



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



DOKTORA TEZİ

**AKRİLAMİD ve KURKUMİNİN LEYDİĞ HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİSİTE, GENOTOKSİSİTE ve HÜCRE SİNYAL
YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Nebahat YILDIZBAYRAK

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Melike ERKAN**

Nisan, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 18.04.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Melike ERKAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Tülay İREZ
Biruni Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Fatma Gül ÖZCAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Gül ÖZHAN
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL
Marmara Üniversitesi
Fen – Edebiyat Fakültesi



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 aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25224 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücreleri üzerinde yapmış oldukları etkileri araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Lisansüstü eğitimim süresince değerli fikirlerini ve bilgilerini benimle paylaşan, fikirleriyle bana yol gösteren çok değerli danışmam hocam Sayın Prof. Dr. Melike ERKAN'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda bilgi ve tecrübeleri ile manevi desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Banu ORTA YILMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Yasemin AYDIN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiç yalnız bırakmayan, karşılaştığım her türlü güçlüğü aşmamda yardımcı olan sevgili anneme, babama ve ablama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nisan 2019

Nebahat YILDIZBAYRAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. LEYDİĞ HÜCRESİ.....	4
2.2. AKRİLAMİD	6
2.2.1. Akrlamidin Genel Özellikleri.....	6
2.2.2. Akrlamid maruziyet yolları	7
2.2.3. Akrlamid metabolizması	9
2.2.4. Akrlamidin Toksik Etkileri	11
2.3. KURKUMİN.....	14
2.4. SİTOTOKSİSİTE.....	17
2.4.1. Oksidatif Stres	17
2.4.2. Antioksidan Savunma Sistemi.....	19
2.6. GENOTOKSİSİTE	20
2.6.1. DNA Hasarı ve Nedenleri	20
2.6.2. Genetik Toksikite Testleri.....	21
2.6.2.1. Mikronükleus testi.....	21
2.6.2.2. Tek hücre jel elektroforezi / Komet testi	23
2.7. HÜCRE SİNYAL YOLAKLARI	25
2.7.1. Apoptoz	25
2.7.3. Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz (MAP-Kinaz) Sinyal Yolakları.....	26
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	28
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	28
3.1.1. Kullanılan Hücre Soyu	28

3.1.2. Hücre Kültürü Rutin Bakım İşlemleri	28
3.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Stoklanması.....	29
3.2 AKRİLAMİD VE KURKUMİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI VE HÜCRELERE UYGULANMASI.....	29
3.3. SİTOTOKSİSİTE.....	30
3.3.1. MTT Hücre Canlılık Testi	30
3.3.2. Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi (LDH) Testi.....	31
3.4. OKSİDATİF HASAR	32
3.4.1. Membran Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi	32
3.4.2. Total Protein Ölçümü	33
3.4.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi	34
3.4.3.1. Hidroksil radikali tayini	34
3.4.3.2. Hidrojen peroksit radikali tayini	34
3.4.4. Enzimatik Antioksidan Seviyelerinin Belirlenmesi	35
3.4.4.1. Katalaz tayini.....	35
3.4.4.2. Glutasyon peroksidaz tayini.....	35
3.4.4.3. Süperoksit dismutaz tayini	36
3.5 APOPTOZ / NEKROZ	36
3.5.1. Propidium / İyodür Hoechst Yöntemi	36
3.6. WESTERN BLOT	37
3.7. MİKROKNÜKLEUS TESTİ.....	41
3.8. KOMET TESTİ (TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ).....	43
3.9. İMMUNFLORESAN BOYAMA	46
3.10. İSTATİSTİK ANALİZ	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI.....	49
4.1.1. MTT Bulguları.....	49
4.1.2. LDH Bulguları.....	54
4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI	55
4.2.1. Lipit Peroksidasyonu	55
4.2.3. Hidroksil Radikali	56
4.2.4. Hidrojen peroksit	57
4.2.5. Katalaz aktivitesi	58
4.2.6. Süperoksitdismutaz aktivitesi.....	59
4.2.7. Glutasyon peroksidaz aktivitesi	60

4.3. APOPTOZ BULGULARI.....	61
4.4. WESTERN BLOT BULGULARI	64
4.4.1 ERK fosforilasyonu	64
4.4.2. JNK fosforilasyonu.....	66
4.4.3. p38 fosforilasyonu	67
4.5. GENOTOKSİSİTE BULGULARI	68
4.5.1. Mikronükleus Bulguları.....	68
4.5.2. Komet Bulguları	70
4.6. İMMÜN FLORESAN BULGULARI.....	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	80
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.1: Leydig hücrelerinin histolojik görüntüsü (https://anatomy-library.com/img/anatomy-and-histology-of-seminiferous-tubule-10.html).....	4
Şekil 2.2.1.1: Akrilamidin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.2.3.1: Akrilamidin emilim, dağılım, biyotransformasyon ve atılımının şematik diyagramı (Kocadağlı ve Gökmen, 2016).	9
Şekil 2.2.3.2: Akrilamidin metabolizması (Capuano ve Fogliano,2011).....	10
Şekil 2.2.4.1: Akrilamidin hücre içi toksik etkileri (reaktif oksijen türleri: ROS, reaktif nitrojen türleri: RNS) (Kahkeshani ve diğ., 2015).	13
Şekil 2.3.1: Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı (Tsuda, 2018).....	14
Şekil 2.8.2: Kurkuminin biyolojik aktiviteleri.....	15
Şekil 2.3.3: Kurkuminin erkek üreme sistemi üzerindeki koruyucu etkileri.....	16
Şekil 2.4.1.2: Reaktif oksijen türleri ile uyarılmış oksidatif hasar (Kohen ve Nyska, 2002).....	13
Şekil 2.6.2.1.1: Mikronükleus oluşumunu tetikleyen mekanizmalar (Zelazna ve diğ., 2011).....	22
Şekil 2.6.2.1.2: Genotoksik etkiler sonucu hücrelerde mikronükleus testi ile tayin edilebilen hasarlar (Fenech, 2000).	13
Şekil 2.6.2.2.1: Komet testinin kritik basamakları.....	24
Şekil 2.7.3.1: MAP kinaz sinyal yolağı (Vezza ve diğ., 2016).....	27
Şekil 3.6.1: Western blot basamakları.....	38
Şekil 3.7.1: Mikronükleus testi aşamalarının şematik gösterimi.....	41
Şekil 3.8.1: Komet testi aşamalarının şematik gösterimi (Gharsalli, 2016).....	44
Şekil 3.8.2: Floresan boya ile işaretlenmiş komete baş, kuyruk ve kuyruk moment uzunluğunun ifade ettiği bölgeler.....	46

Şekil 4.1.1.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 6 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (**p<0,001).....	49
Şekil 4.1.1.2: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 12 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (*p<0,01, **p<0,001).....	50
Şekil 4.1.1.3: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (*p<0,05, **p<0,001).....	50
Şekil 4.1.1.4: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 48 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (*p<0,05, **p<0,01, **p<0,001).	51
Şekil 4.1.1.5: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 72 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (*p<0,05, **p<0,01, **p<0,001).	51
Şekil 4.1.1.6: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde % canlılık üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre. (*p<0,05, #<0,05, •<0,05).....	53
Şekil 4.1.2.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde % LDH aktivitesi üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre. (*p<0,05, **p<0,01, #<0,05, ##p<0,01, •<0,05, •• p<0,01).....	54
Şekil 4.2.1.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde lipid peroksidasyonu üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre. (*p<0,05, **p<0,01, **p<0,001, #<0,05, •<0,05, •• p<0,01).....	55
Şekil 4.2.3.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde oluşan OH ⁻ radikali üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (*p<0,05, **p<0,01, **p<0,001, #<0,05, ##<0,01 •<0,05, •• p<0,01).....	56
Şekil 4.2.4.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde oluşan H ₂ O ₂ üzerine etkileri *: kontrole göre (*p<0,05).	57
Şekil 4.2.5.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde katalaz aktivitesi üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (**p<0,01, **p<0,001, #<0,05, •<0,05, •• p<0,01).....	58
Şekil 4.2.6.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde SOD aktivitesi üzerine etkileri etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (*p<0,05, •<0,05, •• p<0,01)..	59
Şekil 4.2.7.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde GPx aktivitesi üzerine etkileri etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (*p<0,05, **p<0,01, #<0,05, •<0,05, •• p<0,01).....	60

Şekil 4.3.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 24 sonunda apoptoz ve nekroz üzerine etkileri A: kontrol, B: 1 µM AA, C: 10 µM AA, D: 100 µM AA ve E: 1000 µM AA. ▼: canlı, ^: apoptotik, →: erken apoptotik, ⇨: nekroz.....	62
Şekil 4.3.2: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde 24 sonunda apoptoz ve nekroz üzerine etkileri A: KUR, B: 1 µM AA + KUR, C: 10 µM AA + KUR, D: 100 µM AA + KUR and E: 1000 µM AA + CUR 1000 µM AA. ▼: canlı, ^: apoptotik, →: erken apoptotik, ⇨: nekroz.....	13
Şekil 4.4.1.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde ERK fosforilasyonu üzerine etkileri *: kontrole göre, #: akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, #<0,05, ##<0,01, •• p<0,01, ••• p<0,001).....	13
Şekil 4.4.2.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde JNK fosforilasyonu üzerine etkileri *: kontrole göre, #: akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, #<0,05, ##<0,01, •• p<0,01, ••• p<0,001).....	66
Şekil 4.4.3.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde p38 fosforilasyonu üzerine etkileri *: kontrole göre, #: akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (*p<0,05, **p<0,01, #<0,05, •p<0,05 •• p<0,01).....	67
Şekil 4.5.1.1: A: Bir nükleuslu hücre; B: İki nükleuslu hücre; C: Üç nükleuslu hücre; D: Dört nükleuslu hücre.....	69
Şekil 4.5.1.2: Binükleuslu hücrelerde mikronükleus görünümü.....	69
Şekil 4.5.2.1: Akrilamidin farklı konsantrasyonlarının TM3 Leydig hücrelerine 24 saat maruziyeti sonunda elde edilen komet testi floresan mikroskop görüntüleri (40X büyütme) A: Kontrol, B: 1 µM, C:10 µM, D: 100 µM, E:1000 µM, F: Pozitif Kontrol.....	71
Şekil 4.5.2.2: Akrilamidin ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerine 24 saat maruziyeti sonunda elde edilen komet testi floresan mikroskop görüntüleri (40X büyütme) A: Kurkumin, B: 1 µM+Kur , C:10 µM+Kur, D: 100 µM+Kur, E:1000 µM+Kur, F: Pozitif Kontrol.....	72
Şekil 4.6.1: TM3 Leydig hücrelerinde akrilamidin aktin filamentleri üzerine etkileri.....	74
Şekil 4.6.2: TM3 Leydig hücrelerinde akrilamid ile kurkuminin aktin filamentleri üzerine etkileri.....	75
Şekil 4.6.3: TM3 Leydig hücrelerinde akrilamidin tubulin üzerine etkileri.....	76
Şekil 4.6.4: TM3 Leydig hücrelerinde akrilamid ve kurkuminin tubulin üzerine etkileri.....	77
Şekil 4.6.5: TM3 Leydig hücrelerinde akrilamidin konneksin 43 üzerine etkileri.....	78

Şekil 4.6.6: TM3 Leydig hücrelerinde akrilamid ve kurkuminin konneksin 43 üzerine etkileri.....79



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1.1.1: Akrilamidin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.	6
Tablo 2.2.2.1: EFSA (2013) verilerine göre çeşitli gıda maddelerinde tespit edilen akrilamid değerleri.....	8
Tablo 2.3.1: Kurkuminin kimyasal ve fiziksel özellikleri	15
Tablo 2.4.1.1: Reaktif oksijen türleri (Sies ve diğ., 2017).....	17
Tablo 3.2.1: Deneyde kullanılan akrilamid ve kurkumin maruziyet grupları.....	30
Tablo 3.6.1: Western blot tekniğinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	39
Tablo 3.6.2: Western blot yönteminde kullanılan antikorlar ve sulandırma katsayıları.....	40
Tablo 3.7.1: Mikronükleus testi uygulamasında kullanılan tampon ve çözeltiler.....	41
Tablo 3.8.1: Komet testi uygulamasında kullanılan tampon ve çözeltiler	43
Tablo 3.9.1: İmmünfloresan boyama tekniğinde kullanılan tampon ve çözeltiler	43
Tablo 4.1.1.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde zamana bağlı IC ₅₀ değerleri.....	52
Tablo 4.3.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde 24 sonunda apoptoz ve nekroz üzerine etkileri	61
Tablo 4.5.1.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde nukleer bölünme indeksi ve mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre oranı üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (*p<0,05, #<0,05, •p<0,05).	68
Tablo 4.5.2.1: Akrilamid ve kurkumine 24 saat maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinde komet testi sonuçları ile elde edilen DNA hasarı belirteçleri.....	70

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
AA	: Akrilamid
BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Sığır serum albumini
cAMP	: siklik AMP
CAT	: Katalaz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPA	: Amerika Birleşik Devletleri çevre koruma kurumu
FITC	: Floresan izosiyanat
ERK	: Hücre dışı sinyallerle düzenlenmiş kinazlar
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve ilaç kuruluşu
GPx	: Glutayon peroksidaz
GSH	: Glutayon
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
JNK	: c-Ju-N terminal kinazlar
KUR	: Kurkumin
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LMPA	: Düşük erime noktalı agaroz
MDA	: Malondialdehit
NMPA	: Normal erime noktalı agaroz
MTT	: 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromit
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif türleri
TCA	: Trikloroasetik asit

PBS	: Fosfat tamponu
PI	: Propidium İyodür
SDS	: Sodyum dodosil sülfat
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α
WHO	: Dünya Sağlık Organizasyonu



ÖZET

DOKTORA TEZİ

AKRİLAMİD ve KURKUMİNİN LEYDİĞ HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİSİTE, GENOTOKSİSİTE ve HÜCRE SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Nebahat YILDIZBAYRAK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Anabilim Dalı Adı

Danışman : Prof. Dr. Melike ERKAN

Bu çalışmanın amacı akrilamid kaynaklı toksik etkiler ve kurkuminin TM3 Leydig hücreleri üzerindeki olası terapötik etkileriyle ilgili mekanizmaları incelemektir. Akrilamid ile muamele edilmiş hücreler, sitotoksosite, reaktif oksijen türleri, antioksidan ile ilişkili enzim seviyeleri, apoptoz / nekroz oranları, hücre iskeleti, mitojenle aktive olan protein kinazlar ve genotoksosite açısından değerlendirildi. Kurkumin uygulamasının olası iyileştirici etkisi araştırıldı.

Endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan akrilamidin, son yıllarda yüksek sıcaklıkta pişirilen gıdalarda kendiliğinden oluştuğu bulunmuştur. Dünyada ve ülkemizde beslenme alışkanlıkları sebebiyle akrilamid içeren besinler çokça tüketilmektedir. Akrilamid, yüksek sıcaklık uygulanmış (120°C) gıdalarda, karbonhidratların ve aminoasitlerin tepkimesi sonucu oluşan bir bileşiktir. Özellikle tahıllı ve nişastalı gıdalar yüksek miktarda akrilamid içermektedir. Ayrıca, akrilamid kağıt, tekstil ve kozmetik endüstrisinde ve su arıtma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda insan hastalıklarını tedavi etmek için tıbbi bitkilerin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Çoğunlukla baharat ve gıda renklendirici olarak kullanılan zerdaçal bitkisinin aktif bileşeni olan kurkumin, polifenolik bir bileşik olarak nitelendirilmektedir. Yapılan çalışmalar ile kurkuminin antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyal, antikanserojenik ve antimutajenik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

TM3 Leydig hücreleri, 24 saat boyunca kurkumin (2,5 µM) varlığında ve yokluğunda dört farklı konsantrasyonda akrilamide (1, 10, 100, 1000 µM) maruz bırakılmıştır. Oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan savunma sistemi parametreleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü, apoptoz ve nekroz oranları propidium-iyodür-Hoechst boyası ile belirlendi ve hücre iskeleti proteinlerinin işaretlenmesi için immünofloresan boyama gerçekleştirildi. MAPK'lerin fosforilasyonunu belirlemek için Western blot analizleri yapıldı ve ayrıca genotoksisitesinin değerlendirilmesi için komet testi ve mikronükleus testi uygulandı.

Yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarına göre akrilamidin Leydig hücresinin hücresel fonksiyonlarında ve hücre iskeletinde hasara sebep olduğunu, ROS oluşumunu tetikleyerek lipid peroksidasyonuna yol açtığı böylelikle Leydig hücrelerinde antioksidan-oksidan dengesini bozduğunu göstermektedir. Ayrıca oksidatif stresi uyarması ve MAPK yolağını aktive etmesiyle ilişkili olarak Leydig hücrelerinde apoptozu tetiklediğini ve genotoksisiteye neden olduğunu göstermektedir. Bunlara ek olarak sonuçlar, kurkuminin akrilamidin zararlı etkilerini bastırdığını göstermiştir. Sonuçlar birlikte ele alındığında, akrilamidin, MAPK sinyal yolunun aktivasyonu ile apoptozun indüklendiğini ve genotoksisiteye neden olduğunu, ayrıca kurkuminin Leydig hücrelerinde akrilamid kaynaklı hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Nisan 2019, 120 sayfa.

Anahtar kelimeler: Akrilamid, kurkumin, Leydig hücresi, genotoksisite, MAPkinaz

SUMMARY

Ph.D. THESIS

EFFECTS of ACRYLAMIDE and CURCUMIN on CYTOTOXICITY, GENOTOXICITY and CELL SIGNALING PATHWAYS in LEYDIG CELLS

Nebahat YILDIZBAYRAK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Melike ERKAN

The aim of this study is investigating the mechanism related to acrylamide induced toxic effects and possible therapeutic effects of curcumin on TM3 Leydig cells. Acrylamide treated cells were evaluated for cytotoxicity, reactive oxygen species (ROS), antioxidant related enzyme levels, apoptosis/necrosis rates, cytoskeletal damage, phosphorylation status of mitogen activated protein kinases (MAPKs) and genotoxicity. The possible ameliorative effect of curcumin administration was investigated.

Acrylamide, which is widely used in industrial field, has been found to occur in foods prepared in high temperature in recent years. Due to the nutritional habits in the world and in our country, foods containing acrylamide are consumed a lot. Acrylamide is a compound formed by the reaction of carbohydrates and amino acids in foods with high temperatures (120°C). Particularly grain and starchy foods contain high amounts of acrylamide. In addition, acrylamide is widely used in the paper, textile and cosmetic industry and in water treatment system. In recent years, the use of medicinal plants to treat human diseases has become widespread. Curcumin, which is the active ingredient of the turmeric plant, is mostly used as a spice and food colorant, and characterized as a

polyphenolic compound. Studies have shown that curcumin has antioxidant, antiinflammatory, antibacterial, anticarcinogenic and antimutogenic properties.

TM3 Leydig cells were exposed to four different concentrations of acrylamide (1, 10, 100, 1000 μ M) in the presence and absence of curcumin (2,5 μ M) for 24 hours. Oxidative stress markers and antioxidant defense system parameters measured by spectrophotometric method, apoptosis and necrosis rates determining by propidium iodide-Hoechst stain and for mark the cytoskeletal proteins immunofluorescent staining was performed. Western blot analyzes were performed for determining the phosphorylation of MAPKs further Comet assay and micronucleus test applied for evaluate the genotoxicity.

According to the results of our study, acrylamide causes detrimental effect on cell function of Leydig cell and damage to the cytoskeleton, it causes lipid peroxidation by triggering ROS formation and thus deteriorates antioxidant-oxidant balance in Leydig cells. Results also showed that acrylamide induces apoptosis and causes genotoxicity in Leydig cells associated with stimulating oxidative stress and activating MAPK pathway. Moreover, results showed that curcumin suppressed the detrimental effects of acrylamide. Taken together, we suggest that acrylamide, induced apoptosis through activation of MAPK signaling pathway and caused genotoxicity furthermore curcumin has a protective effect against the acrylamide induced damage in Leydig cells.

April 2019, 120 pages.

Keywords: Acrylamide, curcumin, Leydig cell, genotoxicity, MAP kinase

1. GİRİŞ

Akrilamid endüstride (plastik işlenmesi, kağıt üretimi, kozmetik ve boya gibi) ve araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan önemli bir poliakrilamid monomeridir (Friedman, 2003). İsveç Ulusal Gıda Komisyonu ve Stokholm Üniversitesi araştırmacıları 2002 yılında akrilamidin patates cipsi, kızarmış ekmek, bisküvi, kahvaltılık gevrek ve kahve gibi karbonhidrat içeriği yüksek besinlerde bulunduğunu tespit etmişlerdir (Tareke ve diğ., 2002). Gıda işleme sırasında asparajin amino asidi ve glikozun karbonil grubu arasında 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gerçekleşen Maillard reaksiyonu, akrilamid oluşumuna neden olmaktadır (Mottram ve diğ., 2002). Akrilamidin günlük olarak tüketilen gıdalarda bulunması ve çeşitli endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılması insanların akrilamide maruziyetini kaçınılmaz kılmaktadır.

Amfifilik yapısı sayesinde biyolojik membranlardan hızlıca geçebilen akrilamid, oral yol ile alındıktan sonra gastrointestinal kanal tarafından hızla emilir ve diğer sistem ve organlara yayılır. Plasenta ve anne sütü yolu ile fetüs ve yeni doğanlara geçtiği de bildirilmiştir (Fennell ve diğ., 2005; Schettgen ve diğ., 2003). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar akrilamidin nörotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkilerinden dolayı çeşitli sistemler üzerinde zararlı etkileri olduğunu göstermektedir (Lakshmi ve diğ., 2012; Dobrovolsky ve diğ., 2016; Yang ve diğ., 2005). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, akrilamidi insanlar için olası karsinojen kimyasallar olan Grup 2A sınıfına dahil etmiştir (IARC, 1994). Akrilamidin erkek üreme sistemi üzerinde de zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Yapılan hayvan çalışmaları akrilamidin sperm sayısında azalma, kan testosteron seviyelerinde bozukluk, seminifer tubül dejenerasyonu ve testis ağırlığının azalması gibi etkileri olduğunu göstermiştir (Kermani-Alghoraishi ve diğ., 2010; Song ve diğ., 2008; Yang ve diğ., 2005). Ayrıca yapılan *in vitro* çalışmalar ile akrilamidin Leydig hücrelerinde steroidogenik yolda bulunan genlerin ve proteinlerin ekspresyon seviyelerini değiştirdiği ile Leydig ve Sertoli hücrelerinde oksidatif stres yolu ile apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2017; Yıldızbayrak ve Erkan, 2018). Yapılan tüm bu çalışmaların yanısıra akrilamidin Leydig hücrelerinde oluşturduğu toksik hasarın sitotoksosite, hücre sinyal yolları ve genotoksosite açısından değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Günümüzde çevresel toksinlerin biyolojik sistemler üzerindeki toksik etkilerini önlemek için çeşitli fitokimyasal maddelerin kullanılması oldukça yaygın hale gelmiştir. *Curcuma longa* rizomlarından elde edilen, medikal bir bitki olan turmerik Hindistan, Çin ve Güneydoğu Asya’da gıda koruyucu, renklendirici ve baharat olarak kullanılmaktadır (Hosseini ve Hooseinzadeh, 2018). Kurkumin turmerik bitkisinin sarı rengini veren ve temel biyoaktif bileşeni olan, geniş çaplı biyolojik aktivitelere sahip bir polifenoldür (Ammon ve Wahl, 1991). Farmakolojik ve biyolojik etkileri antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, antikarsinogenik ve antiseptik olarak sıralanmaktadır. Yapılan çalışmalar kurkuminin insanlar için toksik olmadığını ve inflamasyona neden olan pek çok faktöre karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir (Gianessi ve diğ., 2008; İlbey ve diğ., 2009; Sharma ve Sing, 2010).

Yapılan çalışmalar kurkuminin bazı çevresel toksik maddelerin neden olduğu DNA hasarı, apoptoz ve oksidatif strese karşı testiküler dokular üzerinde koruyucu etki gösterdiğini bildirmiştir. Bununla birlikte, kurkuminin erkek üreme sistemi üzerinde akrilamid toksisitesine karşı olası iyileştirici etkisi hakkında sınırlı veri bulunmaktadır (Gouda ve diğ., 2011).

Bu tez çalışması, akrilamidin Leydig hücrelerinde sitotoksiste, genotoksiste ve hücre sinyal yolları üzerindeki *in vitro* etkilerini ve bu etkilere karşı kurkuminin koruyucu bir rolü olup olmadığını ortaya çıkarmak üzere gerçekleştirilmiştir. Tezin ‘Genel Kısımlar’ bölümünde Leydig hücreleri, akrilamid, kurkumin, oksidatif hasar, apoptoz, mitojenle etkinleşen protein kinaz sinyal yolağı, genotoksiste ve hücre iskeleti ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tezin “Malzeme ve Yöntem” bölümünde laboratuvarında uygulanan işlemler ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Laboratuvar çalışmaları sonucunda elde edilen veriler tezin “Bulgular” bölümünde belirtilmiştir.

Tezin “Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler mevcut literatür bilgisi ile yorumlanarak sonuca varılmıştır.

Bu çalışmada akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde sitotoksik, genotoksik etkileri ile hücre sinyal yolları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda Leydig hücrelerine farklı kombinasyonlarda uygulanan akrilamid ve kurkuminin sitotoksik etkilerini ortaya çıkarmak için hücre canlılığı, enzimatik antioksidanlar, lipit peroksidasyonu ve reaktif

oksijen türleri biyokimyasal olarak ölçülüp temel hücre iskeleti elemanları (aktin, tubulin, konneksin 43) immünfloresan boya ile işaretlenmiştir. Genotoksik hasarın ortaya çıkarılması için komet ve mikronükleus testleri gerçekleştirilmiştir. Hücre sinyal yolları üzerindeki etkiler ise apoptotik indeksin hesaplanması ve mitojenle etkinleşen protein kinaz sinyal yolağında bulunan proteinlerin (JNK, ERK, p38) ifade düzeylerinin ölçülmesi ile belirlenmiştir.

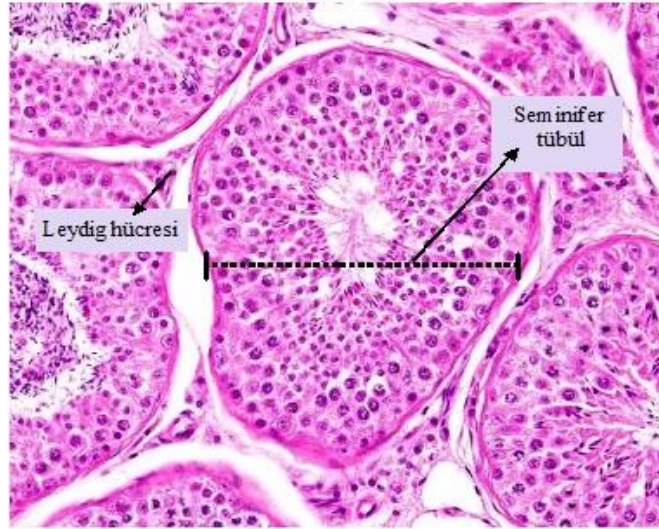


2. GENEL KISIMLAR

2.1. LEYDİG HÜCRESİ

Erkek üreme sisteminin ve endokrin sistemin bir parçası olan testis, spermatogenezin gerçekleştiği ve erkek cinsiyet hormonlarının üretildiği organ olarak yetişkin erkeklerde üreme fonksiyonlarının sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesinde görev alır (Martin, 2016). Testis seminifer tübüller ve interstisyel alan olmak üzere anatomik olarak iki kısma ayrılır. Seminifer tübüller, spermatogenezin çeşitli aşamalarında germ hücrelerinin bulunduğu, Sertoli hücrelerinin konumlandığı vasküler olmayan testis bölümünü oluşturur (Gartner ve Hiatt, 2015). Testiste seminifer tübüller arasında kalan bölge interstisyel alan olarak adlandırılır. İnterstisyel bölge, Leydig hücreleri, makrofaj, fibroblast, myeoid hücreler ile kan ve lenf damarları bakımından oldukça zengin bağ dokusundan oluşmuştur (Mescher, 2015).

