



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**AKRİLAMİDİN 3T3 EMBRİYONİK FİBROBLAST
HÜCRELERİNDE OLUŞTURDUĞU GENOTOKSİSİTEYE
LUTEOLİNİN ETKİSİ**

Burcu KESKİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Yasemin AYDIN**

Nisan, 2024

İSTANBUL

Bu alışma, 19.04.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Yasemin AYDINI(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Banu ORTA YILMAZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN
Marmara Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 39431 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Keskin B., Orta Yılmaz B., Aydın Y., Luteolin alleviates genotoxicity by attenuating micronucleus formation and cellular damage in acrylamide-exposed embryonic fibroblast cells. 6th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2023) Ekim 11-13, 2023. , Ankara, Türkiye, 11 - 13 Ekim 2023, ss.292

ÖNSÖZ

Bu çalışma, akrilamidin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde oluşturduğu genotoksisiteye luteolinin etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Bugünkü bilgi ve tecrübeye sahip olmamı sağlayan, yüksek lisans eğitimim esnasında bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yasemin AYDIN'a ve görüşleri ile katkıda bulunup destek olan hocam Sayın Doç. Dr. Banu ORTA YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince bana destek ve yardımcı olan arkadaşlarım Biyolog Hatice KURTEL, Biyolog Ertan ÇALMAZ, Biyolog İremnur SARIALIOĞLU, Biyolog Gülşah ARMUT'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca desteğini her zaman hissettiğim ve beni yüreklendiren sevgili babam Saadettin KESKİN'e, bana her zaman doğru yolu gösteren ve kıymetli nasihatler veren annem Şermin KESKİN'e, doğru zamanda doğru esprisleriyle beni güldüren sevgili abim Mehmet Burak KESKİN'e, motivasyonuma önemli katkıda bulunan ve birlikte zaman geçirmekten keyif aldığım sevgili kız kardeşim Zehra Begüm KESKİN'e teşekkür ederim.

Nisan 2024

Burcu KESKİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. EMBRİYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİ	3
2.2. AKRİLAMİD	5
2.2.1. Genel Özellikler.....	5
2.2.2. Akrlamid Toksisitesi.....	8
2.3. GENOTOKSİSİTE	10
2.3.1. Genotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	11
2.3.1.1. Mikronükleus Testi	11
2.3.1.2. Komet Testi	12
2.4. APOPTOZ.....	13
2.4.1. Apoptoz Mekanizmaları	13
2.4.2. Apoptozun Belirlenmesi	15
2.5. LUTEOLİN	16
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	20
3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ	20
3.3. AKRİLAMİD VE LUTEOLİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI.....	21
3.4. SİTOTOKSİSİTE.....	22
3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi	22
3.4.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Testi.....	22
3.5. GENOTOKSİSİTE	23

3.5.1. Mikronükleus Testi	23
3.5.2. Komet Testi	24
3.5.2.1. Komet Solüsyon Hazırlığı	25
3.6. APOPTOZ/NEKROZ	26
3.6.1. Propidium İyodür/Hoechst Yöntemi	26
3.6.1.1. Propidium İyodür/Hoechst Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	26
3.6.1.2. Propidium İyodür/Hoechst Yönteminin Uygulanması	26
3.6.1.3. Hesaplama	27
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	27
4. BULGULAR	28
4.1. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI	28
4.1.1. MTT Bulguları	28
4.1.2. Laktat Dehidrogenaz Testi Bulguları	29
4.2. GENOTOKSİSİTE BULGULARI	30
4.2.1. Mikronükleus Bulguları	30
4.2.2. Komet Bulguları	34
4.3. APOPTOZ BULGULARI	40
4.3.1. Propidium İyodür/Hoechst Bulguları	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.2.1.1: Embriyonik fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.	3
Şekil 2.2.1.1: Akrilamidin kimyasal yapısı.	5
Şekil 2.2.1.2: Akrilamidin gıdalardaki oluşum mekanizması (Pietropaoli ve diğ., 2022).	6
Şekil 2.4.1.1: Apoptoz mekanizmaları (Bock ve Tait, 2019).	14
Şekil 2.4.2.1: Luteolinin biyosentezi (Muruganathan ve diğ., 2022).	18
Şekil 4.1.1.1: Embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan akrilamid ve luteolinin % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkisi (*:kontrol göre, #:luteoline göre, ***p<0,001)..	28
Şekil 4.1.2.1: 3T3 Embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan akrilamid ve luteolin konsantrasyonlarının LDH aktivitesi üzerinde konsantrasyona bağlı etkisi (*:kontrol göre, #:luteoline göre, ***p<0,001)).	29
Şekil 4.2.1.1: Akrilamid ve luteolinin embriyonik fibroblast hücrelerindeki çoğalma indeksi oranları *:kontrol göre (***p<0,005, **p<0,05).	32
Şekil 4.2.1.2: Akrilamid ve luteolinin embriyonik fibroblast hücrelerindeki nükleer bölünme indeksi oranları *:kontrol göre, #luteoline göre (**p<0,05, ###p<0,05, #p<0,5).	32
Şekil 4.2.1.3: A) Mononükleatlı hücre, B) Binükleatlı hücre, C) Trinükleatlı hücre, D) Tetranükleatlı hücre.;.....	33
Şekil 4.2.1.4: Akrilamid uygulanan 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde A) Mikronükleus, B) Nükleer tomurcuk, C) Nükleoplazmik köprü.	33
Şekil 4.2.2.1: A1 (0,5 mM) grubuna ait floresan görüntüsü (40X).	35
Şekil 4.2.2.2: Kontrol grubuna ait floresan görüntüsü (40X).	35
Şekil 4.2.2.3: A3 (2 mM) grubuna ait floresan görüntüleri (40X).	36
Şekil 4.2.2.4: A2 (1 mM) grubuna ait floresan görüntüleri (40X).	36
Şekil 4.2.2.5: A1L grubuna ait floresan görüntüleri (40X).	37
Şekil 4.2.2.6: Luteolin grubuna ait floresan görüntüleri (40X).	37

Şekil 4.2.2.7: A3L grubuna ait floresan görüntüleri (40X).....	38
Şekil 4.2.2.8: A2L grubuna ait floresan görüntüleri (40X).....	38
Şekil 4.2.2.9: Pozitif kontrol grubuna ait floresan görüntüleri (40X).....	39
Şekil 4.3.1.1: Kontrol grubuna ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri. →:canlı hücre	41
Şekil 4.3.1.2: A1 (0,5 mM) grubuna ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri. →:canlı hücre ◁: apoptotik hücre.....	41
Şekil 4.3.1.3: A2 (1 mM) grubuna ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri. →:canlı hücre ◁: apoptotik hücre	42
Şekil 4.3.1.4: A3 (2 mM) grubuna ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri. →:canlı hücre ◁: apoptotik hücre ⇨:nekrotik hücre	42
Şekil 4.3.1.5: A1L grubuna ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri. →:canlı hücre	43
Şekil 4.3.1.6: Luteolin grubuna ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri. →:canlı hücre	43
Şekil 4.3.1.7: A3L grubuna ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri. →:canlı hücre ◁: apoptotik hücre	44
Şekil 4.3.1.8: A2L grubuna ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri. →:canlı hücre ◁: apoptotik hücre	44

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.2.1.1: Akrilamidin bazı kimyasal özellikleri.	5
Tablo 2.2.1.2: Bazı gıdaların akrilamid içeriği.	7
Tablo 2.4.2.1: Luteolinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.	17
Tablo 2.4.2.2: Bazı meyve ve sebzelerin luteolin içeriği (mg/100g) (Manzoor ve diğ., 2019).	17
Tablo 2.4.2.1: Akrilamid ve luteolin maruziyet grupları.	21
Tablo 4.2.1.1: Akrilamid ve luteolinin embriyonik fibroblast hücrelerinde mikronükleus içeren binükleatlı ve mononükleatlı hücre popülasyonu üzerine etkileri ve nükleer tomurcuk oluşum sıklığı oranları *:kontrolle göre, #luteoline göre (*p<0,05, **p<0,005, #p<0,5).	31
Tablo 4.2.2.1: 3T3 Embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan akrilamid ve luteolin konsantrasyonlarının komet testi ile elde edilen DNA hasarı sonuçları *:kontrolle göre, #:luteoline göre (p<0,01, p<0,001).	34
Tablo 4.3.1.1: Akrilamid ve luteolinin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde apoptoz ve ölü oranları *:kontrolle göre, #:luteoline göre (p<0,01, p<0,001).	40

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
SNFA	: İsveç Ulusal Gıda İdaresi
3-APA	: 3-aminopropionamid
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
CYP2E1	: Sitokrom P450
GST	: Glutasyon S-transferaz
GSH	: Glutasyon
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
DMSO	: Dimetil sülfoksit
LDH	: Laktat dehidrogenaz
NAD	: Nikotinamid adenosin dinükleotid
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKRİLAMİDİN 3T3 EMBRİYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİNDE OLUŞTURDUĞU GENOTOKSİSİTEYE LUTEOLİNİN ETKİSİ

Burcu KESKİN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Yasemin AYDIN

Akrilamid, gıdaların hazırlanmasında uygulanan pişirme, fırınlama, kızartma ve kavurma gibi işlemler esnasında açığa çıkan beyaz, kristal yapıda, kokusuz bir bileşiktir. Akrilamid, endüstride poliakrilamid olarak kullanılmasının yanı sıra sigara dumanında bulunmakta, atık su, kanalizasyon ve içme suyu arıtımı sürecinde de tespit edilmiştir. Patates kızartması, kahve ve ekmek gibi günlük hayatta sıklıkla tüketilen gıdalardaki varlığı, akrilamidin vücuda alınımını kaçınılmaz kılmaktadır. Son yıllarda araştırmacılar, akrilamid gibi sürekli maruz kaldığımız maddelerin vücutta oluşturduğu sitotoksik ve genotoksik etkilerini en aza indirmenin yollarını aramaktadırlar. Bu da araştırmacıları flavonoidler gibi bitki sekonder metabolitlerini yönlendirmiştir. Bitki sekonder metabolitleri olan flavonoidler, antioksidan özellikleri sebebiyle meyve ve sebzelerdeki vitamin ve enzim depolarını korumakla birlikte hücrel hasara karşı savunma sağlarlar. Luteolin diğer flavonoidlere kıyasla DNA koruyucu etkisi yüksek olan güçlü bir antioksidandır. Kekik, papatya çayı, enginar, kereviz, brokoli ve havuç luteolin içeriği bakımından zengindir. Güncel literatür çalışmaları ele alındığında, luteolinin sitotoksikite ve genotoksikiteye karşı iyileştirici etkisi olduğu bilinse de akrilamid genotoksikitesine karşı luteolinin etkisi henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada, akrilamidin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerindeki sitotoksikitesi hücre canlılık testi (MTT) ve laktat dehidrogenaz testi ile belirlenmiştir. Araştırmada çalışılacak konsantrasyonların belirlenmesinin ardından akrilamidin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı ve bu hasara karşı luteolinin koruyucu etkisi mikronükleus ve komet testi ile değerlendirilmiştir. Akrilamidin embriyonik fibroblast hücrelerinde meydana getirdiği

apoptoz oranları Propidium iyodür/Hoechst ikili floresan boyama ile tespit edilerek, ayrıca luteolinin etkisi araştırılmıştır.

Nisan 2024, 79 sayfa.

Anahtar kelimeler: Akrilamid, luteolin, 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri, genotoksisite, sitotoksisite



SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE EFFECT OF LUTEOLIN ON THE GENOTOXICITY INDUCED BY ACRYLAMIDE IN 3T3 EMBRYONIC FIBROBLAST CELLS

Burcu KESKİN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Yasemin AYDIN

Acrylamide is a white crystalline, odorless compound that is formed during processes such as cooking, baking, frying and roasting applied in the preparation of foods. In addition to being used as polyacrylamide in industry, acrylamide is also found in cigarette smoke and has been detected in wastewater, sewage and drinking water treatment processes. Acrylamide ingestion is inevitable due to its existence in foods that are often consumed in daily life, such as bread, coffee, and french fries. In recent years, researchers have been looking for ways to mitigate the cytotoxic and genotoxic effects of substances such as acrylamide that we are constantly exposed to in the body. This led researchers to plant secondary metabolites such as flavonoids. Flavonoids, which are plant secondary metabolites, protect the vitamin and enzyme stores in fruits and vegetables due to their antioxidant properties and provide defense against cellular damage. Compared to other flavonoids, luteolin is a potent antioxidant with a strong DNA protecting activity. Thyme, chamomile tea, artichokes, celery, broccoli, and carrots are rich in luteolin content. According to the most recent studies in the literature, luteolin is known to have an ameliorative effect against cytotoxicity and genotoxicity, but its impact on acrylamide genotoxicity is not yet known. In this study, the cytotoxicity of acrylamide in 3T3 embryonic fibroblast cells was determined by cell viability assayv (MTT) and lactat dehydrogenase test. After determining the acrylamide concentrations to be studied in the research, DNA damage caused by acrylamide in 3T3 embryonic fibroblast cells and the protective effect of luteolin against this damage were evaluated by micronucleus and comet assay. Apoptosis rates caused

by acrylamide in embryonic fibroblast cells were determined by Propidium Iodide/Hoechst dual fluorescent Staining and the effect of luteolin was also investigated.

April 2024, 79 pages.

Keywords: Acrylamide, luteolin, 3T3 embryonic fibroblast cells, genotoxicity, cytotoxicity



1. GİRİŞ

Akrilamid, gıdaların hazırlanması esnasında açığa çıkan ısı kaynaklı gıda kontaminantları grubuna ait bir bileşiktir. Gıdalardaki keşfinden önce endüstride kağıt, boya ve plastik üretiminde poliakrilamid olarak kullanıldığı bilinmektedir. Endüstrideki kullanımına ek olarak, içme suyu arıtımında ve kanalizasyonda da akrilamid varlığı tespit edilmiştir (Rifai ve Saleh, 2020). İnsanlar için çevresel ve mesleki maruziyet oluşturabilen akrilamidin vücuda alımının kaçınılmaz olması, bu bileşiğin toksisitesi ile ilgili birçok çalışmaya konu olmuştur. Deney hayvanları ve hücre soylarıyla yapılan çalışmalar akrilamidin genotoksik bir bileşik olduğunu göstermiştir (Kontaş Yedier ve diğ., 2022; Nowak ve diğ., 2020; Huang ve diğ., 2018; Manière ve diğ., 2005). Akrilamid, insan sağlığı için endişe uyandırması sebebiyle Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından karsinojen (Grup 2A) olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 1994).

Akrilamid, gıda içeriği karbohidrat ve protein açısından zengin gıdaların 120°C ve üzeri sıcaklıklarda kızartma, kavurma ve fırınlama gibi pişirme teknikleriyle hazırlanması esnasında indirgen şekerler ve aminoasitler arasındaki etkileşimlerle açığa çıkar (Pietropaoli ve diğ., 2022). İnsanların günlük hayatta beslenme alışkanlıkları nedeniyle tükettikleri ekmek, kahve ve patates gibi gıdalar başlıca akrilamid kaynağı olarak bilinmektedir (Lineback ve diğ., 2012). Kronik akrilamid maruziyeti obezite, diyabet, kardiyovasküler bozukluklar ve kanser gibi çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Ghanayem ve diğ., 2010). Akrilamidin meydana getirdiği genotoksik ve sitotoksik etkilerin bilinmesi, araştırmacıları gıdalardaki akrilamid içeriğinin azaltılması yönünde stratejiler geliştirmesine ve etkisinin en aza indirilmesi için çalışmalar yapılmasına yönlendirmiştir (Rifai ve Saleh, 2020). Bu çalışmalar arasında, antioksidan olduğu bilinen flavonoidlerin hücrelerde meydana gelen toksisiteye karşı koruyucu ve iyileştirici özelliğinin araştırılması yer almaktadır (Panche ve diğ., 2016).

Flavonoidler, bitkilerde bulunan polifenolik yapıda sekonder metabolitlerdir. Bitkilerde hücre büyümesinin düzenlenmesi, vitamin ve enzim depolarının korunması ve hücre hasara karşı savunma gibi görevleri vardır (Panche ve diğ., 2016). Flavonoidler arasında yer alan luteolin, aktif antioksidan özelliğe sahip olmasına ek olarak antiinflamatuvar, antiapoptotik, antiviral ve antibakteriyel özellikleri bulunan koruyucu bir bileşiktir. Luteolin, koruyucu etkisini serbest radikal oluşumunu aktif bir şekilde engelleyerek ve sinyal yollarını düzenleyerek

göstermektedir (Tiwari ve Mishra, 2017; Mahdiani ve diğ., 2022). Luteolin içeriğinin en fazla olduğu meyve ve sebzeler arasında kereviz, maydanoz, brokoli, elma ve havuç sayılabilir (Lin ve diğ., 2008). Luteolinin antioksidan etkisi, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla aydınlatılmıştır (Ramos ve diğ., 2010; Alekhya Sita ve diğ., 2019). Ancak luteolinin, akrilamid genotoksisitesine karşı etkisi henüz bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında, akrilamidin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerindeki genotoksik etkileri araştırılıp luteolinin bu genotoksisiteye karşı iyileştirici etkileri açığa çıkarılmıştır. Bu tez çalışmasının “Genel Kısımlar” başlığı altında embriyonik fibroblast hücrelerinin genel özellikleri hakkında, tez çalışmasında fibroblast hücrelerine uygulanan akrilamid bileşiğinin genel özellikleri, oluşum mekanizmaları, gıdalarda bulunma oranları ve toksisitesi hakkında, genotoksisite tanımı ve genotoksisitenin gösterilme yöntemleri hakkında, apoptoz tanımı ve yolları, apoptotik mekanizmalar ve apoptozun gösterilme yöntemleri hakkında ve son olarak bir antioksidan molekül olan luteolinin fiziksel ve kimyasal özellikleri, besinlerde bulunma oranları ve antioksidan özellikleri hakkında ayrıntılı bilgiler verilmiştir.

Tezin “Malzeme ve Yöntem” başlığı altında tez kapsamında laboratuvarında yapılan uygulamalar ve deneyler ayrıntılı şekilde açıklanmıştır. “Bulgular” başlığı altında tez kapsamında yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler değerlendirilerek istatistik uygulanmış ve elde edilen grafik ve tablolar bu bölümde açıklanmıştır.

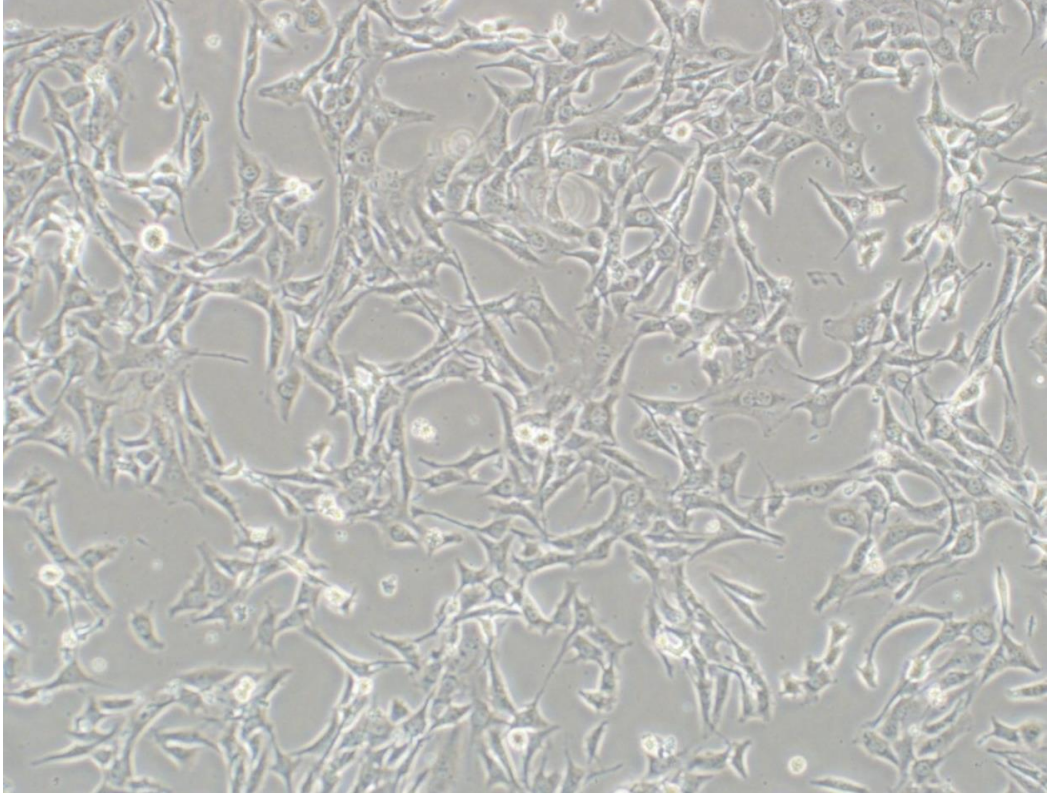
Yapılan bu tez çalışmasının “Tartışma ve Sonuç” başlığında ise, istatistiksel olarak değerlendirilmiş veriler, literatürdeki araştırmalarla yorumlanarak bu tez çalışması sonucunda varılan sonuç ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışmasında, akrilamidin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde oluşturduğu genotoksisitenin ve bu genotoksisiteye karşı luteolinin etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, akrilamidin ve luteolinin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerindeki etkileri hücre canlılığı, lipid peroksidasyonu, mikronükleus, komet ve apoptoz yöntemleriyle değerlendirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. EMBRİYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİ

Fibroblastlar ilk olarak 1858'de Alman patolog Rudolf Virchow tarafından “bağ dokusundaki iğ şeklindeki hücreler” olarak tanımlanmıştır. Ardından, Ernst Ziegler, yeni bağ dokusu hücreleri üreten bu hücrelerin karşılığını “fibroblast” olarak önermiştir (Ziegler, 1900). Fibroblastlar deri, akciğer, karaciğer, kalp, böbrek, göz ve diğer organların yapısında bulunan ekstraselüler matriks içinde gömülü halde, epitelyal veya immün olmayan, yassı, iğ şeklinde morfolojiye sahip, oval çekirdekli hücreler olarak tanımlanmasına ek olarak kendi kendini yenileyebilme yeteneğinde olan mezenşimal kökenli hücrelerdir (Kalluri, 2016). Sitoplazmasında çok sayıda granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi cisimciği bulunmaktadır (Dick ve diğ., 2022). Bağ dokusunda yaygın olarak bulunan fibroblastlar, vücudun dinamik yapısının korunmasında, doku ve organları birbirine bağlayarak yapısal olarak dayanıklı olmasında ve hasar onarımında önemli rol oynar (Wlaschek ve diğ., 2021).



Şekil 2.2.1.1: Embriyonik fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.

Fibroblastlar, bağ dokusunda ekstraselüler matriks bileşenlerinin sentezinden, organizasyonundan, yenilenmesinden ve depolanmasından sorumludurlar (Plikus ve diğ., 2021). Ekstraselüler matriks bileşenleri olan tip I, tip III, tip IV kollajen ve elastin gibi yapısal proteinler, laminin ve fibronektin gibi bağlayıcı nitelikte olan proteinler, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar fibroblast hücreleri tarafından sentezlenmektedir (Kendall ve Feghali-Bostwick, 2014). Fibroblastların ekstraselüler matriks bileşenlerini sentezlemesi doku ve organların bütün bir yapıda olmasını sağlamaktadır. Bunun yanında fibroblastlar pek çok fonksiyona sahiptir: Progenitör hücre niteliğinde kendi kendini yenileyerek fibroblast üretimini sağlarlar, doku veya organ hasarına karşı stroma sentezini sağlarlar, sinyal yollarıyla kök hücre nişleriyle iletişime geçerek farklılaşmayı başlatırlar ve makrofaj polarizasyonu, sitokin sentezi gibi immün sistem düzenleyicilerini organize ederler (Plikus ve diğ., 2021).

Embriyonik fibroblast hücreleri, 1968'de Aaronson ve Todaro tarafından 14-17 günlük BALB/3T3 fare embriyolarından izole edilmiştir (Aaronson ve Todaro, 1968). Embriyonik fibroblast hücreleri sonsuz bölünme yeteneğindedirler ve tek tabakalı olarak büyüyerek kontak inhibisyonu sebebiyle tabakalaşma göstermezler (Nakamura, 2013).

