011)'nin farelerle yaptığı bir çalışmada, 10, 20 ve 30 mg/kg'da tek seferlik verilen ACR dozlarının ve 1-2 hafta boyunca 10 mg/kg'lık tekrarlanan dozların, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde DNA hasarına, MN ve KA artışa neden olduğu rapor edilmiştir. ACR'ye maruz bırakılan ratlarda comet yöntemi ile hepatik dokulardaki DNA değişimleri incelenmiş ve ACR kaynaklı hepatoksisitede genotoksik mekanizmaların olası kalıtımı açıklanmaya çalışılmıştır. Toplam protein, albümin ve globülin düzeylerinde anlamlı bir azalma kaydedilirken, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT)'da önemli bir artış gözlenmiştir. ACR, hem CYP2E1 proteini hem de mRNA ekspresyonunda düşük regülasyona sebep olmuştur. DNA tek zincir kırıklarında doza bağlı olarak önemli artışlar görülmüştür. Histopatolojik incelemeler sonucunda da ACR'ye maruz bırakılan ratların karaciğerinde nekrotik ve dejeneratif



değişiklikler saptandığı belirtilmiştir (El-Bohi ve ark., 2011). ACR ile muamele edilen ratlar ve civciv yumurtaları kullanılarak retikülositlerde MN oluşumunu incelenmiştir. Rat ve civciv embriyolarındaki ACR maruziyeti sadece periferik kan hücrelerine değil aynı zamanda retikülositlere de zarar vermiştir. Civciv embriyosunda MN testi ACR'nin doz artışına bağlı olarak pozitif sonuçlar vermiştir (Venkatasubbaiah ve ark., 2013).

İnsan karaciğer embriyo L-02 hücre hattı (Xu ve ark., 2009) ve insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre hatları (Sumizawa ve Igisu, 2007) üzerindeki *in vitro* çalışmalar ve Sprague-Dawley ratların testisleri (Yang ve ark., 2005a) ile Wistar ratların merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi dokularının (Li ve ark., 2006) *in vivo* çalışmaları sonucu, ACR'nin apoptozisi indüklediği de rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2013).

ACR'nin yüksek dozlarının, *in vitro* çalışmalarda (Jiang ve ark., 2007; Catalgol ve ark., 2009) ve kemirgenlerde (Yousef ve ark., 2006; Zhu ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2010) kimyasal kronik hücre hasarının ve bazı durumlarda genetik hasarın önemli bir kaynağı olabilen, ROS oluşumuna, artışına ve antioksidan savunma mekanizmalarının etkinliğinin azalmasına sebep olan oksidatif stresi indüklediği gözlenmiştir (Lin ve ark., 2013). Kemirgenlerde çeşitli organlarda ACR kaynaklı lipid peroksidasyonunun arttığı ve GSH miktarının azaldığı belirtilmiştir (Zhu ve ark., 2008; Ghareeb ve ark., 2010; Prasad, 2013). ACR'nin hepatositlerde (Cao ve ark., 2008), kalın bağırsak hücrelerinde (Rodriguez-Ramiro ve ark., 2011) ve sinir sistemi hücrelerinde (Pernice ve ark., 2009; Park ve ark., 2010) oksidatif stres oluşturduğu ve hücre fonksiyonlarını yavaşlatarak hücre ölümüne yol açtığı da bildirilmiştir (Chen ve ark., 2013). ACR'nin fare epidermal hücrelerinde Cox-2 ekspresyonunu ve meme epitel hücrelerinde nitrik oksit sintazı yükselttiği rapor edilmiştir (Cook ve ark., 2011; Lim ve ark., 2011; Prasad, 2013). Cox-2' nin artan ekspresyonunun, eninde sonunda hücre yıkımı ile sonuçlanan apoptozu tetikleyen enflamatuar reaksiyonların bir kademesi olarak sonuçlandığı bilinmektedir (Prasad, 2013).

ACR'nin CYP2E1 metabolizmasında GA'ya dönüşümünün genotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, CYP2E1 metabolizması inaktif erkek fareler ile

kontrol grubu erkek farelere birbirini izleyen günlerde 0, 12.5, 25 ve 50 mg/kg ACR enjekte edilip belirli zamanlarda ACR maruziyeti olmayan dişi farelerle çiftleştirilmiştir. Gebeliğin son zamanlarında yapılan uterus analizlerinde CYP2E1 metabolizması inaktif fare ile çiftleşmesi sonucu oluşan uterus dışında, doza bağlı artan dominant öldürücü mutasyonlar saptanmıştır. Bulunan sonuçlara göre CYP2E1 ile GA'ya dönüşümünün hem vücut hücreleri hem de üreme hücrelerinde genetik hasarlara neden olduğu görülmüştür (Besaratina ve Pfeifer, 2007; Daşgın ve Yıldız, 2014).

Sonuç olarak, yapılan pek çok *in vitro* ve *in vivo* modeller kullanılarak yapılan toksisite testlerde ACR'nin genotoksik etkisinin olduğu gözlemlenmiştir (Exon, 2006; Zamani ve ark., 2017).

### **2.5.3 Karsinojenite**

ACR'nin hayvanlarda birçok organda tümör oluşumuna neden olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (Johnson ve ark., 1986; Friedman ve ark., 1995; Chen ve ark., 2013). ACR; uterus, deri, meme bezleri ve beyin de dahil birçok organda tümör oluşumuna sebep olan bir çoklu organ karsinojeni olarak nitelendirilmiştir (Parzefall, 2008; Capuano ve Fogliano, 2011; Tan ve ark., 2013). Bununla birlikte, epidemiyolojik çalışmalar insandaki ACR tüketimi ve kanser arasındaki bağı tam anlamıyla açıklığa kavuşturamamıştır (Arribas-Lorenzo ve Morales, 2012; Tan ve ark., 2013).

ACR'nin karsinojen potansiyelinin bulunup bulunmadığının araştırılması için fare ve ratlarda çok sayıda çalışma yürütülmüştür. İki yıl boyunca ratlarla ve farelerle gerçekleştirilen çalışmalarda, çeşitli uygulama şekillerinde verilen ACR'nin tümör oluşumuna sebep olabildiği belirlenmiştir (Rice 2005; Yener, 2008). ACR'nin ratların içme sularına karıştırılarak verilmesi ile gerçekleştirilen bir çalışmada, ACR'nin tümör oluşumuna neden olduğu ve erkek ratlarda testis ve tiroid tümörlerinin, dişi ratlarda ise meme fibroadenomasi ve tiroid tümörlerinin oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir (Friedman ve ark., 1995; Yener, 2008). Park ve ark., (2002) Suriye hamster embriyo (SHE) hücrelerinde morfolojik dönüşümün yanı sıra potansiyel mekanizmalar da kullanarak, ACR'nin hücre sel transformasyona neden olabileceği olasılığını incelemiştir. 0.5 mM ve üzerindeki

konsantrasyonlardaki ACR maruziyetinin hücrelerin morfolojik değişimini başlattığı görülmüştür. ACR'nin subakut olarak muamelesi sonucunda tiroid, testis mezotelyumu ve adrenal medulla gibi hedef dokularda karsinogeneizde önemli rolü olan DNA sentezinin arttığı görülmüştür (Lafferty ve ark., 2004; Yener, 2008). Yenidoğan farelerle yapılan bir çalışmada, ACR ve GA'nın karaciğerde tümör oluşumuna yol açtığı rapor edilmiştir (Von Tungeln ve ark., 2012). ACR'nin ratlarda, meme ve tiroid bezi tümörlerinin oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Johnson ve ark., 1986; Friedman ve ark., 1995; Beland ve ark., 2013; Maronpot ve ark., 2015). Hayvanların içme suyu ile yüksek konsantrasyonlarda ACR'ye uzun süre maruz kalması, hem erkek hem de dişi bireylerde birden fazla bölgede tümör gelişimine yol açtığı gözlenmiştir (Exon, 2006; Rifai ve Saleh, 2020).

Mesleki veya diyetle maruziyetten sonra insanlarda ACR'nin karsinojenitesi gözden geçirilmiştir (Anonim, 1994; Erdreich ve Friedman, 2004; Mucci ve Wilson, 2008; Mucci ve Adami, 2009). ACR'ye mesleki olarak maruz kalan bireylerde, pankreas haricinde, diğer herhangi bir organda kanser insidansında doza bağlı tutarlı bir artış olmamıştır. ACR'ye diyetle maruz kalma ile, kolorektal, mesane, özofagus, prostat, orofaringeal, gırtlak, pankreas, mide veya akciğer kanseri riski ilişkilendirilmemiştir. Diyetteki ACR'nin meme, böbrek, yumurtalık ve endometriyal kanser riski üzerindeki etkisine ilişkin veriler ise tutarsızdır. Bu incelemelerin ardından, diyetteki ACR ile beyin, meme, endometriyal, baş ve boyun, yumurtalık, prostat ve tiroid kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen ek epidemiyolojik çalışmalar ortaya çıkmıştır (Hogervorst ve ark., 2009; Larsson ve ark., 2009a, b; Schouten ve ark., 2009; Wilson ve ark., 2010). ACR maruziyeti sonucu yumurtalık ve endometriyal kanserlerin oluşumu arasında bir ilişki olabileceği, ancak diğer kanser tipleri ile ACR maruziyeti arasında bir ilişkinin olmadığı rapor edilmiştir (Larsson ve ark., 2009b; Wilson ve ark., 2010; Anonim, 2012). Rastgele 5000 erkek ve kadından oluşan bir grupta yapılan bir çalışmada, ACR'nin diyetle alınması ile böbrek kanseri riski arasında pozitif bir ilişkinin bazı göstergeleri bildirilmesine rağmen, mesane ve prostat kanseri riski ile pozitif bir ilişkisi bulunmamıştır (Hogervorst ve ark., 2008a; Anonim, 2012). Hogervorst ve ark., (2007) tarafından yapılan bir çalışmada ise, artan beslenmeyle ACR alımı arasında postmenopozal endometriyal ve yumurtalık kanseri riski arasında bir ilişki olabileceği düşünölmüştür (Boyacı ve Cengiz, 2012).

İnsanlarda besinlerle ACR alımının artışı ile endometrium, yumurtalık ve böbrek kanserinin sıklığının arttığı rapor edilmiştir (Hogervorst ve ark., 2009b; Chen ve ark., 2013). Birçok çalışmada ACR'nin bağırsak, böbrek, mesane, ağız, özofagus, gırtlak, meme, ovaryum veya prostat kanserleri oluşumu ile ilişkili olmadığı belirtilirken (Mucci ve ark., 2003; Pelucchi ve ark., 2006), birçok epidemiyolojik çalışmada ise, meme kanseri (Olesen ve ark., 2008), böbrek kanseri (Hogervorst ve ark., 2008a) gibi çeşitli kanserler ile ilişkili olduğu desteklenmiştir (Ji ve ark., 2013). Monomer ve polimer üretimi sırasında ACR'ye maruz kalan 8000'in üzerinde işçiyi kapsayan epidemiyolojik bir çalışmada, ACR'ye maruz kalma ile kanser ve kanserden kaynaklanan ölümler arasında bir ilişki saptanmamıştır. Diğer taraftan, ağır ACR maruziyetinin pankreas kanser riskini 2 kat artırdığı görülmüştür (Marsh ve ark., 1999; Daşgın ve Yıldız, 2014). İsveçli 43404 kadının yer aldığı ve en kapsamlı epidemiyolojik çalışmalardan biri olarak gösterilen bir çalışmada, meme kanseri riski ile diyetle alınan ACR arasında istatistiksel açıdan herhangi bir ilişki bulunmamıştır (Mucci ve ark., 2005; Daşgın ve Yıldız, 2014). Yapılan bir çalışmada meme kanserli 374 kadın ile postmenopozal 374 kadının hemoglobin molekülüne bağlanan ACR ve metaboliti olan GA düzeyleri karşılaştırılmıştır. Hem kontrol hem de vaka grubunda benzer düzeylerde ACR ve GA bulunmuştur. Sigara içimi, hipertansiyon, alkol alımı gibi diğer parametrelerin etkisi düzenlendikten sonra bu çalışma sonucuna göre hemoglobine bağlanan ACR düzeyleri ile östrojen reseptörü pozitif meme kanseri arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Yüksek Hb-ACR olan bireylerin östrojen reseptörü pozitif meme kanseri olma riski 2.7 kat daha fazla bulunmuştur (Olesen ve ark., 2008; Daşgın ve Yıldız, 2014). Deney hayvanları ile yapılan birkaç epidemiyolojik çalışma ise, ACR'ye mesleki olarak ya da beslenme yoluyla maruz kalmanın, insanlarda karsinogenik etkilere yol açtığına dair tutarlı bir kanıt bulamamıştır (Zamani ve ark., 2017; Kumar ve ark., 2018).

Görülebileceği üzere, ACR'nin olası karsinogenik etkilerinin değerlendirildiği daha önceden yapılmış olan *in vitro* ve *in vivo* araştırmalardan farklı sonuçlar alındığı göze çarpmaktadır.

#### **2.5.4 Bakteriyel Mutagenез**

ACR'nin, bir ekzojen metabolik sistemin varlığında veya yokluğunda *Salmonella typhimurium* test suşlarında (TA97, TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 ve TA1538) mutajenik olmadığı görülmüştür (Anonim, 1994; Besaratinia ve Pfeifer, 2007). Ayrıca, ACR'nin *Escherichia coli* ile yapılan mutasyon deneyinde veya *Klebsiella pneumoniae* ile yapılan ileri mutasyon deneyinde de mutajenik olmadığı belirlenmiştir (Besaratinia ve Pfeifer, 2005; Anonim, 2012).

#### **2.5.5 In vitro Memeli Gen Mutasyonu**

ACR'nin, fare lenfoma hücrelerinde ve Big Blue fare embriyonik fibroblastlarında zayıf bir şekilde mutajenik olduğu, ancak Çin hamsteri V79 hücrelerinde mutajenik olmadığı rapor edilmiştir (Anonim, 1994; Dearfield ve ark., 1995; Besaratinia ve Pfeifer, 2007). Big Blue fare embriyonik fibroblastlarındaki mutasyon sıklığındaki artış, A→G geçişindeki ve G→C transversiyon mutasyonlarındaki bir artışla ilişkilendirilmiştir (Besaratinia ve Pfeifer, 2003, 2004; Anonim, 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile, ACR'nin rat lenfositinde Hprt geninin (hipoksantin inozin monofosfata ve guaninin guanozin monofosfata dönüşümünü katalize eden bir transferaz) (Mei ve ark., 2010) ve rat testisinde gpt geminin (protein kodlayan gen) (Koyama ve ark., 2011) mutasyonuna sebep olduğu açıklığa kavuşmuştur (Tan ve ark., 2013).

#### **2.5.6 In vivo Memeli Gen Mutasyonu**

ACR'nin, fareler kullanılarak yapılan spot testinde pozitif bir mutajenik yanıt verdiği görülmüştür (Neuhäuser-Klaus ve Schmahl, 1989). Transgenik mutant farelerin lacZ geni (Laktozu glukoz ve galaktoza parçalayan B-galaktosidaz enzimini kodlayan gen) değerlendirildiğinde, ACR'nin karaciğerde mutajenik olmadığı (Krebs ve Favor, 1997), ancak kemik iliğinde artmış bir mutant frekans verdiği görülmüştür (Hoorn ve ark., 1993; Anonim, 1994; Anonim, 2012).

İçme suyu ile ACR verilen transgenik Big Blue farelerinin dalak T lenfositlerinde endojen Hprt geninde ve karaciğer, akciğer ve testislerde ekzojen cII geninde artmış mutant frekanslara sahip olduğu gözlenmiştir (Manjanatha ve ark., 2006; Guo ve ark., 2009; Wang ve ark., 2010). Karaciğer dokusundan alınan cII mutasyonlarının moleküler analizi, G→T transversiyon mutasyonlarını ve -1 ve +1

çerçeve kayması mutasyonlarını göstermiştir (Manjanatha ve ark., 2006). İçme suyunda ACR uygulanan transgenik Big Blue sıçanların her iki cinsiyetinde dalak T lenfositlerindeki endojen Hprt geninde ve dişilerin tiroid ve kemik iliğinde ekzojen cII geninde artmış mutant frekans oluşturduğu görülmüştür (Mei ve ark., 2010; Anonim, 2012).

Doğum sonrası 1., 8. ve 15. günlerde ACR ile muamele edilen neonatal B6C3F1/Tk +/- farelerinde, dalak T lenfositlerinin Hprt veya Tk geninde (timidinin, timidin monofosfata dönüşmesini katalizleyen timidin kinaz enzimini kodlayan gen) mutant frekansında bir artış görülmediği belirtilmiştir (Von Tungeln ve ark., 2009). Buna karşılık, doğum sonrası 1.-8. günler arasında yapılan muamelenin, her iki gende de artan mutant frekansı ile sonuçlandığı rapor edilmiştir. Oluşan bu Tk mutasyonları heterozigotluk kaybı ile ilişkilendirilmiştir (Von Tungeln ve ark., 2009; Anonim, 2012).

### **2.5.7 Fertilite**

ACR'nin spermatogenezde kromozomal anomalilere neden olduğu ileri sürülmüştür (Lü ve ark., 2009). Erkek sıçanlarda 5 günden daha fazla 15 mg/kg/gün, farelerde ise 4 hafta süresince günde 12 mg/kg'a kadar ACR'ye maruz kalma sonucu fertilitede bozulmalar gözlenmiştir (Anonim, 2002a; Daşgın ve Yıldız, 2014). Oral gavaj yöntemi ile 0, 5, 10, 30, 45 ve 60 mg/kg/gün ACR verilen sıçanlarda ACR dozuyla ters orantılı olarak azalan sperm sayısı ve serum testosteron düzeyleri bildirilmiştir. Ayrıca apoptozis ile ilişkili gen ekspresyonunda artış kaydedilmiştir (Yang ve ark., 2005a; Daşgın ve Yıldız, 2014). Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 0.5-10 mg/kg ACR maruziyetinin, sıçanların büyümesini geciktirdiği ve epididimal sperm rezervlerini kontrol grubuna kıyasla azalttığı rapor edilmiştir. Ayrıca ACR ile muamele edilen sıçanların testislerinde histopatolojik lezyonlar da bulunmuştur (Wang ve ark., 2010; Zamani ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, Wei ve ark., (2014) ACR'nin farelerde dişi üreme sistemi için toksik olabileceğini gözlemlemiştir. Oral ACR dozlarının vücut ağırlıklarını, organ ağırlıklarını ve corpus luteum sayısını önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. ACR, doza bağlı olarak serum progesteron konsantrasyonlarını da düşürmüştür (Zamani ve ark., 2017). Ek olarak, erkek sıçanlara 20 gün boyunca tekrarlanan ACR (20 mg/kg) maruziyetinin, doza bağlı bir

şekilde testosteron konsantrasyonunda azalmalara neden olduğu gözlemlenmiştir (Ali, 1983; Rifai ve Saleh, 2020).

Yüksek düzeyde ACR alan laboratuvar hayvanlarında üreme toksisitesi değerlendirilmesine rağmen, insanda ACR'nin üreme toksisitesi hakkında doğrudan bir kanıt bulunmamaktadır (Tyl ve Friedman, 2003; Zamani ve ark., 2017).

### **2.5.8 İmmünotoksisite**

ACR'nin bağışıklık sistemi üzerindeki olumsuz etkileri ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır (Exon, 2006; Rifai ve Saleh, 2020). Jin ve ark., (2012) tarafından yapılan bir çalışmada dişi BALB/c farelerinde ACR'nin immünotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. ACR'nin lenf bezleri, timus ve dalakta patolojik değişikliklere neden olmasının yanı sıra, son vücut ağırlığını, dalak ve timus ağırlıklarını, lenfosit sayılarını azalttığı da gözlemlenmiştir. Ayrıca lenf bezlerinde, timusta ve dalakta patolojik değişikliklerin meydana geldiği görülmüştür (Fang ve ark., 2014; Ghamdi ve ark., 2020).

ACR'nin plasentayı geçip fetüse ulaştığı da rapor edilmiştir. Ancak doğum öncesi beslenmeyle vücuda alınan ACR'ye maruz kalma ile araştırılan bağışıklık ile ilgili sağlık sonuçları veya kan parametreleri arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır (Annola ve ark., 2008; Rifai ve Saleh, 2020).

### **2.5.9 Hepatotoksisite**

ACR karaciğerde metabolize olmasına rağmen, insanlarda hepatotoksisitesine ilişkin raporlar hala azdır. Bununla birlikte, hayvanlarda yapılan çok sayıda çalışma, beslenmeyle alınan ACR'nin oksidatif stres nedeniyle karaciğerde zararlı etkilerinin olduğunu bildirmiştir. 21 gün boyunca uygulanan 25 mg/kg'lık ACR dozunun, deneysel yetişkin sıçanlarda karaciğer GSH seviyesinde ve toplam antioksidan durumunda önemli bir düşüş meydana getirdiği bulunmuştur. Ayrıca, ACR uygulamasının, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinde azalmaya, karaciğer enzimlerinin (AST ve ALT) serum seviyesinde artışa ve toplam oksidan durumu seviyesinde de yükselmeye neden olduğu rapor edilmiştir (Ansar ve ark., 2016; Rifai ve Saleh, 2020).

## 2.6 Sitotoksosite, Genotoksosite ve Karsinojenitenin Değerlendirilmesinde Uygulanan Bazı Yöntemler

Sayıları gün geçtikçe artan ve maruziyetleri sunucu meydana getirdikleri biyolojik etkileri tam olarak bilinmeyen sentetik veya doğal maddelerin çevremizde kullanımlarının hızla artması ve kanser oluşumlarındaki artışlar nedeniyle, bu maddelerin sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin test edilmeleri gerekmektedir. Bu yüzden riski belirleyebilecek biyogöstergelere ihtiyaç duyulmuş ve genetik toksikolojinin önemi gün geçtikçe artmıştır (Şekeroğlu, 2010).

Bir maddenin mutajenik kapasitesi ile karsinojenik potansiyelinin birbirleriyle ilgili olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda, karsinojenik etkisi olan birçok maddenin mutajenik ya da mutajenik etkisi olan birçok maddenin de karsinojenik olduğu belirtilmiştir. Kimyasal maddelerin arasında bu tip bir ilişkinin olması, toksikoloji testlerinin, kimyasal maddelerin potansiyellerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılmasına neden olmuştur. Bu testlerden alınan pozitif veriler, kimyasalların kanser oluşumunda etken olabileceğini göstermektedir (Vural, 2005; Üstün, 2007; Şekeroğlu, 2010). Bu nedenle, toksisitenin belirlenmesinde uygulanan sitotoksosite, genotoksosite ve karsinojenite testlerinin önemi oldukça büyüktür.

### 2.6.1 Sitotoksosite ve Uygulanan Yöntemler

Hücre kültürü birçok alanda sıkça tercih edilmektedir. Bunlardan birisi de sitotoksitenin değerlendirilmesidir (Gilbert ve Boutros, 2016). Sitotoksik terimi, hücre ölümüne sebep olan anlamına gelmektedir. Bir maddenin sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla sitotoksosite testleri uygulanmaktadır. Hücre canlılığını baz alan bu çalışmalar, hem uygulama kolaylığı hemde *in vivo* çalışmaların sonuçlarıyla uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine ek olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sık sık tercih edilen testler haline gelmiştir (Riss ve Moravec, 2004). Sitotoksosite, incelenen maddelerin konsantrasyonuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar vermesi bir olaydır. Hücreler, bu sitotoksik maddelere maruz kaldığında nekroz, otofaji ve apoptoz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi ve ark, 2009).



Deneysel olarak çeşitli etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrası canlılıklarının olup olmadığının belirlenmesi önemli bir basamaktır (Niles ve ark., 2007). Hücre proliferasyonunun belirlenmesinde kullanılan çok sayıda test bulunmaktadır. Bu testler genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir (Fan ve Wood, 2007; Tokur ve Aksoy, 2017).

### **2.6.1.1 MTT Testi**

Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel parametre canlı hücrelerin metabolik aktiviteleridir. Örneğin tetrazolium tuzu kullanılarak yapılan ve bir sitotoksitate testi olan MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi, genellikle hücre proliferasyonu ve sitotoksitesinin kantitasyonunu belirlemede kullanılır. Tetrazolium tuzunun elektron alarak sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar (Oktar, 2009).

Çoğalan hücreler proliferasyon göstermeyen hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksitate değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir. MTT kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmeyen formazana dönüşür. Oluşan bu formazan izopropanol, dimetil sülfoksit (DMSO) veya başka bir çözücü yardımı ile çözünebilir hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Oktar, 2009). Tetrazolium halkası sadece aktif mitokondri tarafından kırıldığı için, renk reaksiyonu yalnızca canlı hücreler tarafından meydana getirilebilir. Ölü hücreler ise tetrazolium tuzunu indirgeme yeteneğini kaybettikleri için renk değişimini meydana getiremezler (Mossman, 1983; Oktar, 2009).

### **2.6.2 Genotoksitate ve Uygulanan Yöntemler**

Genotoksitate; DNA veya kromozomlarda oluşan hasarları, DNA kırıklarını, kromozom anormalliklerini, gen mutasyonlarını, klastojenite ve anöploidiyi kapsayan bir terimdir (Zeiger, 2004; Üstün, 2007; Şekeroğlu, 2010). Genotoksitate

testleri çeşitli ajanların insanda oluşturduğu etkilerinin araştırılmasında ve risk tayininin yapılmasında, çeşitli maddelerin toksik etkilerinin ve güvenilirliklerinin araştırılmasında ve kanserden korunmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Bedir ve ark., 2004; Şekeroğlu, 2010). Kısa dönem genotoksisite testleri tarama amaçlı uygulanırken, memeli testleri ise insanlardaki olası risklerin tayini için kullanılmaktadır (Vural, 2005; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Yaygın olarak uygulanan *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testlerine; ames testi, KA testi, MN testi, KKD testi ve comet testi örnek verilebilir (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). DNA hasarı sonucu oluşan olumsuz etkilerin kantitatif ölçümüne dayanan bu genotoksisite testlerine ek olarak, yakın zamanda geliştirilen  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 ko-lokalizasyon testinin de içinde bulunduğu yeni genotoksisite testleri de verim, hassasiyet ve güvenilirlik gibi gereksinimleri karşılayabilmektedir (Nikolova ve ark., 2017).

#### **2.6.2.1 $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Ko-lokalizasyon Testi**

DNA çift zincir kırıkları, hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkabilen en tehlikeli lezyon türleridir ve bunların etkili bir şekilde onarılması hücrenin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için son derece önemlidir. Çünkü tamir edilemeyen bu hasar; genomik kararsızlık, kanser gelişimi ve neoplastik transformasyona yol açan mutasyonların oluşumuna neden olabilir (Podhorecka ve ark., 2010; Atlı Şekeroğlu, 2013). DNA çift zincir kırıkları varlığında, 53BP1 ve fosforlanmış H2AX ( $\gamma$ H2AX) gibi DNA tamir ve DNA hasar sinyalizasyonunda görevli çeşitli proteinlerin odaklar oluşturduğu gösterilmiştir. Bu odaklara DNA tamir odakları da denilebilir ve mikroskobik düzeyde bu odakların saptanmasının DNA çift zincir kırıklarının oluşum ve tamir mekanizmalarına bakılmaksızın DNA çift zincir kırıklarının belirlenmesi için oldukça hassas bir yöntem olarak düşünülür.

$\gamma$ H2AX ve 53BP1'in oluşturduğu nükleer odaklar immünofloresan yöntem ile belirlenebilir. Bu teknik herbir hücredeki tek bir DNA çift zincir kırığının ölçülmesini sağlar (Belyaev ve ark., 2009; Lassmann ve ark., 2010). DNA hasar tespitini sağlayan diğer test veya uygulamalarla kıyaslandığında; tek bir hücre düzeyinde genomun bütünlüğündeki çok küçük değişiklikleri saptayabildiği için bu odakların belirlenmesi daha avantajlıdır. DNA hasarının göstergesi olarak çok

önemli indikatörler olan  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 odaklarının belirlenmesinin klinikte kullanımını da çok pratik ve faydalıdır. Ayrıca hücre ölümü ve yaşlanmada, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarının ve tamirinin tespitinde ve genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde de başarılı bir şekilde kullanılabilirler. Son yıllarda bu testlerin; kanser riskinin ve kansere duyarlılığın tayininde ve takibinin yapılmasında, dosimetride, radyoterapi ve kemoterapinin indüklediği DNA hasar seviyesinin moleküler düzeyde belirlenmesinde ve antikanser ajanlara karşı tümör hassasiyeti ya da direncinin tespit edilmesi konularındaki kullanımları da göz ardı edilemeyecek kadar artmıştır (Lassmann ve ark., 2010; Redon ve ark., 2011; Ivashkevich ve ark., 2012; Atlı Şekeroğlu, 2013).

#### **2.6.2.2 Comet Testi**

DNA kırıklarının tayinini sağlayan comet yöntemi, tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da adlandırılmaktadır. DNA tek ve çift zincir kırıklarına yol açan çeşitli ajanların tespiti için kullanılan güvenilir, hassas ve hızlı bir yöntemdir. Bu yöntem, birçok memeli hücresinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarımda meydana gelen bozuklukların tayininde, fiziksel ve kimyasal maddelerin özellikle insanlarda neden olduğu DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının tamiri ve derecesinin belirlenmesinde, bazı kalıtsal hastalıkların tanısında ve artan DNA hasarının tayininde kullanılan bir biyoizlem testidir. Ayrıca hızlı ve basit bir yöntem olması, hemen hemen bütün ökaryotik hücrelerde kullanılabilmesi, mutajenleri ilk etki bölgelerinde değerlendirebilmesi, düşük hasar seviyesini ölçebilmesi gibi avantajlara sahip olduğu için geniş bir kullanım alanına sahiptir (Fairbairn ve ark., 1995; Kassie ve ark., 2000; Tice ve ark., 2000; Choy, 2001; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Comet testi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alan içerisinde farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde göre, hücreler öncelikle agarozda yerleştirilip daha sonra bazı deterjanlar içeren lizis çözeltisi ile muamele edilir. Bu çözelti içerisinde hücrenin zarı, sitoplazması ve nükleozomları da dahil olmak üzere nükleoplazma ortadan kalkmaktadır (Dhawan ve ark., 2009). Lizisden sonra alkali unwinding solusyonundaki ortam nedeniyle süperkoil yapı gevşeyerek açılmakta ve kırıklar

ortaya çıkmaktadır. Daha sonra alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçen hücreler floresan boya ile boyanmaktadır. Floresan mikroskop ile gerçekleştirilen incelemelerde hücrelerdeki zarar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş olan DNA moleküllerindeki fragmentler ise farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine göre elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışı doğru ilerlemekte ve kuyruklu yıldız görüntüsünü oluşturmaktadırlar. Bu görüntü sebebiyle bu yöntem "Comet" adı verilmiştir. DNA hasarının meydana gelmesiyle oluşan bu kuyruğun ölçümü hasarın derecesini göstermektedir (McKelvey-Martin ve ark., 1993; Albertini ve ark., 2000; Çelik ve ark., 2005; Atlı Şekeroğlu ve ark., 2011).

### **2.6.3 Karsinojenite ve Uygulanan Yöntemler**

Kanser, hücrelerin bölünme kontrolünü kaybettiği, denetimsiz ve anormal hücre çoğalması ile tanımlanan çeşitli hastalık grupları için kullanılan genel bir terimdir (Çiftçi, 2017). Hücreler büyüme, bölünme ve apoptozis gibi yönetim ve denetim mekanizmaları ile yaşamını devam ettirmekte ve/veya sonlandırmaktadır. Söz konusu bu mekanizmaların devre dışı kalması ile karsinogenez olarak adlandırılan kanser gelişim süreci görülmektedir. Karsinogenez; kontrolsüz hücre çoğalması, bu hücrelerin çevre dokulara invazyon ve uzak organlara metastaz yeteneği kazanması sürecinin tümünü kapsamaktadır (İnciser Paşalak ve Seven, 2017).

Hücrenin malign bir hücreye dönüşüp kanser oluşumunun meydana gelmesinde yani malignant tümör oluşumunda endojenler (gen ve hormon gibi) ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimler etkilidir (Klaunig ve Kamendulis, 2004). Malign dönüşüme mutasyonlar ve bunların birikimi; proto-onko genlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genler, DNA onarım enzimleri ve apoptozisin inaktivasyonunu tetikleyen pekçok etken neden olabilmektedir (İnciser Paşalak ve Seven, 2017).

Karsinogenez süreci; başlangıç, artma ve ilerleme olarak üç safhadan oluşmaktadır. Başlama safhasında, karsinojen maruziyeti sonucu onarılamayan DNA hasarı veya hatalı DNA sentezi gerçekleşmekte ve sonuçta mutasyonlu bir hücre oluşmaktadır. Bu hücre değişiklikten dolayı anormal şekilde çoğalmaktadır. Artma

safhasında genomik olarak kararsız hücrelerin anormal şekilde çoğalması ve hücre sayısının artmasından dolayı tümör oluşumu meydana gelmektedir. Bu hücre artışının sürekli olması ve ortaya çıkacak mutasyonların artması neoplazmalara neden olabilmektedir. İlerleme safhası olan üçüncü safhada ise hücreler çoğalırken, genomlarındaki geri dönüşü olmayan hasarlar hücrelere daha fazla zarar vererek kötü huylu tümöre dönüşmektedir (Cooper, 2000; Klaunig ve Kamendulis, 2004; Khambete ve Kumar, 2014; Çiftçi, 2017).

### **2.6.3.1 Neoplastik Transformasyon Testi (Kontak İnhibisyon Testi)**

Tümör oluşumunun incelenmesine ilişkin çalışmalar, karsinojen bir maddenin etkilerinin gözlenebildiği ve nicelleştirilebildiği deneysel yöntemler gerektirmektedir. Karsinojenlerin etkileri, sağlıklı hayvanlarda denenebilir fakat, deneylerin ölçülmesi ve kontrolü oldukça zordur. Kültür ortamında ise normal hücrelerin karsinojen bir madde ile maruziyetinden sonra malign hücrelere dönüşümünü incelemek amacıyla uygulanan *in vitro* hücre transformasyon testi ile kanser araştırmaları için büyük bir ilerleme kaydedilmiştir (Poburski ve ark., 2016).

Yaygın olarak kullanılan neoplastik transformasyon testi ilk kez Howard Temin ve Harry Rubin tarafından 1958'de geliştirilmiştir. Bu deney, bir kültür kabının yüzeyine yapışan normal hücrelerin, çeşitli maddeler aracılığıyla transformasyona uğramış bir hücre grubuna dönüşmesine dayanan bir testtir. Deneyde transforme olmuş hücrelerin özellikleri olan değişmiş morfoloji, kontak-inhibisyonun kaybı ve yoğunluğa bağlı büyüme inhibisyonunun kaybindan yararlanılmaktadır (Temin ve Rubin, 1958). Bunların sonucunda kültür ortamında normal hücrelerden farklı olarak aşırı büyüyen morfolojik olarak transforme olmuş hücre kolonileri oluşmaktadır. Transforme olmuş hücrelerden oluşan odaklar karsinojen maddeye maruz kalındıktan sonraki bölünmelerde gözlenebilmektedir. Bu hücrelerin uygun deney hayvanlarına aşılandığında tümör oluşumunun görülmesi ise, *in vitro* neoplastik transformasyon testinin sonucunu desteklemektedir (Alberts ve ark., 2002).

DNA hasarı onarımından sorumlu olan genlerdeki yetersizlik, genlerde yaygın mutasyonlara neden olur ve buna bağlı olarak kolaylıkla neoplastik transformasyonlar meydana gelebilmektedir. Genlerdeki hasarlar, karsinogenezis

olayındaki başlıca hedef noktalarıdır. Çeşitli genlerdeki değişimler sonucu, neoplastik hücreler gelişebilmektedir. Onkogenik proteinlerin üretimindeki aşırılığı veya antionkogenik proteinlerin üretimindeki eksikliği, dengeyi neoplastik transformasyon ve proliferasyon yönünde değiştirebilmekte ve sonuçta genetik hasarı tamir edilemeyen mutasyona uğramış (mutant) hücrelerde yeni ek mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar çoğalmakta, birikmekte ve hücre artışının yanısıra malign transformasyonları oluşturabilmektedir (Xie ve ark., 2007).

### **2.6.3.2 Soft Agar Koloni Oluşum Testi (Ankraj Bağımsız Büyüme Testi)**

Soft agar koloni oluşum testi, *in vitro* hücrel transformasyonu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemlerden birisidir. Tarihsel olarak, Puck ve ark., (1956)'ı tarafından hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu teknikte hücreler, bir kültür plakası üzerine dağıtılmış ve gerekli büyüme faktörlerini sağlamak için besiyeri ortamı varlığında büyütülmüştür. Normalde hücreler anoikis adı verilen belirli bir apoptotik ölüm tipi nedeniyle ankrajdan bağımsız büyümesi önlenmektedir. Ankraj-bağımlı hücreler (normal hücreler) çoğalmak için buldukları ortamda bir yüzeye tutunma ihtiyacı duyarlar. Ankraj-bağımsız hücreler (kansereleşen hücreler) ise çoğalmak için buldukları ortamda herhangi bir yüzeye tutunma ihtiyacı duymazlar. Bu davranış çoğunlukla transforme olmuş hücrelerin özelliğidir. Ankraj-bağımsız hücrelerin büyümesi, hücre kültür kaplarında daha gelişigüzel ve rastgele görünür. Davranış olarak normal hücreler gibi monolayer (tek tabaka) olmak yerine gelişigüzel yayılım gösterirler. Soft agar koloni oluşum testi hücrelerdeki kötü huylu dönüşüm için en iyi testlerden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bu test çeşitli tedavi koşullarına yanıt olarak bu yeteneğin yarı kantitatif değerlendirmesine de izin vermektedir (Borowicz ve ark., 2014).

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Kullanılan Cihazlar**

##### **3.1.1 Karbondioksit (CO<sub>2</sub>)'li İnkübatör**

Hücrelerin uygun sıcaklık, nem ve pH ortamında çoğaltılması ve kültürlerin devam ettirilmesi için CO<sub>2</sub>'li inkübatör kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda, hücrelerin daha sağlıklı olmaları için kandaki tampon sistemine benzer bir şekilde, kültür ortamında pH bikarbonat tamponu kullanımının daha iyi olacağı gözlemlenmiştir. Hücrelerdeki bu asit-baz dengesini ayarlamak için inkübatöre CO<sub>2</sub> verilmektedir. CO<sub>2</sub>, kültür ortamında bikarbonat ve hidrojen iyonlarına ayrılan karbonik asiti (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) meydana getirmektedir. Çalışmamızda CO<sub>2</sub> inkübatörü olarak Memmert İncö 108 kullanılmıştır. İnkübatörün nem oranı ise, içerisine steril su koyulan bir kap kullanılarak sabit tutulmuştur.

##### **3.1.2 Biyogüvenlik Kabini**

Hücrelerin kültür ortamına ekimi, test solüsyonlarının hazırlanıp kültürlere eklenmesi ve bu işlemler esnasında oluşabilecek kontaminasyonu engellemek için Clean Air by Baker BioVanguard B Greenline biyogüvenlik kabini kullanılmıştır. Kabin kullanılmadan önce 30 dakika UV ışına maruz bırakıldıktan sonra %70'lik etanol ile steril edilmiştir. Çalışmalar bittikten sonra da kabin içerisi %70'lik etanol ile silinip 30 dakika UV ışınla steril edilmiştir.

##### **3.1.3 Floresan Filtreli Işık Mikroskobu**

Ko-lokalizasyon testinde DNA lezyonu odaklarının sayımı ve görüntülenmesi için, comet testinde ise DNA'daki tek ve çift zincir kırığı hasarının görüntülenmesi için Leica marka DM2500 model floresan mikroskop kullanılmıştır. Ko-lokalizasyon testinde, DNA çift zincir kırılmalarının tamiri ve DNA hasar sinyalizasyonunun belirlenmesinde görev alan  $\gamma$ -H2AX ve 53BP1 proteinlerini işaretlemek için, sadece floresan filtrelerle görünebilen Alexa Fluor 488 ve Alexa fluor 555 immünofloresan boya kullanılmıştır. Comet testinde ise DNA hasarından kaynaklanan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri sonucu oluşan kuyruğun boyanması için SYBR Green I boyası kullanılmıştır.