Franz Leydig tarafından 1850 yılında tanımlanan Leydig hücreleri spermatogenezin kontrolü, erkek üreme kanalları ve ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişmesi için gerekli androjen olan testosteronun ana kaynağıdır (Christensen, 2007). Testis yapısında Leydig hücrelerinin konumu ve histolojik olarak görünüşleri şekil 2.1.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1.1: Leydig hücrelerinin histolojik görüntüsü (<https://anatomy-library.com/img/anatomy-and-histology-of-seminiferous-tubule-10.html>)

Androjen üretimi fetal Leydig hücreleri ve yetişkin Leydig hücreleri olmak üzere iki farklı Leydig hücre popülasyonu tarafından gerçekleşmektedir. Bu iki popülasyon histolojik yapı, yaşam süresi, androjen sentez kapasitesi ve gonadotropinlere cevap verme mekanizmaları

bakımından farklılıklar gösterirler. Prenatal dönem boyunca androjen üretiminin temel kaynağı olan fetal Leydig hücreleri iç ve dış erkek genital yapılarının maskülinizasyonu ve nöroendokrin fonksiyonların düzenlenmesinde görev alırlar (Svechnikov ve diğ., 2010). Fetal Leydig hücreleri morfolojik olarak yuvarlak-ovaldır, düz yüzlü endoplazmik retikulum, mitokondri ve bol miktarda lipit damlacıkları içerirler. Gruplar halinde bulunma eğilimi gösteren fetal Leydig hücreleri kollojen ve lamininden oluşan bir membran tarafından çevrelenirler (Martin, 2016).

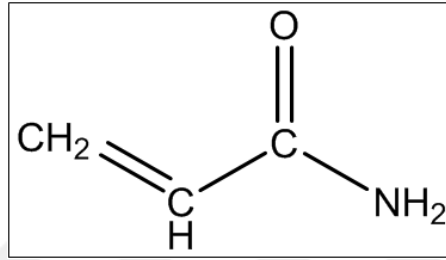
Yetişkin Leydig hücreleri dış genital bölgenin pubertal gelişimi için gerekli testosteron üretimi, spermatogenezin başlaması ve pubertede görülen endokrin fonksiyonların düzenlenmesinde rol alırlar (Svechnikov ve diğ., 2010). Geniş, yuvarlak veya çok köşeli olabilen hücreler olarak gelişirler ve merkezi konumlanmış bir nükleus ile eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptirler (Mescher, 2015). Fetal Leydig hücrelerinin aksine bir membran tarafından çevrelenmeden kümeleşebilirler ve androjen üretme potansiyelleri daha yüksektir (Haider, 2004). Her iki Leydig hücre popülasyonu da sitoplazmalarında lipaz, oksidatif enzimler, esteraz ve steroid dehidrogenaz enzimleri içerirler ve luteinizan hormon reseptörü eksprese edebilirler (Trainer, 1995).

Leydig hücreleri, kolesterolden testosteron biyosentezi yapabilme kapasitesindedirler ve bu fonksiyonlarının düzenlenmesinde birçok hormon ve sinyal molekülü görev alır (Ye ve diğ., 2011). Fetal dönem boyunca cinsel gelişim ve testislerin inmesinde, erginlik dönemi boyunca seminifer tübüllerde sperm üretimi, aksesuar cinsiyet organlarının ve cinsel davranışın sağlanması için gerekli olan başlıca hormon testosterondur (Payne ve Youngblood, 1995; Wilson, 2001; Hardy ve diğ., 2008). Testosteron biyosentezi ve sekresyonu esas olarak ön hipofizden salınan bir gonadotropin olan luteinizan hormonun gönderdiği bir uyarı ile gerçekleşir. Leydig hücreleri yüzeyindeki özelleşmiş reseptörüne bağlanan luteinizan hormon, hücre içi ikincil mesajcı olan siklik AMP (cAMP)'nin üretimini uyarır (Hales, 2002). Kolesterolün dış mitokondriyal membrandan iç membrana aktarılması, steroidogenik akut düzenleyici protein tarafından yeterli cAMP seviyelerinin varlığında gerçekleştirilir. Kolesterol, mitokondriye transfer olduğunda yan zincir kırıcı enzim tarafından pregnenolona dönüştürülür ve 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz ile 17β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla Leydig hücrelerinde testosteron üretimi gerçekleşir (Payne ve Youngblood, 1995; Wilson, 2001, Ye ve diğ., 2011).

2.2. AKRİLAMİD

2.2.1. Akrilamidin Genel Özellikleri

Akrilamid, biyolojik materyallere karşı yüksek reaktif özellik gösteren, beyaz renkli, kokusuz, kristal yapılu organik bir maddedir (EPA, 2007). Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliğine (IUPAC) göre 2-propenamid olarak adlandırılan akrilamidin kimyasal yapısı şekil 2.2.1.1’de verilmiştir (Friedman, 2003).



Şekil 2.2.1.1: Akrlamidin kimyasal yapısı.

Akrilamid suda kolayca çözünebilir ayrıca aseton, metanol ve etanol gibi organik çözücülerde de yüksek çözünürlük gösterir (Semla ve diğ., 2017). Doymamış bir çift bağ ve amid grubu içeren akrilamid vinil bileşikleri ile konjuge olur. Kimyasal yapısında bulunan çift bağdan dolayı sisteinde bulunan -SH grupları ile protein ve aminoasitlerde bulunan -NH₂ grupları ile bağ kurmaya yatkınlık gösterir (Girma ve diğ., 2005). Akrlamid yüksek ultraviyole radyasyon ve sıcaklık altında polimerize olur ve bu reaksiyonlar sonucunda poliakrlamid olarak adlandırılan yeni kimyasal bileşikler oluşur (Semla ve diğ., 2017). Akrlamidin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri tablo 2.2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1.1.1: Akrlamidin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Kimyasal formülü	CH ₂ =CH-CO-NH ₂
Moleküler ağırlığı	71,08
Yoğunluk	1,12g/ml (30°C)
Kaynama noktası	192,6°C
Erime noktası	84,5°C
Suda çözünürlüğü	2.155g/ml (30°C)

2.2.2. Akrilamid maruziyet yolları

Akrilamid, poliakrilamid üretimi ve sentezinde kullanılan sentetik bir kimyasal bileşiktir ve birçok endüstri dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Poliakrilamid üretiminin başlıca kullanım alanları endüstriyel atık suların arıtılması, içme suyu depoları ve kanalizasyon hatlarının yapımı, adhezyon arttırıcı polimerlerin üretimi ve kağıt yapımı olarak sıralanabilir. Poliakrilamid içeren ürünler ve bileşikler, endüstriyel akrilamid maruziyetinin ve akrilamidden kaynaklanan çevresel kirliliğin en önemli kaynaklarıdır (EPA). Akrilamid araştırma laboratuvarlarında nükleik asitlerin ve proteinlerin elektroforetik olarak ayrılması işlemi sırasında poliakrilamid jel uygulamasında kullanılır (Friedman, 2003). Ayrıca akrilamid sigara dumanının bir bileşenidir ve yüksek oranda maruziyetin sebeplerinden biridir. Sigara dumandaki akrilamid miktarı bir sigara için yaklaşık olarak 1,1 – 2,34 µg olarak hesaplanmıştır (Smith ve diğ., 2000).

İsveç Ulusal Gıda Kuruluşunun 2002 yılında patates cipsi, kahve ve ekmek gibi karbonhidrat bakımından zengin gıdalarda akrilamid bulunduğunu ilan etmesinden bu yana akrilamid gıda kaynaklı toksik maddeler listesine eklenmiştir (Swedish National Food Administration, 2002). Yiyeceklerdeki varlığı tespit edildikten kısa bir süre sonra, gıdalarda akrilamid oluşumunun ana yolunun Maillard reaksiyonu olduğu açıkça belirlenmiştir (Mottram ve diğ., 2002; Stadler ve diğ., 2002). Glikoz (indirgeyici şeker) ve asparajin arasındaki Maillard reaksiyonu olarak bilinen reaksiyon, fırınlanan ve kızartılan besin maddelerindeki renk, lezzet ve aromanın oluşmasından sorumludur ve 120 °C'yi aşan sıcaklıkta reaksiyon daha yüksek oranda gerçekleşir (Friedman, 2003, Tareke ve diğ., 2002). Avrupa Gıda Güvenliği Kuruluşu (EFSA) 2005 yılından itibaren belli aralıklarla gıdalarda bulunan akrilamid miktarları ve etkileri ile ilgili bildirimler yayımlamaktadır ve en son 2015 yılında akrilamid risk değerlendirmesi raporunu bildirmiştir (EFSA, 2015). 2007-2012 yılları arasında EFSA izleme verilerine dayanan çeşitli gıdalarda tespit edilen akrilamid değerleri tabloda verilmiştir (EFSA, 2013). Gıdalarda akrilamid oluşumunu etkileyen faktörler: sıcaklık, yüksek sıcaklığa maruz kalma süresi, amino asit içeriği ve türleri ile karbonhidrat içeriği olarak sıralanabilir. (Becalski ve diğ., 2003).

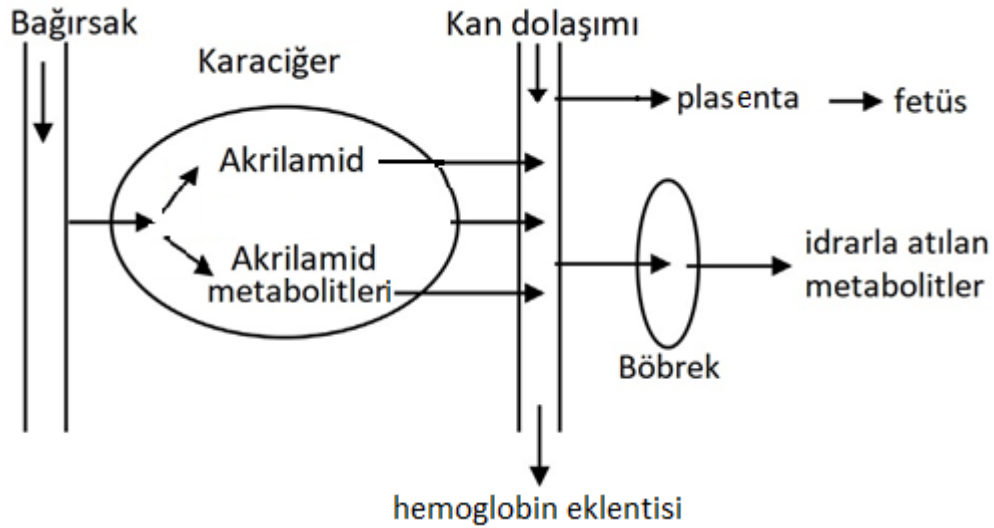
Tablo 2.2.2.1: EFSA (2013) verilerine göre çeşitli gıda maddelerinde tespit edilen akrilamid değerleri.

Gıda ürünleri	Belirlenen akrilamid değerleri (µg/kg)
Patates kızartması	600
Patates içerikli cips	1000
Buğday ekmeği	80
Kahvaltılık gevrekler	400
Bisküvi ve gofretler	500
Bebek bisküvileri	200
Çözünebilir kahve	900
Kavrulmuş kahve	200

Akrilamid kızartma, kavrulma ve fırınlama sırasında oluşur ve haşlanmış veya mikrodalga fırında işlenmiş gıdalarda bulunmaz. Kızarmış patates ürünleri, ekmekek, unlu mamuller ve kahvede en yüksek akrilamid seviyeleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte, akrilamidin, tabloda listelenenlerin dışındaki gıda ürünlerinde olduğu da bildirilmiştir. İnsanlar akrilamidin zararlı etkilerine işlenmemiş bazı doğal gıdaları tüketerek de maruz kalabilirler bu gıdalar fındık, badem, kakao ve tahıl grubu olarak sıralanabilir ayrıca aşırı sıcak işlem görmeyen kurutulmuş meyvelerde (kuru kayısı, erik gibi) de yüksek miktarlarda akrilamid olduğu görülmüştür (Rachwał ve Nebesny, 2012, Amrein ve diğ., 2005, Amrein ve diğ., 2007). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) genel popülasyon için günlük olarak alınan akrilamid miktarını 0,3-2,0 mg/kg/vücut ağırlığı olarak ve yüksek tüketicilerde 5,1 mg/kg/vücut ağırlığına kadar çıkabildiğini belirtmiştir (WHO, 2005). Çocuklar ve ergenler gibi popülasyondaki farklı alt gruplarda ve toplumların geleneksel beslenme alışkanlıklarının değişkenliği doğrultusunda vücut ağırlığına oranla günlük olarak daha fazla akrilamid tüketildiği bilinmektedir. EFSA, akrilamidin azaltılması konusundaki araştırma sürecini ve gıdalarda oluşan akrilamid seviyelerini etkileyen parametreleri özetlediği “toolbox”ı 2014 yılında güncelleyerek yayınlamıştır. Rapora göre patates içerikli gıdalarda akrilamid oluşumunu indirgeyebilmek için bilimsel tarım (şeker ve asparjin içeriği), reçeteye bağlı değişkenler, (fermantasyon, dilisyon ve parça boyutu, pH, aminoasit ve kalsiyum içeriği), gıda işlenmesi ile ilgili faktörler (asparjinaz, ısı girişi ve nem, ürün rengi) gibi parametrelere gıda sanayinin uygulaması üzere belirli kısıtlamalar getirilmiştir (Toolbox, 2013).

2.2.3. Akrilamid metabolizması

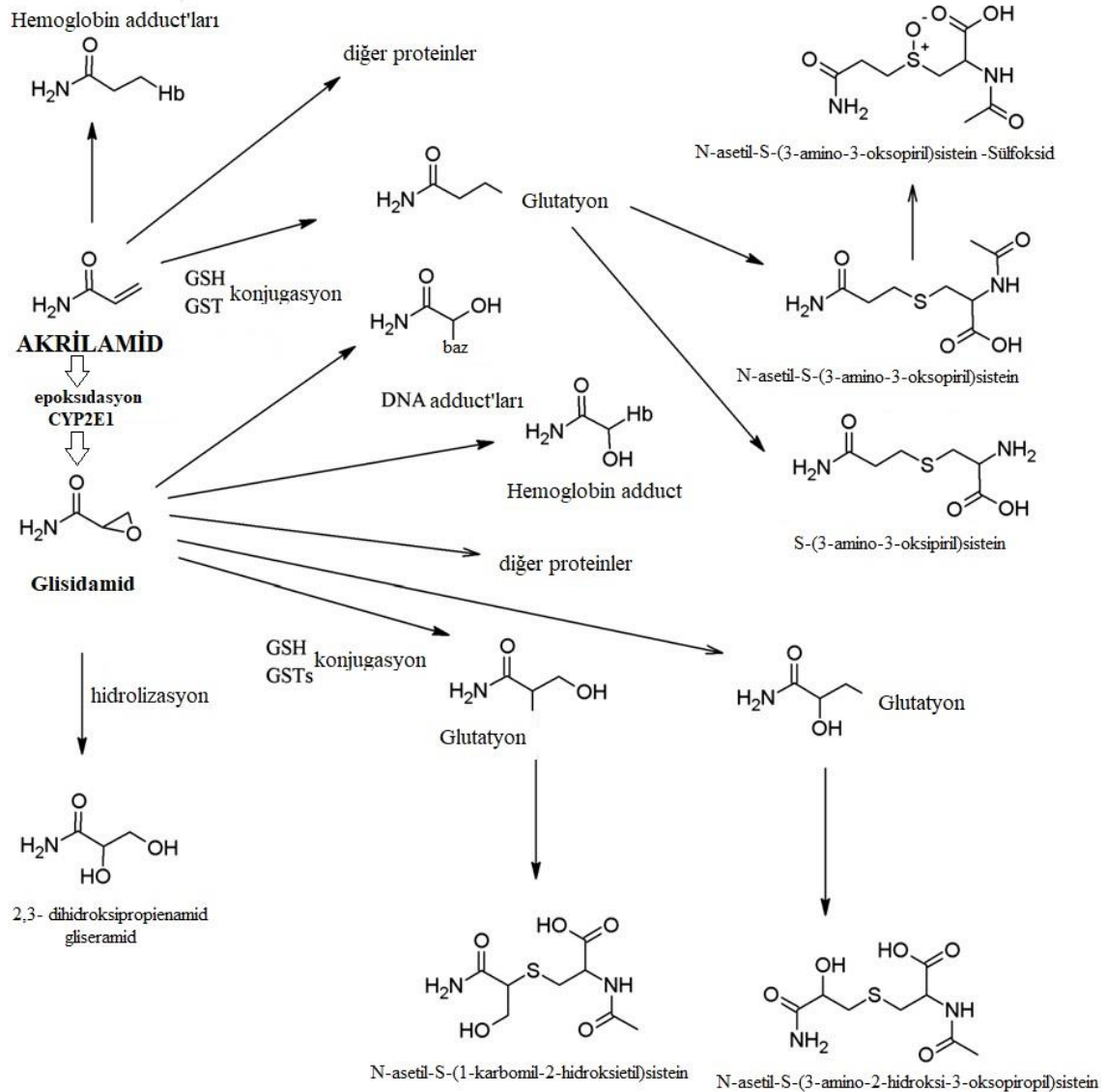
Akrilamid vücuda üç farklı yol ile giriş yapabilir bunlar sindirim yolu, solunum yolu (sigara dumanı) ve deri emilim yolu (kozmetik ürünler) olarak sınıflandırılır (Semla ve diğ., 2016). Yüksek miktarda hidrofilik özellik gösterdiği için vücuda alınan akrilamidin tamamının emilmesi beklenmektedir. Yapılan pek çok çalışma akrilamidin insanlara ve özellikle kemirgenlere oral yol ile verilmesinin ardından hızlıca emildiğini göstermektedir. Vücuda alınan akrilamid hızlıca emilip kan dolaşımına katılarak organlara (karaciğer, kalp, beyin, böbrekler) yayılır (Kocadağlı ve Gökmen, 2016). Plasenta ve anne sütüne de geçebilen akrilamid böylelikle fetüs ve yenidoğan metabolizmasına da dahil olur (Schettgen ve diğ., 2004, Sorgel ve diğ., 2002, Capuano ve Fogliano, 2011). Akrilamidin emilim, dağılım, metabolizma ve atılımını gösteren şema Şekil 2.2.3.1 'de verilmiştir.



Şekil 2.2.3.1: Akrilamidin emilim, dağılım, biyotransformasyon ve atılımının şematik diyagramı (Kocadağlı ve Gökmen, 2016).

Akrilamid metabolizmasında iki ana yolak bulunur (Şekil 2.2.3.2). Akrilamid, faz I metabolizmasında sitokrom P450 2E1 tarafından oksidasyon yoluyla *in vivo* olarak bir elektrofil olan epoksit glisdamide dönüştürülür (Settels ve diğ., 2008). Bu nedenle, akrilamid gibi, glisamid de kovalent olarak sülfhidril ve amino grupları içeren hücresel bileşenlere bağlanır. Biyotransformasyonun ikinci aşamasında, akrilamid ve glisamid redükte glutatyon ile glutatyon konjugatlarının oluşmasına neden olan glutatyon-s-transferaz ailesinden enzimler aracılığıyla birleştirilir (Friedman, 2003). Glutatyon konjugatları reaksiyonunun son ürünleri, olan N-asetilsisteinin türevleri idrar ile atılır (Pingot ve diğ., 2013). Akrilamid ve glisamidin

her ikisi de hemoglobin, glutatyon ve DNA gibi vücutta bulunan nükleofilik moleküllerle etkileşime girebilirler. Ancak akrilamidin DNA ile olan reaktivitesinin glisidamide oranla daha düşük olduğu belirtilmiştir (Doerge ve diğ., 2005; Ghanayem ve diğ., 2005). Oksijen içeren heterosiklik bileşikler olan epoksitler (glisidamid) çok reaktifirler ve bu sebepten proteinler ile DNA'daki nükleofilik bölgelerle kolayca reaksiyona girebilirler (Melnick, 2003).



Şekil 2.2.3.2: Akrilamid metabolizması (Capuano ve Fogliano, 2011).

2.2.4. Akrilamidin Toksik Etkileri

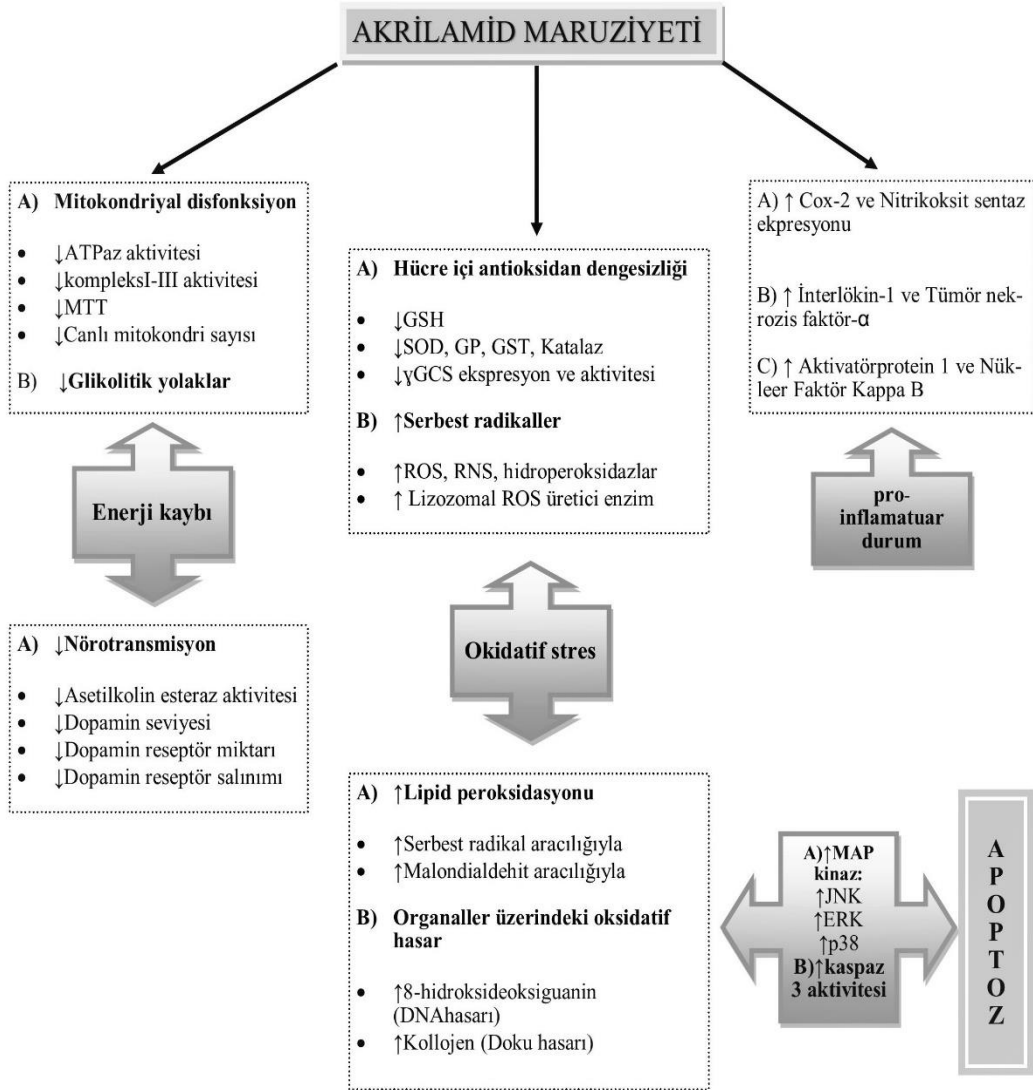
Akrilamidin farklı canlı gruplarında çeşitli doku ve organlar üzerinde toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Bu toksik etkiler, nörotoksisite, karsinojenite, genotoksisite ve üreme sistemleri üzerine olan etkiler olarak sınıflandırılır (Friedman, 2003; Parzefall, 2008; Exon, 2010). Akrilamid nörotoksisitesi yüksek miktarlarda maruziyet sonucunda gelişir ve özellikle mesleki olarak inhalasyon ve dermal yol ile maruz kalan bireylerde görülür (WHO, 2005). Nörotoksisiteye bağlı hasarlar genellikle çevresel nöropatiye bağlı olarak gelişen ataksi, ekstremitelerde uyuşukluk, aşırı terleme ve iskelet kası zayıflığı olarak tanımlanır. Akrilamidin nörotoksik etkileri kinezin aracılı aksonomal taşımayı ve nörotransmisyonu inhibe etmesine dayanmaktadır (LoPachin, 2002; Sickles ve diğ., 2002).

Akrilamid Uluslararası Kanser Araştırmaları Kuruluşu (IARC) tarafından 1994 yılında insanlar için muhtemel karsinojenler olan Grup 2A sınıfı kimyasallar içine tanımlanmıştır (IARC, 1994). Kemirgenlerde yapılan birçok çalışma, akrilamidin, çoklu organ kanserojeni olduğunu ve akciğer, rahim, cilt, meme bezi, beyin gibi birçok organda tümöre yol açabileceğini göstermektedir (Rice, 2005). Genel olarak akrilamidin neden olduğu kanserojenik etkinin memelilerde glisidamide dönüşmesinden kaynaklandığı ve glisidamidin nükleik asitlerin asit bazlarına akrilamidden daha yüksek afinite gösterdiği kabul edilmektedir. Bununla birlikte hem akrilamidin hem glisidamidin, N-7 pozisyonunda guanine kovalent olarak bağlanarak "DNA adduct" oluşturduğu bulunmuştur (Atay ve diğ., 2005). Akrilamid maruziyetinde görülen başlıca DNA adduct N-7 glisidamid-guanin DNA adduct'tır ve DNA replikasyonu sırasında guanine-timin geçişine sebep olduğu için mutajenik etki gösterir (Besaratina ve Pfeifer, 2004). Akrilamid kaynaklı DNA adduct oluşması ve buna bağlı görülen mutajenite akrilamid genotoksisitesinin anahtar noktasıdır.

Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar akrilamid maruziyetinin testis fonksiyonu üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bu çalışmaların sonuçları sperm sayısı ve canlılığında azalma, anormal sperm morfolojisinde artış ve seminifer tübüllerde vakuolizasyon ve apoptotik ve dev hücrelerin oluşumu gibi histopatolojik değişiklikler olduğunu göstermiştir. Erkek farelerle yapılan bir çalışmada düşük konsantrasyonda (0,001 mg/kg/vücut ağırlığı) akrilamid on iki ay süre ile içme suyuna katılarak kronik maruziyet modeli oluşturulmuş ve germ hücrelerinde akrilamid konsantrasyonuna bağımlı olarak artış gösteren DNA hasarı tespit edilirken testis morfolojisi ve ağırlığında bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşılık, bir diğer

çalışmada yüksek konsantrasyonlarda (0,43 ve 2,18 mg/kg/vücut ağırlığı) uygulanan akrilamidin serumda bulunan total testosteron, yüksek konsantrasyonlu lipoprotein ve lenfosit miktarını azalttığı böylelikle yüksek konsantrasyonlarda maruz kalınan akrilamidin sistemik toksisiteye neden olduğu sonucuna varılmıştır (Raju ve diğ., 2015) Yapılan bir diğer çalışma akrilamidin Leydig hücrelerine doğrudan hasar vererek testisin endokrin fonksiyonu üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğunu göstermektedir (Song ve diğ., 2008). Daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada akrilamid uyguladığımız Leydig hücrelerinde testosteron hormon miktarının azaldığını ve steroidogenez sürecinde görevli genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerinde azalma olduğu gözlenmiştir (Yildizbayrak ve Erkan, 2018). Artan doza bağlı olarak akrilamid Leydig hücre canlılığını ve serumda bulunan testosteron seviyesini düşürerek spermatogenez kapasitesinin düşmesine neden olur. Ayrıca, spermatogenez ile ilgili gen anlatımını negatif yönde etkilediği, kauda epididimisteki sperm miktarını azalttığı ve cinsiyet steroidlerinin taşınmasında olumsuz etkiler yaptığı gösterilmiştir (Yang ve diğ., 2005).