2.2.AKRİLAMİD

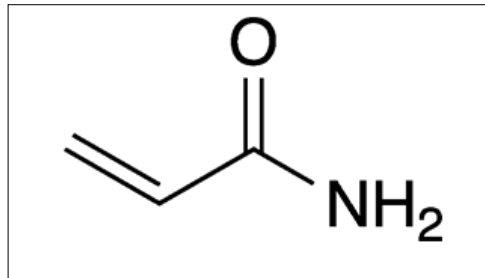
2.2.1. Genel Özellikler

Akrilamid (AA) kokusuz, kristal, beyaz renkli ve polar yapıda bir bileşiktir. Polar yapıda olması sebebiyle su, etanol, metanol ve aseton gibi polar çözücülerde çözünür. Yüksek reaktiviteye sahip olduğu bilinen akrilamidin bu özelliği, doymamış çift bağ içeren bir amid olmasıyla ilişkilidir (Törnqvist, 2022). Yapısında bulunan çift bağ, akrilamidin amino ve sülfhidril gruplarıyla etkileşimine yatkınlık sağlamaktadır (Friedman, 2003). Şekil 2.2.1.1' akrilamidin kimyasal yapısı gösterilmiştir. Kimyasal yapısında çift bağ bulunan akrilamidin bazı kimyasal özellikleri tablo 2.2.1.1'de verilmiştir.

Tablo 2.2.1.1: Akrilamidin bazı kimyasal özellikleri.

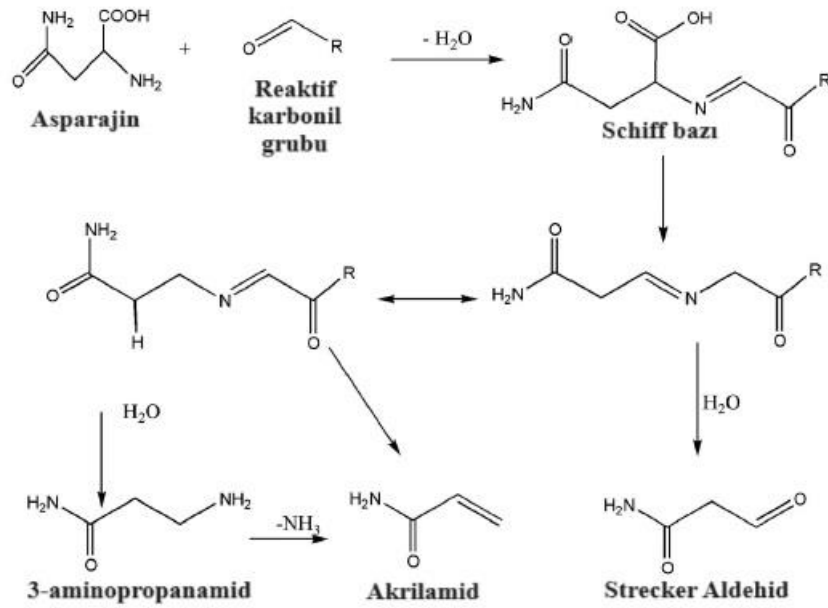
Moleküler Ağırlık	71,08 g/mol
Molekül Formülü	C ₃ H ₅ NO
Kaynama Noktası	192,6 °C
Erime Noktası	84,5 °C
Parlama Noktası	138 °C
Yoğunluk	1,13 g/cm ³

Akrilamidin, gıdalardaki keşfinden önce iyi bir yapışkan olması, yüksek hidrofilliği ve nemi absorbe etmesi (higroskopisite) sebebiyle kağıt ve tekstil endüstrilerinde poliakrilamid olarak kullanıldığı bilinmekteydi (Voronova ve diğ., 2020). İçme suyu arıtımında çökelti oluşturma süreçlerinde ve kanalizasyonda da tespit edilmesi, akrilamide maruziyetin kaçınılmaz olduğunu



Şekil 2.2.1.1: Akrilamidin kimyasal yapısı.

göstermiştir (King ve Noss, 1989; Friedman, 2003). Akrilamidin sigara dumanının bir bileşeni olduğu ve sigara başına ortalama 1-7,991 µg akrilamid bulunduğu hesaplanmıştır (Harahap ve diğ., 2021). Akrilamidin gıdalardaki varlığı ilk olarak 2002 yılında İsveç Ulusal Gıda İdaresi (SNFA) tarafından raporlanmıştır. Bu raporun ardından yapılan analizler sonucunda, akrilamidin özellikle karbohidrat ve protein açısından zengin gıdaların 120 derece ve üzeri sıcaklıklarda hazırlanması (kızartma, haşlama ve fırınlama) ve yüksek basınçta konserve üretimi esnasında Maillard reaksiyonuyla açığa çıktığı tespit edilmiştir (Blank, 2005; Pietropaoli ve diğ., 2022). Ürün içeriğindeki akrilamid öncülleri indirgen şekerler ve asparajin aminoasidi arasında meydana gelen Maillard reaksiyonu; sitrik asit veya malik asit gibi organik asitlerin dehidrasyonu ve dekarboksilasyonu; nişasta ve aminoasitlerin ayrışmasıyla oluşan akrolein ve akrilik asidin etkileşimi sonucunda meydana gelmektedir (Sharp, 2003). Esmerleşme reaksiyonu da denilen ve gıdalara tat, koku, lezzet veren Maillard reaksiyonu üç basamakta gerçekleşir: ilk basamak gıdaların yüksek sıcaklığa ve basınca maruz kalmasıyla yoğunlaşmış asparajin aminoasidinin oluşması, ikinci basamak asparajin aminoasidi ile karbonil gruplarının karşılıklı olarak etkileşime girmesi ve üçüncü basamak asparajinin yüksek sıcaklık ve basınçta Strecker reaksiyonuyla aldehid ve amonyaya parçalanarak akrilamidin gıdalardaki ilk formu olan 3-aminopropionamid (3-APA) bileşiğini oluşturmasıdır (Peivasteh-Roudsari ve diğ., 2024). Akrilamidin gıdalardaki oluşumu şekil 2.2.1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2.1.2: Akrilamidin gıdalardaki oluşum mekanizması (Pietropaoli ve diğ., 2022).

Akrilamidin gıdalardaki oluşumu, pişirme sıcaklığına ve süresine bağlıdır. Yüksek ve uzun süreli sıcaklık uygulaması Maillard reaksiyonunun meydana gelmesine uygun bir zemin hazırlar (Lund ve Ray, 2017). Gıda içeriğindeki glukoz veya fruktoz gibi indirgen şekerler ve asparajın içeriğinin Maillard reaksiyonuyla meydana gelecek akrilamid miktarını etkilediği pek çok çalışmayla gösterilmiştir (Nguyen ve diğ., 2017; Muttucumaru ve diğ., 2017). Akrilamidin gıdalarda oluşumunun azaltılması yönünde pek çok strateji geliştirilmiştir. Bunlar arasında ilk olarak ürünlerin düşük ısılarda hazırlanması vardır. Ancak bu yol kültürlerin yeme alışkanlığı ile çelişebilmektedir. Bir diğer yol, agronomik teknikler geliştirilerek gıda içeriğindeki indirgen şeker ve asparajın aminoasidinin azaltıldıktan sonra hasat edilmesidir (Pietropaoli ve diğ., 2022). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) akrilamidin tolere edilebilir günlük alım dozunu, yetişkinlerde ve çocuklarda sırasıyla 0,3-0,6 µg/kg ve 0,4-0,6 µg/kg olarak belirlemiştir. Akrilamidin yüksek miktarlarda açığa çıktığı gıdalar arasında kızartılmış patates ürünleri, ekmek, bisküvi, mısır gevreği, kahve ürünleri, siyah zeytin ve et ürünleri sayılabilir (Rifai ve Saleh, 2020; Yan ve diğ., 2023). Akrilamid içeriği yüksek olan bazı gıdalar tablo 2.2.1.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2.1.2: Bazı gıdaların akrilamid içeriği.

Patates kızartması	5-1999 µg/kg
Patates cipsi	5-8440 µg/kg
Kahvaltılık mısır gevreği	11-1057 µg/kg
Ekmek	10-130 µg/kg
Kızartılmış ekmek	25-1430 µg/kg
Pastane ürünleri	18-3324 µg/kg
Konserve siyah zeytin	123-1925 µg/kg
Kavrulmuş kahve	135-1139 µg/kg
Çikolata ürünleri	2-826 µg/kg

2.2.2. Akrilamid Toksisitesi

Akrilamidin, gıdalardaki keşfini takiben *in vitro* ve *in vivo* modellerle yapılan çalışmalar sonucunda nörotoksisiteye, hepatotoksisiteye, üreme toksisitesine, genotoksisiteye ve kanserojeniteye neden olduğu açığa çıkarılmıştır (Yan ve diğ., 2023). Akrilamidin, merkezi ve periferik sinir sisteminde aksonal dejenerasyona, apoptoza, asetilkolinesteraz aktivitesini azaltmaya neden olarak nörotoksisiteye yol açtığı bilinmektedir (Kopańska ve diğ., 2022, Peivasteh-Roudsari ve diğ., 2024). Astrosit ve SH-SY5Y nöroblastoma hücre soyuyla yapılan *in vitro* bir çalışmada, hücrelerin akrilamide karşı hassaslaştığı ve nöronal hasarla ilişkili gen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Park ve diğ., 2024). Akrilamid, nörotransmisyonu direkt yolla inhibe ederek nöronlar arasındaki sinyal alışverişini engeller, nörotransmitter düzeylerinde anormal değişikliğe neden olarak nöronlarda kalıcı hasara neden olur ve aksonal taşınmayı baskılayarak dejenerasyona yol açar (Peivasteh-Roudsari ve diğ., 2024). Akrilamidin vücuda alındıktan sonra ince bağırsaklar tarafından emilmesi, enterik sinir sistemi nöronlarında hasara neden olarak gastrointestinal bozukluklara yol açtığı rapor edilmiştir (Govindaraju ve diğ., 2024). Akrilamidin toksik etkilerinin erkek sıçanlarda araştırıldığı *in vivo* bir çalışmada, beyin ve karaciğer dokularında motor fonksiyonların hasarına yol açtığı, malondialdehit seviyesini anlamlı düzeyde arttırarak oksidatif strese ve GSH seviyelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Rahbardar ve diğ., 2021). Malondialdehit seviyesinin artışının, beyinde redoks dengesini bozarak Alzheimer hastalığıyla sonuçlanan nöronal hücre dejenerasyonuna neden olabileceği tespit edilmiştir (Govindaraju ve diğ., 2024). Ek olarak, akrilamidin mikrogliya hücrelerindeki glikolizle ilgili enzimlerin aktivitesini baskılayarak, TCA döngüsündeki substrat miktarını azaltır ve mikrogliya hücrelerindeki metilglioksal birikimini bozar. Bu bozulma doğrudan merkezi sinir sistemi bağışıklığını etkilemektedir (Yan ve diğ., 2023). Akrilamidin, vücuda alındığında ilk olarak karaciğerde metabolize olmaya başlaması çalışmaları hepatotoksisiteye yönlendirmiştir. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada, akrilamidin karaciğerdeki GSH seviyelerinde anlamlı bir düşüşe neden olduğu ve antioksidan enzim seviyesini azalttığını göstermiştir. Bunlara ek olarak, karaciğer enzimleri (ALT, AST ve ALK) seviyesini arttırmış ve süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinde azalmaya yol açmıştır (Saleh, 2020). Sonuçta, akrilamidin karaciğerdeki lipid metabolizmasında bozukluklara yol açarak doku hasarının meydana gelebileceği öne sürülmüştür (Govindaraju ve diğ., 2024). Akrilamidin erkek üreme sistemi üzerindeki toksik etkisi pek çok üreme parametresiyle değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, akrilamidin sperm anormalliğine, sperm

konsantrasyonunda azalmaya, sperm hareketliliğinde değişikliğe, seminifer tübüllerde dev hücre ve apoptotik hücre oluşumuna ve Leydig hücrelerinde ciddi hasara neden olabileceği bildirilmiştir (Peivasteh-Roudsari ve diğ., 2024). Akrilamidin erkek üreme sisteminde, seminifer tübüllerde lezyon oluşumuna neden olarak gelişim bozukluklarına yol açtığı rapor edilmiştir (Wang ve diğ., 2010). Dişi üreme sisteminde östrus siklusu değişimine, korpus lutea sayısında azalmaya ve progesteron seviyesinde düşüşe neden olmaktadır. Buna ek olarak, plasenta bariyerinden geçerek fetüse ulaşabilmektedir. Akrilamidin anne sütündeki varlığının tespit edilmesi büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir (Gupta ve diğ., 2023). Akrilamid, kanda ksenobiyotik özellik göstererek eritrositlerde oksidatif hasar meydana getirmesi nedeniyle kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda akrilamid maruziyetinin, kalpte işlev bozukluğuna ve kardiyomiyositlerin çoğalma yeteneğini baskılayarak sayılarının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Huang ve diğ., 2018, Govindaraju ve diğ., 2024). Yüksek ısıl işlem uygulanan gıdalarda açığa çıkan akrilamid, genotoksik ve kanserojen etkilere sahiptir. Akrilamid maruziyeti, meme bezi, tiroid ve merkezi sinir sisteminde tümör oluşumuna neden olur. Akrilamidin DNA yapısında bulunan nükleik bazlarla etkileşime geçerek DNA eklentileri oluşturmaktadır. Bu DNA eklentileri hücrelerde mitojenik bozukluklara yol açarak kardeş kromatit değişimlerini, mikronükleus ve komet oluşumunu ve kromozom aberasyonlarını indüklemektedir (Govindaraju ve diğ., 2024). Akrilamidin güçlü bir genotoksik ajan ve karsinojen olduğunu gösteren çalışmalarda, uzun süreli akrilamid maruziyetinin kadınlarda endokrin ve endometriyal tümöre yol açtığı gösterilmiştir (Gupta ve diğ., 2023). Akrilamid, vücuda alındıktan sonra metabolize olmasıyla birlikte farelerde ve sıçanlarda DNA hasarına, kromozom bozukluklarına ve gen düzeyinde mutasyonlara yol açarak genotoksik etkilere yol açar (Peivasteh-Roudsari ve diğ., 2024). Günlük diyetle sıklıkla tüketilen akrilamidin glikoz metabolizması ile ilişkili bulunmuştur. Bu, insülin seviyelerinde değişikliğe neden olarak insülin reseptör substratının sinyal iletimini engelleyerek diyabetin etkilerini daha da arttırabilmektedir (Yan ve diğ., 2023).

2.3.GENOTOKSİSİTE

Genotoksisite terimi, hücrelerin genetik materyalleri olan DNA veya RNA'nın bütünlüğünün bozulmasına neden olan maddelerin meydana getirdiği etki olarak tanımlanmaktadır. Genotoksik maddeler, DNA veya kromozomlarda hücresel ve yapısal işlevleri bozarak pek çok hasara neden olabilmektedir (Saks ve diğ., 2017). Genotoksisite, hücre içinde kodlanan aminoasitlerle etkileşime girerek doğrudan veya dolaylı yolla DNA üzerinde farklı etkiler gösterir. Bu etkiler arasında tek veya çift zincir kırıkları, kromozom aberasyonları, nokta mutasyonları, delesyonlar ve mikronükleus oluşumları sayılmaktadır (Phillips ve Arlt, 2009). Genotoksinlerin hücrelerde meydana getirdiği ileri boyuttaki hasarlar, DNA onarım mekanizmalarının ve hücrelerarası iletişimin bozulmasına neden olmaktadır (Dusinska ve diğ., 2012).

Canlı sistemlerin maruz kaldıkları genotoksinler klastojenik veya anojenik ajanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Klastojenik ajanlar, DNA'da yapısal hasar meydana getiren ve çoğu zaman kanser oluşturan ajanlardır. Anojenik ajanlar, hücre bölünmesi esansında etkili olan molekülleri sayısal olarak etkileyerek anöploidi oluşturan ajanlardır (Stopper ve Müller, 1997). DNA hasarı, endojen ve eksojen süreçlerle oluşabilmektedir: Endojen kaynaklı DNA hasarı hücre içi reaktif oksijen türleri ve aminoasit metabolizmasına bağlıyken, eksojen kaynaklı DNA hasarı, akut veya kronik çevresel ve mesleki maruziyet sonucunda meydana gelmektedir (Hartwig ve diğ., 2020). DNA onarım mekanizmalarının ve hücre döngüsünün işlevini etkileyen hasarların meydana gelmesi durumunda apoptoz, otofaji ve yaşlanma olayları görülmektedir (Roos ve diğ., 2015). genotoksinlerin somatik ve üreme hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı kalıtsal hastalıklara yol açabilmektedir. DNA'da veya hücre enerji deposu olan mitokondride meydana gelen hasarlar nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara, üreme sistemi bozukluklarına, yaşlanmaya, metabolik hastalıklara ve hücresel işlev bozukluğuna neden olabilmektedir (Turkez ve diğ., 2017). Isı kaynaklı gıda toksinlerine, ağır metallere ve çeşitli kirleticilere kronik maruziyet veya sigara kullanımı gibi alışkanlıklar DNA'da meydana gelen hasar seviyelerini arttırmaktadır. Bu nedenle, çevre ve insan sağlığı için kimyasal ajanların *in vitro* ve *in vivo* modellerde değerlendirilmesi ve kinetik profilinin aydınlatılması önem arz etmektedir (Elmassry ve diğ., 2020). Hücre kültüründe çeşitli kimyasal ajanların genotoksisitesini belirlemek için yapılan başlıca testler arasında ames testi, mikronükleus testi,

komet testi, kromozom aberasyonu testi ve kardeş kromatit değişimi testi gibi DNA, gen ve kromozom hasarını tespit edebilen yöntemler yer almaktadır (Saks ve diğ., 2017).

2.3.1. Genotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

2.3.1.1. Mikronükleus Testi

Mikronükleus testi, interfaz evresindeki hücrelerin sitoplazmasında mikronükleus gibi küçük ve zara bağlı DNA parçaları oluşturan klastojenik ve anojenik kimyasalların tespiti için kullanılan bir mutajenite testidir (Sioen ve diğ., 2020). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar için en önemli yöntemlerden biri olarak kabul edilen mikronükleus testi Fenech ve Morley tarafından 1985 yılında geliştirilmiştir (Fenech ve Morley, 1985). Çevre yönetimiyle ilgili kurumların, kimyasal ve biyogüvenlik sebepleriyle hazırladıkları ve kimyasalların değerlendirilmesinde kullanılan hassas yöntemleri de içeren yönergeler arasında bulunan mikronükleus testi, uluslararası kabul görmüş testlerinden biridir (OECD, 2016). Mikronükleus, hücre sitoplazmasında bulunan, yuvarlak ve kromatin içerikli yapılardır. Hücrelerde meydana gelen DNA hasarının, genotoksik stresin ve genomdaki yüksek orandaki değişikliklerle meydana gelen genomik kararsızlığın belirteci olan mikronükleuslar, metabolizma aktivitesi ve yaşlanma gibi doğal süreçlerle de meydana gelebilir (Sommer ve diğ., 2020). Mikronükleus DNA zincirinde, DNA bağlantılarında veya tamir mekanizmasında meydana gelen hasarlar sonucunda oluşan asentrik kromozomlardan, sentromerlerde veya kinetokorda meydana gelen hasar sonucu kromozomların yanlış ayrışmasından, disentrik kromozom kırıklarından ve kromozom dışı yapıların (double minutes) birleşmesinden ve hücrelerde meydana gelen yüksek değişikliğin neden olduğu kromozom kararsızlığından kökenlenebilir (Palanikumar ve Panneerselvam, 2011; Sommer ve diğ., 2020). Hücre bölünmesi esnasında, nükleusun ekstrakromozomal yapıları (double minutes) nüklear zara göç ederek tomurcuk oluşumunu sağlar. İlerleyen fazlarda nüklear zardan ayrılarak nükleusa yakın konumda oluşan mikronükleus hücre sitoplazmasında ayırt edilebilir (Kisurina-Evgenieva ve diğ., 2016). Sitokinezi durdurulmuş mikronükleus testinde, hücre bölünmesinin sitokinez evresi sitokalazin B ile durdurulur. Sitokalazin B, aktin filamentlerinin polimerize olmasını engelleyerek sitoplazma bölünmesini durdurarak kontraktıl mikrofilamentlerin oluşumunu sağlar (Hartwig ve Stossel, 1976). Sitokinezi durdurulmuş mikronükleus testi, hücrelerin bir kez bölünerek oluşan mikronükleus içeren binükleat hücre, nükleoplazmik köprü ve nüklear tomurcuk miktarlarına göre değerlendirilir. Bu kriterler, kromozom kaybı veya hasarı, DNA kaybı veya DNA tamir

mekanizmasında görevli komplekslerin hasarını belirlemektedir (Fenech, 2007). Nükleoplazmik köprü ve nüklear tomurcuk DNA hasarı gibi replikatif stres sonucunda meydana gelen genomik kararsızlığın sonucunda oluşan yapılardır (Fenech ve Crott, 2002). Nükleoplazmik köprüler, hücre bölünmesinin anafaz evresinde hücrenin zıt kutuplara çekildiği esnada meydana gelerek test edilen kimyasalın genotoksitesinin belirlenmesini sağlar (Fenech, 2007). Bu nedenle, sitokinezi durdurulmuş mikronükleus testi, genotoksinlerin hücresel düzeydeki etkilerinin gözlemlenmesini sağlayan hassas yöntemlerden biridir.

2.3.1.2. Komet Testi

Komet testi, hücresel düzeyde meydana gelen yapısal aberasyonlarla DNA hasarı oluşturan klastojenlerin etkilerini ve hücrelerin kimyasal ajanlarla etkileşim sonucunda meydana gelen kararsız bölgelerin ve genom mutasyonlarının deneysel olarak tespit edilmesini sağlayan bir genotoksisite testidir (Langie ve diğ., 2015). Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen bu hassas yöntem özellikle ökaryotik canlılarda yüksek güvenilirlikli sonuçlar vermektedir (Ostling ve Johanson, 1984). Testin temel prensibi test edilen kimyasal maddenin DNA'daki çapraz bağları uyarmasının ardından kromozomal DNA'nın stabilize olması ve DNA'nın agaroz jel içinde göç etme yeteneğini azaltarak "kuyruklu yıldız (komet)" görüntüsünün oluşmasına dayanır (Speit ve Hartmann, 2012). Komet testi, DNA hasarına ek olarak, DNA hasarı oluşturan ajanın sistemden çıkarılmasıyla veya iyileştirici maddeyle uygulama yapılmasıyla DNA göçündeki azalma ortadan kaldırılarak DNA onarımının izlenmesini ve tek-çift zincir kırıkları ile baz düzeyinde meydana gelen hasarların ayrımını sağlayan bir yöntemdir (Speit ve Hartmann, 2012; Azqueta ve diğ., 2019). Test edilecek kimyasalın uygulandığı hücrelerin DNA'sında meydana gelen hasar, alkali ortamda ($pH > 13$) çözülen DNA çift sarmalının elektroforez esnasında göç eden hücre materyali derecesiyle değerlendirilir (Speit ve Hartmann, 2022). Elektroforez sonrasında hücrelerin boyanması için kullanılan boyanın DNA hasarının tespit edilmesini etkileyecek olan hücresel RNA'nın parçalanmasını sağlayarak testin güvenilir olmasını sağlamaktadır (Singh ve diğ., 1988). Görüntüleme esnasında hücreler, meydana gelen hasar miktarına bağlı olarak uzun veya kısa kuyruklu yıldız yapısında görünür. Komet testinde hasarlı hücreleri değerlendirmek için belli kriterler bulunmaktadır. Bunlar kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA miktarı, hücrelerin baş kısmının çapı ve kuyruk momentidir (Tice, 2015; Langie ve diğ., 2015). Kuyruk uzunluğu DNA hasarıyla doğru orantılı olarak artış gösteren bir parametredir. Komet testi, hücrelerin bireysel olarak değerlendirilmesini sağlayan nicel bir

yöntem olmasına ek olarak DNA zincirinde meydana gelen kırıkların veya DNA onarımının moleküler düzenlenmesinin anlaşılmasına olanak sağlamaktadır (Collins, 2004).