### **3.1.4 Mikroplaka Okuyucu**

96-kuyucuklu plakalara ekilen hücrelerin testte kullanılan kimyasalla maruziyetinden sonra sitotoksik etkilerinin ve hücre canlılığı oranının ölçülmesinde kullanılan bir yöntem olan MTT testi sonuçlarının belirlenmesinde BioTek marka Elx800 model mikroplaka okuyucu kullanılmıştır. Cihazda 570 nm'de absorbans değerleri ölçülerek değerlendirme yapılmıştır.

### **3.1.5 Invert Mikroskop**

ZEISS marka Primo Vert model invert mikroskop çeşitli kültür kaplarına ekimi yapılan hücrelerin kültürleri devam ederken çoğalmalarının, karakterizasyonlarının ve morfolojilerinin incelenmesinde kullanılmıştır. Göz merceği 10X, objektif mercekleri ise 10X, 20X ve 40X büyütme özelliğindedir.

### **3.1.6 Hücre Sayım Cihazı**

Çalışmada kullanılan hücreler standard tripan mavisini boyası ile boyanarak canlı, ölü ve toplam hücre sayıları ve canlılık oranları masa üstü İnvitrogen marka hücre kültür sayımı cihazı ile otomatik olarak belirlenmiştir.

### **3.1.7 Su Banyosu**

Wisd marka su banyosu hücrelerin split, ekim ve dondurulma işlemlerinde kullanılan solüsyonların ısıtılarak uygun sıcaklığa getirilmesi ve testlerde kullanılan hücrelerin çözündürülmesi için kullanılmıştır. Kontaminasyonun önlenmesi için suyu düzenli olarak değiştirilmiş ve dezenfektan ile temizliği yapılmıştır.

### **3.1.8 Vorteks Karıştırıcı**

Çalışmada kullanılan kimyasalın hazırlanması sırasında, konsantrasyonların dairesel salınım hareketi ile homojenize edilerek karıştırılması amacıyla BioCote (Stuart SA8) marka vorteks karıştırıcı kullanılmıştır.

### **3.1.9 Santrifüj**

Hücre süspansiyonlarındaki hücreleri çöktürmek amacıyla MPW marka antrifüj kullanılmıştır.



### **3.1.10 Kuru Blok Isıtıcı**

Comet yöntemi uygulanırken LMAgaroz ile hücre karışımının hazırlanması sırasında agarın belirli sıcaklıkta tutulması için Biosan Bio TDB-100 marka kuru blok ısıtıcı kullanılmıştır.

### **3.1.11 Shaker**

Stuart marka SSL3 model shaker MTT testinin sonlandırılması esnasında 96 kuyucuklu plakalara DMSO eklendikten sonra çalkalamak amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.12 pH Metre**

Çalışmada çeşitli yöntemlerde kullanılan solüsyonlar hazırlandıktan sonra asidik ve bazik oranlarının pH seviyesini ölçmek amacıyla Mettler Toledo Five Easy Plus marka pH metre kullanılmıştır.

### **3.1.13 Buz Makinası**

Comet yönteminin belirli aşamalarında kullanmak amacıyla GenBiotek marka H-IMS-50 model kırık buz yapma cihazı kullanılmıştır.

### **3.1.14 Elektroforez Cihazı**

Comet yönteminde, DNA hasarını takiben oluşan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmelerini sağlayarak kuyruk oluşumuna yardımcı olmak amacıyla VWR model güç kaynağı ve Comet Assay ES II model tankı ile beraber Trevigen marka comet cihazı kullanılmıştır.

### **3.1.14 Aspirasyon Cihazı**

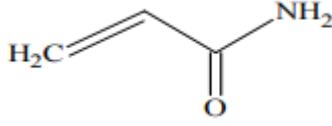
Ko-lokalizasyon testinde lamaların kuyucuklarından solüsyonları aspire etmek için BTM Life 7E-A marka aspirasyon cihazı kullanılmıştır.

### **3.1.15 Hassas Terazî**

Çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemeler Radwag AS 220 R2 marka hassas terazi ile tartılmıştır. Tartım esnasında hava akımı sebebiyle oluşabilecek hataları engellemek için cam koruyuculu terazi kullanılmış ve koyulan yüzeyde düz durabilmesi için her kullanımdan önce dengesi kontrol edilmiştir.

## 3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

### 3.2.1 Akrilamid (Sigma)



**Kimyasal Adı:** Akrilamid

**IUPAC Adı:** 2-Propenamid

**Sinonim Adı:** Etilen karboksamid, akrilik asit amid, vinil amid

**Ampirik Formülü:** C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO

**Moleküler Ağırlığı:** 71.08 g/mol

**Erime Noktası:** 82-86 °C

**Kaynama Noktası:** 125 °C

**Buhar Basıncı:** 0.03 mmHg (40 °C)

**Çözünürlük:** 2.04 kg/L (25 °C)

**CAS no:** 79-06-1

**Saflık düzeyi:** ≥ %99

### 3.2.2 Sıvı Azot (LN)

Hücreler daha sonra kullanmak için uzun süre saklanmak istendiğinde, sıvı azot içerisinde dondurularak saklanır. Deneylerde kullanılan BEAS-2B hücreleri, kriyojenik tüpler içerisinde kozmik kalf serumu, penisilin/streptomisin antibiyotiği ve DMSO karışımında sıvı azotun buhar fazında tutulmuştur.

### 3.2.3 LHC-8 Medium

Hücreleri büyütülmesi, çoğaltılması gibi hücre kültürü uygulamalarında ve dondurulup saklanması gibi diğer işlemlerde serum içermeyen Gibco marka LHC-8 besiyeri kullanılmıştır. 0.08 mM kalsium, 1 mM L-glutamin, 20 nM hidrokortizon, 10 nM triiodotayronin, 5 ng/ml epidermal büyüme faktörü, 0.5 µM etanolamin, 0.5 µM fosfoetanolamin, 5 µg/ml insulin, 10 µg/ml transferin, oligo elementler ve sığır hipofiz ekstratı içeren LHC-8 basal (serumsuz) besiyeri kullanılırken kontaminasyonu engellemek amacıyla içerisine 50 µg/ml gentamisin eklenmiştir.

### **3.2.4 Attachment Faktör (AF) (Bağlanma Faktörü)**

Çalışmalarımızda hücre ekimi için kullanılan tüm kaplar Gibco marka attachment faktör ile yıkanmıştır. Kollajen proteini içeren attachment faktör, hücrelerin kendi morfolojik özelliklerini ve fonksiyonlarını korumada yardımcı olur. Ayrıca ekim yapılan kültür kapları içerisindeki epitel hücrelerinin ince tabaka halinde büyümesini sağlamaktadır.

### **3.2.5 Ultra Salin A**

Hücreleri kültür kaplarından ayırma işlemi yapılmadan önce ve besiyeri aspire edildikten sonra, hücreler Lonza marka ultra salin ile yıkanmıştır. Bunun amacı, besiyeri içerisinde olan tüm kimyasalların hücre yüzeyinden uzaklaştırmaktır. Fenol kırmızısı içermeyen ultra salin, hücreyi durulamak için kullanıldığında tripsin etkisini arttırmaktadır.

### **3.2.6 Tripsin-EDTA**

Hücre pasajlanması (belli yoğunlukta hücre içeren kültürlerde çoğalmalarını ve devamlılığını sağlamak amacıyla hücrelerin, içinde besiyeri bulunan başka bir kültür kabına aktarılması işlemi) ve hasatı sırasında hücrelerin kültür kaplarından ayrılmasını sağlamak amacıyla, Lonza marka Tripsin-EDTA solüsyonu ile muamele edilmiştir. Hücre ile kültür kabı arasında oluşan protein bağlarını, lizin ve arjinin aminoasitlerinin olduğu yerden yıkan tripsin-EDTA solüsyonu bir serin proteaz enzimidir. Tripsin içinde bulunan etilendiamintetraasetik asit (EDTA), kalsiyum ve magnezyum iyonlarını hücre kabının içerisinden uzaklaştırıp ortamı nötral hale getirerek tripsinin peptid bağlarını daha etkili bir şekilde yıkmasına yardımcı olur.

### **3.2.7 Tripsin Nötrleştirici Solüsyon (TNS)**

Hücreleri kültür kabından ayırma süreci sırasında hücrelere eklenen tripsinin aktivitesini etkili bir şekilde nötralize etmek amacıyla Lonza marka TNS kullanılmıştır.

### **3.2.8 Tripan Mavisi**

Hücre ekiminin yapılmasında ve testlerde kullanılacak uygulama gruplarının hazırlanmasında, hücre sayısını belirlemek ve hücre canlılığını ölçmek için hücreler Gibco marka tripan mavisi ile boyanmıştır.

### **3.2.9 Kozmik Kalf Serum**

Sıvı azot içerisinde uzun süre dondurulup saklanacak olan hücrelerin çözdürme işlemi sonrasında hayatta kalma ve şoktan korunma şanslarının artırılmasını sağlamak için Lonza marka kozmik kalf serum kullanılmıştır. Hücre kültürleri için kullanılan kozmik kalf serum, standart kalf seruma demir ve patentli bir büyüme hormonu eklenmesi sonucu elde edilen geniş spektrumlu bir serumdur.

### **3.2.10 Dimetil Sülfoksit (DMSO)**

Uzun süre saklamak amacıyla sıvı azotta dondurulan hücrelerin içerisindeki sıvılar donacağı için donma noktasını düşüren ve soğuktan koruyan kryoprotektif ajanlara ihtiyaç vardır. Polar bir çözücü ve koruyucu bir ajan olarak kullanılmasının yanı sıra, çalışmamızda MTT testinde de Merck marka DMSO kullanılmıştır.

### **3.2.11 Penisilin/Strepomisin Antibiyotiği**

Biological Industries marka penisilin/streptomisin antibiyotiği hücrelerin dondurulma işlemleri sırasında hücrelere eklenmiştir. Penisilin/Streptomisin antibiyotik solüsyonu, bakteriyel kontaminasyonu kontrol etmek için hücre kültürü ortamına ek olarak kullanılan ikili bir antibiyotik solüsyonudur. Bu solüsyon çoğu gram pozitif ve gram negatif bakteriye karşı etkilidir. Orijinal olarak *Penicillium* mantarından saflaştırılan penisilin, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe etmektedir. Orijinal olarak *Streptomyces griseus*'tan saflaştırılan streptomisin ise, prokaryot protein sentezini inhibe etmektedir.

### **3.2.12 Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)**

Çalışmamızda Sigma marka thiazolyl blue tetrazolium bromide kullanılmıştır. Hücre canlılığı ve sitotoksitenin ölçülmesinde kullanılan membran geçirgen bir boya olan thiazolyl blue tetrazolium bromide, canlı hücrelerde suda çözünmeyen formazana dönüştürülen sarımsı bir tetrazol çözeltisi üretmektedir. Oluşan kristaller çözüldürülüp yoğunluk kolorimetrik olarak 570 nm'de ölçülmektedir.

### **3.2.13 Phosphate Buffered Saline (PBS)**

Ko-lokalizasyon testinde, hücrelerin pH'sı (pH 7.4) ve ozmolaritesinin sabit tutulması amacıyla  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyonlarını içeren Gibco marka PBS tamponuyla hücreler yıkanmıştır.

### **3.2.14 Paraformaldehit Solüsyonu**

Hücrelerin sabitleştirilmesi amacıyla ko-lokalizasyon testinde Chemcruz marka paraformaldehit solüsyonu kullanılmıştır.

### **3.2.15 Octyl Phenol Ethoxylate (Triton X-100)**

Hücre membranının geçirgenliğini artırmak amacıyla ko-lokalizasyon testinde Sigma marka triton X-100 kullanılmıştır.

### **3.2.16 Bovine Serum Albümin**

Özgül olmayan antijen-antikor bağlanmasını en aza indirmek amacıyla ko-lokalizasyon testinde blocking buffer hazırlamak için Chemcruz marka bovine serum albümin kullanılmıştır.

### **3.2.17 Sodyum Azide**

Hücrelerde endositozun olmasını engellemek amacıyla ko-lokalizasyon testinde blocking buffer hazırlanmasında Sigma marka sodyum azide kullanılmıştır.

### **3.2.18 Horse Serum**

Özgül olmayan antijen-antikor bağlanmasını en aza indirmek amacıyla ko-lokalizasyon testinde blocking buffer hazırlanmasında Gibco marka horse serum kullanılmıştır.

### **3.2.19 Anti-gamma H2A.X Antibody**

Ko-lokalizasyon testinde H2AX histon proteinlerinden fosforlanmış olanların ( $\gamma$ H2AX) belirlemesi amacıyla primer antikor olarak Abcam marka anti-gamma H2A.X antibody kullanılmıştır.

### **3.2.20 Anti-53BP1 Antibody**

Ko-lokalizasyon testinde 53BP1 proteinlerine bağlanması için primer antikor olarak Cell Signaling marka anti-53BP1 antibody kullanılmıştır.

### **3.2.21 Alexa Fluor 488 Goat Anti-rabbit IgG**

Ko-lokalizasyon testinde primer antibody olan anti-gamma H2A.X'e bağlanarak odakların görünür hale gelmesini sağlamak amacıyla sekonder antikor

olarak Thermo Fisher Scientific marka Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG kullanılmıştır.

### **3.2.22 Alexa Fluor 555 Goat Anti-mouse IgG**

Ko-lokalizasyon testinde primer antibody olan anti-53BP1'e bağlanması için Thermo Fisher Scientific marka Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG kullanılmıştır.

### **3.2.23 Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI**

Hücre çekirdeklerini boyamak ve preparatları kapatmak amacıyla ko-lokalizasyon testinde Thermo Fisher Scientific marka Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI kullanılmıştır.

### **3.2.24 Trizma Base**

Comet yönteminde standart ve bazimetrik bir tampon olarak Sigma marka trizma base kullanılmıştır. Tek başına bir tampon veya karışık tampon formülasyonlarının bir bileşeni olarak kullanılabilir. Comet yönteminde Tris-EDTA (TE) buffer olarak SYBR green solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır.

### **3.2.25 Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)**

Çalışmamızda Sigma-Aldrich marka EDTA, comet yönteminde elektroforez tamponu için EDTA stok solüsyonunun hazırlanmasında ve SYBR green solüsyonu için TE buffer hazırlanmasında kullanılmıştır.

### **3.2.26 SYBR Green I**

SYBR Green nükleik asit boyası olarak kullanılan asimetrik bir siyanin boyasıdır. Comet testinde preparatların boyanıp floresan filtreli ışık mikroskopunda incelenmesi için Invitrogen marka SYBR Green I boyası kullanılmıştır.

### **3.2.27 Lizis Solüsyonu**

Trevigen marka lizis solüsyonu yüksek tuz ve deterjan içerir ve çalışmamızda comet testinde kullanılmıştır.

### **3.2.28 LMAgaroz**

LMAgaroz, %1 düşük erime noktalı agarozdur. Çalışmamızda comet yönteminde Trevigen marka LMAgaroz kullanılmıştır.

### **3.2.29 200 mM EDTA**

Comet testinde alkalın unwinding solüsyonunun hazırlanması için Trevigen marka 200 mM EDTA kullanılmıştır.

### **3.2.30 Metanol**

Transformasyon testinde transforme olmuş hücrelerden oluşan odaklar boyanmadan önce Sigma marka saf metanol kullanılarak hücre kültürü kabında tespit edilmiştir.

### **3.2.31 Kristal Viyole**

Transformasyon testinde transforme olmuş hücrelerin oluşturdukları odakların tespit edilmesi ve sayılması için formaldehit içinde çözülmüş Sigma marka kristal viyole boyası kullanılmıştır.

### **3.2.32 Difco Bacto Agar**

Difco bacto agar, yabancı maddelerin, pigmentli kısımların ve tuzların minimum düzeye indirildiği saflaştırılmış bir agardır. Soft agar testinin uygulanmasında odaklardan toplanan transforme hücrelerin kültür kaplarına ekimlerinin yapılması sırasında hem hücre ile birlikte karıştırılarak hem de hücresiz iki tabaka halinde BD Diagnostics marka difco bacto agar kullanılmıştır.

### **3.2.33 4-Nitro-Blue-Tetrazolium Chloride (NBT)**

Bazı hücreler, renksiz ve sarı bir boya olan NBT'yi mavi veya siyah formazan kristallerine indirgemektedir. Böylece, ortamda çoğalan canlı hücrelerin gözlemlenmesi sağlanır. Çalışmamızda soft agar testinde Invitrogen marka %5'lik NBT kullanılmıştır.

### **3.2.34 Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Ko-lokalizasyon ve comet testlerinde pozitif kontrol olarak Sigma marka %34,5-36,5'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır.

### 3.3 Hücre Kültürü

#### 3.3.1 Kullanılan Hücre Hattı

Tez çalışmasında *in vitro* model olarak BEAS-2B insan bronşiyal epitel hücre hattı kullanılmıştır. BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) hücre hattı American Type Cell Culture'dan (ATCC) temin edilmiştir. BEAS-2B hücreleri, kanser olmayan bir insandan otopsi sonucu alınmış normal akciğer bronşiyal epitelinden izole edilen hücrelerdir. Temin edilen BEAS-2B hücreleri, replikasyon kusurlu bir SV40/adenovirüs 12 hibridiyle enfekte edilmiş ve klonlanmış hücrelerdir. Seruma yanıt olarak skuamöz farklılaşma gözlemlenebilir. Bu yetenek, farklılaşmayı ve/veya karsinogenezi indükleyen veya etkileyen kimyasal ve biyolojik ajanların taranması için kullanılabilir. Konfluent (Mikroskopla gözlemlendiğinde kültür kabı yüzey alanının %80 oranında hücre katmanıyla kaplanmış olması) kültürler hızla skuamöz (yassı epitel) terminal farklılaşmaya uğradığından, hücrelerin birleşme öncesinde pasajlanması gereklidir.

Çalışmamızda normal bir bronşiyal epitel hücreleri olan BEAS-2B hücreleri üzerinde ACR'nin sitotoksik, genotoksik ve neoplastik potansiyellerinin test edilmesi hedeflenmiştir.

#### 3.3.2 Hücre Kültürünün Yönetimi

BEAS-2B hücreleri, basal LHC-8 besiyerinde, iç ortamı 37°C'de, %95 nem içeren ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültür kaplarında çoğaltılmıştır. Hücrelerin günlük mikroskopik kontrolleri yapılmış ve besiyerleri haftada iki defa veya gerekli görüldüğünde değiştirilmiştir.

#### 3.3.3 Hücrelerin Çözülmesi

Temin edilen BEAS-2B hücreleri, rutin işlemlerin yapılacağı güne kadar, içerisinde sıvı azot bulunan tankta, sıvı azotun buhar fazı içinde -196°C'de muhafaza edilmiştir. Tanktaki sıvı azot miktarı düzenli olarak kontrol edilip üzerine eklemeler yapılmıştır. Kültür zamanı geldiğinde, sıvı azot tankında bulunan dondurulmuş hücreler kullanılmak için çözülmüş ve daha sonra uygun kültür kabına ekim yapılmıştır. Hücre hattının çözülmesi için gerekli kimyasal malzemeler 37°C'ye ayarlanan su banyosunda ısıtılmıştır. Daha sonra, sıvı azot tankından çıkarılan



hücreler de 37°C'lik su banyosunda hızla çözülmüştür. Çözünen hücreler biyogüvenlik kabini içinde 15 ml'lik santrifuj tüpüne aktarılıp üzerine besiyeri eklenmiştir. 1000 rpm'de 5 dk santrifuj edilmiştir. Santrifuj sonrasında tüpün dibinde yaklaşık 100 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti elle süspanse edilerek üzerine taze besiyeri eklenmiş ve iyice karışması sağlanmıştır. Ekim yapılacak steril flaska attachment faktör (AF) konularak flaska yayılması sağlanmıştır. Bu işlemden sonra, hücreler flaska aktarılıp ekim yapılmıştır. Flask, 37°C'de, %95 nemde, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırılmıştır. Her gün invert mikroskop altında hücre canlılığı incelenmiş ve 3 günde bir eski besiyeri aspire edilerek taze besiyeri eklenmiştir. Bu işleme hücreler konfluent (%70-80 yoğunluk) duruma ulaşana kadar devam edilmiştir.

### **3.3.4 Hücrelerin Pasajlanması**

Hücreler konfluent (%70-80 yoğunluk) duruma ulaştığında, hücreler kültür kabından kaldırılarak ve ayrılarak (split) yeni kültür kaplarına ekim yapma işlemleri uygulanıp pasajlanmıştır. Flaskın içindeki besiyeri aspire edilmiştir. Hücreler ultrasalin ile yıkanmış ve ultrasalin aspire edilmiştir. Hücrelere tripsin eklenerek flask 5 dk 37°C'lik CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletilmiş ve hücrelerin yüzeyden kaldırılmaları sağlanmıştır. Tripsin etkinliğini sonlandırmak amacıyla hücrelerin üzerine tripsinle eşit miktarda tripsin nötralize edici solüsyon (TNS) eklenmiştir. Flaskın içindeki karışım birkaç kez pipetle resüspanse edilmiş ve 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak santrifuj edilmiştir. Dipte yaklaşık 100 µl olacak şekilde süpernatant kısmı atılmıştır. Tüpte kalan pellet elle süspanse edilmiş ve üzerine taze besiyeri eklenmiştir. Eşit miktarda hücre süspanasyonu ve tripan blue boyası karıştırılmış ve boyanan hücreler hücre sayım cihazının lamına aktarılarak cihazda ölçümü yapılmış ve 1 ml'deki canlı hücre sayısı, ölü hücre sayısı ve canlılık değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen hücre sayısı formüle yerleştirilerek yeni kültüre ne kadar ekim yapılacağı hesaplanmıştır. Ekim yapılan flask 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Flasktaki hücreler mikroskopta incelenerek, hücre üremesinin iyi olduğu görülünceye kadar 3 günde bir eski besiyeri çekilip taze besiyeri eklenmiştir.

Yeterli hücre sağlanıncaya kadar flaska ekim yapılmaya devam edilmiştir. Pasajlanarak çoğaltılan hücrelerin bir kısmı uygulanacak testlerde kullanılmış bir kısmı ise dondurularak saklanmıştır.

### **3.3.5 Hücrelerin Dondurulması**

Hücrelerin sürekli pasajlaması hücre hatlarında genetik değişikliklere neden olabildiği için, uzun süre pasajlanan hücreler ilk hücrelerden farklı karakterlere sahip olabilirler. Bu tip değişikliklerin engellenmesi ve deneylerin yakın pasaj seviyelerinde tekrarlanabilmesi için, hücre kültürleri düzenli bir şekilde sıvı azotta dondurulmuş ve stoklanmıştır. Dondurmak için, hücreler kriyojenik tüpler içerisinde 1 ml’de bir milyon hücre olacak şekilde, antibiyotik, DMSO ve kozmik kalf serum ilave edilmiş besiyeri içerisinde tüplere alınmıştır. Tüpler önce 1 günlüğüne -80 °C’de tutulmuş, daha sonra sıvı azot tankı içerisine transfer edilmiştir.

### **3.3.6 Deney Planı ve Deney Grupları**

Deneylerimizde negatif kontrol, pozitif kontrol ve ACR olarak üç ana grup oluşturulmuştur. MTT testi,  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 ko-lokalizasyon testi ve comet testinde bütün gruplara 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet süresi uygulanmıştır. Neoplastik transformasyon testinde sadece 72 saatlik maruziyet süresi kullanılmıştır. Soft agar koloni testinde ise gruplar en az 4 hafta bekletilmiştir. Soft agarda transformasyon testinde odaklardan toplanan hücreler kullanılmıştır.

#### **3.3.6.1 Negatif Kontrol Grubu**

Herhangi bir etkinin beklenmediği gruptur. Negatif kontrol grubundaki hücreler sadece besiyeri içerisindedir. ACR’nin hücreler üzerinde oluşturdukları olası etkilerin karşılaştırılabilmesi amacıyla kontrol grubundaki hücreler ACR’nin çözücüsü olarak kullanılan saf su ile muamele edilmiştir.

#### **3.3.6.2 Pozitif Kontrol Grubu**

Bu grup, hücrelerin DNA’da oluşan hasara tepkisinin gözlenmesi ve diğer gruplar ile karşılaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Bu grubundaki hücreler, DNA’da kırıklara neden olan ve bir oksitadif stres ajanı olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) ile 30 dakika muamele edilmiştir.

### 3.3.6.3 Akrilamid Grupları

ACR konsantrasyonlarının hazırlanması için öncelikle bir stok çözeltisi oluşturulmuş ve seyreltme işlemi uygulanarak farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Saf su kullanılarak 0.5 M 10 ml ACR stok çözeltisi hazırlanmış ve filtreden geçirilmiştir. Daha sonra bu stoktan 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 mM'lik ACR konsantrasyonları hazırlanmıştır. Kültürlere 0 mM, 0.005 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM ve 10 mM ACR dozları eklenerek MTT testi yapılmıştır. MTT testinin sonuçları değerlendirilerek hem hücre canlılığı, hem inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri, hem de sonraki testlerde kullanılacak ACR konsantrasyonları belirlenmiştir.

## 3.4 Hücre Canlılığı ve Sitotoksiste

### 3.4.1 MTT Testi

Tetrazolium tuzu kullanılarak yapılan MTT (3-[4,5-Dimethyl thiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi, genellikle hücre canlılığı ve sitotoksitesinin kantitasyonunda kullanılır. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücreleri saptar. Çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksiste değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenebilir. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmeyen formazana dönüşür. Oluşan bu formazan izopropanol, DMSO veya başka bir çözücü yardımı ile çözünebilir hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Oktar, 2009).

96 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 200 µl besiyeri içerisinde  $1 \times 10^4$  hücrenin ekimi yapılmıştır. Hücrelerin normal hücre döngülerini kazanmaları için 1 gün 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe bekletilmiştir. Süre sonunda hücrelerin besiyerleri yenilenmiştir. Hücreler deney gruplarında belirtildiği şekilde saf su (negatif kontrol) ve farklı ACR konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatörüne kaldırılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik muamele süreleri sonunda,

kuyucuklara PBS içerisinde hazırlanmış %5'lik MTT solüsyonundan 20 µl eklenmiştir. Kültür kabındaki hücreler 3 saat 37°C'de inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda içerisinde MTT bulunan besiyeri aspire edilerek formazan kristallerinin çözülmesi için 100 µl DMSO eklenmiş ve 15 dk bekletilmiştir. Kuyucuklardaki mor renkli solüsyonun absorbansı 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Negatif kontrol ve ACR dozlarına ait tüm maruziyet sürelerinin hücre canlılığı ve sitotoksitesi de aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır.

Hücre canlılığı=(Ortalama doğrulanmış mualeme kuyucuğunun absorbans değeri/Ortalama doğrulanmış kontrol kuyucuğunun absorbans değeri)x100.

Sitotoksite (%İnhibisyon)=100-(Ortalama doğrulanmış mualeme kuyucuğunun absorbans değeri/Ortalama doğrulanmış kontrol kuyucuğunun absorbans değeri)x100.

### **3.5 Genotoksite**

#### **3.5.1 γH2AX ve 53BP1 Ko-Lokalizasyon Testi**

DNA çift zincir kırıkları, hücreler için tehlikeli lezyon türleridir. Tamir edilemeyen bu hasarlar; genomik kararsızlık, kanser gelişimi, neoplastik transformasyona yol açan mutasyonların oluşumu ve ölüme neden olabilir. DNA çift zincir kırıkları varlığında, γH2AX ve 53BP1 DNA'da çift zincir kırıklarının olduğu çekirdekdeki hasar bölgesine giderler ve DNA hasar ve tamir sinyalizasyonunda görev alarak odaklar oluşturmaktadırlar. γH2AX ve 53BP1'in oluşturduğu nükleer odaklar floresan boya içeren antikorlarla belirlenebilir (Belyaev ve ark., 2009; Lassmann ve ark., 2010).

Yapılan ön denemeler sonucunda primer antikor hazırlanırken, görüntü ve sinyallerin en iyi şekilde alındığı oran, kırmızı sinyal veren γH2AX antikor konsantrasyonu 1/5000, yeşil sinyal veren 53BP1 antikor konsantrasyonu ise 1/500 olarak belirlenmiştir. Sekonder antikor hazırlanırken en iyi görüntü ve sinyaller, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG de 1:2000 oranında, Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG de ise 1:3000 oranında belirlenmiş ve deneylerde bu oranlar kullanılmıştır.

$\gamma$ H2AX ve 53BP1 ko-lokalizasyon testi, Xie ve ark., (2005) tarafından belirtilen test protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ko-lokalizasyon testi için 8 bölmeli özel kültür lamının her bir kuyucuğuna ekilen hücreler saf su (negatif kontrol), belirlenen ACR konsantrasyonları ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pozitif kontrol) ile 24, 48 ve 72 saatliğine muamele edilmiştir. Muamele sürelerinin bitiminde besiyeri aspire edilip kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra sırasıyla %4'lük paraformaldehit ve %2'lik Triton X-100 ile muamele edilmiştir. Her kimyasaldan sonra kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklara blocking buffer eklenerek bir gece +4'de bekletilmiştir. Süre sonunda önce primer daha sonra sekonder antikorlar ile muamele edilmiştir. PBS ile yıkanan kuyucuklar kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamlar DAPI boyası içeren kapatma medyumu ile kapatılarak preparatlar hazırlanmıştır. Daha sonra karanlık ortamda floresan mikroskopta incelenmiştir. Tüm gruplara ait hücre çekirdeklerinin ve ilgili protein odaklarının floresan ışmaları görüntülenmiştir.

Odaklar analiz edilirken yapı olarak düzgün kenarlı ve hücre morfolojisi ve karakteristiğine uygun şekilli çekirdekler sayımlara dahil edilmiştir. Silik veya çok parlak odaklar dikkate alınmamıştır. Bu standartlara uygun 50 hücre çekirdeği sayılmış ve ortalamaları alınmıştır. Daha sonra istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

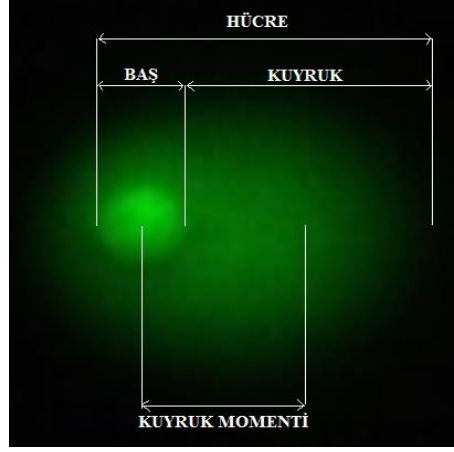
### **3.5.2 Comet Testi**

Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da adlandırılan comet yöntemi, birçok memeli hücresinde çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıkları gibi DNA hasarlarının ve onarım bozukluğunun tespiti için kullanılmaktadır. Comet yöntemi, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında ve bazı hastalıklarda artan DNA hasarını belirlemede de kullanılan bir biyoizlem testidir. Alkali comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip oldukları için elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruk oluşturmaktadırlar (Singh ve ark., 1988; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Alkali comet testi daha önceden Singh ve ark., (1988)'nin tanımladığı protokole göre gerçekleştirilmiştir. Hücreler 24 kuyucuklu kültür kaplarına her bir bölmede 50000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler belirlenen ACR konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saatliğine muamele edilmek üzere 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletilmiştir. Pozitif kontrol grubundaki hücreler ise 30 dakika boyunca 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilmiştir. Maruziyet süreleri tamamlanmadan kısa bir süre önce comet testinin gerçekleştirilmesi için kullanılacak kimyasallar hazırlanmıştır.

Maruziyet süresinin bitiminde besiyerleri aspire edilerek kuyucuklar ultrasalin ile yıkanmıştır. Tripsin eklenerek 2-3 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Eşit miktarda TNS ile tripsinin etkisi durdurulmuş ve tüplerdeki süspansiyonlarda bulunan hücre sayısı belirlenmiştir. Tüm tüpler santrifüj edilmiş, supernatant aspire edilmiş ve tüplere ultrasalin eklenmiştir. Buz üzerinde tutulan hücreler düşük yoğunluklu agaroz ile karıştırılmış ve comet lamalarına yayılmıştır. Yayma yapılan lamalar +4°C'de 30 dakika bekletildikten sonra lizis solüsyonu içerisine alınmıştır. Lizis solüsyonundan sonra alkalın unwinding solüsyonunda bekletilen lamalar elektroforez tamponu içerisine koyularak 21 voltta 15 dakika yürütülmüştür. Lamalar elektroforezden sonra saf su ve %70'lik etanol içerisnde bekletildikten sonra kurumaya bırakılmıştır. İncelemeden önce SYBR Green I boyasından hazırlanan çalışma solüsyonu ile boyanmıştır.

Boyama sonrasında lamalar kurutulmuş ve floresan mikroskopta incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Her bir deney grubundaki herbir muamele için elde edilen 50 comet fotoğrafları Cometscore 2.0 Programında analiz edilmiştir. Kuyruktaki DNA (%), kuyruk momenti ve olive kuyruk momenti parametreleri hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1** Floresan Boya ile Boyanmış Hücrede Baş, Kuyruk ve Kuyruk Momentinin İfade Ettiği Bölgeler

Kuyruktaki DNA (%), comet kuyruk yoğunluğunun toplam comet yoğunluğuna bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmaktadır. Kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesinin kuyruk uzunluğu ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Olive kuyruk momenti ise, kuyruktaki DNA yüzdesi ile comet başı ve kuyruğun ağırlık merkezleri arasındaki mesafenin çarpılmasıyla hesaplanmıştır (Koh ve ark., 2019).

### 3.6 Karsinojenite

#### 3.6.1 Neoplastik Transformasyon Testi (Kontak İnhibisyon Testi)

Yaygın olarak kullanılan neoplastik transformasyon testi ilk kez Howard Temin ve Harry Rubin tarafından 1958’de geliştirilmiştir. Bu test, bir kültür kabının yüzeyine yapışan normal hücrelerden, çeşitli maddeler aracılığıyla transformasyona uğramış bir hücre grubuna dönüşmesine dayanan bir testtir. Deneyde transforme olmuş hücrelerin özellikleri olan değişmiş morfoloji, kontak-inhibisyonun kaybı ve yoğunluğa bağlı büyüme inhibisyonunun kaybından yararlanılmaktadır (Temin ve Rubin, 1958). DNA hasarı ve onarımından sorumlu olan genlerdeki yetersizlikten dolayı genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu neoplastik hücreler oluşmakta ve transformasyonlar gelişmektedir. Genetik hasarı tamir edilemeyen mutant hücrelerdeki mutasyonlar çoğalır, birikir ve hücre sayısının artışının yanısıra, malign transformasyonlar oluşmaktadır (Xie ve ark., 2007).

Kültür ortamında ACR’nin BEAS-2B hücreleri üzerinde neoplastik transformasyona sebep olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Xie ve ark.,

(2007)'nın kullandıkları yöntemle göre transformasyon testi uygulanmıştır. 60 mm'lik petrilere her bir doz grubu ve negatif kontrol için 200 000 hücre ekimi yapıp, daha önce belirlenen 3 farklı ACR konsantrasyonuna 72 saatliğine maruz bırakılmıştır. Petriler her gün gözlenmiş ve maruziyet süresi dolduğunda hücreler split edilerek her bir konsantrasyondan 2 ayrı petriye 100 000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Sonraki her split aşamasında ise her petri için 1'er petriye ekim yapılmıştır. 3 günde bir tüm petrilerin besiyerleri değiştirilerek hücrelerin morfolojik durumları ve odak oluşumları invert mikroskop altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Test protokolüne göre odak oluşumları en fazla 10. pasaja kadar incelenmekte ve bu pasaja kadar odak oluşmadığı takdirde test sonlandırılmaktadır. Odak oluşumu gözlemlendiğinde odakların yerleri belirlenmiş ve büyük odakları oluşturan hücreler özel steril plastik halkalar yardımıyla tripsin ile kaldırılmıştır. İstenilen odaklar toplanıp çoğaltılmak üzere 6 kuyucuklu kültür kaplarına yeniden ekilmiştir. Odakları alınan petriler kristal viyole ile boyanmış ve geriye kalan odaklar sayılmıştır.

### **3.6.1.1 Kristal Viyole Boyaması**

Boyama işlemi için petrilerin içindeki besiyerleri aspire edilmiştir. Petriler ultrasalin ile yıkandıktan sonra önce metanolde 20 dakika, daha sonra %0.25'lik kristal viyole boya solüsyonunda 30 dakika bekletilmiştir. Süre bitiminde petriler su ile yıkandıktan sonra bir gece kuruması için bırakılmıştır. Petrilerin resimleri çekilerek saptanan odaklar sayılmıştır.

### **3.6.2 Soft Agar Koloni Oluşum Testi (Ankraj Bağımsız Büyüme Testi)**

Bağlanma-bağımlı hücreler (normal hücreler) çoğalmak için buldukları ortamda bir yüzeye tutunma ihtiyacı duyarlar. Bağlanma-bağımsız hücreler (kansereleşen hücreler) ise çoğalmak için buldukları ortamda herhangi bir yüzeye tutunma ihtiyacı duymazlar. Bu davranış çoğunlukla transforme olmuş hücrelerin özelliğidir. Bağlanma-bağımsız hücrelerin büyümesi, hücre kültür kaplarında daha gelişigüzel ve rastgele görünür. Davranış olarak normal hücreler gibi monolayer olmak yerine gelişigüzel yayılım gösterirler (Borowicz ve ark., 2014).

Neoplastik transformasyon testi sonucu oluşan odaklardaki hücrelerin çoğalmak için bir yüzeye bağımlı olup olmadığını (bağlanma-bağımlı ya da bağlanma-bağımsız) belirlemek için Xie ve ark., (2007)'nin önerdikleri yöntemle göre



soft agar koloni oluşum testi uygulanmıştır. Öncelikle %1.8'lik Difco Bactor-Agar solusyonu hazırlanmış, steril edilmiş ve 56°C'de bekletilmiştir. Hazırlanan bu agar zeltisi besiyeri ile karıştırılarak 6 kuyucuklu kültür kaplarına zemini kaplayacak şekilde damlatılmıştır. Kültür kapları +4°C'de bekletildikten sonra donmuş olan agar-besiyeri karışımının üzerine, %20 agar ve %80 besiyeri içerisindeki hücreler ekilmiştir. Aynı işlem kontrol hücreleri için de uygulanmıştır. İnkbasyondaki petriyer koloni oluşumu bakımından mikroskopik olarak kontrol edilmiş ve invert mikroskopta günlük olarak izlenmiştir. Koloni oluşumu 4 hafta boyunca gözlenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Süre sonunda koloniler %5'lik NBT zeltisi ile 37°C'de 24 saat boyanmıştır. Fotoğraflanan koloni resimlerinden Image-J yazılımı kullanılarak koloni sayıları tespit edilmiştir.