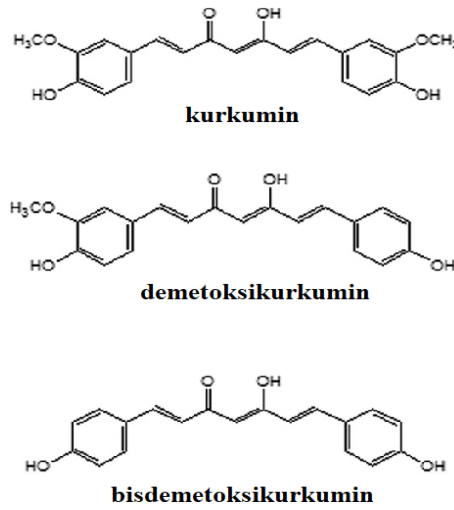
Akrilamid kaynaklı oluşan hücre içi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif DNA hasarı ve detoksifikasyonunda rol oynayan glutatyonun (GSH) tükenmesi yoluyla akrilamid hücrelerde sitotoksik ve genotoksik etkiler göstermektedir (Friedman, 2015). Akrilamid, reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak, p38 ve JNK kinazları aktive eder ve genotoksik stres ile bağlantılı transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hücrelerde senesens ve apoptozu uyarır. Akrilamidin hücre içine girdikten sonra neden olduğu hücrel değişiklikler şekil 2.2.4.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2.4.1: Akrilamidin hücre içi toksik etkileri (reaktif oksijen türleri: ROS, reaktif nitrojen türleri: RNS) (Kahkeshani ve diğ., 2015).

2.3. KURKUMİN

Geleneksel tıpta insan hastalıklarını tedavi etmek için tıbbi bitkilerin kullanımı oldukça yaygındır. Natürel ilaçların sentetik ilaçlara oranla daha sağlıklı olduğu inancı nedeniyle son on yılda tıbbi bitkiler ve geleneksel tıp üzerine ilgi artmıştır (Mohebbati ve diğ., 2017). *Curcuma longa* (turmerik, zerdeçal), Güney Asya'ya özgü tropik bir bitki olup Zingiberaceae familyasına aittir ve dünyada yaklaşık 133 tür *Curcuma longa* vardır. Kurkumin ise turmerikte bulunan bir çeşit polifenol maddedir (Hosseini ve Hosseinzadeh, 2018). Zerdeçalın kurkuminoid içeriği %2-9'dur ve ticari olarak satılan zerdeçal ekstraktları %70-75 oranına kurkumin ile birlikte yapısal kurkumin analogları olan demetoksikurkumin (%20) ve bisdemetoksikurkumin (%5) içerir.



Şekil 2.3.1: Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı (Tsuda, 2018).

Kurkumin tautomer olarak adlandırılan iki moleküler konfigürasyona sahiptir. Keto-enol tautomerizm gösterir ve çözündüğünde, enol formu baskın olur (Tsuda, 2018). Nötr ve alkali çözeltilerde hızlı bir şekilde bozunabilen nispeten kararsız bir bileşik olan kurkuminin çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri tablo 2.3.1'de verilmiştir. Kurkumin FDA tarafından genel olarak güvenli bileşikler kategorisinde değerlendirilir ve herhangi bir toksik etkisinin olmadığı belirtilmektedir. EFSA raporlarına göre kurkuminin yeterli günlük alım dozu 0-3 mg/kg'dır (EFSA, 2014). Sağlıklı bireylerle gerçekleştirilen bir çalışmanın sonucunda günlük 12 g kurkumin tüketiminin sağlık açısından herhangi bir risk oluşturmadığı gösterilmiştir (Lao ve diğ., 2006)

Tablo 2.3.1: Kurkuminin kimyasal ve fiziksel özellikleri.

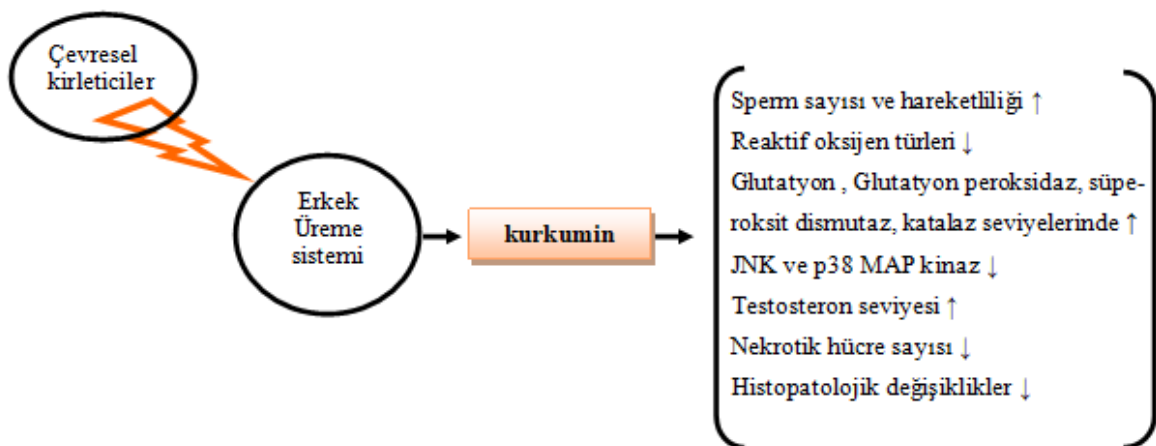
Kimyasal formülü	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
Moleküler ağırlığı	368,39 g/mol-1
Kaynama noktası	183 °C
Çözünürlüğü	Etanol, dimetilsülfoksit, metanol, aseton
Sudaki çözünürlüğü	Yok
Fiziksel durum	Katı
Renk	Sarı
Işığa duyarlılık	Işığa duyarlı

Kurkumin antik çağlardan bu yana farklı amaçlar için kullanılmıştır. Köri tozu olarak bilinen ve özellikle Güneydoğu Asya mutfağında yaygın olarak kullanılan baharatın ana bileşenidir. Batı mutfağında ise, soslarda, hardal yapımında ve turşularda tat, renk ve aroma verici olarak kullanılır (Gupta ve diğ., 2013). Kurkuminin Ayurveda ve geleneksel Çin tıbbında birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisi için kullanıldığı bilinmektedir (Deogade ve Ghate, 2015). Kurkumin ile yapılan çalışmalar sonucunda, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-karsinojenik gibi geniş çaplı farmakolojik özellikleri olduğu bildirilmiştir. Şekil 2.3.2.'de kurkuminin çoklu biyolojik aktiviteleri şematize edilmiştir. Bu özellikleri doğrultusunda kurkumin kanser, otoimmün rahatsızlıklar, nörolojik, metabolik ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde koruyucu ve önleyici bir ajan olarak kullanılmaktadır.

**Şekil 2.3.2:** Kurkuminin biyolojik aktiviteleri.

Kurkumin, birçok hastalığının gelişim basamaklarında işlev gören sitokinlerin, kinazların, enzimlerin, transkripsiyon faktörlerinin, metastatik ve apoptotik moleküllerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Maheshwari ve diğ., 2005). Kurkuminin antioksidan özellik göstermesinde moleküler yapısında bulunan fenolik β -diketon grubu ve metoksi gruplarının etkisi vardır. Yapılan çalışmalara göre kurkuminin radikal süpürücü özelliği fenolik yapısından kaynaklanmaktadır (Esatbeyoğlu, 2012). Kurkuminin, süperoksit anyon radikalleri, hidroksil radikalleri gibi çeşitli reaktif oksijen türlerine ve nitrojen türlerine karşı güçlü bir radikal temizleyicisi olarak terapötik avantajlara sahip olduğu gösterilmiştir (Maheshwari ve diğ., 2005). Serbest radikalleri temizlemesine bağlı olarak güçlü bir anti-karsinojen olarak bilinen kurkumin bu etkisini glutatyon seviyelerini arttırabilmesi ve mutajenlerin ile karsinojenlerin hepatik detoksifikasyonunu hızlandırabilmesi sayesinde gerçekleştirir (Mohebbatı ve diğ., 2017).

Yapılan çalışmalarda kurkuminin erkek üreme organları üzerindeki etkileri incelenmiş ve sağlıklı hücre ve dokular üzerinde anti-imflammatuar, anti-apoptotik ve antioksidan etkileri gözlenirken malign hücrelerde pro-apoptotik etki gösterdiği sonuçlarına varılmıştır. Çevresel kirlenmelerin, pestisitlerin, kemoterapi ilaçlarının ve alkolün testis ve erkek üreme fonksiyonları üzerindeki etkilerine karşı kurkuminin koruyucu rolünün incelendiği çalışmalarda rapor edilen sonuçlar şekil 2.3.3'te özetlenmiştir (Giannessi ve diğ., 2008; İlbey ve diğ., 2009; Shaarma ve Singh, 2010; Oğuztürk ve diğ., 2012).



Şekil 2.3.3: Kurkuminin erkek üreme sistemi üzerindeki koruyucu etkileri.

2.4. SİTOTOKSİSİTE

2.4.1. Oksidatif Stres

Günümüzde ‘stres’ fizyolojik veya çevresel faktörlerce uyarılan değişmiş biyokimyasal homeostazi süreci olarak tanımlanmaktadır (Rahal ve diğ., 2014). İlk olarak 1991 yılında Sies tarafından tanımlanan ‘oksidatif stres’ prooksidan-antioksidan dengesindeki, oksidan türlerinin lehine yöndeki potansiyel hasara yol açan bozukluk olarak karakterize edilmiştir (Sies,1991). Prooksidanlar kaynaklarına göre endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılırlar. Çeşitli patojenler (bakteri, virüs, mantar), ilaçlar, çevresel toksinler (pestisitler, ağır metaller) ve diyet içeriği (işlemiş gıdalar, karbohidratlar, yağlar) eksojen kaynaklar olarak sıralanır. Hücrel metabolizma ürünleri, ilaç metabolitleri, iyon dengesizliği, anksiyete ve iskemi ise endojen prooksidanlar olarak gruplandırılır (Rahal ve diğ., 2014).

Normal hücrel metabolizmanın bir sonucu olarak moleküler oksijenden reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir. ROS üretimi ve tükenmesi arasındaki dengenin bozulması sonucu aşırı miktarda oluşan ROS oksidatif strese nedene olur. ROS’lar serbest radikaller ve radikal olmayanlar olmak üzere kendi içlerinde ikiye ayrılırlar. Bir veya daha fazla bağlanmış elektron içeren ve böylelikle aşırı reaktivite gösteren moleküller serbest radikaller olarak adlandırılır. Radikal olmayan formdaki ROS’lar ise iki serbest radikalın eşleşmemiş elektronlarını paylaşması durumunda oluşur (Birben ve diğ., 2012). Fizyolojik olarak öneme sahip üç temel ROS; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($OH\bullet$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) olarak sıralanır. Tablo 2.4.1.1’de reaktif oksijen türleri gösterilmektedir.

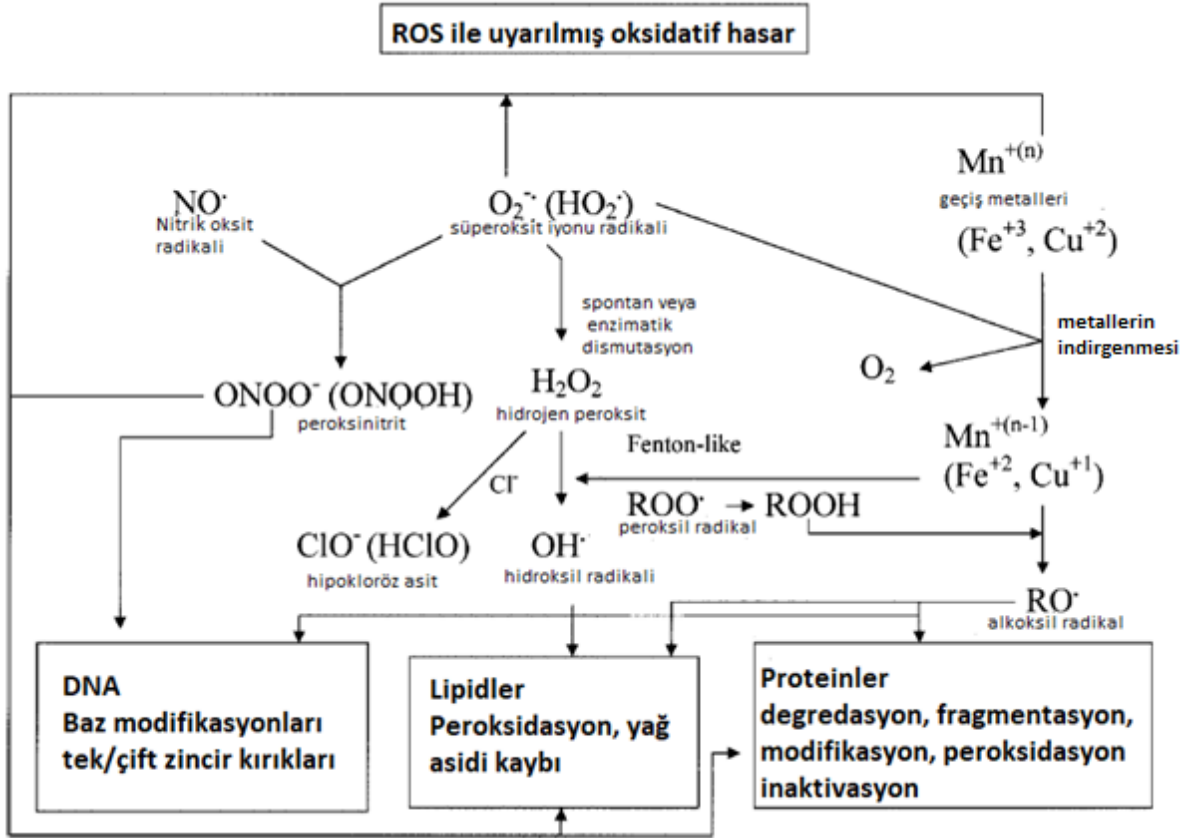
Tablo 2.4.1.1: Reaktif oksijen türleri (Sies ve diğ., 2017).

Serbest Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyonu radikali $O_2^- \bullet$	Hidrojen peroksit H_2O_2
Hidroksil radikali $OH\bullet$	Organik hidroperoksit ROOH
Peroksil radikali $ROO\bullet$	Singlet moleküler oksijen O_2
Alkoksil radikali $RO\bullet$	Ozon O_3

ROS’lara ek olarak nitrik oksit, azot dioksit, peroksinitrit, dinitrojen trioksit ve azot asit gibi reaktif azot türleri de oksidatif strese neden olur. Nitrik oksit, L-arjininin L-sitruiline

dönüşümünü katalizleyen nitrik oksit sentaz enziminin üç farklı izoformu tarafından üretilir (He ve diğ., 2017).

Hücrel oksidatif stres moleküllerinin birincil kaynağı olarak ROS'lar reaktif moleküllerdir ve DNA'yı, proteinleri ve lipidleri okside edebilir. Aşırı miktarda üretilen ROS, otofaji, apoptoz ve nekroz mekanizmalarının aktivasyonunu, stres kaynaklı bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarır (Kohen ve Nyska 2002). Oksidatif stresteki serbest radikal kaynaklı hasarın, birçok kronik sağlık probleminin (nörodejeneratif bozukluklar parkinson, Alzheimer, Huntington hastalığı, lateral skleroz, amfizem, kardiyovasküler ve enflamatuvar hastalıklar, katarakt ve kanser gibi) patogeneze ve patofizyolojisine katkıda bulunduğu doğrulanmıştır (Pisoschi ve Pop, 2015).



Şekil 2.4.1.2: Reaktif oksijen türleri ile uyarılmış oksidatif hasar (Kohen ve Nyska, 2002).

2.4.2. Antioksidan Savunma Sistemi

Memeli hücreleri canlı sistemlerde oksidanların oluşturduğu etkileri dengeleyebilmek için çeşitli antioksidanlar ile donatılmıştır (Birben ve diğ., 2012). Antioksidanlar çok çeşitli şekilde sınıflandırılmaktadır. Antioksidanlar kaynaklarına göre sınıflandırılabilir; endojen olarak sentezlenen enzimler ve eksojen olarak diyet ile alınan fenolikler, flavonoidler, fenolik asitler, karotenoidler, vitaminler ve mineraller gibi küçük moleküller. Endojen antioksidanlar da kendi içlerinde üç ayrı gruba ayrılmaktadır: i) süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) ve tiyoredoksin (Trx) gibi enzimatik antioksidanlardan; ii) ürat, askorbat, glutatyon ve flavonoidler gibi hidrofilik antioksidanlar; iii) tokoferol ve karotenoid gibi lipofilik radikal antioksidanlar (Ratnam ve diğ., 2006; He ve diğ., 2017). Antioksidanlar oksidatif stres, DNA mutasyonları, malign transformasyonlar ve diğer hücre hasarı parametrelerini azaltmayı amaçlamaktadır (Pisoschi ve Pop, 2015).

Oksidatif bozulmaya karşı SOD, CAT ve GPx enzimatik savunma sisteminin temel bileşenleridir. SOD, oksijen kaynaklı serbest radikallere karşı ilk savunma hattı gibi işlev görmektedir ve oksidatif strese maruz kalındığında hızlı şekilde indüklenmektedir. Süperoksit radikalının H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizleyen SOD'un memeli dokularında üç farklı formu bulunmaktadır. Sitoplazmada bulunan bakır-çinko içeren SOD1, mitokondriyal matrikse bulunan manganez içeren SOD2 ve hücre dışı alanda bulunan SOD3 (He ve diğ., 2017) Peroksizomal bir enzim olan CAT ise H_2O_2 'yi nötralize ederek moleküler oksijen ve H_2O 'ya ayrışmasında rol oynar (Patlevic, 2016). Redoks döngüsünde H_2O_2 ve membran lipid peroksidasyonunun sonucu olarak üretilen lipid hidroperoksitlerin baskılanmasından sorumlu enzim GPx'tir. Aktif bölgesinde selenosistein aminoasitini içeren tetramerik bir enzim olan GPx, H_2O_2 ve lipidperoksitlerini indirgemek için glutatyonu kullanır (Birben ve diğ., 2012).

2.6. GENOTOKSİSİTE

2.6.1. DNA Hasarı ve Nedenleri

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılmaktadır. Bu değişikliklere sebep olan etkenler endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılır. Endojen etkenler; replikasyon hataları, yanlış eşleşmeler ve baz kayıpları olarak sıralanabilir (Kulaksız ve Sancar, 2007). Ayrıca hücrel metabolizma sonucu oluşan reaktif oksijen türleri de oksidatif DNA hasarına neden olabilir. Kimyasal ajanlar ve ultraviyole radyasyon gibi fiziksel ajanlar ise eksojen etkenler olarak gruplandırılır (Atmaca ve Aksoy, 2009).

Organizmalarda DNA hasarı ve kromozom hasarına sebep olan kimyasal ajanlar genotoksin olarak adlandırılır. Genotoksinler canlılar üzerinde oluşturdukları etkilere göre üç gruba ayrılırlar: i) karsinojenler veya kansere sebep olan ajanlar, ii) mutajenler veya mutasyona sebep olan ajanlar, iii) teratojenler veya doğum anomolilerine sebep olan ajanlar (Natarajan, 1993). Ökaryotik canlılarda somatik hücrelerde görülen DNA hasarı kanser ile sonuçlanırken, germ hücrelerindeki genetik hasar infertileteye neden olduğu gibi kalıcı mutasyonlara da sebep olabilir.

Genetik toksikoloji bilim dalının hedefinde olan maddeler veya ajanlar hücrelerin kromozom ve DNA'sına zarar verebilme potansiyeli sahiptir. Bununla birlikte genotoksisite sıklıkla mutajenite ile karıştırılmaktadır. Tüm mutajenler genotoksiktir ancak genotoksik maddelerin tümü için mutajenik denilemez (Saks ve diğ., 2017). DNA üzerindeki değişikliklerin doğrudan veya dolaylı etkileri olabilir; mutasyonların uyarılması, mekanizmasal hataların aktivasyonu ve mutasyonlara yol açan doğrudan DNA hasarı gibi (Nagarathna ve diğ., 2013). Gen mutasyonları genotoksisitenin sonuçlarından biridir. Mutasyonlar genel olarak tek nokta mutasyonları, yapısal kromozomal aberasyonlar ve genom mutasyonları olarak gruplandırılır. Hücrelerde genetik mutasyonları önlemeye karşı DNA onarım mekanizmaları veya apoptoz işleyiş göstermektedir ancak oluşan hasar her zaman tamir edilememektedir (Saks ve diğ., 2017). Bu yüzden bir maddenin genotoksik olup olmadığını belirlemek risk değerlendirmesi çalışmalarında maddenin karsinojenik ve / veya mutajenik potansiyelini ortaya çıkarmak için önem taşımaktadır. DNA eklentileri (DNA adduct), DNA kırıkları, gen mutasyonları,

kromozom anomolileri, klastojenite ve anöplöidi gibi hasarlar genotoksisite belirteçleri olarak sıralanır (ECVAM, 2013).

2.6.2. Genetik Toksisite Testleri

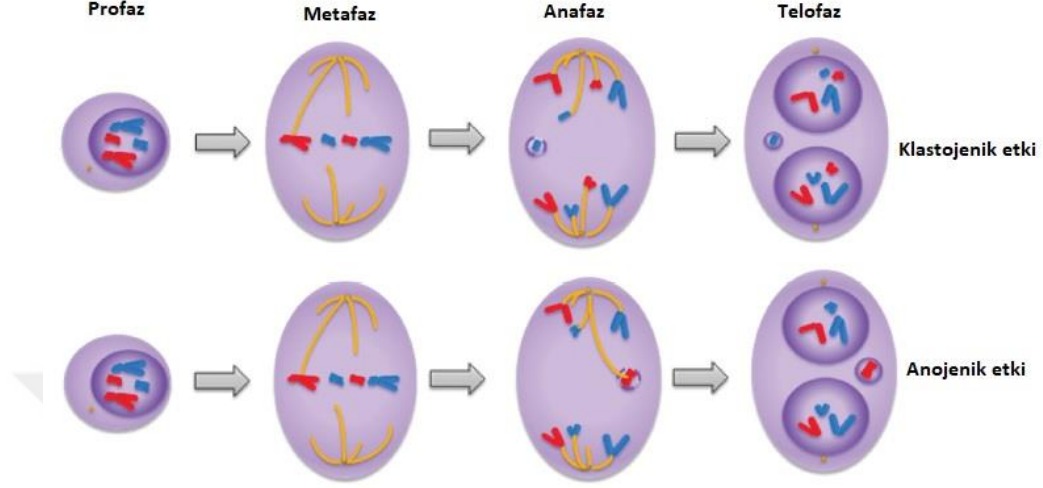
Genetik toksisite testleri çevresel bir faktörün, kimyasal bir ajanın veya bir ürünün organizma üzerinde genetik bir hasara neden olup olmadığını araştırmayı amaçlamaktadır. Yeterli bir değerlendirme için karsinogez ve kalıtsal hastalıklar ile bağdaştırılan üç ana etki incelenmelidir: gen mutasyonları, yapısal kromozom bozuklukları ve sayısal kromozom bozuklukları (Corvi ve Madia, 2017).

Standardize edilmiş ve yaygın olarak kullanılan *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testleri mikronükleus testi, kromozom aberasyon testi, tek hücre jel elektroforezi veya komet testi, bakteriyel gen mutasyon testi (ames testi), somatik-germ hücresi gen mutasyon testi olarak sıralanmaktadır. Genotoksisite testleri içerisinde komet ve mikronükleus testleri DNA kırıklarını incelemedeki hassasiyetleri, istatistiki güvenilirlikleri ve duyarlılıkları ile ayrt edilmektedir (Araldi ve diğ., 2015).

2.6.2.1. Mikronükleus testi

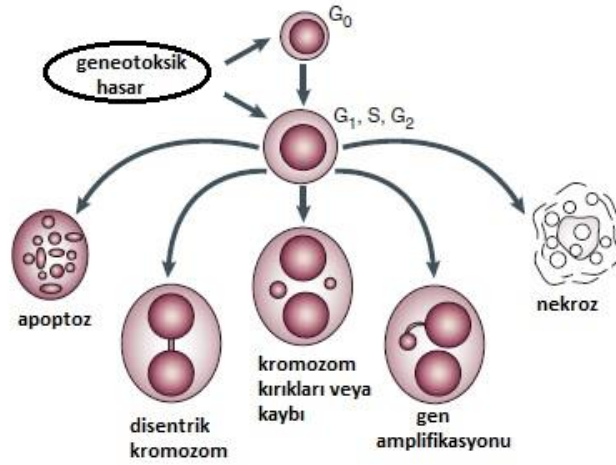
Mikronükleus testi, genotoksik ajanlara maruz kalmış biyolojik materyallerde moleküler epidemiyoloji ve sitogenetik hasarın belirlenmesinde önemli bir *in vivo* ve *in vitro* test metodu olarak uygulanmaktadır (Araldi ve diğ., 2015). 1950'li yılların başında hücre bölünmesinde anafaz aşamasında ana nükleustan atılan asentrik fragmantlar ilk olarak olarak Howwll-Jolly cisimcikleri olarak tanımlanmıştır (Evans, 1997). Mikronükleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan iğ kutuplarına ulaşamayan kromozomlar veya sentromer içermeyen kromozom kırıklarından (asentrik fragmantlar) kökenlenmektedirler (Fenech, 2000). Hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki hatalar, mitotik iğdeki bozukluklar ve kromozomal hasarlar mikronükleus oluşumunu tetiklemektedir. Mikronükleus oluşumunu tetikleyen ajanların klastojenik veya anojenik yapıda olmaları oluşan mikronükleusların kinetikor içerip içermemesinden dolayısıyla mikronükleusların boyutlarından anlaşılabilir (Şekil 2.6.2.1.1). Klastojenler tarafından tetiklenen mikronükleuslar küçük boyutluken anojenler tarafından tetiklenenler tam bir kromozom kaybına neden olduğu için daha büyük çaplıdır (Araldi ve diğ., 2015). Somatik hücrelerde mikronükleus sayısındaki artış hücrelerde meydana

gelen genomik kararsızlığın göstergesi olarak kabul edilmektedir (Vedat-Zülal Şekeroğlu, 2011).



Şekil 2.6.2.1.1: Mikronükleus oluşumunu tetikleyen mekanizmalar (Zelazna ve diğ., 2011).

Fenech ve Morley 1985 yılında mikronükleus testinde küf mantarlarının metaboliti olan sitokalsin B maddesini kullanarak sadece bölünmekte olan hücrelerdeki mikronükleus oluşumunu incelemeyi amaçlamışlardır. Sitokalsin B maddesi aktin polimerizasyonunu inhibe ederek hücre bölünmesinde sitokinez aşamasını engeller ve mitoz sonucunda iki nükleuslu tek bir hücre oluşmasına neden olur. İki nükleuslu hücrelerdeki mikronükleusu tespit etmek, hücre bölünme kinetiklerinin bozulması sonucu oluşan hataların mikronükleus sonuçlarını etkilemesinin elimine edilmesini sağlamaktadır (Fenech, 2007). Sitokalsin B ile bloke edilmiş mikronükleus testi kullanılarak sitotoksik ve genotoksik ajanların hücreler üzerindeki pek çok farklı etkileri tespit edilebilir. Bu etkiler kromozom kırıkları (mikronükleus), kromozom kaybı (mikronükleus), disentrik kromozom oluşumları (nükleozmik köprüler) gibi yeniden düzenlenmeler, gen amplifikasyonları (nüklear tomurcuklar) apoptoz ve nekroz olarak sıralanabilir (Fenech, 2000).