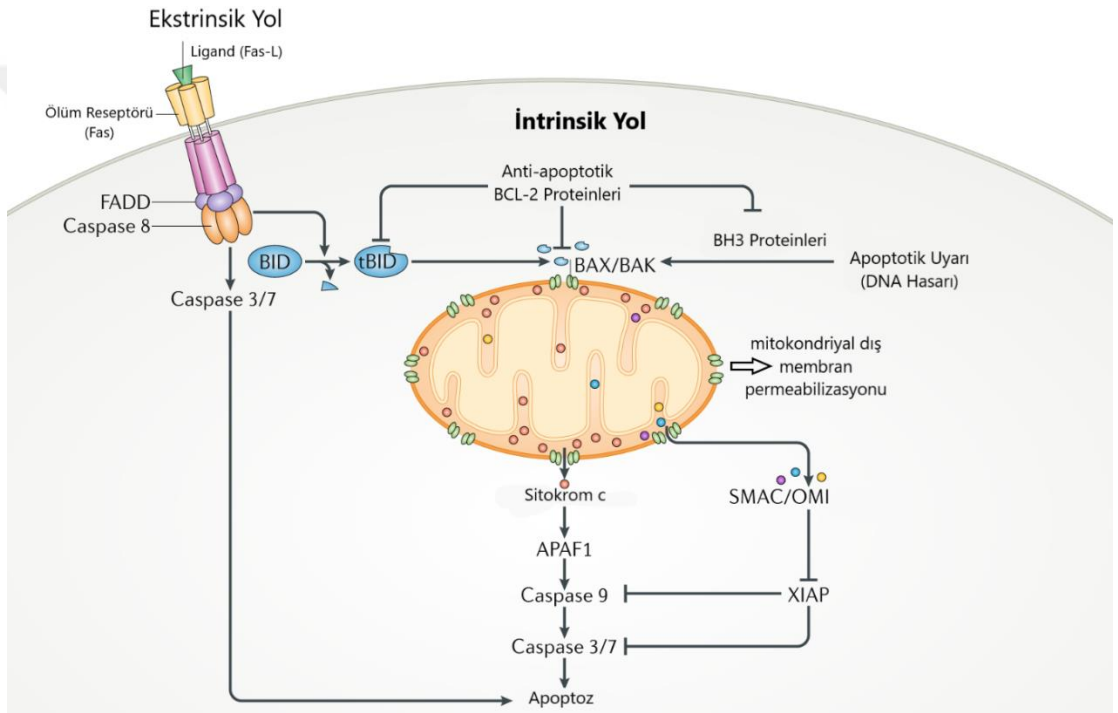
2.4.APOPTOZ

Apoptoz, organizmaların gelişiminde ve yaşlanma sürecinde var olan programlı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Organizmada sıralı olarak meydana gelen apoptoz hücre popülasyonunun regülasyonunda önemli rol oynayarak homeostatik mekanizma görevi görür (Wang, 2020). Apoptoz, embriyo gelişiminde organizma şeklinin ve organ biçiminin düzenlenmesini destekler. Doku homeostazının düzenlenmesinde önemli role sahip olan apoptoz mekanizması, kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması için aktive edilen bir yoldur (Czabotar ve Garcia-Saez, 2023). Apoptoz hücrelerde UV maruziyeti ve reaktif oksijen türlerinin varlığına bağlı olarak meydana gelen DNA hasarıyla veya ligandların ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla aktive edilir. 1842 yılında Carl Vogt tarafından metamorfik kurbağaların notokordundaki hücrelerin ortadan kalktığını gözlemesiyle keşfedilmiş olan apoptoz, ilk olarak 1964 yılında Lockshin ve Williams tarafından programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Hücrelerde apoptoz süreci ilk olarak hücrenin küçülmesiyle başlar ve ardından sırasıyla, hücre zarında kabarcık oluşur, kromatin yoğunlaşır, hücre iskeleti bozulur, nüklear zar parçalanır, apoptotik cisimler oluşmaya başlar ve hücre fagositozla ortadan kaldırılır (Elmore, 2007). Apoptoz mekanizmasında meydana gelecek herhangi bir bozukluk kanser gelişimi, felç, bağışıklık sistemi hastalıkları ve sinir sistemi bozukluklarıyla ilişkilendirilmiştir (Czabotar ve Garcia-Saez, 2023). Apoptoz, başlıca CD95, Trail veya tümör nekrozis faktör (TNF) gibi spesifik reseptörlerin hücre içi yolakları başlatmasıyla, fizyolojik uyarılar varlığında, bazı sitotoksik ilaç tedavilerinde ve bakteri veya virüsler aracılığıyla teşvik edilebilmektedir (Gulbins ve diğ., 2000). Apoptoz kaspazlar, apoptotik protein inhibitörleri, Bcl-2 protein ailesi ve p53 gen aileleri arasındaki iş birliği ile meydana gelen bir süreç olarak da tanımlanabilmektedir (Kiraz ve diğ., 2016).

2.4.1. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz intrinsik ve ekstrinsik yollarla ortaya çıkabilmektedir. İntrinsik yol mitokondriyal ve endoplazmik retikulum yolu olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir. Şekil 2.4.1.1'de intrinsik ve ekstrinsik yolların aktivasyonu gösterilmiştir. İntrinsik mitokondriyal yol; hormonlar, büyüme faktörleri, enfeksiyonlar, hipoksi veya hipotermi gibi koşullarda teşvik

edilmektedir. İntrensik mitokondriyal yolda mitokondriye gelen apoptotik uyarı, mitokondri dış membranında permeabilizasyona neden olarak pro-apoptotik proteinlerin sitozole salınmasını sağlar (Obeng, 2021). Birinci grup pro-apoptotik proteinler, Apaf-1 ve prokaspaz-9 ile bağlanarak apoptozom kompleksi oluşturan sitokrom-C, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi gibi mitokondriyal proteinlerden oluşmaktadır (Riedl ve Shi, 2004). İkinci grup pro-apoptotik proteinler AIF (Apoptoz indükleyici faktör), endonükleaz G ve CAD (kaspaz aktifleştirici DNaz) apoptoz esnasında mitokondriden salınır (Elmore, 2007). İntrensik mitokondriyal yoldaki apoptozu teşvike eden uyarılar BCL-2 protein ailesinin Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, ve Blk üyeleri tarafından düzenlenmektedir. Mitokondriye gelen



Şekil 2.4.1.1: Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolları (Bock ve Tait, 2019).

apoptotik uyarılar, Bax ve Bak proteinlerinin mitokondrinin dış membranında konformasyonel değişikliklere neden olarak oligomerize olur ve dış membranda sitozole salınacak proteinler için por yapısı oluşur (Czabotar ve Garcia-Saez, 2023).

Ekstrinsik yolak, ölüm reseptörleri ve ligandları aracılığıyla apoptozu teşvik eden bir yoldur (Sayers, 2011). Ekstrinsik yol, ölüm reseptörleri denilen FasL, TNF ve TRAIL gibi sitokin ligandların TNF veya TRAIL reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olur. TNF veya TRAIL reseptörleri ölüm reseptörleri olarak bilinir ve 80 aminoasit uzunluğunda ölüm domaini içerir. (Khosravi-Far, 2004). Ölüm reseptörlerinin membranda bağlanmasıyla hücre içinde FADD (Fas ilişkili ölüm domaini) ve TRADD (TNF reseptörü ilişkili ölüm domaini) adaptörleriyle bir

trimer yapısı oluşur. FADD yapısında bulunan ölüm efektör alanı pro-kaspaz-8 ile etkileşime girerek DISC (ölümü indükleyen sinyal kompleksi) kompleksini oluşturur. Hücre içindeki kaspaz-8 aktivasyonu ile apoptoz başlatılır (Sayers, 2011).

2.4.2. Apoptozun Belirlenmesi

Apoptozun belirlenmesinde pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar arasında floresan mikroskopisi, elektron mikroskobu, TUNEL analizi, mikroakışkan cihazları, elektrokimyasal yöntemler ve akış sitometrisi gibi teknikler vardır (Martinez ve diğ., 2010). Floresan mikroskopisi, Hoechst ve Propidium iyodür gibi floresan maddelerin kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyaların DNA'ya bağlanma yeteneğinde olmaları hücrelerin nükleusunu görünür hale getirebilmektedir. Bu yöntemle canlı ve ölü hücrenin ayrımı kolayca yapılabilmektedir. Canlı hücreleri boyayabilen Hoechst boyası ile sadece ölü hücreleri boyayan propidium iyodür boyasının birlikte kullanılmasıyla geliştirilen bu yöntemin prensibi, hücre zarı parçalanmış hücrelerin boyanması, canlı hücrelerin boyanmaması temeline dayanır (Belloc ve diğ., 1994, Oancea ve diğ., 2023, Plesca ve diğ., 2008). Propidium iyodür, sağlam hücre membranından geçme yeteneğine sahip değildir ve dolayısıyla sadece hücre membran bütünlüğünün bozulduğu durumlarda çekirdeğe nüfuz ederek floresan bir görüntü oluşumunu sağlar. Propidium iyodür boyası, DNA'daki az tercih edilen baz çiftlerine bağlanarak floresan kompleks oluşumunu sağlamaktadır. Propidium iyodür nükleaz varlığında RNA boyama yöntemi olarak da değerlendirilebilir. Hoechst ise hücrelerden kolayca geçebilen, DNA'nın adenin ve timine zengin bölgelerinde kompleks oluşturan ve 460/490 nm'de mavi floresan ışığa gösteren bir boyamadır (Atale ve diğ., 2014).

2.5.LUTEOLİN

Polifenolik bileşikler, bitkiler tarafından üretilen ve insan sağlığına pek çok açıdan yarar sağlayan düzenleyicilerdir. Polifenolik bileşikler, kimyasal yapılarında bulunan fenol halkalarının miktarına ve bu fenol halkalar arasında bağlayıcı roldeki yapısal elementlere göre fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar olarak dört sınıfta incelenmektedir (Pandey ve Rizvi, 2009). Bitkilerin çoğunda bulunan flavonoidlerden, flavon grubunun önemli bir üyesi olan luteolinin antioksidan, serbest radikal süpürücülüğü ve kansere karşı aktif olması nedeniyle insanlar için yararlı olduğu düşünülmektedir (Lin ve diğ., 2008, Kang ve diğ., 2017). Luteolin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon), yapısında dört hidroksi grubu bulunduran (3', 4',5 ve 7. pozisyonlarda) sarı kristal renkte olan bir bitki sekonder metabolitidir. Biyolojik etkisi keşfedilmeden önce boya bileşiği olarak kullanılan luteolin ilk olarak 1829 yılında Fransız kimyager Michel Eugène Chevreul tarafından saf halde izole edilmiş ve adlandırılmıştır. Takip eden yıllarda Avusturyalı kimyagerler Hlasiwetz ve Leopold Pfaundler luteolinin ampirik formülünü belirlemiştir (Jain ve Tiwari, 2020). Luteolinin güçlü bir antioksidan olarak önerilmesinin temel nedeni, yapısında bulunan C5, C7, C30, C40 kısımlarındaki hidroksil gruplarının varlığı ve C4 bölgesindeki karbonil oksijenin mikroorganizmalara karşı koruyucu bir etkinlik göstermesidir. Bunlara ek olarak, C2 ve C3 arasında bulunan çift bağın 3',4',5,7-tetrahidroksiflavon formunun diğer formlarına kıyasla biyosidal tabiatıta olduğu saptanmıştır (Çetinkaya ve Baran, 2023). Luteolinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri tablo 2.5.1'de verilmiştir.

Tablo 2.5.1: Luteolinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.

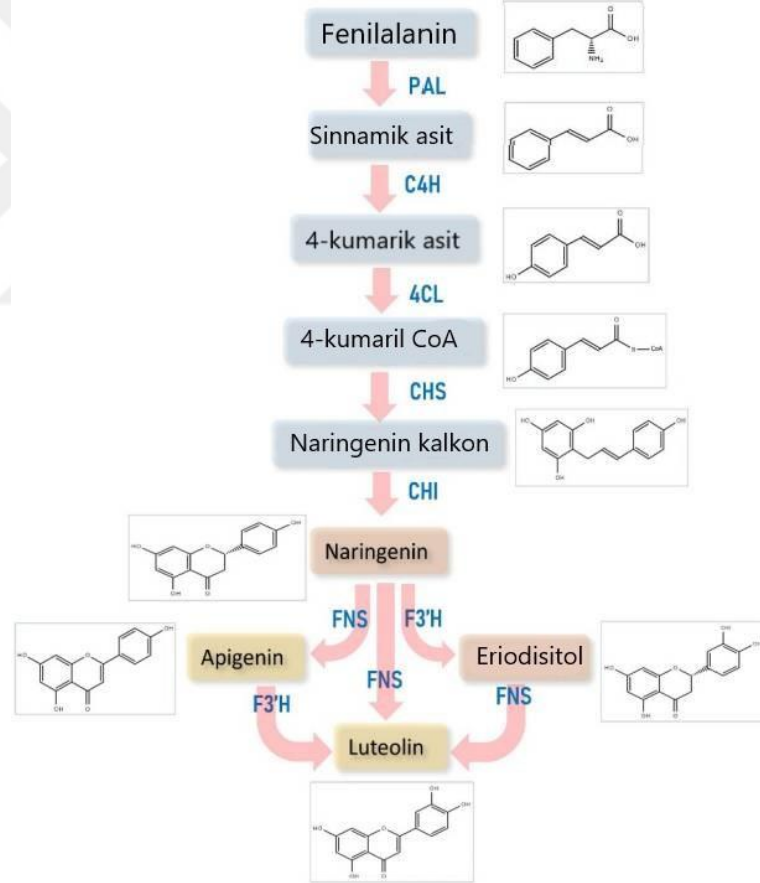
Molekül Formülü	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Moleküler Ağırlık	286,24 g/mol
Fiziksel Hal	Katı
Renk	Sarı
Kaynama Noktası	616 °C
Erime Noktası	329,5 °C
Yoğunluk	1,7 g/cm ³
Çözünürlüğü	387,5 mg/L

Luteolin, antiinflamatuvar etkisi son yıllarda araştırılan ve geleneksel tıpta sıklıkla kullanılan bitkilerden elde edilmektedir. Luteolin, kereviz, maydanoz, soğan, brokoli, havuç, biber, yeşil çay ve elma kabuğu gibi yenilebilir bitki ve ürünlerinde bulunur (Manzoor ve diğ., 2019). Luteolin içeriği yüksek olan bazı gıdalar tablo 2.5.2’de verilmiştir.

Tablo 2.4.2: Bazı meyve ve sebzelerin luteolin içeriği (mg/100g) (Manzoor ve diğ., 2019).

Kırmızı hindiba (radiçi)	37,96
Çin kerevizi	34,87
Kurutulmuş baharatlar	19,75
Kekik	1028,8
Ardıç meyveleri	69,05
Taze Meksika kekiği	25,10
Taze kekik	51,00

Meyve ve sebzelerdeki luteolin içeriği ısıya, oksijene ve asit derecesine dayanıklı olmasına rağmen tüketime hazırlanırken kabuklarının ve yapraklarının uzaklaştırılmasıyla antioksidan içeriği azalmaktadır. Bununla birlikte kaynatma, mikrodalgada pişirme ve uzun süreli kızartma gibi pişirme yöntemleri de luteolin içeriğinde azalmaya yol açabilir (Aherne ve O'Brien, 2002). Luteolin, bitki hücre vakuollerinde bulunur ve fenilpropanoid ve flavonoid yolağının ürünüdür (Muruganathan ve diğ., 2022). Endoplazmik retikulumun sitoplazmik tarafında, fenilalanin sıralı etkileşimlerle naringenini üretmesinin ardından luteolin biyosentezinde önemli olan kalkon isomeraz, flavonoid 3' hidroksilaz ve flavon sentaz enzimleri luteolinin oluşumunu sağlamaktadır (Muruganathan ve diğ., 2022, Wayne, 2019). Luteolin biyosentezinde ilk adım fenilalaninin, fenilalanin amonyak-liyaz, sinamik asit 4-hidroksilaz ve 4-kumaril koenzim A-ligaz enzimleri aracılığıyla 4-kumaril koenzim A'ya dönüştürülür. Birincil metabolizma



Şekil 2.4.2.1: Luteolinin biyosentezi (Muruganathan ve diğ., 2022).

tarafından üretilen üç malonil koenzim A molekülü ve fenilalaninden üretilen 4-kumaril koenzim A kalkon sentaz enzimi varlığında bir araya gelerek, flavonoidlerin yapıtaşı olarak adlandırılan naringenin kalkonunu oluşturur (Bangar ve diğ., 2023). Luteolin, endoplazmik

retikulumda üretildikten sonra ligand aracılığıyla veya veziküler taşımayla vakuol membranı olan tonoplasta taşınır (Grotewold ve Davies, 2008). Şekil 2.5.1’de luteolinin biyosentezi gösterilmiştir. Luteolin, diğer çoğu flavonoide kıyasla serbest radikal temizleyici ve güçlü bir antioksidan olarak önerilmektedir. Yapısında bulunan 1,4-piron kısmının, bileşiklerin antioksidan özelliklerini test etmek için kullanılan bir yaklaşım olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidraliz) ve FRAP (demir azaltma aktivite potansiyeli) radikalleriyle etkileşimi sonucunda luteolinin inhibitör rolde olduğu gösterilmiştir (Punia Bangar ve diğ., 2023).

Luteolin, vücutta bağırsak mukozası tarafından biyolojik olarak aktifleştirilir ve sistemik dolaşıma katılır (Hayasaka ve diğ., 2018). Diyetle alınan luteolinin, 14,3 mg/kg dozlu oral alımından sonra, plazmada eriştiği maksimum konsantrasyon yaklaşık 1,97 g/ml olarak hesaplanmıştır (Luo ve diğ., 2017). Bu miktar, luteolinin %14’ünün etkili bir şekilde plazmada bulunduğunu göstermektedir. Luteolin, kimyasal ve doğal toksik maddelere karşı koruyuculuk özelliğini antioksidan ve antiapoptotik nitelikleriyle sağlamaktadır (Mahdiani ve diğ., 2022). Meyve ve sebzeler aracılığıyla vücuda alınan luteolin bağırsaktan hızlıca emilerek plazmaya geçer ardından ana metaboliti olan monoglukuronit ve diglukuronide metabolize olur (Yasuda ve diğ., 2015). Glukuronid metabolitleri inflamatuvar genleri (TNF- α , IL-6, iNOS, COX2) indirgeyerek antiinflamatuvar etki gösterir (Kure ve diğ., 2016). Luteolin, Glutasyon-S-transferazı aktive ederek antioksidan özelliğini gösterir. Luteolin, Wnt/ β -katenin/GSK-3 β sinyal yolunu inhibe ederek büyümenin durmasını ve kaspaz-3 ile apoptozu indükler (Kang ve diğ., 2017). Luteolin, hücrel canlılığı arttırması, DNA hasarını önlemesi ve antioksidan etkisinin fazla olması sebebiyle oksidatif hasarı azaltma yeteneğine sahip bir bileşiktir (Kim ve diğ., 2000, Choi ve diğ., 2008, Wang ve diğ., 2016).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmada kullanılan 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri, 1968 yılında Stuart A. Aaronson tarafından dişi BALB/3T3 farelerin embriyosundan elde dilmiş hücre soyudur. Hücre kültürü laboratuvarımıza American Type Culture Collection (ATCC)'dan getirilmiş olup kontak inhibisyonu ve sıcaklık dalgalanmalarına karşı yüksek hassasiyet gösteren embriyonik fibroblastların uygun hücre kültürü flaskında 6×10^3 hücre/cm² yoğunlukta yetiştirilmektedir. İnkübatör koşullarındaki değişikliklerden ve dış ortamdan etkilenen BALB/3T3 hücreleri, flask tabanından ayrılma ve kalkma eğilimindedir. Bu sebeple bulundukları inkübatör koşullarından sadece kısa süreli olarak çıkarılmalıdırlar. Hücreler %10 calf serumu, 4,5 g/L glukoz, L-Glutamin, Sodyum Pirüvat ve PSA (Penisilin-Streptomisin Amfoterin) içerikleri ile hazırlanmış DMEM kültür medyumunda %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli ortamda 37°C'de inkübe edilerek yetiştirilmektedir.

3.2.HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Tez kapsamındaki deneylerde kullanılan BALB/3T3 hücreleri, yetiştirildikleri kültür flaskları içinde en fazla %80 yoğunluğa ulaştıklarında haftada bir-iki defa düzenli olarak pasajları yapılmakta ve iki kez medyumunu değiştirilmektedir. Pasaj işlemi için, ilk adımda flask tabanında bulunan hücreler PBS ile iyice durulanarak tripsin inhibitörlerinden arındırılır. Ardından hücrelere 2- 3 ml Tripsin-EDTA eklenir ve hücrelerin inkübatör koşullarında yedi dakika muamele edildikten sonra santrifüj tüpüne toplanır ve santrifüje aktarılır. 3T3 embriyonik fibroblastlar 150 G'de beş dakika santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılır ve pellet üzerine daha önce ısıtılarak pH ayarı dengelenen DMEM kültür medyumunu eklenerek, deney için gerekli sayıda hücre kültür kaplarına ekilir.

3.3.AKRİLAMİD VE LUTEOLİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Akrilamidin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan dozları, canlı sistemlerin akrilamide maruz kaldıkları dozlar ele alınarak saptanmıştır. Akrilamid %10 calf serum içeren kültür medyumunda belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Deney gruplarına akrilamidin 0,5 mM, 1 mM, 2 mM konsantrasyonları ve kontrol gruplarına %10 calf serum içeren kültür medyumunu uygulanmıştır. Deneylerde kullanılan luteolin konsantrasyonu, literatürdeki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ele alınarak belirlenen doz aralığındaki en etkili antioksidan konsantrasyon olan 10 μ M olarak belirlenmiştir (Çetinkaya ve diğ., 2023, Karuppaiyah Selvendiran ve diğ., 2006,). Akrilamid ve %100 DMSO'da çözünen luteolin konsantrasyonları 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine 24 saat uygulanmıştır Tablo 3.3.1'de akrilamid ve luteolin maruziyet gruplarının konsantrasyonları gösterilmiştir.

Tablo 3.3.1: Akrilamid ve luteolin maruziyet grupları.

Negatif Kontrol	%0,05 DMSO içeren %10 Calf Serum içeren medyum
0,5 mM Akrilamid	%0,05 DMSO içeren %10 Calf Serum içeren medyum ve 0,5 mM Akrilamid
1 mM Akrilamid	%0,05 DMSO içeren %10 Calf Serum içeren medyum ve 1 mM Akrilamid
2 mM Akrilamid	%0,05 DMSO içeren %10 Calf Serum içeren medyum ve 2 mM Akrilamid
10 μM LUT	%0,05 DMSO içeren %10 Calf Serum içeren medyum ve 10 μ M Luteolin
0,5 mM Akrilamid+10 μM LUT	%0,05 DMSO içeren %10 Calf Serum içeren medyum ve 0,5 mM Akrilamid + 10 μ M Luteolin
1 mM Akrilamid+10 μM LUT	%0,05 DMSO içeren %10 Calf Serum içeren medyum ve 1 mM Akrilamid + 10 μ M Luteolin
2 mM Akrilamid+10 μM LUT	%0,05 DMSO içeren %10 Calf Serum içeren medyum ve 2 mM Akrilamid + 10 μ M Luteolin
Pozitif Kontrol	%0,05 DMSO içeren %10 Calf Serum içeren medyum ve 150 μ M H ₂ O ₂

3.4.SİTOTOKSİSİTE

3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi

Embriyonik fibroblast hücrelerinin kültür kabı içindeki yoğunlukları %70'e ulaştığında hücreler Tripsin-EDTA ile flask tabanından kaldırılmıştır. Hücreler, Thoma lamı yardımıyla üç kez sayılarak MTT testi için 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. Akrilamid ve luteolinin %10 calf serum içeren medyumda hazırlanmış konsantrasyonları uygulanarak 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Deney süresi sonunda, her bir kuyuya 10 µl MTT I solüsyonu eklenmiştir. MTT I solüsyonunun, metabolik olarak aktif olan hücrelerin içerdiği oksidoredüktaz enzimi aracılığıyla MTT'yi formazan kristallerine dönüştürmesi için kültür kapları 4 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan suda çözünmeyen formazan kristallerinin çözünmesi için her bir kuyuya 100 µl MTT II (SDS) solüsyonu eklenmiş ve bir gece boyunca CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, embriyonik fibroblast hücrelerinin optik yoğunlukları ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesiyle muamele edilmeyen grubun canlılığı %100 kabul edilmiştir. Deney gruplarının hücresel canlılık oranları yüzdesel olarak ifade edilmiştir. Bu test üç kez tekrar edilmiştir (Mossman, 1983).