### **3.7 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi**

Herbir deney üç kez tekrarlanmış ve veriler bu üç tekrarın ortalamasını ve  $\pm$  standart hatasını ifade etmektedir. İnceleme sonucunda elde edilen tüm verilerin homojenliği ve grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı SPSS programı kullanılarak tek yönlü varyans analiz metodu (ANOVA) ile belirlenmiştir. Farkın önemli olduğu gruplarda ise, elde edilen sonuçlar Student's t-testi ile karışlaştırılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde  $p < 0.05$  anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

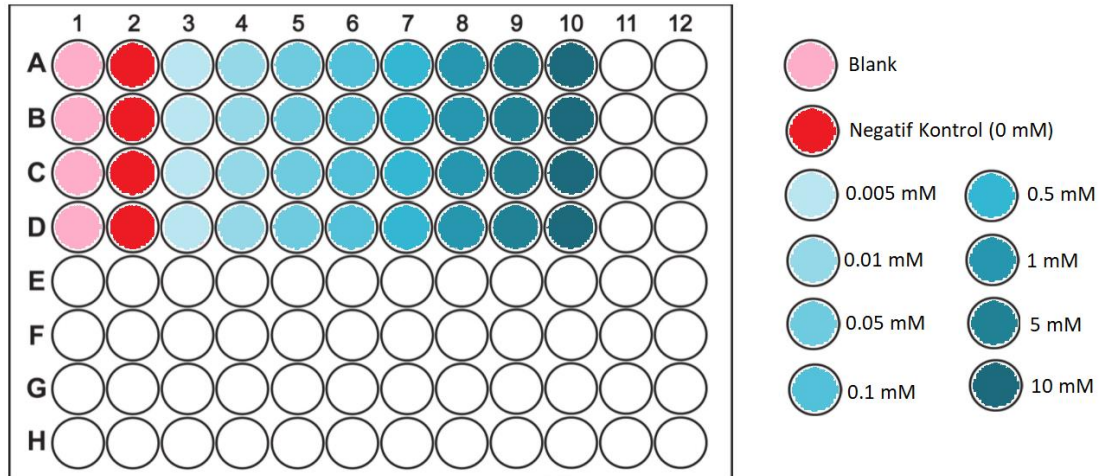
## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1 BULGULAR

ACR'nin insan akciğer epitel hücre kültürlerinde sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkilerinin bulunup bulunmadığını araştırmak amacıyla uygulanan MTT Testi, Comet Testi,  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Kolokalizasyon Testi, Neoplastik Transformasyon Testi (Kontak İnhibisyon Testi) ve Soft Agar Koloni Oluşum Testi (Ankraj Bağımsız Büyüme Testi)'nin sonuçları detaylı şekilde aşağıda verilmiştir. Bu testlerden elde edilen veriler grafiklendirilip tabloları oluşturulmuştur ve istatistiksel analizler uygulanarak bu verilerin değerlendirilmeleri yapılmış ve yorumlanmıştır.

#### 4.1.1 MTT Testi

MTT testi ile mitokondriyal aktivite ölçülerek ACR'nin çeşitli maruziyet süreleri sonrası, kuyucuklardaki canlı hücrelerin oranını nasıl etkilediği belirlenmiştir. 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta  $10^4$  oranında BEAS-2B hücresi olacak şekilde hücre ekilmiştir. Hazırlanan ACR dozları 24, 48, 72 saatlik maruziyet sürelerinde hücrelere uygulanmıştır (Şekil 4.1). Uygulamadan sonra MTT testi protokolündeki işlemler gerçekleştirilmiştir ve 570 nm'de mikropilaka okuyucu ile absorbans değerleri okunmuştur.



Şekil 4.1 96 Kuyucuklu Kültür Kaplarında MTT Testi İçin Yapılan Uygulama Planı

24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerinin sonunda elde edilen sonuçlara göre, tekrarlı olarak uygulanan konsantrasyonların ortalama değerleri blank değerinden (sadece besiyerinin absorbans değeri) çıkarılarak normalizasyon yapılmıştır. Normalizasyon sonrasında elde edilen absorbans değerleri Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1** 24 Saatlik Maruziyet Sonrası ACR Konsantrasyonlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyon (mM)	OD 570 nm	Normalizasyon (Konsantrasyon OD – Blank OD)
Blank	0.060	-
0	0.392	0.332
0.005	0.381	0.321
0.01	0.370	0.310
0.05	0.367	0.306
0.1	0.361	0.301
0.5	0.328	0.268
1	0.315	0.255
5	0.257	0.197
10	0.180	0.120

**Çizelge 4.2** 48 Saatlik Maruziyet Sonrası ACR Konsantrasyonlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyon (mM)	OD 570 nm	Normalizasyon (Konsantrasyon OD – Blank OD)
Blank	0.058	-
0	0.435	0.377
0.005	0.433	0.375
0.01	0.425	0.366
0.05	0.417	0.359
0.1	0.401	0.343
0.5	0.396	0.338
1	0.340	0.282
5	0.112	0.053
10	0.087	0.029

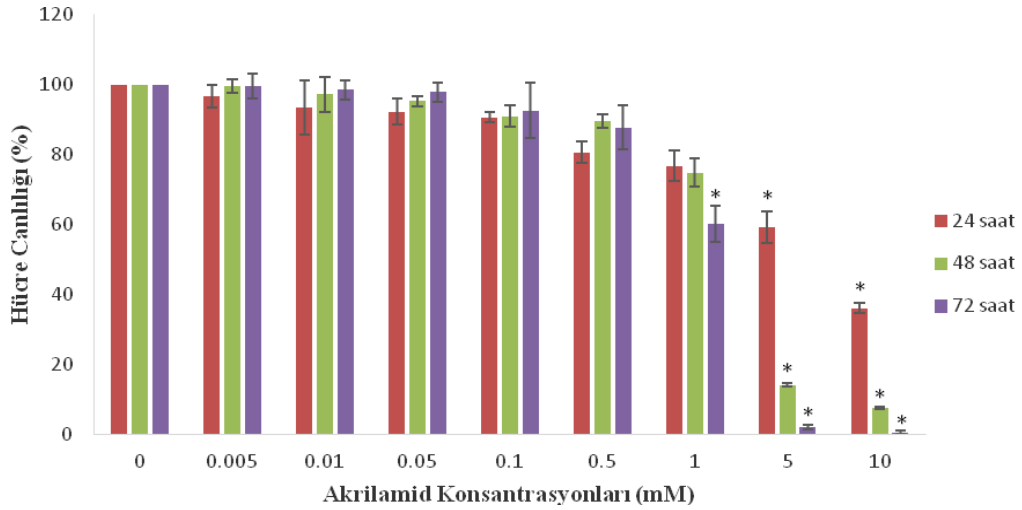
**Çizelge 4.3** 72 Saatlik Maruziyet Sonrası Konsantrasyonlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyon (mM)	OD 570 nm	Normalizasyon (Konsantrasyon OD –Blank OD)
Blank	0.065	-
0	0.518	0.453
0.005	0.516	0.452
0.01	0.511	0.447
0.05	0.508	0.444
0.1	0.485	0.420
0.5	0.462	0.398
1	0.338	0.273
5	0.074	0.010
10	0.067	0.002

ACR ile 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerine bırakılan BEAS-2B hücrelerinin hücre canlılık değerleri formüle göre hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar çizelge de gösterilmiştir (Çizelge 4.4). Bu değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılarak grafiklendirilmiştir (Şekil 4.2).

**Çizelge 4.4** ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyetleri Sonucu Elde Edilen Verilerden Hesaplanan Hücre Canlılığı (%) Değerleri

Konsantrasyonlar (mM)	24 saat	48 saat	72 saat
	Hücre canlılığı (%)	Hücre canlılığı (%)	Hücre canlılığı (%)
0	100	100	100
0.005	96.68	99.54	99.61
0.01	93.44	97.29	98.51
0.05	92.31	95.27	97.85
0.1	90.66	91.04	92.66
0.5	80.71	89.71	87.70
1	76.79	74.83	60.29
5	59.23	14.14	2.10
10	36.02	7.64	0.49



**Şekil 4.2** 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonrası elde edilen ortalama hücre canlılığı verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi [\*] çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında farklılığı gösterir ( $p < 0.05$ )

MTT testinde ACR'nin 24 saatlik maruziyeti sonucu BEAS-2B hücrelerinin hücre canlılığı değerlerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Hücre canlılığı değerindeki bu azalmanın en yüksek konsantrasyon olan 10 mM'da %50'nin altına düştüğü görülmüştür. Hücre canlılığında görülen bu düşüşlerden, en yüksek iki konsantrasyonda gözlenen azalmaların negatif kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.2).

48 saatlik maruziyet süresi sonucunda ise, 24 saatlik uygulamaya benzer bir şekilde konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşler tespit edilmiştir. Hücre canlılığı değerindeki düşüş 1 mM'lık konsantrasyondan sonraki muamelelerde %50'nin altına düşmüştür. Özellikle test edilen en yüksek iki konsantrasyon olan 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda önceki dozlara göre ciddi bir azalış görülmüştür. 48 saatlik uygulama süresinde en yüksek iki konsantrasyonda hücre canlılığında gözlenen bu dramatik düşüşler negatif kontrole göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.2).

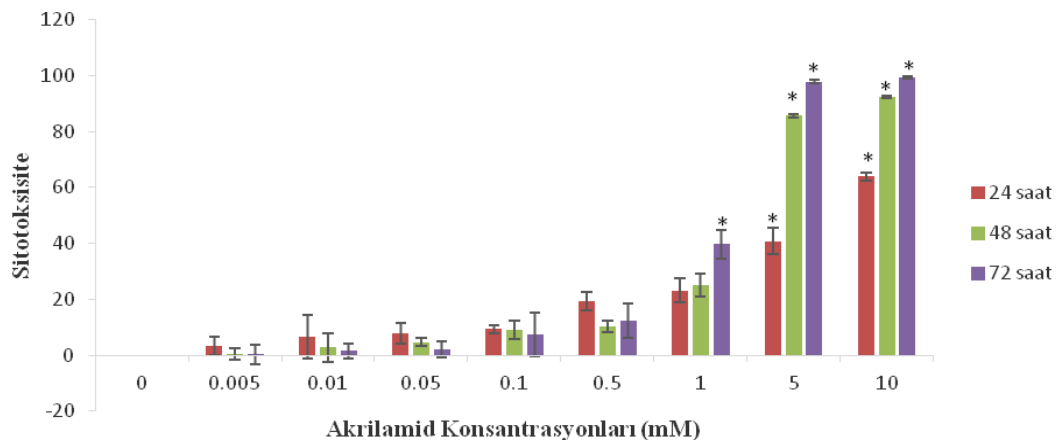
72 saatlik muamele sonrasında ACR'nin BEAS-2B hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisine bakıldığında, diğer muamele sürelerinde görüldüğü gibi konsantrasyon artışına bağlı hücre canlılığı değerlerinin azaldığı görülmüştür. Hücre

canlılığının %50'nin altına düştüğü değerin 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda olduğu tespit edilmiştir. Tıpkı 48 saatlik muamele olduğu gibi, özellikle en yüksek iki konsantrasyonda önceki dozlara göre çok dramatik bir azalış belirlenmiştir. Hücre canlılığı değeri negatif kontrole göre kıyaslandığında aralarındaki farkın test edilen en yüksek üç konsantrasyonda istatistiksel açıdan anlamda önemli olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.2).

ACR ile 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerine bırakılan BEAS-2B hücrelerinin sitotoksosite değerleri formülle hesaplanarak çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Bu değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılarak grafiklendirilmiştir (Şekil 4.3).

**Çizelge 4.5** ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyetleri Sonucu Elde Edilen Verilerinden Hesaplanan Sitotoksosite Değerleri

Konsantrasyon (mM)	24 saat Sitotoksosite (%)	48 saat Sitotoksosite (%)	72 saat Sitotoksosite (%)
0	0	0	0
0.005	3.32	0.46	0.39
0.01	6.56	2.71	1.49
0.05	7.69	4.73	2.15
0.1	9.34	8.96	7.34
0.5	19.29	10.29	12.30
1	23.21	25.17	39.71
5	40.77	85.86	97.90
10	63.98	92.36	99.51



**Şekil 4.3** 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Ortalama Sitotoksosite Verileri ve Standart Hata Değerlerinin Grafikselsel Olarak Gösterimi [\*] çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında farklılığı gösterir ( $p<0.05$ )

ACR'nin 24 saatlik maruziyeti sonucu BEAS-2B hücrelerinin hesaplanan sitotoksosite değerlerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Negatif kontrole göre kıyaslandığında sitotoksosite değerlerinde görülen bu artışların en yüksek iki konsantrasyonda (5 ve 10 mM) istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.3).

48 saatlik maruziyet süresi sonucunda, ACR'nin akciğer epitel hücreleri üzerindeki sitotoksitesi konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. Özellikle en yüksek iki konsantrasyon olan 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonda önceki konsantrasyonlara göre sitotoksosite değerinde oldukça ciddi artışların olduğu görülmüştür. 48 saatlik uygulama süresinde en yüksek iki konsantrasyonda sitotoksistide gözlenen bu ciddi artışlar negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.3).

72 saatlik maruziyet sonrasında da, ACR konsantrasyonundaki artışlara bağlı olarak hücrelerdeki sitotoksitenin de arttığı görülmüştür. 48 saatlik uygulamanın sonuçlarına benzer şekilde, özellikle en yüksek iki konsantrasyon olan 5 ve 10 mM'da önceki dozlara göre sitotoksistide çok ciddi artışlar belirlenmiştir. Sitotoksosite değerleri negatif kontrole göre kıyaslandığında aralarındaki farkın en yüksek üç ACR konsantrasyonunda (1, 5 ve 10 mM) istatistiksel anlamda önemli olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.3).

ACR'nin tüm konsantrasyonlarına uygulanan MTT testinde, 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetler sonucu; 1 mM'lık konsantrasyona kadarki muamelelerde düşük bir sitotoksosite gözlenirken, 1 mM'dan itibaren sitotoksitenin artmaya başladığı ve test edilen en yüksek konsantrasyonlar olan 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda ise sitotoksistide ciddi artışlar olduğu tespit edilmiştir.

#### **4.1.2 IC50 Değerlerine Göre Deneylerde Kullanılan Dozların Belirlenmesi**

Tekrar edilen MTT testi sonuçlarının ortalamaları alınarak her bir muamele süresi için kontrole göre %50 oranında sitotoksosite gösteren konsantrasyon (İnhibitör Konsantrasyon=IC50 değeri) değerleri hesaplanmıştır ve bu konsantrasyonlar sitotoksik doz olarak kabul edilmiştir. IC50 değerleri 24 saatlik

muamele için 6.6 mM, 48 saatlik muamele için 1.97 mM ve 72 saatlik muamele için 1.33 mM olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6** ACR İçin MTT Testi Sonuçlarına Göre Belirlenen IC50 Değerleri

	24 saat	48 saat	72 saat
IC50	6.6 mM	1.97 mM	1.33 mM

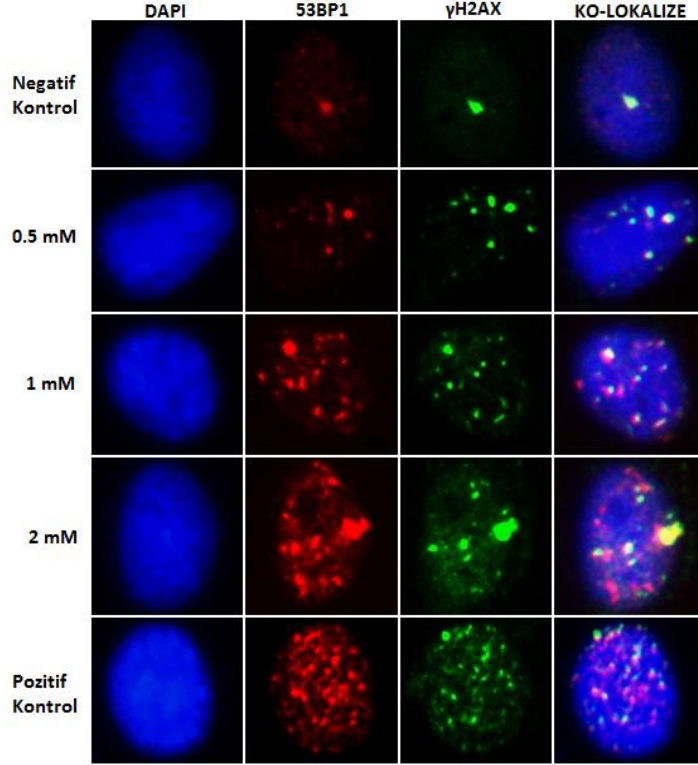
Çalışmada uygulanan üç zaman noktasına bağlı olarak ACR için hesaplanan IC50 değeri dikkate alındığında; bundan sonraki uygulayacağımız deneylerimiz için kullanılacak ACR konsantrasyonları 0.5, 1 ve 2 mM olarak belirlenmiştir.

#### 4.1.3 $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Ko-Lokalizasyon Testi

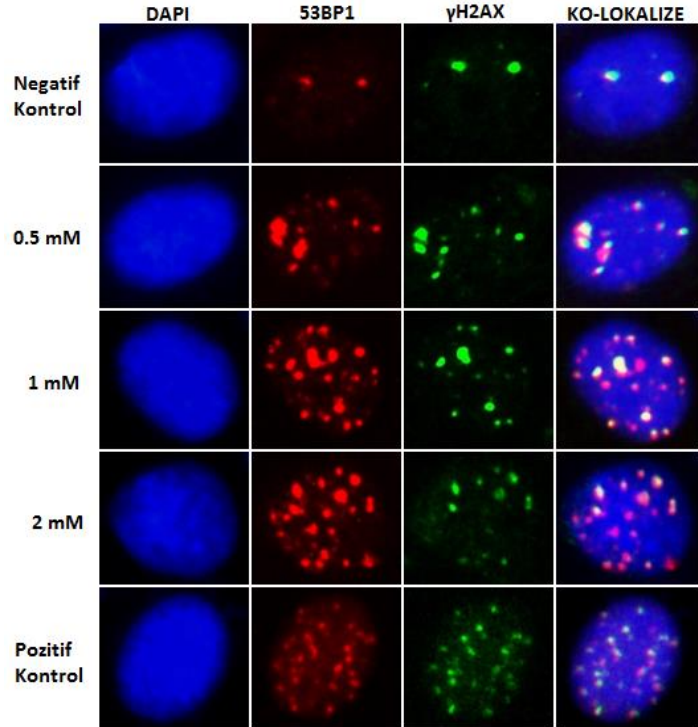
$\gamma$ H2AX ve 53BP1 proteinleri, DNA çift zincir kırıklarının tamirinde görev alan iki proteindir. Bu proteinler p53 proteinine bağlanmaktadır ve DNA'da çift zincir kırığı oluştuğunda çekirdekdeki hasar bölgesinde p53 proteini ile ko-lokalize olurlar. Hasar oluşan bu bölgede her iki protein de bir araya gelerek odaklar meydana getirirler (Ertürk, 2019).  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 proteinlerinin oluşturdukları odakların, immünofloresan yöntemle gözlemlenmesi, uygulanan ko-lokalizasyon çalışmalarını oluşturmaktadır.

$\gamma$ H2AX ve 53BP1 ko-lokalizasyon testinde, hücreler uygulanan MTT test sonuçlarından elde edilen veriler doğrultusunda belirlenen üç konsantrasyon olan 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlara 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Maruziyet süreleri sonunda tüm deney gruplarına ait hücrelerden immünofloresan yöntemle preparatlar hazırlanmıştır ve floresan mikroskop ile incelenmiştir. DAPI ile boyanmış ve morfolojisi düzgün olan hücre çekirdeklerindeki  $\gamma$ H2AX ve 53BP1'e ait odakların sayımları yapılmıştır (Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6).

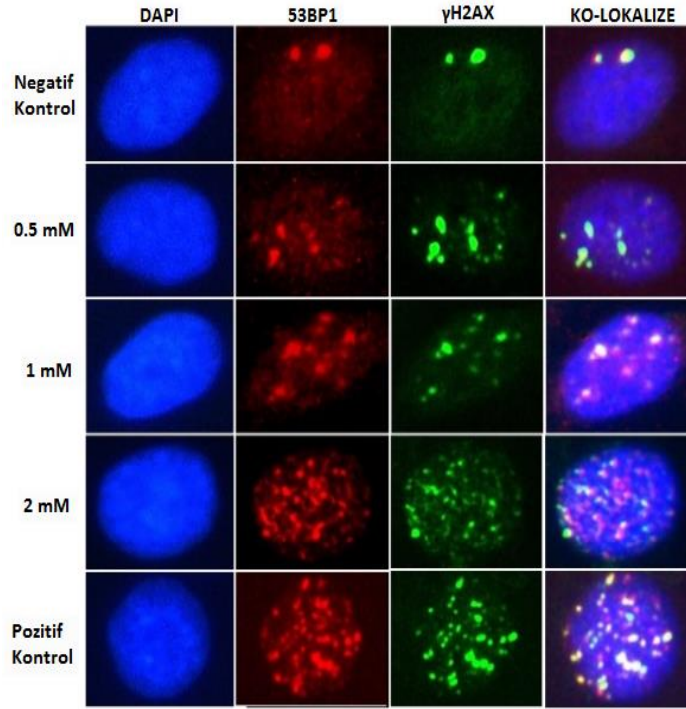




**Şekil 4.4** 24 Saat ACR ile Muamele Edilen BEAS-2B Hücre Çekirdeklerindeki  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Kontrol Grupları ve Konsantrasyonlara Bağlı Değişim Örnekleri



**Şekil 4.5** 48 Saat ACR ile Muamele Edilen BEAS-2B Hücre Çekirdeklerindeki  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Kontrol Grupları ve Konsantrasyonlara Bağlı Değişim Örnekleri



**Şekil 4.6** 72 Saat ACR ile Muamele Edilen BEAS-2B Hücre Çekirdeklerindeki  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Kontrol Grupları ve Konsantrasyonlara Bağlı Değişim Örnekleri

Sayımlarda çekirdek morfolojisi ve odak belirgenliği açısından bir standart belirlenip o doğrultuda sayım yapılmıştır. Bütün gruplara ait 50 hücre çekirdeğindeki odak sayıları sayıldıktan sonra deney tekrarlarının ortalamaları alınmıştır. Odak sayıları  $\gamma$ H2AX, 53BP1 ve ikisi birlikte (ko-lokalizasyon) olacak şekilde değerlendirilerek kaydedilmiştir (Çizelge 4.7, 4.8 ve 4.9). Elde edilen sonuçlar 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetlerde, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak odak sayılarındaki değişiklik kaydedilmiş ve grafiklendirilerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9).

**Çizelge 4.7** 24 Saatlik Uygulama Sonrası Konsantrasyona Bağlı Olarak Hücre Başına Sayılan Ortalama Odak Sayıları

Konsantrasyonlar	24 saat		
	$\gamma$ -H2AX $\pm$ SH	53BP1 $\pm$ SH	Ko-lokalize $\pm$ SH
<b>Negatif Kontrol</b>	4.89 $\pm$ 0.19	3.75 $\pm$ 0.40	2.86 $\pm$ 0.23
<b>0.5 mM</b>	6.88 $\pm$ 0.49	6.45 $\pm$ 0.08	4.92 $\pm$ 0.12
<b>1 mM</b>	7.66 $\pm$ 0.94	6.53 $\pm$ 0.32	4.88 $\pm$ 0.03
<b>2 mM</b>	9.8 $\pm$ 0.68	7.02 $\pm$ 0.23	5.91 $\pm$ 0.17
<b>Pozitif Kontrol</b>	16.89 $\pm$ 0.33	8.07 $\pm$ 0.32	7.09 $\pm$ 0.30

**Çizelge 4.8** 48 Saatlik Uygulama Sonrası Konsantrasyona Bağlı Olarak Hücre Başına Sayılan Ortalama Odak Sayıları

Konsantrasyonlar	48 saat		
	$\gamma$ -H2AX $\pm$ SH	53BP1 $\pm$ SH	Ko-lokalize $\pm$ SH
<b>Negatif Kontrol</b>	6.43 $\pm$ 0.17	5.08 $\pm$ 0.21	3.44 $\pm$ 0.10
<b>0.5 mM</b>	9.15 $\pm$ 1.12	5.92 $\pm$ 0.42	4.88 $\pm$ 0.35
<b>1 mM</b>	11.53 $\pm$ 0.34	6.28 $\pm$ 0.36	5.25 $\pm$ 0.16
<b>2 mM</b>	11.89 $\pm$ 0.11	6.47 $\pm$ 0.85	5.93 $\pm$ 0.65
<b>Pozitif Kontrol</b>	15.44 $\pm$ 0.31	8.53 $\pm$ 1.13	6.67 $\pm$ 0.55

**Çizelge 4.9** 72 Saatlik Uygulama Sonrası Konsantrasyona Bağlı Olarak Hücre Başına Sayılan Ortalama Odak Sayıları

Konsantrasyonlar	72 saat		
	$\gamma$ -H2AX $\pm$ SH	53BP1 $\pm$ SH	Ko-lokalize $\pm$ SH
<b>Negatif Kontrol</b>	5.45 $\pm$ 0.82	3.85 $\pm$ 0.24	2.79 $\pm$ 0.18
<b>0.5 mM</b>	7.83 $\pm$ 0.82	5.97 $\pm$ 0.25	4.67 $\pm$ 0.24
<b>1 mM</b>	11.85 $\pm$ 1.06	6.83 $\pm$ 0.39	5.51 $\pm$ 0.62
<b>2 mM</b>	13.57 $\pm$ 0.21	9.18 $\pm$ 0.45	6.58 $\pm$ 0.11
<b>Pozitif Kontrol</b>	15.69 $\pm$ 0.84	9,87 $\pm$ 0,69	7,71 $\pm$ 0,43

ACR'nin 24 saatlik maruziyetinde ko-lokalize olan odaklar hariç, DNA çift zincir kırığı belirteci olan  $\gamma$ -H2AX protein odağındaki ve DNA onarım proteinlerinin hasar bölgesinde toplanmasını sağlayan 53BP1 protein odağındaki artışların konsantrasyon artışına bağlı olduğu görülmüştür. 48 ve 72 saatlik uygulamalar sonucu ise, hem  $\gamma$ -H2AX, hem 53BP1 hem de ko-lokalize odak sayılarındaki artışların konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı görülmüştür (Çizelge 4.7, 4.8 ve 4.9).

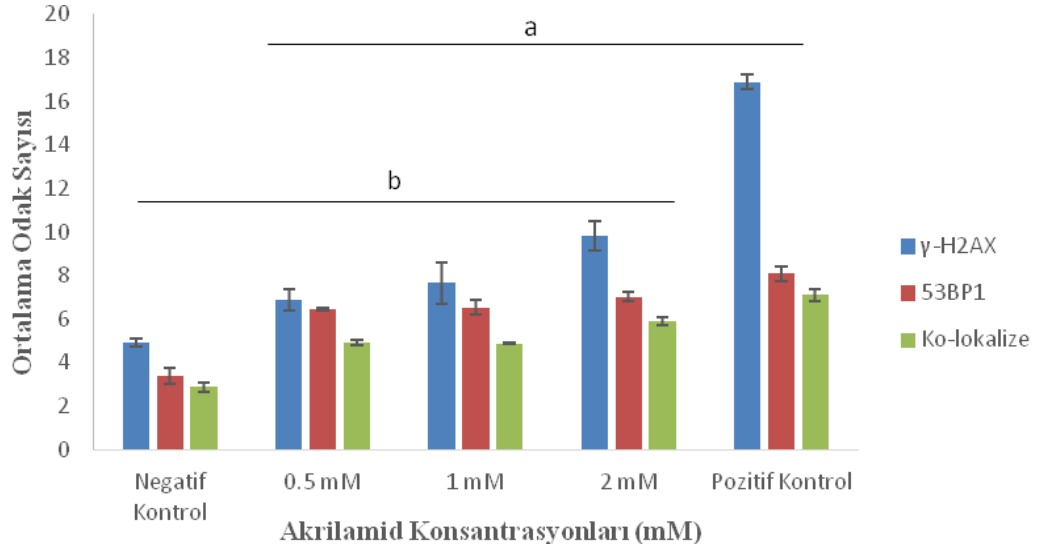
24, 48 ve 72 saatlik süreyle ACR'ye maruz bırakılan hücrelerdeki ortalama odak sayıları hem negatif kontrol hem de pozitif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Beklendiği gibi pozitif kontrol olarak kullanılan ve 30 dakika boyunca hücrelerle muamele edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\gamma$ -H2AX, 53BP1 ve ko-lokalize odak sayılarını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde artırmıştır (p<0.05) (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9).

ACR'nin 24 saatlik maruziyetinde, tüm ACR gruplarında  $\gamma$ -H2AX, 53BP1 ve ko-lokalize odaklarda meydana gelen artışlar, negatif kontrole karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). 24 saatlik maruziyet sonucu oluşan odak sayıları pozitif kontrole göre kıyaslandığında da, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür (p<0.05). Bu da bize 24 saatlik ACR maruziyetinin hücreler üzerindeki olumsuz etkisinin pozitif kontroldeki kadar fazla olmadığını göstermektedir (Çizelge 4.7, Şekil 4.7).

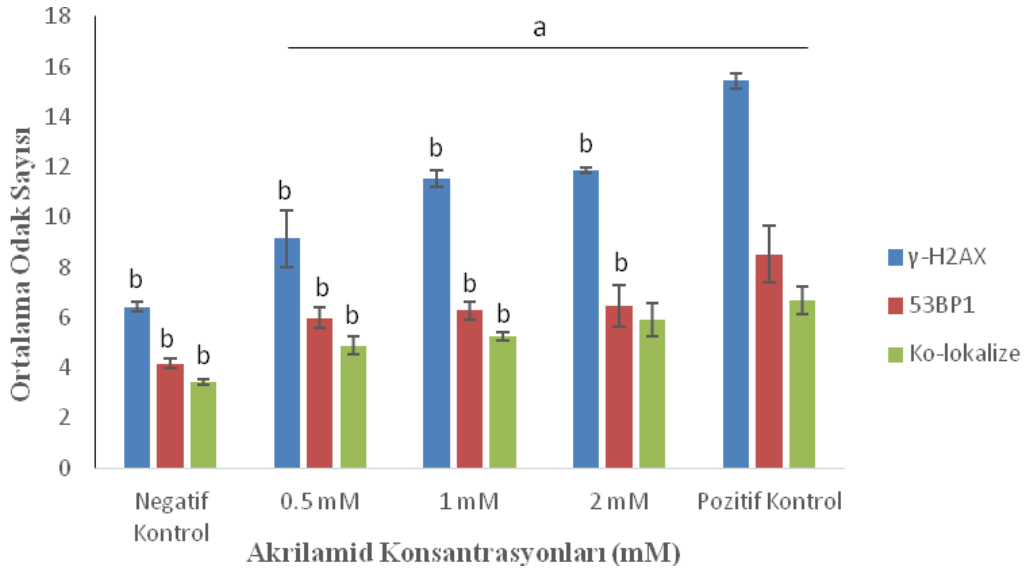
48 saatlik ACR uygulamasının  $\gamma$ -H2AX, 53BP1 ve ko-lokalize odaklarında, tüm konsantrasyonlarda meydana gelen artışların negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). ACR dozlarının 48 saatlik maruziyet süresi sonuçları tüm odaklar açısından pozitif kontrole göre karşılaştırıldığında ise,  $\gamma$ -H2AX ve 53BP1 protein odaklarının tüm dozlarda istatistiksel açıdan aralarında fark olduğu bulunmuştur (p<0.05). Ko-lokalize olan odaklarda düşük olan iki dozda pozitif kontrole göre önemli farklılıklar tespit edilirken (p<0.05), en yüksek dozda aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05) (Çizelge 4.8, Şekil 4.8). Bu durum bize en yüksek ACR konsantrasyonunun istatistiksel olarak pozitif kontrole yakın miktarlarda ko-lokalize odak oluşumuna yol açtığını göstermektedir.

72 saatlik uygulama sonunda, tüm konsantrasyonlarda elde edilen protein odakları ve ko-lokalize olan odak sayıları negatif kontrole karşılaştırıldığında görülen artışın istatistiksel olarak öneme sahip bir fark olduğu tespit edilmiştir (p<0.05).  $\gamma$ -H2AX protein odağı ve ko-lokalize olan odaklarda 72 saatlik maruziyet süresindeki tüm konsantrasyonların pozitif kontrole göre karşılaştırıldığında önemli derecede farklı olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). 53BP1 odağında ise 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarda görülen artışların pozitif kontrole göre istatistiksel olarak

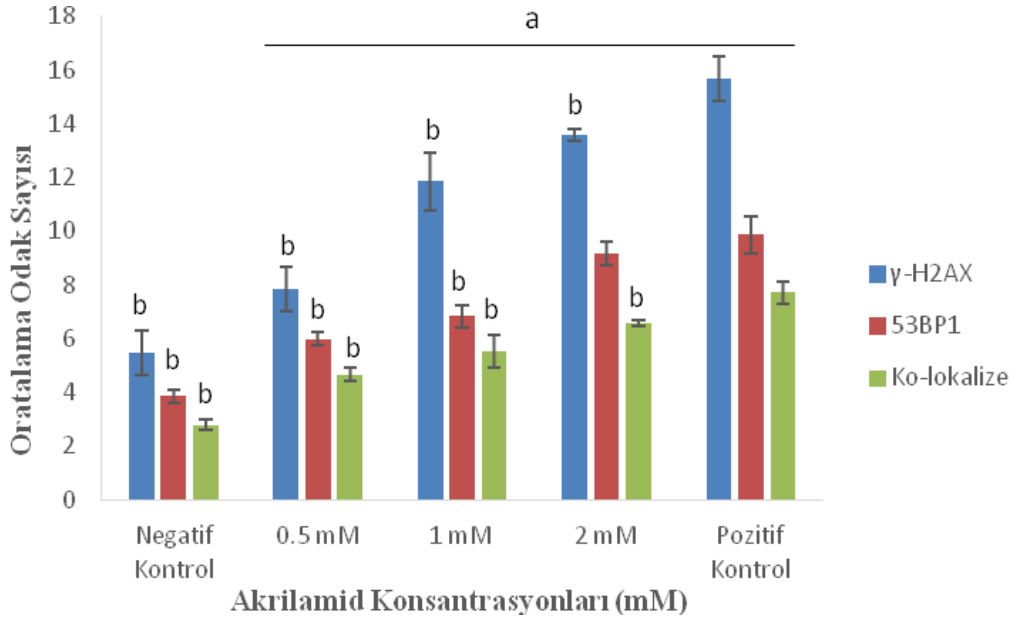
aralarındaki farkın anlamlı olduğu ve pozitif kontrol kadar etkili olmadığı görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Buna karşılık, 2 mM'lık konsantrasyondaki artış pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 4.9, Şekil 4.9). Bu sonuç; 72 saatlik muamelede en yüksek ACR konsantrasyonunun, istatistiksel olarak pozitif kontrol gibi yüksek miktarda 53BP1 odak oluşumuna yol açtığını göstermektedir.



**Şekil 4.7** 24 Saatlik Maruziyet Sonucu Hücre Çekirdeklerindeki  $\gamma$ H2AX, 53BP1 ve Ko-lokalize Odakların Değişimi  
 [a] Çözücü (negatif) kontrol ile karşılaştırıldığındaki farklılığı gösterir ( $p < 0.05$ )  
 [b] Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığındaki farklılığı gösterir ( $p < 0.05$ )



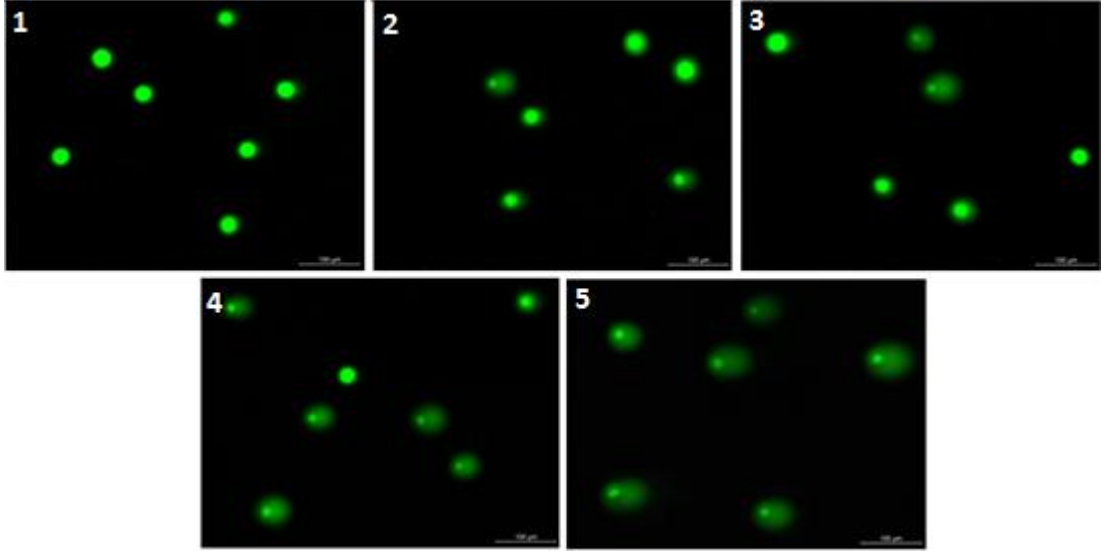
**Şekil 4.8** 48 Saatlik Maruziyet Sonucu Hücre Çekirdeklerindeki  $\gamma$ H2AX, 53BP1 ve Ko-lokalize Odakların Değişimi  
 [a] Çözücü (negatif) kontrol ile karşılaştırıldığında farklılığı gösterir ( $p < 0.05$ )  
 [b] Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında farklılığı gösterir ( $p < 0.05$ )



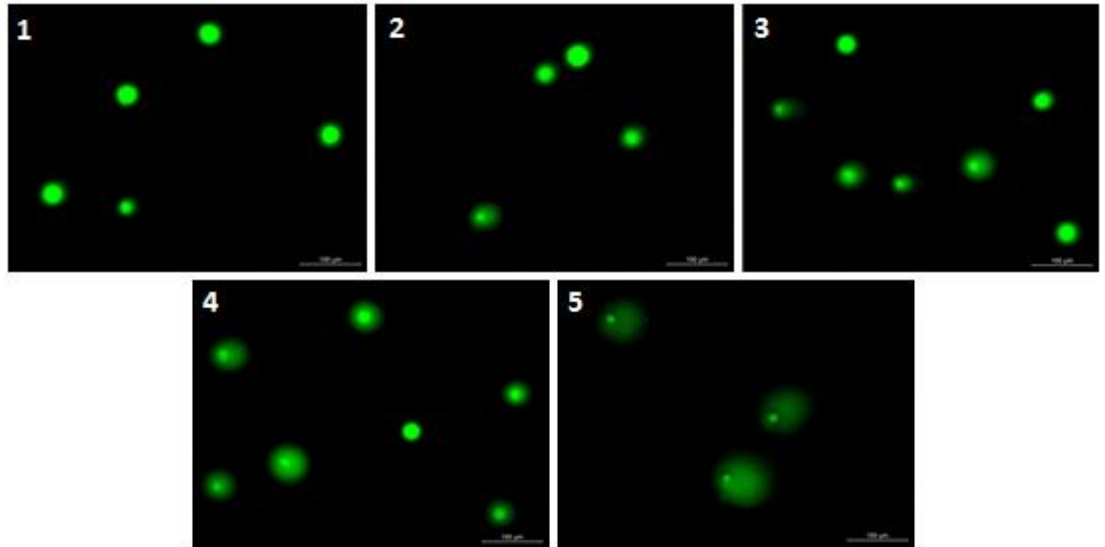
**Şekil 4.9** 72 Saatlik Maruziyet Sonucu Hücre Çekirdeklerindeki  $\gamma$ H2AX, 53BP1 ve Ko-lokalize Odakların Değişimi  
 [a] Çözücü (negatif) kontrol ile karşılaştırıldığında farklılığı gösterir ( $p < 0.05$ )  
 [b] Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında farklılığı gösterir ( $p < 0.05$ )

### 4.1.3 Comet Testi

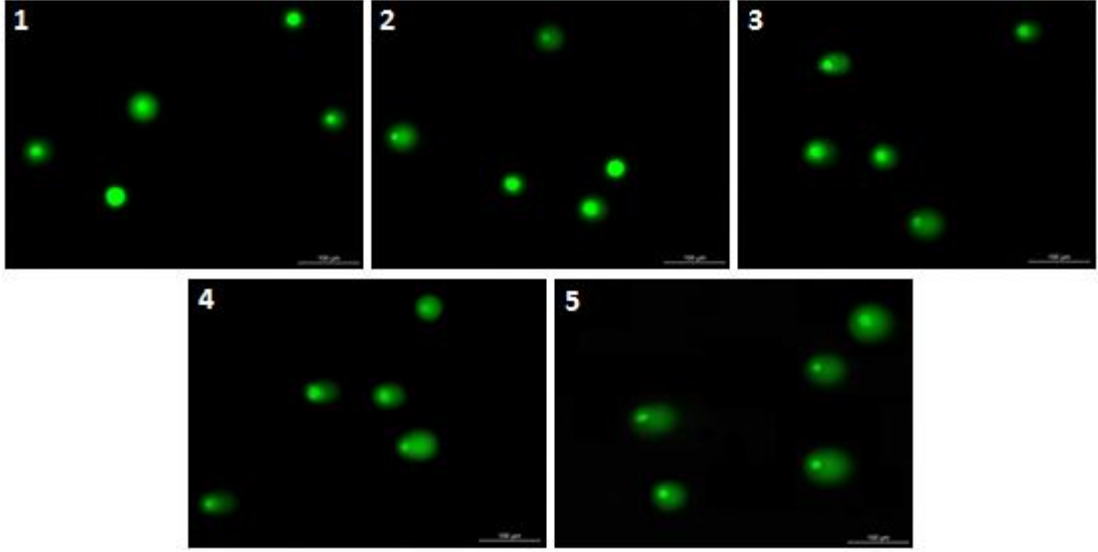
Belirlenen konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaya maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde oluşan DNA hasarlarını belirlemek amacıyla hazırlanan preparatlar, floresan mikroskop kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücrelerde meydana gelen DNA hasarının derecesine göre kuyruk oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.10 Negatif Kontrol (1), Pozitif Kontrol (5), 0.5 mM (2), 1 mM (3) ve 2 mM (4) ACR ile 24 Saat Muamele Edilen Hücrelerdeki Cometlerin Görünümü



Şekil 4.11 Negatif Kontrol (1), Pozitif Kontrol (5), 0.5 mM (2), 1 mM (3) ve 2 mM (4) ACR ile 48 Saat Muamele Edilen Hücrelerdeki Cometlerin Görünümü



**Şekil 4.12** Negatif Kontrol (1), Pozitif Kontrol (5), 0.5 mM (2), 1 mM (3) ve 2 mM (4) ACR ile 72 Saat Muamele Edilen Hücrelerdeki Cometlerin Görünümü

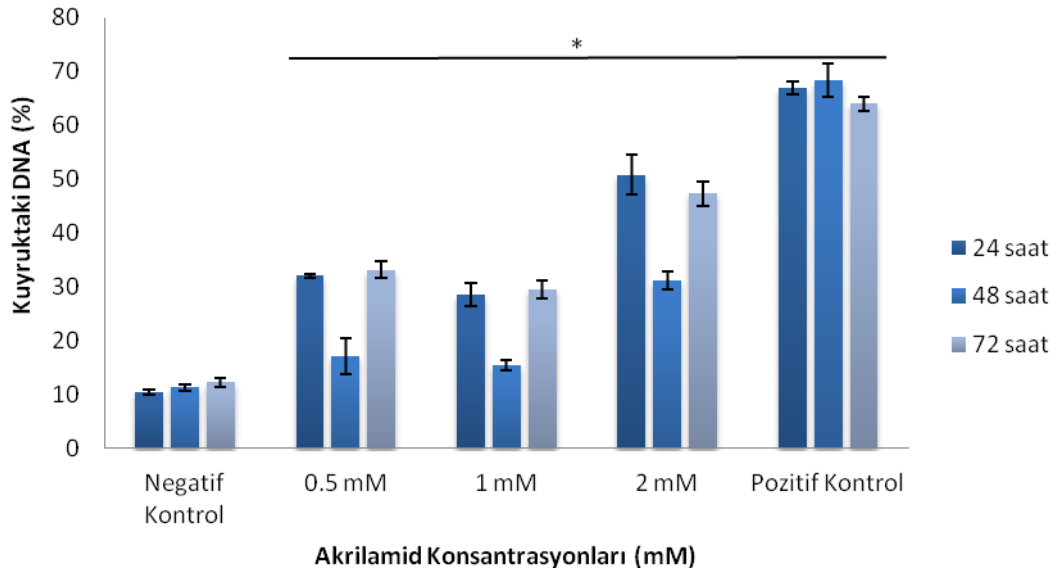
Genotoksisiteyi belirlemek amacıyla uygulanan comet testi ile, DNA hasarının kantitatif olarak saptanmasında sıklıkla kullanılan; kuyruktaki DNA (%), kuyruk momentı ve olive kuyruk momentı gibi parametrelerin ölçümleri Comet Score 2.0 (Tritek Corp, Sumerduck, VA) yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. Hem kontrol grupları hem de deney gruplarının floresan mikroskopta fotoğraflama işlemleri yapılmıştır. Tüm maruziyet süreleri ele alınarak kuyruk momentı, kuyruktaki DNA (%) ve olive kuyruk momentinin konsantrasyonlara bağlı değişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

ACR uygulamasına maruz bırakılan hücrelerde meydana gelen kuyruktaki DNA yüzdeleri negatif kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. ACR'nin 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetlerinde, tüm konsantrasyonlarda hücrelerde oluşan kuyruktaki DNA yüzdesindeki artışların doza bağlı olmadığı görülmüştür. Tüm maruziyet sürelerinde, kuyruktaki DNA yüzdesinde meydana gelen bu artışlar negatif kontrol ile kıyaslandığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 4.10, Şekil 4.13).