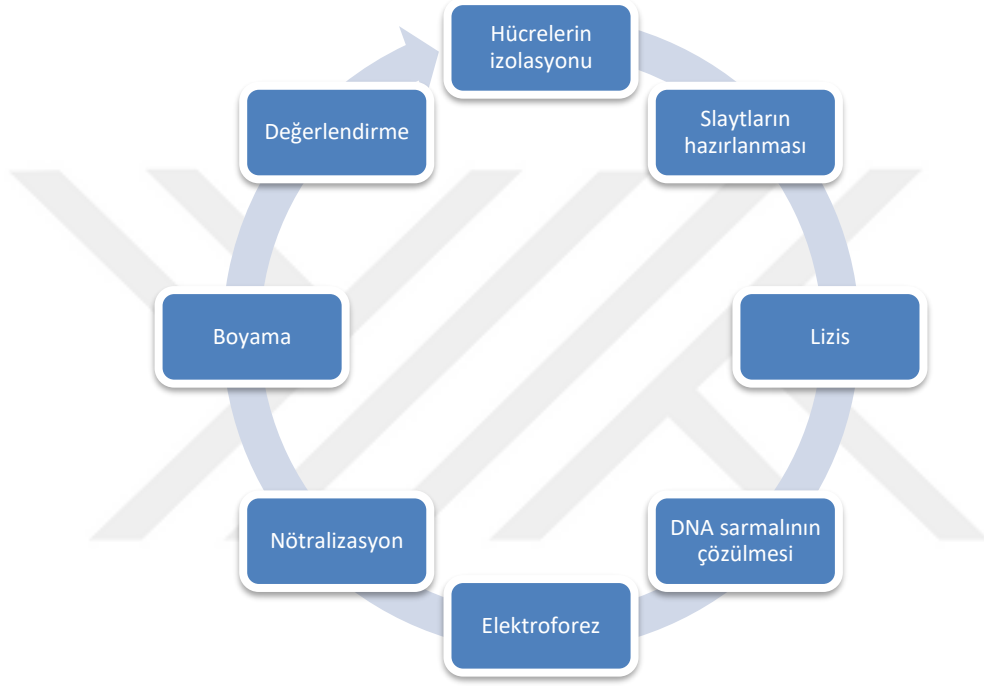


Şekil 2.6.2.1.2: Genotoksik etkiler sonucu hücrelerde mikronükleus testi ile tayin edilebilen hasarlar (Fenech, 2000).

2.6.2.2. Tek hücre jel elektroforezi / Komet testi

DNA hasarı ilk kez 1978 yılından Rydberg ve Johanson tarafından belirlenmiştir (Rydberg ve Johanson, 1978). 1984 yılında Ostling ve Johanson DNA süper sarmallarının açılmasına neden olan DNA tek zincir kırıklarının tespit etmek için mikrojel elektroforez yöntemini geliştirmişlerdir. Nötral koşullarda gerçekleştirilen bu yöntem ancak DNA üzerindeki çift sarmal kırıklarının test edebilmektedir. Bunun üzerine 1988 yılında Singh ve arkadaşları mikrojel elektroforez yöntemini alkali koşullarda uygulayarak modifiye etmişlerdir. DNA jel elektroforezi yöntemini floresan mikroskopi ile birleştirerek ayrı ayrı agaroz gömülü hücrelerin DNA iplikçiklerinin göçünü görsel olarak izlenmesine olanak sağlayan metod tek hücre jel elektroforezi olarak tanımlanmıştır. Yöntemin alkali ($\text{pH} > 13$) ortamda gerçekleştirilmesi DNA tek zincir kırıkları (tamamlanmamış eksizyon (kesip-çıkarma) onarım bölgeleri) ile alkali duyarlı (apurinik ve apirimidinik bölgeler) bölgelerin de tespit edilmesine olanak sağlayarak yöntemin daha güçlü olmasını sağlamıştır (Tice ve Vasquez, 1999). Komet yöntemi, lizis işlemi ile serbest hale getirilen DNA'nın alkali ortamda süpersarmal yapısının açılması ve DNA kırıklarının elektroforez uygulaması ile anodo doğru göç ettirilmesi prensibine dayanmaktadır. DNA'sı zarar görmemiş hücrelerde serbest uçlar olmaması ve fragmentlerin büyük olması elektroforez sırasında göçü engellemektedir. Anoda doğru göç

eden DNA fragmentleri floresan boya ile işaretleme sonunda kuyruklu yıldız görünümü verdiği için hasarlı hücreler ‘komet’ olarak adlandırılmıştır (Singh ve diğ., 1988). Tice ve arkadaşlarının (2000) uyarlamasına göre komet testinin kritik basamakları şekil 2.6.2.2.1.’de verilmiştir. Farklı hücre ve doku tiplerinde uygulanabilirliği, güvenli, düşük maliyetli ve az miktarda hücreye gereksinim duyması yöntemin avantajları olarak sıralanmaktadır (Singh ve diğ., 1988).



Şekil 2.6.2.2.1: Komet testinin kritik basamakları.

2.7. HÜCRE SİNYAL YOLAKLARI

2.7.1. Apoptoz

Apoptoz normal hücre mekanizmasının gerekliliği olarak kendine özgü morfolojik ve biyokimyasal özellikleri olan bir hücre ölüm şeklidir. 1842 yılında Alman bilimadamı Carl Vogt apoptoz olayını ifade etmiştir ancak apoptoz terimi ilk olarak 1972 yılında John Kerr ve çalışma grubu tarafından morfolojik olarak hücrelerden oluşan apoptotik cisimciklerin oluşması ile tanımlanmıştır (Kerr ve diğ., 1972). Apoptoz organların, uzuvların ve vücuda ait yapıların oluşumunda ve sistemlerin çoğunun işlevini sürdürmesinde kritik öneme sahiptir (Xu ve Shi, 2007). Apoptozu kontrol eden moleküler mekanizmalar ile ilgili ilk çalışmalar *C. elegans* ile yürütülmüştür ve Sydney Brenner, Robert Horvitz ve John E. Sulston adlı araştırmacılar apoptoz araştırmaları ile 2002 yılında Nobel ödülünü kazanmışlardır.

Apoptoz hücrenin sitoplazma, nükleus ve hücre membranında meydana gelen biyokimyasal ve fiziksel birtakım değişiklikler ile hücrenin kendini yok etmesi sürecidir (Lawen, 2003). Apoptozun erken basamaklarında hücreler yuvarlaklaşır ve komşu hücreler ile olan bağlantılarını keserler. Bu sırada endoplazmik retikulum genişler ve sitoplazmada vesiküller ve vakuoller oluşur. Nükleus da ise kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyon gerçekleşir. Apoptozun ilerleyen basamaklarında nükleus apoptotik cisimcikleri oluşturacak olan paketlenmiş fragmentlere ayrılır. Hücre yüzeyinde çıkıntılar oluşur ve son aşamada hücre kapsülle kaplanmış apoptotik cisimlere ayrılır. Apoptotik cisimler kapsül ile sarılı olduğu için enflamasyon görülmez ve son olarak fagositoz gerçekleşir (Ellis, 1991; Lawen, 2003).

Apoptoz çoklu sinyal yolları ile tetiklenir ve farklı iç ve dış ligandlar ile düzenlenir. Memelilerde apoptozu yol açan iki ana yolak vardır: i) ölüm reseptörleri tarafından uyarılan dışsal bir yol, ii) mitokondride meydana gelen içsel bir yol (Zhao, 2015). Dışsal yolak hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin (tümör nekrozis- α , TNF- α ve Fas ligand reseptörleri gibi) özelleşmiş ölüm ligandları ile karşılaşması durumunda hücre zarından başlayarak yayılan konformasyonel değişiklikler ile uyarılır. Bu reseptörler, ligand-reseptör bağlanmasının gerçekleştiği saniyeler içerisinde kaspazların (kaspaz 3, kaspaz 8) aktivasyonunu uyararak birkaç saat içinde apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır (Xu ve Shi, 2007). Memeli hücrelerinde apoptozun mitokondriyal veya içsel yol ile uyarılması mitokondri membran permeabilizasyonu ile gerçekleşir ve belirli proteinlerin salınımına yol açarak kaspazları aktive

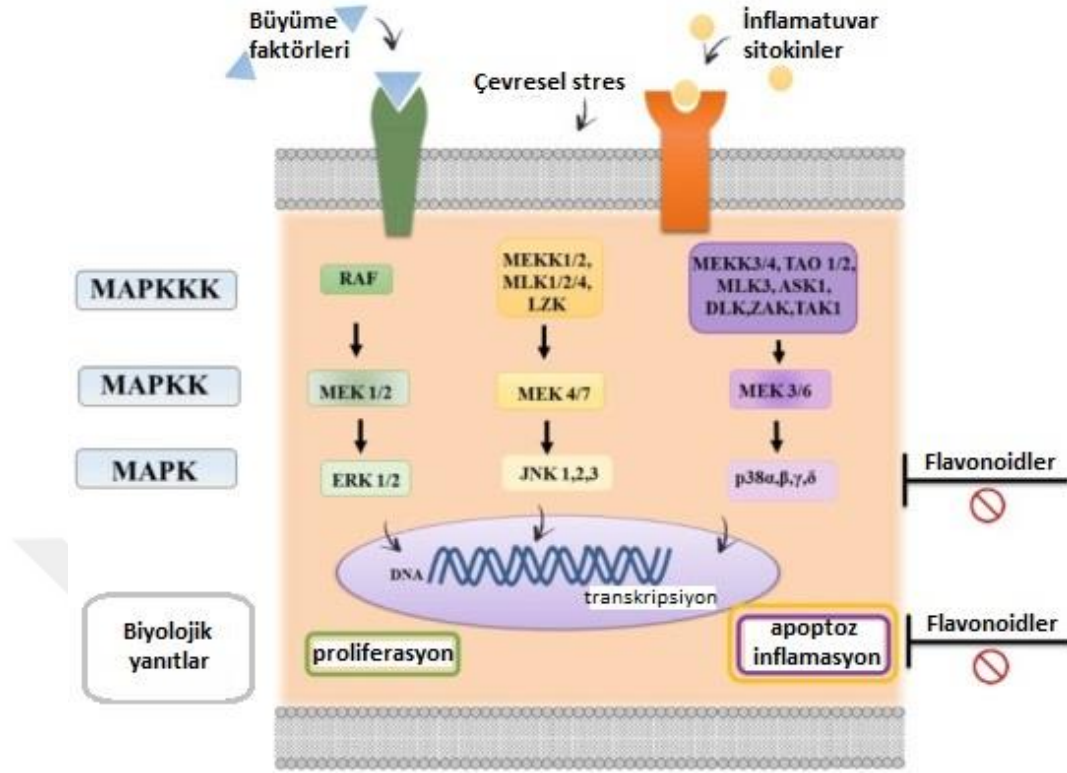
eder (Lawen, 2003). Hücre içi sinyaller ile apoptotik uyarının oluşması sonucunda mitokondri membranlarından salınan sitokrom-c, apoptotik proteaz aktive eden faktör ile bağlanmak üzere sitoplazmaya yayılır. Oluşan komplekse apoptozom adı verilir ve kaspaz aktivasyonu (kaspaz 9, kaspaz 3) ile apoptoz uyarılır (Zhao, 2015). Apoptozun ölüm reseptörleri veya mitokondriyal yolaklar ile uyarılmasında rol oynayan içsel faktörler oksidatif stres, sitokrom-c, endoplazmik retikulum stresi olarak sıralanabilirken, sitokinler, ilaçlar, hormonlar, patojenler dışsal faktörleri oluşturur. Apoptoz sinyali organizma gelişimi, organ, uzuv ve diğer vücut yapılarının oluşumu ve doku homeostazında kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, apoptotik sinyal mekanizmasındaki düzensizlik nörodejeneratif hastalıklar, kanser veya otoimmün rahatsızlıklar gibi pek çok istenmeyen durum ile sonuçlanır (Xu ve Shi, 2007).

2.7.3. Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz (MAP-Kinaz) Sinyal Yolakları

Protein kinazlar hücre biyolojisinin her alanında düzenleyici rol üstlenirler (Hunter, 2000). İnsan genomunun %1,7'si oluşturan protein kinaz gen ailesi içerdiği 518 gen ile genomdaki en büyük gen ailelerinden biridir. Protein kinaz reaksiyonu, ATP'nin fosforil grubunun protein substratının hidroksil grubuna transfer olmasını içerir (Robert Roskoski, 2012). Fosforile edilmiş OH grubunun yapısına bağlı olarak, bu proteinler, protein-serin / treonin kinazlar, protein-tirozin kinazlar ve tirozin-kinaz benzeri proteinler olarak sınıflandırılır (Manning ve diğ., 2002). Protein fosforilasyonu sinyal iletiminde kullanılan en yaygın post-translasyonel modifikasyon olarak bilinmektedir.

Sitoplazmik protein-serin / treonin kinaz sınıfına dahil olan MAP-kinazlar hücre yüzeyinden nükleusa sinyal iletiminde görevlidirler ve ardışık olarak aktive olan üç protein kinaz içerirler (Morrison, 2012). MAP kinazlar tüm ökaryotik hücrelerde hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümü gibi temel mekanizmlarda sinyal iletimine katkı sağlarlar. MAPK-kinaz kinaz fosforillenerek MAPK-kinazı oluşturur, bu da MAPK'leri fosforile eder (Şekil 2.7.3.1). Aktive olmuş protein kinazlar, transkripsiyon faktörleri, fosfotazlar, protein kinazlar ve pek çok fonksiyonel proteinin fosforilasyonunu katalize ederler (Son ve diğ., 2011).

MAP kinazlar memelilerde üç ana gruba ayrılırlar: i) hücre dışı sinyallerle düzenlenmiş kinazlar (ERK), ii) c-Ju-N terminal kinazlar (JNK), iii) stres ile aktive olan kinazlar (p38).



Şekil 2.7.3.1: MAP kinaz sinyal yolağı (Veza ve diğ., 2016).

Klasik ERK yolağı, hücre büyümesini ve farklılaşmasını sağlamak için büyüme faktörlerine ve mitojenlere cevap verir. ERK kinazları aktive edici düzenleyiciler; integrinleri ve tirozin kinazlar ile G proteinine bağlı hücre yüzey reseptörlerini içerir (Robert Roskoski, 2012). p38 ve JNK kinazlar TNF- α ve interleokinler gibi pro-inflamatuvar sitokinler tarafından veya genotoksik, ozmatik, hipoksik ve oksidatif stres gibi hücrel stres durumlarında aktive olurlar (Plotnikov ve diğ., 2011). JNK kinazlar hücre metabolizmasında apoptoz, sitokin üretimi ve inflamasyonda görev alırlar (Morrison, 2012). Apoptoz ve inflamasyon süreçlerinde JNK kinazlar ile birlikte görev alan p38 kinazlar ayrıca hücre farklılaşması ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynarlar (Son ve diğ., 2011).

Pekçok farklı hücre tipi ile yapılan çalışmalar ROS üretimini tetikleyen çeşitli hücrel uyarıların paralel olark MAP kinaz yolağını da aktive edebildiğini göstermektedir. Hücrelerde antioksidan takviyesi ile ROS ölçümü ve birikiminin engellendiği durumlarda MAPkinaz aktivasyonunun da bloke olduğu bildirilmiştir (Son ve diğ., 2011). Ayrıca MAP kinaz sinyal yolaklarından JNK kinazlar, stres bağımlı apoptozda temel aracı sinyal yolağı olarak gösterilmektedir (Mates ve diğ., 2012).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada akrilamid ve kurkumin farklı süre ve konsantrasyonlarda TM3 Leydig hücrelerine uygulanmıştır. TM3 Leydig hücreleri kontrol ve deney grupları olmak üzere gruplara ayrılarak, kontrol grubunda bulunan hücreler hücre büyüme medyumuna veya sadece kurkumin ile muamele edilmiştir, deney grubunda bulunan hücreler ise hücre büyüme medyumuna akrilamidin dört farklı konsantrasyonuna tek başına ve kurkumin ile birlikte 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Deney süresi tamamlandığında hücre canlılığını ve sitotoksiteyi belirlemek için MTT ve LDH testleri gerçekleştirilmiştir ve oksidatif hasarı belirlemek için reaktif oksijen türleri (hidroksil radikali ve hidrojen peroksit radikali) ile enzimatik antioksidanlar (katalaz, süperoksitdismutaz, glutasyon peroksidaz) spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hücre sinyal yollarındaki etkileri incelemek için apoptotik ve nekrotik hücreler propidium iyodür hoechst floresan işaretleme ile yöntemi ile MAP kinaz yolağındaki kinazlar ise Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Genotoksik hasarı ortaya çıkarmak için tek hücre jel elektroforezi (komet testi) ve mikronükleus testi uygulanmıştır. Ayrıca hücre iskeleti ve hücre iletişim bağlantıları immunfloresan boyama ile işaretlenmiştir.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.1.1. Kullanılan Hücre Soyu

Yapılan bu tez çalışmasında *in vitro* model olarak TM3 Leydig hücre soyu kullanılmıştır. TM3 Leydig hücre soyu Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından temin edilmiştir. Tümöröjenik olmayan TM3 Leydig hücre soyu, 11-13 günlük *Mus musculus* türü farelerin testis dokusundan izole edilmiştir. Epidermal büyüme faktörü, androjen, östrojen ve progesteron reseptörlerine sahip olan TM3 hücreleri Luteinizan hormon varlığında kolesterolü metabolize edebilme yeteneğindedir.

3.1.2. Hücre Kültürü Rutin Bakım İşlemleri

TM3 Leydig hücre soyu; kültür kabının zemininde adherent olarak çoğalan hücre soyudur. Hücreler; %5 at serumu, %2,5 fetal sıgır serumu, %1 Penisilin- Streptomisin içeren ticari olarak satılan DMEM/F12 50:50 büyüme medyumunda iç ortamı 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren karbondioksit inkübatöründe 75 cm²'lik kültür kaplarında çoğaltılmıştır. Inkübatörde çoğalmaya

birakılan hücrelerin, günlük mikroskopik kontrolü yapılmıştır ve besiyeri ortamı, haftada 2-3 defa olacak şekilde değiştirilmiştir.

Hücre kültür kaplarında çoğalan hücrelerin konfluent (%70-80 yoğunluk) duruma ulaştığında dilüe edilerek yeni bir kültür kabına aktarılması işlemine pasajlama denir. Hücreler 5 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkanıp ve 75 cm²'lik kültür kabına 2-3 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37°C'de 2-4 dakika boyunca inkübe edilmiştir ve hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkması sağlanmıştır. Yüzer halde bulunan hücreler kültür medyumu ile santrifüj tüplerine toplanmıştır. Hücreler oda sıcaklığında 1500 g'de 5 dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp hücre peleti kültür medyumu ile süspanse edilmiştir. Hücre sayımı yapıldıktan sonra istenilen miktarda hücre taze kültür medyumu konulmuş kültür kaplarına ekilmiştir.

3.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Stoklanması

2 ml'lik kriyotüp içerisine 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ve pasaj işleminden sonra yeterli miktarda kültür medyumu ile süspanse edilmiş 1900 µL hücre solüsyonu eklenir. Kültür deneyleri süresince hücre dondurma işleminde stok tüpler bir gece -20°C'de tutulduktan sonra -86°C'ye alındı ve uzun süreli stoklama için -196°C'lik sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.2 AKRİLAMİD VE KURKUMİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI VE HÜCRELERE UYGULANMASI

Akrilamidin TM3 Leydig hücre soyu üzerine uygulanan konsantrasyonları çeşitli hücre soylarında yapılan *in vitro* çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar esas alınarak bir konsantrasyon aralığı oluşturulmuştur. %1'lik at serumu içeren deney medyumu içerisinde 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM, 2000 µM, 5000 µM ve 10000 µM konsantrasyonlarında akrilamid solüsyonları hazırlanmıştır ve hücrelere 6, 12, 24, 48, 72 saat süre ile uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak da %1'lik at serumu içeren kültür medyumu kullanılmıştır.

Kurkuminin uygulanacak konsantrasyonu hücre hatları ile yapılan *in vitro* çalışmalarda ortalama antioksidan konsantrasyonu olarak kullanılan 2,5 µM olarak belirlenmiştir (Dai ve diğ., 2015). DMSO içerisinde çözülen kurkumin stok solüsyonu olarak hazırlanmıştır ve -20 °C derecede saklanmıştır. Hazırlanan akrilamid ve akrilamid+kurkumin solüsyonları 0,2 µm milipor filtre ile steril edilerek, TM3 hücrelerine uygulanmıştır. Yapılan MTT testi sonuçlarında

hücre canlılığını %20'den fazla azaltmayan 4 farklı akrilamid konsantrasyonu seçilmiş ve tablo 3.2.1'de gösterilen şekilde TM3 Leydig hücrelerine uygulanmıştır.

Tablo 3.2.1: Deneyde kullanılan akrilamid ve kurkumin maruziyet grupları.

AKRİLAMİD		AKRİLAMİD + KURKUMİN	
Kontrol	% 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum	Kontrol	2,5 µM Kurkumin + % 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum
1 µM	1 µM Akrilamid + % 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum	1 µM + KUR	2,5 µM Kurkumin + 1 µM Akrilamid + % 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum
10 µM	10 µM Akrilamid + % 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum	10 µM + KUR	2,5 µM Kurkumin + 10 µM Akrilamid + % 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum
100 µM	100 µM Akrilamid + % 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum	100 µM + KUR	2,5 µM Kurkumin + 100 µM Akrilamid + % 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum
1000 µM	1000 µM Akrilamid + % 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum	1000 µM + KUR	2,5 µM Kurkumin + 1000 µM Akrilamid + % 0,05 DMSO içeren % 1 at serumlu medyum

3.3. SİTOTOKSİSİTE

3.3.1. MTT Hücre Canlılık Testi

Sitotoksik etkilerin değerlendirilmesinde kantitatif, kolorimetrik bir yöntem olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid (MTT) testi kullanılmıştır [Cell Proliferation Kit I (MTT) Roche-Germany]. Canlı hücrelerde görülen mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesini ölçmede kullanılan en yaygın testtir. MTT testi, metabolik olarak aktif olan hücrelerin, sarı

renkli bir tetrazolium tuzu olan MTT'yi mor renkli formazan kristallerine indirgeyebilme esasına dayanır. Sadece aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir görülen suda çözünmeyen formazan oluşumu için organik çözücülere (sodyum dodesil sülfat, SDS) ihtiyaç vardır.

MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına %1'lik at serumu kullanılarak kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin kültür kaplarına tutunması için 16-18 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. %1 at serumu içeren medyunda hazırlanmış akrilamidin 12 farklı konsantrasyonu (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM , 1000 μM , 2000 μM , 5000 μM ve 10000 μM) 6, 12, 24, 48 ve 72 saat ayrıca tablo 3.2.1'de verilen akrilamid ve kurkumin konsantrasyonları 24 saat süre uygulanarak 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Maruziyet sürelerinin bitiminde her bir kuyucuğa 10 μl MTT I solüsyonu eklenmiştir ve kültür kapları MTT boyasının formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için 4 saat 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Oluşan formazan kristallerinin çözünbilmesi için her bir kuyucuğa 100 μl MTT II solüsyonu eklenmiş ve 16-18 saat CO₂ inkübatöründe bırakılmıştır.

Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 μl MTT II solüsyonu (SDS) eklenmiş ve bir gece boyunca CO₂ inkübatöründe bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test istatistik hesaplamalar için 3 kez tekrar edilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir.

3.3.2. Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi (LDH) Testi

LDH, sitoplazmada bulunan bir hücre içi enzimdir ve hücre membranı bütünlüğünün bozulmasının bir göstergesidir. LDH aktivitesi bir enzimatik testte belirlenmiştir: İlk adımda LDH piruvatı laktata çevirmektedir ve bu dönüşümle NAD⁺, NADH/H⁺'ya indirgenmektedir. İkinci adımda katalizör madde NADH/H⁺ dan H/H⁺ bir tetrazolyum tuzunun kırmızı renkli formazan ürününe dönüşümünü gerçekleştirir. Ölü veya plazma membranı hasarlı hücre

miktarındaki bir artış, kültür süpernatantındaki LDH enzim aktivitesinde bir artışa neden olur. Süpernatandaki enzim aktivitesi miktarındaki bu artış, sınırlı bir süre zarfında oluşan formazan miktarıyla doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, test sırasında oluşan renk miktarı, hasar görmüş hücrelerin sayısı ile orantılıdır.

LDH testi için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına %1'lik at serumu kullanılarak kuyu başına 10000 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin kültür kaplarına tutunması için 16-18 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Hücreler tablo 3.2.1'de verilen akrilamid ve kurkumin konsantrasyonları ile 24 saat boyunca 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda boya ve enzim solüsyonlarından oluşturulan kit karışımı kuyu başına 100 µl olacak şekilde uygulanmıştır. Karanlıkta 30 dakikalık inkübasyonun ardından oluşan sitotoksisite 492 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Spektrofotometrik analiz sonucu elde edilen absorbans değerleri ile oluşan toksisite yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir.

Sitotoksisite (%):
$$\frac{[\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}]}{[\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol}]} * 100$$

3.4. OKSİDATİF HASAR

Oksidatif hasarı belirlemede kullanılan biyokimyasal analizler için 6 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Kontrol ve deney gruplarında gerçekleştirilen 24 saatlik maruziyet sonunda tripsin-EDTA ile tutundukları yüzeyden kaldırılmıştır ve Tris-HCl tamponuna (pH:7,2) alınmıştır. Daha sonra ultrasonikatör ile sonike edilerek hücrelerin membranlarının parçalanması sağlanmış ve elde edilen hücre süspansiyonu 14000 g'de Nüve marka soğutmalı santrifüjde 4 ° C'de santrifüj edilmiştir. Lipid peroksidasyonunun, enzimatik antioksidan seviyelerinin ve reaktif oksijen türlerinin ölçümü için santrifüj sonrası süpernatant toplanmıştır.

3.4.1. Membran Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Lipit peroksidasyonu, Devasagayam ve Tarachand (1987)'in metodunda olduğu gibi malondialdehit (MDA) oluşumunun ölçülmesiyle test edilmiştir. Bu yöntemin prensibi poliansatüre yağ asidlerinin peroksidasyonu ile oluşan MDA'nın asidik pH'da ve kaynar suda Tiyobarbitirik asit (TBA) ile verdiği reaksiyona dayanmaktadır. 1 ml 0,15 M Tris-HCl

tamponu (pH 7,4) ve 0,3 ml 10 mM KH₂PO₄ içeren reaksiyon karışımına 0,2 ml hücre ekstresi ilave edilmiştir. Tüpler 20 dakika 37 ° C'de çalkalama banyosunda inkübe edilmiştir ve reaksiyon, sırasıyla, 1 ml %10 trikloroasetik asit (TCA) ve 1,5 ml TBA ilave edilerek durdurulmuştur. Daha sonra tüpler 20 dakika kaynar su banyosunda tutulmuştur. Soğutulan tüpler 10 dakika 2000 g'de santrifüj edilip, süpernatantın absorbanansı 532 nm'de köre karşı okundu. Kontrol ve deney gruplarında oluşan lipid peroksidasyonu miktarı spektrofotometreden alınan absorbanans değerlerinin aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanması ile tespit edilmiştir.

$$\text{TBARS (nmol/ml)} = [V_{\text{toplam}} \times A_{\text{örnek}} \times 10^6 \times \text{df}] / [V_{\text{örnek}} \times \epsilon_{\text{mM}} \times \text{LP}]$$

TBARS: Tiyobarbütirik asit reaktif türleri, TBARS için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon_{\text{mM}} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, V_{toplam} : Toplam hacim, $V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi, $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbanansı, df : Sulandırma katsayısı, LP: Işık yolu

3.4.2. Total Protein Ölçümü

Total protein tayini ticari olarak satılan The SMART™ BCA protein assay kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. The SMART™ BCA protein kiti örneklerde bulunan toplam protein miktarının tayini için deterjan uyumlu olarak bikinkoninik asite (BCA) dayanan, kolorimetrik tespit yapılmasına olanak sağlayan bir metottur. Mor renkli reaksiyon ürünü iki BCA molekülünün bir bakır iyonu ile bağlanması sonucunda oluşur. Suda çözünebilir özellikte olan bu kompleks geniş çalışma aralığında (20-2000 µg / ml) örneklerde artan protein konsantrasyonu ile paralel olarak 562 nm'de kuvvetli bir absorbanans özellik gösterir. Protein konsantrasyonları genel olarak sığır serum albümini (BSA) gibi ortak bir proteinin standartlarına referansla belirlenir. Bilinen konsantrasyonda hazırlanan bir dizi dilüsyon protein serisinden bir standart eğri oluşturulur ve örneklerdeki bilinmeyen konsantrasyondaki protein miktarı çizilen eğri referans alınarak hesaplanır.