3.4.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Testi

Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi, hücre içi enerji metabolizmasında rol oynayan ve oksidoredüktaz sınıfına ait sitoplazmik bir enzimdir. Hücre içi bir enzim olan LDH, hücre zarının hasarı veya hücre ölümü durumlarında hücre içinden dış ortama sızar. Test, dış ortamdaki LDH miktarını ölçmek için dizayn edilmiştir. Testin prensibi, ilk olarak laktat dehidrogenaz enziminin NAD⁺'yı NADH/H⁺'ya indirgenmesiyle laktatın pirüvata dönüşümünün katalizlenmesini, ardından katalizör maddenin NADH/H⁺ 'dan sarı renkli iyodotetrazolyum tuzuna H/H⁺ transfer ederek kırmızı renkli formazan kristallerinin oluşumunu kapsamaktadır. Oluşan renk miktarı, hücre zarında meydana gelen hasar boyutuyla ilişkilidir. 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Akrilamid ve luteolinin %10 calf serum içeren medyumda hazırlanmış konsantrasyonları uygulanarak 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Deney süresi sonunda, kit içinde bulunan boya ve enzim solüsyonlarından hazırlanan reaksiyon karışımından her kuyuya 100 µl eklenmiştir. 30 dakikalık inkübasyon süresinin bitiminde oluşan sitotoksositeye göre kırmızı renkli formazan

ürünün artan renginin absorbansı 492 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Absorbans değerleri elde edildikten sonra oluşan toksisite yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol}} \times 100$$

3.5.GENOTOKSİSİTE

3.5.1. Mikronükleus Testi

In vitro mikronükleus testi, anojenik ve klastojenik ajanların hücre bölünmesi oluşturdukları DNA fragmentlerine bağlı olarak mutajenitesinin değerlendirildiği bir yöntemdir. Hücrelerde gözlemlenen mikronükleus, kromozomdaki yapısal ve sayısal değişikliklerle doğrudan ilişkilidir (Parry ve Parry, 2006). Akrilamidin BALLB/3T3 embriyonik fibroblast hücrelerindeki toksisitesi ve bu toksisiteye luteolinin etkisini değerlendirmek için Fenech (2007)'in uyguladığı prosedür kullanılmıştır. BALB/3T3 embriyonik fibroblast hücreleri kontrol ve deney gruplarını oluşturmak üzere altı kuyulu hücre kültür kaplarına kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Akrilamid ve luteolinin %10 calf serum içeren medyumda hazırlanmış konsantrasyonları hücrelere uygulanarak 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Maruziyet süresinin bitiminde, mikronükleus oluşumunun gözlemlenmesi için Sitokalsin B uygulamasının ardından hücreler 37°C'de 20 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda kültür kaplarından tripsin ile kaldırılan hücreler santrifüj edilmiş ve süpernatantı uzaklaştırılmıştır. Deneyin ilk adımında hücrelere mikroskopta daha iyi gözlemlenmesi için 0,075 M konsantrasyonda hazırlanan KCl çözeltisi uygulanmıştır. Hücre süspansiyonlarına 3:1 oranında hazırlanmış ve +4°C'de soğutulmuş Cornay fiksatif eklenmesinin ardından santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine Cornay fiksatif ve esas fiksasyon işlemini yapacak formaldehit eklenmiştir ardından tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine Cornay fiksatif eklenmiştir. Grupların hepsine 1 dakika boyunca pipetaj yapılmış ve önceden temizlenmiş lam üzerine hücre süspansiyonundan 40 µl yayılmıştır. Deneye başlamadan önce hazırlanmış Giemsa boyası lamaların üzerini kaplayacak şekilde uygulanmış ve sekiz dakika boya maruziyeti yapılmıştır. Boya maruziyeti bitiminde lamalar saf su ile durulanarak boya kalıntıları uzaklaştırılmış ve kurutulmaya bırakılmıştır. Preparatlar ışık mikroskobu altında 20x

büyütmedeki objektifte incelenerek kontrol ve deney grupları için 1000 binükleat ve 1000 mononükleat hücrelerde görülen mikronükleus sayısı tespit edilmiştir. Deney sonucunda oluşan nüklear tomurcuk ve nükleoplazmik köprü oranlarının hesaplanması 1000 binükleat hücre sayılarak yapılmıştır. Sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan nüklear bölünme indeksinin (NDI), sitostasisin ve sitokinezi bloklanmış proliferasyon indeksinin (CBPI) hesaplanması için mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücrelerin bulunma sıklığı her grupta 500 hücre sayılarak aşağıda verilen formüllerle hesaplanmıştır. Deney üç kez tekrarlanmıştır.

$$\text{NDI: } (M1 + M2 + M3 + M4) / N$$

NDI: nüklear bölünme indeksi, M1: mononükleat hücre, M2: binükleat hücre, M3: trinükleat hücre, M4: tetranükleat hücre, N: toplam hücre sayısı.

$$\text{CBPI: } (M1) + 2(M2) + 3(M3 + M4) / N$$

CBPI: sitokinezi bloklanmış proliferasyon indeksi, M1: mononükleat hücre, M2: binükleat hücre, M3: trinükleat hücre, M4: tetranükleat hücre, N: toplam hücre sayısı.

3.5.2. Komet Testi

Komet testi, ökaryotik hücrelerde meydana gelen DNA hasarını tek hücre seviyesinde incelemek için kullanılan güçlü bir genotoksisite testidir (Langie ve diğ., 2015). Lam hazırlığı ve hücre lizisi, alkali çözeltide DNA çift zincirinin çözülmesi, elektroforez ve nötralizasyon aşamalarını kapsayan komet testi, son adımda DNA boyası ile boyanarak görselleştirilmektedir (Sing ve diğ., 1988, Tice ve diğ., 2000). 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri kontrol ve deney gruplarını oluşturmak üzere hücre kültür kaplarına 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Akrilamid ve luteolinin %10 calf serum içeren medyumda hazırlanmış konsantrasyonları hücrelere uygulanarak 24 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. Deney süresi tamamlandığında hücreler tripsinle kaldırılıp santrifüj edilmiştir. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant uzaklaştırılıp pellete PBS eklenip ve pipetaj yapılmıştır. PBS içerisinde süspansiyon halde bulunan embriyonik fibroblast hücreleri, 37°C su banyosunda düşük erime noktalı agaroz ile karıştırılmıştır. Elde edilen homojen hücre süspansiyonundan 20 μl alınıp önceden normal erime noktalı agaroz ile kaplanmış lamalar üzerine yayılmış ve lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar, $+4^\circ\text{C}$ 'de bir saat bekletilmiş ve süre sonunda lameller nazikçe çekilmiştir. Lamlar, içerisinde Triton X-100 içeren taze hazırlanmış lizis tamponunun içinde

+4°C’de bir saat bekletilmiştir. Lizis aşamasından sonra, DNA çift zincirinin çözülmesi için lamalar alkali özellikteki elektroforez tamponunda +4°C’de 20 dakika bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra lamalar 300 mA, 25 V ayarlanmış yatay elektroforez tankında 30 dakika boyunca elektroforez işleminden geçirilmiştir. Elektrik alanındaki akıma karşı tepki gösteren hücrelerin nötralize olması için hazırlanmış ve soğukta bekletilmiş nötralizasyon tamponu lamaların üzerini kaplayacak şekilde üç kez uygulanmıştır. Tampon uygulaması sonrasında saf su ile yıkanan lamlara beş dakika DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) maruziyeti yapılmıştır. DAPI, lamlara sabitlenmiş hücrelerin DNA zincirindeki A-T’ce zengin bölgelere bağlanarak floresan bir kompleks oluşturur. Boya maruziyetinin ardından, kuruyan preparatlar Olympus IX71 floresan ataçmanlı mikroskopta uygun filtre ile incelenerek Olympus DP72 video kamerada eşit aralıklarla seri olarak fotoğraflanmıştır. Komet test sonuçlarının değerlendirilmesi için elde edilen görüntülerden her lamdan 100 hücre Cometscore 2 programında komet kuyruk uzunluğu, kuyruk %DNA içeriği ve Olive kuyruk momenti kriterlerine göre incelenmiştir. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.1. Komet Solüsyon Hazırlığı

Lizis Tamponu: Lizis tamponu, 7-7,4 pH’da olan hücrelerin pH’sını değiştirirerek hücre zarının parçalanmasını sağlar. Lizis solüsyonu, 100 mM EDTA, 2,5 M NaCl ve 10 mM Tris-Base karışımından oluşur. Kullanılmadan önce hücre lizisinin gerçekleşmesi için %1 Triton X-100 eklenir ve pH 10’a sabitlenir. Triton X-100, integral ve periferik zar proteinlerini çözündürerek hücre içeriğini serbest bırakmak üzere parçalama rolündedir. Lizis solüsyon hazırlandıktan sonra +4°C’de dinlendirilir.

Elektroforez Tamponu: Elektroforez solüsyonu, 1 mM EDTA ve 300 mM NaOH karışımından oluşur. Lamaların elektroforez solüsyonunda inkübasyonundan önce alkali (pH>13) özellikte olması önemlidir.

Nötralizasyon Tamponu: Nötralizasyon solüsyonu 0,4 M Tris-HCl’den oluşan, elektroforez aşamasından sonra lamaların yüksek pH’sını nötralize etmek için kullanılan bir karışımdır.

3.6.APOPTOZ/NEKROZ

3.6.1. Propidium İyodür/Hoechst Yöntemi

Embriyonik fibroblast hücrelerinde meydana gelen apoptozun belirlenmesinde Hoechst 33342 (Ho342), ölü hücrelerin belirlenmesinde Propidium iyodür (PI) floresan işaretleme yöntemleri kullanılmıştır. Ho342 hücre zarından kolayca geçerek canlı hücreleri boyar. Ho342 boyama, hücreler arasındaki canlı, ölü, apoptotik ayrımının yapılabilirdiğİ bir yöntemdir. Boyama mekanizması, DNA'nın adenin-timince zengin bölgelerine bağlanarak floresan kompleksi oluşturmasıyla açıklanmaktadır (Chazotte, 2015, Crowley ve diğ., 2016). Propidium iyodür floresan boyası, ölü hücrelerin zayıflamış hücre zarından geçerek hücreyi kırmızı renge boyar. Canlı hücrelerin hücre zarından geçmeyen bir boya olan Propidium iyodür, hücre popülasyonundaki ölü hücrelerin belirlenmesinde kullanılır. Boyama mekanizması, DNA'nın az tercih edilen sekans bölgelerindeki bazlar arasına yerleşerek DNA ile kompleks oluşturur (Atale ve diğ., 2014).

3.6.1.1. Propidium İyodür/Hoechst Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

1 mg/ml PI (20 µl)

1 mg/ml Ho342 (20 µl)

1 M PBS (pH 7,4) (3960 µl)

3.6.1.2. Propidium İyodür/Hoechst Yönteminin Uygulanması

Embriyonik fibroblast hücreleri, 24 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Akrilamid ve luteolinin %10 calf serum içeren medyumda hazırlanmış konsantrasyonları uygulanarak 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Deney süresinin sonunda, kuyular PBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyuya 200 µl boya karışımından eklenerek 20 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler PBS ile yıkanarak Olympus IX71 floresan mikroskopta incelenerek Olympus DP72 video kamerada eşit aralıklarla fotoğraflanmıştır.

3.6.1.3. Hesaplama

Kontrol ve deney grupları için, floresan kompleks oluşturarak ışımaya gösteren hücreler ayrı ayrı sayılarak ortalama yüzde değerleri hesaplandı. Her bir grup için üç tekrarlı gerçekleştirilen deneyde toplam 12 kuyuda 10-15 alan ve 1000 hücre taranmıştır. Gruplardaki hücreler canlı, erken apoptotik ve ölü hücreler olarak değerlendirilmiş ve sayılmıştır. Her grup için apoptotik ve ölü hücrelerin tüm hücrelere oranı hesaplanarak yüzdesel değerleri bulunmuştur.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

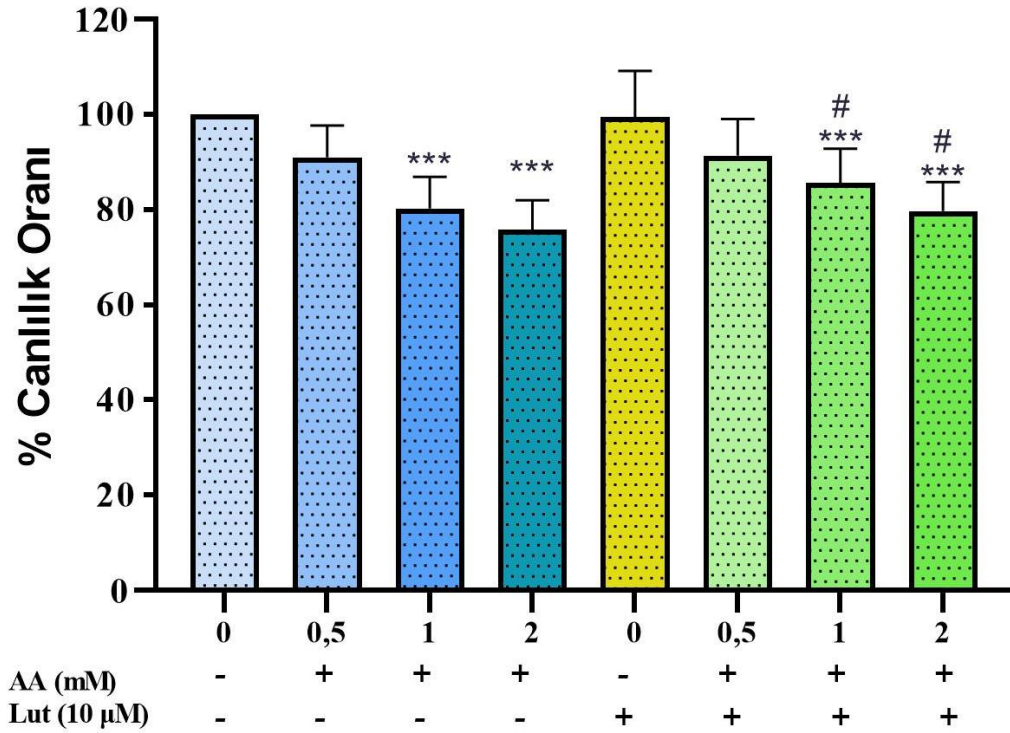
Embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan akrilamid, luteolin ve luteolinle kombine edilen konsantrasyonlarıyla dizayn edilen çalışmada gerçekleştirilen hücre canlılık testi, laktat dehidrogenaz testi, mikronükleus testi, komet analizi ve Propidium iyodür/ Hoechst çift floresan boyama ile elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Graphpad Prism 9.0.0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için ilk olarak Shapiro-Wilk normalite testi uygulanmış ve One-Way ANOVA yöntemi ile Tukey's testi kullanılmıştır. İstatistik sonuçlarının değerlendirilmesinde $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ ve $p < 0,0001$ anlamlılık düzeyi esas alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1.SİTOTOKSİSİTE BULGULARI

4.1.1. MTT Bulguları

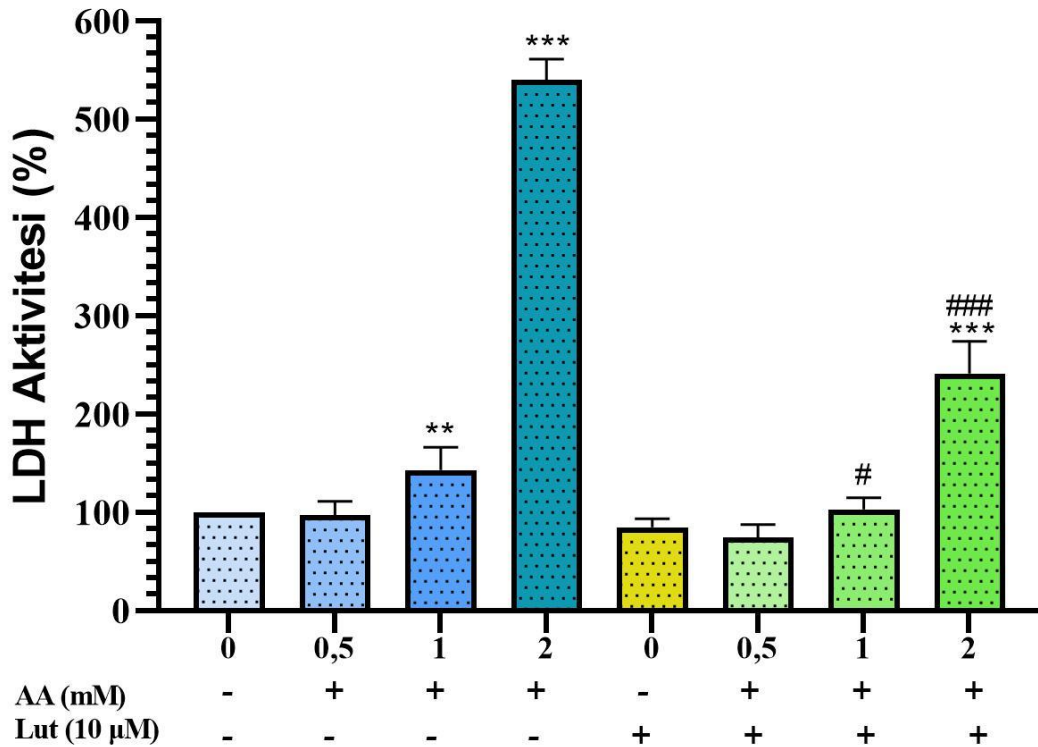
Embriyonik fibroblast hücrelerine 24 saat boyunca uygulanan üç farklı akrilamid konsantrasyonu ve luteolinin, hücre canlılığına etkisi MTT testi ile tespit edilmiştir. Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre, embriyonik fibroblast hücrelerinin kontrol ve deney gruplarının yüzde hücre canlılık oranları şekil 4.1.1.1’de verilmiştir. Akrilamidin 0,5 mM grubunun kontrole kıyasla anlamlı bir azalmaya yol açtığı görülmezken, 1 mM ve 2 mM akrilamid uygulanmış gruplarda hücre canlılığı anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,0001$). Akrilamid ve luteolinin birlikte uygulanan grupları, yalnızca akrilamid uygulanan gruplarla kıyaslandığında, 1 mM akrilamid+Lut ve 2 mM akrilamid+Lut gruplarının hücre canlılığı akrilamidin 1 mM ve 2 mM gruplarına göre anlamlı bir şekilde yükselmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.1.1.1: Embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan akrilamid ve luteolinin % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkisi (*:kontrole göre, #:luteoline göre, *** $p<0,001$).

4.1.2. Laktat Dehidrogenaz Testi Bulguları

Embriyonik fibroblast hücrelerine 24 saat uygulanan üç farklı akrilamid konsantrasyonu ve luteolinin sitotoksosite üzerine etkisi laktat dehidrogenaz testi ile spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Gruplardaki laktat dehidrogenaz aktivitesi oranları şekil 4.1.2.1’de verilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1 mM ve 2 mM akrilamid konsantrasyonlarında laktat dehidrogenaz enzim aktivitesinde anlamlı artışa yol açtığı tespit edilmiştir. Akrilamid konsantrasyonlarına ilave luteolin eklenmiş gruplar, tek başına akrilamid uygulanmış gruplar ile karşılaştırıldığında laktat dehidrogenaz aktivitesinde azalma meydana geldiği ve özellikle 2 mM akrilamid + luteolin grubuyla 2 mM akrilamid uygulanan grup karşılaştırıldığında laktat dehidrogenaz aktivitesinde anlamlı bir azalmanın olduğu belirlenmiştir (** $p < 0,01$; *** $p > 0,001$).



Şekil 4.1.2.1: 3T3 Embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan akrilamid ve luteolin konsantrasyonlarının LDH aktivitesi üzerinde konsantrasyona bağlı etkisi (*:kontrole göre, #:luteoline göre, *** $p < 0,001$)).

4.2.GENOTOKSİSİTE BULGULARI

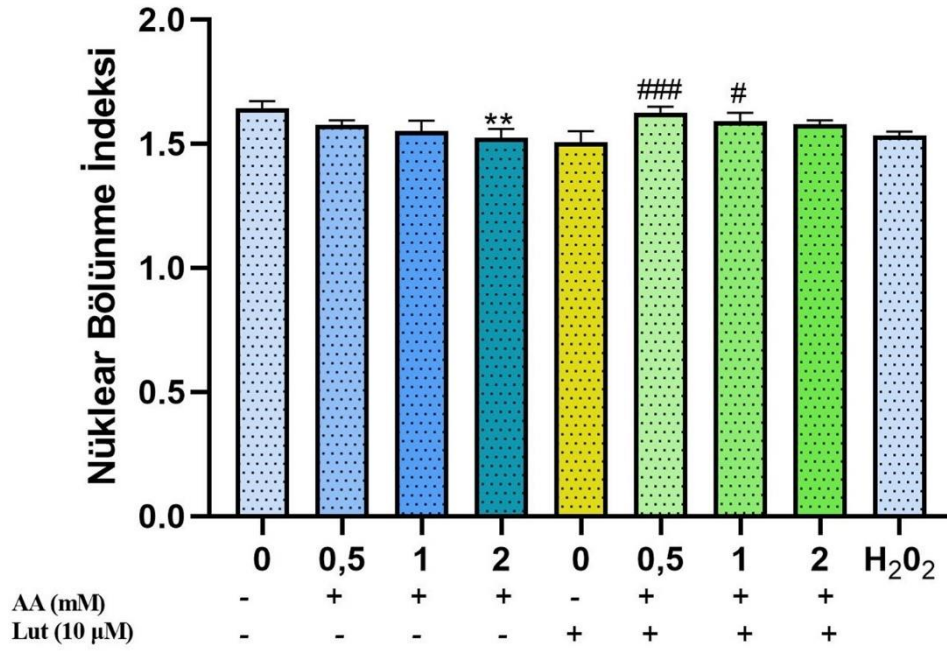
4.2.1. Mikronükleus Bulguları

Embriyonik fibroblast hücrelerine akrilamidin tek başına ve luteolin ile kombine uygulanan konsantrasyonların hücrelerde mikronükleus oluşturma sıklığı değerlendirilmiştir. Akrilamidin 2 mM konsantrasyonunun kontrole kıyasla mikronükleus görülme sıklığı anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0,05$). Akrilamidin 2 mM konsantrasyonuna luteolin eklenerek hazırlanan gruptaki mikronükleus görülme sıklığı istatistiksel olarak anlamlı sonuçlanmıştır ($p<0,05$). Nüklear tomurcuk içeren binükleatlı hücre oranı değerlendirildiğinde, akrilamidin 2 mM uygulanmış konsantrasyonu oluşan nüklear tomurcuk oranını istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmıştır ($p<0,05$). Uygulanan akrilamid konsantrasyonlarına luteolin ilave edilen gruplar yalnız akrilamid uygulanmış gruplar ile karşılaştırıldığında, sadece akrilamidin 2 mM uygulanan konsantrasyonunda nüklear tomurcuk oluşmuş binükleatlı hücre oranında anlamlı bir azalma meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Binükleatlı hücrelerde oluşan sitoplazmik köprü açısından değerlendirilecek olursa, akrilamidin 1 mM ve 2 mM uygulanan konsantrasyonlarında oluşan sitoplazmik köprü oranı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır. Akrilamid konsantrasyonlarına luteolin ilave edilmesiyle oluşturulan gruplardan sadece 2 mM akrilamid grubuna göre luteolinin sitoplazmik köprü oluşumunu anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.2.1.1).

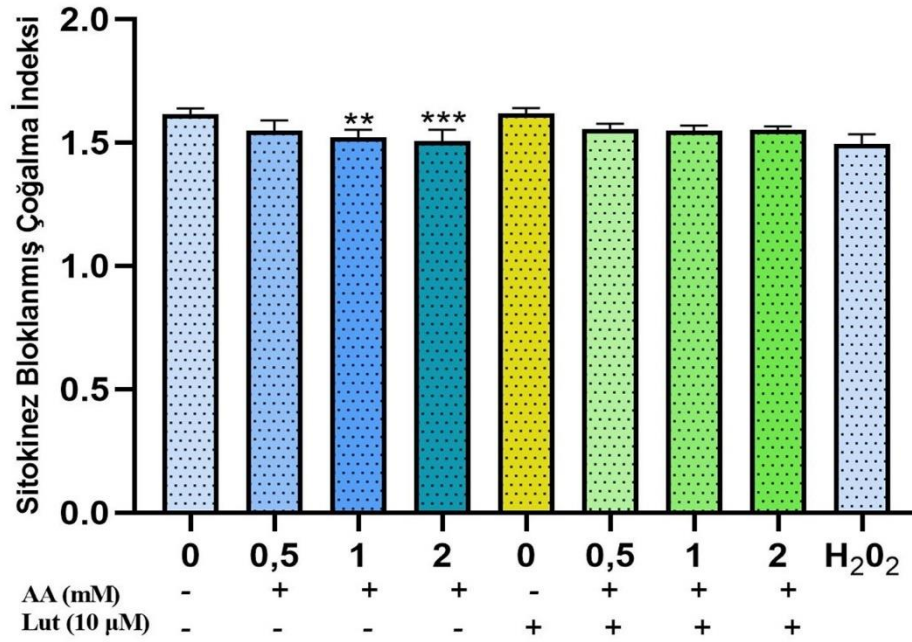
Hücre popülasyonundaki nüklear bölünme indeksi, akrilamidin artan konsantrasyonlarında azalma gösterirken, bu azalma oranı sadece 2 mM akrilamid uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Buna karşın, akrilamid gruplarına luteolin ilave edilen gruplarda sadece 0,5 mM ve 1 mM akrilamid uygulanmış gruplarda anlamlı bir iyileşme tespit edilmiştir (Şekil 4.2.1.1). Sitokinez-blok çoğalma indeksi akrilamidin 2 mM konsantrasyonunda anlamlı bir şekilde azalırken; aynı gruba eklenen luteolinle artış saptanmıştır (Şekil 4.2.1.2). Şekil 4.2.1.3 akrilamid uygulanmış 3T3 hücrelerinde mikronükleus, nüklear tomurcuk ve nüklear köprüyü gösterirken, şekil 4.2.1.4 mononükleatlı, binükleatlı, trinükleatlı ve tetranükleatlı hücreleri ifade etmektedir.