**Çizelge 4.10** ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulamaları Sonrası Kuyruktaki DNA Yüzdesi Değerleri

Konsantrasyonlar	24 saat	48 saat	72 saat
Negatif Kontrol	10.32 ± 0.48	11.28 ± 0.64	12.18 ± 0.74
0.5 mM	31.99 ± 0.40	17.03 ± 3.31	33.14 ± 1.50
1 mM	28.51 ± 2.06	15.41 ± 0.90	29.42 ± 1.69
2 mM	50.79 ± 3.69	31.16 ± 1.63	47.31 ± 2.30

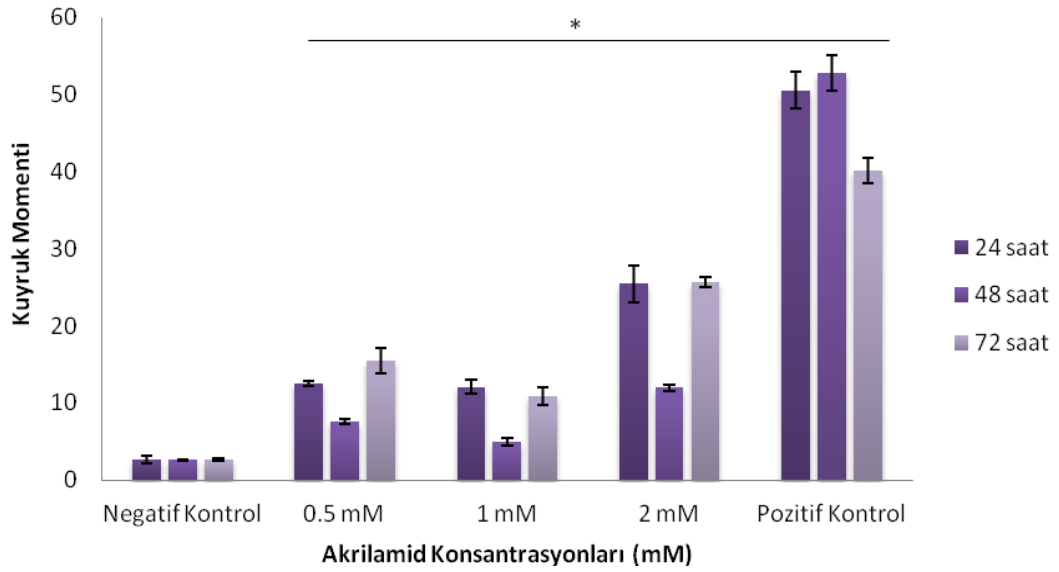


**Şekil 4.13** 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyet Sonrası Kuyruktaki DNA Yüzdesinin ACR Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi

ACR'ye 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerde incelenen kuyruk momenti değerlerindeki artışların doza bağlı olmadığı gözlenmiştir. Tüm maruziyet süreleri sonunda, hücrelerdeki kuyruk momenti değerleri negatif kontrolle karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda görülen artışların istatistiksel öneme sahip anlamlı bir fark gösterdiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). (Çizelge 4.11, Şekil 4.14).

**Çizelge 4.11** ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulamaları Sonrası Kuyruk Momenti Değerleri

Konsantrasyonlar	24 saat	48 saat	72 saat
Negatif Kontrol	2.57 ± 0.48	2.56 ± 0.11	2.59 ± 0.17
0.5 mM	12.52 ± 0.38	7.56 ± 0.32	15.39 ± 1.66
1 mM	12.06 ± 0.87	4.93 ± 0.42	10.88 ± 1.10
2 mM	25.45 ± 2.39	11.95 ± 0.42	25.67 ± 0.66

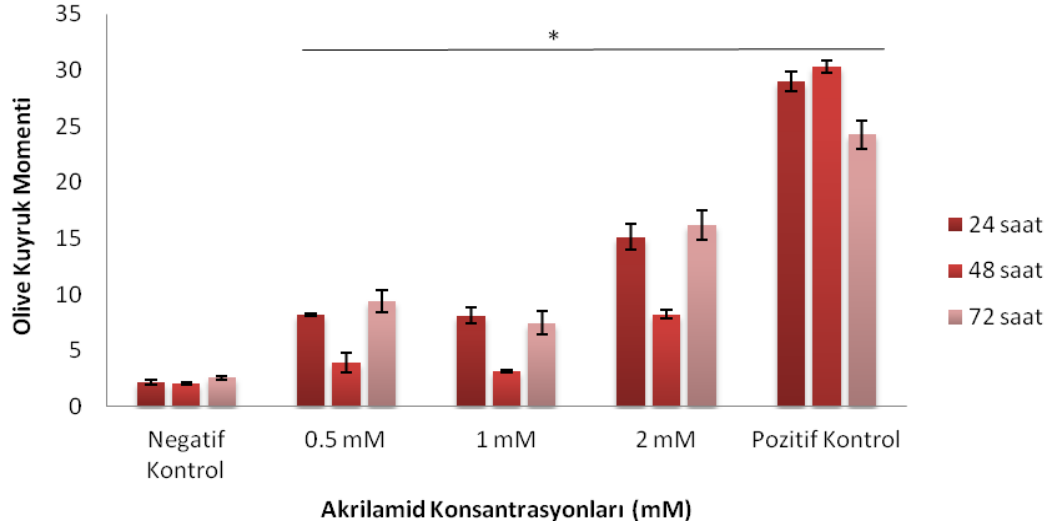


**Şekil 4.14** 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyet Sonrası Kuyruk Momentinin ACR Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi

24, 48 ve 72 saatlik maruziyet süresi sonunda, tüm doz uygulamalarının ardından hücrelerde meydana gelen kuyruklardaki olive kuyruk momenti değerlerinde görülen artışların doza bağlı olmadığı tespit edilmiştir. ACR'nin 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları sonunda, tüm konsantrasyonlarda gözlemlenen olive kuyruk momentindeki bu artışların negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarındaki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 4.12, Şekil 4.15).

**Çizelge 4.12** ACR Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulamaları Sonrası Olive Kuyruk Momenti Değerleri

Konsantrasyonlar	24 saat	48 saat	72 saat
Negatif Kontrol	2.20 ± 0.20	2.09 ± 0.08	2.59 ± 0.14
0.5 mM	8.23 ± 0.09	3.93 ± 0.84	9.45 ± 0.99
1 mM	8.13 ± 0.71	3.18 ± 0.09	7.46 ± 1.01
2 mM	15.13 ± 1.15	8.25 ± 0.38	16.15 ± 1.32



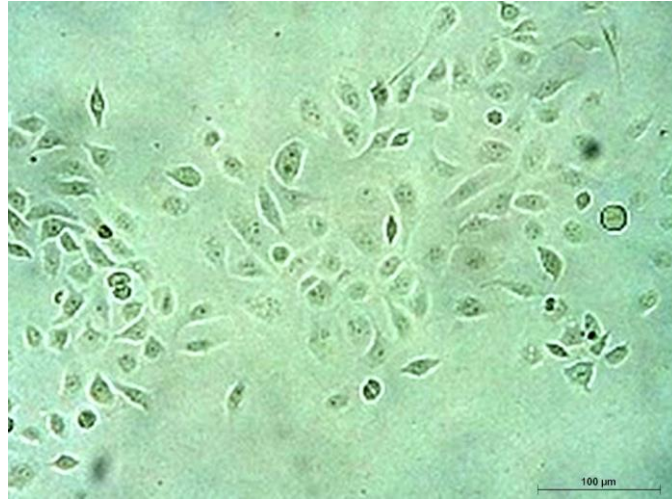
**Şekil 4.15** 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyet Sonrası Olive Kuyruk Momentinin ACR Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi

#### 4.1.4 Neoplastik Transformasyon Testi (Kontak İnhibisyon Testi)

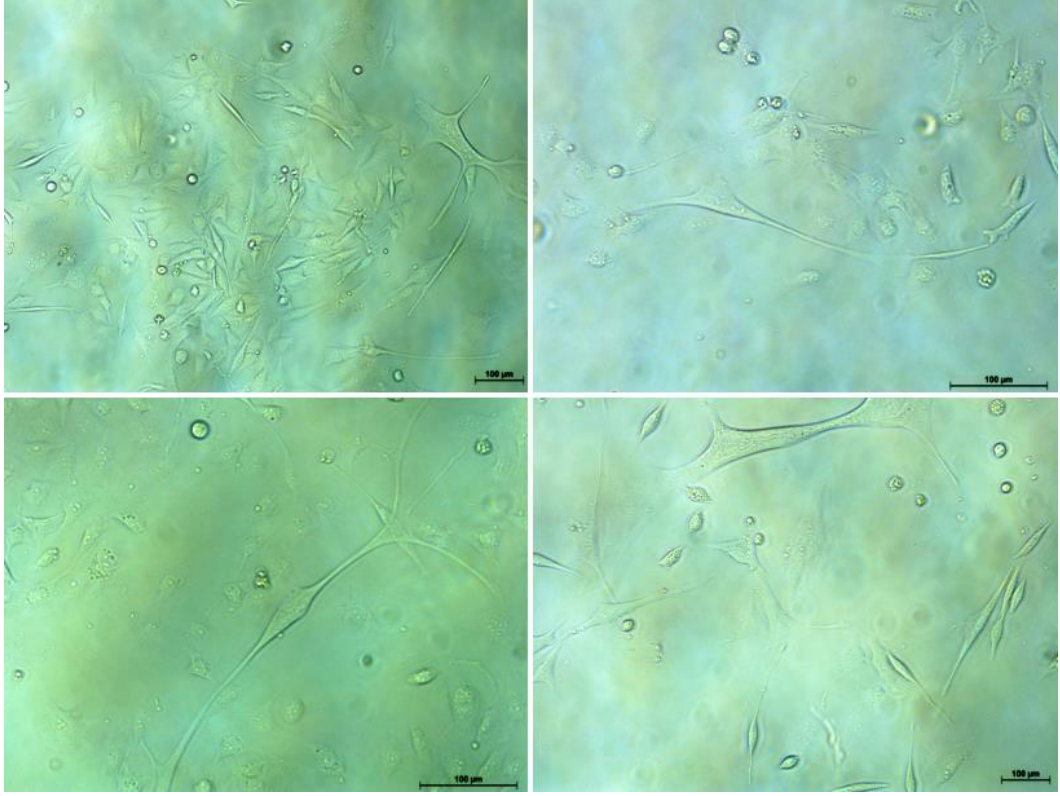
ACR'nin BEAS-2B hücreleri üzerindeki karsinojenitesinin araştırılması için belirlenen konsantrasyonlarda neoplastik transformasyon testi uygulanmıştır. Hücelere belirlenen ACR konsantrasyonları ile 72 saatlik maruziyet uygulanmıştır. ACR'ye maruz bırakılan gruplarda hücrelerin değişimi izlenerek görüntüledikten sonra her bir dozdan ikişer petri olacak şekilde pasajlanmıştır. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler ve odak oluşumları incelenmiştir.

ACR uygulanmasından ve diğer pasajlamalardan sonra BEAS-2B hücrelerinde, negatif kontrol ile kıyaslandığında çeşitli morfolojik değişikliklerin meydana geldiği görülmüştür. Hücreler normal morfolojik özelliklerini kaybetmiş ve iğsi bir yapıya dönüşmüşlerdir. Bazılarında yırtık ve parçalı şekilde hasarlı sitoplazma görülürken, bazılarında da büyük boşlukları olan ve çekirdekleri anormal

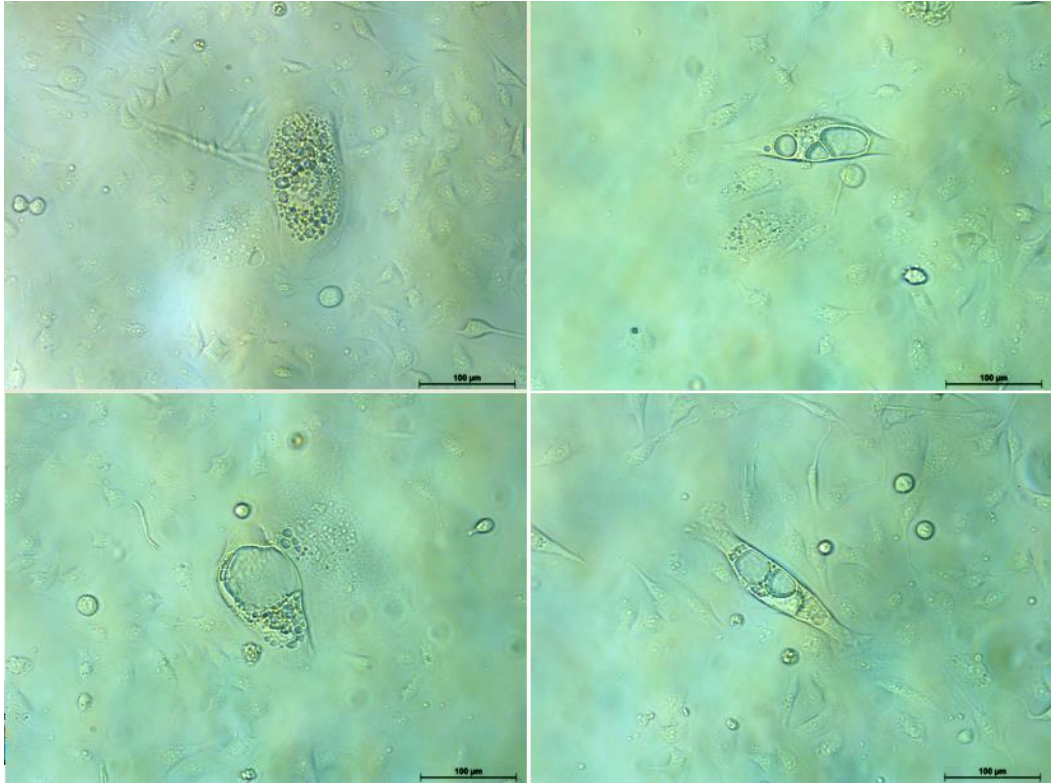
konumlanmış hücreler tespit edilmiştir. Hücrelerin pleomorfik kümeler (aynı türe mensup hücrelerin birden fazla yapısal şekil gösterdiği kümeler) meydana getirdiği ve normal boyutlarından farklı olarak displazik (organ veya dokularda anormal hücrelerin oluşması) ve hipertrofik (bir doku ya da organın aşırı gelişerek hacim artışının olması) bir görünüme sahip oldukları gözlenmiştir. Hücrelerde temel hücre tabakasından farklı olarak çok tabakalı şekilde büyüyeabilen, rastgele yönelim gösteren ve invaziv (yayılan bir zararlı etki niteliği taşıyan doku oluşumları) olarak büyüyen hücrelerin bu değişimleri sonucu monolayer büyüme özelliğinin aksine üst üste büyümeler devam etmiş ve çok tabakalı hücre topluluğu oluşturmuşlardır. Bunun sonucunda çok katmanlı bir yığılma sergileyerek odaklar oluşturdukları ve bir zaman sonra bu odakların yapışık oldukları yüzeyden ayrıldıkları görülmüştür. Transformasyon sonrasında hücreler aşırı gelişme ve çoğalma göstererek kültürün ilerleyen zamanlarında hipertrofik bir durum görülmüştür. Negatif kontrol grubu ve ACR uygulaması sonrasında muamele gruplarının hücre kültüründe meydana gelen hücresel değişimlere ait örnekler aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18).



**Şekil 4.16** Negatif Kontrol BEAS-2B Hücreleri (20x)

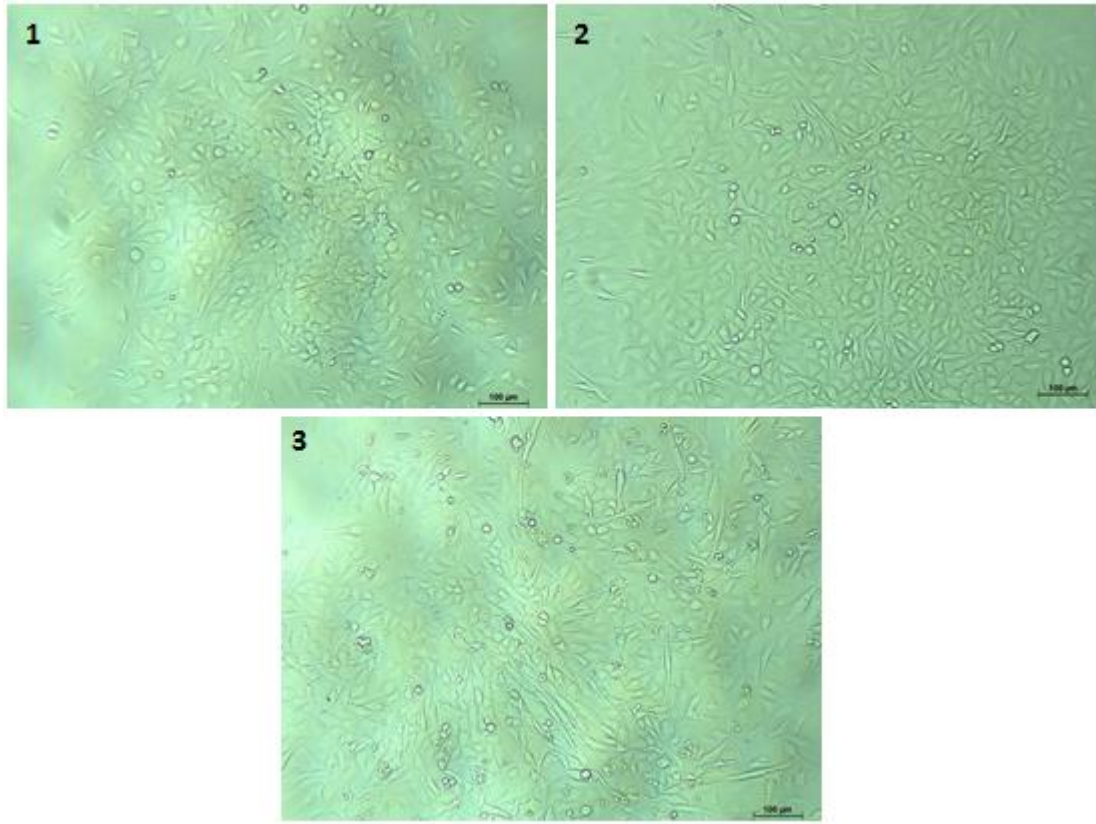


**Şekil 4.17** ACR Uygulaması Sonrası BEAS-2B Hücrelerinde Meydana Gelen Morfolojik Değişimler-1



**Şekil 4.18** ACR Uygulaması Sonrası BEAS-2B Hücrelerinde Meydana Gelen Morfolojik Değişimler-2

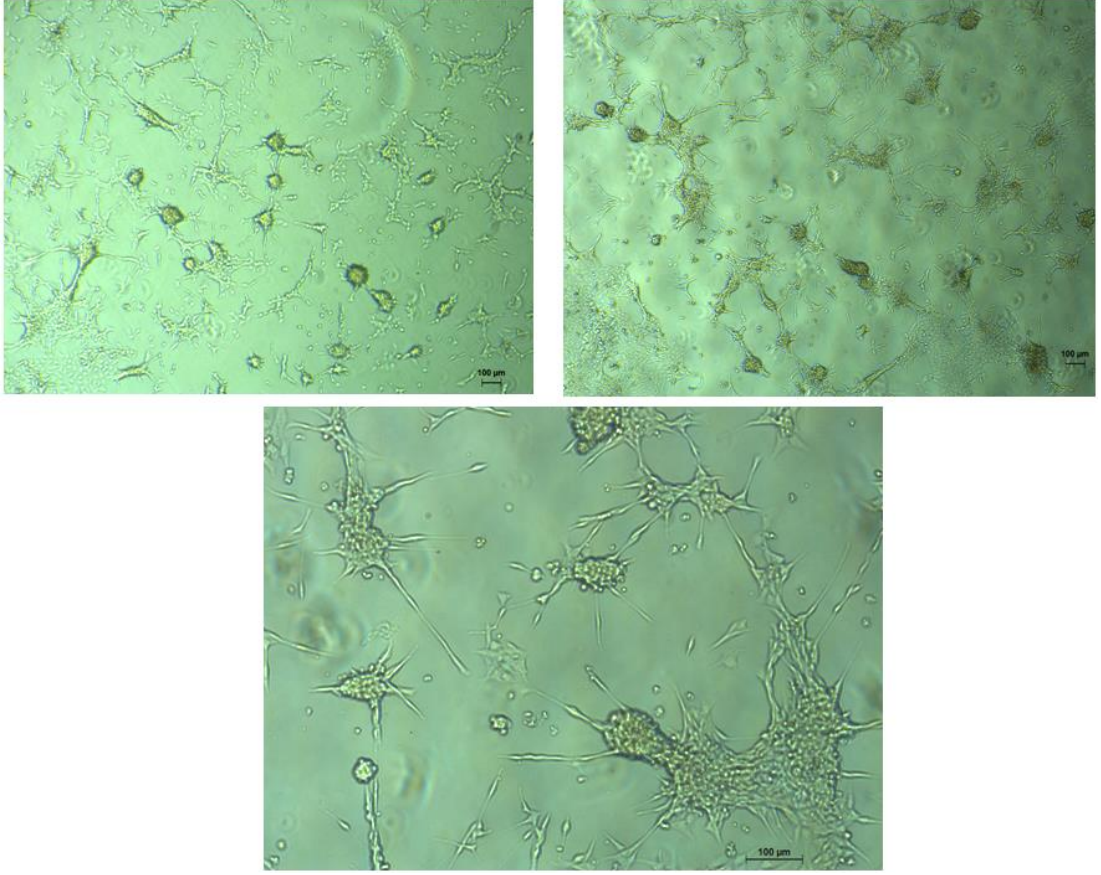
Maruziyet süresi bitiminde hücreler split edilip ilk pasajlama yapıldıktan sonra, ACR ile muamele edilen hücrelerde negatif kontrol ile kıyaslandığında morfolojik değişiklikler meydana geldiği görülmüştür. Hücrelerde gözlenen bu değişikliklere rağmen ilk pasajlama sonrasında odak oluşumu görülmemiştir. İlk pasaj sonrasında, 5 gün içerisinde negatif kontrol, 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlar konfluent hale gelmiştir. 0.5 ve 1 mM'lık dozlarda odak oluşumu gözlenmemiştir. En yüksek dozda ise hücrelerin çoğu ölüp petriye tutunamadıkları için yapışan hücrelerin çoğalması beklenmiştir (Şekil 4.19).



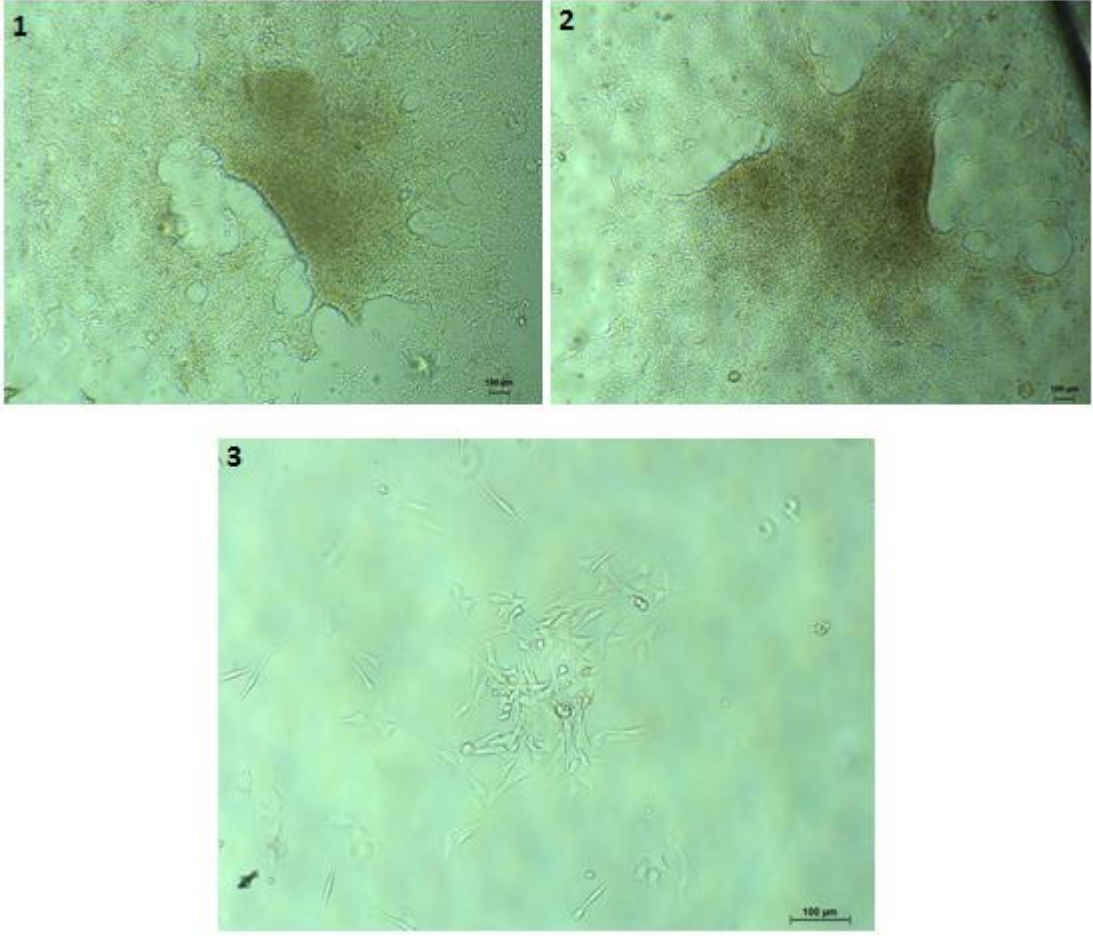
**Şekil 4.19** Transforme Olan BEAS-2B Hücrelerinin İlk Pasajdan Sonraki Morfolojik Görünümleri (10x) 0.5 mM (1), 1 mM (2), 2 mM (3)

Hücreler konfluent olduktan sonra negatif kontrol ve 0.5 ve 1 mM ACR ile muamele edilen hücreler pasajlanmıştır. Hücrelerin ikinci pasajdan sonra morfolojileri daha çok değişmiştir. Gözlem esnasında 0.5 ve 1 mM'lık dozlarda transforme hücre oluşumu görülmüş ve çok sayıda odak oluşumu meydana gelmiştir (Şekil 4.20). Negatif kontrol ve 2 mM'lık konsantrasyon pasajlanarak tekrar ekim yapılmıştır ve hücrelerin çoğalmaları gözlenmiştir (Şekil 4.21). 0.5 ve 1 mM'lık

konsantrasyonlarda ise oluşan birkaç odak split edilerek çoğaltılmak amacıyla ekim yapılmıştır. Daha sonra petriler yıkanıp boyanarak test sonlandırılmıştır.



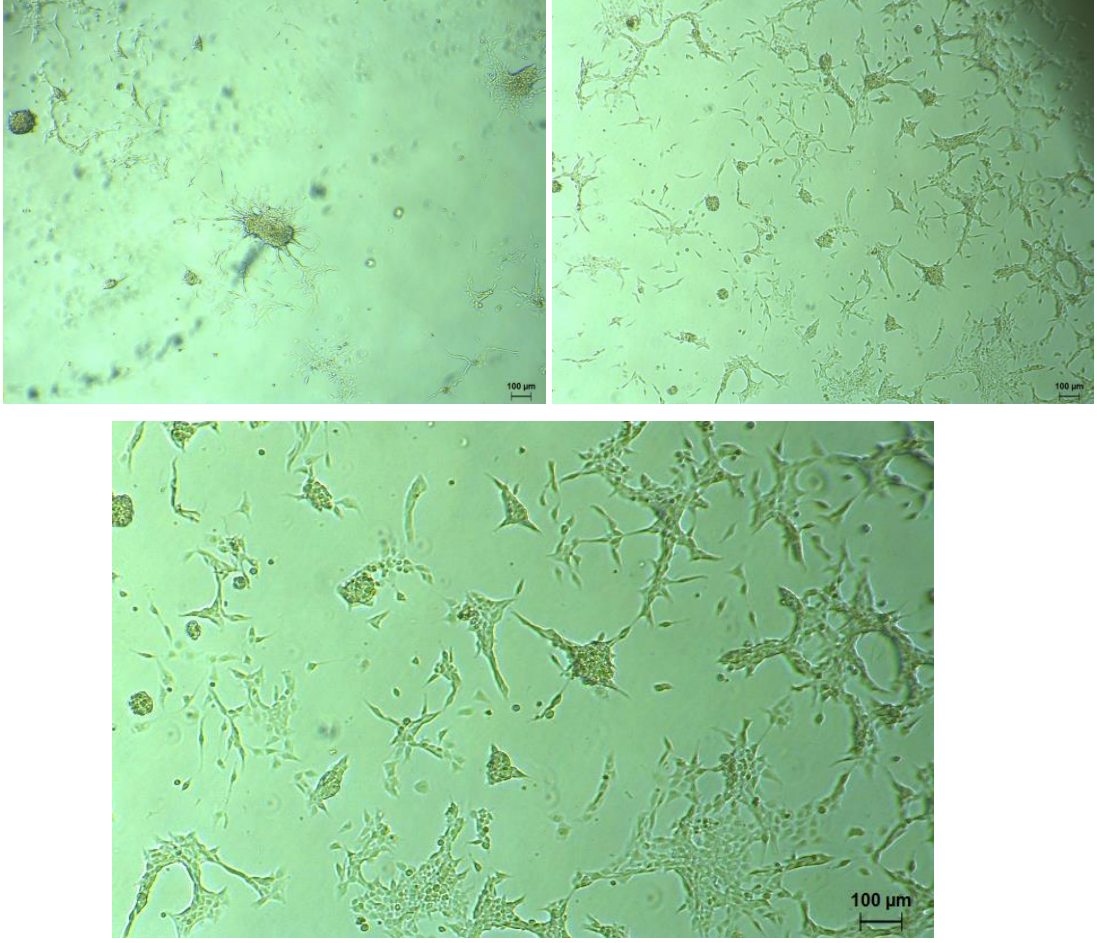
**şekil 4.20** İkinci Pasaj Sonrası Transforme Hücrelerin Oluşturduğu Oluşan Çoklu Koloniler



**Şekil 4.21** Transforme Olan BEAS-2B Hücrelerinin İkinci Pasajdan Sonraki Morfolojik Görünümleri 0.5 mM (1) (4x), 1 mM (2) (4x), 2 mM (10x) (3)

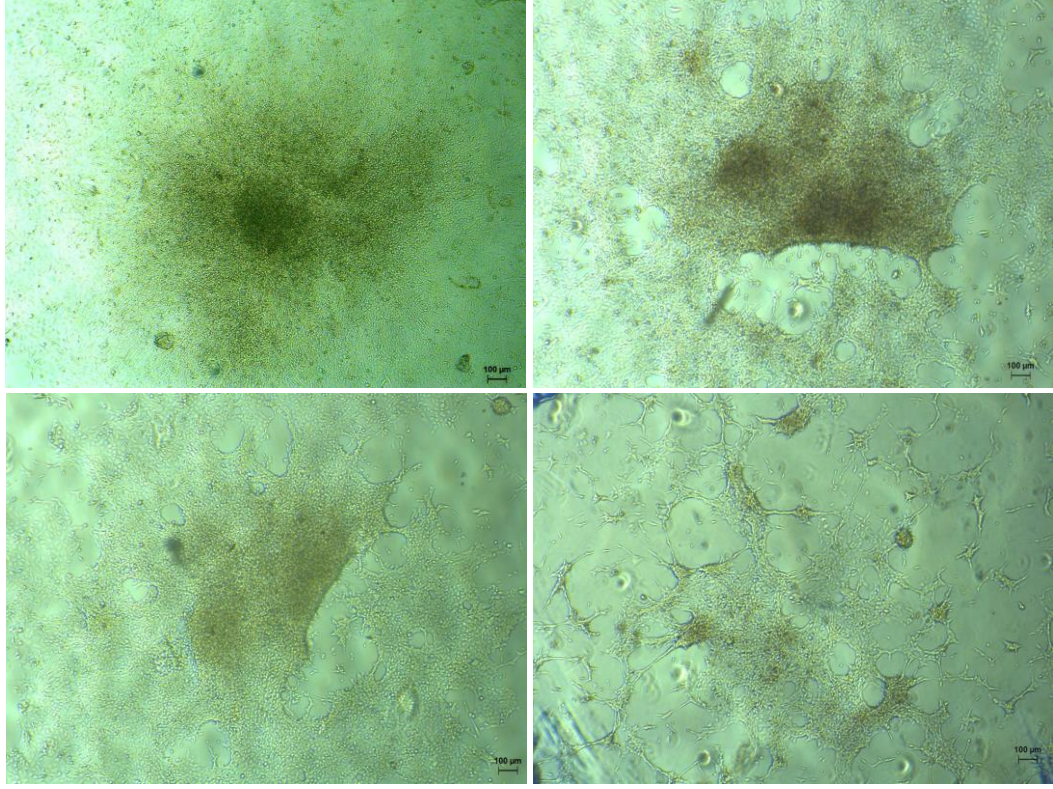
Negatif kontrol hücreleri kültür kabı içerisinde konfluent hale geldikten sonra boyanarak kontrol grubu için test sonlandırılmıştır. Birkaç gün sonra ise 2 mM'lık ACR grubu konfluent hale gelmiş ve tekrar pasajlanmıştır. Hücreler 3. pasajda odak oluşturmaya başlamışlardır (Şekil 4.22). Oluşan odaklardan birkaç tanesi split edilip çoğaltılmak için tekrar ekildikten sonra petriler boyanarak en yüksek konsantrasyon için de test sonlandırılmıştır.



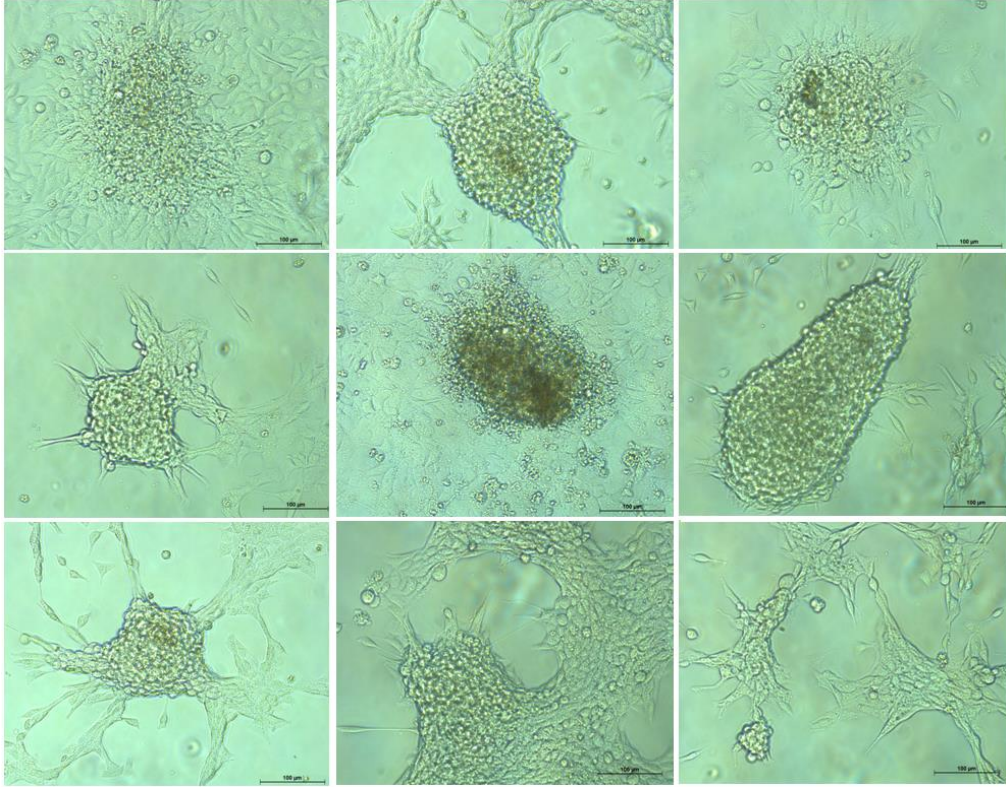


**Şekil 4.22** 2 mM'lık Uygulamada Transforme Olan BEAS-2B Hücrelerinin Üçüncü Pasajdan Sonraki Morfolojik Görünümleri (4x)

ACR'nin muamelesi sonucu oluşan transforme hücrelerin oluşturduğu odaklar toplanarak çoğaltılmak için 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24). Çoğaltıldıktan sonra elde edilen odakların bir kısmı soft agar koloni oluşum testinde (ankoraj-bağımsız büyüme) kullanılmış, bir kısmı ise daha sonraki araştırmalarda kullanılmak amacıyla dondurulmuştur.