3.4.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

3.4.3.1. Hidroksil radikali tayini

Hücre ekstresindeki hidroksil radikal (OH[·]) oluşumu Puntarulo ve Cederbaum (1988) metoduna göre ölçülmüştür. OH[·] üretimi, NADPH ve DMSO varlığında formaldehit oluşturulması ve oluşan formaldehitin TCA ile reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır. 1 ml hücre ekstresi, 0,2 ml 1 M fosfat tamponu ve her birinden 0,1 ml olacak şekilde 0,1 M MgCl₂, 10 M sodyum azid, 4 mM DMSO ve 4 mM NADPH ile karıştırılmıştır. 10 dakika boyunca 37 ° C'de inkübasyondan sonra, 0,5 ml kromotropik asit ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur ve daha sonra 30 dakika kaynatılmıştır. Reaksiyon sonunda tüpler soğutulmuştur ve süpernatantın absorbansı 570 nm'de köre karşı okundu. Kontrol ve deney gruplarında oluşan hidroksil radikali miktarı spektrofotometreden alınan absorbans değerlerinin aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanması ile tespit edilmiştir.

$$\text{Dakikada oluşan } \mu\text{mol Hidroksil radikali} = [A_{\text{örnek}} \times df \times V_{\text{toplam}}] / [\epsilon_{\text{mM}} \times LP \times V_{\text{örnek}}]$$

$\epsilon_{\text{mM}} = 6,22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, V_{toplam} : Toplam hacim, $V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi, $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı, df : Sulandırma katsayısı, LP : Işık yolu

3.4.3.2. Hidrojen peroksit radikali tayini

Hidrojen Peroksit (H₂O₂) üretimi, Holland ve Storey (1981) metodu ile ölçülmüştür. Yöntemin prensibi, asitlendirilmiş ferrositokrom c'nin oksidasyonundan kaynaklanan artan sapmaya bağlıdır. 0,1 ml hücre ekstresi 0,1 ml 1,13 M KCl, 0,1 ml 150 mM KH₂PO₄, 0,05 ml 60 mM MgCl₂, 0,05 ml 8 mM EDTA, 0,1 ml 200 mM Tris-HCl (pH 7.4) ve 0,1 ml 1 mM asetillenmiş ferro sitokrom c ile karıştırılmıştır. H₂O₂ seviyesi, spektrofotometrik olarak 550 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Kontrol ve deney gruplarında oluşan hidrojen peroksit miktarı spektrofotometreden alınan absorbans değerlerinin aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanması ile tespit edilmiştir.

$$\mu\text{mol/ml H}_2\text{O}_2 = [A_{\text{örnek}} \times V_{\text{toplam}} \times df] / [\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{örnek}} \times LP]$$

$\epsilon_{\text{mM}} = 19,1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, V_{toplam} : Toplam hacim, $V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi, $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı, df : Sulandırma katsayısı, LP : Işık yolu

3.4.4. Enzimatik Antioksidan Seviyelerinin Belirlenmesi

3.4.4.1. Katalaz tayini

Katalaz (CAT) enzim miktarı Sinha (1972) metodu ile ölçüldü. Katalaz enzimi hücre için çok zararlı olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) su ve moleküler oksijene dönüştürür. Bu yöntem, asetik asit içerisinde dikromatın H_2O_2 varlığında ısıtılarak kromik asetata dönüştürülmesine dayanır. Reaksiyon karışımı, 0,4 ml 0,2 M H_2O_2 ve 0,5 ml sodyum fosfat tamponundan oluşmaktadır; reaksiyon, 0,1 ml hücre ekstresi eklendikten sonra başlar. 2 ml asit çözeltisi (dikromat / asetik asit) ile reaksiyon durdurulmuştur ve bütün tüpler, 10 dakika boyunca ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. İnkübasyon ve soğutma süresinin sonunda oluşan yeşil renk gelişimi 570 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmüştür.

Kontrol ve deney gruplarında katalaz miktarı spektrofotometreden alınan absorbans değerlerinin aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanması ile tespit edilmiştir.

$$\text{Tüketilen } H_2O_2 = [A_{\text{örnek}} \times df \times V_{\text{Toplam}}] / [\epsilon_{mM} \times LP \times V_{\text{örnek}}]$$

H_2O_2 için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon_{mM} = 1.88 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$, V_{toplam} : Toplam hacim, $V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi, $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı, df: Sulandırma katsayısı, LP: Işık yolu

3.4.4.2. Glutasyon peroksidaz tayini

Glutasyon Peroksidaz (GPx), Hafeman ve arkadaşlarının metodu ile tayin edilmiştir. Glutasyon peroksidaz, indirgenmiş glutasyon ve okside olmuş glutasyon ve su varlığında hidrojen peroksitin ayrışmasını katalize eder. Reaksiyon karışımı 0,5 ml sodyum fosfat tamponu (0,4 M), 0,25 ml sodyum azit (10 mM), 0,5 ml redükte glutasyon (4 mM), 0,6 ml saf su ve 0,15 ml hücre ekstresi içermektedir. Tüpler, 37 ° C'de 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir, inkübasyonun tamamlanmasından sonra, 0,5 ml H_2O_2 (1,25 mM) ilave edilmiştir ve 37 ° C'de 3 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon, 1 ml %10 TCA ilavesiyle durdurulmuştur. Kalan glutasyonu belirlemek için, süpernatant santrifüj işleminden sonra uzaklaştırılmış ve 4 ml disodyum hidrojen fosfat (0,3 M) çözeltisi ve 1 ml ditiyo-bis-nitrobenzoik asit (DTNB) reaktifi eklenmiştir. Test çözeltisinin ve standardın son absorbansı, 412 nm'de sadece fosfat çözeltisi ve DTNB reaktifi içeren köre karşı okunmuştur.

Kontrol ve deney gruplarında glutasyon peroksidaz miktarı spektrofotometreden alınan absorbans değerlerinin aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanması ile tespit edilmiştir.

$$\text{Tüketilen Glutasyon} = [A_{\text{örnek}} \times df \times V_{\text{Toplam}}] / [\epsilon_{\text{mM}} \times LP \times V_{\text{örnek}}]$$

DTNB için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon_{\text{mM}} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, V_{toplam} : Toplam hacim, $V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi, $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı, df : Sulandırma katsayısı, LP : Işık yolu

3.4.4.3. Süperoksit dismutaz tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) miktarı, Marklund ve Marklund'un (1974) methoduna göre test edilmiştir. Deney prensibi SOD enzimi tarafından pirogallolün otooksidasyonunun inhibie edilmesi esasına dayanır. Reaksiyon karışımı, 0,05 ml hücre ekstresi, 1,4 ml Tris-HCl tamponu (pH 8,2) ve 0,05 ml 2 mM pirogallolden oluşmaktadır. Reaksiyon pirogallol eklendikten sonra başlamaktadır ve SOD varlığında absorbastaki artış inhibe olmaktadır. Absorbanstaki değişiklikler, spektrofotometrik olarak 30 sn aralıklarla 3 dakika boyunca kör kuyuya karşı 420 nm'de ölçülmüştür.

Kontrol ve deney gruplarında SOD miktarı spektrofotometreden alınan absorbans değerlerinin aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanması ile tespit edilmiştir.

$$\text{Körün absorbans değişimi } \Delta A = [A_{\text{son}} - A_{\text{ilk}}] / [T_{\text{son}} - T_{\text{ilk}}]$$

$$\text{Örneğin absorbans değişimi } \Delta B = [B_{\text{son}} - B_{\text{ilk}}] / [T_{\text{son}} - T_{\text{ilk}}]$$

$$\text{SOD'un \%50 inhibisyon miktarı} = [(\Delta A - \Delta B) \times 100] / [\Delta A \times 50]$$

3.5 APOPTOZ / NEKROZ

3.5.1. Propidium / İyodür Hoechst Yöntemi

Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerini incelemek için Hoechst33342 ve Propidium İyodür (PI) çift floresan boyaması yapılmıştır. Bir çeşit mavi-floresan boya olan Hoechst 33342, apoptotik hücrelerde yoğunlaşmış kromatini boyamaktadır, PI ise kırmızı-floresan bir boyadır ve nekrotik hücrelerin zayıflamış hücre zarından içeri nüfuz eder. 24 kuyulu hücre kültür kaplarına kuyu başına 1×10^4 hücre olacak

şekilde ekim yapılmıştır. Maruziyet süresi tamamlandığında deney medyumları çekilip atılmıştır ve hücreler 1M PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. 20 µl PI (1mg/ml), 20 µl Ho342 (1mg/ml) ve 3960 µl PBS' ten oluşan reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Kuyu başına 0,2 ml reaksiyon karışımı eklenerek 37°C'de 15-30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler PBS ile yıkanarak floresan mikroskop altında inceleme yapılmıştır. Hücreler Olympus IX71 floresan ataçmanlı mikroskopta uygun filtre ile incelenerek Olympus DP72 video kamerada eşit aralıklarla seri olarak fotoğraflanmıştır.

Kontrol ve deney gruplarındaki canlı, erken apoptotik, apoptotik ve nekrotik hücre sayılarının hesaplaması için her grup için 3 bağımsız deneyde toplam 12 farklı kuyuda 10-15 alan fotoğraflanarak 1000 hücre incelenmiştir. Her grup için apoptotik/nekrotik hücrelerin tüm hücrelere oranı hesaplanarak yüzde değerleri bulunmuştur.

3.6. WESTERN BLOT

"Blot" terimi, biyolojik numunelerin bir jelden bir membrana transferini ve daha sonra membran yüzeyinde tespit edilmelerini ifade etmektedir. Bir antikorun antijenini spesifik olarak saptamak için kullanılan immün blotlama yöntemi olarak da bilinen Western Blot tekniği Towbin ve ark. (1979) tarafından geliştirilmiştir ve günümüzde protein analizleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Antikor-antijen etkileşiminin özgülüğü, karmaşık bir protein karışımının ortasında hedef bir proteinin tanımlanmasını sağlar. Western blot yöntemi ilgili protein hakkında nitel ve yarı nicel veriler üretebilir.

Western blot tekniğinde örnekler hazırlandıktan sonra ilk adım, jel elektroforezi kullanarak örneklerdeki makromoleküllerin ayrılmasıdır. Daha sonra, ayrılan moleküller, genellikle nitroselüloz veya poliviniliden diflorür (PVDF) membranlar üzerine transfer edilir. Daha sonra, antikorların membran yüzeyine spesifik olmayan herhangi bir şekilde bağlanmasını önlemek için membran bloke edilir. Transfer edilen protein daha sonra bir antikor kombinasyonu ile işaretlenir: hedef proteine özgü bir antikor (primer antikor) ve primer antikorun konak türüne spesifik başka bir antikor (sekonder antikor). Dolaylı tespit yöntemi olarak kabul edilen teknikte işaretlenmemiş bir primer antikor ilk önce antijene bağlanır. Sonrasında, birincil antikor, bir enzim (horseradish peroksidaz (HRP) gibi) veya florofor konjuge sekonder antikor kullanılarak tespit edilir. Antikora konjuge enzim ile reaksiyonun bir yan ürünü olarak ışık üreten bir

kemilüminesan substrat kullanılarak membran görüntülenir ve sonuçlar analiz edilir. Western blot tekniğini oluşturan temel basamaklar şekil 3.6.1’de verilmiştir.



Şekil 3.6.1: Western blot basamakları.

Western blot tekniğinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri tablo 3.6.1’de verilmiştir.

Tablo 3.6.1: Western blot tekniğinde kullanılan tampon ve çözeltiler

Tampon /Çözelti	İçerik ve Hazırlanışı
Lizis Tamponu	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na ₂ EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF ve proteaz inhibitör tablet saf su içerisinde hazırlandı.
%10 SDS	10 g SDS, 100 ml’lik beherde saf su ile çözülüp, 100 ml’ye tamamlandı.
Yürütme / Transfer Tamponu	(1 L, 10X) 0,25 M 30 g Tris-baz, 144 g glisin 600 ml saf suda çözülüp, pH=7,4’e ayarlandı. Çözelti saf su ile 1 litreye tamamlandı.
Yürütme Tamponu	(1L, 1X) 100 ml stok 10X yürütme transfer tamponu üzerine 900 ml saf su eklendi. Bu karışımın içine 1ml %10’luk SDS eklenerek 1X yürütme tamponu hazırlandı.
Transfer Tamponu	(1L) 200 ml Metanol, 100 ml stok 10X yürütme transfer tamponu ve 700 ml saf su ile 1 litre transfer tamponu hazırlandı
TBS (Tris Buffer Saline)	(1L, 10X) 0,2 M Tris-Baz (24,2 g) ve 80 g sodyum klorür (NaCl) 600 ml saf suda çözülüp, pH=7,4’e ayarlandı. Çözelti saf su ile 1 litreye tamamlandı.
TBST	(1L, 1X) Hazırlanan TBS stoğundan 100 ml alınarak, 900 ml su ile 1 litreye tamamlandı. Daha sonra 1ml TWEN-20 eklenerek hazırlandı.
Laemmlı Yürütme tamponu	1,5 M Tris-Baz (3,64 g) 15 ml saf suda çözülerek pH=6,8’e ayarlandı. Çözeltiye saf su eklenerek hacim 20 ml’ye tamamlandı.
4X Laemmlı tamponu	1,5 ml’lik eppendorf tüpüne 167 µl 1,5 M tris çözeltisi (pH 6.8), 23 µl saf su, 400 µl gliserol, 200 µl %40’lık SDS, 200 µl β-merkaptotanol, 10 µl %0,1’lik brom fenol mavisini eklenerek hazırlandı
Süt tozu	(%5, 100ml) (Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad Blotting-Grade Blocker 170-6404) 100 ml TBST çözeltisi içinde 5 g süt tozu çözülerek hazırlandı.
Stripping (Sıyırma) Tamponu	20 ml % 10 SDS, 12,5 ml 0,5 M Tris HCl (pH 6.8) çözeltisi, 67,5 ml ultra saf su, 0,8 ml 2-mercaptopethanol karıştırılarak hazırlandı.

Altı kuyulu hücre kültür kaplarına kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve kontrol ve deney gruplarında maruziyet gerçekleştirilmiştir. Deney süresi tamamlandığında, hücreler soğuk PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra, hücre ekstraktları lizis tamponunda protein inhibitör tablet kullanılarak hazırlanmıştır. Hücreler kültür kaplarından santrifüj tüplerine aktararak, hızlıca kısa süreli bir sonikasyon işleminden geçirilerek, 10 dakika boyunca $14.000 \times g$ ’de soğutmalı santrifüjde santrifüj edilir. Protein miktarı, ticari bir protein analiz kiti olan BCA (iNtRON Biyoteknoloji, Kyungki-Do, Kore) testi kullanılarak ölçülmüştür. Üç hacim protein lizatı, %1 β-merkaptotanol (Biomatik) içeren bir hacimdeki Laemmlı tamponunda

(Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) seyreltilmiştir ve karışım 5 dakika boyunca 95 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Proteinlerin jelde yürütülmesi için BioRad marka Mini-PROTEAN® TGX™ Precast jeller kullanılmıştır. Kuyu hacmi 30 µl olan ve 10 kuyudan oluşan jellere protein örnekleri yüklenmiştir. İndirgenmiş protein lizatları, %10 SDS poliakrilamid jeller üzerinde önce 80 voltta (400mA) 10 dakika yürütüldükten sonra 120 voltta 2 saat dikey elektroforezde ayrıştırılmıştır ve elektro-blotlama ile polivinil diflorür membranlara (Trans-Blot Turbo Transfer Paketi, Bio-Rad) aktarılmıştır. Membranlar, tris-tamponlu salin (TBST) (Santa Cruz, Heidelberg, Almanya) içinde %0,5 Tween 20 içinde %5 yağsız süt tozu (Blotting sınıfı engelleyici, Bio-Rad) ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloke edilmiştir. Bir gece boyunca çalkalayıcıda 4 ° C'de primer antikoları ile birlikte inkübe edilmiştir. Membranlar, 5 dakikalık aralıklarla beş kez TBST ile yıkanıp, daha sonra bir HRP konjuge sekonder antikorla oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. 5 dakika aralıklarla beş kez TBST ile yıkandıktan sonra proteinler, geliştirilmiş kemilüminesans (Clarity Western ECL Substrat, Bio-Rad) ile tespit edilmiştir ve hedef bantlar, bir ChemiDoc Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad) kullanılarak görselleştirilmiştir. Her bir hedef bant, Image Lab 5.2.1 yazılımı kullanılarak ölçülmüştür ve her bir bandın yoğunluğu, iç referans β-aktin veya ERK1 / 2, JNK, p38'e göre normalize edilmiştir. Kullanılan birincil ve ikincil antikolar ve sulandırma katsayıları tablo 3.6.2'de verilmiştir. Kullanılan tüm birinci ve ikinci antikolar SantaCruz Biotechnology'den temin edilmiştir.

Tablo 3.6.2: Western blot yönteminde kullanılan antikolar ve sulandırma katsayıları.

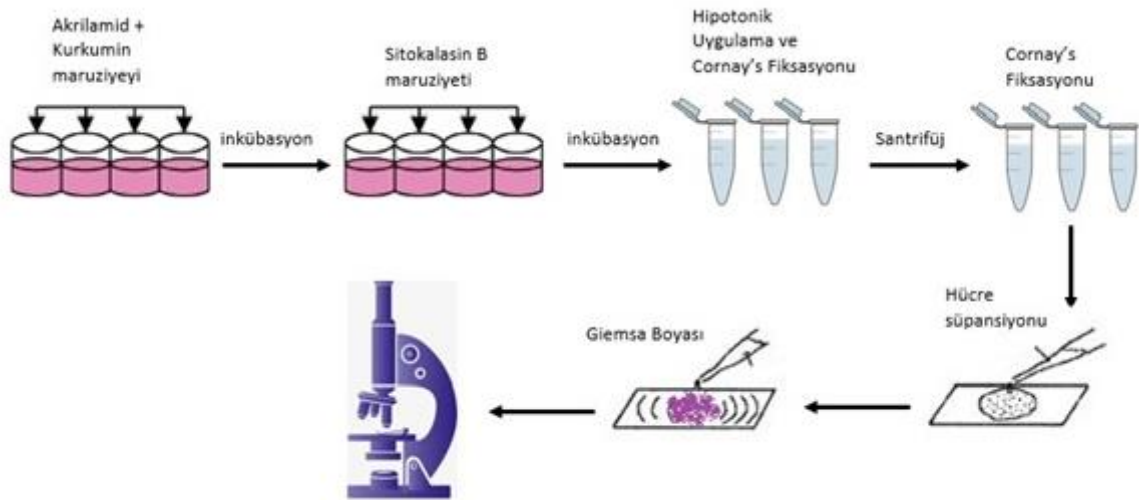
Kullanılan antikolar	Sulandırma katsayıları
Fare monoklonal JNK primer antikoru	1:500
Fare monoklonal pJNK primer antikoru	1:500
Fare monoklonal p38 primer antikoru	1:500
Fare monoklonal pp38 primer antikoru	1:500
Fare monoklonal ERK primer antikoru	1:500
Fare monoklonal pERK primer antikoru	1:500
Tavşan poliklonal β-Aktin primer antikoru	1:1000
Fare IgG kappa binding protein (m-IgGκ BP) Sekonder HRP konjugat	1:1000

3.7.MİKROKNÜKLEUS TESTİ

Mikronükleus testi için Fenech (2007)'nin sitoklasin B ile bloke edilmiş mikronükleus protokolü laboratuvar koşullarımıza uyacak şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır. Mikronükleus testi uygulamasında kullanılan tampon ve çözeltiler tablo 3.7.1'de verilmiştir.

Tablo 3.7.1: Mikronükleus testi uygulamasında kullanılan tampon ve çözeltiler

Tampon / Çözelti	İçerik ve Hazırlanışı
Sitokalsin-B çözeltisi	DMSO içerisinde hazırlanan 2 M'lık Sitokalsin B çözeltisinden 4 µg/ml'lik dilüsyonlar kültür medyumunda hazırlanmıştır.
Hipotonik çözelti	0,075 M KCl çözeltisi ultra saf suda hazırlanmıştır.
Cornay fiksatif	3/1 oranında metanol/glasiyel asetik asit deneyden önce taze olarak hazırlanmıştır.
Sorensen tamponu	Tampon A: 0,06 M Na ₂ HPO ₄ Tampon B: 0,06 M KH ₂ PO ₄ 51ml tampon A + 49ml tampon B karıştırılarak pH: 6,8 tampon elde edilmiştir.
Giemsa çözeltisi	%4 'lük giemsa çözeltisi sorensen tamponu içerisinde hazırlanmıştır.



Şekil 3.7.1: Mikronükleus testi aşamalarının şematik gösterimi.

- 1) TM3 Leydig hücreleri kontrol ve deney gruplarını oluşturmak üzere 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir, ayrıca pozitif kontrol olarak $150 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ uygulanmıştır.
- 2) 24 saat maruziyet bitiminde medyumlar çekilip atılmıştır ve Sitokalsin B uygulaması gerçekleştirilmiştir.
- 3) 37°C 'de 20 saat inkübasyonun ardından hücreler santrifüj işleminden geçirilmiştir.
- 4) Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet hipotonik solüsyon ile 5 dk inkü edilmektedir.
- 5) Hücre süspansiyonları üzerine Cornay fiksatif eklenip, santrifüj işleminden geçirilmiştir.
- 6) Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet üzerine Cornay fiksatif uygulanarak hücre süspansiyonları santrifüj işleminden geçirilmiştir.
- 7) Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet üzerine Cornay fiksatif uygulanmıştır ve hazırlanan hücre süspansiyonları önceden temizlenmiş lam üzerine yayılmıştır.
- 8) Hazırlanan preparatlar giemsa çözeltisi ile boyanmıştır ve açık havada kurumaları sağlanmıştır.
- 9) Preparatlar mikroskop altında incelenmiştir ve her grup için 1000 binükleuslu hücrede görülen mikronükleus sayısı tespit edilmiştir. Deney 3 kere tekrarlanmıştır.
- 10) Ayrıca sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan nükleer bölünme indeksinin hesaplanabilmesi için 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin bulunma sıklığı her preparattan 500 hücre sayılarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Eastmond ve Tucker, 1989).

$$\text{NDI} = \frac{M1 + M2 + M3 + M4}{N}$$

NDI: nükleer bölünme indeksi, M1: 1 nükleuslu hücre, M2: 2 nükleuslu hücre, M3: 3 nükleuslu hücre, M4: 4 nükleuslu hücre, N: toplam hücre sayısı.

Mikronükleus skorlaması yapılırken uyulan kriterler aşağıda sıralanmıştır:

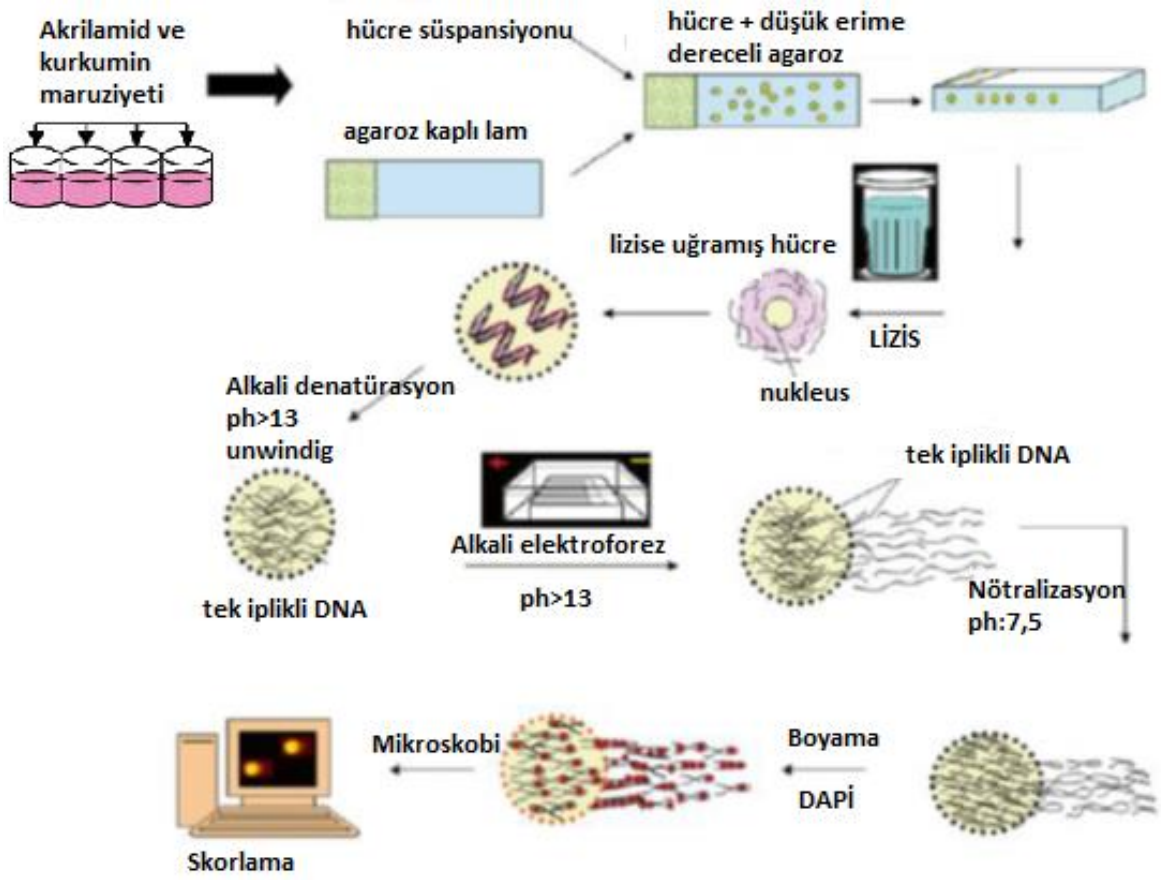
- Skorlamaya dahil edilen hücreler 2 nükleuslu olmalıdır, belirgin bir sitoplazmada oval veya yuvarlak iki nükleus seçilmelidir.
- Mikronükleus çapı ana nükleusun 1/3'ünden küçük olmalıdır.
- Mikrokukleus ana nükleustan tamamen bağımsız olmalıdır.
- Mikronükleusların boya alma yoğunluğu ana nükleuslar ile eşit olmalıdır.

3.8. KOMET TESTİ (TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ)

Komet testi için preparatların hazırlanması, kullanılan çözeltiler ve deney prosedürü olarak Singh ve arkadaşları (1988) ile Tice ve arkadaşlarının (2000) kullandıkları metotlar laboratuvar koşullarımıza uyacak şekilde modifiye edilerek uygulanmıştır. Komet testi uygulamasında kullanılan tampon ve çözeltiler tablo 3.8.1'de ve komet testi aşamalarının şematik gösterimi şekil 3.8.1'de verilmiştir.

Tablo 3.8.1: Komet testi uygulamasında kullanılan tampon ve çözeltiler.