Tablo 4.2.1.1: Akrilamid ve luteolinin embriyonik fibroblast hücrelerinde mikronükleus içeren binükleatlı ve mononükleatlı hücre popülasyonu üzerine etkileri ve nüklear tomurcuk oluşum sıklığı oranları *:kontrolle göre, #luteoline göre (*p<0,05, **p<0,005, #p<0,5).

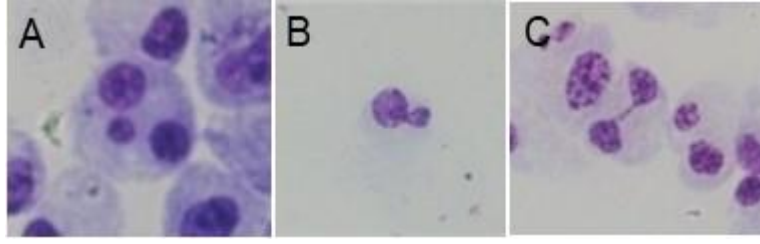
AA mM	Lut 10 µM	Mikronükleus içeren binükleatlı hücre oranı (‰)	Mikronükleus içeren mononükleatlı hücre oranı (‰)	Nüklear tomurcuk içeren binükleatlı hücre oranı	Sitoplazmik köprü içeren binükleatlı hücre oranı
0	-	1,08±0,3	1,22±0,4	0,95±0,2	0,73±0,3
0,5	-	3,11±1,2	2,96±0,7	1,86±0,5	1,93±0,03
1	-	5,09±2,2	6,33±1,6	2,29±0,3	2,19±0,5*
2	-	7,10±2,9*	10,19±1,3*	2,66±0,4*	2,71±0,3**
0	+	0,68±0,8	0,74±0,4	0,47±0,1	0,44±0,01
0,5	+	1,40±0,5	1,24±0,4	0,73±0,2	0,90±0,01
1	+	2,12±0,4	2,48±0,5	0,96±0,1	0,93±0,01
2	+	3,37±2,4#	5,38±1,0#	1,31±0,2#	1,35±0,1#
H ₂ O ₂		29,80±2,6	24,98±2,8	5,87±0,2	7,67±0,4



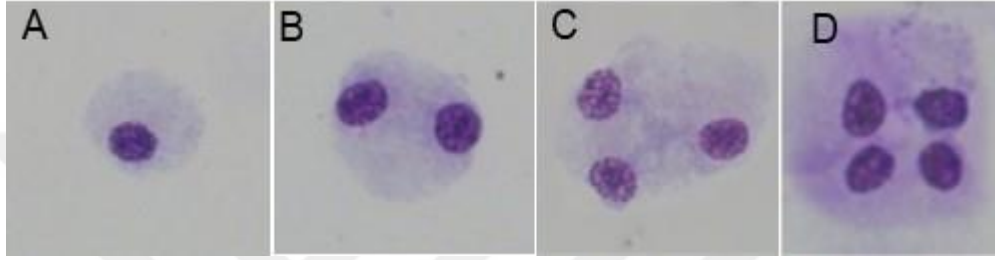
Şekil 4.2.1.1: Akrilamid ve luteolinin embriyonik fibroblast hücrelerindeki nüklear bölünme indeksi oranları *:kontrolle göre, #luteoline göre (**p<0,05, ###p<0,05, #p<0,5).



Şekil 4.2.1.2: Akrilamid ve luteolinin embriyonik fibroblast hücrelerindeki çoğalma indeksi oranları *:kontrolle göre (***p<0,005, **p<0,05).



Şekil 4.2.1.3: Akrilamid uygulanan 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde A) Mikronükleus, B) Nüklear tomurcuk, C) Nükleoplazmik köprü.



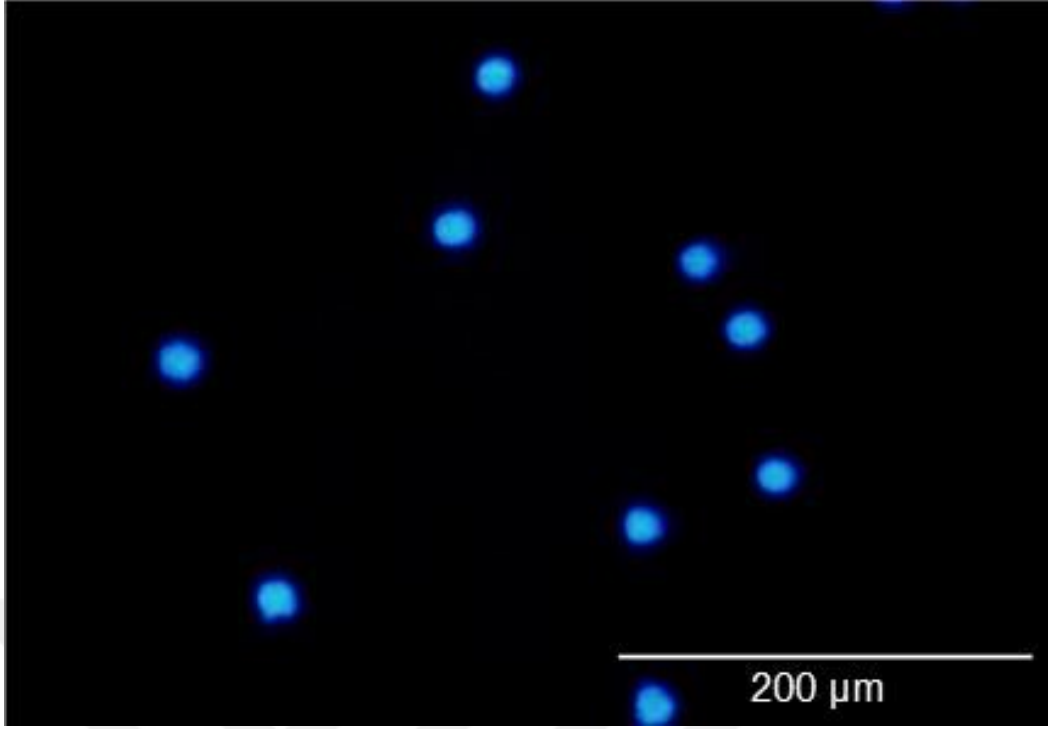
Şekil 4.2.1.4: A) Monoükleatlı hücre, B) Binükleatlı hücre, C) Trinükleatlı hücre, D) Tetranükleatlı hücre.

4.2.2. Komet Bulguları

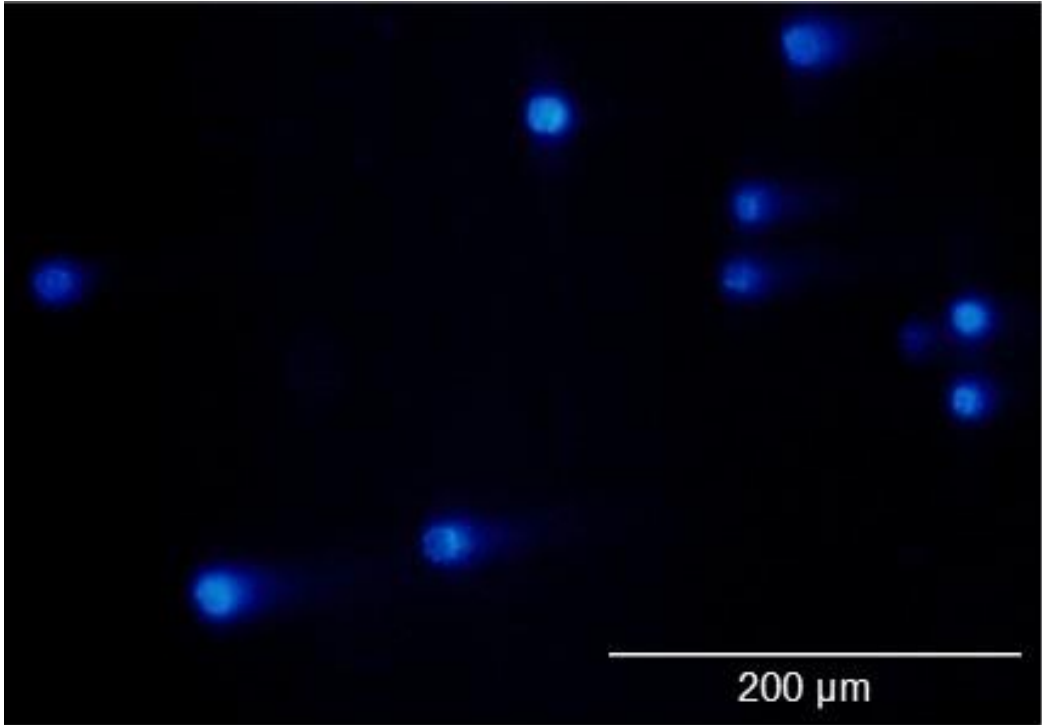
Akrilamid ve luteolinin belirlenen konsantrasyonlarda tek ve kombine edilerek 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanmasıyla meydana gelen DNA hasarı komet testi ile tespit edilmiştir. Kuyruk uzunluğu, kuyruk DNA'sı ve Olive kuyruk momenti parametreleriyle değerlendirilen deney sonuçları Tablo 4.2.2.1'de verilmiştir. Kuyruk uzunluğu ve kuyruk % DNA miktarı akrilamidin artan konsantrasyonlarında anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,001$, $p<0,001$). Kontrol grubuna kıyasla Olive kuyruk momenti 1 mM ve 2 mM akrilamid konsantrasyonlarında anlamlı bir artış göstermiştir. Yalnızca luteolin uygulanan grupla luteolinle kombine edilerek uygulanan akrilamid grupları karşılaştırıldığında kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA miktarı ve Olive kuyruk momenti istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmuştur ($p<0,001$).

Tablo 4.2.2.1: 3T3 Embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan akrilamid ve luteolin konsantrasyonlarının komet testi ile elde edilen DNA hasarı sonuçları *:kontrolle göre, #:luteoline göre ($p<0,01$, $p<0,001$).

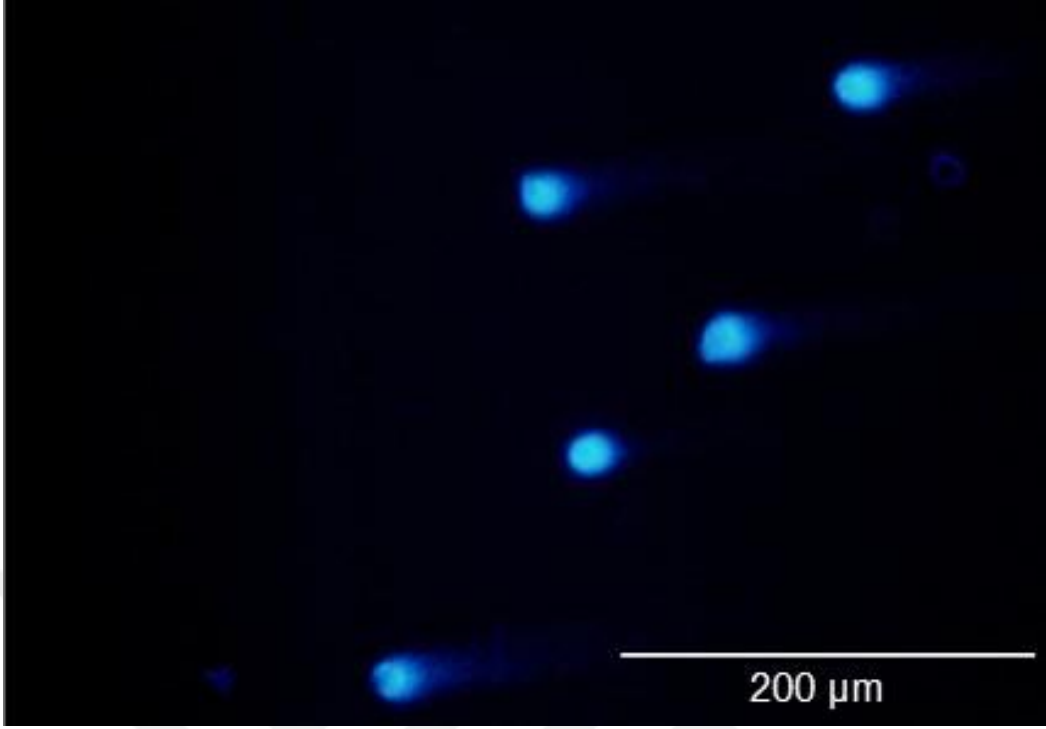
AA mM	Lut 10 μ M	Kuyruk Uzunluğu (μ m)	Kuyruk DNA (%)	Olive Kuyruk Momenti
0	-	0,04 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 1,8	0,46 $\pm$ 0,2
0,5	-	4,77 $\pm$ 0,9***	11,21 $\pm$ 4,8**	1,66 $\pm$ 0,4*
1	-	14,62 $\pm$ 3,4***	14,81 $\pm$ 4,8***	3,04 $\pm$ 0,3***
2	-	32,68 $\pm$ 0,5***	26,76 $\pm$ 2,2***	5,76 $\pm$ 1,6***
0	+	0,01 $\pm$ 0,01	5,97 $\pm$ 2,1	0,52 $\pm$ 0,03
0,5	+	2,26 $\pm$ 0,8	9,25 $\pm$ 0,3	1,54 $\pm$ 0,4
1	+	8,98 $\pm$ 1,1###	11,54 $\pm$ 0,8###	2,57 $\pm$ 1,1###
2	+	15,99 $\pm$ 3,5###	21,81 $\pm$ 0,31###	4,81 $\pm$ 1,7###
H ₂ O ₂		72,83 $\pm$ 2,9	96,88 $\pm$ 3,9	15,31 $\pm$ 2,9



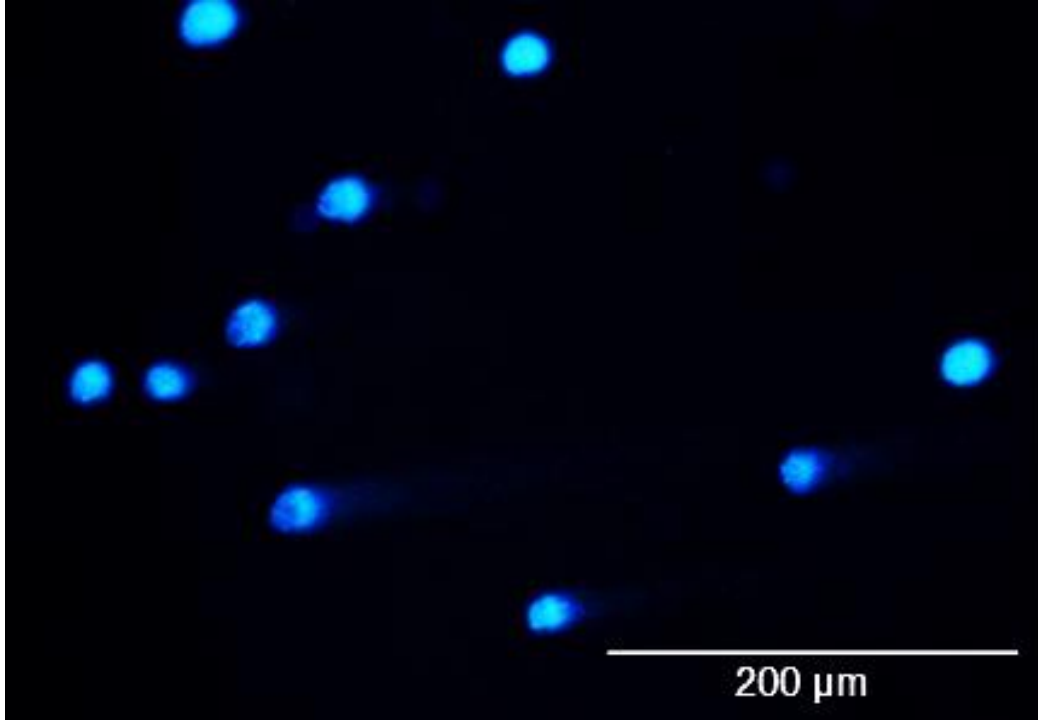
Şekil 4.2.2.1: Kontrol grubuna ait floresan görüntüsü (40X).



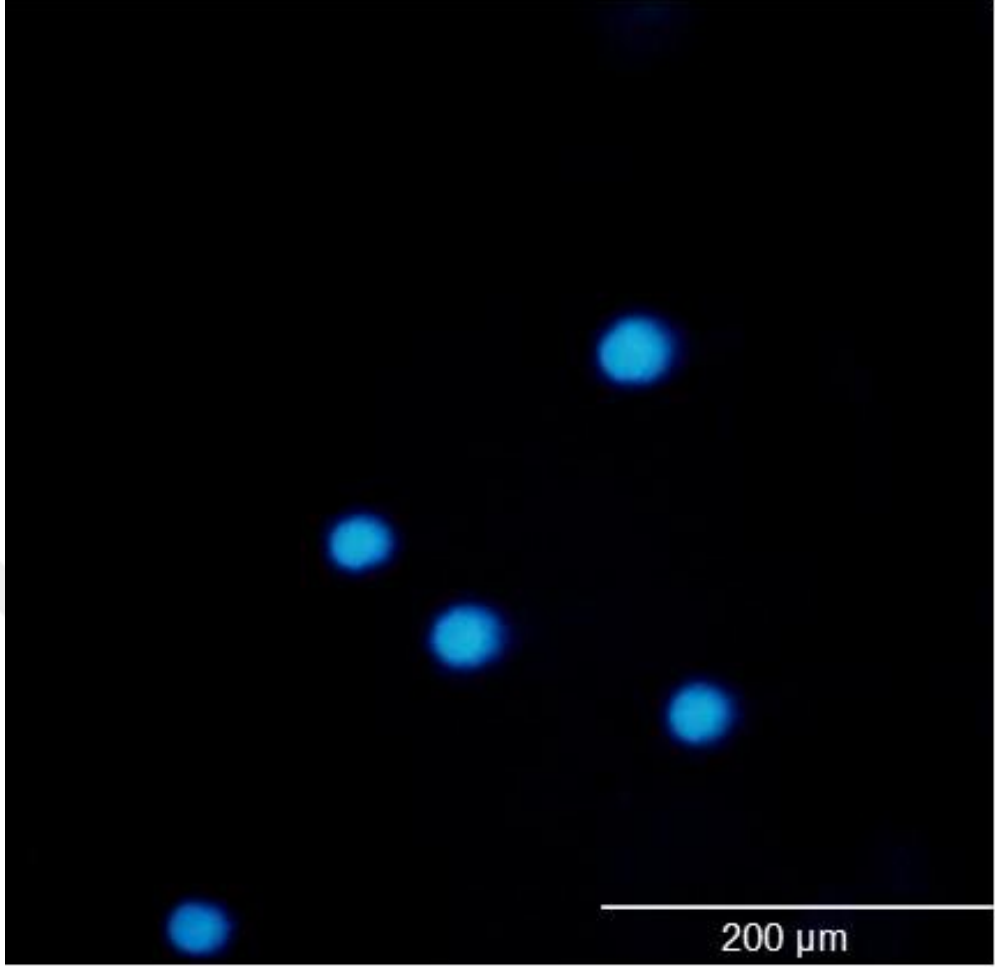
Şekil 4.2.2.2: A1 (0,5 mM) grubuna ait floresan görüntüsü (40X)..



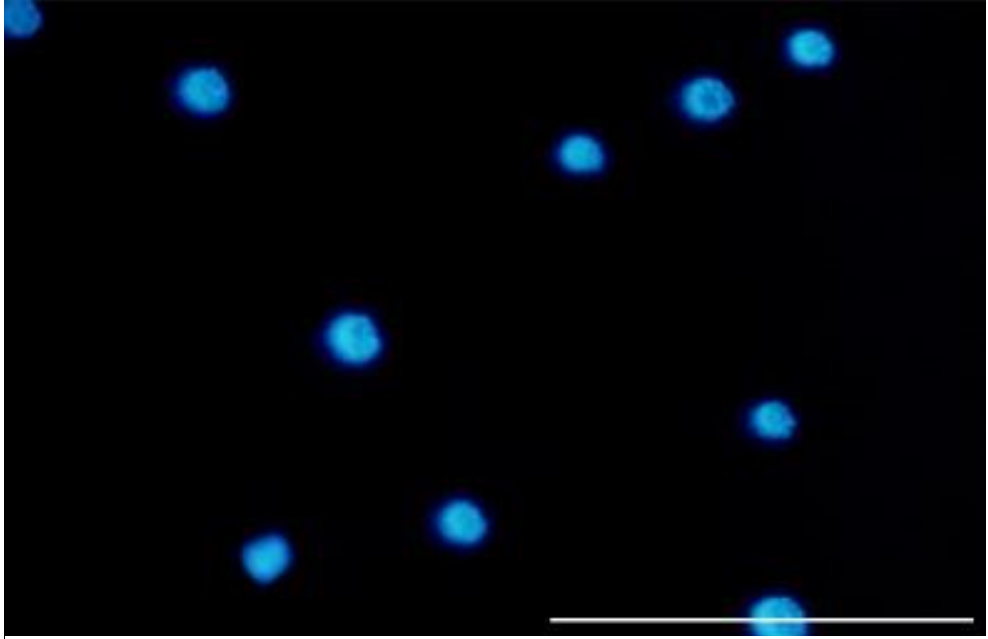
Şekil 4.2.2.3: A2 (1 mM) grubuna ait floresan görüntüleri (40X).



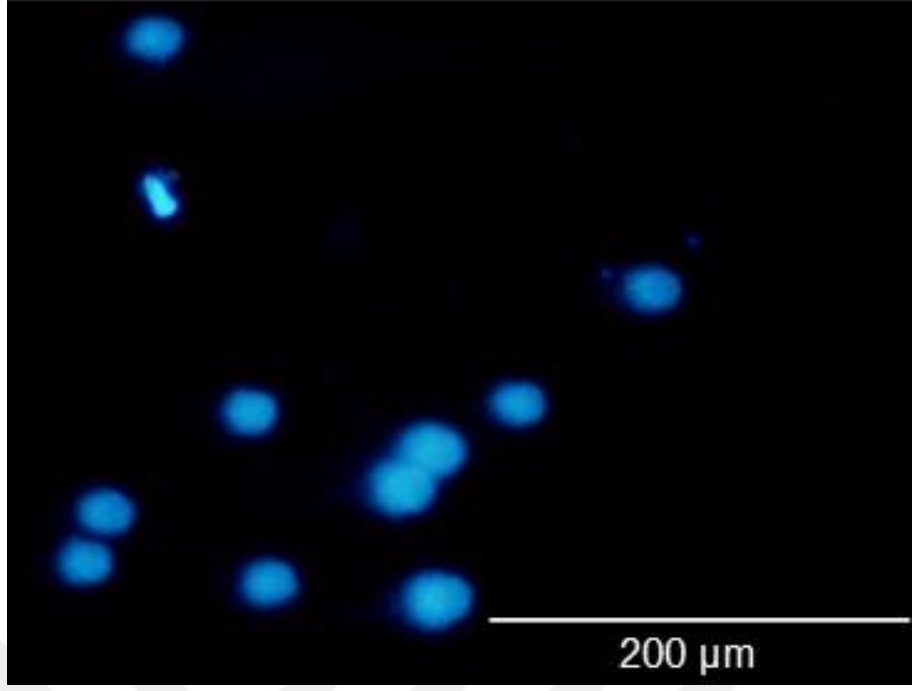
Şekil 4.2.2.4: A3 (2 mM) grubuna ait floresan görüntüleri (40X).