**Şekil 4.23** ACR Uygulaması Sonrası Transforme Olan Hücrelerinin Oluşturduğu Odakların Mikroskoptaki Genel Görüntüsü (4x)



**Şekil 4.24** ACR Uygulaması Sonrası Transforme Olan Hücrelerinin Oluşturduğu Odakların Mikroskoptaki Genel Görüntüsü (10x)

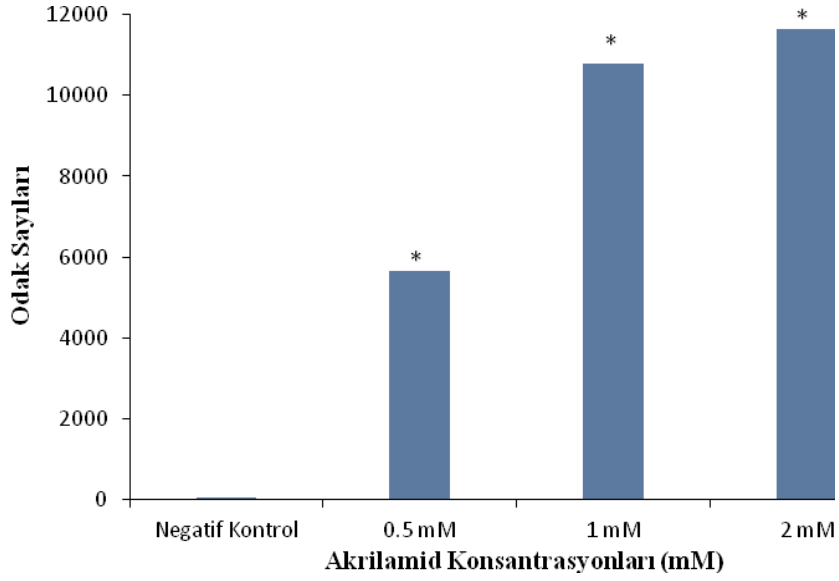
Odakların toplandığı kültür kaplarındaki odak sayılarını belirlemek amacıyla kristal viyole kullanılarak boyama yapılmış ve boyanan odaklar Image-J görüntü analiz yazılımı yardımıyla sayılmıştır. 0.5 mM'lık ACR konsantrasyonu için yapılan tüm transformasyon tekrarlarından sonra elde edilen toplam odak sayısı 5654 olup, petri başına ortalama 565.4 odak/petri olarak bulunmuştur. 1 mM'lık ACR konsantrasyonunda 10797 adet odak tespit edilmiş ve petri başına ortalama 1079.7 odak/petri olarak belirlenmiştir. 2 mM ACR konsantrasyon grubunda ise odak sayısı 11663 olup, petri başına düşen ortalama değer 1166.3 odak/petri olarak bulunmuştur. ACR konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak ACR gruplardaki odak sayılarında artış görülmüştür. Bununla birlikte konsantrasyon artışına bağlı olarak hücrelerin morfolojileri ve davranışları üzerinde de ACR'nin belirgin bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.13 ve 4.14, Şekil 4.25).

**Çizelge 4.13** BEAS-2B Hücrelerinde ACR Maruziyeti Sonrası Transformasyon (Kontak İnhibisyon) Testi ile Belirlenen Odak Sayıları

Petri ve Tekrar sayısı	0.5 mM	1 mM	2 mM
1. Petri - 1	135	673	1230
1. Petri - 2	28	556	97
2. Petri - 1	244	1495	1954
2. Petri - 2	217	1475	1160
3. Petri - 1	74	709	325
3. Petri - 2	1389	1526	1249
4. Petri - 1	796	1628	1264
4. Petri - 2	1091	193	1371
5. Petri - 1	948	1456	1589
5. Petri - 2	732	1086	1424

**Çizelge 4.14** ACR Konsantrasyonlarının BEAS-2B Hücreleri Üzerindeki Etkisi Sonucu Oluşan Odak Sayıları, Odak Frekansları ve İzole Edilen Odak Sayıları

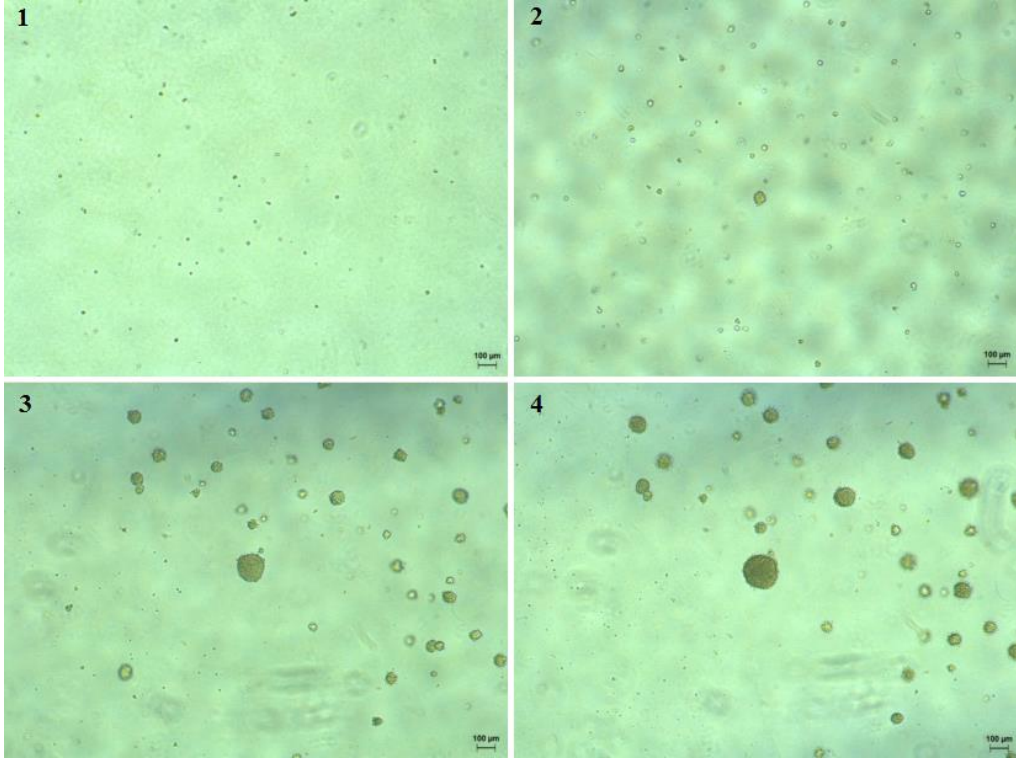
Dozlar	Odak Sayıları	Odak Frekansı (Odak Sayısı / Petri Sayısı)	İzole Edilen Odak Sayısı / Toplam Odak Sayısı
Negatif Kontrol	7	0.7	-
0.5 mM	5654	565.4	6 / 5654
1 mM	10797	1079.7	6 / 10797
2 mM	11663	1166.3	6 / 11663



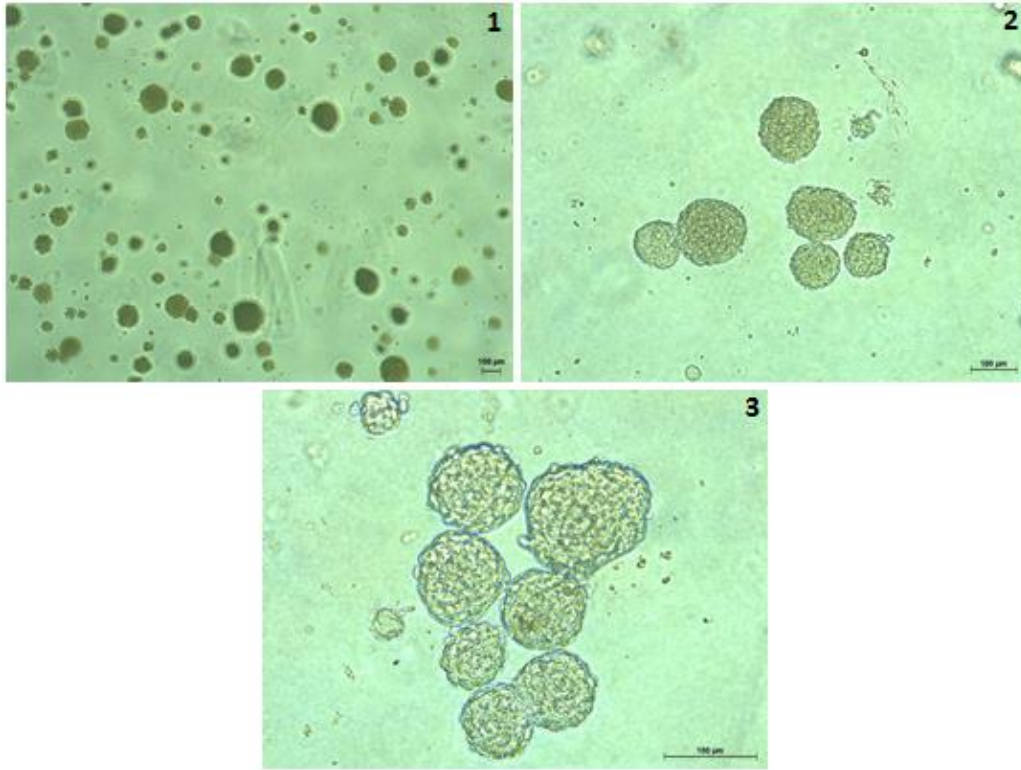
**Şekil 4.25** Transforme Hücrelerin Oluşturduğu Ortalama Odak Sayıları

#### **4.1.5 Soft Agar Koloni Oluşum Testi (Ankraj-Bağımsız Büyüme Testi)**

Transforme olan hücrelerin kanserleşme potansiyellerini belirlemek amacıyla ankraj-bağımsız büyüme özellikleri soft agar testi ile araştırılmıştır. Kontak inhibisyon testi sonunda toplanan, transforme olmuş hücrelerin oluşturduğu odaklar, her bir ACR konsantrasyonundan 4 ayrı odak seçilerek her birinden üçer tekrar olacak şekilde negatif kontrol grubu da dahil olmak üzere 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapılmış ve koloni oluşumu 4 hafta boyunca gözlenmiştir. Kültür kaplarında oluşan koloniler tespit edilerek işaretlenmiştir ve gözleme devam edilmiştir. Dört haftalık sürenin sonuna kadar her gün fotoğflanarak koloni oluşumları ve büyümeleri izlenmiştir (Şekil 4.26 ve 4.27).

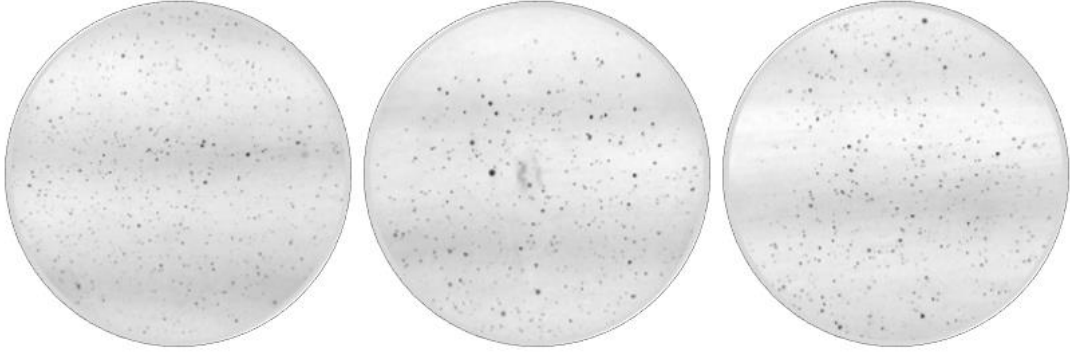


**Şekil 4.26** Transforme BEAS-2B Hücrelerinin Soft Agarda Oluşturduğu Kolonilerin Ortalama 1 Hafta Arayla Büyüme Örneği (4x)

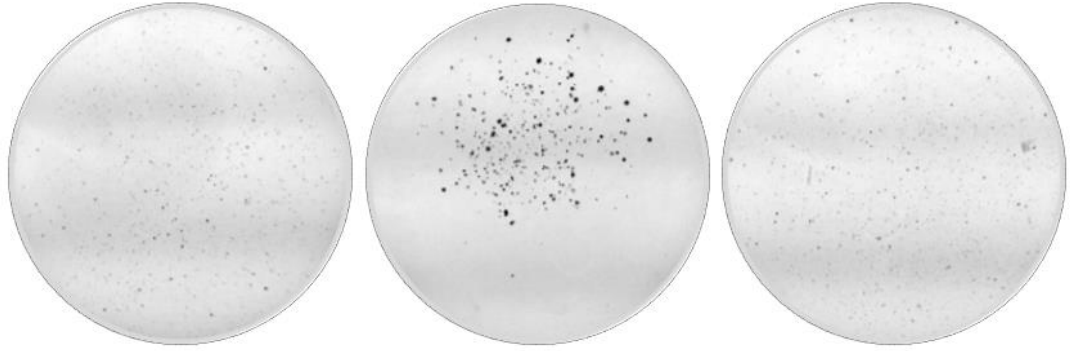


**Şekil 4.27** ACR Uygulaması Sonrası Transforme Hücrelerin Soft Agarda Oluşturduğu Odakların Mikroskoptaki Genel Görüntüsü 4x (1), 10x (2), 20x (3)

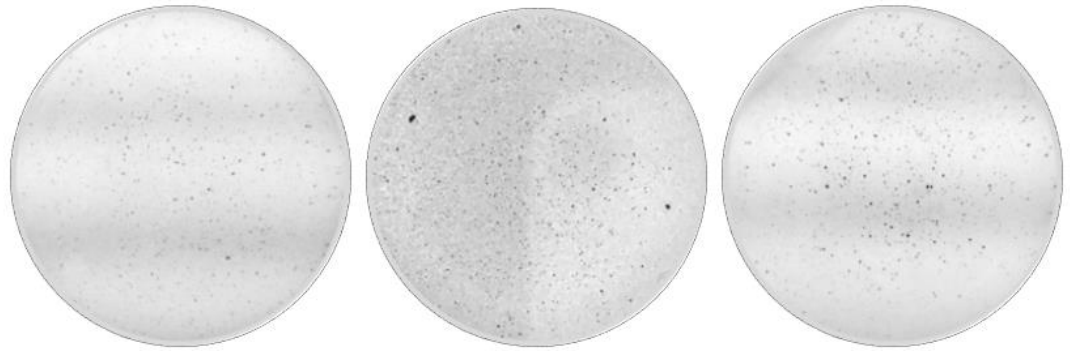
4 haftalık süre sonunda kültür kaplarındaki koloniler NBT ile boyanarak fotoğraflanmıştır. Kolonilerin sayı ve büyüklüklerine göre sayımı Image-J görüntü analiz yazılımı yardımı ile yapılmıştır (Şekil 4.28, 4.29, 4.30 ve 4.31).



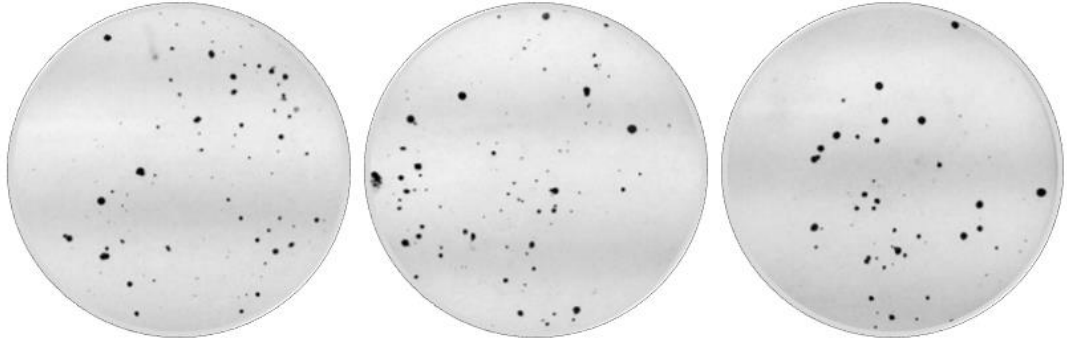
**Şekil 4.28** Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-Kontrol



**Şekil 4.29** Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-0.5 mM



**Şekil 4.30** Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-1 mM



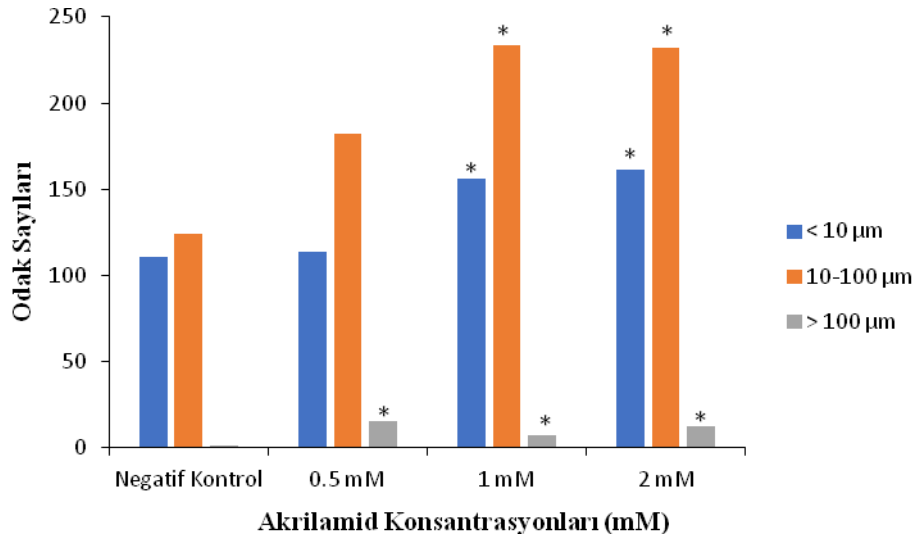
**Şekil 4.31** Ankoraj-Bağımsız Büyüyen (Soft Agar) Koloni Görünümleri-2 mM

Soft agar test ortamı, sağlıklı hücrelerin çoğalamadıkları, fakat transformasyon sonucu kanserleşmenin belirlenebildiği hücrelerin çoğalabildikleri bir ortamdır. Verilere göre en yüksek koloni sayısı 2 mM'lık dozda saptanmıştır. Sonuçlara göre 72 saatlik ACR uygulaması sonrasında, transformasyona uğrayan ve soft agarda büyüyen kolonilerin sayısında doza bağlı bir şekilde artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.15, Şekil 4.32).

0.5 mM'lık doz maruziyetine sahip koloniler, negatif kontroldekilerle karşılaştırıldığında  $<10 \mu\text{m}$  (hücre çapının uzunluğu) ve  $10-100 \mu\text{m}$  olan kolonilerde istatistiksel olarak aralarında önemli bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).  $>100 \mu\text{m}$  olan kolonilerde ise istatistiksel açıdan aralarındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). 1 mM ve 2 mM'lık uygulamalarda ise soft agarda büyüyen transforme hücrelerin oluşturduğu  $<10 \mu\text{m}$ ,  $10-100 \mu\text{m}$  ve  $>100 \mu\text{m}$  olan kolonilerde negatif kontrole göre kıyaslandığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Çizelge 4.15, Şekil 4.32). Bu sonuçlar; ACR'nin normal BEAS-2B hücrelerinde *in vitro* transformasyona yol açmasına ek olarak, organizmada tümör oluşumu ve kanserleşme potansiyelinin de olabileceğini göstermektedir.

**Çizelge 4.15** ACR Uygulaması Sonrası BEAS-2B Hücrelerinin Büyüklüklerine Göre Ankoraj-Bağımsız Büyüme (Soft Agar) Koloni Sayıları

Akrilamid Konsantrasyonları	Soft Agarda Büyüyen Koloniler		
	$< 10 \mu\text{m}$	$10-100 \mu\text{m}$	$> 100 \mu\text{m}$
Negatif Kontrol	$111 \pm 15.31$	$124.33 \pm 36.76$	$1.33 \pm 0.67$
0.5 mM	$113.83 \pm 9.37$	$182,58 \pm 14.3$	$15.33 \pm 5.07$
1 mM	$156.33 \pm 29.04$	$233.58 \pm 55.89$	$7.58 \pm 2.17$
2 mM	$161.75 \pm 29.64$	$231.83 \pm 10.95$	$12.5 \pm 0.8$



Şekil 4.32 Soft Agar Testi ACR Konsantrasyonlarına Göre Ortalama Koloni Sayıları



## 4.2 TARTIŞMA

ACR'nin hem gıdalarla tüketimi hem de çeşitli alanlardaki kullanımı son yıllarda giderek artmaktadır. ACR dokularda birikim gösterebildiği için insan sağlığı açısından potansiyel bir risk haline gelmiştir. Bu nedenle ACR'nin insanlar üzerindeki olası sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkilerinin değerlendirilmesi büyük bir öneme sahiptir. ACR ile ilgili çeşitli araştırmalarda farklı sonuçların bulunduğu göze çarpmaktadır. Bazı çalışmalarda kanser oluşumu ile pozitif ilişki kurulurken, bazılarında ise kanser oluşumu için ACR'nin vücuda alım şeklinin önemli olduğu şeklindeki görüşler desteklenmiştir. Deney hayvanları üzerinde yapılan karsinojenik etki çalışmalarında da çeşitli dokularda karsinojenik etkilerinin olduğu ortaya konulmasına rağmen, insanlar üzerine yapılan çalışmalarda oldukça farklı sonuçlara ulaşıldığı görülmektedir. Bazı çalışmalarda ise, beslenmeyle ACR tüketiminin toksisitede bir artış meydana getirmediği bildirilmektedir (Besaratina ve Pfeifer, 2007; Olesen ve ark., 2008; Mucci ve Adami, 2009; Boyacı ve Cengiz, 2012).

ACR'nin karsinojenitesiyle ilgili çalışmaların çoğu kemirgenlerde yapılmıştır ve insanlardaki potansiyel etkileri konusundaki bilgilerimizin çoğu, bu çalışmalardan elde edilen verilere dayanmaktadır. ACR ve kanser arasındaki ilişki için epidemiyolojik kanıtlar da belirsizdir. ACR'nin beslenme yoluyla alınması durumunda bazı kanser türlerinin oluşumunu tetikleyebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Wilson ve ark., 2008; Hogervorst ve ark., 2008b; Larsson ve ark., 2009c); fakat ACR maruziyeti ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir.

ACR alımı ve akciğer kanseri riski arasındaki ilişki tam olarak bilinmediği için, insan akciğer epitel hücre hattı kullanılmış ve ACR'nin bu hücre hattındaki olası *in vitro* sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkileri çeşitli yöntemler kullanılarak ilk kez bu çalışma ile araştırılmıştır. ACR'nin bronşiyal epitel hücrelerindeki olası etkilerinin belirlenmesi ile henüz tam olarak araştırılmamış olan bu konuya önemli bir katkı sağlanacaktır.

ACR; ağız, deri ve solunum başta olmak üzere vücuda çeşitli yollarla alınan ve vücuda dağılarak az ya da çok zararları olabilen bir ksenobiyotiktir (Dearfield ve

ark., 1995). ACR'nin ilk başta mesleki maruziyetten dolayı vücuda alındığı varsayıldığı için sadece bu tür çalışmalarla araştırılmaya çalışılmıştır. Daha sonra kozmetik ürünlerdeki kullanımı sayesinde ksenobiyotik olarak vücuda alındığı tartışılmıştır (Fuhr ve ark., 2006; Mucci ve ark., 2008). Yiyeceklerde uygulanan çeşitli pişirilme şekilleri aracılığıyla oral yoldan alınması ve uzun süreçte insanların ACR'ye maruz kalmaları ise asıl tehdit olarak görülmüştür (Biederman ve ark., 2003). Ayrıca, insanlarda ACR'nin vücuda alınması için diğer bir kaynak da sigaradır. Yapılan çalışmalar, ACR'nin sigara dumanı sayesinde akciğerler yoluyla vücuda yüksek oranda alındığını göstermektedir. Sigara içenlerde sık rastlanan akciğer kanserinin esas sebebinin, sigara ile alınan ACR olabileceğini ileri süren çalışmalar da mevcuttur (Bergmark, 1997; Schettgen ve ark., 2003). Ayrıca ksenobiyotikler, metabolize olduklarında zararlı metabolitler oluşturmaları yönünden de büyük öneme sahiptirler. ACR hücre içine alındığında kendinden daha aktif bir metaboliti olan GA'ya dönüşmektedir ve GA'nın genotoksik etkiyi artırdığını ileri süren çalışmalar mevcuttur (Fuhr ve ark., 2006; Mucci ve ark., 2008).

#### **4.2.1 Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite**

Çeşitli faktörler, farklı derecelerde etki ederek hücrelerde sitotoksisiteye sebep olabilirler. Bu tür faktörlerin hücre içindeki toksik veya toksik olmayan etkilerini anlamak önemlidir. Sitotoksisite, etkisi araştırılan bir maddenin doz ve maruziyet süresine göre hücrelerde oluşturdukları farklı derecelerdeki zararlarıdır. Hücreler, sitotoksik etkiye sahip bir maddeye maruz kalırlarsa apoptoz, nekroz ve otofaji gibi olaylar sebebiyle ölebilir. Buna ek olarak, hücre gelişiminin durdurulması veya engellenmesi nedeniyle de proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi ve ark., 2009). Deneysel olarak kimyasal etkenlere maruz bırakılan hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi sitotoksisite çalışmalarının önemli bir basamağıdır ve çalışma sonunda canlı ve ölü hücrelerin miktarı belirlenebilmektedir (Niles ve ark., 2007). Hücre canlılığını belirlemede kullanılan *in vitro* sitotoksisite testleri, etken maddeleri değerlendirmek veya bazı bileşiklerin sitotoksisitesini araştırmak için uygulanan ölçüm yöntemleridir. Farklı uygulama yollarına sahip kolorimetrik, enzimatik, luminometrik ilkelere dayalı birçok hücre canlılığı testi bulunmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017).

Çalışmamızda, hücre canlılığı ve sitotoksitenin belirlenmesine yardımcı olan kolorimetrik test grubundaki MTT testi uygulanmıştır. Çalışmamızda, BEAS-2B hücreleri 24, 48 ve 72 saatliğine, farklı ACR konsantrasyonları ile muamele edildikten sonra, MTT testi sonucu elde edilen hücre canlılığı verilerinin, konsantrasyon ve uygulama süresi arttıkça düştüğü gözlemlenmiştir. Sitotoksitenin verilerine bakıldığında ise, ACR'nin BEAS-2B hücreleri üzerinde doz arttıkça sitotoksiteni artırdığı ve giderek artan bir sitotoksik etki meydana getirdiği görülmüştür. ACR'nin BEAS-2B hücreleri için IC50 değerleri ise 24 saatlik muamele için 6.6 mM, 48 saatlik muamele için 1.97 mM ve 72 saatlik muamele için 1.33 mM olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar ACR'nin akciğer epitel hücrelerinde sitotoksik potansiyeline işaret etmektedir.

ACR'nin, elektron eksikliğinden kaynaklı hücre ölümüne sebep olabileceği bildirilmiştir. ACR, özellikle DNA ve sistein amino asidi bakımından zengin olan proteinler gibi makromoleküllerin elektronca zengin parçalarıyla reaksiyona girebilmektedir (LoPachin ve Barber, 2006). Bunun yanı sıra hücre ölümünün diğer bir sebebi de ACR'nin hücre bölünmesi esnasında iğ ipliklerinin oluşumundan sorumlu olan kinesin proteini üzerindeki etkisinden dolayı proliferasyonu inhibe etmesi ve hücrenin çoğalmasını engellemesidir (Exon, 2006).

ACR uygulamasından sonra meydana gelen anti-proliferatif etkinin, ACR'nin DNA'ya zarar vermesinden kaynaklı olduğu ileri sürülmüştür. DNA hasarından sonra p21, p27 ve p53 (hasarla ilişkili proteinler) aktif hale getirilmektedir ve DNA onarımı için G0/G1 fazında proliferasyon durdurulmaktadır. Böylece, ACR maruziyetinden sonra DNA hasarı ile ilişkili olan proteinlerin ve kontrol noktası proteinlerinin (Cdk2 ve siklin D1 gibi) miktarlarının arttığı görülmüştür (Chen ve ark., 2010).

İçme suyuyla 0, 2.5, 10, ve 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün konsantrasyonlarında ACR'ye 14 gün maruz bırakılan erkek F344 sıçanlarının üreme ve Leydig hücreleri üzerinde ACR'nin etkileri *in vivo* olarak değerlendirilmiş ve en yüksek konsantrasyonda testislerde bazı genlerin ekspresyonları, serum hormonları, hücre proliferasyonu ve histopatolojide önemli değişiklikler görülmüştür. ACR'nin testosteron düzeylerinde azalmaya, germ hücreleri üzerinde histopatolojik

değişikliklere, Leydig hücrelerinde canlılığın azalmasına ve mRNA ekspresyon değişikliklerine sebep olduğu rapor edilmiştir (Camacho ve ark., 2012).

Doku mühendisliği alanında sıklıkla kullanılan N-izopropil ACR ve Poli N-izopropil ACR kaplı yüzeylerin sitotoksitesini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, sığır aort endotel hücreleri (BAECs), maymun böbrek epitel hücreleri (Veros), sıçan aort düz kas hücreleri (SMCs) ve fibroblastlar (3T3s) kullanılarak 24 ve 48 saatlik maruziyetlerde N-izopropil ACR ve Poli N-izopropil ACR monomerlerinin sitotoksitesi, canlı hücrelerde mitokondriyal aktiviteyi test eden bir yöntem olan MTS testi (3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum testi) kullanılarak test edilmiştir. Test edilecek monomerler doku kültürü ortamında 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda çözdürülerek MTS testinde hücrelere *in vitro* olarak uygulanmıştır. Test edilen tüm hücre tiplerinde, monomer çözelti varlığında 24 ve 48 saatlik hücre kültürlerinden sonra hücre canlılığında azalmalar olduğu rapor edilmiştir. 3T3 hücrelerinin N-izopropil ACR'nin toksik etkilerine en fazla direnç gösteren hücre tipi olduğu ve 24 saat maruziyetten sonra hücre canlılığının %80'in biraz üzerinde (5 mg/mL konsantrasyonda) olduğu bildirilmiştir. Ancak 48 saat sonra canlılık %70'in altına düşmüştür. Diğer hücre tiplerinde de, 24 saat maruziyetten sonra hücre canlılığının önemli ölçüde düştüğü ve 48 saatlik maruziyetten sonra daha da azaldığı belirtilmiştir. Endotel (BAECs) ve epitel (Veros) hücreler monomere en duyarlıyken, fibroblastların en dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, çalışmada bu iki monomer test edilen tüm hücre tipleri için sitotoksik olmasına rağmen, uygulanan konsantrasyonlarda hücreler için toksik etkisinin hücre tipine bağlı olduğu belirtilmiştir (Cooperstein ve Canavan, 2013).

Liu ve ark., (2015) yaptıkları bir çalışmada, ACR'nin ölümsüzleştirilmiş bir fare mikrogliya hücre hattı olan BV2'de redoksa bağımlı apoptotik ve enflamatuar etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. ACR'nin BV2 hücrelerinde hücre canlılığı ve apoptoz üzerindeki etkisi MTT testi ile *in vitro* olarak incelenmiştir. Hücreler 24 saat boyunca ACR'nin değişik konsantrasyonlarına (0-10 mM) maruz bırakılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, BV2 hücrelerinin ACR'ye maruz kalması durumunda hücre canlılığında azalma meydana geldiği ve konsantrasyona bağlı olarak mitokondriyal disfonksiyon sebebiyle apoptozun indüklendiği rapor

edilmiştir. Ayrıca, BV2 mikroglia hücre hattı için IC50 değeri 2 ila 5 mM dozlar arasında bulunmuştur. Bu değer bizim çalışmamızda elde ettiğimiz IC50 değerleri ile benzerlik göstermektedir.

İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı (A549) üzerinde ACR'nin değişik konsantrasyonlarının (0.5-20 mM) sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin *in vitro* olarak incelendiği başka bir çalışmada, MTT test sonuçlarına göre, A549 hücre canlılığının artan ACR konsantrasyonları ile ters orantılı olarak azaldığı rapor edilmiştir ve bu hücre hattı için IC50 değeri, 24 saat boyunca 4.6 mM olarak bulunmuştur. Anneksin-V testi sonuçları, ACR'nin A549 hücrelerinin %64'ünde apoptozu indüklediği belirtilmiştir. TEM ve konfokal mikroskopi analizleri ise, hücrelerin apoptoza özgü morfolojik özellikler (fragmantasyonlar, nükleer yoğunlaşmalar, membran kabarcıkları ve hücre iskeleti yırtılması gibi) gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar ACR'nin A549 hücreleri üzerinde sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik etkilere sebep olduğunu göstermiştir (Kaçar ve ark., 2017).

ACR'nin hücrelerdeki toksisitesinin temel nedenlerinden birinin, reaktif oksijen türleri (ROS) yani oksidatif stres olduğu bildirilmiştir (Hamdy ve ark., 2011; Yılmaz ve ark., 2017). İnflamasyon, kanser, diyabet, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar başta olmak üzere birçok kronik hastalığın nedeni oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir (Jin ve ark., 2012; Mojtahedzadeh ve ark., 2014). Normalde serbest radikaller sürekli *in vivo* şekilde üretilmektedirler. Bu serbest radikallerin vücuttaki olumsuz etkilerini nötralize etmek amacıyla süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz (GST), katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanların vücut için koruyucu etkileri bulunmaktadır (Yousef ve El-Demerdash, 2006). Biyolojik olarak oksidan-antioksidan oranında dengesizlik oluştuğunda, oksidatif stres meydana gelebilmektedir (Jin ve ark., 2012; Mojtahedzadeh ve ark., 2014). Oksidan özellik gösteren maddelerin toksisite mekanizmaları, antioksidan savunma sistemlerindeki bozulmadan ve oksidatif stresten kaynaklanmaktadır (Veena ve ark., 2010). ACR, elektron eksikliğine sahip bir elektrofildir. OH<sup>-</sup>, SH<sup>-</sup> NH<sub>2</sub><sup>-</sup> fonksiyonel grupları gibi elektron yoğunluğuna sahip moleküller olan nükleofillere karşı yüksek bir afiniteye sahiptir (LoPachin ve Barber, 2006). Bu nedenle ACR, bu fonksiyonel grupları bünyesinde bulduran herhangi bir moleküler yapı ve protein ile reaksiyona girmeye yatkın hale gelir ve ROS

oluşturur. Böylece oksidatif strese yol açar (Yousef ve El-Demerdash, 2006; Mehri ve ark., 2012). ACR uygulaması sonrasında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA ve ROS seviyelerinde artış görülmüştür (Kaçar ve ark., 2017). Antioksidanlarla ilgili genlerin aktifleştirilmesinden sorumlu bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2, aktif olarak GSH ve diğer antioksidanların sentezlenmesini sağlamaktadır. Nrf-2, Keap-1 proteinine (Nrf-2 aktivasyonunu inhibe eder) bağlı olarak sitoplazmada bulunur. ACR ile hücre içinde oksidatif stres indüklendiğinde, Nrf-2 proteini salınır ve antioksidanla ilişkili genlerin ekspresyonunun başlatıldığı çekirdeğe translokasyonu gerçekleştirir. Bu translokasyon, oksidatif strese karşı hücreleri koruyan bir savunma mekanizmasıdır (Zhao ve ark., 2017). ACR konsantrasyonunun artışıyla doğru orantılı olarak Nrf-2 proteininin oranında da artış gözlemlenmiştir (Kaçar ve ark., 2017).

ACR'nin insan servikal kanser hücrelerinin (HeLa) çoğalması ve enzimler üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, ACR'nin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksitesisi ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi yaygın olarak kullanılan bir tarama yöntemi olan MTT testi ile *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. HeLa hücre kültürleri, 24 saat boyunca artan ACR konsantrasyonlarına (1-6 mg/ml) maruz bırakılmıştır. 24 saat sonra HeLa hücre hattının 2 mg/ml ACR'den başlayan konsantrasyonlarda zayıf canlılık gösterdiği bildirilmiştir. ACR dozları 1'den 6 mg/ml'ye yükseldikçe, HeLa hücrelerinin 24 saatte hücre canlılığının doza bağlı olarak %76'dan %30'a kadar düştüğü gözlemlenmiştir. Bu çalışmada ACR'nin hücre içindeki Malondialdehit (MDA), GSH ve GST aktivitesi seviyelerinin etkileri de araştırılmıştır. Sonuçlara göre, ACR'nin MDA seviyesini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, GSH seviyesinde ve GST aktivitesinde azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir. ACR'nin; proliferasyonun azalmasını, Kaspaz-3 enzim aktivitesinin ve apoptotik hücre ölümünün indüklenmesini sağladığı da belirtilmiştir. Bunun sonucu olarak ACR ile muamele edilen canlı HeLa hücrelerinin sayısında azalma olduğu rapor edilmiştir (Mallepogu ve ark., 2017).

Oksidatif stresin ACR ve metaboliti olan GA tarafından indüklendiği fare Leydig (TM3) ve Sertoli (TM4) hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini araştırmak için yapılan *in vitro* bir çalışmada, TM3 ve TM4 hücreleri 24 saatliğine ACR (10 µM ve 1 mM) ve GA'ya (1 µM ve 0.5 mM) maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığının MTT testi kullanılarak değerlendirildiği bu çalışmada, maruz kalma süresinin ardından

Leydig ve Sertoli hücrelerinin hücre canlılığında azalmanın meydana geldiği bildirilmiştir. Leydig ve Sertoli hücrelerinde kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, Leydig hücre canlılığını anlamlı derecede düşüren dozların en yüksek ACR ve GA dozunun olduğu; öte yandan, Sertoli hücre canlılığında anlamlı azalmaya neden olan dozların ise en yüksek ACR ve her iki GA dozunun olduğu belirtilmiştir ( $p<0.01$ ). Yapılan bu çalışmanın sonuçlarında görülen hücre canlılığındaki düşüş sebebiyle, hücre canlılığı sonuçları bakımından bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Ayrıca, ACR'ye maruz kalma süresinin ardından Leydig ve Sertoli hücreleri üzerinde laktat dehidrojenaz aktivitesi, lipid peroksidasyonu, hidrojen peroksit seviyeleri, apoptoz/nekroz oranı ve apoptotik genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin ölçümleri de değerlendirilmiştir. ACR ve GA maruziyetinin her iki hücre tipinde de aşırı oksidatif stres ve apoptoz artışına neden olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Leydig ve Sertoli hücrelerinde meydana gelen oksidatif stresin ve indüklenen apoptozun ACR ve GA kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (Yılmaz ve ark., 2017).