Tampon / Çözelti	İçerik ve Hazırlanışı
Normal erime noktalı agaroz (NMPA) çözeltisi	750 mg NMPA tartılıp üzerine 50 ml distile H ₂ O eklendi ısıtılarak çözüldü ve %1,5 NMPA çözeltisi elde edildi.
Düşük erime noktalı agaroz (LMPA) çözeltisi	50 mg LMPA tartılıp üzerine 10 ml PBS eklendi ısıtılarak çözüldü ve %0,5 LMPA çözeltisi elde edildi.
Lizis solüsyonu	Lizis solüsyonu 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA ve 10 mM Trizma base'den oluşmaktadır (pH: 10), kullanmadan önce %10 DMSO eklendi.
Elektroforez tamponu	Elektroforez tamponu 300 mM NaOH ve 1 mM Trizma Base'den oluşmaktadır (pH>13)
Nötralizasyon solüsyonu	Nötralizasyon solüsyonu 0,4 M Tris base den oluşmaktadır (pH: 10)
Boyama solüsyonu	DAPI



Şekil 3.8.1: Komet testi aşamalarının şematik gösterimi (Gharsalli, 2016).

- 1) TM3 Leydig hücreleri kontrol ve deney gruplarını oluşturmak üzere 24 kuyulu hücre kültür kaplarına 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir, ayrıca pozitif kontrol olarak $150 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ uygulanmıştır.
- 2) Deney süresi tamamlandığında hücreler toplanıp ve 5 dk süre ile 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 3) Son hacimde 1×10^4 hücre olacak şekilde pellette bulunan hücreler PBS ile sulandırılmıştır.
- 4) PBS içerisinde süspansiyon halde bulunan hücreler 1:6 oranında %0,05'lik LMPA (37°C) ile karıştırılıp pipetaj yapılarak homojen bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir.
- 5) Deney gününden önce %1,5'luk NMPA ile kaplanmış lamalar hazırlanmıştır.

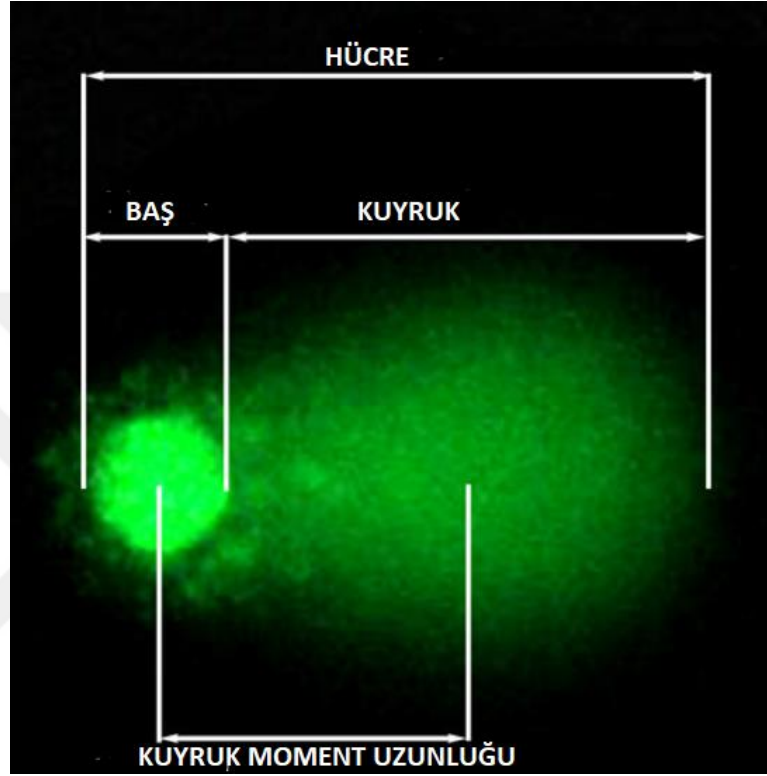
- 6) Elde edilen hücre süspansiyonundan 30 µl alınıp önceden agar ile kaplanmış lamalar üzerine yayılmıştır ve lamel ile kapama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 7) Hazırlanan preparatlar +4°C'de 45 dk süre ile bekletilmiş ve süre sonunda lameller dikkatlice çekilip atılmıştır.
- 8) Lamlar taze olarak hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak 1 saat süreyle +4°C'de şale içerisinde bekletilmiştir.
- 9) Lizis gerçekleştirildikten sonra elektroforez basamağından önce DNA'nın çift sarmal yapısının açılması (DNA unwinding) için lamalar alkali (pH>13) elektroforez tamponunda 20 dk süre ile inkübe edilmiştir.
- 10) DNA unwinding basamağı gerçekleştirildikten sonra lamalar elektroforez tankına dizilmiştir ve 300 mA, 25 V'ta 30 dk süre ile elektroforez uygulanmıştır.
- 11) Elektroforez uygulamasından sonra saf su ile yıkanan lamalar 5 dk'lık periyotlarla üç kez nötralizasyon solüsyonu ile muamele edilmiştir.
- 12) Nötralizasyonun ardından saf su ile yıkanan lamalar DAPI ile 5 dk boyanmıştır.
- 13) Boyama sonrasında yıkanan lamalar kurutulmuştur ve her lam floresan mikroskop altında rastgele alanlardan fotoğraflanmıştır.
- 14) Komet testi verilerinin değerlendirilmesi için elde edilen fotoğraflardan her lamdan 100'er hücre Cometscore 2. Programı üzerinde incelenmiştir. Program içerisinde komet kuyruk uzunluğu, kuyruk %DNA içeriği ve Olive kuyruk momenti parametreleri hesaplatılmıştır. Deney 3 kez tekrarlanmıştır.

Komet kuyruk uzunluğu: Hücre nükleusunun baş bölgesinden dışarı doğru gerçekleşen DNA migrasyonunun uzunluğu.

Komet %DNA içeriği: Kuyrukta bulunan DNA'nın hücrede bulunan toplam DNA'ya olan yüzdesi

Olive Kuyruk momenti: Komet kuyruk uzunluğunun DNA hasarını tam olarak ifade etmediğini ileri süren Olive ve diğ. (1990) yaptıkları çalışmalar sonucunda DNA göçünün bir noktaya

kadar sürdüğünü rapor etmişlerdir. Bununla birlikte migrasyon uzunluğunun bir noktada durmasının yanısıra migrasyona uğrayan DNA yüzdesinin arttığını belirtmişlerdir. Bunun üzerine Olive kuyruk momenti parametresini geliştirip aşağıdaki denklem ile formüle etmişlerdir. Olive Kuyruk momenti = Kuyruk uzunluğu x Kuyruktaki DNA yüzdesi.



Şekil 3.8.2: Floresan boya ile işaretlenmiş komette baş, kuyruk ve kuyruk moment uzunluğunun ifade ettiği bölgeler.

3.9. İMMUNFLORESAN BOYAMA

Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinin hücre iskeleti ve hücre iletişim bağlantıları üzerindeki etkileri direkt immunfloresan boyama yöntemi ile tayin edilmiştir. Direkt immunfloresan boyamanın aşamaları fiksasyon – permeabilizasyon – bloklama – antikor ile inkübasyon – nükleus boyası – mounting (floresan solmasını engelleyici solüsyon ile kapama) şeklinde sıralanmaktadır. Immunfloresan boyama prosedüründe kullanılan çözeltiler, antikorlar ve boyalar tablo 3.9.1’de verilmiştir.

Tablo 3.9.1: Immünfloresan boyama tekniğinde kullanılan tampon ve çözeltiler.

Tampon / Çözelti		İçerik ve Hazırlanışı
Paraformaldehit fiksatifi		%4'lük paraformaldehit fiksatifi PBS içerisinde pH: 7.2 olacak şekilde hazırlanmıştır.
Permeabilizasyon çözeltisi		%0,2'lik TritonX-100 PBS içerisinde hazırlanmıştır.
Bloklama tamponu		%1 'lik sığır serum albümin (BSA) PBS içerisinde hazırlanmıştır.
Antikorlar	Fare monoklonal konneksin 43 antikor (floresan izosiyanat, FITC) Fare monoklonal α tubulin antikor (FITC)	Antikorlar %1 BSA çözeltisinde 1:100 sulandırılarak kullanılmıştır.
Falloidin tetrametil rodamin B izosiyanat (Phalloidin- TRITC)		1,5 metanolde çözülerek 200 ünit/ml stok oluşturulmuştur, he kuyu için 1 ünit olacak şekilde %1 BSA çözeltisinde sulandırılarak kullanılmıştır.
Floresan solmasını engelleyici DAPI boyalı solüsyon		Ticari olarak kullanıma hazır halde satılan solüsyon lam üzerine damlatılarak kullanılmıştır (Thermo Fisher Scientific).

- 1) TM3 Leydig hücreleri kontrol ve deney gruplarını oluşturmak üzere 12 kuyulu hücre kültür kaplarında steril yuvarlak lam üzerine 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir.
- 2) Maruziyet süresinin bitiminde PBS ile yıkanan hücreler %4 paraformaldehit çözeltisi ile fikse edilmiştir.
- 3) Fiksasyon sonrasında tekrar PBS ile yıkanan hücrelere permeabilizasyon basamağı için %0,2'lik TritonX-100 uygulanmıştır.
- 4) Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra bloklama tamponu ile 30 dk süre ile inkübe edilmiştir.

- 5) Bloklama gerçekleştikten sonra PBS ile yıkanan hücreler FITC konjugeliprimer antikorlar ve TRITC konjugeli falloidin boyalari ile 90dk süre ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 6) Antikor inkübasyonundan sonra PBS ile yıkanan hücreler floresan solmasını engelleyici DAPI boyalı solüsyon damlatılmış lamalar üzerine kapatılmıştır.
- 7) Floresan mikroskop altında antikor ve boyalara uygun filtreler altında seri fotoğraf çekimi gerçekleştirildi.
- 8) Aynı preparat alanına ait uygun filtreler altında fotoğraflanan aktin, tubulin, konneksin 43 proteinleri ve DAPI ile işaretlenmiş nükleus fotoğrafları Photoshop programı kullanılarak st üste gelecek şekilde birleştirilmiştir.

3.10. İSTATİSTİK ANALİZ

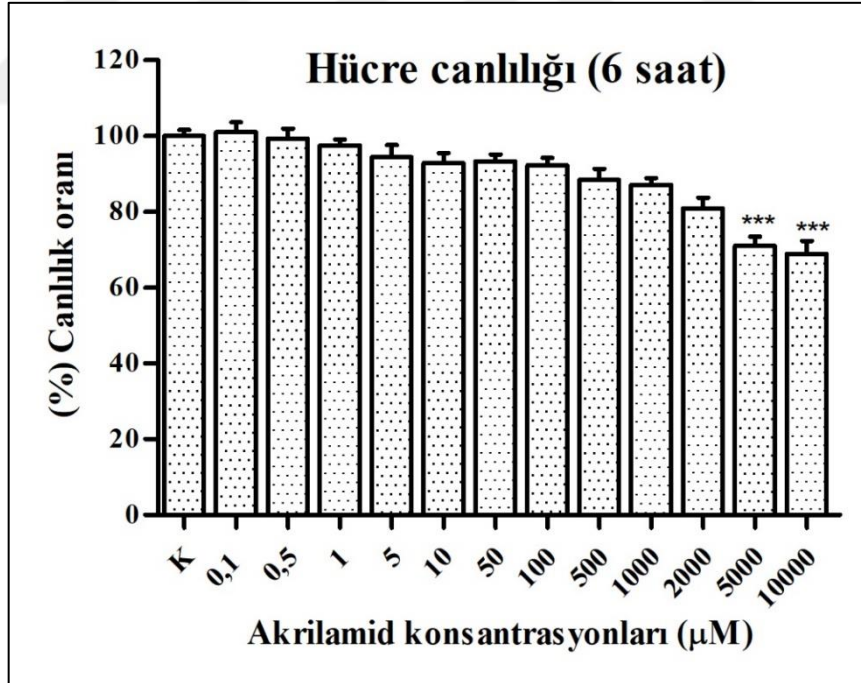
Bu tez çalışmasında kontrol ve deney gruplarından elde edilen verilerin istatistik değerlendirilmesinde Graphpad Prism 5.0 programı kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında One-Way ANOVA testi, gruplar arasındaki karşılaştırmalarda Tukey's testi uygulanmıştır. Analiz sonuçları değerlendirilirken $p < 0,05$, $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

4. BULGULAR

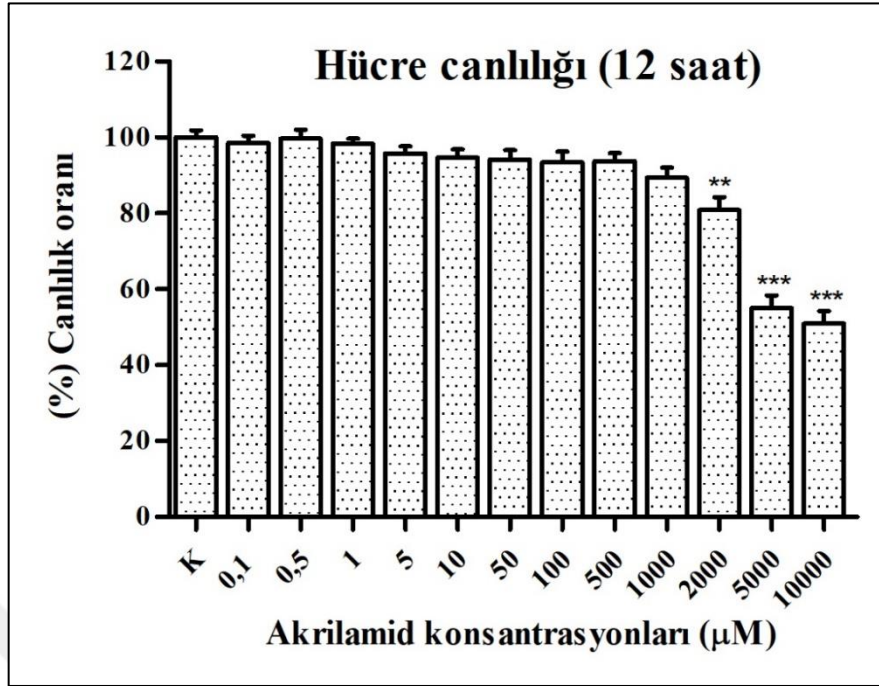
4.1. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI

4.1.1. MTT Bulguları

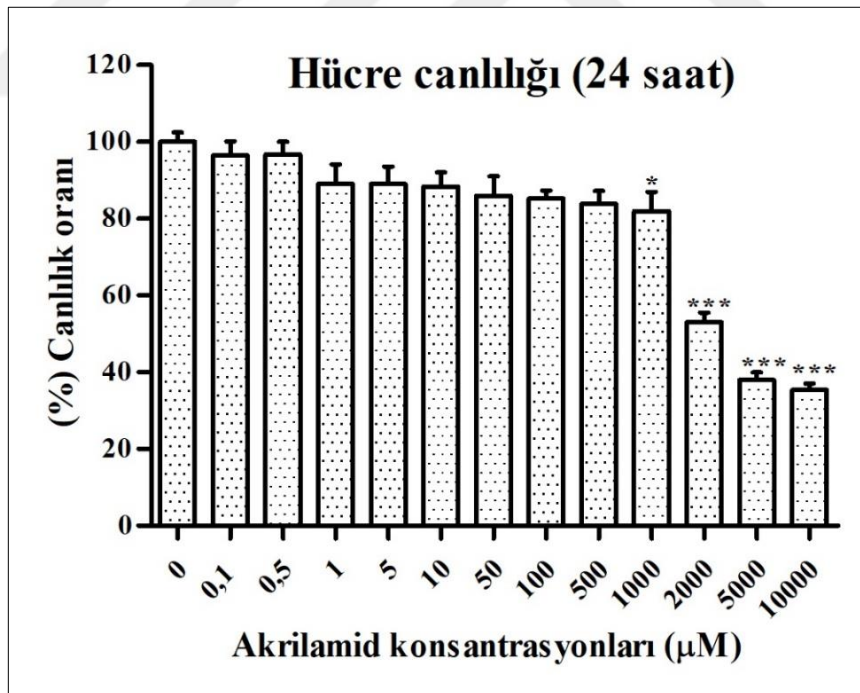
TM3 Leydig hücrelerinde akrilamidin 0,1 μM ile 10000 μM aralığındaki on iki farklı konsantrasyonunun 6, 12, 24, 48 ve 72 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Akrilamidin 6 saatlik maruziyeti sonunda 5000 μM konsantrasyonundan itibaren kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülürken (Şekil 4.1.1.1); 12 saatlik maruziyette 2000 μM (Şekil 4.1.1.2), 24 saatlik maruziyette ise 1000 μM (Şekil 4.1.1.3) konsantrasyonundan itibaren anlamlı azalma görüldü. Akrilamidin 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda MTT testi sonuçları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 0,5 μM konsantrasyonundan sonra anlamlı azalmalar gözlemlendi (Şekil 4.1.1.4 ve Şekil 4.1.1.5).



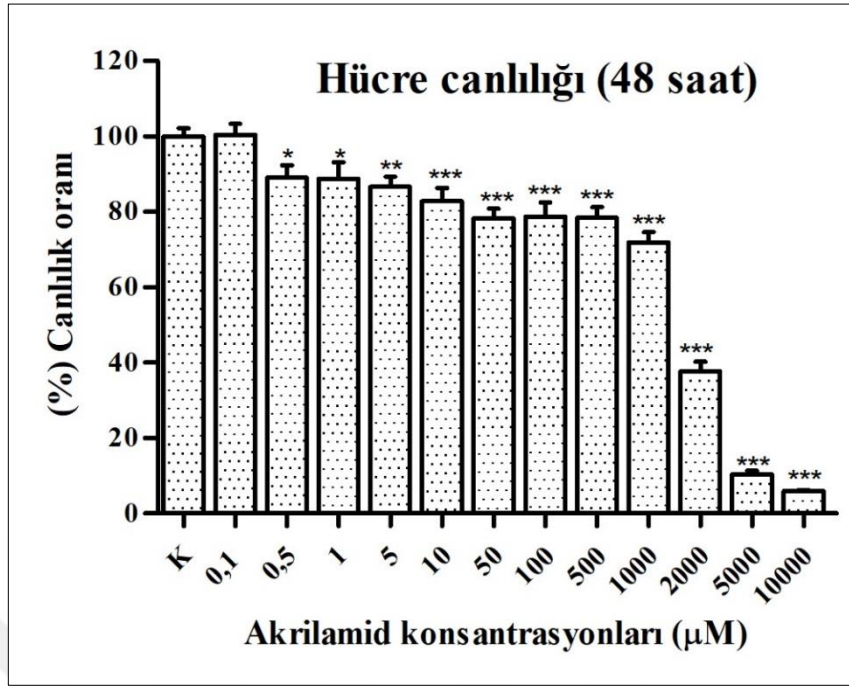
Şekil 4.1.1.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 6 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (***) $p < 0,001$).



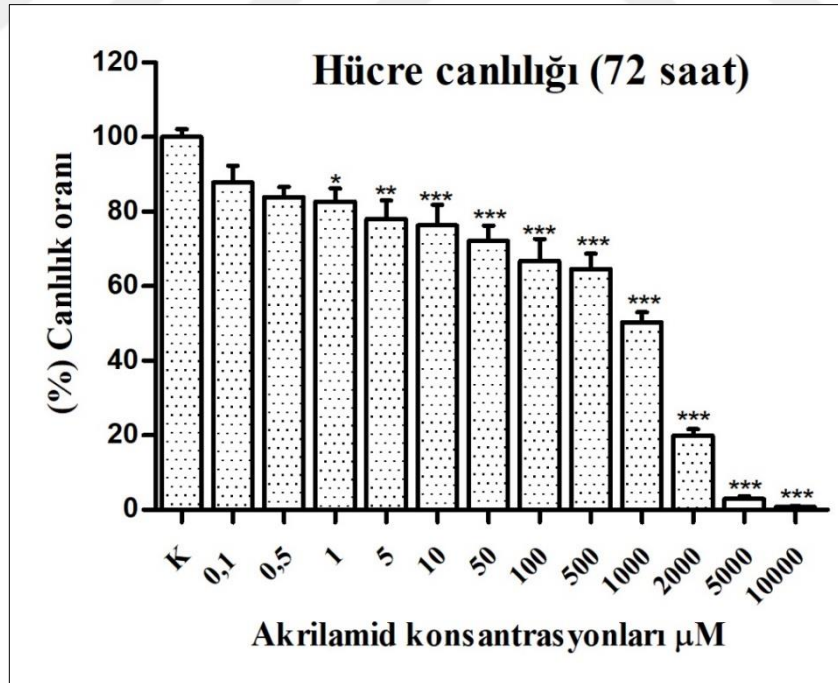
Şekil 4.1.1.2: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 12 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Şekil 4.1.1.3: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).



Şekil 4.1.1.4: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 48 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Şekil 4.1.1.5: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 72 saat maruziyet sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

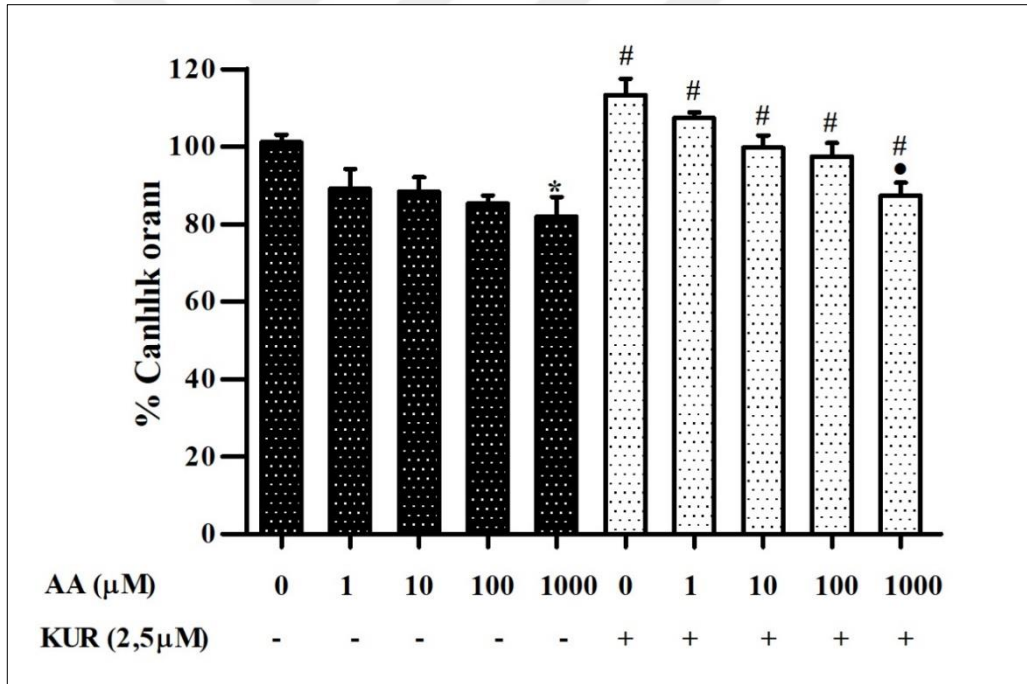
Yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) bir maddenin belirli bir biyolojik veya biyokimyasal fonksiyonu inhibe edici etkisinin bir ölçüsüdür, başka bir ifade ile biyolojik bir süreci yarıya indirmek için o maddeye ne kadar ihtiyaç olduğunu gösterir. Akrilamidin on iki farklı konsantrasyonuna 6, 12, 24, 48 ve 72 saat süre ile maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinin her uygulama saati için IC_{50} değerleri MTT testi sonuçları kullanılarak GraphPad Prism programı ile hesaplandı (Tablo 4.1.1.1).

Tablo 4.1.1.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde zamana bağlı IC_{50} değerleri.

Akrilamid maruziyet süresi	IC_{50} değeri
6 saat	102800 μ M
12 saat	9214 μ M
24 saat	3541 μ M
48 saat	1213 μ M
72 saat	289 μ M

Bu tez çalışmasının daha sonraki araştırma parametrelerinde kullanılan dört farklı akrilamid konsantrasyonu da (1, 10, 100 ve 1000 μ M) hücre canlılığı maksimum %80 seviyesine düşürmektedir.

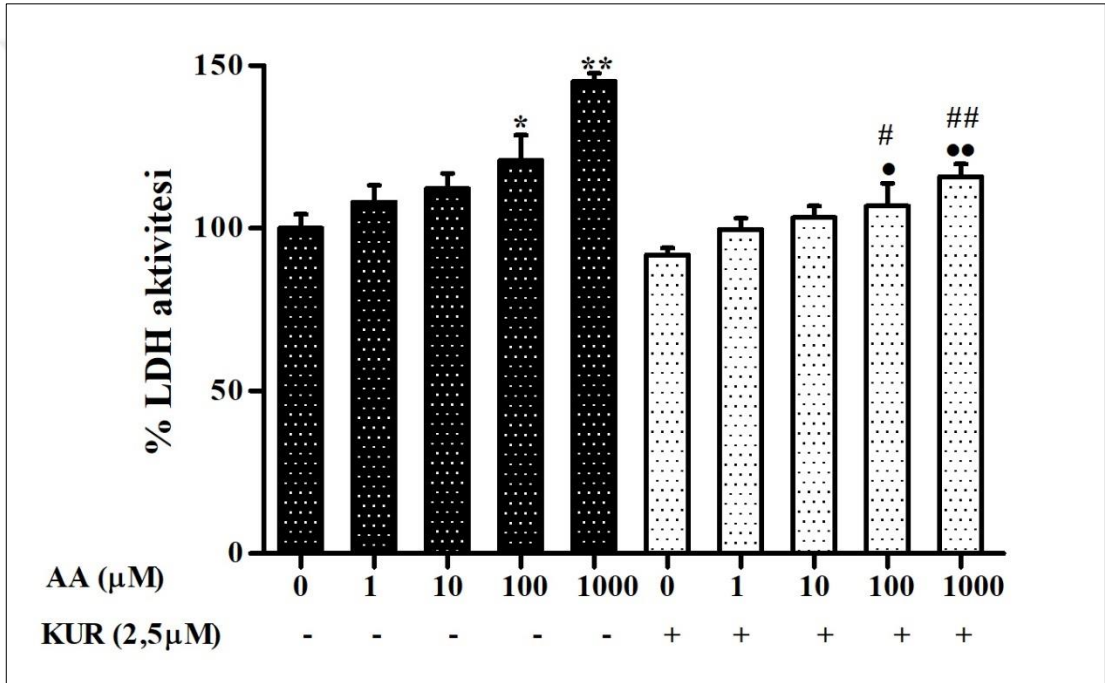
TM3 Leydig hücrelerine 24 saat süre ile uygulanan akrilamidin dört farklı konsantrasyonunun tek başına ve kurkumin ile birlikte hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Şekil 4.1.1.6'da tek başına farklı akrilamid konsantrasyonları ile birlikte 2,5 μ M kurkumine maruz kalan hücrelerin MTT sonuçları kontrol grubuna göre % canlılık oranı olarak verilmiştir. 1, 10, 100 ve 1000 μ M akrilamid varlığında, hücre canlılığı, sırasıyla, kontrole göre %89; 88,3; 85,2 ve 81,9'a düşmüştür. Tek başına akrilamid uygulanan gruplarda hücre canlılığında yalnızca 1000 μ M konsantrasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$). Akrilamid ve kurkuminin birlikte uygulandığı gruplar yalnızca kurkumin uygulanan grup ile karşılaştırıldığında 1000 μ M akrilamid+kurkumin grubunda anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p<0,05$). Bunlarla birlikte, kurkuminin hücre canlılığı üzerindeki iyileştirici etkisi akrilamid ile birlikte uygulandığı tüm gruplarda görülmüştür ($p<0,05$).



Şekil 4.1.1.6: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde % canlılık üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre. (* $p<0,05$, # $<0,05$, • $<0,05$).