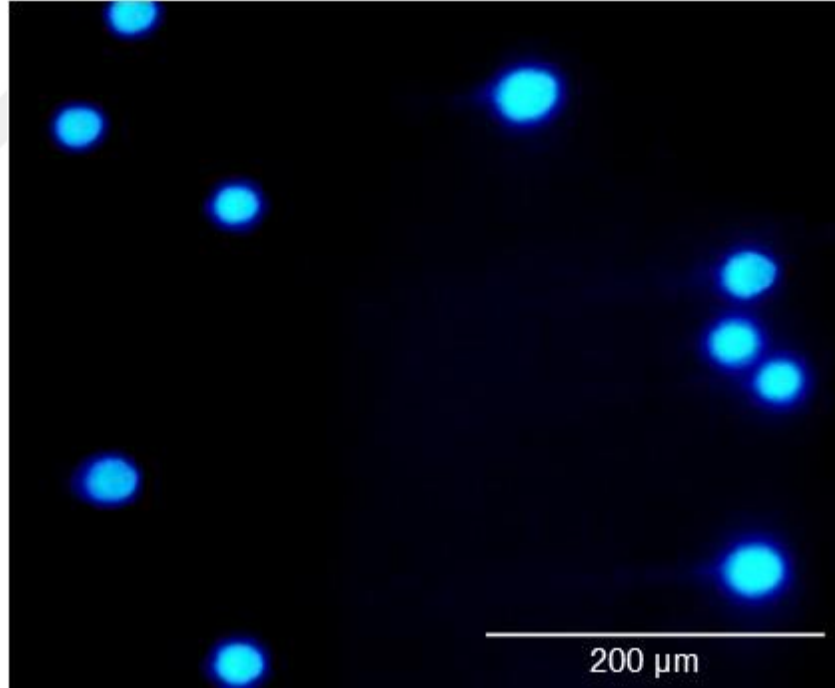
Şekil 4.2.2.5: Luteolin grubuna ait floresan görüntüleri (40X).



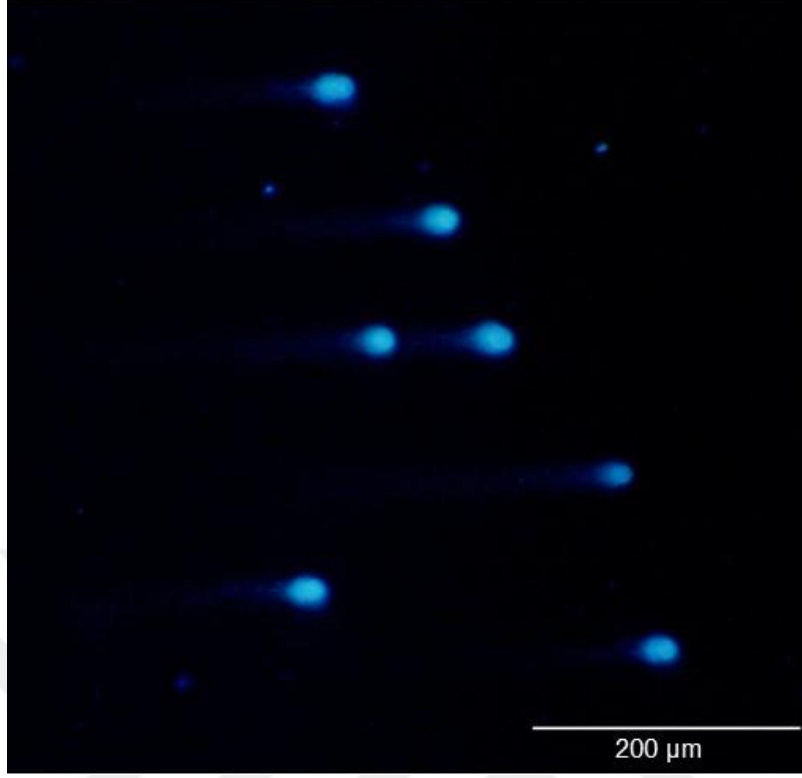
Şekil 4.2.2.6: A1L grubuna ait floresan görüntüleri (40X).



Şekil 4.2.2.7: A2L grubuna ait floresan görüntüleri (40X).



Şekil 4.2.2.8: A3L grubuna ait floresan görüntüleri (40X).



Şekil 4.2.2.1: Pozitif kontrol grubuna ait floresan görüntüleri (40X).

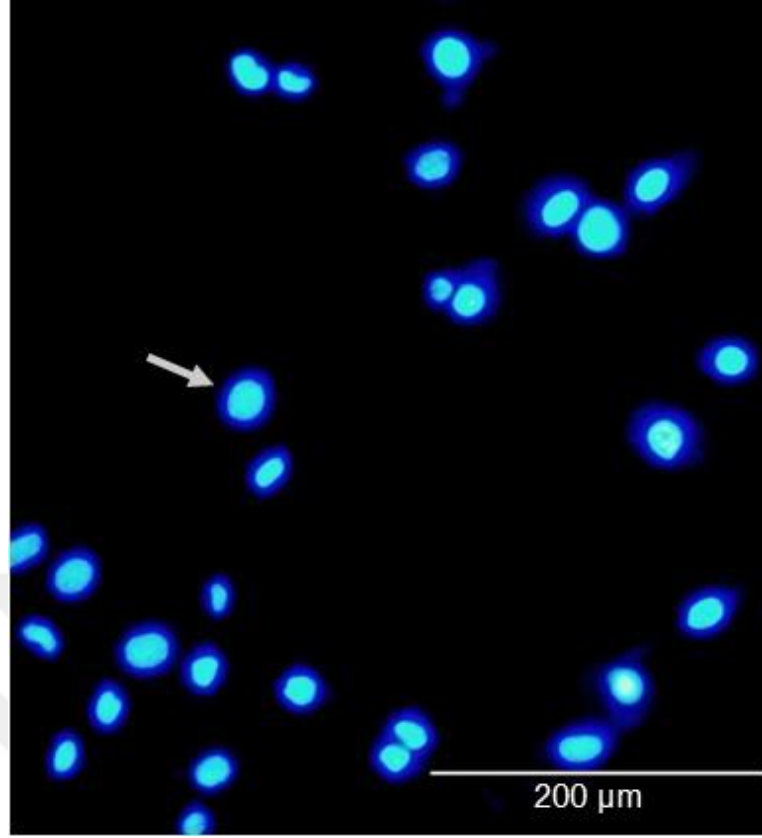
4.3.APOPTOZ BULGULARI

4.3.1. Propidium İyodür/Hoechst Bulguları

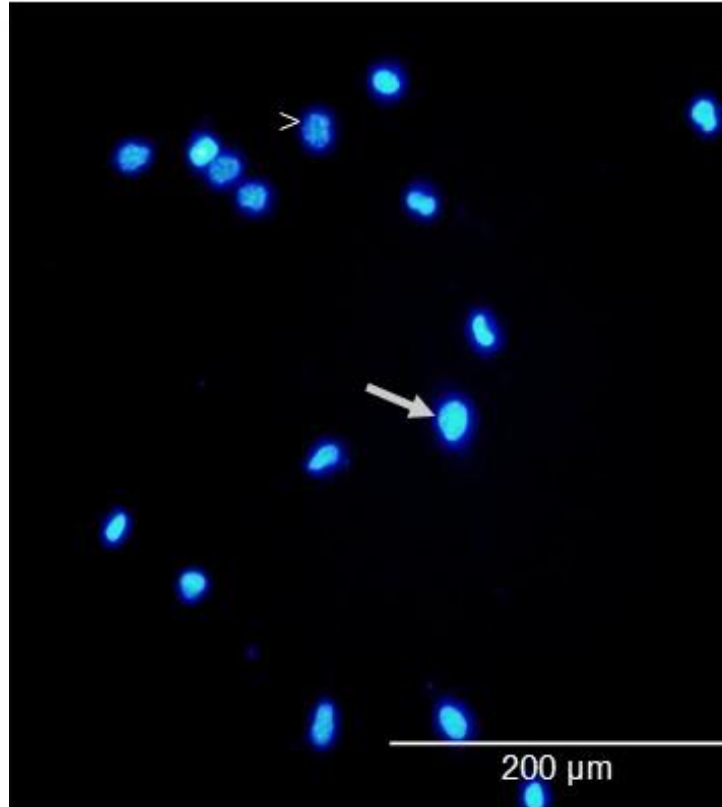
Embriyonik fibroblast hücrelerinde kontrol, akrilamid ve luteolinle kombine edilerek hazırlanan akrilamid gruplarında Propidium İyodür (PI) ve Hoechst 33342 çift floresan boyama yöntemiyle canlı, apoptotik ve ölü hücrelerin yüzde (%) değerleri Tablo 4.3.1.1’de verilmiştir. Deney gruplarındaki morfolojik özellikler incelendiğinde canlı hücreler yuvarlak, mavi ve parlak nükleuslu, apoptotik hücreler nüklear olarak kondense ve fragmentli, ölü hücreler ise membranı parçalanmış ve kırmızımsı renkte gözlenmiştir. Propidium İyodür/ Hoechst bulgularına göre, 1 ve 2 mM akrilamid konsantrasyonlarının uygulandığı hücre popülasyonundaki apoptoz ve ölü oranı kontrole kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,001$, $p<0,0001$). Luteolinle (10 μ M) kombine edilerek uygulanan akrilamid konsantrasyonları yalnızca akrilamid uygulanan gruplarla kıyaslandığında apoptotik ve ölü hücreler anlamlı bir şekilde azalmıştır.

Tablo 4.3.1.1: Akrilamid ve luteolinin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde apoptoz ve ölü oranları
*:kontrolle göre, #:luteoline göre ($p<0,01$, $p<0,001$).

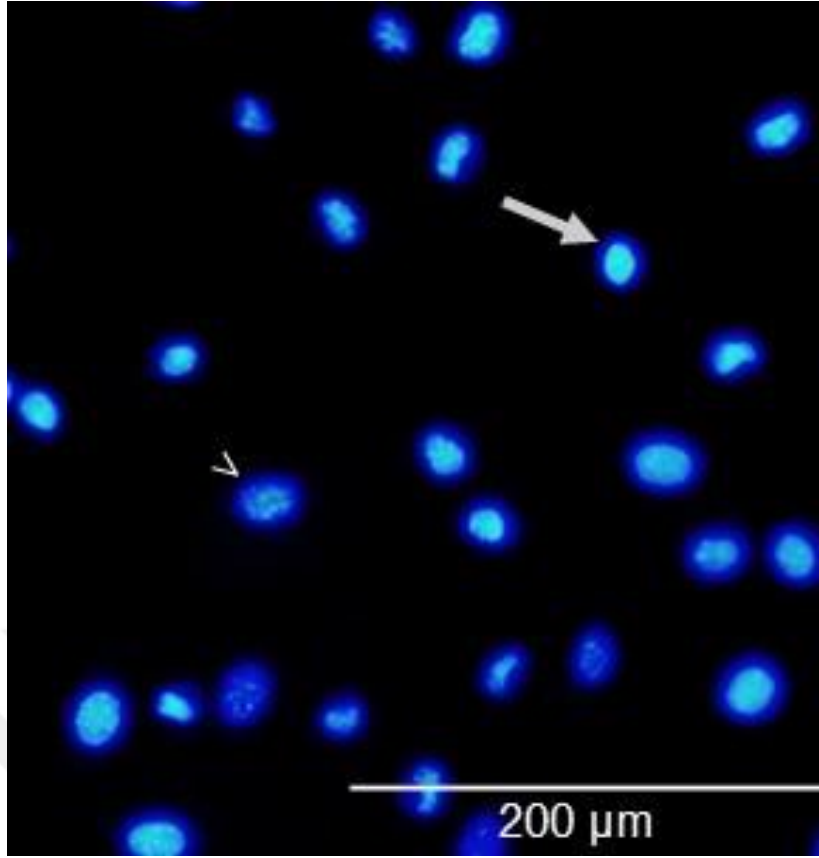
AA mM	Lut 10 μ M	Canlı	Apoptoz	Ölü
0	-	94,86 $\pm$ 4,3	4,97 $\pm$ 1,8	0,17 $\pm$ 0,1
0,5	-	86,52 $\pm$ 6,4	11,82 $\pm$ 2,9	1,65 $\pm$ 1,2
1	-	76,30 $\pm$ 1,9**	21,3 $\pm$ 2,1***	2,4 $\pm$ 0,4**
2	-	66,71 $\pm$ 4,1***	29,37 $\pm$ 4,6***	3,91 $\pm$ 0,6***
0	+	97,5 $\pm$ 0,02	2,32 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,05
0,5	+	88,53 $\pm$ 3,4	10,46 $\pm$ 3,3 [#]	1,02 $\pm$ 0,3
1	+	85,90 $\pm$ 3,7** [#]	12,72 $\pm$ 3,7* ^{##}	1,38 $\pm$ 0,3
2	+	76,31 $\pm$ 0,7*** ^{###}	20,76 $\pm$ 0,9*** ^{####}	2,94 $\pm$ 0,3 ^{###}



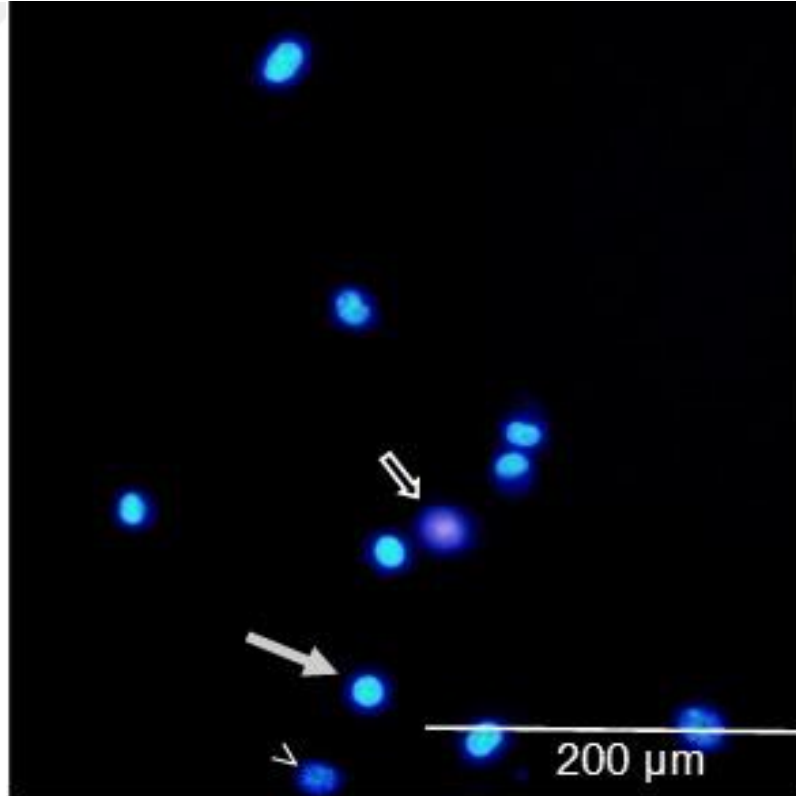
Şekil 4.3.1.1: Kontrol grubuna ait apoptoz floresan görüntüleri. →: canlı hücre



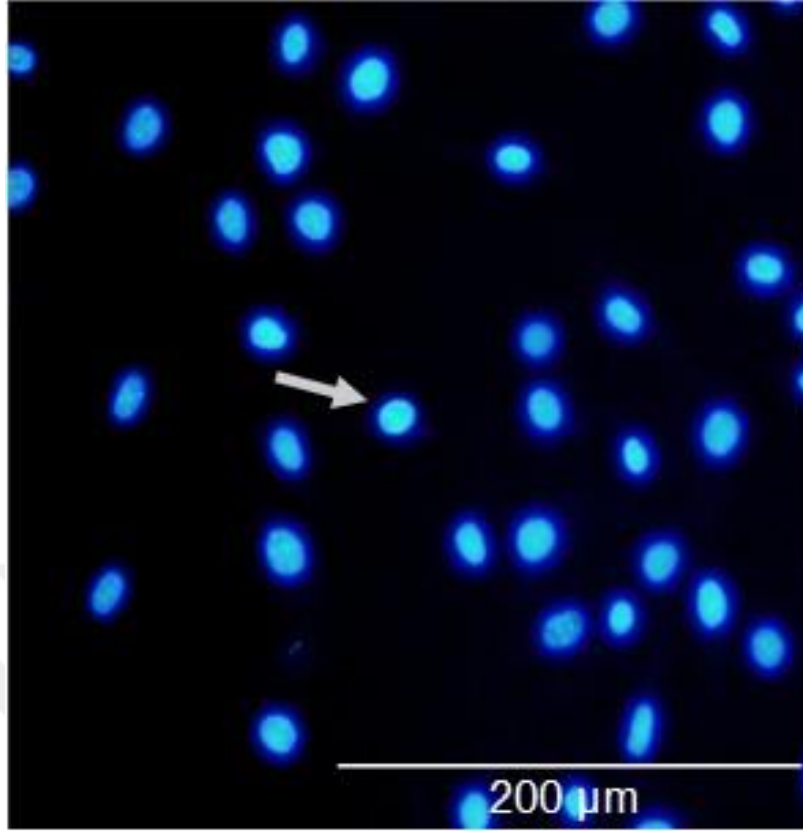
Şekil 4.3.1.2: A1 (0,5 mM) grubuna ait apoptoz floresan görüntüleri. →: canlı hücre >: apoptotik hücre



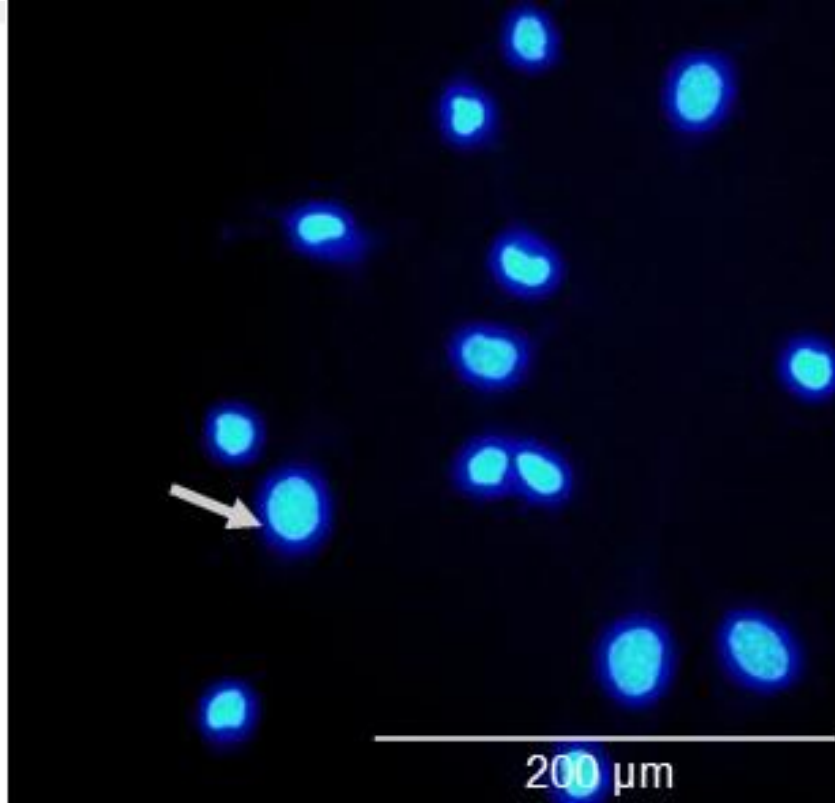
Şekil 4.3.1.3: A2 (1 mM) grubuna ait apoptoz/nekroz floresan görüntüleri. →: canlı hücre <: apoptotik hücre



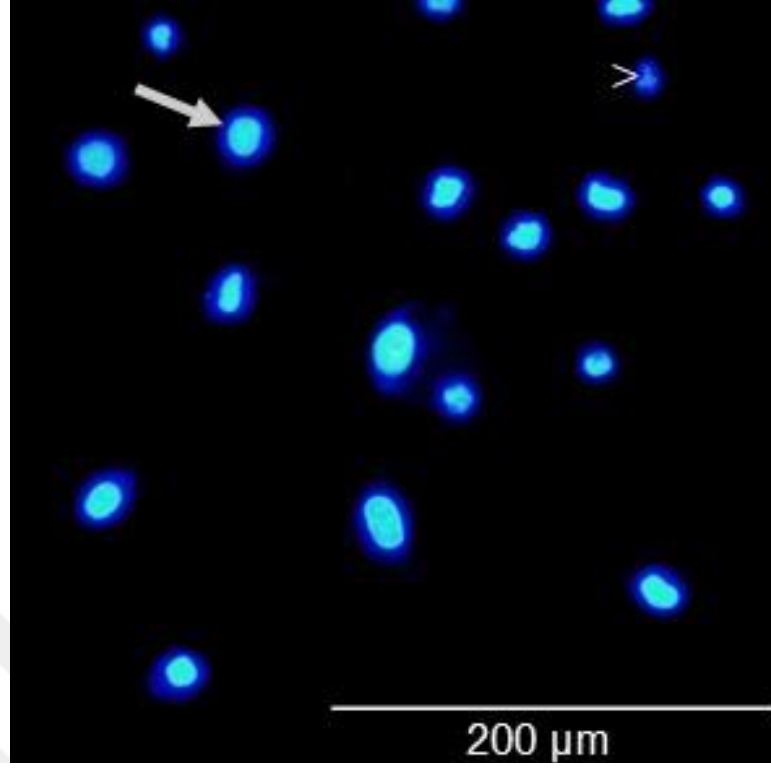
Şekil 4.3.1.4: A3 (2 mM) grubuna ait apoptoz floresan görüntüleri. →: canlı hücre >: apoptotik hücre ⇨: ölü hücre



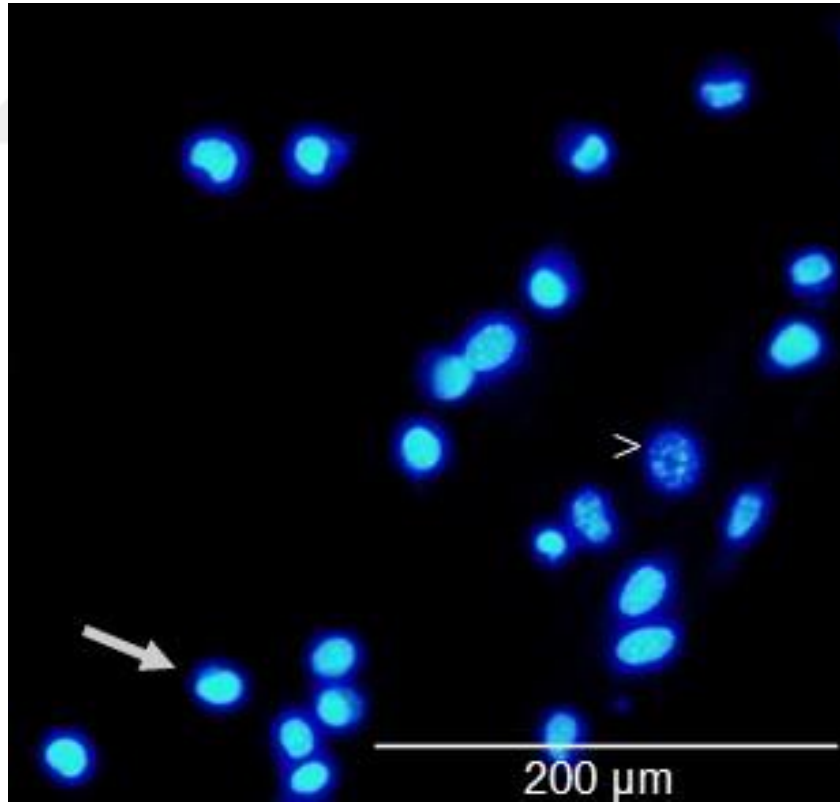
Şekil 4.3.1.5: Luteolin grubuna ait apoptoz floresan görüntüleri. →: canlı hücre



Şekil 4.3.1.6: A1L grubuna ait apoptoz floresan görüntüleri. →: canlı hücre



Şekil 4.3.1.7: A2L grubuna ait apoptoz floresan görüntüleri.→:canlı hücre >: apoptotik hücre



Şekil 4.3.1.8: A3L grubuna ait apoptoz floresan görüntüleri.→:canlı hücre >: apoptotik hücre

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çiğ meyve ve sebzelere uygulanan ısıt işlemler, çeşitli gıda ve gıda bileşenlerinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bu ısıt işlemler arasında kızartma, fırınlama ve fermentasyon gibi farklı yöntemler veya bu yöntemlerin kombinasyonları bulunmaktadır (Perera ve diğ., 2021). Yüksek ısıt işlemler, gıda içeriğindeki lipitleri okside eden Maillard reaksiyonunu tetikleyerek insan sağlığına olumsuz etkileri olan bazı yan ürünleri meydana getirmektedir (Maan ve diğ., 2020). Bu yan ürünler çok sayıda olup çok çeşitli etkilere sahip olabilirler. Gıdaların hazırlanması aşamalarında uygulanan ısıt işlemler, lipitlerin oksidasyonuna ek olarak protein içeriğinde de oksidatif değişikliğe neden olarak sebze ve meyve ürünlerinin antioksidan karakterini bozduğu rapor edilmiştir (Koszucka ve Nowak, 2018). Günlük hayatta sıklıkla tüketilen gıdalarda yan ürün olarak açığa çıkan akrilamid, geniş çaplı toksik etkilere sahip olması sebebiyle popüler araştırma konusu olmuştur. Akrilamidin, insan ve hayvan sistemleri üzerinde genotoksisiteye, nefrotoksisiteye, hepatotoksisiteye ve nörotoksisiteye yol açtığı bilinmektedir (Perera ve diğ., 2021). Akrilamid, vücuda alındıktan sonra biyotransformasyon ile toksik karakter kazanarak mutasyon ve kromozomal hasarlara neden olmaktadır (Eisenbrand, 2020). Akrilamidin etkilerini araştırmak için yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, akrilamidin hücrelerde sitotoksisiteye, kromozom ve DNA hasarına, mikronükleus oluşumuna, poliploidi ve anöploidi oluşumuna, gen ekspresyonunda değişikliklere neden olması ve apoptozu teşvik ettiğini göstermiştir (Albalawi ve diğ., 2017; Hansen ve diğ., 2018; Hong ve diğ., 2019; Jiang ve diğ., 2018; Nowak ve diğ., 2020; Sekeroglu ve diğ., 2017; Zamani ve diğ., 2018; Zhao ve diğ., 2015a; Zhao ve diğ., 2015b). Akrilamidin çeşitli hücre soylarındaki toksik etkileri açığa çıkarılmış olsa da, 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerindeki hücre canlılığını, laktat dehidrogenaz enzim aktivitesini, genotoksisiteyi ve apoptozu nasıl etkilediği ve luteolinin bu etkilere karşı gösterdiği koruyuculuğu gösteren bir çalışma mevcut değildir.