ACR'nin fare NIH/3T3 fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin ve oluşan etki sonucu meydana gelen ölümün apoptozdan mı yoksa nekrozdan mı kaynaklandığını araştırmak için yapılan *in vitro* bir çalışmada, ilk önce 0,5 ila 20 mM arasında değişen 22 farklı akrilamid konsantrasyonu hazırlanarak MTT testi uygulanmış ve ACR'nin IC50 dozu hesaplanmıştır. Daha sonra, belirlenen IC50 dozu ile 24 saat muamele edilen NIH/3T3 hücrelerine Annexin-V ve kaspaz 3/7 deneyleri uygulanmıştır. Son olarak, morfolojik değişiklikleri gözlemlemek için de konfokal mikroskopi ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizi gerçekleştirilmiştir. MTT sonuçlarına göre, ACR'nin IC50 değerinin 6.73 mM olarak bulunmuş ve ACR muamelesinin NIH/3T3 hücrelerinin canlılığını doza bağlı olarak azalttığını belirtilmiştir. Hücre canlılığındaki düşüş bakımından ilk önemli farkın 3 mM ACR muamelesinden sonra gözlemlendiği rapor edilmiştir ( $p<0.01$ ). Bu doz 4 mM'ye yükseldiğinde, anlamlılık seviyesinin daha da arttığı gözlemlenmiştir ( $p<0.001$ ). 3T3 hücreleri için IC50 ACR konsantrasyonu 6.73 mM olarak bulunmuştur Annexin-V ve kaspaz 3/7 deneylerine dayanarak da NIH/3T3 hücrelerinin ölüm nedeninin apoptoz olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ACR uygulamasına maruz bırakılmış hücrelerin kaspaz 3/7 aktivitelerinin, muamele

edilmemiş NIH/3T3 hücrelerine göre üç kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. TEM analizinde membran kabarması ve nükleer kromatin kümelenmesi gözlemlenmiştir. Sitoplazmik vakuolizasyon ve konfokal mikroskopide apoptotik cisimler, nükleer parçalanmalar ve yoğunlaşmalar görüldüğü rapor edilmiştir (Şahintürk ve ark., 2018).

Seçer Çelik ve ark., (2018)'nin yaptığı bir çalışmada, ACR'nin HEK293 hücreleri (insan embriyonik böbrek hücre hattı) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. ACR'nin sitotoksikite ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi ise *in vitro* olarak MTT testi ile ölçülmüştür. ACR'nin 24, 48 ve 72 saat süreyle çeşitli konsantrasyonlarda (0.001, 0.01, 0.1, 1, 2 M) maruziyetinden sonra hücre canlılığında önemli ölçüde azalma gösterdiği bildirilmiş ve HEK293 hücre hattı üzerinde ACR'nin sitotoksik etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada ACR'nin oksidatif stres üzerindeki etkisi GSH, SOD ve katalaz gibi oksidatif stres belirteçleri açısından araştırılmıştır. ACR metabolizmasının oluşturduğu radikal oksijen türlerinin, hücrelerde oksidatif stresin artmasına neden olduğu ve SOD miktarını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. GSH miktarının hidrojen peroksit miktarındaki artışla doğru orantılı olarak azaldığı ve oksitlenmiş GSH (GSSG) seviyesinin ise düştüğü belirtilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak ACR'nin oksidatif stresi arttırıcı etkisinin olduğu rapor edilmiştir.

Hücre tipi ve hücre canlılığı verilerimiz ile benzer sonuçlar gösteren diğer bir çalışmada, sitotoksik, oksidatif, apoptotik ve morfometrik analizler kullanarak ACR'nin BEAS-2B hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Uygulanan MTT testinde BEAS-2B hücrelerine ACR'nin 0 ila 50 mM'lık konsantrasyonlarının 24 saatlik maruziyette uygulanması sonucu elde edilen IC50 değerinin 2 mM olduğu belirtilmiştir. Bu değer şimdiki kadar bildirilen en küçük ACR IC50 değeri olduğundan dolayı, bulunan sonucu akciğer hücrelerinin ACR'ye çok duyarlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır. ACR'nin bu hücre hattı üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. MTT testinde, BEAS-2B hücrelerindeki canlılığın doza bağlı olarak düştüğünü gözlemleyen araştırmacılar, 1 mM dozda hücre canlılığının %87, 2 mM ACR dozunda yaklaşık %50, 3 mM dozda canlılığın %16, 4-5-6-8 ve 10 mM'lık dozlar arasında canlılığın %11'den küçük, daha yüksek ACR dozlarında ise (20 ve 50 mM) canlılığın gözlenmediğini rapor etmişlerdir. Bu



çalışmada BEAS-2B hücreleri üzerinde hücrel oksidatif stres Annexin-V ve kaspaz 3/7 için akış sitometrisi analizi yapılarak, Bax, Bcl-2 ve Nrf-2 proteinleri ise immünohistokimya ile değerlendirilmiştir. Son olarak, ACR kaynaklı hücrel morfolojik değişiklikler, konfokal ve TEM mikroskopları altında gözlemlenmiştir. ACR uygulamasından sonra oksidatif stresin doza bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Annexin-V etiketli apoptotik hücrelerin ve kaspaz 3/7 aktivitesinin, ACR ile muamele edilmiş hücrelerde muamele edilmemiş hücrelerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal incelemelerde, Bcl-2 (apoptotik süreçte hücre içerisine olan kalsiyum girişini por oluşumunu sağlayarak düzenleyen ve apoptozu inhibe eden antiapoptotik bir protein)'de belirgin bir azalma görülürken, Bax (p53 aracılığıyla indüklenen ve bulunduğu hücrenin apoptozu gidişini hızlandıran protein) ve Nrf-2 (oksidatif stresin etkilerini azaltmak için antioksidan cevap genlerinin çalışmasını artıran ve bir antioksidan ajanı olan glutasyonu aktive eden protein)'de artışlar olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, ACR'nin BEAS-2B hücrelerinde anti-proliferatif aktivite gösterdiği, canlılığı azalttığı, apoptoz ve oksidatif stresi indüklediği ve morfolojik değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (Kaçar ve ark., 2019). Aynı hücre hattı kullanılarak yapılmış olan ve benzer sonuçlara sahip bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da, ACR maruziyetine bağlı olarak hücre canlılığında düşüş görülmesi, ACR'nin BEAS-2B hücrelerinin canlılığı üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu hipotezini desteklemektedir.

ACR'nin insan kolon adenokarsinom hücre hattı (Caco-2) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla uygulanan *in vitro* bir çalışmada, hücre canlılığı deneylerinde IC50 değerini belirlemek, DNA hasarının yanı sıra apoptozu yol açan oksidatif stresi ve mikroskopik yöntemler kullanılarak hücrelerdeki morfolojik değişiklikleri değerlendirmek amaçlanmıştır. Hücre canlılığı hem MTT hem de PrestoBlue testleriyle ölçülmüştür. Hücrelerin 24, 48 ve 72 saatlik ACR maruziyeti (0.2-50 mM) sonrasında, hem MTT hem de PrestoBlue testlerinin sonuçlarına göre hücre canlılığında zamana ve doza bağlı bir düşüş görüldüğünü rapor etmişlerdir. Her iki testte de negatif kontrol ile karşılaştırıldığında farklı ACR konsantrasyonlarının Caco-2 hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Her iki testte de maruziyetler sonrasında sitotoksitede önemli bir artış görüldüğü bildirilmiştir. PrestoBlue testine kıyasla MTT testinde daha

yüksek bir sitotoksik aktivite elde edildiği de bildirilmiştir. 24 saatlik maruziyetten sonra MTT testinde IC50 değeri 5.9 mM ve PrestoBlue testine ise 8.9 mM olarak bulunmuştur. ACR'nin Caco-2 hücrelerindeki sitotoksisiteyi indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca ACR'nin oksidatif DNA hasarına, konsantrasyona bağlı olarak mitokondriyal membran potansiyelinde düşüşe ve apoptoz indüksiyonunu sağlayan ROS üretimine neden olduğu da gözlenmiştir. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında, ACR'nin Caco-2 hücreleri üzerinde pro-oksidatif etkiye sahip olduğu ve bunun apoptotik hücre ölümüne yol açtığı rapor edilmiştir (Nowak ve ark., 2020).

Görüldüğü gibi bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer olarak; ACR'nin sitotoksitesinin araştırıldığı daha önceki çalışmalarda da farklı hücre tipleri ve farklı ACR konsantrasyonları kullanılmasına rağmen, ACR'nin hücreler üzerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

#### **4.2.2 Genotoksisite**

Genotoksisite, genotoksik etki oluşturan maddelerin DNA ve kromozom yapısında meydana getirdiği hasarları kapsamaktadır ve genellikle gen mutasyonları, DNA zincir kırıkları, kromozom anormallikleri ve DNA eklentileri gibi hasarlar meydana gelmektedir. Oluşan bu tip genetik hasarlar; doğum defektleri, genetik hastalıklar, kanser, yaşlanma ve infertiliteye yol açabildikleri için, genotoksik maddelerin tanımlanarak risklerinin en düşük seviyeye çekilmesi insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Genotoksisite testleri çeşitli mutajenlerin belirlenmesi, mutajenlerin insanlarda oluşturduğu risk tayininin yapılması ve bu gibi maddelere fazla maruz kalmanın önlenmesi için uygulanan yöntemlerdir (Vural, 2005; Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Genotoksitesini test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyellerinin olup olmadığının belirlenmesi için yaygın olarak uygulanan *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testleri; ames testi, kromozom anormallikleri testi, mikronükleus testi, kardeş kromatit değişimi testi ve comet testidir (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). DNA hasarı sonucu oluşan olumsuz etkilerin kantitatif ölçümüne dayanan bu genotoksisite testlerine ek olarak, yakın zamanda geliştirilen  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 ko-lokalizasyon testinin de içinde bulunduğu yeni genotoksisite testleri de verim, hassasiyet ve güvenilirlik gibi gereksinimleri karşılayabilmektedir (Nikolova ve ark., 2017). Çalışmamızda,

ACR'nin akciğer epitel hücresi olan BEAS-2B üzerindeki genotoksik etkisini araştırmak için çeşitli genotoksisite testleri uygulanmıştır. Bunlardan ilki comet testi, diğeri ise  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 ko-lokalizasyon testidir.

DNA molekülü sürekli olarak genotoksik strese yol ačan çeşitli faktörlerin etkisi altındadır. Endojen ve ekzojen kökenli pekçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktör DNA zincir kırıklarının oluşumuna neden olan şeker-fosfat omurgasında kırılmalara yol açabilir. Özellikle DNA çift zincir kırıkları, hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkabilen en tehlikeli lezyon türleridir ve bunların etkili bir şekilde onarılması hücrenin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için son derece önemlidir. Oluřan hasar düzgün bir şekilde tamir edilmezse, DNA çift zincir kırıkları DNA dizisinde değişikliklere, genomik kararsızlığa, kromozomal translokasyonlara ve en sonunda neoplastik dönüşümlere neden olabilmektedir. Bu nedenle, hücrelerde DNA çift zincir kırık hasarlarına karşı DNA onarımı, hücre döngüsü durması ve apoptoz gibi hücrenel aktiviteler gelişmektedir (Chronis ve Rogakou, 2007; Atlı Şekeroğlu, 2013).

Bir genotoksik maddenin DNA'da oluşturduğu çift zincir kırılmalarının biyolojisindeki en etkili temalardan biri, DNA çift zincir kırık hasarı tepkilerinde işlevli bir oyuncu olarak ortaya çıkan kromatindir (Chronis ve Rogakou, 2007). Nükleozom yapısını meydana getiren dört çekirdek histon tipinden birisi olan H2A histon protein ailesinin önemli bir H2A tipi olan H2AX proteini; fosforilasyon, asetilasyon ve ubikuitinasyona uğrayarak pek çok hücrenel olayın düzenlenmesini sağlar. Hasarlı bölgelerde görev alan bu histon tipi, DNA hasar tamiri sürecinde anahtar bir rol oynadığı için, hücre bölünmesi ve büyümesi, immüno-reseptörlerin düzenlenmesi gibi pekçok hücrenel olay, genomik kararsızlık ve DNA hasar tamiri ile ilgili sendromlarla yakından ilişkilidir. H2AX, DNA hasarına yanıt yollarda görev alan ilk proteinlerden birisidir. DNA çift zincir kırıklarına yanıtta H2AX, korunmuş olan C-terminal kuyruk bölgesindeki serin 139 pozisyonundan, ATM, ATR ve DNA-PK'ler tarafından hızla fosforillenir. Fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX ( $\gamma$ H2AX) adını alır ve DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda görülebilir nükleer odaklar oluşturur. Bu odakların belirlenmesi ve DNA hasarının ya da tamir etkinliğinin ölçülmesinde immünofloresan yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle

$\gamma$ H2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir indikatör olarak son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır (Atlı Şekeroğlu, 2013).

Bir DNA çift zincir kırığı oluştuğunda, DNA hasarına yanıt olarak H2AX'in fosforilasyonu yoluyla  $\gamma$ H2AX oluşur. DNA çift zincir kırık hasarı oluşumunda hasar bölgesinde en erken beliren  $\gamma$ H2AX lezyonunun her iki bölgesinde uzun bir alan boyunca uzanmaktadır. Bu şekilde sinyal iletim yollarının gen amplifikasyonuna destek sağlamaktadır. DNA hasarını takiben, özel bir transkripsiyon faktörü olan tümör baskılayıcı protein olan p53 bağlayan protein (53BP1), memeli hücrelerinin genotoksik strese yanıtında merkezi bir rol oynar ve DNA çift iplik kırıklarının onarım ve işlenmesi sürecinde önemli bir regülatördür.  $\gamma$ H2AX ile etkileşime girer ve DNA çift zincir kırıklarının olduğu bölgelere yerleşerek, sinyal proteinleri ile metillenmiş histon kalıntıları arasında arayüz oluşturmaktadır ve hasar gören kromatin üzerinde yoğunlaşarak ya hücre döngüsünün durmasını sağlamakta ya da apoptozun oluşmasına aracılık etmektedir. Bu nedenle hücrede  $\gamma$ H2AX odaklarının kalıcılığı ve/ya artışının yanında, DNA hasar onarım moleküllerinin hasar bölgesine çağrılması ve bu proteinlerin toplanarak gözlenebilir odaklar oluşturmasında 53BP1 odaklarının da kritik bir rolü vardır (Ward ve ark., 2003; Chronis ve Rogakou, 2007; Lassmann ve ark., 2010; Zimmermann ve de Lange, 2014; Ertürk, 2019; Şekeroğlu ve ark., 2021). DNA çift zincir kırıklarının tamirinde görev alan iki protein olan  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 proteinleri p53 proteinine bağlanır ve DNA'da çift zincir kırıklarının oluştuğu çekirdekdeki hasar bölgesine p53 ile ko-lokalle olurlar. Hasar bölgesinde  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 proteinlerinin bir araya gelerek oluşturdukları odakların immünofloresan yöntemle gözlemlenmesi, ko-lokalizasyon çalışmalarının temelini oluşturmaktadır (Ertürk, 2019).

DNA'daki çift zincir kırıklarının tespit edilmesi için diğer bir yöntem de Östling ve Johanson (1984) tarafından geliştirilen nötral koşullarda gerçekleştirilen bir yöntem olan DNA jel elektroforezi yöntemidir (Comet Testi). Daha sonra, Singh ve ark., (1988) bu yöntemi modifiye ederek alkali koşullarda uygulamışlardır. Comet yöntemi uygulanmış hücrelerin floresan mikroskopta incelenmesiyle DNA moleküllerinin elektriksel göçünü görsel olarak gözlemlenmesine olanak sağlanmıştır. Bir hücre süspansiyonu, düşük erime noktalı agaroz ile karıştırılarak bir mikroskop lamı üzerine yayılmaktadır. Comet testi, spesifik bir pH'ta lizis solüsyonu

ile serbest hale getirilen DNA'nın süpersarmal yapısının açılması ve elektroforez ile DNA'da oluşan kırıkların anoda doğru göç etmesi prensibine dayanmaktadır. Nötr pH'ta (7-8) DNA'nın çözülmesi ve elektroforez, çoğunlukla çift zincir kırıklarının ve çapraz bağların tespitini kolaylaştırırken, pH 12.1-12.4'te gevşeme ve elektroforez, tek ve çift zincir kırıklarının, tamamlanmamış eksizyon onarım bölgelerinin ve çapraz bağların saptanmasını kolaylaştırmaktadır. 12.6'dan daha yüksek bir pH'ta gerçekleşen çözülme ve elektroforez ise, yukarıda listelenen tüm lezyon tiplerine ek olarak alkali değişken bölgelerin saptanmasına yardımcı olmaktadır (Miyamae ve ark., 1997). DNA'sında kırık görülmeyen normal hücrelerde serbest uçların olmaması ve fragmentlerin büyük olması sebebiyle elektroforez esnasında göçün engellenmesine neden olmaktadır. Anoda göç eden DNA fragmentleri floresan etkili boyalar ile işaretlendiğinde kuyruklu görünümüne sahip olmaktadır (Singh ve ark., 1988).

Bu çalışmada comet testi sonucu elde edilen verilere göre; kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk momenti ve olive kuyruk momenti değerlerinde konsantrasyona bağlı olmayan artışların olduğu ve bu artışların negatif kontrolle kıyaslandığında aralarındaki farkların önemli olduğu tespit edilmiştir.  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 ko-lokalizasyon testi sonuçlarına bakıldığında ise,  $\gamma$ H2AX, 53BP1 ve ko-lokalize olan odaklarda doza bağlı artışlar görülmüştür. Uygulanan maruziyet sürelerinde  $\gamma$ -H2AX protein odağı, 53BP1 protein odağı ve ko-lokalize odaklarda meydana gelen bu artışlar, negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu veriler ışığında ACR'nin genotoksik potansiyelinin olduğu görülmektedir.

ACR'nin mutajenik etki göstermesine yol açan iki olası mekanizma öne atılmıştır (Dearfield ve ark., 1995). Bunlardan ilki, ACR'nin, DNA bazlarındaki nükleofilik bölgelerle etkileşime girerek reaktif bir metabolit olan GA'ya oksitlenmesidir. Bu metabolik dönüşümde Sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) rol oynamaktadır (Adler ve ark., 2000; Ghanayem ve ark., 2005). İkinci olası mekanizma ise, ACR'nin DNA ve proteinlerdeki nükleofillerle (örneğin; tiyoller veya GSH) doğrudan reaksiyona girmesidir. Bu yollarla, ACR'nin mutajenitesi, GSH gibi oksidatif savunma sisteminin azalmasından ve reaktif oksijen türlerinin artmasından kaynaklanabilmektedir (Dearfield ve ark., 1995). Oksidatif stresin ise kromozomal anormallikler, mutasyon, tümör ve kanser gelişiminde rol aldığı

bilinmektedir ve bu nedenle de dolaylı yoldan oluşan genotoksisitenin önemli mekanizmalarından birisi olarak kabul görmektedir (Liu ve ark., 2010a; Liu ve ark., 2010b; Mallepogu ve ark., 2017).

Blasiak ve ark., (2004)'ı sağlıklı insan kanından izole edilen lenfositleri *in vitro* koşullar altında 0.1-0.5  $\mu\text{mol}$  ACR ile muamele etmişler ve GSH ölçümü ile comet analizini uygulamışlardır. ACR'nin hücre içindeki GSH seviyesini önemli derecede düşürdüğünü ve DNA'da önemli genotoksik hasarlar meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Bahsedilen çalışmaların sonuçları ile çalışmamızda elde edilen sonuçlar ele alındığında sonuçlar paralellik göstermektedir.

ACR (1000-6000  $\mu\text{M}$ ) ve GA'nın (100-3000  $\mu\text{M}$ ) mutajenik potansiyelini ölçmek için Çin hamster fibroblast hücre hattı (V79) ve genotoksik potansiyelini ölçmek için ise model sistem olarak insan kanının kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada, hprt mutajenite testinde ACR 10 mM'lık konsantrasyona kadar inaktif olduğu görülmüştür. Buna karşılık GA'nın, 800  $\mu\text{M}$  ve daha yüksek konsantrasyonlarda konsantrasyona bağlı mutasyon indüksiyonu gösterdiği bildirilmiştir. Comet testi uygulanarak lenfositlerdeki genotoksik etkiye bakıldığında ise, ACR'nin 6000  $\mu\text{M}$ 'a kadar önemli genotoksik veya mutajenik etki göstermediği belirtilmiştir. GA'nın 300-3000  $\mu\text{M}$  doz aralığında konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarı gösterdiği rapor edilmiştir. ACR'de 5000  $\mu\text{M}$ 'a kadar, GA'da ise 1000  $\mu\text{M}$ 'a kadar anlamlı MN-indüksiyonu gözlenmemiştir. Bu nedenle, ACR ve GA'nın etkileri karşılaştırıldığında GA'nın daha ılımlı bir genotoksik aktivite sergilediği belirlenmiştir (Baum ve ark., 2005).

ACR kaynaklı genotoksik etkiyi açıklığa kavuşturmak için seçilmiş rat dokularıyla yapılan *in vivo* bir çalışmada, DNA hasarının varlığı comet testi ile, ACR'nin aktif metaboliti olan GA'nın oluşturduğu adenin ve guanin eklentileri ise LC/MS/MS analizi ile araştırılmıştır. Sıçanlara oral yolla tek dozda ACR (vücut ağırlığına göre 18, 36 ve 54 mg/kg) uygulanmış ve tedaviden sonra farklı zamanlarda çeşitli organlardan (kan lökositleri, beyin, karaciğer, kemik iliği, testisler ve adrenaller) örnekler alınmıştır. GA ile meydana gelen DNA eklentilerinin ölçümlerinden elde edilen sonuçlarda, testis, beyin ve karaciğerdeki eklentilerin nisbeten eşit miktarda olduğu gözlemlenmiştir. Comet testi sonuçları DNA göçünün

beyin ve testislerde önemli ölçüde artış gösterdiği belirlenmiştir. Karaciğer ve kemik iliğinde ise zayıf bir DNA hasarı kaydedilmiştir (Mani`ere ve ark., 2005).

İnsan lenfoblastoid TK6 hücrelerinde ACR (0-15 mM) ve metaboliti olan GA'nın (0-2.5 mM) genotoksitesinin araştırıldığı *in vitro* bir çalışmada, DNA hasarı için comet testi, klastogenez için MN testi ve gen mutasyonu için de timidin kinaz testi *in vitro* olarak uygulanmıştır. ACR'nin, yüksek konsantrasyonlarda (>10 mM) MN ve timidin kinaz testlerinde kromozom sapmalarına ve genomik dengesizliğe neden olarak hafif genotoksik bir etki gösterdiği; GA'nın ise, DNA ile oldukça reaktif ve 0.5 mM'da anlamlı ve konsantrasyona bağlı olarak genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Timidin kinaz analizinde, ACR'nin çoğunlukla heterozigosite hasar mutasyonunu indüklediği, GA'nın ise esas olarak nokta mutasyonları indüklediği ortaya konulmuştur. Tüm bu sonuçlara dikkate alındığında, ACR ve GA'nın genotoksik özelliklerinin belirgin şekilde farklı olduğunu, ACR'nin DNA'ya doğrudan zarar vermeden klastojenik etkisinin olduğu ve GA'nın ise mutajenik ve karsinojenik olduğu rapor edilmiştir (Koyama ve ark., 2006).

ACR'nin *in vivo* genotoksitesini araştırmak için Manjanatha ve ark., (2006)'nın yaptığı bir çalışmada, erkek ve dişi Big Blue (BB) farelere, içme sularına 3-4 hafta süreyle 0, 100 veya 500 mg/l ACR ve GA dozları uygulanmıştır. Mutantların moleküler analizi, ACR ve GA'nın benzer mutasyon spektrumları ürettiğini ve bunların kontrol mutantlarından önemli ölçüde farklı olduğunu göstermiştir (P<0.001). ACR ve GA'ya maruz bırakılan farelerin karaciğer cII genindeki baskın mutasyon tipleri G:C>T:A transversiyonları ve -1/+1 çerçeve kaymaları olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, hem ACR hem de GA'nın farelerde genotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir.

İnsan hepatoma G2 (HepG2) hücrelerinde hazırlanan 2.5, 5, 10 ve 20 mM'lık konsantrasyonlar ile ACR'nin olası genotoksitesinin comet ve MN testi kullanarak değerlendirildiği *in vitro* bir çalışmada, genotoksite oluşumunun altında yatan mekanizmaları açıklığa kavuşturmak için, hücre içi ROS oluşumu ve oksidatif DNA hasarının seviyesi immünohistokimyasal analiz ile değerlendirilmiştir. ACR'nin doza bağlı olarak HepG2 hücrelerinde DNA zincir kırılmalarında ve MN sıklığında artışa sebep olduğu görülmüştür (Jiang ve ark., 2007).

Mei ve ark., (2008)'nin yaptığı *in vitro* bir çalışmada, L5178Y/Tk +/- fare lenfoma hücrelerinde ACR ve metaboliti olan GA'nın genotoksitesisi değerlendirilmiştir. Hücreler, ACR (2-18 mM) ve GA'ya (0.125-4 mM) metabolik aktivasyon olmadan 4 saat boyunca maruz bırakılarak DNA eklentileri, mutant frekansları ve mutasyon türleri incelenmiştir. Test edilen doz aralığında GA'nın, adenin ve guanin [N3-(2-karbamoil-2-hidroksietil)-adenin ve N7-(2-karbamoil-2-hidroksietil)-guanin] DNA eklentilerini doza bağımlı bir şekilde indüklediği görülmüştür. GA'nın daha düşük dozlarda mutajenik etki göstermesi nedeniyle bu sonucu, GA'nın ACR'den çok daha fazla mutajenik etkiye sahip olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Bununla birlikte, mutant frekansların 12 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda ACR tarafından önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Mutasyon spektrumlarının istatistiksel analizine bakıldığında, ACR ve GA muamelelerinin neden olduğu mutasyon türleri arasında önemli bir fark ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Hem ACR'nin hem de GA'nın fare lenfoma hücrelerinde klastojenik bir etkiyle mutasyonlara sebep oldukları, GA'nın DNA eklenti mekanizması ile mutasyonları indüklediği, ACR'nin ise oksidatif stresi artırmasından dolayı mutasyonları indüklediği rapor edilmiştir.

Belirlenen 23 gıda içerisindeki ACR seviyelerinin Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile incelendiği bir çalışmada, tüm gıda örneklerindeki ACR ve GA miktarlarının genotoksitesisi Salmonella mutajenite testi kullanılarak araştırılmıştır. Bu 23 gıdanın 16'sının sulu ve organik ekstraktları oluşturularak comet testi ile DNA hasar potansiyelleri tespit edilmiştir. Metabolik aktivasyon sistemi (S9) varlığında ve yokluğunda, ne ACR ne de gıdaların sulu veya organik özütleri, TA98, TA100 ve TA1535 Salmonella suşları üzerinde mutajenik etki göstermiştir. Aynı şekilde, comet testinde de DNA'ya hasar veren etkiler göstermedikleri tespit edilmiştir. GA'nın ise, TA100 suşu ile sadece S9 varlığında mutajenik etki gösterdiği ve comet testinde yoğun DNA kırılmalarına yol açtığı rapor edilmiştir. Cipsle beslenen sıçanlardan alınan lökositlerde, comet testinde geniş DNA hasarı belirlenmiştir (El-Assouli, 2009).

Chen ve ark., (2010)'nin insan astrositom hücreleri kullanılarak farklı zaman periyotları için (0, 6, 12, 24, 36 ve 48 saat) hazırlanan 0, 0.5, 1 ve 2 mM'lık ACR maruziyetinden kaynaklanan DNA hasarının hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin



araştırıldığı *in vitro* bir çalışmada, 48 saatliğine 0,5 mM'lık ACR'ye maruz bırakılan hücrelerde comet kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yüzdesi değerlerinde artış meydana gelirken, kuyruk momenti değerinde ise 2 mM'lık konsantrasyonda anlamlı artışlar meydana geldiği tespit edilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada, aflatoksin B1 (AFB1), ACR, siklofosfamid (CPA), benzo[a]piren (B[a]P), N-nitrosodimetilamin (NDMA), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridin (PhIP) ve 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f] kinolin (IQ) gibi promutajenler kullanılarak farklılaşmış insan hepatomu olan HepaRG hücreleri üzerinde comet ve MN testleri *in vitro* olarak uygulanmış ve bu promutajenlerin neden olduğu DNA hasarı tespit edilmek istenmiştir. Bu bileşiklerin sitotoksitesisi ise, laktat dehidrojenaz (LDH) ölçülerek değerlendirilmiştir. LDH deneyi ile belirlenen hücre canlılığı, IQ hariç tüm bileşikler için 24 saatlik uygulamadan sonra %70 olarak belirlenmiştir. Comet testinde IQ hariç tüm bileşiklerde DNA hasarı ve kuyruk oluşumun meydana geldiği bildirilmiştir. B[a]P, CPA ve AFB1'de doza bağlı bir artış gözlenirken; PhIP, IQ ve ACR'de artış gözlenmediği rapor edilmiştir. Comet testinde HepaRG hücrelerinde sadece yüksek ACR konsantrasyonları ile yapılan muamelelerde DNA göçünün arttığı belirlenmiş ve DNA fragmentasyonunun gözlemlendiği bildirilmiştir. Görülen etkiler, hücre içi ROS'ların sebep olduğu oksidatif DNA hasarı ve glutatyon miktarının tükenmesi olarak yorumlanmıştır (Le Hegarat ve ark., 2010).

Sıçanlardaki sitokrom P450 2E1 (CYP2E1)'de ACR kaynaklı genotoksik etkinin olup olmadığını incelemek için yapılan bir çalışmada *in vivo* alkali comet testi uygulanmıştır. Sıçanlar 50 mg/kg ACR grubu, 100 mg/kg ACR grubu ve kontrol grubu olarak üç gruba ayrılmıştır ve belirlenen konsantrasyonlar 21 gün boyunca sıçanlara oral yolla uygulanmıştır. ACR'nin her iki muamele grubunda da hayvan davranışında ve ölüm oranında %30'a (birinci grupta) ve %40'a (ikinci grupta) varan belirgin değişikliklere sebep olduğu belirtilmiştir. ACR'nin, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesinde oldukça önemli bir artış sağlarken, toplam protein, albümin ve globulin seviyelerinde önemli bir düşüşe sebep olduğu rapor edilmiştir. ACR'nin konsantrasyona bağlı olarak DNA tek zincir kırılmalarının sayısında önemli bir artışa neden olduğunu bildirilmiştir. Yapılan histopatolojik incelemede ise, ACR ile muamele edilen sıçanların karaciğerinde

nekrotik ve dejeneratif değişikliklerin meydana geldiği gözlemlenmiştir (El-Bohi ve ark., 2011).

Hobbs ve ark., (2016)'nın yaptığı bir çalışmada, erkek F344 sıçanları ve B6C3F1 fareleri içme suyu ile sırasıyla 24.0 ve 12.0 mg/kg/gün olacak şekilde 30 gün boyunca ACR konsantrasyonuna maruz bırakılmış ve DNA hasarı ve gen mutasyonu potansiyelinin olup olmadığı MN ve Pig-a gen mutasyon testleriyle *in vivo* olarak araştırılmıştır. MN ve Pig-a gen mutasyonu deneylerinin sonuçlarına göre, test edilen dozlarda ACR uygulanan erkek sıçanlar için Pig-a geninde mutasyon oluşmamış ve sonuç negatif bulunmuştur; fakat MN oluşumunda konsantrasyona bağlı bir artış meydana geldiği görülmüştür. Farelerde Pig-a testi sonuçları da negatif olarak rapor edilmiştir.

Sitotoksite bölümünde de bahsedilen bir araştırma olan Seçer elik ve ark., (2018)'nin yaptığı *in vitro* alışmada, ACR'nin embriyonik böbrek hücresi (HEK293) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda (0.001, 0.01, 0.1 M) ACR eklenerek 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Genotoksisiteyi incelemek için MN ve FISH (Floresan *in situ* Hibridizasyon) testleri uygulanmıştır. MN testinin sonuçlarına göre, doz artışına bağlı olarak MN sayısında ve sıklığında artış gözlemlenmiştir. FISH testinin sonuçlarına göre, oluşan mikronükleuslardaki sentrik fragmentlerin asentrik fragmentlere oranı 1/3 olarak bulunmuştur. Testin sonucuna göre, ACR'nin DNA kırıklarına neden olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, HEK293 hücre hattı üzerinde ACR'nin genotoksik etkisinin olduğu rapor edilmiştir.

Nowak ve ark., (2020)'nin Caco-2 hücre hattı üzerinde ACR'nin sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları *in vitro* bir çalışmada, 24, 48 ve 72 saatlik ACR maruziyetinden sonra belirlenen IC50 değerleri sonucu nihai konsantrasyonlar olarak 0.2, 0.8, 3.2, 6.4 ve 12.5 mM'lık dozlar seçilmiş ve genotoksisitenin belirlenmesi için uygulanan testlerde bu konsantrasyonlar kullanılmıştır. Comet testi sonucu ACR'nin Caco-2 hücreleri üzerinde genotoksisiteyi indüklediği ve en büyük DNA hasarının ACR'nin en yüksek konsantrasyonu olan 12,5 mM'de görüldüğü tespit edilmiştir.

Görüldüğü üzere ACR'nin *in vitro* ve *in vivo* genotoksitesinin araştırıldığı daha önceki çalışmaların pek çoğunda farklı canlı türleri, farklı hücre tipleri, farklı ACR konsantrasyonları ve bazılarında farklı genotoksite testleri kullanılmasına rağmen, ACR'nin genotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Önceki çalışmaların sonuçları ile uyumlu olarak bizim çalışmamızın sonuçları da ACR'nin akciğer bronşial epitel hücrelerinde DNA hasarına yol açtığını ortaya koymuştur.

#### **4.2.3 Karsinojenite**

Çeşitli genotoksinlerin meydana getirdikleri mutajenik etkiler karsinojenik potansiyelleri ile de ilgilidir. Özellikle hücrelerde oluşan DNA çift zincir kırıkları, genomik bütünlüğü bozmaktadır. Meydana gelen bu hasarlar eğer onarılmadan bırakılırlarsa, kalıcı olarak hücre döngüsünün durmasına, apoptozun indüksiyonuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Olive, 1998). Yanlış bir şekilde onarıldıklarında ise, doğrudan indüklenen ya da gecikmiş kromozomal yeniden düzenlemeler aracılığıyla karsinogeneze yol açabilmektedir (Morgan ve ark., 1998; Xie ve ark., 2008).

Bir tümör hücresi, oluşan çeşitli fenotipik değişiklikler sonucu normal hücre fenotipinden ayırt edilebilmektedir. Tümörleşen hücredeki değişiklikler arasında; serum büyüme faktörlerine olan bağımlılığın azalması, hücre morfolojide değişiklikler, kontakt inhibisyonun kaybolması, ankraj bağımsız büyüme yeteneğinin olması, immortalizasyon (ölümsüz olmak), hücrelerde kontrolsüz üremenin olması, hücreler arası iletişimin azalması, substratlara yapışma özelliğinde zayıflama, yarı katı ortamlarda üreme kabiliyetinin artması, kültür ortamında devamlı, hızlı ve kolaylıkla üremesi, suspansiyon kültürler halinde üreme özelliğinin olması, uygun konakçıya enjekte olduklarında tümör oluşturması ve klon oluşturma yeteneğinin artışı bulunmaktadır. Morfolojik olarak değişen transforme hücreler, faz kontrast mikroskopu altında gözleendiğinde düzensiz bir şekilde büyüyen kümeler görünümünde olmaktadır. Bu tür hücreler, normal hücrelerde olduğu gibi tek tabaka halinde bir büyüme göstermemeleri ve katmanlı bir şekilde çoğalmalarından dolayı kolaylıkla tespit edilememektedirler (Xie ve ark., 2007).

Neoplastik transformasyon ve soft agar testleri, çeşitli bileşiklerin *in vitro* olarak karsinojen etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla uygulanan

yöntemlerdendir. Transformasyon deneyi, *in vivo* karsinogenez sürecine benzer hücrel ve moleküler olaylar içermektedir. Neoplastik transformasyon testi sonucunda transforme olan hücrelerin, farelere aşılandığında tümöregenik bir etki ortaya çıkardıkları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca *in vitro* transformasyon testi, çeşitli kimyasalların karsinojen etki gösterip göstermediğinin belirlenmesinde kullanılan *in vivo* kemirgen deneylerinden daha hızlı sonuç vermektedir. Hücrel ve hücreler arası etkileşimler hakkında bilgi vererek genotoksik ve genotoksik olmayan bazı karsinojenlerin belirlenmesini sağlamaktadır (Sasaki ve ark., 2012).

Çalışmamızda uygulanan transformasyon testi sonuçlarımıza göre, hücreler normal morfolojik özelliklerini kaybetmiş ve iğsi bir yapıya dönüşmüşlerdir. Bazı hücrelerde yırtık ve parçalı şekilde sitoplazma görülürken, bazılarında da büyük boşluklar oluşmuş ve çekirdekler anormal konumlanmıştır. Hücrelerin normal boyutlarından farklı olarak displazik ve hipertrofik bir görünüme sahip oldukları gözlenmiştir. Temel hücre tabakasından farklı olarak çok tabakalı halde büyüeyebilen, rastgele yönelim gösteren ve invaziv olarak büyüyen hücrelerin olduğu belirlenmiş ve monolayer büyüme özelliğinin aksine üst üste çoğalmalar devam etmiştir. Oluşan bu odakları oluşturan hücrelerin zamanla yapışma özelliğinde zayıflama olmuş ve bir süre sonra yapışık oldukları yüzeyden ayrıldıkları görülmüştür.

Soft agar testi de karsinogenitenin belirlenmesinde kullanılan testlerden biridir. Bu testte, transforme olmuş hücrelerin katı bir yüzeyde bağımsız olarak büyüme yeteneğini ve karsinogenezi ayırt etmek için kullanılır. Bu yeteneği *in vitro* karakterize etmek için iyi bilinen bir yöntemdir ve hücrelerdeki kötü huylu transformasyonun olup olmadığını saptamak için kullanılan bir test olarak kabul edilmiştir. Ayrıca çeşitli muamele koşullarına yanıt olarak bu yeteneğin yarı kantitatif değerlendirmesine de izin vermektedir. Hücreler, yüksek bir agar konsantrasyonu içeren hücre kültürü ortamı ile karıştırılmış yumuşak bir agar tabakası içinde büyütülmektedir. Bu tabaka, hücrelerin kültür petrisine yapışmasını önlemekte ve transformasyona uğramış hücrelerin görünür koloniler oluşturmalarına izin vermektedir. Bu tekniğin mantığı, normal hücrelerin büyüeyebilmek ve bölünebilmek için hücre-hücre dışı matris temasına bağımlı olmasıdır. Bunun aksine, transformasyona uğramış hücreler, çevrelerindeki tabakadan bağımsız olarak

büyüme ve bölünme yeteneğine sahiptirler ve bu nedenle, ankorajdan bağımsız bir şekilde koloni oluşturabilen hücrelerin transformasyona uğradığı ve karsinojen olduğu kabul edilmektedir. Bu yöntemin amacı, hücrelerdeki bu yeteneğin yarı kantitatif bir şekilde ölçülmesini sağlamaktır (Borowicz ve ark., 2014).

Soft agar testi sonuçlarımıza göre, en yüksek koloni sayısı 2 mM'lık konsantrasyonda saptanmıştır. Bu sonuca göre ACR uygulaması sonrasında, transforme olan ve soft agarda büyüyen kolonilerin sayısının konsantrasyona bağlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. 0.5 mM'lık doz maruziyetine sahip koloniler, negatif kontroldekilerle karşılaştırıldığında <10 µm ve 10-100 µm olan kolonilerde istatistiksel olarak aralarında önemli bir fark bulunmamıştır. >100 µm olan kolonilerde ise istatistiksel açıdan aralarındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir. 1 mM ve 2 mM'lık uygulamalarda ise, <10 µm, 10-100 µm ve >100 µm olan kolonilerde negatif kontrole göre kıyaslandığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar; ACR'nin normal BEAS-2B hücrelerinde *in vitro* transformasyona yol açmasına ek olarak, organizmada tümör oluşumu ve kanserleşme potansiyelinin de olabileceğini göstermektedir.