4.1.2. LDH Bulguları

TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat maruziyet sonunda kontrol ve deney gruplarında oluşan sitotoksite spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçülen % LDH aktivitesi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1.2.1). LDH aktivitesi 100 μM ve üzeri konsantrasyonlarda akrilamidin tek başına ve kurkumin ile birlikte uygulandığı gruplarda sırasıyla kontrol grubu ve yalnız kurkumin uygulanan gruba göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$, $p<0,01$). Kurkuminin akrilamidin oluşturduğu sitotoksisteye karşı koruyucu etkisi 100 μM ve üzeri konsantrasyonlarda akrilamide kurkumin ilave edilmiş gruplarda görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,01$).

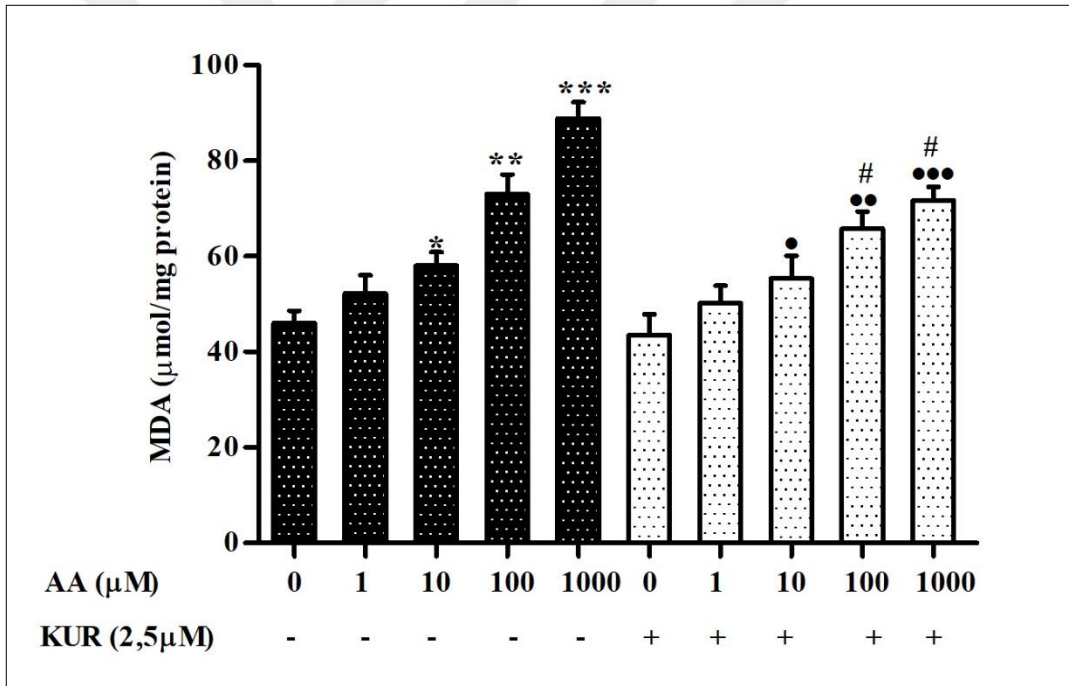


Şekil 4.1.2.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde % LDH aktivitesi üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$, ## $p<0,01$, • $p<0,05$, •• $p<0,01$).

4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI

4.2.1. Lipit Peroksidasyonu

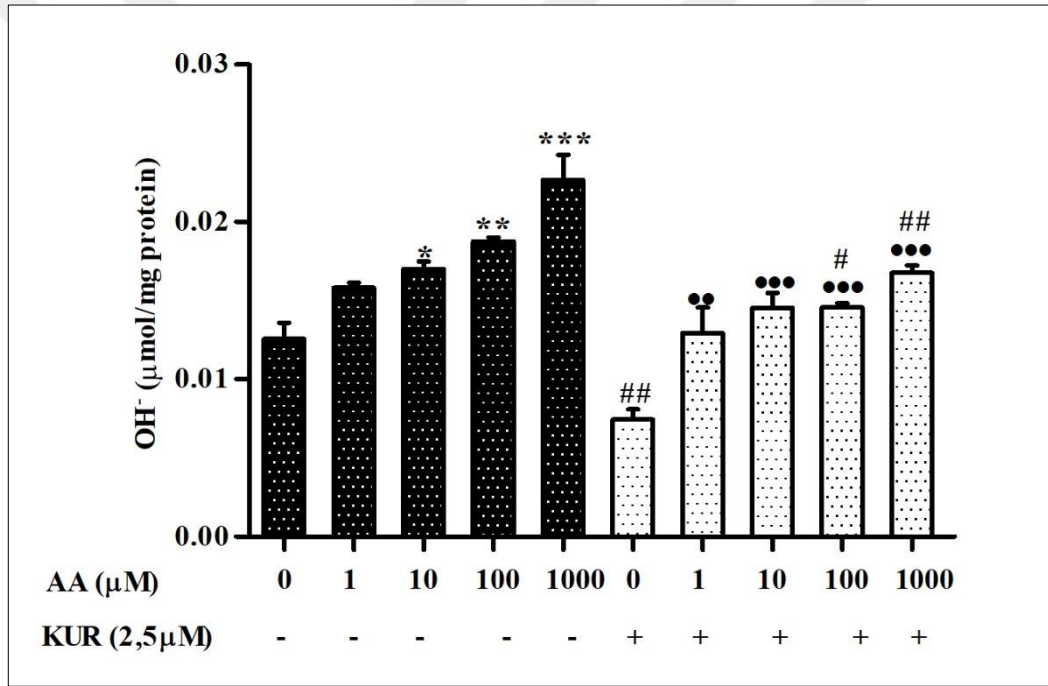
TM3 Leydig hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenen malondialdehit seviyeleri Şekil 4.2.1.1’de verilmiştir. 24 saat maruziyet sonunda MDA seviyelerine bakıldığında 10 μM ve üzeri akrilamidin tek başına ve kurkumin ile birlikte uygulandığı gruplarda sırasıyla kontrol grubu ve yalnız kurkumin uygulanan gruba göre anlamlı olarak artış görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). Akrilamid ve kurkuminin birlikte uygulandığı gruplar yalnızca akrilamid uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında ise 100 μM ve üzeri konsantrasyonlarda akrilamid içeren gruplarda kurkuminin iyileştirici etkisi saptanmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.2.1.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde lipid peroksidasyonu üzerine etkileri
 : kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre. ($p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, # $<0,05$, • $<0,05$, •• $p<0,01$).

4.2.3. Hidroksil Radikali

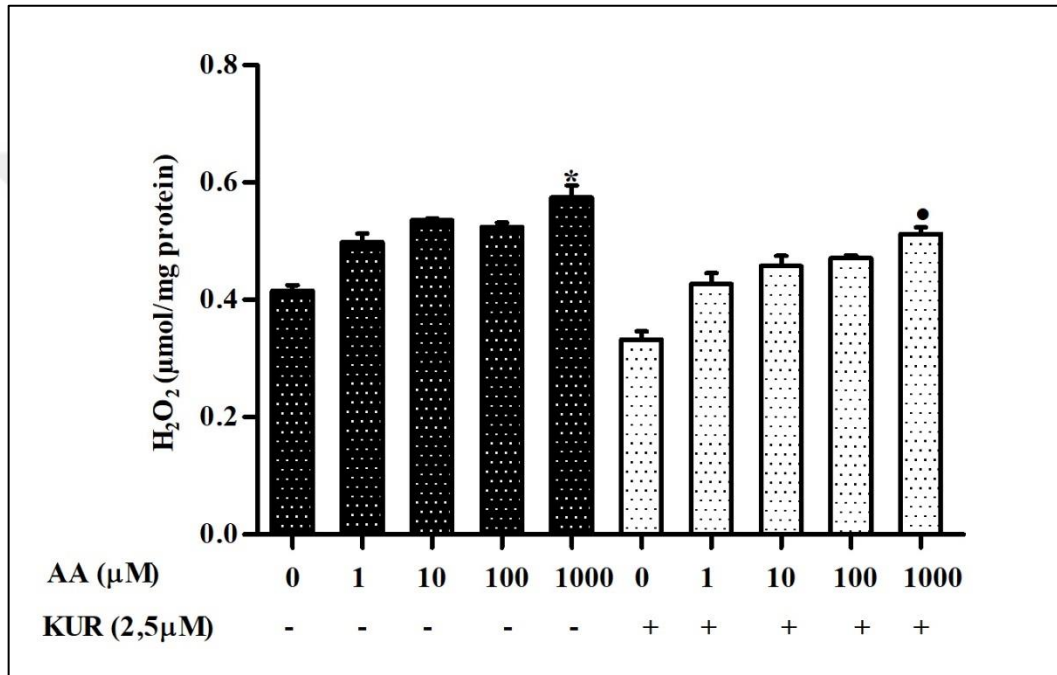
TM3 Leydig hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenen hidroksil radikali seviyeleri Şekil 4.2.3.1’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 10, 100 ve 1000 μM akrilamid uygulanan gruplarda hidroksil radikali oluşumu anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). Akrilamid ve kurkuminin birlikte uygulandığı gruplar yalnızca akrilamid uygulana gruba göre karşılaştırıldığında ise tüm gruplarda anlamlı bir artış saptanmıştır. Akrilamid kaynaklı oluşan hidroksil radikale karşı kurkuminin koruyucu etkisi 100 ve 1000 μM akrilamide maruz kalan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$, $p<0,01$).



Şekil 4.2.3.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde oluşan OH⁻ radikali üzerine etkileri
: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre ($p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, # $<0,05$, ## $<0,01$ • $<0,05$, •• $p<0,01$).

4.2.4. Hidrojen peroksit

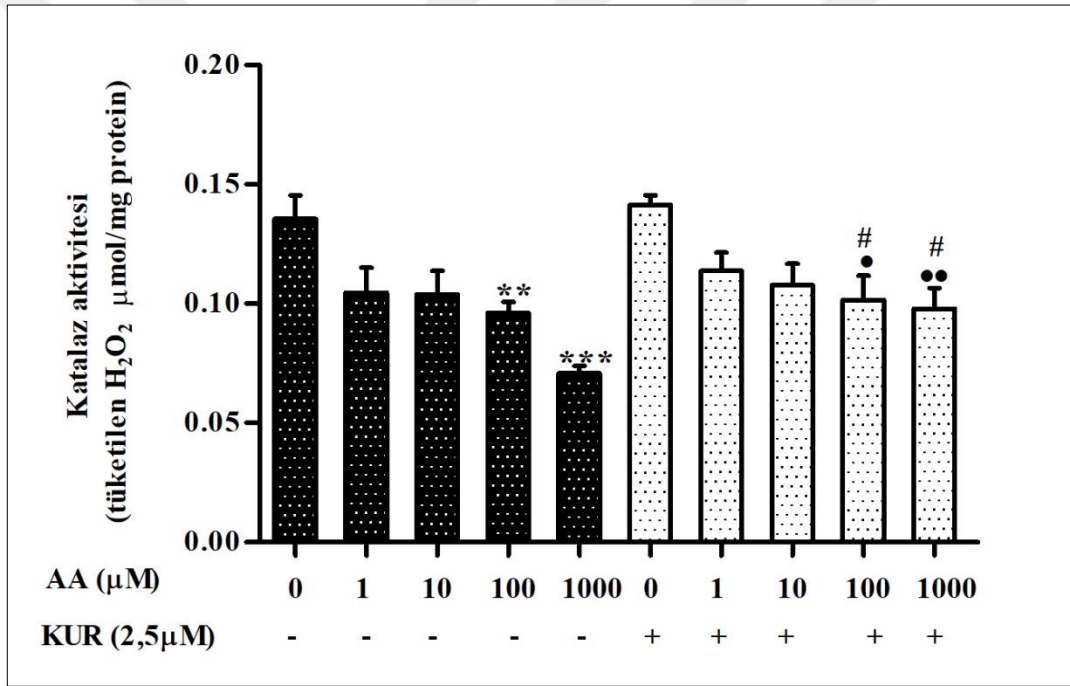
TM3 Leydig hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenen hidrojen peroksit seviyeleri Şekil 4.2.4.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda akrilamidin dört farklı konsantrasyonu ve akrilamide kurkumin ilavesi ile oluşturulan gruplar kontrol gruplarına göre karşılaştırıldığında yalnızca 1000 μM akrilamid uygulanan gruplarda hidrojen peroksit miktarında anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$).



Şekil 4.2.4.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde oluşan H₂O₂ üzerine etkileri *: kontrole göre ($*p < 0,05$).

4.2.5. Katalaz aktivitesi

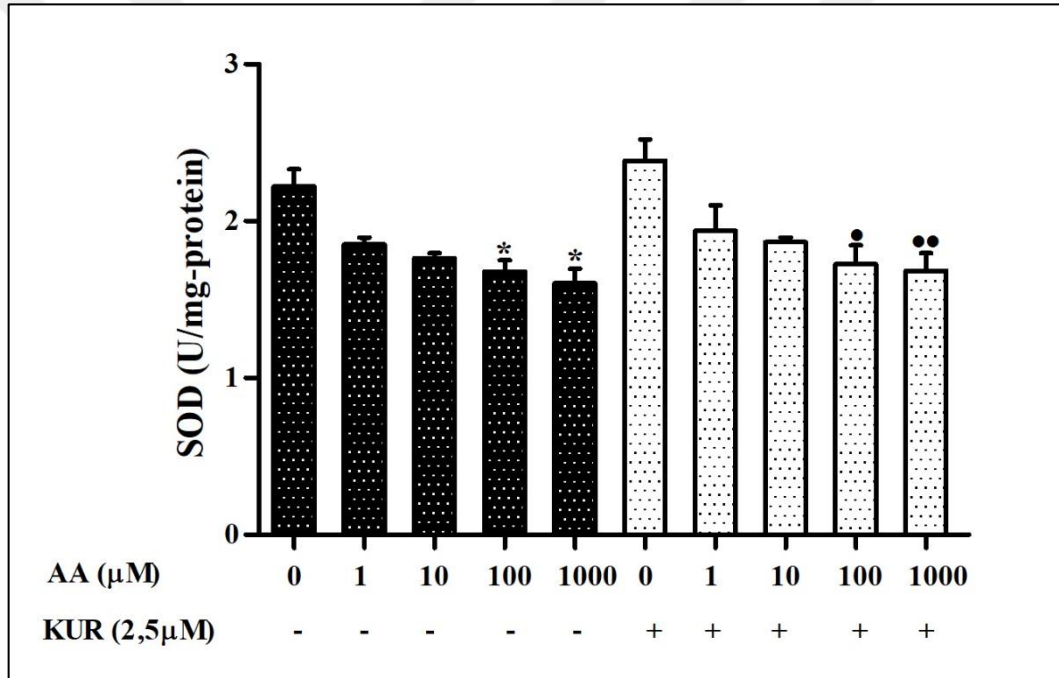
Akrilamidin dört farklı konsantrasyonuna kurkumin ile birlikte ve tek başına maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinde tüketilen H_2O_2 miktarına bağlı olarak hesaplanan katalaz enzimi miktarı Şekil 4.2.5.1’de verilmiştir. Deney süresi tamamlandığında, gruplar katalaz enzim miktarları bakımından karşılaştırıldığında 100 μM ve üzeri konsantrasyonlarda akrilamide tek başına ve kurkumin ile birlikte maruz kalan hücrelerde sırasıyla kontrol grubuna ve sadece kurkumin grubuna göre anlamlı azalmalar görülmüştür ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). 100 μM ve üzeri konsantrasyonda akrilamide kurkumin ile birlikte maruz bırakılan hücrelerde tek başına akrilamide maruz kalan hücrelere göre kurkuminin koruyucu etkisi saptanmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 4.2.5.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde katalaz aktivitesi üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # $< 0,05$, • $< 0,05$, •• $p < 0,01$).

4.2.6. Süperoksitdismutaz aktivitesi

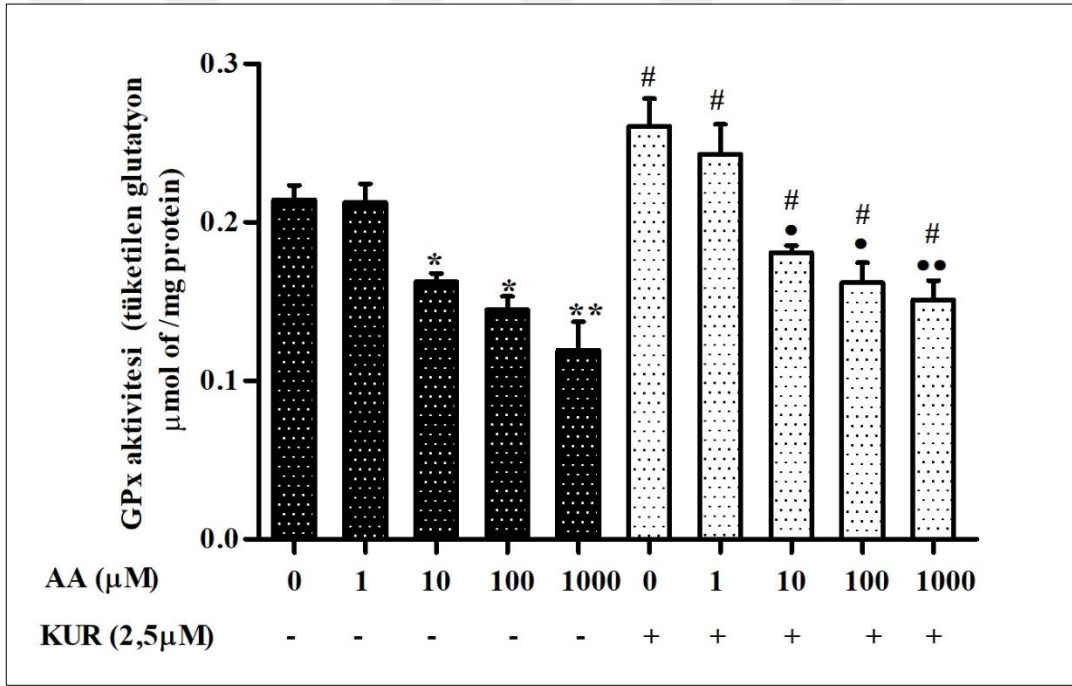
Akrilamidin dört farklı konsantrasyonuna kurkumin ile birlikte ve tek başına maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinde süperoksitdismutaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Şekil 4.2.6.1). Deney sonuçları kontrol ve yalnızca kurkumin maruziyeti yapılmış gruplar ile karşılaştırıldığında akrilamide tek başına maruz bırakılan hücrelerde 10 μM ve üzeri konsantrasyonlarda anlamlı olarak azalma görülürken; kurkumin ilavesi olan gruplarda 100 μM ve üzeri konsantrasyonlarda enzim miktarlarında anlamlı azalma görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,01$). Akrilamid ve kurkumine birlikte maruz bırakılan gruplar yalnızca akrilamid uygulanan gruplara göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlam bulunmamaktadır.



Şekil 4.2.6.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde SOD aktivitesi üzerine etkileri etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (* $p<0,05$, • $p<0,05$, •• $p<0,01$).

4.2.7. Glutasyon peroksidaz aktivitesi

Akrilamidin dört farklı konsantrasyonuna kurkumin ile birlikte ve tek başına maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinde glutasyon peroksidaz enzim miktarı spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.2.7.1). Glutasyon peroksidaz miktarı 10 μM ve üzeri konsantrasyonlarda akrilamidin tek başına ve kurkumin ile birlikte uygulandığı gruplarda sırasıyla kontrol grubu ve yalnız kurkumin uygulanan gruba göre anlamlı olarak azalmıştır. Tüm gruplarda kurkuminin glutasyon peroksidaz enzim miktarı üzerinde akrilamide karşı koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır.



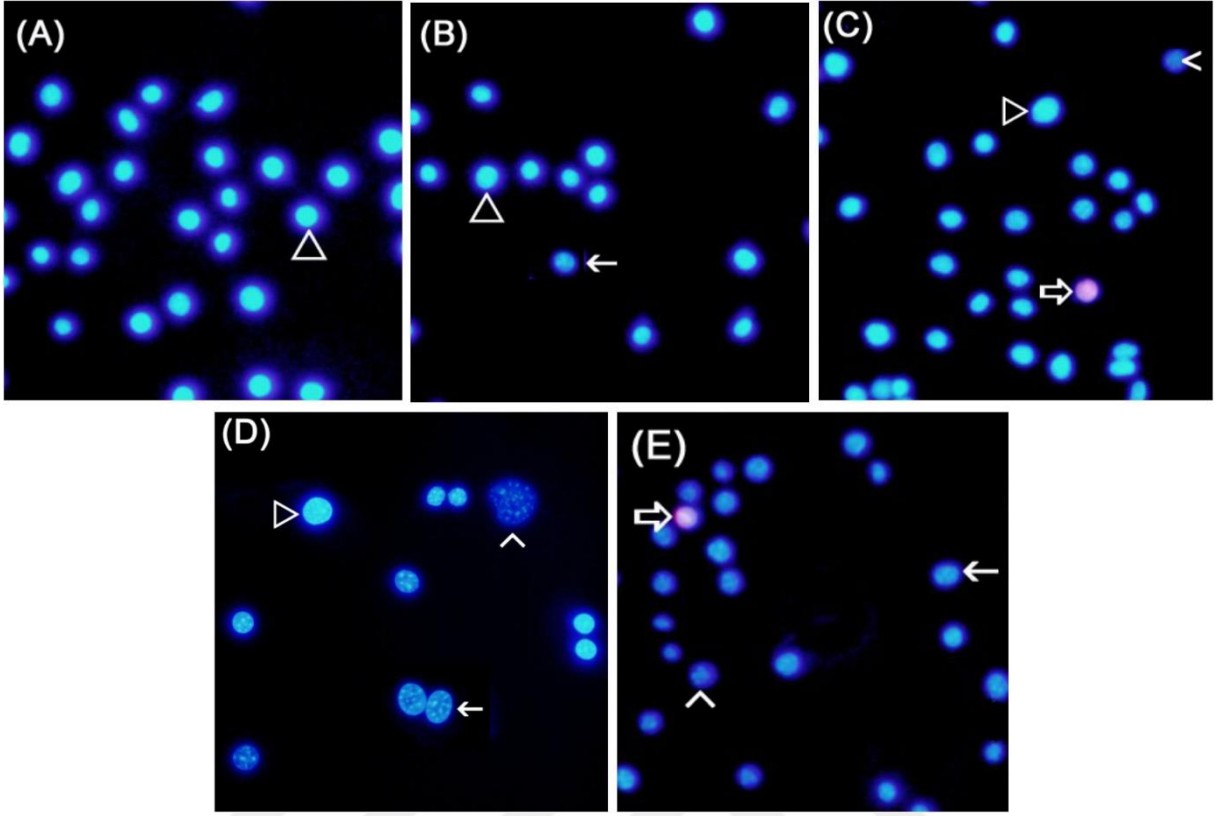
Şekil 4.2.7.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde GPx aktivitesi üzerine etkileri etkileri
 : kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, # $< 0,05$, • $< 0,05$, •• $p < 0,01$).

4.3. APOPTOZ BULGULARI

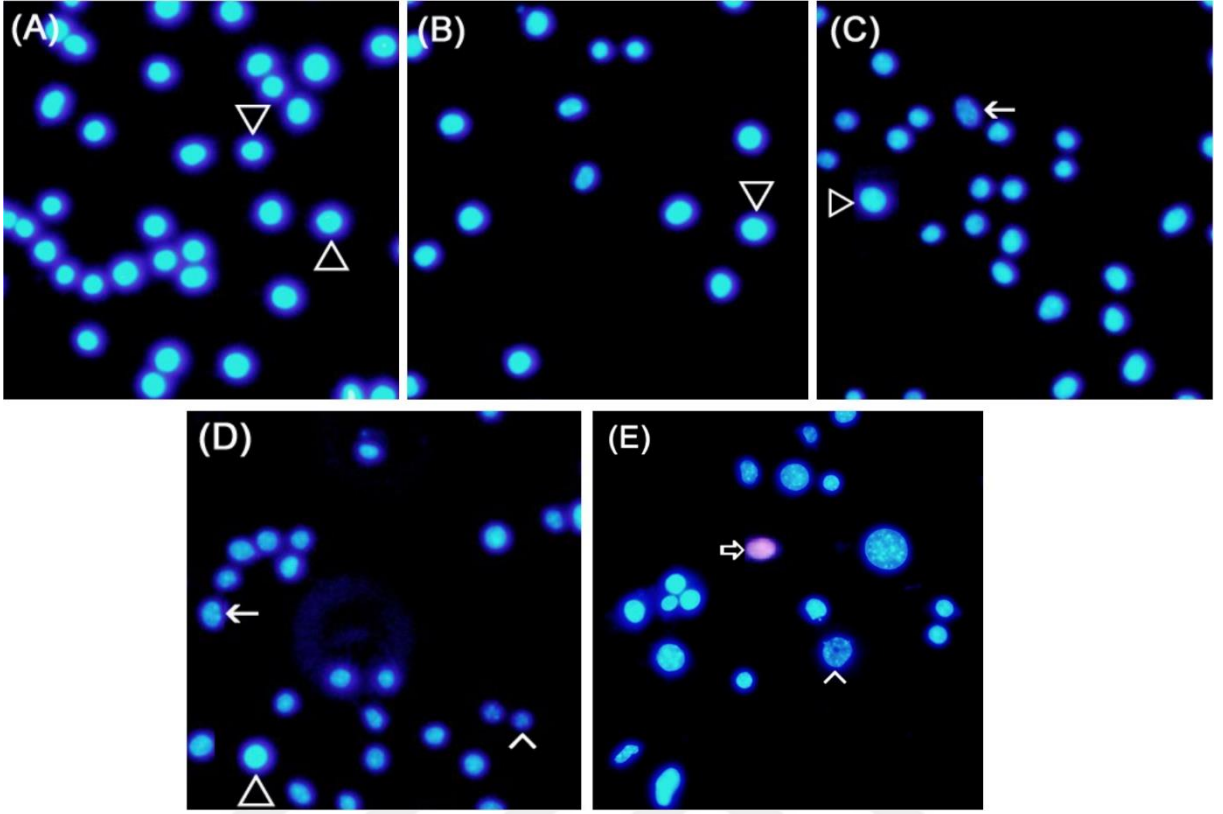
TM3 Leydig hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında floresan boyama yöntemi kullanılarak belirlenen canlı, erken apoptotik, apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzde cinsinden değerleri Tablo 4.3.1’de verilmiştir. Floresan boyama sonuçlarına göre, deney gruplarında gözlemlenen morfolojik değişiklikler aşağıdaki özelliklere sahiptir: i) canlı hücreler; oldukça organize nükleuslu parlak mavi renkli ii) erken apoptotik hücreler; nükleer olarak yoğunlaşmış mavi renkli iii) apoptotik hücreler; yüksek nükleer yoğunlaşma ve fragmentasyon gösteren donuk mavi ila mor renkli, iv) nekrotik hücreler; kromatin fragmentasyonu göstermez ve kırmızı renkli. Deney sonuçları 10 μM ve daha yüksek akrilamid konsantrasyonlarının, kontrol grubuna göre erken apoptotik, apoptotik ve nekrotik hücre konsantrasyonunu arttırdığını göstermektedir ($p<0,001$, $p<0,01$). Akrilamid ve kurkumine birlikte maruz bırakılan gruplar tek başına akrilamid uygulanan gruplara göre karşılaştırıldığında erken apoptotik ve nekrotik hücreler, 10 μM ve daha yüksek konsantrasyonlarda anlamlı şekilde azalmıştır. Bununla birlikte apoptotik hücre yoğunluğunda 100 μM ve daha yüksek konsantrasyonlarda önemli ölçüde azalma saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4.3.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde 24 sonunda apoptoz ve nekroz üzerine etkileri.