Akrilamidin sitotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda hücre canlılığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla değerlendirilmiştir. Akrilamidin kolon adenokarsinom hücreleri (Caco-2), akciğer bronş epitel hücreleri (BEAS-2B) ve insan lenfosit hücrelerine uygulanan akrilamid konsantrasyonlarının, hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Kontaş Yedier ve diğ., 2022; Nowak ve diğ., 2020; Salimi ve diğ., 2021). Akrilamidin insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) gösterdiği sitotoksik etkilerin araştırıldığı başka bir çalışma, uygulanan 2 M, 1 M, 0,1 M, 0,01 M ve 0,001 M konsantrasyonlarının hücre

popölasyonunda antiproliferatif etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (Secer Celik ve diğ., 2018). Sanayi işçilerinde ortaya çıkan nörölojik belirtileri üzerine akrilamidin C6 glioma hücrelerindeki nörotoksik etkisi üzerine bir çalışma yapılmış ve 4 mM akrilamid konsantrasyonu hücre canlılık oranını % 62,2 seviyesine düşürmüştür. Aynı çalışmada antioksidan etkileri araştırılan timokinon (3,9 μ M) ve kersetin (2 μ M), 4 mM akrilamid konsantrasyonu ile kombine edilmiştir. Kontrol ve akrilamid grubuyla kıyasla timokinon uygulanan akrilamid grubundaki hücre canlılık oranı % 85,1, kersetin grubundaki hücre canlılığı % 76,6 olarak raporlanmıştır (Kacar ve diğ., 2022). Zhao ve arkadaşlarının 2023 yılında insan nöroblastoma hücre soyunda (SH-SY5Y) yaptığı bir çalışmada akrilamidin 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM ve 5 mM konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatlerde hücre canlılığındaki etkileri araştırılmıştır. MTT test sonuçları, nöroblastoma hücrelerindeki metabolik aktivitenin artan akrilamid konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığını ortaya koymuştur. Akrilamidin erkek üreme sistemindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 10 μ M ve 1 mM akrilamid konsantrasyonları, Leydig (TM3) ve Sertoli (TM4) hücrelerinde canlılığı düşürerek sitotoksositeye yol açmıştır (Orta-Yılmaz ve diğ., 2017). Sıçan karaciğerinden izole edilen fibroblast benzeri hücrelerle (BRL-3A) yapılan bir çalışmada, 2 mM akrilamid konsantrasyonunun hücre canlılığını azalttığı, antioksidan madde olan allicinin ise koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (Hong ve diğ., 2019). Akrilamid toksisitesinin güçlü bir antioksidan olan likopen varlığındaki etkilerinin hepatoma hücre soyundaki (HepG2) etkilerinin incelendiği bir araştırmada, 500 μ M akrilamid konsantrasyonunun tek ve 10 μ M likopen konsantrasyonu ile birlikte 24 saatlik maruziyeti yapılmıştır. MTT testi sonuçları, 500 μ M akrilamid uygulanan gruptaki hücre canlılığı % 80 seviyesine düşerken likopenle uygulanan akrilamid grubunda karaciğer koruyucu etki meydana geldiği ortaya konmuştur (Reshmitha ve Nisha, 2021).

Literatürde, akrilamidin tek başına veya antioksidanlarla kombine edilerek uygulanan konsantrasyonlarının fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bazı çalışmalar řu şekildedir: BALB/3T3 hücrelerine, 24 saat boyunca akrilamidin 1, 10, 100 ve 1000 μ mol/L konsantrasyonları tek başına ve 2,5 μ mol/L kurkumin ve 50 μ mol/L C vitamin ile kombine edilerek uygulanmış ve hücre canlılığı testi yapılmıştır. Hücre canlılığı, yalnızca 1000 μ mol/L akrilamid uygulanan grupta anlamlı bir azalma gösterdiği ve kurkumin ve C vitaminin 1000 μ mol/L akrilamid konsantrasyonu ile iyileştirici etki gösterdiği tespit edilmiştir (Orta-Yılmaz, 2020). Akrilamid toksisitesinin NIH/3T3 hücrelerindeki etkilerinin hücresel

yöntemlerle araştırıldığı bir çalışmada 0,5-20 mM aralığında belirlenen 22 akrilamid konsantrasyonu hücrelere 24 saat boyunca uygulanmıştır. MTT testi sonucuna göre, NIH/3T3 hücrelerindeki canlılığın konsantrasyonlardaki artışa bağlı olarak % 21 oranına kadar düştüğü raporlanmıştır (Şahintürk ve diğ., 2018). Fare embriyonik fibroblast hücrelerinde (NIH/3T3) yapılan başka bir çalışmada, hücrelere uygulanan 1 mM, 2 mM ve 5 mM akrilamid dozlarının hücre canlılığını azalttığı rapor edilmiştir (Elahe Mahdizade ve diğ., 2021). Fare embriyonik fibroblast hücrelerindeki akrilamid toksisitesinin ve bu toksisiteye karvakrolün iyileştirici etkisinin incelendiği bir çalışmada 5 mM akrilamidin hücre sağkalımını % 50'nin altına düşürdüğü; akrilamidle kombine edilen 50 ve 100 µM karvakrol konsantrasyonunun hücre canlılığını anlamlı düzeyde arttırdığı belirtilmiştir (Evazalipour ve diğ., 2021). Yaptığımız bu tez çalışmasında, BALB/3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM akrilamid konsantrasyonlarının hücre canlılığını azaltırken; akrilamid konsantrasyonlarına ilave olarak 10 µM luteolin konsantrasyonunun hücrelerde canlılığı arttırdığı ve akrilamidin oluşturduğu sitotoksik etkiyi azalttığı gösterilmiştir.

Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi, çoğu organizmada doku ve hücrelerde bulunan ve glukoneogenez ve hücre içi metabolik yolların kontrolünde önemli bir rol oynar. Hücre zarında meydana gelen hasar sonucunda, hücreler tarafından plazmaya veya hücre kültürü süpernatantına hızlıca salınır. LDH testi, hücre membranında meydana gelen hasarın ölçüldüğü enzimatik bir yöntemdir (Farhana ve Lappin, 2023; Jörg Weyermann ve diğ., 2005). Akrilamidin LDH aktivitesindeki etkilerinin incelendiği BALB/3T3 hücrelerine, 24 saat boyunca akrilamidin 1, 10, 100 ve 1000 µmol/L konsantrasyonları tek başına ve 2,5 µmol/L kurkumin ve 50 µmol/L C vitamin ile kombine edilerek uygulanmıştır. LDH aktivitesinin, tüm akrilamid gruplarında anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kurkumin uygulanan 1000 µmol/L akrilamid grubundaki ve C vitaminin 1 µmol/L akrilamid grubundaki LDH seviyelerindeki anlamlı azalma, çalışmada kullanılan antioksidanların iyileştirici etkisi olduğunu göstermiştir (Orta-Yılmaz, 2020). Akrilamidin erkek üreme sistemindeki LDH aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada 10 µM ve 1 mM akrilamid konsantrasyonları, Leydig (TM3) ve Sertoli (TM4) hücrelerindeki LDH aktivitesinin doza bağlı artışına yol açmıştır (Orta-Yılmaz ve diğ., 2017). İnsan adenokarsinom (MDA-MB-231) hücre soyunda yapılan bir çalışmada, akrilamidin konsantrasyon artışına bağlı olarak LDH seviyesinin arttığını, 10-100 µM aralığında dört saat boyunca uygulanan siyanidin-3-glukozit flavonoidinin hücrelerdeki LDH aktivitesini akrilamid grubuna kıyasla düşürerek koruyucu etkisi olduğunu ortaya

koymuştur (Song ve diğ., 2013). Akrilamid toksisitesine antioksidanların etkisinin araştırıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları destekleyen bu çalışmamızda, 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine 24 saat akrilamidin 0,5 mM 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarının ve bu konsantrasyonlarla 10 µM luteolinin kombine edilerek uygulanması sonucunda LDH testi gerçekleştirilmiştir. LDH testinin spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre, akrilamidin artan konsantrasyonları LDH aktivitesini arttırırken, luteolinle kombine edilerek uygulanan gruplardaki LDH aktivitesi akrilamid gruplarına kıyasla düşük oranlarda ölçülmüştür.

Akrilamid *in vitro* ve *in vivo* sistemlerdeki genotoksitesinin araştırıldığı pek çok çalışmada, akrilamidin vücuda alınması sonucunda toksik metaboliti olan glisidamidin aracılığıyla DNA eklentileri meydana getirdiği gösterilmiştir (Baum ve diğ., 2005; Hansen ve diğ., 2010; Manière ve diğ., 2005; Mei ve diğ., 2008; Naoki ve diğ., 2006). DNA eklentileri, DNA yapısında bulunan tek halkalı (adenin ve guanin) ve çift halkalı (timin ve sitozin) bazların -NH₂ ve -N grupları ile akrilamid yapısında bulunan -NH₂ gruplarının etkileşime girmesiyle oluşmaktadır (Ou ve diğ., 2020). Akrilamidin, BEAS-2B hücrelerindeki genotoksik etki mekanizmalarını açığa çıkarmak için uygulanan konsantrasyonlarının (0,5 mM, 1 mM ve 5 mM) kuyruk DNA yüzdesini, kuyruk momentini ve olive kuyruk momentini arttırdığını tespit edilmiştir (Kontaş Yedier ve diğ., 2022). Başka bir çalışmada kolon adenokarsinom hücrelerine (Caco-2) uygulanan 0,2 mM, 0,8 mM, 3,2 mM, 6,4 mM ve 12,5 mM akrilamid konsantrasyonlarının doza bağlı olarak komet kuyruk uzunluğunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (Nowak ve diğ., 2020). Vasily ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı *in vivo* çalışmada 0,33 mg/kg, 0,66 mg/kg, 1,32 mg/kg, 2,7 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg akrilamid dozları, Fisher 344 sıçanlarına 29 gün boyunca uygulanmıştır. Kuyruk DNA yüzdesinin, 10 mg/kg doz uygulanan hayvan grubunda arttığı raporlanmış ve DNA hasarının 2,8 katlık artış gösterdiği bildirilmiştir. Sprague Dawley sıçanlarıyla yapılan başka bir çalışmada, 18 mg/kg, 39 mg/kg ve 54 mg/kg akrilamid dozlarının etkileri sırasıyla 5, 24, 48 ve 72 saat sonra alınan kan örneklerindeki plazmadan tayin edilmiştir. Sonuçlara göre, 36 mg/kg ve 54 mg/kg akrilamid dozları 5 ve 24 saat maruziyetten sonra DNA hasarını anlamlı düzeyde arttırmıştır. Çalışmada akrilamidin 18 mg/kg, 26 mg/kg ve 54 mg/kg dozlarına 24 saatlik maruziyet sonucunda kan, beyin, kemik iliği, karaciğer ve testis organlarında da DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir (Manière ve diğ., 2005). Wistar albino sıçanlarıyla yapılan başka bir çalışmada, akrilamid kaynaklı genotoksisiteye karşı N-asetilsisteinin (NAC) koruyucu etkisi komet testi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucuna göre, kontrol ve NAC ile muamele edilmiş lenfosit gruplarında DNA

hasarına rastlanmamış, akrilamid grubundaki lenfositlerde kuyruk oluşumu tespit edilmiştir. Akrilamidle kombine edilerek uygulanan NAC grubunda ise bu kuyruk oluşumu önemli ölçüde azalmıştır (Altinoz ve diğ., 2014). Balb/3T3 embriyonik fibroblast hücreleri ile yapılan bu tez çalışmasında, komet testi bulgularına göre akrilamidin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak kuyruk uzunluğunda, kuyruktaki % DNA miktarında ve Olive kuyruk momentinde anlamlı artış görülmüştür ($p<0,01$ ve $p<0,001$). Buna karşın luteolinle kombine edilerek uygulanan 1 mM ve 2 mM akrilamid konsantrasyonları, hücrelerde kuyruk uzunluğunu önemli ölçüde azaltarak kuyruktaki % DNA miktarında ve Olive kuyruk momentinde anlamlı bir iyileştirme göstermiştir.

HEK293 hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada, akrilamidin 0,001 M, 0,01 M ve 0,1 M, konsantrasyonlarının 24 saatlik maruziyet sonucunda meydana getirdiği genotoksisite mikronükleus yöntemiyle araştırılmıştır. Sonuçlara göre, akrilamidin artan dozlarına bağlı olarak mikronükleus görülme sıklığı sırasıyla 0,0091, 0,031 ve 0,039 olarak hesaplanmıştır (Secer Celik ve diğ., 2018). Başka bir genotoksisite çalışmasında, akrilamidin sinir sistemindeki genotoksik etkilerinin belirlenmesi için 10-12 haftalık Swiss albino farelerine 2 mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg, 16 mg/kg, ve 32 mg/kg akrilamid dozları oral yolla 30 gün boyunca uygulanmıştır. Maruziyet süresi bitiminde kemik iliği hücrelerinde meydana gelen genotoksisite mikronükleus yöntemiyle tespit edilmiştir. Akrilamid dozlarının kontrol grubuna kıyasla mikronükleus sıklığında anlamlı bir artışa neden olarak, kemik iliği hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği saptanmıştır (Algarni, 2018).

Akrilamidin muhtemel karsinojen olarak bildirilmesi, halk sağlığı endişelerini arttırmış ve araştırmacılar tarafından akrilamidin toksik etkilerine karşı koruyucu stratejiler araştırılmaya başlanmıştır. Bitki sekonder metabolitleri olan flavonoidler, antioksidan içerikleri nedeniyle toksisite çalışmalarında antioksidan olarak önerilmiştir. Bu çalışmalardan bazıları şöyledir: Akrilamidin HepG2 hücre soyunda oluşturduğu genotoksik etkilere karşı güçlü bir antioksidan olarak önerilen kurkuminin DNA hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu rapor edilmiştir. Komet testi sonuçlarına göre, HepG2 hücrelerine uygulanan 2,5 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM akrilamidin doza bağlı olarak kuyruk uzunluğunu arttırdığı görülürken, 2,5 µg/mL kurkuminle birlikte uygulanan akrilamid dozlarında herhangi bir kuyruk oluşumu tespit edilmemiştir. Mikronükleus testi sonuçlarına göre, HepG2 hücrelerine uygulanan 1,25 mM ve 2,5 mM akrilamid konsantrasyonlarının mikronükleus görülme sıklığını anlamlı ölçüde arttırdığı

görülürken ($p < 0,05$, $p < 0,01$), kurkumin ile uygulandığında mikronükleus oluşumunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, akrilamidin meydana getirdiği genotoksik etki kurkuminle önemli ölçüde azaltılmıştır (Cao, 2008). Başka bir çalışmada, akrilamidin insan lenfositlerinde meydana getirdiği genotoksisiteye karşı L-karnitinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. İnsan lenfositlerine uygulanan 0,25 mM, 50 mM ve 100 mM akrilamid konsantrasyonlarının 24 saatlik maruziyeti sonunda, mikronükleus testi uygulanmıştır. Akrilamidin yüksek konsantrasyonları, hücre popülasyonunda mikronükleus oluşumunu önemli ölçüde arttırırken L-karnitin (100 ve 200 μ M) akrilamid gruplarında mikronükleus oluşumunu inhibe ettiği açığa çıkarılmıştır (Zamani ve diğ., 2018). Akrilamidin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde meydana getirdiği genotoksisiteye karşı luteolinin koruyucu etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, akrilamid konsantrasyonları yalnız ve luteolinle (10 μ M) kombin edilerek hücrelere uygulanmıştır. Yapılan mikronükleus testi sonuçlarına göre, akrilamidin 2 mM konsantrasyonunun hücrelerde mikronükleus oluşumunu arttırdığını göstermiştir. Mikronükleus testinin önemli bir parametresi olan nükleer bölünme indeksi sonuçları 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı bir azalma göstererek akrilamidin genotoksik etkisinin olduğunu desteklemiştir. Luteolinle uygulanan 2 mM akrilamid grubundaki mikronükleus oluşumunun anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiş ve luteolinin akrilamid genotoksisitesine karşı iyileştirici etkisi olduğu ortaya konmuştur.

Yapılan bu tez çalışmasında, akrilamidin hücrelerde meydana getirdiği sitotoksik ve genotoksik etkiye karşı luteolinin iyileştirici etkilerinin açığa çıkarılmasında 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Sitotoksisite verilerinden elde edilen sonuçlara göre, akrilamidin 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarının hücre canlılığını sırasıyla % 90, % 80 ve % 75 seviyelerine indirdiği görülürken, luteolinle (10 μ M) uygulanan akrilamid gruplarında hücre canlılığında artış tespit edilmiştir. Yapılan LDH testi sonuçlarında ise akrilamidin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak LDH aktivitesinde artış görülürken, luteolinle kombine edilerek uygulanan gruplardaki enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanan akrilamid konsantrasyonlarının komet kuyruk oluşumu ve mikronükleus oluşumuna neden olması literatürdeki diğer genotoksisite çalışmalarıyla örtüşmektedir (Algarni, 2018; Cao, 2008; , Zamani ve diğ., 2018). Akrilamidin embriyonik fibroblast hücrelerinde genotoksik etkisi olduğu bilinse de literatürde luteolinin akrilamid genotoksisitesine karşı koruyucu etkisi olduğunu gösteren bir çalışma mevcut değildir. Yapılan bu çalışmada, luteolinin akrilamidin genotoksisitesine karşı iyileştirici özellik gösterdiği

hücrelerde meydana gelen komet kuyruk oluşumunun azalması ve mikronükleus görülme sıklığını inhibe etmesinin gösterilmesiyle açığa çıkarılmıştır.



KAYNAKLAR

- Aaronson, S. A., Todaro, G. J., 1968, Development of 3T3-like lines from Balb/c mouse embryo cultures: Transformation susceptibility to SV40, *Journal of Cellular Physiology*, 72(2), 141–148.
- Aherne, S. Aisling., O'Brien, N., 2002, Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism, *Nutrition*, 18(1), 75–81.
- Albalawi, A., Alhasani, R.H.A., Biswas, L., Reilly, J., Shu, X., 2017, Protective effect of carnosic acid against acrylamide-induced toxicity in RPE cells, *Food and Chemical Toxicology*, 108(Pt B), 543-553.
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Aitio, A., 2000, IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111–172.
- Albiach-Delgado, A., Esteve-Turrillas, F.A., Fernández, S.F., Garlito, B., Pardo, O., 2022, Review of the state of the art of acrylamide human biomonitoring, *Chemosphere*, 295, 133880–133880.
- Alekhyasita, G. J., Gowthami, M., Srikanth, G., Krishna, M. M., Rama Sireesha, K., Sajjarao, M., Nagarjuna, K., Nagarjuna, M., Chinnaboina, G. K., Mishra, A., SreeHarsha, N., 2019, Protective role of luteolin against bisphenol A-induced renal toxicity through suppressing oxidative stress, inflammation, and upregulating Nrf2/ARE/ HO-1 pathway, *IUBMB Life*, 71(7), 1041-1047.
- Algarni, A. A., 2018, Genotoxic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells. (2018). *Caryologia*, 71(2), 160-165.
- Altinoz, E., Turkoz, Y., 2014, The protective role of n-acetylcysteine against acrylamide-induced genotoxicity and oxidative stress in rats, *Gene Therapy and Molecular Biology*, 16, 35-43.
- Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E., 1975, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(6), 347–363.
- Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C. S., Rani, V., 2014, Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques, *Journal of Microscopy*, 255(1), 7–19.
- Azqueta, A., Muruzabal, D., Boutet-Robinet, E., Milic, M., Dusinska, M., Brunborg, G., Collins, A. R., 2019, Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 24–32.
- Bangar, S.P., Kajla, P., Chaudhary, V., Sharma, N., Ozogul, F., 2023, Luteolin: A flavone with myriads of bioactivities and food applications, *Food Bioscience*, 52, 102366–102366.

- 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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1-2), 61–69.
- Belloc, F., Dumain, P., Boisseau, M. R., Jalloustre, C., Reiffers, J., Bernard, P., Lacombe, F., 1994, A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells, *Cytometry*, 17(1), 59–65.
- Besaratinia, A., Pfeifer, G. P., 2005, DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1-2), 31–40.
- Bhat, T. A., Chaudhary, A. K., Kumar, S., O'Malley, J., Inigo, J. R., Kumar, R., Yadav, N., Chandra, D., 2017, Endoplasmic reticulum-mediated unfolded protein response and mitochondrial apoptosis in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1867(1), 58–66.
- Blank, I., 2005, Current Status of Acrylamide Research in Food: Measurement, Safety Assessment, and Formation, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043(1), 30–40.
- Bock, F. J., Tait, S. W. G., 2019, Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), 85–100.
- Cao, J., Liu, Y., Jia, L., Jiang, L.-P., Geng, C.-Y., Yao, X.-F., Kong, Y., Jiang, B.-N., Zhong, L.-F., 2008, Curcumin Attenuates Acrylamide-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in HepG2 Cells by ROS Scavenging, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 12059–12063.
- Chazotte, B., 2011, Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1).
- Choi, M. Y., Song, H. S., Hur, H. S., Sim, S. S., 2008, Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in α -MSH-stimulated B16 melanoma cells, *Archives of Pharmacal Research*, 31(9), 1166–1171.
- Collins, A. R., 2004, The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations, *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261.
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Waterhouse, N. J., 2016, Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(9).
- Czabotar, P. E., Garcia-Saez, A. J., 2023, Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(10), 732–748.
- Çetinkaya, M., Baran, Y., 2023, Therapeutic Potential of Luteolin on Cancer, *Vaccines (Basel)*, 11(3), 554–554.