Kimyasallar ile kanser indüksiyonu çok aşamalı bir süreçtir. Bu aşamalar, mutasyona uğrayan bir hücrenin oluşumundan başlayarak, hücre popülasyonunun artmış hücre proliferasyonu veya azalmış apoptoz yoluyla oluşumunu içermektedir. Süreç, farklı histolojik lezyonlarla çeşitli hayvan modellerinde gösterilebilmektedir. Genelde kanser gelişiminin başlama, artma ve ilerleme olmak üzere üç adımla oluştuğu düşünülmektedir. İlk aşama olan başlama evresi, bir genotoksik bileşik maruziyetinden sonra, onarılmamış genomik DNA etkileşimlerinden kaynaklı mutasyona uğramış bir hücrenin oluşmasıdır (Klaunig ve ark., 2003; Klaunig ve Kamendulis, 2004). Ayrıca, spontan DNA hasarının indüksiyonu sonucunda ortaya çıkan mutasyonlar da meydana gelebilmektedir. Bu nedenle, karsinogenez sürecinin ilk adımı, genomik DNA'nın kimyasal etkileşim yoluyla veya spontan olarak mutasyonların meydana gelmesidir. Mutasyona uğramış hücrede DNA onarılamayarak hücre apoptoz yoluyla uzaklaştırılmazsa geri dönüşü olmayan bir süreç meydana gelmektedir (Klaunig ve ark., 2000). İkinci aşama artma olarak adlandırılır ve hücrenin doğrudan bir kimyasal madde tarafından veya dolaylı olarak (hormonal, sitotoksikite) hücre büyümesini düzenleyici genlerin gen ekspresyonunun

aktivasyonu yoluyla çoğalmasını içermektedir. Bu aşamada hasara uğrayan hücreler aktif olarak çoğalarak çok hücreli bir premalign kanser hücresi popülasyonu oluşturmak için genişlemektedir. Üçüncü adım (ilerleme) ise, pre-neoplastik durumdan neoplastik aşamaya geçişi temsil etmektedir. Artan proliferatif kapasite, invazivlik ve metastaz aracılığıyla tümör hücrelerinin ürettiği süreçtir (Klaunig ve ark., 2003; Klaunig, 2008; Khambete ve Kumar, 2014). Bizim çalışmamızda da, ACR maruziyeti sonrası hücrelerde DNA çift zincir kırıkları oluşmuş, oluşan bu hasarlar muhtemelen tam olarak tamir edilememiş, hücrelerin morfolojilerinde değişimler meydana gelmiş, proliferasyonda artış olmuş, transforme odaklar oluşmuş ve transforme olmuş bu hücreler ankorajdan bağımsız bir şekilde softa agar da koloni oluşturmuşlardır. Görülebileceği gibi, karsinogenezin belirtilen aşamalarının hemen hemen tamamı çalışmamızda gözlemlenmiştir.

Akrilonitril (AN) (2-200 µg/ml) ve ACR'nin (2, 6.3, 12.5, 50, 100, 200 µg/ml), 48 saat maruziyet süresi ile *in vitro* olarak C3H/IOT1/2 ve NIH/3T3 fare fibroblast hücrelerinde morfolojik transformasyona sebep olup olmadığını belirlemek amacıyla transformasyon ve soft agar testine ek olarak, sitotoksik etkilerinin olup olmadığı da araştırılmıştır. AN ve ACR'nin, hem C3H/IOT1/2 hemde NIH/3T3 hücrelerinde morfolojik transformasyonu indüklediğini gözlemlenmiştir. AN ve ACR, NIH/3T3 hücrelerini C3H/IOT1/2 hücrelerinden daha büyük ölçüde transformasyona uğrattığı belirtilmiştir. Transformasyona uğrayan hücrelerin morfolojik olarak değişikliğe uğradığı görülmüştür. Hücrelerin bazofilik ve üst üste biriken odaklar oluşturduğu rapor edilmiştir. AN ve ACR, transformasyon etkilerini NIH/3T3 hücrelerinde 2 ve 100 µg/ml'lik dozlar arasında sergilemiştir. Morfolojik olarak transforme olmuş NIH/3T3 hücreleri, çok katmanlı odaklar oluşturmuşlardır. Hücre morfolojilerinin iğ şeklinde ve oldukça bazofilik olduğu gözlenmiştir. Morfolojik olarak transformasyona uğrayan bu hücreler softa agar testi için yumuşak agar içinde büyütülmüştür. AN ve ACR ile transformasyona uğramış C3H/IOT1/2 hücrelerinin, koloni oluşturduğu görülmüştür (Banerjee ve Segal, 1986). Görüldüğü üzere, bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçları ile büyük benzerlikler göstermektedir.

ACR'nin genotoksik potansiyelinin incelendiği bir çalışmada, *in vitro* olarak kapsamlı bir araştırma yapılmış ve Salmonella/mikrozom testi, *Escherichia coli*

mikrozom testi (50 mg/petri), *Bacillus subtilis* spor-rec testi (DNA hasarı) (10-50 mg/disk), KA testi (2-5 mM, 24 saatlik maruziyet), poliploidi testi (1-5 mM, 24 saatlik maruziyet), hücre transformasyon testi (1-2 mM, 72 saatlik maruziyet) ve KKD testi (1-2.5 mM, 24 saatlik maruziyet) uygulanmıştır. ACR'nin 1 ve 2 mM'lık dozlarda hücrede meydana getirdiği transformasyonun doza bağımlı bir şekilde indüklendiği gösterilmiştir. Daha sonra transforme olan odaklardan alınan hücreler çoğaltılmış ve farelere aktarılmıştır. Odaklardan izole edilen hücrelerin büyüyerek tümörler ürettiği rapor edilmiştir. Bu tümörlerin hepsi fibrosarkom olarak teşhis edilmiş ve transforme olmuş odakların habis olduğu gösterilmiştir (Tsuda ve ark., 1993).

Park ve ark., (2002) Suriye hamster embriyosu (SHE) hücrelerinde morfolojik dönüşümün yanı sıra potansiyel mekanizmalar da kullanarak, ACR'nin hücrenel transformasyona neden olabileceği olasılığını *in vitro* olarak incelemişlerdir. 7 gün boyunca sürekli olarak 5 mM ve daha yüksek ACR konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerde morfolojik değişimin başladığı görülmüştür. ACR ve N-asetil-L-sistein (NAC)'in birlikte kullanılarak uygulandığı maruziyette, embriyo hücrelerinde ACR kaynaklı morfolojik değişimin azaldığı rapor edilmiştir. Bir P450 inhibitörü olan 1-aminobenzotriazole (ABT) ve ACR'nin birlikte maruziyeti sonucu, sadece ACR muamelesine kıyasla morfolojik dönüşümde hiçbir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. ACR ve bir gamma-glutamilsistein sentetaz inhibitörü olan DL-büthionon-[S,R]-sülfoksimin (BSO) ile yapılan maruziyette ise, tek başına ACR muamelesine kıyasla morfolojik olarak dönüştürülmüş kolonilerin yüzdesinin arttığı görülmüştür.

Kronik ACR maruziyetinin ardından F344 sıçanlarında adrenal feokromositomalar, testiküler mezotelyomalar, tiroid adenomları ve meme neoplazmaları insidansında bir artış olduğu tespit edilmiştir. ACR'nin incelenen tüm dozlarında (0, 2, 15 mg/kg/gün) ve zaman noktalarında (7, 14, 28 gün) hedef dokularda (tiroid, testis mezotelyum, adrenal medulla) DNA sentezinin artırdığı rapor edilmiştir. Comet testi kullanılarak DNA hasarının incelenmesi amaçlanmış ve hedef dokularda DNA hasarında bir artış gözlemlenmiştir (Klaunig ve Kamendulis, 2005).

Exon (2006)'un yaptığı bir çalışmada, ACR'nin vinil karbamat ve akrilonitril gibi karsinojen bileşiklere benzer bir yapıya sahip olduğu ve içme suyundaki yüksek ACR konsantrasyonuna maruz kalan hayvanlarda birden çok bölgede hem erkek hem de dişi cinslerde birden çok tümör üretiminin olduğu rapor edilmiştir. Deney hayvanlarında ACR'nin karsinojenitesine ilişkin yeterli kanıt olmasına rağmen, mesleki maruziyet veya diyetle ACR'ye maruz kalınarak yapılan birkaç epidemiyolojik çalışmada, insan kanser riski ile tutarlı bir ilişki kanıtı bulunamadığını ifade edilmiştir.

Gen mutasyonunun, ACR ve GA ile indüklenen fare akciğer karsinojenitesinin etiyolojisine dahil olup olmadığını araştırmak için yapılan *in vivo* bir çalışmada, 4 haftalık bir sürede içme suyunda 0, 1.4 ve 7 mM'lık dozlar uygulanan erkek ve dişi Big Blue (BB) farelerden alınan akciğerlerde cII mutant frekansı taranmıştır. Her iki ACR ve GA dozunun, mutant frekansında önemli artışlar meydana getirdiği ve yüksek dozlarda kontrollerden 2.7-5.6 kat daha yüksek oranlarda artışlar olduğu bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Yüksek dozlardaki mutajenitenin moleküler analizi incelendiğinde, ACR ve GA'nın benzer mutasyon spektrumları ürettiği ve bu spektrumların kontrol farelerindeki spektrumlardan önemli ölçüde farklı olduğunu gözlemlenmiştir ( $P<0.01$ ). Bu sonuçlar, ACR'nin fare akciğerlerinde mutajenik bir karsinojen olduğunu göstermiştir (Manjanatha ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda da ACR, BEAS-2B hücrelerinde genotoksik ve karsinojenik etkiler göstermiştir.

Bazı çalışmalarda insanda ACR'nin bazı kanser tiplerinin oluşum riskini artırabileceği ifade edilirken, bazı çalışmalarda ise ACR maruziyeti ile kanser oluşum riski arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı belirtilmiştir. Hogervorst ve ark., (2008a)'nın ACR'nin beslenme ile alımı ve çeşitli kanser türlerinin oluşumu arasındaki ilişki üzerine yaptıkları bir çalışmada, 55-69 yaşları arasındaki 120.852 erkek ve kadın incelenmiştir. ACR alımı, ilk önce hangi gıdaların tüketildiğini bulmak amacıyla yapılan bir anket ile değerlendirilmiş ve bununla ilgili tüm Hollanda gıdalarının kimyasal analizi yapılmıştır. 13.3 yıllık takip süresinin ardından sırasıyla 339, 1210 ve 2246 böbrek, mesane ve prostat kanseri vakası tespit edilmiştir. ACR'nin mesane ve prostat kanseri riski arasında pozitif bir ilişki bulunmazken, beslenmeyle alınan ACR ile renal hücre kanseri arasında pozitif bir



ilişki gözlenmiştir. Menopoz sonrası kadınlarda, ACR'ye maruz kalmanın böbrek ve meme kanserleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ancak, Pellucchi ve ark., (2017)'nin 1975 pankreas kanseri vakası ve pankreas kanseri vaka kontrol konsorsiyumunun (PanC4) altı çalışmasına kaydedilen 4239 kontrol ile yaptıkları bir çalışmada, ACR ile pankreas kanseri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Literatür bilgileri göz önüne alındığında ACR'nin bazı kanser türlerinin oluşumunu tetikleyebileceği görülmektedir. Ancak ACR mazuriyeti ile akciğer kanseri oluşum riski arasındaki ilişki tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. ACR'nin insana ait akciğer hücrelerindeki sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkileri ilk kez bizim çalışmamız ile araştırılmıştır. Çalışmamızın sonuçları, ACR maruziyeti sonrası akciğer bronşial epitel hücrelerinde DNA çift zincir kırıklarının oluştuğunu, hücrelerin morfolojilerinde değişimler olduğunu, proliferasyonun arttığını, transformasyonun gerçekleştiğini ve transforme hücrelerin ankorajdan bağımsız bölünme ve büyüme yeteneği kazandıklarını açıkça göstermektedir. Mevcut sonuçlarımız, ACR maruziyetinin akciğer hücrelerinde karsinogenezi indükleyebileceğini ve akciğer kanseri oluşumu açısından bir risk olabileceği hipotezini desteklemektedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

ACR'nin; içme sularının temizlenmesi, içme suyu depolarının yapımı, plastik üretimi, endüstriyel atık suların arıtılması, kanalizasyon hatlarının yapımı, jel elektroforezi, boya sanayisi, kağıt üretimi ve kozmetik ürünleri gibi bir çok alanda kullanımının olduğu bilinmektedir. 120°C ve üzerindeki sıcaklıklarda kızartılarak, kavrulmuş veya pişirilerek işlenen gıdalarda gerçekleşen bazı tepkimeler sonucu da oluşabilmektedir. Ayrıca, insanlar sigara kullanımı sonucu da ACR'ye maruz kalmaktadır. ACR'ye maruz kalınan ortamın ve etkenin fazla oluşu ve oluşum koşullarının artışı sebebiyle sitotoksitesisi, genotoksitesisi ve karsinojenitesinin bilinmesi için çeşitli çalışmaların yapılması hem sağlık hem de üretim standardının oluşturulması açısından oldukça önemlidir. Bu sayede hem endüstriyel olarak kullanılan hem de yiyeceklerin pişirilmesi sırasında oluşan ACR gibi maddelerin kontrolü ve sonraki kullanım süreçlerindeki risk değerlendirmelerinin yapılmasında başarıya ulaşılabilecektir.

Bilimsel çalışmalar tasarlanırken etkisi tespit edilecek madde ya da maddeler, çeşitli yöntemler ile test edilmektedir. Yeterli tekrarlar sonrasında elde edilen çalışmaların verileri, uygulanan deney şartlarına göre değerlendirilmekte ve bir sonuç elde edilmeye çalışılmaktadır. Bunun yanı sıra, benzer şartları kullanarak yapılan farklı bilimsel araştırmaların sonuçları da dikkate alınıp ortak bilimsel bir doğruya ulaşılmak istenmektedir. Çalışmamıza konu olan ACR'nin deney hayvanları üzerindeki toksik etkileri hakkında çeşitli fikirler olmasına rağmen insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda karsinojenitesi ile ilgili oldukça farklı sonuçlara ulaşıldığı görülmektedir. Bunun sebebi, deney hayvanlarının ve insanların karsinojen maddelere farklı hassasiyet gösterebilmeleri ve farklı metabolik yanıt verebilmelerinden kaynaklı olabilmektedir.

ACR'ye ait karsinojenite çalışmalarının çoğu kemirgenlerde yapılmıştır ve insanlar üzerindeki potansiyeli konusundaki bilgilerimizin çoğu bu çalışmaların sonuçlarından elde edilen verilere dayanmaktadır. ACR'in insanlarda bazı kanser türlerinin oluşumunu tetikleyebileceğini gösteren çalışmalar olmasına rağmen, ACR ile akciğer kanseri arasındaki ilişki net değildir ve açıklığa kavuşmamıştır. ACR'nin insan akciğer bronşial epitel hücrelerinde DNA ile etkileşime girip tek veya çift

zincir kırıklarını indükleyerek genomik kararsızlığa yol açıp açtığı ve neoplastik transformasyon meydana getirerek kanserleşmeye neden olabileceği *in vitro* olarak ilk kez bizim çalışmamız ile gösterilmiştir. Mevcut literatür bilgileri göz önüne alındığında, ACR ile ilgili özellikle akciğer hücreleri kullanılarak daha fazla araştırmanın yapılması gerekliliği açıktır.

İnsanların endüstriyel ve besin kaynaklı olarak vücutlarına aldıkları ACR ve sağlık arasındaki ilişkinin daha net anlaşılabilmesi gerekmektedir. ACR'nin beslenmeyle alınan miktarı, emilimi, sindirimi, dağılımı, metabolizması ve besinlerdeki içeriğinin belirlenmesi, ACR ile onun metaboliti olan GA'nın toksik ve karsinogenik etkilerinin tespit edilmesi, farklı yaş grupları için insanlardaki olası risklerinin daha detaylı bir şekilde irdelenmesi gereklidir.

İnsan için ACR kaynakları dikkate alındığında; sigara kullanımına, yaygın olarak tercih edilen ve ACR içeriğinin yüksek olduğu bilinen ürünlerin tüketimine özellikle dikkat edilmesi gerekmektedir. Besinlerde ACR oluşum yollarının fazla olması, ACR maruziyetinin azaltılmasında bir sorun olmaya devam etmektedir. Besinlerdeki ACR miktarını azaltabilmek için tüketilen besinlerin yüksek sıcaklıklarda uzun süre işlem görmemesi ve kızartmalarda kahverengi renk oluşumu görülmeden önce işlemin sonlandırılması gereklidir. Ayrıca 120°C'nin altında haşlanarak tüketilen besinlerde ACR oluşumunun meydana gelmediği göz önüne alındığında bu tür besinleri tüketmenin daha sağlıklı olacağı akılda tutulmalı ve bu şekilde tüketilmesi teşvik edilmelidir. Örneğin, asparajın amino asidinin fazla olduğu patates gibi gıdaların haşlanarak tüketilmesi tercih edilmelidir.

Vücuda alınan ACR glutatyon ile bağlanarak vücut dışına atılmaktadır. Hücrelerde ACR maruziyeti sonrası glutatyon seviyesinde bir azalma meydana gelmesi oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, glutatyon miktarındaki azalma, ACR'nin metaboliti olan GA dönüşümünü hızlandırmaktadır. GA kaynaklı genotoksisiteyi azaltmak ve ACR aracılı oksidatif stres oluşumunu engellemek amacıyla glutatyon öncülü sistein amino asidi yönünden zengin gıdaların (kırmızı et, balık ve tavuk eti, brokoli, lahana, karnabahar, sarımsak, soğan, peyniraltı suyu vb.) tercih edilerek yeterli miktarda tüketmesi oldukça faydalı olacaktır. Çeşitli yollarla ACR'ye maruz kalan insanlara, glutatyon S-transferaz

aktivitesini artırıcı flavonoidler bakımından zengin meyve ve sebzeleri (kırmızı pancar, kırmızı lahana, havuç, kayısı, domates, patates, soğan, patlıcan, elma, armut, şeftali vb.) günlük olarak yeterli miktarlarda tüketmeleri, vücutta antioksidan kapasitesini artıran gıdaların ve yiyeceklerin (bitter çikolata, enginar, fındık, ceviz, yaban mersini, ıspanak, çilek, pancar vb.) günlük olarak yeterli miktarlarda tüketmesi tavsiye edilebilir.

Kanser, bilindiği gibi dünya çapında önemli olan ölüm sebeplerinden biridir ve yeni vakaların önümüzdeki yıllar içinde artması beklenmektedir. Kanserleşme için risk faktörlerini ortadan kaldırmak ya da en aza indirmek bazı kanser tiplerinin oluşumunu önleyebilir. Kanser yükünü azaltmak için kanseri önleme stratejileri çok önemlidir. ACR maruziyetinin insanlar üzerindeki karsinojenik potansiyeli net değildir. Bu nedenle, ACR'nin çeşitli hücrelerde neoplastik transformasyona yol açıp açmadığının ve insanlarda karsinojenik etkisinin olup olmadığını anlaşılması son derece önemlidir. Ayrıca ACR'nin doz-yanıt özelliği daha iyi değerlendirilerek ACR ile daha geniş kapsamlı çalışmalar yapıp toksisitesinin moleküler mekanizmalarını araştırmaya da ihtiyaç vardır. Bunun için daha fazla epidemiyolojik kohort çalışmasının yapılması gerekmektedir. Bu çalışmalar sonrasında, ACR ve metabolitine maruz kalındığında oluşan biyobelirteçleri ve daha sonra oluşabilecek kanser riski ile ilişkilendirip inceleyerek gıdalardaki oluşumu için çeşitli yöntemler bulmamıza fırsat sağlayabilir. Ayrıca, endüstride kullanılan ACR seviyelerini azaltmak için de pratik ve etkili yollar benimsenmesine yardımcı olabilir. Bu tür çalışmaların uygulanması, ACR kullanımını ve besinsel olarak tüketimini daha çok önemsememize yardımcı olup insan yaşamının kalitesini artırmak ve daha doğru kullanılmasını sağlamak açısından önemli olacaktır. Sonuçta ACR maruziyetini ya da vücuda alınan ACR miktarını azaltmaya yönelik geliştirilecek her strateji, ACR kaynaklarının daha doğru kullanılması ve kanser gibi hastalıkların mümkün olduğunca önüne geçilebilmesine yardımcı olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abd El-Mottaleb, EM. & Rashed, AYM. (2008). Some studies on acrylamide intoxication in male albino rats. *Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology*, 21(4), 222-245.
- Adler, ID., Baumgartner, A., Gonda, H., Friedman, MA. & Skerhut, M. (2000). 1-aminobenzotriazole inhibits acrylamide-induced dominant lethal effects in spermatids of male mice. *Mutagenesis*, 15(2), 133-136.
- Adler, ID., Ingwersen, I., Kliesch, U. & El Tarras, A. (1988). Clastogenic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells. *Mutation Research*, 206(3), 379-385.
- Aksu, P., Doğan, A. & Gül, S. (2010). İnsan lenfosit kültüründe akrilamidin klastojenik etkileri. III. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi (29 Eylül-2 Ekim 2010) (Ed.: Dr. Levent Altıntaş ve Araş. Gör. Hüsamettin Ekici), Kuşadası, Aydın.
- Albertini, RJ., Anderson, D., Douglas, GR., Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, AT., Norppa, H., Suhaker, DEG., Tice, R., Waters, MD. & Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, 463(2), 111-172.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). The molecular basis of cancer-cell behavior. *Molecular Biology of The Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26902/>.
- Ali, SF., Hong, JS., Wilson, WE., Uphouse, LL. & Bondy, SC. (1983). Effect of acrylamide on neurotransmitter metabolism and neuropeptide levels in several brain regions and upon circulating hormones. *Archives of Toxicology*, 52(1), 35-43.
- Alzahrani, HAS. (2011). Protective effect of L-carnitine against acrylamide-induced DNA damage in somatic and germ cells of mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1), 29-36.
- Annola, K., Karttunen, V., Keskirahkonen, P., Myllynen, P., Segerbäck, D., Heinonen, F. & Vähäkangas, K. (2008). Transplacental transfer of acrylamide and glycidamide are comparable to that of antipyrine in perfused human placenta. *Toxicology Letters*, 182(1-3), 50-56.
- Anonim, (1994). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some industrial chemicals acrylamide, World health organization international agency for research on cancer (IARC), 60, 389-433.
- Anonim, (2002a). Health Implications of Acrylamide in Food. Report of a Joint FAO / WHO Consultation. Food safety programme department of protection of the human environment world health organization. WHO Headquarters, Geneva, Switzerland.
- Anonim, (2002b). Consultation of the health implications of acrylamide in food. Geneva, Switzerland.

- Anonim, (2005). Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA), In: W.W.H. Organisation, Rome.
- Anonim, (2007). Toxicological review of acrylamide. In: U.S. Environmental Protection Agency, report EPA/635/R-07/009F. Washington, DC: EPA-Science Advisory Board.
- Anonim, (2010). Acrylamide levels in food should be reduced because of public health concern says UN expert committee. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Anonim, (2012). Toxicology and carcinogenesis studies of acrylamide in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed and drinking water studies). National Institutes of Health Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services (Cas no: 79-06-1). ([https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt\\_rpts/tr575\\_508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr575_508.pdf))
- Ansar, S., Siddiqi, J., Zargar, S., Ganaie, MA. & Abudawood, M. (2016). Hepatoprotective effect of quercetin supplementation against acrylamide-induced DNA damage in wistar rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 16(1), 327-331.
- Arinç, E., Sen, A. & Bozcaarmutlu, A. (2000). Cytochrome P4501A and associated mixed function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. *Pure and Applied Chemistry*, 72(6), 985-994.
- Arribas-Lorenzo, G. & Morales, FJ. (2012). Recent insights in acrylamide as carcinogen in foodstuffs. *Advances in Molecular Toxicology*, 6, 163-193.
- Arusoğlu, G. (2015). Akrilamid oluşumu ve insan sağlığına etkileri. *Akademik Gıda*, 13(1), 61-71.
- Atlı Şekeroğlu Z. & Şekeroğlu V. (2011). Genetik toksisite testleri. *Tübbav Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Atlı Şekeroğlu, Z. (2013). Gamma-H2AX Testi ve Önemi. *Toksikoloji Bülteni, Türk Toksikoloji Derneği Yayın Organı*, 37, 3-4.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. & Kolören, Z. (2011). The *in vitro* alkaline comet assay in genetic toxicology. *Journal of Applied Biological Sciences*, 5(13), 49-54.
- Attoff, K., Kertika, D., Lundqvist, J., Oredsson, S. & Forsby, A. (2016). Acrylamide affects proliferation and differentiation of the neural progenitor cell line C17.2 and the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Toxicology in vitro*, 35, 100-111.
- Banerjee, S. & Segal, A. (1986). C3H/10T1/2 ve NIH/3T3 hücrelerinin akrilonitril ve akrilamid ile *in vitro* dönüşümü. *Cancer Letters*, 32(3), 293-304.
- Baum, M., Fauth, E., Fritzen, S., Herrmann, A., Mertes, P., Merz, K., Rudolphi, M., Zankl, H. & Eisenbrand, G. (2005). Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutation Research*, 580(1-2), 61-69.

- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, BŞ. & Alvur, M. (2004). DNA hasarı analizinde  $\mu$ -fadu ve comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2(3), 97-103.
- Beland, FA., Mellick, PW., Olson, GR., Mendoza, MC., Marques, MM. & Doerge, DR. (2013). Carcinogenicity of acrylamide in B6C3F(1) mice and F344/N rats from a 2-year drinkingwater exposure. *Food Chemical Toxicology*, 51, 149-159.
- Belyaev, IY., Markova, E., Hillert, L., Malmgren, LOG. & Persson, BRR. (2009). Microwaves from UMTS/GSM mobile phones induce long-lasting inhibition of 53BP1/ $\gamma$ -H2AX DNA repair foci in human lymphocytes. *Bioelectromagnetics*, 30(2), 129-141.
- Bergmark, E. (1997). Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology*, 10(1), 78-84.
- Besaratinia, A. & Pfeifer, GP. (2003). Weak yet distinct mutagenicity of acrylamide in mammalian cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(12), 889-896.
- Besaratinia, A. & Pfeifer, GP. (2004). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(13), 1023-1029.
- Besaratinia, A. & Pfeifer, GP. (2005). DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutation Research*, 580(1-2), 31-40.
- Besaratinia, A. & Pfeifer, GP. (2007). A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis*, 28(3), 519-528.
- 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 aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 94(5), 406-422.
- Blasiak J., Gloc, E., Wozniak, K. & Czechowska, A. (2004). Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 149(2-3), 137-149.
- Boettcher, MI., Bolt HM, Drexler, H. & Angerer, J. (2006). Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Archives Toxicology*, 80(2), 55-61.
- Boettcher, MI., Schettgen, T., Kutting, B., Pischetsrieder, M. & Angerer, J. (2005). Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutation Research*, 580(1-2), 167-176.
- Bologna, LS., Andrawes, FF., Barwenik, FW., Lentz, RD. & Sojka, RE. (1999). Analysis of residual acrylamide in field crops. *Journal of Chromatographic Science*, 37(7), 240-244.

- Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, MK., Tauler, J., Bikkavilli, RK. & Winn, RA. (2014). The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 92, e51998.
- Boyacı, CP. & Cengiz, MF. (2012). Gıdalarda akrilamid risk değerlendirme çalışmaları. *Gıda*, 37(5), 287-294.
- Buranasilp, K. & Charoenpanich, J. (2011). Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter aerogenes* isolated from wastewater in Thailand. *Journal of Environmental Sciences*, 23(3), 396-403.
- Calleman, CJ., Bergmark, E. & Costa, L. (1990). Acrylamide is metabolized to glisidamide in the rat: Evidence from hemoglobin adduct formation. *Chemical Research in Toxicology*, 3(5), 406-412.
- Camacho, L., Latendresse, JR., Muskhelishvili, L., Patton, R., Bowyer, JF., Thomas, M. & Doerge, DR. (2012). Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of fischer 344 rats. *Toxicology letters*, 211(2), 135-143.
- Cao, J., Beisker, W., Nüsse, M. & Adler, ID. (1993). Flow cytometric detection of micronuclei induced by chemicals in poly-and normochromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *Mutagenesis*, 8(6), 533-541.
- Cao, J., Liu, Y., Jia, L., Jiang, LP., Geng, C. & Yao, XF. (2008). Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 12059-12063.
- Capuano, E. & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 793-810.
- Carere, A. (2006). Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: A critical review. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 42(2), 144-155.
- Casella, IG. & Contursi, M. (2004). Quantitative analysis of acrolein in heated vegetable oils by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5816-5821.
- Castle, L. (1993). Determination of acrylamide in mushrooms grown on polyacrylamide gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(8), 1261-1263.
- Castle, L., Campos, MJ. & Gilbert, J. (1991). Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4), 549-555.
- Catalgol, B., Ozhan, G. & Alpertunga, B. (2009). Acrylamide-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Human and Experimental Toxicology*, 28(10), 611-617.
- Çelik, A., Mazmancı, B., Çamlıca, Y., Çömelekoğlu, Ü. & Aşkın, A. (2005). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on wistar rat bone



- marrow by gavage administration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(1), 128-133.
- Chen, JH. & Chou, CC. (2015). Acrylamide inhibits cellular differentiation of human neuroblastoma and glioblastoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 27-35.
- Chen, JH., Tsou, TC., Chiu, IM. & Chou, CC. (2010). Proliferation inhibition, DNA damage, and cell-cycle arrest of human astrocytoma cells after acrylamide exposure. *Chemical Research in Toxicology*, 23(9), 1449-1458.
- Chen, JH., Yang, CH., Wang, YS., Lee, JG., Cheng, CH. & Chou, CC. (2013). Acrylamide-induced mitochondria collapse and apoptosis in human astrocytoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 446-452.
- Choy, WN. (2001). Genetic toxicology and cancer risk assessment. Ed.: Wai Nang Choy, Marcel Dekker, Inc., New York, 29-187.
- Chronis, F. & Rogakou, EP. (2007). Interplay Between  $\gamma$ H2AX and 53BP1 pathways in DNA double strand break repair response: Apoptosis, senescence and cancer, Ed.: DA. Gewirtz, SE. Holt & S., Grant, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, America, 243-263.
- Çiftçi, N. (2017). Oksidatif stresin kanserdeki rolü: Antioksidanlar kanser progresyonunun yakıtı olabilir mi? *Ahi Evran Tıp Dergisi*, 1, 8-13.
- Cook, LELJ., Tareke, E., Word., B., Starlard-Davenport, A., Lyn-Cook, BD. & Hammons, GJ. (2011). Food contaminant acrylamide increase expression of Cox-2 and nitric oxide synthase in breast epithelial cells. *Toxicology and Industrial Health*, 27(1), 11-18.
- Cooper, GM. (2000). The development and causes of cancer, the cell: A molecular approach. 2nd edition, Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cooperstein, MA. & Canavan, HE. (2013). Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and poly(N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces. *Cooperstein and Canavan Biointerphases*, 8(1), 19-31.
- Daşgın, H. & Yıldız, E. (2014). Akrilamid ve Sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 42(3), 228-233.
- Daughton, CG. (1988). Quantitation of acrylamide (and polyacrylamide): Critical review of methods for trace determination/formulation analysis and future research recommendations. Final report (Daughton (Christian G.), Orinda, CA (USA)).
- Dearfield, KL., Abernathy, CO., Ottley, MS., Brantner, JH. & Hayes, PF. (1988). Acrylamide: Its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutation Research*, 195(1), 45-77.
- Dearfield, KL., Douglas, GR., Ehling, UH., Moore, MM., Sega, GA. & Brusick, DJ. (1995). Acrylamide: A review its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutation Research*, 330(1-2), 71-99.

- Dhawan, A., Bajpayee, M. & Parmar, D. (2009). Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 5-32.
- Doerge, DR., Young, JF., McDaniel, LP., Twaddle, NC. & Churchwell, MI. (2005b). Toxicokinetics of acrylamide and glycydamide in B6C3F mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(3), 258-267.
- Doerge, DR., Young, JF., McDaniel, LP., Twaddle, NC. & Churchwill, MI. (2005a). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208(3), 199-209.
- Dybing, E., Farmer, PB., Andersen, M., Fennell, TR., Lalljie, SP., Muller, DJ., Olin, S., Petersen, BJ., Schlatter, J., Scholz, G., Scimeca, JA., Slimani, N., Tornqvist, M., Tuijtelaars, S. & Verger, P. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(3), 365-410.
- El-Assouli, SM. (2009). Acrylamide in selected foods and genotoxicity of their extracts. *Journal of the Egyptian Public Health Association*, 84(3-4), 371-392.
- El-Bohi, KM., Moustafa, GG., Sharkawi NIE. & Sabik, LME. (2011). genotoxic effects of acrylamide in adult male albino rats liver. *Journal of American Science*, 7(1), 1097-1108.
- Erdemli, M., Turkoz, Y., Altinoz, E., Elibol, E. & Dogan, Z. (2016). Investigation of the effects of acrylamide applied during pregnancy on fetal brain development in rats and protective role of the vitamin E. *Human and Experimental Toxicology*, 35(12), 1337-1344.
- Erdreich, LS. & Friedman, M. (2004). Epidemiologic evidence for assessing the carcinogenicity of acrylamide. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 150-157.
- Ertürk, B. (2019). Deltametrin ve Thiaklopid Karışımının İnsan Akciğer Hücrelerindeki Sitotoksitesisi ve DNA Çift Zincir Kırıkları Üzerindeki Etkileri. Doktora Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ordu.
- Exon, JH. (2006). A review of the toxicology of acrylamide. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 9(5), 397-412.
- Fairbairn, DW., Olive, PL. & O'Neill, KL. (1995). The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research*, 339(1), 37-59.
- Fan, F. & Wood, KV. (2007). Bioluminescent assays for high through put screening. *Assay and Drug Development Technologies*, 5(1), 127-136.
- Fang, J., Liang, CL., Jia, XD. & Li, N. (2014). Immunotoxicity of acrylamide in female BALB/c mice. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27(6), 401-409.
- Favor, J. & Shelby, MD. (2005). Transmitted mutational events induced in mouse germ cells following acrylamide or glycidamide exposure. *Mutation Research*, 580(1-2), 21-30.

- Fazendeiro, MSPP. (2013). DNA damage induced by acrylamide: Role of genetic polymorphisms in DNA damage levels. Doutoramento em Ciências da Vida, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências Médicas, Especialidade Genética, Lisboa, Portugal.
- Fennell, TR., Sumner, SC., Snyder, RW., Burgess, J. & Friedman, MA. (2006). Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicological Sciences*, 93(2), 256-267.
- Fennell, TR., Sumner, SC., Snyder, RW., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, WE. & Friedman, MA. (2005). Metabolism, hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicological Sciences*, 85(1), 447-459.
- Friedman, M. & Levin, CE. (2008). Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6113-6140.
- Friedman, M. (1996). Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 631-653.
- Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4504-4526.
- Friedman, M. (2005). Biological effects of maillard browning products that may affect acrylamide safety in food: Biological effects of maillard products. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 561, 135-156.
- Friedman, M. (2015). Acrylamide: Inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans. *Food and Function*, 6(6), 1752-1772.
- Friedman, MA., Dulak, LH. & Stedham, MA. (1995). A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundamental and Applied Toxicology*, 27(1), 95-105.
- Fuhr, U., Boettcher, MI. & Kinzig-Schippers, M. (2006). Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiology*, 15(2), 266-271.
- Galluzzi, L., Aaronson, SA., Abrams, J., Alnemri, ES., Andrews, DW., Baehrecke, EH., Bazan, NG., Blagosklonny, MV., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, DE., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, JA., Ciechanover, A., Cohen, GM., Laurenzi, VD., Maria, RD., Deshmukh, M., Dynlacht, BD., El-Deiry, WS., Flavell, RA., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, ML., Green, DR., Gronemeyer, H., Hajno' czky, G., Hardwick, JM., Hengartner, MO., Ichijo, H., Ja' a'ttela', M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, DJ., Knight, RA., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, SA., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, JCW., Martin, SJ., Medema, JP., Mehlen, P., Melino, G., Moll, UM., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, DW., Nicotera, P., Nun' ez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, ME., Piacentini, M., Prehn, JHM., Puthalakath, H., Rabinovich, GA., Rizzuto, R., Rodrigues, CMP., Rubinsztein, DC., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, HU., Steller, H., Tschopp, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Vousden, KH., Youle, RJ., Yuan, J., Zhivotovsky, B. & Kroemer, G. (2009). Guidelines for

the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*, 16(8), 1093-1107.

- Gassner, P. & Adler, ID. (1996). Induction of hypoploidy and cell cycle delay by acrylamide in somatic and germinal cells of male mice. *Mutation Research*, 367(4), 195-202.
- Ghamdi, A., Alenezi, F., Algoferi, M., Alhawas, M., Farga, AA. & Afifi, M. (2020). A review on the new trends of acrylamide toxicity. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research*, 27(2), 20638-20644.
- Ghanayem, BI., McDaniel, LP., Churchwell, MI., Twaddle, NC., Snyder, R., Fennell, TR. & Doerge, DR. (2005). Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicological Sciences*, 88(2), 311-318.
- Ghanayem, BL., Wang, H. & Sumner, S. (2000). Using cytochrome P-450 gene knock-out mice to study chemical metabolism, toxicity and carcinogenicity. *Toxicologic Pathology*, 28(6), 839-850.
- Ghareeb, DA., Khalil, ACR., Elbassoumy, AM., Hussiena, HM. & Abo-Sraiaab, MM. (2010). Ameliorated effects of garlic (*Allium sativum*) on biomarkers of subchronic acrylamide hepatotoxicity and brain toxicity in rats. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92(7), 1357-1372.
- Gilbert, DF. & Boutros, M. (2016). A protocol for a high through put multiplex cell viability assay. *Methods in Molecular Biology*, 1470, 75-84.
- Gölükcü, M. & Tokgöz, H. (2005). Gıdalarda akrilamid oluşum mekanizması ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 22(1), 41-48.
- Granath, F., Ehrenberg, L., Paulsson, B., Tornqvist, M., Marsh, G., Youk, A., Lucas, L. & Schall, L. (2001). Cancer risk from exposure to occupational acrylamide. *Occupational Environmental Medicine*, 58(9), 608-609.
- Guo, L., Shelton, S., Moore, M. & Manjanatha, M. (2009). Acrylamide and glycidamide induce cII mutations in lung tissue of Big Blue mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 570.
- Hagmar, L., Törnqvist, M., Nordander, C., Rosén, I., Bruze, M., Kautiainen, A., Magnusson, AL., Malmberg, B., Aprea, P., Granath, F. & Axmon, A. (2001). Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health*, 27(4), 219-226.
- Hamdy, SM., Bakeer, HM., Eskander, EF. & Sayed, ON. (2012). Effect of acrylamide on some hormones and endocrine tissues in male rats. *Human and Experimental Toxicology*, 31(5), 483-491.
- Hamzalıoğlu, A., Mogol, BA. & Gökmen V. (2018). Acrylamide: An overview of the chemistry and occurrence in foods. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 492-499.

- Hansen, SH., Olsen, AK., Soderlund, EJ. & Brunborg, G. (2010). *In vitro* investigations of glycidamide induced DNA lesions in mouse male germ cells and in mouse and human lymphocytes. *Mutation Research*, 696(1), 55-61.
- Hashimoto, K. & Aldridge, WN. (1970). Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochemical Pharmacology*, 19(9), 2591-2604.
- He, FS., Zhang, SL., Wang, HL., Li, G., Zhang, ZM., Li, FL., Dong, XM. & Hu, FR. (1989). Neurological and electroneuromyographic assessment of the adverse effects of acrylamide on occupationally exposed workers. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 15(2), 125-129.
- Heath, JCW., Falk, H. & Creech, J.J. (1975). Characteristics of cases of angiosarcoma of the liver among vinyl chloride workers in the United States. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 246(1), 231-236.
- Hobbs, CA., Davis, J., Shepard, K., Chepelev, N., Friedman, M., Marroni, D. & Recio, L. (2016). Differential genotoxicity of acrylamide in the micronucleus and Pig-a gene mutation assays in F344 rats and B6C3F1 mice. *Mutagenesis*, 31(6), 617-626.
- Hogervorst, J.G., Baars, B.J., Schouten, L.J., Konings, E.J., Goldbohm, R.A. & van den Brandt, P.A. (2010). The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: A comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(6), 485-512.
- 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 Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 16(1), 2304-2313.
- 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. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1428-1438.
- Hogervorst, J.G., Schouten, L.J., Konings, E.J., Goldbohm, R.A. & van den Brandt, P.A. (2009b). Dietary acrylamide intake and brain cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 18(5), 1663-1666.
- Hogervorst, J.G., Schouten, L.J., Konings, E.J., Goldbohm, R.A. & van den Brandt, P.A. (2008b). Dietary acrylamide intake is not associated with gastrointestinal cancer risk. *Journal of Nutrition*, 138(11), 2229-2236.
- Hogervorst, J.G., Schouten, L.J., Konings, E.J., Goldbohm, R.A. & van den Brandt, P.A. (2009a). Lung cancer risk in relation to dietary acrylamide intake. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(9), 651-662.
- Hoorn, AJW., Custer, LL., Myhr, BC., Brusick, D., Gossen, J. & Vijg, J. (1993). Detection of chemical mutagens using Muta Mouse: A transgenic mouse model. *Mutagenesis*, 8(1), 7-10.
- 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. *Environmental Research*, 104(3), 346-351.

- İnciser Paşalak, Ş. & Seven, M. (2017). Onkolojide genetik gelişmeler ve hemşirenin rollerine etkisi. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, 14(3), 212-217.
- Ivashkevich, A., Redon, CE., Nakamura, AJ., Martin, RF. & Martin, OA. (2012). Use of the  $\gamma$ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Letters*, 327(1-2), 123-133.
- Ji, K., Kang, S., Lee, G., Lee, S., Jo, A., Kwak, K., Kim, D., Kho, D., Lee, S., Kim, S., Kim, S., Hiuang, YF., Wu, KY. & Choi, K. (2013). Urinary levels of N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-cysteine (AAMA), an acrylamide metabolite, in Korean children and their association with food consumption. *Science of The Total Environment*, 456(457), 17-23.
- Jiang, L., Cao, J., An, Y., Geng, C., Qu, S., Jiang, L. & Zhong, L. (2007). Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicology in vitro*, 21(8), 1486-1492.
- Jin, Y., Pan, X. & Fu, Z. (2012). Exposure to bifenthrin causes immunotoxicity and oxidative stress in male mice. *Environmental Toxicology*, 29(9), 991-999.
- Johnson, KA., Gorzinski, SJ., Bodner, KM., Campell, RA., Wolf, CH., Friedman, MA. & Mast, RW. (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 85(2), 154-168.
- Kaçar, S., Şahintürk, V. & Kutlu, HM. (2019). Effect of acrylamide on BEAS-2B normal human lung cells: Cytotoxic, oxidative, apoptotic and morphometric analysis. *Acta Histochemica*, 121(5), 595-603.
- Kaçar, S., Vejselova, D., Kutlu, HM. & Şahintürk, V. (2017). Acrylamide-derived cytotoxic, anti-proliferative, and apoptotic effects on A549 cells. *Human and Experimental Toxicology*, 37(5), 468-474.
- Kassie, F., Parzefall, W. & Knasmüller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 463(1), 13-31.
- Keramat, J., LeBail, A., Prost, C. & Soltanizadeh, N. (2011). Acrylamide in foods: Chemistry and analysis. A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 4(3), 340-363.
- Khambete, N. & Kumar, R. (2014). Carcinogens and cancer preventors in diet. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 4(1), 4-11.
- Kirman, CR., Gargas, ML., Deksin, R., Toner-Navarro, L. & Andersen, MA. (2003). A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 66(3), 253-274.
- Kısabay, A., Korkmaz, T., Çakıroğlu, E. & Selçuki, D. (2004). Kısa süreli akrilamid maruziyeti sonucu gelişmiş toksik polinoropati olgusu. *Causa Pedia*, 3(1), 701-702.

- Klaunig, JE. & Kamendulis, LM. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 239-267.
- Klaunig, JE. & Kamendulis, LM. (2005). Mechanisms of acrylamide induced rodent carcinogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 561, 49-62.
- Klaunig, JE. (2008). Acrylamide carcinogenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 5984-5988.
- Klaunig, JE., Babich, MA., Baetcke, KP., Cook, JC., Corton, JC., David, RM., DeLuca, JG., Lai, DY., McKee, RH., Peters, JM., Roberts, RA. & Fenner-Crisp, PA. (2003). PPAR  $\alpha$  agonist-induced rodent tumors: Modes of action and human relevance. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(6), 655-780.
- Klaunig, JE., Kamendulis, LM. & Xu, Y. (2000). Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Human and Experimental Toxicology*, 19(10), 543-555.
- Koh, J., Itahana, Y., Mendenhall, IH., Low, D., Soh, EXY., Guo, AK., Chionh, YT., Wang, LF. & Itahana, K. (2019). ABCB1 protects bat cells from DNA damage induced by genotoxic compounds. *Nature Communications*, 10, 2820.
- Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N. & Honma, M. (2006). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutation Research*, 603(2), 151-158.
- Koyama, N., Yasui, M., Kimura, A., Takami, S., Suzuki, T., Masumura, K., Nohmi, T., Masuda, S., Kinae, N. & Matsuda, T. (2011). Acrylamide genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats. *Mutagenesis*, 26(4), 545-549.
- Krebs, O. & Favor, J. (1997). Somatic and germ cell mutagenesis in lambda lacZ transgenic mice treated with acrylamide or ethylnitrosourea. *Mutation Research*, 388(2-3), 239-248.
- Krishnakumar, T. & Visvanathan, R. (2014). Acrylamide in food products: A review. *Journal of Food Processing and Technology*, 5(7), 344-352.
- Kuklenyik, Z., Needham, LL. & Calafat, AM. (2005). Measurement of 18 perfluorinated organic acids and amides in human serum using on-line solid-phase extraction. *Analytical Chemistry*, 77(18), 6085-6091.
- Kumar, J., Das, S. & Teoh, SL. (2018). Dietary acrylamide and the risks of developing cancer: Facts to ponder. *Frontiers in Nutrition*, 5, 14-25.
- Kutting, B., Schettgen, T., Schwegler, U., Fromme, H., Uter, W., Angerer, J. & Drexler, H. (2009). Acrylamide as environmental noxious agent: A health risk assessment for the general population based on the internal acrylamide burden. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(5), 470-480.
- Lafferty, JS., Kamendulis, LM., Kaster, J., Jiang, J. & Klaunig, JE. (2004). Subchronic acrylamide treatment induces a tissue-specific increase in DNA synthesis in the rat. *Toxicology Letters*, 154(1-2), 95-103.

- Larsson, SC., Akesson, A. & Wolk, A. (2009a). Dietary acrylamide intake and prostate cancer risk in a prospective cohort of Swedish men. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18(6), 1939-1941.
- Larsson, SC., Akesson, A. & Wolk, A. (2009c). Long-term dietary acrylamide intake and breast cancer risk in a prospective cohort of Swedish women. *American Journal of Epidemiology*, 169(3), 376-381.
- Larsson, SC., Hakansson, N., Akesson, A. & Wolk, A. (2009b). Long-term dietary acrylamide intake and risk of endometrial cancer in a prospective cohort of Swedish women. *International Journal of Cancer*, 124(5), 1196-1199.
- Lasekan, O. & Kassim, A. (2011). Investigation of the roasting conditions with minimal acrylamide generation in tropical almond (*Terminalia catappa*) nuts by response surface methodology. *Food Chemistry*, 125(2), 713-718.
- Lassmann, M., Hanscheid, H., Gassen, D., Biko, J., Meineke, V., Reiners, C. & Scherthan, H. (2010). *In vivo* formation of  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 DNA repair foci in blood cells after radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *The Journal of Nuclear Medicine*, 51(8), 1318-1325.
- Le Hegarat, L., Dumont, J., Josse, R., Huet, S., Lancelleur, R., Mourot, A., Poul, JM., Guillouzo, CG., Guillouzo, A. & Fessard, V. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, 25(6), 555-560.
- Lee, JH., Lee, KJ., Ahn, R. & Kang, HS. (2014). Urinary concentrations of acrylamide (AA) and N-acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-cysteine (AAMA) and associations with demographic factors in the South Korean population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(7), 751-757.
- Li, SX., Cui, N., Zhang, CL., Zhao, XL., Yu, SF. & Xie, KQ. (2006). Effect of subchronic exposure to acrylamide induced on the expression of Bcl-2, Bax and Kaspase-3 in the rat nervous system. *Toxicology*, 217(1), 46-53.
- Lim, TG., Lee, BK., Kwon, JY., Jung, SK. & Lee, KW. (2011). Acrylamide up-regulates cyclooxygenase-2 expression through the MEK/ERK signalling pathway in mouse epidermal cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1254-1259.
- Lin, CY., Lee, HL., Chen, YC., Lien, GW., Lin, LY., Wen, LL., Liao, CC., Chien, KL., Sung, FC., Chen, PC. & Su, TC. (2013). Positive association between urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and the acrylamide metabolite N-acetyl-S-(propionamide)-cysteine in adolescents and young adults. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 372-377.
- 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.



- Lipworth, L., Sonderman, JS., Tarone, RE. & McLaughlin, JK. (2012). Review of epidemiologic studies of dietary acrylamide intake and the risk of cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 21(4), 375-386.
- Liu, CM., Ma, JQ. & Lou, Y. (2010a). Chronic administration of troxerutin protects mouse kidney against D-galactose-induced oxidative DNA damage. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2809-2817.
- Liu, CM., Ma, JQ. & Sun, YZ. (2010b). Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(3), 264-271.
- Liu, Z., Song, G., Zou, C., Liu, G., Wu, W., Yuan, T. & Liu, X. (2015). Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 84, 42-53.
- Liu, ZH., Cao, YM., Zhou, QW., Guo, K., Ge, F., Hou, JY., Hu, SY., Yuan, S. & Dai, YJ. (2013). Acrylamide biodegradation ability and plant growth-promoting properties of *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969. *Biodegradation*, 24(6), 855-864.
- LoPachin, RM. & Barber, DS. (2006). Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxicants. *Toxicological Sciences*, 94(2), 240-255.
- LoPachin, RM., Balaban, CD. & Ross, JF. (2003). Acrylamide axonopathy revisited. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 188(3), 135-153.
- Lü, ZR., Zou, HC., Park, SJ., Park, D., Shi, L., Oh, SH., Park, YD., Bhak, J. & Zou, F. (2009). The effects of acrylamide on brain creatin kinase: Inhibition kinetics and computational docking simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(2), 128-132.
- Mallepogu, V., Jayasekhar, B., Doble, M., Suman, B., Nagalakshamma, V., Chalapathi, PV. & Thyagaraju, K. (2017). Effects of acrylamide on cervical cancer (HeLa) cells proliferation and few marker enzymes. *Austin Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 4(4), 1087-1091.
- 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. *Mutation Research*, 580(1-2), 119-129.
- Manjanatha, MG., Aidoo, A., Shelton, SD., Bishop, ME., McDaniel, LP., Lyn-Cook, LE. & Doerge, DR. (2006). Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female Big Blue mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(1), 6-17.
- Manjanatha, MG., Guo, LW., Shelton, SD. & Doerge, DR. (2015). Acrylamide-induced carcinogenicity in mouse lung involves mutagenicity: cII gene mutations in the lung of big blue mice exposed to acrylamide and glycidamide for up to 4 weeks. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(5), 446-456.

- Maronpot, RR., Thoolen, RJMM. & Hansen, B. (2015). Two-year carcinogenicity study of acrylamide in Wistar Han rats within utero exposure. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(2), 189-195.
- Marsh, GM., Lucas, LJ., Youk, AO. & Schall, LC. (1999). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occupational and Environmental Medicine*, 56(3), 181-190.
- Matosoa, V., Bargi-Souzab, P., Ivanskia, F., Romanoa, MA. & Romano, RM. (2019). Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food Chemistry*, 283, 422-430.
- Mavournin, HK., Blakey, HD., Cimino, CM., Salamone, FM. & Heddle, AJ. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 239(1), 29-80.
- McKelvey-Martin, VJ., Green, MH., Schmezer, P., Pool-Zobel, BL., De Meo, MP. & Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review. *Mutation Research*, 288(1), 47-63.
- Mehri, S., Abnous, K., Mousavi, SH., Shariaty, VM. & Hosseinzadeh, H. (2012). Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(2), 227-235.
- Mei, N., Hu, JX., Churchwell, MI., Guo, L., Moore, MM., Doerge, DR. & Chen, T. (2008). Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 628-636.
- Mei, N., McDaniel, LP., Dobrovolsky, VN., Guo, X., Shaddock, JG., Mittelstaedt, RA., Azuma, M., Shelton, SD., McGarrity, LJ. & Doerge, DR. (2010). The genotoxicity of acrylamide and glycidamide in big blue rats. *Toxicological Sciences*, 115(2), 412-421.
- Miyamae, Y., Iwasaki, K., Kinae, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M. & Sasaki, YF. (1997). Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutation Research*, 393(1-2), 107-113.
- Mogol, B.A. & Gökmen, V. (2016). Thermal process contaminants: Acrylamide, chloropropanols and furan. *Current Opinion in Food Science*, 7, 86-92.
- Mojtahedzadeh, M., Ahmadi, A., Mahmoodpoor, A., Beigmohammadi, MT., Abdollahi, M., Khazaeipour, Z., Shaki, F., Kuochaki, B. & Hendouei, N. (2014). Hypertonic saline solution reduces the oxidative stress responses in traumatic brain injury patients. *Journal of Research in Medical Sciences*, 19(9), 867-874.
- Morgan, WF., Corcoran, J., Hartmann, A., Kaplan, MI., Limoli, CL. & Ponnaiya, B. (1998). DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements and genomic instability. *Mutation Research*, 404(1-2), 125-128.

- Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mottram, DS., Wedzicha, BL. & Dodson, AT. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419(6906), 448-449.
- Mucci, L., Sandin, S., Magnusson, S. & Weiderpass, E. (2005). Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. *The Journal of the American Medical Association*, 293(11), 1322-1327.
- Mucci, LA. & Adami, HO. (2009). The plight of the potato: Is dietary acrylamide a risk factor for human cancer? *Journal of the National Cancer Institute*, 101(9), 618-621.
- Mucci, LA. & Wilson, KM. (2008). Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6013-6019.
- Mucci, LA., Dickman, PW., Steineck, G., Adami, HO. & 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. *British Journal of Cancer*, 88(1), 84-89.
- Naruszewicz, M., Zapolska-Downar, D., Kosmider, A., Nowicka, G., Kozłowska-Wojciechowska, M. Vikstrom, AS. & Tornqvist, 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. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(3), 773-777.
- Neuhäuser-Klaus, A. & Schmahl, W. (1989). Mutagenic and teratogenic effects of acrylamide in the mammalian spot test. *Mutation Research*, 226(3), 157-162.
- Nikolova, T., Marini, F. & Kaina, B. (2017). Genotoxicity testing: Comparison of the  $\gamma$ H2AX focus assay with the alkaline and neutral comet assays. *Mutation Research*, 822, 10-18.
- Niles, AL., Moravec, RA., Hesselberth, PE., Scurria, MA., Daily, WJ. & Riss, TL. (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical Biochemistry*, 336(2), 197-206.
- Nizamlioğlu, NM. & Nas, S. (2019). Gıdalarda akrilamid oluşum mekanizmaları, gıdaların akrilamid içeriği ve sağlık üzerine etkileri. *Akademik Gıda*, 17(2), 232-242.
- Nowak, A., Zakłós-Szyda, M., Żyżelewicz, D., Koszucka, A. & Motyl, I. (2020). Acrylamide decreases cell viability, and provides oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Molecules*, 25(2), 368-385.
- Oktar, N. (2009). K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin MTT (3-(4,5 dimethylthiazole-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Adana.

- Olesen, PT., 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. *International Journal of Cancer*, 122(9), 2094-2100.
- Olive, PL. & Banath, JP. (2006). The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23-29.
- Olive, PL. (1998). The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiation Research*, 150(5), 42-51.
- Östling, O. & Johanson, KJ. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(11), 291-298.
- Park, H., Kim, MS., Kim, SJ., Park, M., Kong, KH. & Kim, HS. (2010). Acrylamide induces cell death in neural progenitor cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Toxicology Letters*, 193(1), 86-93.
- Park, J., Kamendulis, LM., Friedman, MA. & Klaunig, JE. (2002). Acrylamide-induced cellular transformation. *Toxicological Sciences*, 65(2), 177-183.
- Parzefall, W. (2008). Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1360-1364.
- Paulsson, B., Granath, F., Grawe, J., Ehrenberg, L. & Törnqvist, M. (2001). The multiplicative model for cancer risk assessment: Applicability to acrylamide. *Carcinogenesis*, 22(5), 817-819.
- Paulsson, B., Grawe, J. & Törnqvist, M. (2002). Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mutation Research*, 516(1-2), 101-111.
- Paulsson, B., Kotova, N., Grawé, J., Henderson, A., Granath, F., Golding, B. & Törnqvist, M. (2003). Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutation Research*, 535(1), 15-24.
- Pelucchi, C., Galeone, C., Levi, F., Negri, E., Franceschi, S., Talamini, R., Bosetti, C., Giacosa, A. & La Vecchia, C. (2006). Dietary acrylamide and human cancer. *International Journal of Cancer*, 118(2), 467-471.
- Pelucchi, C., Rosato, V., Bracci, PM., Li, D., Neale, RE., Lucenteforte, E., Serraino, D., Anderson, KE., Fontham, E., Holly, EA., Hassan, MM., Polesel, J., Bosetti, C., Strayer, L., Su, J., Boffetta, P., Duell, EJ. & La Vecchia, C. (2017). Dietary acrylamide and the risk of pancreatic cancer in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of Oncology*, 28(2), 408-414.
- Pernice, R., Hauder, J., Koehler, P., Vitaglione, P., Fogliano, V. & Somoza, V. (2009). Effect of sulforaphane on glutathione-adduct formation and on glutathione S transferase dependent detoxification of acrylamide in Caco-2 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(12), 1540-1550.

- Poburski, D. & Thierbach, R. (2016). Improvement of the BALB/c-3T3 cell transformation assay: A tool for investigating cancer mechanisms and therapies. *Scientific Reports*, 6, 32966.
- Podhorecka, M., Skladanowski, A. & Bozko, P. (2010). H2AX phosphorylation: Its role in DNA damage response and cancer therapy. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 920161.
- Prasad, SN. (2013). Neuroprotective efficacy of eugenol and isoeugenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: Behavioral and biochemical evidence. *Neurochemical Research*, 38(2), 330-345.
- Puck, TT., Marcus, PI. & Cieciura, SJ. (1956). Clonal growth of mammalian cells *in vitro*; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *Journal of Experimental Medicine*, 103(2), 273-283.
- Puppel, N., Tjaden, Z., Fueller, F. & Marko, D. (2005). DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutation Research*, 580(1-2), 71-80.
- Ramsey, J., Young, J. & Gorzinski, S. (1984). Acrylamide: Toxicodynamics in the rat. Dow Chemical Company, Health and Environmental Sciences, Toxicology Research Laboratory, Midland, Michigan 48640, USA.
- Redon, CE., Nakamura, AJ., Martin, OA., Parekh, PR., Weyemi, US. & Bonner, WM. (2011). Recent developments in the use of  $\gamma$ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging*, 3(2), 168-174.
- Rice, JM. (2005). The carcinogenicity of acrylamide. *Mutation Research*, 580(1-2), 3-20.
- Rifai, L. & Saleh, FA. (2020). A review on acrylamide in food: Occurrence, toxicity, and mitigation strategies. *International Journal of Toxicology*, 39(2), 1-10.
- Riss, TL. & Moravec, RA. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(1), 51-62.
- Rodriguez-Ramiro, I., Martín, MÁ., Ramos, S., Bravo, L. & Goya, L. (2011). Olive oil hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *Toxicology*, 288(1-3), 43-48.
- Şahintürk, V., Kacar, S., Vejselova, D. & Kutlu, HM. (2018). Acrylamide exerts its cytotoxicity in NIH/3T3 fibroblast cells by apoptosis. *Toxicology and Industrial Health*, 34(7), 481-489.
- Sasaki, K., Bohnenberger, S., Hayashi, K., Kunkelmann, T., Muramatsu, D., Phrakonkham, P., Poth, A., Sakai, A., Salovaara, S., Tanaka, N. & Thomas, BC. (2012). Recommended protocol for the BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutation Research*, 744(1), 30-35.
- 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47(2), 171-183.

- Schettgen, T., Kutting, B. & Hornig, M. (2004). Trans-placental exposure of neonate to acrylamide a pilot study. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 77(3), 213-216.
- 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. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206(1), 9-14.
- Schouten, L.J., Hogervorst, JGF., Konings, EJM, Goldbohm, RA. & van den Brandt, PA. (2009). Dietary acrylamide intake and the risk of head-neck and thyroid cancers: Results from the Netherlands cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 170(7), 873-884.
- Seçer Çelik, F., Cora, T. & Kalayci Yigin, A. (2018). Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of acrylamide in HEK293 cell line. *Journal of Cancer Prevention and Current Research*, 9(5), 260-264.
- Şekeroğlu, V. (2010). Thiachloprid ve deltamethrin insektisitlerinin tek başlarına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman sıçan kemik iliği hücrelerinde *in vivo* (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun.
- Şekeroğlu, V., Ertürk, B. & Atlı Şekeroğlu, Z. (2021). Effects of mixture of deltamethrin and thiachloprid on DNA double strand breaks in bronchial epithelial cells. *Chemosphere*, 263, 128293.
- Sharp, D. (2003). Acrylamide in food. *The Lancet*, 361(9355), 361-362.
- Singh, NP., McCoy, MT., Tice, RR. & Schneider, EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- Smith, CJ., Perfetti, TA., Rumble, MA., Rodgman, A. & Doolittle, DJ. (2000). IARC group 2A carcinogens reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology*, 38(4), 371-383.
- Smith, EA. Pruen, SL. & Oehme, FW. (1996). Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: Temperature, light and pH. *Ecotoxicology and environmental safety*, 35(2), 121-135.
- Smith, EA., Prues, SL. & Oehme, FW. (1997). Environmental degradation of acrylamides II. Effects of environmental (outdoor) exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37(1), 76-91.
- Solomon, JJ., Fedyk, J., Mukai, F. & Segal, A. (1985). Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following *in vitro* reaction with acrylamide. *Cancer Research*, 45(8), 3465-3470.
- Sorgel, F., Weissenbacher, R. & Kinzig-Schippers, M. (2002). Acrylamide: Increased concentration in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy*, 48(6), 267-274.

- Stadler, RH., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, PA. & Riediker, S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419(6906), 449-450.
- Stadler, RH., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J. & Blank, I. (2004). In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17), 5550-5558.
- Stadler, RH., Verzeegnassi, L., Varga, N., Grigorov, M., Studer, A., Riediker, S. & Schilter, B. (2003). Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems. *Chemical Research in Toxicology*, 16(10), 1242-1250.
- Sumizawa, T. & Igisu, H. (2007). Apoptosis induced by acrylamide in SH-SY5Y cells. *Archives of Toxicology*, 81(4), 279-282.
- Sumner, SC., Fennell, TR., Moore, TA., Chanas, B., Gonzales, F. & Ghanayem, BI. (1999). Role of cytochrome P4502E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chemical Research in Toxicology*, 12(11), 1110-1116.
- Sumner, SC., Macneela, JP. & Fennell, TR. (1992). Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-<sup>13</sup>C] acrylamide in rats and mice using <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Research in Toxicology*, 5(1), 81-89.
- Sumner, SCJ., Selvaraj, L., Nauhaus, SK. & Fennell, TR. (1997). Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 Days. *Chemical Research in Toxicology*, 10(10), 1152-1160.
- Sumner, SCJ., Williams, CC., Snyder, RW., Krol, WL., Asgharian, B. & Fennell, TR. (2003). Acrylamide: A comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral or inhalation exposure. *Toxicological Sciences*, 75(2), 260-270.
- Tan, D., Li, L., Wang, S., Wei, B., Zhang, X., Sun, B. & Ji, S. (2013). The cytogenetic effects of acrylamide on *Carassius auratus* peripherial blood cells. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 318-322.
- Tardiff, RG., Gargas, ML., Kirman, CR., Carson, ML. & Sweeney, LM. (2010). Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 658-667.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Tornqvist, M. (2000). Acrylamide: A cooking carcinogen. *Chemical Research in Toxicology*, 13(6), 517-522.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Tornqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4998-5006.
- Temin, HM. & Rubin, H. (1958). Characteristics of an assay for *Rous sarcoma* virus and *Rous sarcoma* cells in tissue culture. *Virology*, 6(3), 669-688.
- Tice, RR., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, JC. & Sasaki, YF. (2000). Single cell gel/comet

- assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Tokur, O. & Aksoy, A. (2017). *In vitro* sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- Tsuda, H., Shimizu, CS., Taketomi, MK., Hasegawa, MM., Hamada, A., Kawata, KM. & Inui, N. (1993). Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations. *Mutagenesis*, 8(1), 23-29.
- Tyl, RW. & Friedman, MA. (2003). Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reproductive Toxicology*, 17(1), 1-13.
- Üstün, F. (2007). Albendazol'un olası genotoksisitesi üzerine askorbik asitin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Veena, S., Arti, S. & Leena, K. (2010). The effect of oral administration of *Allium sativum* extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 928-936.
- Venkatasubbaiah, K., Divya, K., Pallavi, C., Kamala, K, Swamy, MV., Rao, KJ. & Thyaga Raju, K. (2013). Analysis of micronuclei formation is an indicator of genotoxicity assessment to acrylamide in rats and developing chick embryos. *Biolife*, 1(2), 35-44.
- Vesper, HW., Caudill, SP., Osterloh, JD., Meyers, T., Scott, D. & Meyers, GL. (2010). Exposure of the U.S. population to acrylamide in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*, 118(2), 278-283.
- Vesper, HW., Slimani, N., Hallmans, G., Tjonneland, A., Agudo, A., Benetou, V., Bingham, S., Boeing, H., Boutron-Ruault, MC., Bueno-de-Mesquita, HB., Chirlaque, D., Clavel-Chapelon, F., Crowe, F., Drogan, D., Ferrari, P., Johansson, I., Kaaks, R., Linseisen, J., Lund, E., Manjer, J., Mattiello, A., Palli, D., Peeters, PH., Rinaldi, S., Skeie, G., Trichopoulou, A., Vineis, P., Wirfält, E., Overvad, K. & Strömberg, U. (2008). Cross-sectional study on acrylamide hemoglobin adducts in subpopulations from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6046-6053.
- Von Tungeln, LS., Churchwell, MI., Doerge, DR., Shaddock, JG., McGarrity, LJ., Heflich, RH., Gamboa da Costa, G., Marques, MM. & Beland, FA. (2009). DNA adduct formation and induction of micronuclei and mutations in B6C3F1/Tk mice treated neonatally with acrylamide or glycidamide. *International Journal of Cancer*, 124(9), 2006-2015.
- Von Tungeln, LS., Doerge, DR., Gamboa da Costa, G., Marques, MM., Witt, WM., Koturbash, I., Pogribny, IP. & Beland, FA. (2012). Tumorigenicity of acrylamide and its metabolite glycidamide in the neonatal mouse bioassay. *International Journal of Cancer*, 131(9), 2008-2015.



- Vural, N. (2005). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 115-129.
- Wallace, A., Wallace, GA. & Abouzam, AM. (1986). Effect of excess level of a polymer as a soil conditioner on yield and mineral nutrition of plants. *Soil Science*, 141(5), 377-379.
- Wang, H., Huang, P., Lie, T., Li, J., Hutz, RJ., Li, K. & Shi, F. (2010). Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reproductive Toxicology*, 29(2), 225-230.
- Ward, IM., Minn, K., Van Deursen, J. & Chen, J. (2003). p53 binding protein 53bp1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 23(7), 2556-2563.
- Wei, Q., Li, J., Li, X., Zhang, L. & Shi, F. (2014). Reproductive toxicity in acrylamide-treated female mice. *Reproductive Toxicology*, 46, 121-128.
- Weng, H., Weng, Z., Lu, Y., Nakayama, K. & Morimoto, K. (2009). Effects of cigarette smoking, XRCC1 genetic polymorphisms and age on basal DNA damage in human blood mononuclear cells. *Mutation research*, 679(1-2), 59-64.
- Wilson, KM., Balter, K. & Adami, HO. (2008). Acrylamide exposure measured by food frequency questionnaire and hemoglobin adduct levels and prostate cancer risk in the cancer of the prostate in Sweden study. *International Journal of Cancer*, 124(10), 2384-2390.
- Wilson, KM., Mucci, LA., Rosner, BA. & Willett, WC. (2010). A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 19(10), 2503-2515.
- Xie, H., Holmes, AL., Wise, SS., Huang, S., Peng, C. & Wise, JPS. (2007). Neoplastic transformation of human bronchial cells by lead chromate particles. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 37(5), 544-552.
- Xie, H., Wise, SS. & Wise, JPS. (2008). Deficient repair of particulate hexavalent chromium-induced DNA double strand breaks leads to neoplastic transformation. *Mutation Research*, 649(1-2), 230-238.
- Xie, H., Wise, SS., Holmes, AL., Xu, B., Wakeman, TP., Pelsue, SC., Singh, NP. & Wise, JPS. (2005). Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutation Research*, 586(2), 160-172.
- Xu, J., Wang, R., Liu, J., Qian, Q., Li, Q. & Liu, X. (2009). Study on DNA damage in L-02 cell induced by acrylamide. *Wei Sheng Yan Jiu / Journal of Hygiene Research*, 38(5), 589-591.
- Xu, X. & An, X. (2016). Study on acrylamide inhibitory mechanism in Maillard model reaction: Effect of p-coumaric acid. *Food Research International*, 84, 9-17.

- Yang, HJ., Lee, SH., Jin, Y., Choi, JH., Han, CH. & Lee, MH. (2005b). Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *Journal of Veterinary Science*, 6(2), 103-109.
- Yang, HJ., Lee, SH., Jin, Y., Choi, JH., Han, DU., Chae, C., Lee, MH. & Han, CH. (2005a). Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reproductive Toxicology*, 19(4), 527-534.
- Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M. & Shibamoto, T. (2003). Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 3999-4003.
- Yaylayan, VA., Perez Locas, C., Wnorowski, A. & O'Brien, J. (2005). Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids. In Friedman & Mottram (Eds.), *Chemistry and safety of acrylamide in food* (pp. 191-203). New York: Springer and Business Media, Inc.
- Yener, Y. (2008). Akrilamid uygulanan sıçanların kemik iliği hücrelerinde mitotik aktivite ile emperipolez ve mikronükleus sıklığının belirlenmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Konya.
- Yılmaz, BO., Yıldızbayrak, N., Aydın Y. & Erkan, M. (2017). Evidence of acrylamide- and glycidamide-induced oxidative stress and apoptosis in leydig and sertoli cells. *Human and Experimental Toxicology*, 36(12), 1-11.
- Young, RR. (2002). Genetic toxicology. *Toxicology*, 173, 103-21.
- Yousef, MI. & El-Demerdash, FM. (2006). Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*, 219(1-3), 133-141.
- Zamani, E., Shokrzadeh, M., Fallah, M. & Shaki, F. (2017). A review of acrylamide toxicity and its mechanism. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3(1), 1-7.
- Zeiger, E. (2004). History and rationale of genetic toxicology testing: An impersonal and sometimes personal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(5), 363-371.
- Zhang, JX., Yue, WB., Ren, YS. & Zhang, CX. (2010). Enhanced role of elaidic acid on acrylamide-induced oxidative stress in epididymis and epididymal sperm that contributed to the impairment of spermatogenesis in mice. *Toxicology and Industrial Health*, 26(8), 469-477.
- Zhang, Y., Zhang, G. & Zhang, Y. (2005). Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1075(1-2), 1-21.
- Zhao, M., Lewis Wang, FS., Hu, X., Chen, F. & Chan, HM. (2017). Acrylamide-induced neurotoxicity in primary astrocytes and microglia: Roles of the Nrf2-ARE and NF-kappaB pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 106(Pt A), 25-35.
- Zhao, M., Liu, X., Luo, Y., Guo, H., Hu, X. & Chen F. (2015). Evaluation of protective effect of freeze-dried strawberry, grape, and blueberry powder on acrylamide toxicity in mice. *Journal of Food Science*, 80(4), H869-874.

- Zhu, YJ., Zeng, T., Zhu, YB., Yu, SF., Wang, QS., Zhang, LP., Guo, X. & Xie, KQ. (2008). Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. *Neurochemical Research*, 33(11), 2310-2317.
- Zimmermann, M. & de Lange, T. (2014). "53BP1: Pro choice in DNA repair". *Trends in Cell Biology*, 24(2), 108-117.
- Zyzak, DV., Sandres, RA., Stojanovic, M., Tallmadge, DH., Eberhart, BL., Ewald, DK., Gruber, DC., Morsch, TR., Strothers, MA., Rizzi, GP. & Villagran, MD. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4782-4787.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Seval KONTAŞ YEDİER
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	2010
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	17.07.2012
Doktora	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	2021
Tezler	
(2010)	Farklı Kompostlarda Yetiştirilen ( <i>Mentha piperita</i> L.) Nane Bitkisinde Bazı Ekolojik Parametreler ile Elde Edilen Eterik Yağların ve Özütlerin Antimikrobiyal ve Antifungal Etkilerinin Araştırılması (Lisans Tezi).
(2012)	Loratadin'in İnsan Periferik Lenfositleri Üzerindeki Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri (Yüksek Lisans Tezi).
(2021)	Akrilamidin İnsan Akciğer Epitel Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitesisi, Genotoksitesisi ve Karsinojenitesinin Araştırılması (Doktora Tezi).
Seminerler	
2011	Kardeş Kroatid Değişimi Testi ve Kullanım Alanları (Yüksek Lisans Semineri).
2015	Epigenetik (Doktora Semineri).

Bildiriler	
2011	Viskum album L. Ekstraktı ve Kuersetinin Fare Kemik İliğindeki Antigenotoksik Etkileri (12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi-Uluslararası katılımlı, 26 - 30 Ekim 2011, Porto Bello Hotel, Antalya) (Poster)
2012	Kontaş, S., Aksoy, M., Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. 2012. Antihistaminik İlaç Olarak Kullanılan Loratadinin İnsan Periferik Lenfositlerindeki Genotoksik Etkisinin Kardeş Kromatid Değişimi Testi ile Belirlenmesi, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi - Uluslararası Katılımlı, İzmir, 3 - 7 Eylül 2012, p. 1374.
2012	Aksoy, M., Kontaş, S., Şekeroğlu, V., Atlı Şekeroğlu, Z., 2012. Antibiyotik İlaç Olarak Kullanılan Ofloksasinin İnsan Periferik Lenfositlerindeki Genotoksik Etkisinin Mikronükleus Testi ile Belirlenmesi, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi - Uluslararası Katılımlı, İzmir, 3 - 7 Eylül 2012, p. 1319.
2013	Kontaş S, Atlı Şekeroğlu Z, Aksoy M, Şekeroğlu V. 2013. Cytotoxic and genotoxic potential of loratadine. 1st International Cell death Research Congress, İzmir, Turkey, October 30 - November 3, p.89.
2013	Şekeroğlu V, Atlı Şekeroğlu Z, Aksoy M, Kontaş S. 2013. <i>In vitro</i> evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of ofloxacin. The Society of Toxicology (SOT) 52nd Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA.
2014	Kontaş, S., Güneş, B., Uçgun, E., Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. 2014. Tartrazinin sitotoksikite ve hücre bölünmesi üzerine etkileri 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 23 - 27 Haziran 2014, p.721.
2015	Atlı Şekeroğlu, Z., Gediz Ertürk, A., Şekeroğlu, V., Kontaş Yedier, S. (2015). Evaluation of the effect of a new substituent of 1,2,5-thiadiazolidine 1,1-dioxide compound on cell division. 3rd International BAU Drug Design Congress, 01.10.2015-03.10.2015.

2015	Atlı Şekeroğlu, Z., Kefelioğlu, H., Şekeroğlu, V., Coşguner, G., Kondaş Yedier, S. (2015). Ziprasidonun sitotoksik ve genotoksik potansiyelinin mikronukleus yöntemiyle belirlenmesi. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27.10.2015 - 30.10.2015.
2016	Kondaş Yedier, S., Güneş, B., Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. (2016). Determination of cyto genotoxic potential of tartrazine using chromosome aberration assay. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences, 21.04.2016-23.04.2016.
2016	Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., Uçgun, E., Kondaş Yedier, S., Güneş, B. (2016). Investigation of Cytotoxic and Genotoxic Effects Effects of Clothianidin Using Micronucleus Test. 1st International Black Sea Congress on Environmental Sciences, 31.08.2016-03.09.2016.
2017	Gediz Ertürk, A., Atlı Şekeroğlu, Z., Kondaş Yedier, S., Şekeroğlu V. 2017. 3-Amino-4-[4-(Dimetilamino)Fenil]-4,5-Dihidro-1,2,5-Tiyadiazol 1,1-Dioksit Bileşiğinin Kromozom Hasarı Üzerindeki Etkisi. Uluslararası Katılımlı "5. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi Ve Standardizasyonu Kongresi. 30.03.2017-02.04.2017.
2017	Flupyradifurone induces micronuclei in human peripheral blood lymphocytes.
2017	Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., Aydın, A., Kondaş Yedier, S. (2017). XIII. Congress of Ecology and Environment with international participation, 12.09.2017.
2017	Şekeroğlu, V., Atlı Şekeroğlu, Z., Kondaş Yedier, S., Ertürk, B., Işık, S. 2017. Cytotoxicity of clothianidin on human bronchial epithelial cells. XIII. Congress of Ecology and Environment with international participation, 12.09.2017.
2017	Atlı Şekeroğlu, Z., Gediz Ertürk, A., Şekeroğlu, V., Kondaş Yedier, S. (2017). Cytotoxic and Genotoxic Effects Of 3-Amino-4-[4-

(Dimethylamino)Phenyl]-4,5-Dihydro-1,2,5-Thiadiazole 1,1-Dioxide On Human Peripheral Lymphocytes. IV. International Multidisciplinary Eurasian Congress, 23.08.2017-25.08.2017.

#### Yayınlar

Kontaş, S., Atlı Şekeroğlu, Z. & Şekeroğlu, V. (2011). Kardeş Kromatid Değişimi Testi ve Kullanım Alanları, *Tübav Bilim Dergisi*, 4 (4) , 226 - 234.

Kontaş, S. & Atlı Şekeroğlu, Z. (2015). Investigation of cytotoxic and genotoxic effects of the antihistaminic drug, loratadine, on human lymphocytes. *Drug and chemical Toxicology*, 38(1), 57-62.

Kefelioğlu, H., Atlı Şekeroğlu, Z., Coşguner, G., Kontaş Yedier, S. & Şekeroğlu, V. (2016). Ziprasidone induces cytotoxicity and genotoxicity in human peripheral lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 40(4), 425–431.

Atlı Şekeroğlu, Z., Kefelioğlu, H., Kontaş Yedier, S., Şekeroğlu, V. & Delmecioğlu, B. (2017). Oxcarbazepine-induced cytotoxicity and genotoxicity in human lymphocyte cultures with or without metabolic activation. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(3), 201-206.

Atlı Şekeroğlu, Z., Güneş, B., Kontaş Yedier, S., Şekeroğlu, V. & Aydın, B. (2017). Effects of tartrazine on proliferation and genetic damage in human lymphocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(5), 370-375.

Şekeroğlu, Z. A., Aydın, A., Yedier, S. K. & Şekeroğlu, V. (2018). Cytogenetic alterations induced by flupyradifurone, a new butenolide insecticide, in human lymphocytes. *Toxicology and Industrial Health*, 34(11):737-743.

Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., Uçgun, E., Kontaş Yedier, S. & Aydın, B. (2018). Cytotoxicity and genotoxicity of clothianidin in human lymphocytes with or without metabolic activation system. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(4), 364-370.

- Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V., Aydın, B., Yedier, S. K. & İlkun, E. (2020). Clothianidin induces DNA damage and oxidative stress in bronchial epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61(6).
- Çil, E., Börçek Kasurka, C., Gediz Erturk, A. & Konaş Yedier, S. (2020). Bazı 3-imino-4-sübstitüe-1,2,5-tiroidiazolidin 1,1-dioksitlerin antibakteriyel etkisi. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(2), 255-264.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., Konaş Yedier, S., İlkun, E. & Liou, L.S. (2021). Increased DNA strand breaks and neoplastic transformation in human bladder cells treated with pioglitazone. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 62(2), 1543-154.
- Ertürk, Ö., Değirmenci, A., Yurdakul Ertürk, E., Atlı Şekeroğlu, Z., Çol Ayvaz, M., & Konaş Yedier, S. (2021). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of some analgesic or anti-inflammatory drugs. *Biologia*.