- de Lima, J. P., Silva, S. N., Rueff, J., Pingarilho, M., 2016, Glycidamide genotoxicity modulated by Caspases genes polymorphisms, *Toxicology in Vitro*, 34, 123–127.
- Dick, M.K., Miao, J.H., Lima, F., 2022, *Histology, Fibroblast*, StatPearls, Treasure Island.
- Dobrovolsky, V. N., Monserrat Pacheco-Martínez, M., McDaniel, L.P., Pearce, M. G., Ding, W., 2016, In vivo genotoxicity assessment of acrylamide and glycidyl methacrylate, *Food and Chemical Toxicology*, 87, 120–127.
- Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Carreira, S. C., Saunders, M., 2012, Critical Evaluation of Toxicity Tests, *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*, 63–83.
- Eastmond, D. A., 2014, Sister Chromatid Exchanges, *Encyclopedia of Toxicology*, 276–277.
- European Food Safety CONTAM Panel. (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6):4104, 321.
- Elhelaly, A. E., AlBasher, G., Alfarraj, S., Almeer, R., Bahbah, E. I., Fouda, M. M. A., Abdel-Daim, M. M., 2019, Protective effects of hesperidin and diosmin against acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative damage in rats, *Environmental Science and Pollution Research*, 26(34), 35151–35162.
- Elmassry, M. M., Zayed, A., Farag, M. A., 2020, Gut homeostasis and microbiota under attack: impact of the different types of food contaminants on gut health, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(3), 738–763.
- Elmore, S., 2007, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Endow, S., Atwood, K., 1988, Magnification: gene amplification by an inducible system of sister chromatid Exchange, *Trends in Genetics*, 4(12), 348–351.
- Evazalipour, M., Safarzadeh Kozani, P., Shabani, S., Rezaei Soufi, B., 2021, Acrylamide Induced Oxidative Cellular Senescence in Embryonic Fibroblast Cell Line (NIH 3T3): A Protection by Carvacrol, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 16(4), e109399.
- Exon, J. H., 2006, A Review of the Toxicology of Acrylamide, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9(5), 397–412.
- Farhana, A., and Lappin, S.L., 2023, Biochemistry, Lactate Dehydrogenase, In: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, PMID: 32491468.
- Fenech, M., Morley, A. A., 1985, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2), 29–36.
- Fenech, M., Crott, J. W., 2002, Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 131–136.

- Fenech, M., 2007, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104.
- Fenech, M., 2020, Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability, *Genes*, 11(10), 1203.
- Firbas, P., Amon, T., 2014, Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L., *Caryologia*, 67(1), 25–35.
- Friedman, M., 2003, Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4504–4526.
- Gerhard, E., 2020, Revisiting the evidence for genotoxicity of acrylamide (AA), key to risk assessment of dietary AA exposure, *Archives of Toxicology*, 94(9), 2939–2950.
- Ghanayem, B. I., Bai, R., Kissling, G. E., Travlos, G., Hoffler, U., 2010, Diet-Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity, *Biology of Reproduction*, 82(1), 96–104.
- Govindaraju, I., Sana, M., Chakraborty, I., Md. Hafizur Rahman, Biswas, R., Mazumder, N., 2024, Dietary Acrylamide: A Detailed Review on Formation, Detection, Mitigation, and Its Health Impacts, *Foods*, 13(4), 556–556.
- Grotewold, E., Davies, K., 2008, Trafficking and Sequestration of Anthocyanins, *Natural Product Communications*, 3(8).
- Gulbins, A., Jekle, K., Ferlinz, H., Grassmé, Lang, F., 2000, Physiology of apoptosis, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279(4), F605–F615.
- Gupta, D., Singh, S., Soni, R., Gupte, S. S., Arti Rathour, Shrivastava, S., Shukla, S., 2023, Possible metabolic effect of acrylamide on biological system, *Food Safety and Health*, 1(2), 126–138
- Hagmar, L., Törnqvist, M., Nordander, C., Rosén, I., Bruze, M., Kautiainen, A., Magnusson, A.-L., 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 & Health*, 27(4), 219–226.
- Harahap, Y., Jautan, A., Sunarsih, 2021, The Levels of Acrylamide and Glycidamide as Biomarker in Smokers: An Article Review, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 12(1), 726–732.
- Hartwig, A., Arand, M., Epe, B., Guth, S., Jahnke, G., Lampen, A., Martus, H.-J., Monien, B., Rietjens, I. M. C. M., Schmitz-Spanke, S., Schriever-Schwemmer, G., Steinberg, P., Eisenbrand, G., 2020, Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens, *Archives of Toxicology*, 94(6), 1787–1877.
- Hartwig, J. H., Stossel, T. P., 1976, Interactions of actin, myosin, and an actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages. III. Effects of cytochalasin B, *Journal of Cell Biology*, 71(1), 295–303.

- He, F. S., Zhang, S. L., Wang, H. L., Li, G., Zhang, Z. M., Li, F. L., Dong, X. M., Hu, F. R., 1989, Neurological and electroneuromyographic assessment of the adverse effects of acrylamide on occupationally exposed workers. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 15(2), 125–129.
- Helland Hansen, S., Olsen, A., Söderlund, E.J., Brunborg, G., 2010, In vitro investigations of glycidamide-induced DNA lesions in mouse male germ cells and in mouse and human lymphocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology and environmental Mutagenesis*, 696(1), 55–61.
- Hendrich, A. B., 2006, Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(1), 27–40.
- Hong, Y., Nan, B., Wu, X., Yan, H., Yuan, Y., 2019, Allicin alleviates acrylamide-induced oxidative stress in BRL-3A cells, *Life Science*, 231, 116550.
- Huang, M., Jiao, J., Wang, J., Xia, Z., Zhang, Y., 2018, Exposure to acrylamide induces cardiac developmental toxicity in zebrafish during cardiogenesis, *Environmental Pollution*, 234, 656–666.
- IARC, 1994, Acrylamide In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, *International Agency for Research on Cancer*, 60, 389–433.
- Jain, R., Tiwari, A., 2020, Monograph: Luteolin, *Matrix Science Medica*, 4(3), 88.
- Jiang, L., Cao, J., An, Y., Chen, G., Qu, S., Jiang, L., Zhong, L., 2007, Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells, *Toxicology in Vitro*, 21(8), 1486–1492.
- Kaçar, S., Şahintürk, V., Tomsuk, Ö., Kutlu, H.M., 2022, The effects of thymoquinone and quercetin on the toxicity of acrylamide in rat glioma cells, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(4).
- Kalluri, R., 2016, The biology and function of fibroblasts in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 582–598.
- Kang, K. A., Piao, M. J., Ryu, Y. S., Hyun, Y. J., Park, J. E., Shilnikova, K., Zhen, A. X., Kang, H. K., Koh, Y. S., Jeong, Y. J., Hyun, J. W., 2017, Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells, *International Journal of Oncology*, 51(4), 1169–1178.
- Katen, A. L., Roman, S. D., 2015, The genetic consequences of paternal acrylamide exposure and potential for amelioration, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 777, 91–100.
- Kendall, R. T., Feghali-Bostwick, C. A., 2014, Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators, *Frontiers in Pharmacology*, 5.

- Kim, N. M., Kim, J., Chung, H. Y., Choi, J. S., 2000, Isolation of luteolin 7-O-rutinoside and esculetin with potential antioxidant activity from the aerial parts of *Artemisia montana*, *Archives of Pharmacal Research*, 23(3), 237–239.
- King, D. J., Noss, R. R., 1989, Toxicity of Polyacrylamide and Acrylamide Monome, *Reviews on Environmental Health*, 8(1-4).
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., Baran, Y., 2016, Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis, *Tumor Biology*, 37(7), 8471–8486.
- Kisurina-Evgenieva, O. P., Sutiagina, O. I., Onishchenko, G. E., 2016, Biogenesis of micronuclei, *Biochemistry (Moscow)*, 81(5), 453–464.
- Kontaş Yedier, S., Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., Aydın, B., 2022, Cytotoxic, genotoxic, and carcinogenic effects of acrylamide on human lung cells, *Food and Chemical Toxicology*, 161, 112852.
- Kopańska, M., Łagowska, A., Kuduk, B., Banaś-Ząbczyk, A., 2022, Acrylamide Neurotoxicity as a Possible Factor Responsible for Inflammation in the Cholinergic Nervous System, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2030–2030.
- Koszucka, A., Nowak, A., 2018, Thermal processing food-related toxicants: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(22), 3579–3596.
- Langie, S. A. S., Azqueta, A., Collins, A. R., 2015, The comet assay: past, present, and future, *Frontiers in Genetics*, 6.
- Liao, W., McNutt, M. A., Zhu, W.-G., 2009, The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, *Methods*, 48(1), 46–53.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., Shen, H.-M., 2008, Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy, *Current Cancer Drug Targets*, 8(7), 634–646.
- Lineback, D. R., Coughlin, J. R., Stadler, R. H., 2012, Acrylamide in Foods: A Review of the Science and Future Considerations, *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 15–35.
- Liu, S., Jiang, L., Zhong, T., Kong, S., Zheng, R., Kong, F., Zhang, C., Zhang, L., An, L., 2015, Effect of Acrylamide on Oocyte Nuclear Maturation and Cumulus Cells Apoptosis in Mouse In Vitro, *PLOS ONE*, 10(8), e0135818.
- Lockshin, R. A., Williams, C. M., 1964, Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms, *Journal of Insect Physiology*, 10(4), 643–649.
- Lund, M. N., Ray, C. A., 2017, Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(23), 4537–4552.

- Maan, A.A., Anjum M.A., Khan, M.K. I., Nazir, A., Saeed, F., Afzaal M., Aadil, R.M., 2022, Acrylamide Formation and Different Mitigation Strategies during Food Processing – A Review, *Food Reviews International*, 38(1), 70-87.
- Mahdiani, S., Omidkhoda, N., Heidari, S., Hayes, A. W., Karimi, G., 2022, Protective effect of luteolin against chemical and natural toxicants by targeting NF- κ B pathway, *BioFactors*, 48(4), 744–762.
- Mahdizade, E., Baeeri, M., Hodjat, M., Rahimifard, M., Navaei-Nigjeh, M., Haghi-Aminjan, H., Moeini-Nodeh, S., Hassani, S., Dehghan, G., Ali, M., Abdollahi, M., 2021, Impact of Acrylamide on Cellular Senescence Response and Cell Cycle Distribution via an In-vitro Study, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 20(4), 165–177.
- Manière, I., Godard, T., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Guffroy, M., Laurentie, M., Poul, J.-M., 2005, DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1-2), 119–129.
- Manzoor, M. F., Ahmad, N., Ahmed, Z., Siddique, R., Zeng, X., Rahaman, A., Muhammad Aadil, R., Wahab, A., 2019, Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives, *Journal of Food Biochemistry*, 43(9).
- Marković Filipović, J., Karan, J., Ivelja, I., Matavulj, M., Stošić, M., 2022, Acrylamide and Potential Risk of Diabetes Mellitus: Effects on Human Population, Glucose Metabolism and Beta-Cell Toxicity, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6112.
- Martinez, M. M., Reif, R. D., Pappas, D., 2010, Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques, *Analytical Methods*, 2(8), 996.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., 2006, Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie*, 88(11), 1515–1531.
- Mei, N., Hu, J., Churchwell, M. I., Guo, L., Moore, M. M., Doerge, D. R., Chen, T., 2008, Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells, *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 628–636.
- Mohamed, S., Sabita, U., Rajendra, S., Raman, D., 2017, Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods, *Global Journal of Pharmaceuticals*, 1(5).
- Mosmann, 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.
- Muruganathan, N., Dhanapal, A. R., Baskar, V., Muthuramalingam, P., Selvaraj, D., Aara, H., Shiek Abdullah, M. Z., Sivanesan, I., 2022, Recent Updates on Source, Biosynthesis, and Therapeutic Potential of Natural Flavonoid Luteolin: A Review, *Metabolites*, 12(11), 1145.

- Muppidi, J., Porter, M., Siegel, R. M, 2004, Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death, *Current Protocols in Immunology*, 59(1).
- Muttucumar, N., Powers, S. J., Elmore, J. S., Dodson, A., Briddon, A., Mottram, D. S., Halford, N. G., 2017, Acrylamide-forming potential of potatoes grown at different locations, and the ratio of free asparagine to reducing sugars at which free asparagine becomes a limiting factor for acrylamide formation, *Food Chemistry*, 220, 76–86.
- Nakamura, H., 2013, *BALB/c Mouse*, In Brenner's Encyclopedia of Genetics, 2nd ed., In: Maloy, S., Hughes, K., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 290–292.
- Natarajan, A. T., 2002, Chromosome aberrations: past, present and future, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 3–16.
- Nguyen, H. T., van der Fels-Klerx, H. J. (Ine)., & van Boekel, M. A. J. S., 2017, Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during biscuit baking. Part II: Effect of the ratio of reducing sugars and asparagine, *Food Chemistry*, 230, 14–23.
- Nowak, A., Zakłó-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), 368–368.
- Oancea, M., Mazumder, S., Crosby, M.E., Almasan, A., 2006, *Apoptosis Assays, Cardiovascular Disease. Methods in Molecular Medicine*, In: Wang, Q.K. (eds), vol 129. Humana Press. 279–290.
- Obeng, E, 2021, Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review, *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 1133–1143.
- OECD, 2016, Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- Orta-Yilmaz, B., Yildizbayrak, N., Aydın, Y., Erkan, M., 2017, Evidence of acrylamide- and glycidamide-induced oxidative stress and apoptosis in Leydig and Sertoli cells, *Human & Experimental Toxicology*, 36(12), 1225–1235.
- Orta-Yilmaz, B., 2019, Protective effects of vitamin C and curcumin against acrylamide toxicity in embryonic fibroblast cells, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 101:7-8, 389-403.
- Ostling, O., Johanson, K. J., 1984, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298.
- Ou, J., Zheng, J., Huang, J., Ho, C., Ou, S.,(2020, Interaction of Acrylamide, Acrolein, and 5-Hydroxymethylfurfural with Amino Acids and DNA, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(18), 5039–5048.

- Palanikumar, L., Panneerselvam, N., 2011, Micronuclei assay: A potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies, *Russian Journal of Genetics*, 47(9), 1033–1038.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R., 2016, Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., (2009, Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
- Park, S., Oh, H.-N., Kim, W.-K., 2024, Human coculture model of astrocytes and SH-SY5Y cells to test the neurotoxicity of chemicals, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 269, 115912–115912.
- Parry, J. M., Parry, E. M., 2006, The use of the in vitro micronucleus assay to detect and assess the aneugenic activity of chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 607(1), 5–8.
- Paul, S. F., Venkatachalam, P., Jeevanram, R. K., 1996, Chromosome aberration analysis for biological dosimetry: a review.
- Pedersen, M., Vryonidis, E., Joensen, A., Törnqvist, M., 2022, Hemoglobin adducts of acrylamide in human blood – What has been done and what is next?, *Food and Chemical Toxicology*, 161, 112799.
- Peivasteh-Roudsari, L., Karami, M., Barzegar-Bafrouei, R., Samiee, S., Karami, H., Tajdar-Oranj, B., Mahdavi, V., Alizadeh, A. M., Sadighara, P., Oliveri Conti, G., Mousavi Khaneghah, A., 2024, Toxicity, metabolism, and mitigation strategies of acrylamide: a comprehensive review, *International Journal of Environmental Health Research*, 1–29.
- Perera, D.N., Hewavitharana, G.G., Navaratne, S.B., 2021, Comprehensive Study on the Acrylamide Content of High Thermally Processed Foods, *BioMed Research International*, 1–13.
- Phillips, D. H., Arlt, V. M., 2009, Genotoxicity: damage to DNA and its consequences, *Experientia Supplementum*, 87–110.
- Pietropaoli, F., Pantalone, S., Cichelli, A., d'Alessandro, N., 2022, Acrylamide in widely consumed foods – a review, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39(5), 853–887.
- Plesca, D., Mazumder, S., Almasan, A., 2008, DNA Damage Response and Apoptosis. *Methods in Enzymology*, 446, 107–122.
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J., Horsley, V., 2021, Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease, *Cell*, 184(15), 3852–3872.
- Ghasemzadeh Rahbardar, M., Cheraghi Farmad, H., Hosseinzadeh, H., Mehri, S., 2021, Protective effects of selenium on acrylamide-induced neurotoxicity and hepatotoxicity in rats, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(8), 1041–1049.

- Ramos, A. A., Pereira-Wilson, C., Collins, A. R., 2010, Protective effects of Ursolic acid and Luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 692(1-2), 6–11.
- Reshmitha, T. R., Nisha, P., 2021, Lycopene mitigates acrylamide and glycidamide induced cellular toxicity via oxidative stress modulation in HepG2 cells, *Journal of Functional Foods*, 80, 104390–104390.
- Riedl, S. J., Shi, Y., 2004, Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11), 897–907.
- Rifai, L., Saleh, F. A., 2020, A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies, *International Journal of Toxicology*, 39(2), 93–102.
- Roos, W. P., Thomas, A. D., Kaina, B., 2015, DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology, *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 20–33.
- Roya Khosravi-Far, 2004, Death receptor signals to the mitochondria, *Cancer Biology & Therapy*, 3(11), 1051–1057.
- Salimi, A., Hashemidanesh, N., Seydi, E., Baghal, E., Khodaparast, F., Ghobadi, H., 2021, Restoration and stabilization of acrylamide-induced DNA, mitochondrial damages and oxidative stress by chrysin in human lymphocyte, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 17(7), 857–865.
- Sayed, S., Alotaibi, S. S., El-Shehawi, A. M., Hassan, M. M., Shukry, M., Alkafafy, M., Soliman, M. M., 2022, The Anti-Inflammatory, Anti-Apoptotic, and Antioxidant Effects of a Pomegranate-Peel Extract against Acrylamide-Induced Hepatotoxicity in Rats, *Life*, 12(2), 224.
- Sayers, T. J., 2011, Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(8), 1173–1180.
- Seçer Çelik, F., Çora, T., Kalaycı Yiğın, A., 2018, Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of acrylamide in HEK293 cell line, *Journal of Cancer Prevention & Current Research*, 9(5).
- Selvendiran, K., Koga, H., Ueno, T., Yoshida, T., Maeyama, M., Torimura, T., Yano, H., Kojiro, M., Sata, M., 2006, Luteolin Promotes Degradation in Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Human Hepatoma Cells: An Implication for the Antitumor Potential of Flavonoids, *Cancer Research*, 66(9), 4826–4834.
- Sharp, D., 2003, Acrylamide in food. *The Lancet*, 361(9355), 361–362.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191.

- Sioen, S., Cloet, K., Vral, A., Baeyens, A., 2020, The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Human Isolated Fresh and Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Journal of Personalized Medicine*, 10(3), 125.
- Sommer, S., Buraczewska, I., Kruszewski, M., 2020, Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1534.
- Song, J., Zhao, M., Liu, X., Zhu, Y., Hu, X., Chen, F., 2013, Protection of cyanidin-3-glucoside against oxidative stress induced by acrylamide in human MDA-MB-231 cells, *Food and Chemical Toxicology*, 58, 306–310.
- Sörgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M., Skott, A., Landersdorfer, C., 2002, Acrylamide: Increased Concentrations in Homemade Food and First Evidence of Its Variable Absorption from Food, Variable Metabolism and Placental
- Speit, G., Hartmann, A., 2012, The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage, *Methods in Molecular Biology*, 314, 275-186.
- Speit, G., Hartmann, A., 2022, The Comet Assay, *Methods in Molecular Biology*, 275–286.
- Stopper, H., Müller, S. O., 1997, Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview, *Toxicology in Vitro*, 11(5), 661–667.
- Stults, D. M., Killen, M. W., Marco-Casanova, P., Pierce, A. J., 2020, The Sister Chromatid Exchange (SCE) Assay, *Molecular Toxicology Protocols*, 441–457.
- Şahintürk, V., Kaçar, S., Vejselova, D., Kutlu, H.M., 2018, Acrylamide exerts its cytotoxicity in NIH/3T3 fibroblast cells by apoptosis, *Toxicology and Industrial Health*, 34(7), 481–489.
- Taylor, J. H., 1958, Sister Chromatid Exchanges In Tritium-Labeled Chromosomes, *Genetics*, 43(3), 515–529.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hasrtmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2015, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3).
- Tiwari, P., Mishra, 2017, Role of Flavonoids in DNA Damage and Carcinogenesis Prevention, *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 08(04).
- Törnqvist, M., 2022, Acrylamide in Food: The Discovery and Its Implications, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1–19.
- Tumini, E., Aguilera, A., 2020, The Sister-Chromatid Exchange Assay in Human Cells, *Homologous Recombination*, 383–393.
- Turkez, H., Arslan, M. E., Ozdemir, O., 2017, Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(10), 1089–1098.

- Turkez, H., Arslan, M. E., Ozdemir, O., 2017, Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decad, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(10), 1089–1098.
- US EPA., 2010, *Assessment of Health Risks from Exposure to Acrylamide*, Office of Toxic Substances; US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Voronova, M. I., Surov, O. V., Afineevskii, A. V., Zakharov, A. G., 2020, Properties of polyacrylamide composites reinforced by cellulose nanocrystals, *Heliyon*, 6(11), e05529.
- Wang, H., Huang, P., Lie, T., Li, J., Hutz, R. J., Li, K., Shi, F., 2010, Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats, *Reproductive Toxicology*, 29(2), 225–230.
- Wang, H., Wang, H., Cheng, H., Che, Z., 2016, Ameliorating effect of luteolin on memory impairment in an Alzheimer's disease model, *Molecular Medicine Reports*, 13(5), 4215–4220.
- Wang, H., 2020, MicroRNAs and Apoptosis in Colorectal Cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5353–5353.
- Wang, Q., Chen, X., Ren, Y., Chen, Q., Meng, Z., Cheng, J., Zheng Yun-yan, Zeng, W., Zhao, Q., Zhang, Y., 2016, Toxicokinetics and internal exposure of acrylamide: new insight into comprehensively profiling mercapturic acid metabolites as short-term biomarkers in rats and Chinese adolescents, *Archives of Toxicology*, 91(5), 2107–2118.
- Wayne, R., 2019, Endoplasmic Reticulum, *Plant Cell Biology*, 67–81.
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., 2005, A practical note on the use of cytotoxicity assays, *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2), 369–376.
- Wilson, D. M., Thompson, L. H., 2007, Molecular mechanisms of sister-chromatid Exchange, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1-2), 11–23.
- Wlaschek, M., Maity, P., Makrantonaki, E., Scharffetter-Kochanek, K., 2021, Connective Tissue and Fibroblast Senescence in Skin Aging, *Journal of Investigative Dermatology*, 141(4), 985–992.
- Yan, F., Wang, L., Zhao, L., Wang, C., Lu, Q., Liu, R., 2023, Acrylamide in food: Occurrence, metabolism, molecular toxicity mechanism and detoxification by phytochemicals, *Food and Chemical Toxicology*, 175, 113696.
- Yasuda, M. T., Fujita, K., Hosoya, T., Imai, S., Shimoi, K., 2015, Absorption and Metabolism of Luteolin and Its Glycosides from the Extract of Chrysanthemum morifolium Flowers in Rats and Caco-2 Cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7693–7699.
- Yesildag, K., Eroz, R., Genc, A., Dogan, T., & Satıcı, E. (2022). Evaluation of the protective effects of morin against acrylamide-induced lung toxicity by biomarkers of oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy. *Journal of Food Biochemistry*, 46(7).

- Zamani, E., Shokrzadeh, M., Modanloo, M., Shaki, F., 2018, In vitro study towards role of acrylamide-induced genotoxicity in human lymphocytes and the protective effect of L-Carnitine, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61, e18160685.
- Zeiger, E., 2019, The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 841, 43–48.
- 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, H869–H874.
- Zhao, M., Wang, P., Zhu, Y., Liu, X., Hu, X., Chen, F., 2015, Blueberry anthocyanins extract inhibits acrylamide-induced diverse toxicity in mice by preventing oxidative stress and cytochrome P450 2E1 activation, *Journal of Functional Foods*, 14, 95–101.
- Zhao, M., Zhang, B., Deng, L., Zhao, L., 2022, Acrylamide Induces Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells via NLRP3-mediated Pyroptosis, *Molecular Neurobiology*, 60(2), 596–609.
- Zhao, S., Zhong, H., Geng, C., Xue, H., Wang, C., Sun, W., Dang, R., Han, W., Jiang, P., 2021, Comprehensive analysis of metabolic changes in rats exposed to acrylamide, *Environmental Pollution*, 287, 117591.
- Ziegler, E., 1899, *The science of the causes, nature and course of the pathological disturbances which occur in the living subject*, General Pathology, Buck, A. H., (ed.), W. Wood and company, New York.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Burcu KESKİN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2021

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Zooloji

Makale ve Bildiriler	
Keskin B., Orta Yılmaz B., Aydın Y., Luteolin alleviates genotoxicity by attenuating micronucleus formation and cellular damage in acrylamide-exposed embryonic fibroblast cells. 6th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2023) Ekim 11-13, 2023. , Ankara, Türkiye, 11 - 13 Ekim 2023, ss.292	
Orta Yılmaz B., Kurtel H., Keskin B., Aydın Y., The Genotoxic Effects of Heat-Induced Food Contaminants in the Male Reproductive System, Genotoxicity: Advances in Research and Applications, Chibuisi Gideon Alimba, Editör, Nova, Nigeria, ss.1-27, (2023).	