AA μM	KUR 2,5 μM	Canlı	Erken Apoptoz	Apoptoz	Nekroz
0	-	98,67 \pm 0,34	1,12 \pm 0,30	0,09 \pm 0,04	0,24 \pm 0,03
1	-	96,63 \pm 0,33	2,56 \pm 0,37	0,51 \pm 0,09	0,52 \pm 0,01
10	-	86,15 \pm 1,31***	12,55 \pm 1,31***	0,84 \pm 0,17**	0,80 \pm 0,01***
100	-	78,82 \pm 0,48***	19,26 \pm 0,30***	1,14 \pm 0,20***	0,91 \pm 0,08***
1000	-	72,25 \pm 0,74***	25,17 \pm 0,61***	1,97 \pm 0,06***	1,11 \pm 0,07***
0	+	99,17 \pm 0,09	0,59 \pm 0,59	0,001 \pm 0,0	0,12 \pm 0,04
1	+	96,91 \pm 0,30	2,32 \pm 0,29	0,25 \pm 0,04	0,30 \pm 0,01
10	+	94,98 \pm 0,12***#	3,81 \pm 0,04***#	0,41 \pm 0,08	0,46 \pm 0,07**#
100	+	92,51 \pm 0,21***#	5,50 \pm 0,16***#	1,08 \pm 0,08***#	0,78 \pm 0,12***#
1000	+	80,87 \pm 0,56***#	16,06 \pm 0,58***#	1,70 \pm 0,15***#	0,87 \pm 0,08***#



Şekil 4.3.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde 24 sonunda apoptoz ve nekroz üzerine etkileri A: kontrol, B: 1 μM AA, C: 10 μM AA, D: 100 μM AA ve E: 1000 μM AA. \blacktriangledown : canlı, \wedge : apoptotik, \rightarrow : erken apoptotik, \Rightarrow : nekroz.



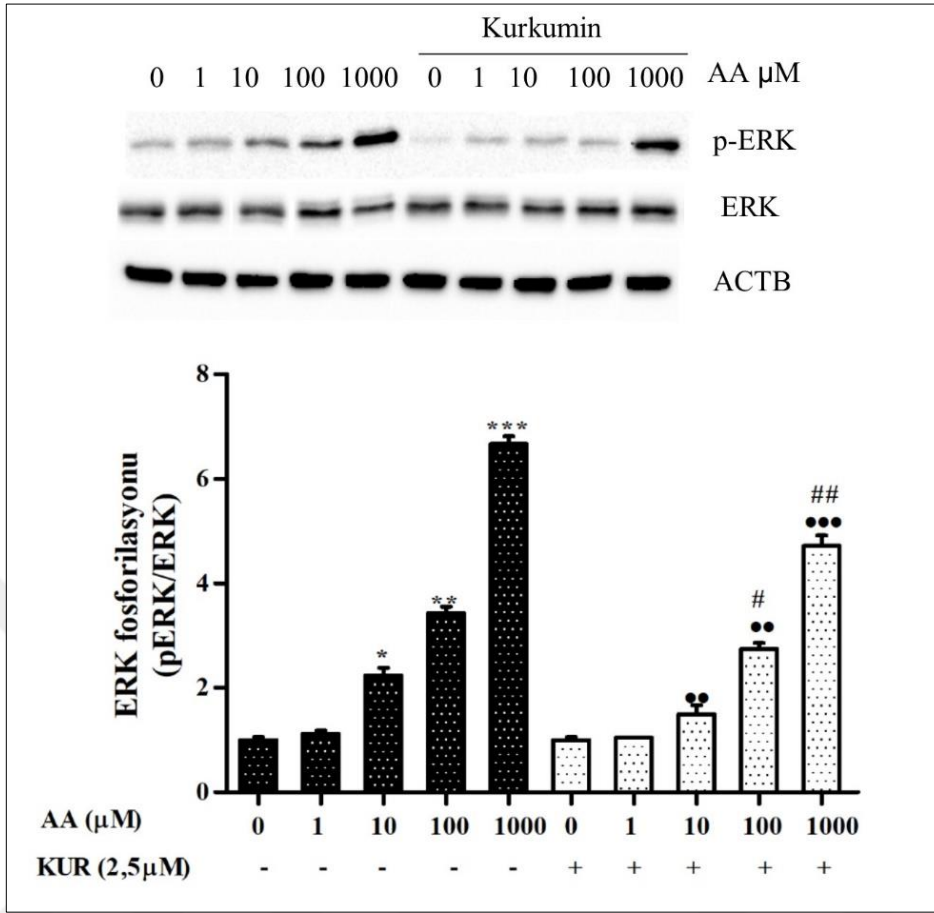
Şekil 4.3.2: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde 24 sonunda apoptoz ve nekroz üzerine etkileri A: KUR, B: 1 μM AA + KUR, C: 10 μM AA + KUR, D: 100 μM AA + KUR and E: 1000 μM AA + CUR 1000 μM AA. ▼: canlı, ^: apoptotik, →: erken apoptotik, ⇨: nekroz.

4.4. WESTERN BLOT BULGULARI

Akrilamid ve kurkuminin, TM3 Leydig hücrelerinde MAP-Kinaz sinyal yolağında bulunan proteinlerin (ERK, JNK, p38) fosforilasyon seviyeleri üzerindeki etkileri Western blot yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol ve deney gruplarında seçilen proteinlerin miktarı belirlenmiş ve sonuçlar hem protein bantları hem de her bir proteinin fosforillenme düzeylerine göre değerleri grafik olarak verilmiştir.

4.4.1 ERK fosforilasyonu

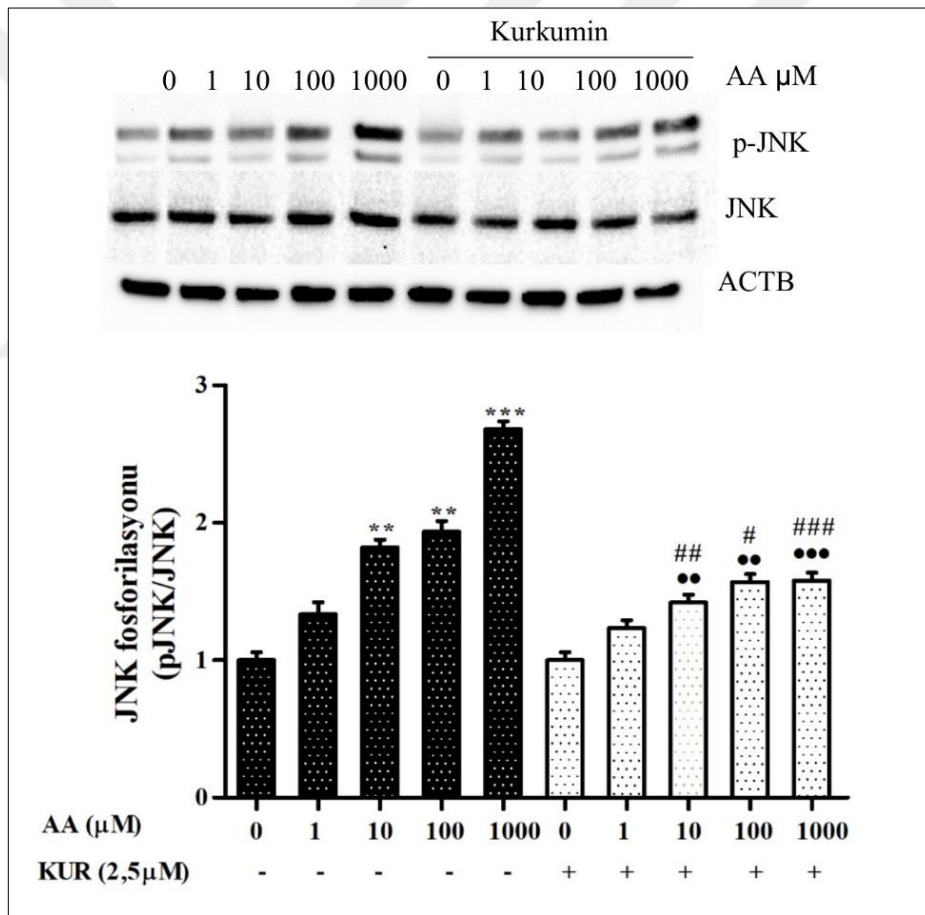
Deney süresi tamamlandığında TM3 Leydig hücrelerinde hesaplanan ERK fosforilasyonu Şekil 4.4.1.1'de verilmiştir. Deney süresi tamamlandığında, gruplar fosforilasyon düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında 10 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda akrilamide tek başına ve kurkumin ile birlikte maruz kalan hücrelerde sırasıyla kontrol grubuna ve sadece kurkumin grubuna göre anlamlı artışlar görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). 100 μ M ve üzeri konsantrasyonda akrilamide kurkumin ile birlikte maruz bırakılan hücrelerde tek başına akrilamide maruz kalan hücrelere göre kurkuminin koruyucu etkisi saptanmıştır ($p<0,05$, $p<0,01$).



Şekil 4.4.1.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde ERK fosforilasyonu üzerine etkileri
 : kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre ($p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, # $<0,05$, ## $<0,01$, •• $p<0,01$, ••• $p<0,001$).

4.4.2. JNK fosforilasyonu

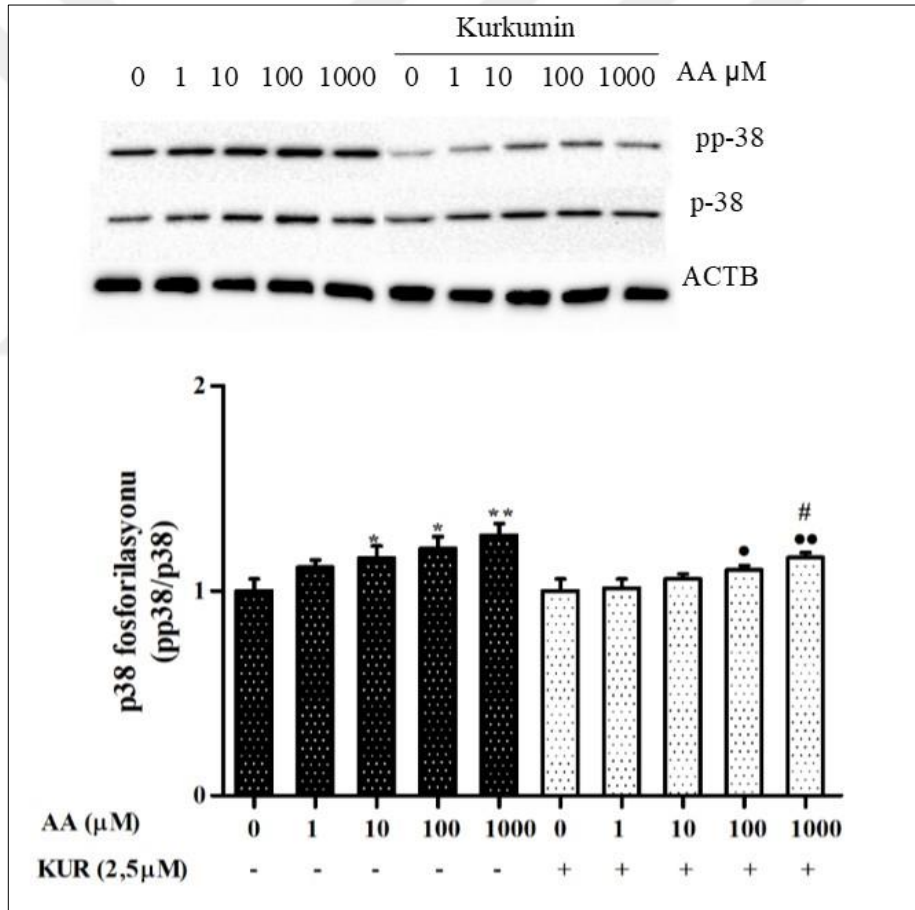
Deney süresi tamamlandığında TM3 Leydig hücrelerinde hesaplanan JNK fosforilasyonu Şekil 4.4.2.1’de verilmiştir. Deney süresi tamamlandığında, gruplar fosforilasyon düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında 10 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda akrilamide tek başına ve kurkumin ile birlikte maruz kalan hücrelerde sırasıyla kontrol grubuna ve sadece kurkumin grubuna göre anlamlı artışlar görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). 100 μ M ve üzeri konsantrasyonda akrilamide kurkumin ile birlikte maruz bırakılan hücrelerde tek başına akrilamide maruz kalan hücrelere göre kurkuminin koruyucu etkisi saptanmıştır ($p<0,05$, $p<0,01$).



Şekil 4.4.2.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde JNK fosforilasyonu üzerine etkileri
 : kontrole göre, #: akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre ($p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, # $<0,05$, ## $<0,01$, •• $p<0,01$, ••• $p<0,001$).

4.4.3. p38 fosforilasyonu

Deney süresi tamamlandığında TM3 Leydig hücrelerinde hesaplanan p38 fosforilasyonu Şekil 4.4.3.1’de verilmiştir. Deney sonuçları kontrol ve yalnızca kurkumin maruziyeti yapılmış gruplar ile karşılaştırıldığında akrilamide tek başına maruz bırakılan hücrelerde 10 μM ve üzeri konsantrasyonlarda anlamlı olarak artış görülürken; kurkumin ilavesi olan gruplarda 100 μM ve üzeri konsantrasyonlarda enzim miktarlarında anlamlı artış görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). Akrilamide kurkumin ile birlikte maruz bırakılan hücrelerde tek başına akrilamide maruz kalan hücrelere göre kurkuminin koruyucu etkisi yalnızca 1000 μM konsantrasyonunda saptanmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.4.3.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde p38 fosforilasyonu üzerine etkileri *: kontrole göre, #:akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $<0,05$, • $p<0,05$ •• $p<0,01$).

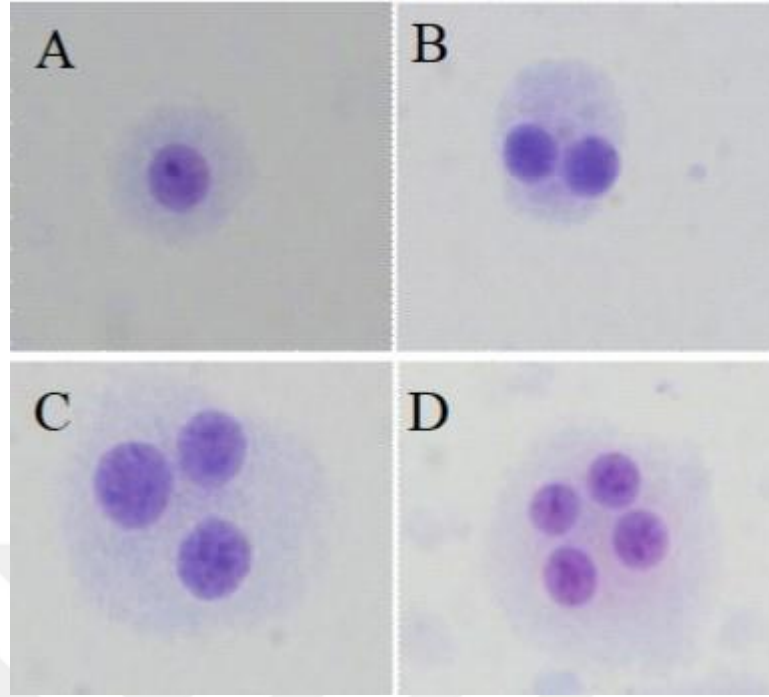
4.5. GENOTOKSİSİTE BULGULARI

4.5.1. Mikronükleus Bulguları

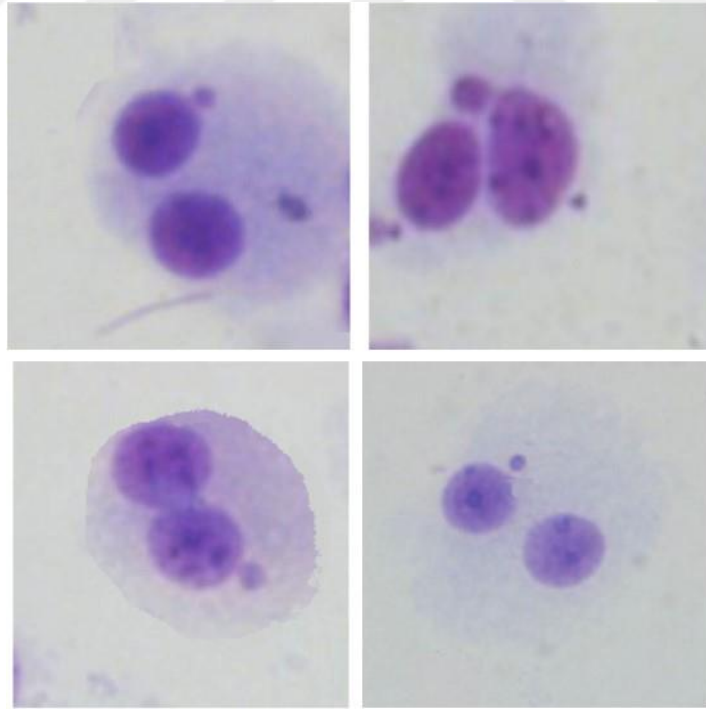
Akrilamidin dört farklı konsantrasyonuna kurkumin ile birlikte ve tek başına maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinde nükleer bölünme indeksi 100 μM akrilamid konsantrasyonundan itibaren kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma göstermiştir. Ayrıca 1000 μM akrilamide kurkumin ile birlikte maruz bırakılan grupta tek başına 1000 μM akrilamide maruz kalan gruba göre anlamlı bir iyileşme saptanmıştır. Binükleuslu hücrelerde akrilamid ve kurkumin maruziyeti sonrasında oluşan mikronükleus oranlarına bakıldığında ise yalnızca akrilamide maruz bırakılan gruplarda 100 μM konsantrasyonundan itibaren kontrol grubuna göre anlamlı artış görülürken; kurkumin ilavesi olan gruplarda 1000 μM akrilamid konsantrasyonunda istatistiksel bir anlam görülmüştür.

Tablo 4.5.1.1: Akrilamid ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerinde nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre oranı üzerine etkileri *: kontrole göre, #: akrilamid+kurkumin grupları yalnız akrilamid gruplarına göre, •: yalnız kurkumin grubuna göre (* $p < 0,05$, # $< 0,05$, • $p < 0,05$).

Gruplar	Konsantrasyonlar	Nükleer Bölünme İndeksi	Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre oranı (%)
H_2O_2	150 μM	1,51 \pm 0,02	48,64 \pm 3,18
AA (μM)	0	1,73 \pm 0,02	4,10 \pm 1,60
	1	1,70 \pm 0,05	6,94 \pm 1,19
	10	1,68 \pm 0,06	9,78 \pm 1,88
	100	1,63 \pm 0,07*	11,91 \pm 2,06*
	1000	1,60 \pm 0,06*	15,73 \pm 2,14*
AA + KUR (2,5 μM)	0	1,74 \pm 0,11	3,19 \pm 1,26
	1	1,71 \pm 0,07	4,20 \pm 1,06
	10	1,67 \pm 02	9,77 \pm 1,90
	100	1,68 \pm 0,05•	9,98 \pm 2,03
	1000	1,70 \pm 0,09•#	12,21 \pm 1,30•#



Şekil 4.5.1.1: A: Bir nükleuslu hücre; B: İki nükleuslu hücre; C: Üç nükleuslu hücre; D: Dört nükleuslu hücre.



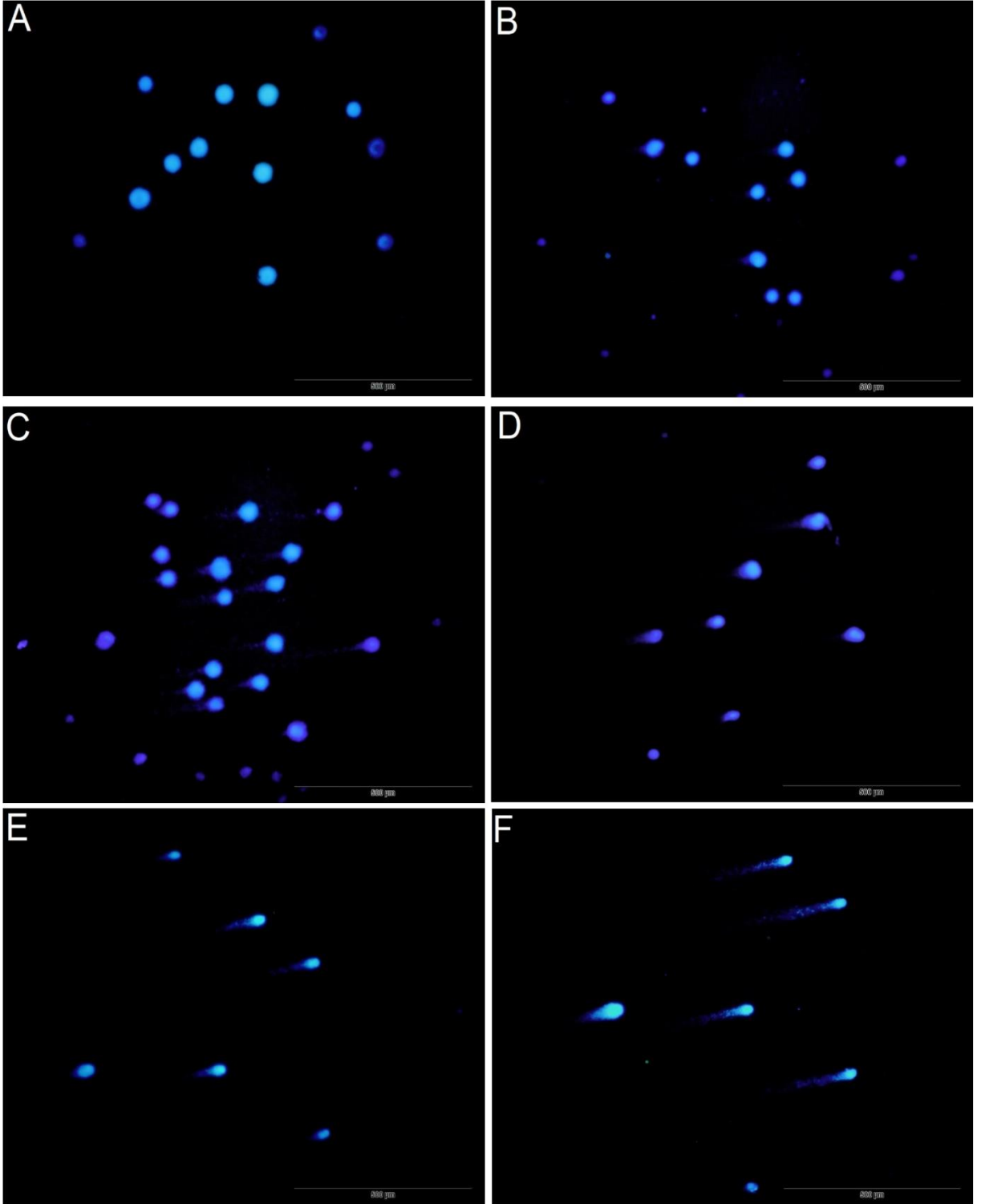
Şekil 4.5.1.2: Binükleuslu hücrelerde mikronükleus görünümü.

4.5.2. Komet Bulguları

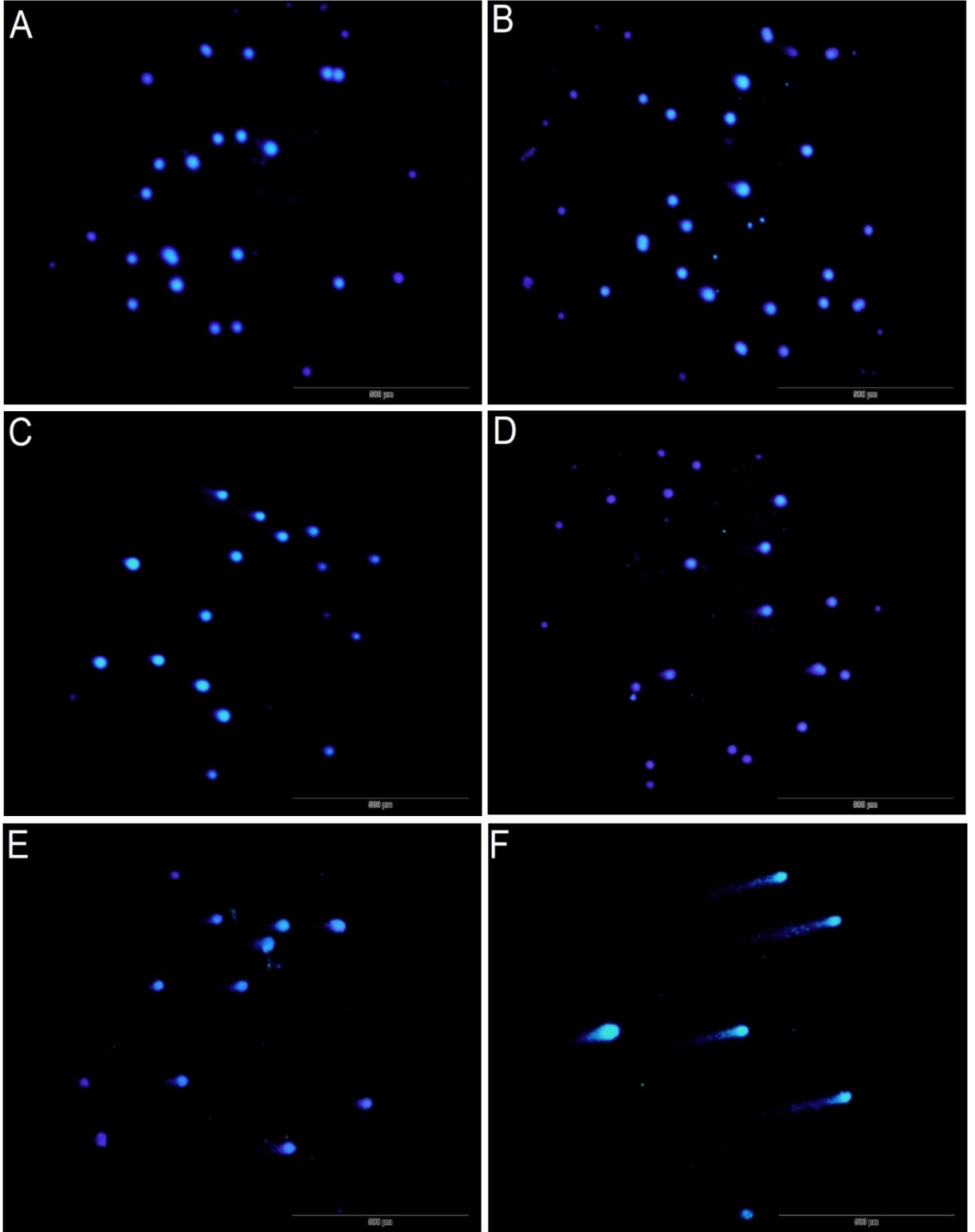
TM3 Leydig hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında DNA hasarını belirlemek için uygulanan komet testi Kuyruktaki % DNA miktarı, kuyruk uzunluğu ve Olive kuyruk momenti parametreleri üzerinden değerlendirilmiştir (Tablo 4.5.2.1). Kuyrukta bulunan % DNA miktarı 10 μM akrilamid konsantrasyonundan itibaren anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0,05$, $p<0,01$). Kuyruk uzunluğu ve Olive kuyruk momenti verilerine bakıldığında ise 100 μM akrilamid konsantrasyonlarından itibaren anlamlı artışlar görülmüştür. Leydig hücrelerinde akrilamid maruziyeti sonunda oluşan DNA hasarına karşı kurkuminin koruyucu etkisi 1000 μM akrilamide maruz kalan gruplarda anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 4.5.2.1: Akrilamid ve kurkumine 24 saat maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinde komet testi sonuçları ile elde edilen DNA hasarı belirteçleri.

Gruplar	Konsantrasyonlar	Kuyruk % DNA miktarı	Kuyruk uzunluğu	Olive kuyruk momenti
H ₂ O ₂	150 μM	70,41 \pm 1,63	97,56 \pm 1,53	10,29 \pm 1,07
AA (μM)	0	7,64 \pm 1,07	47,13 \pm 2,12	1,11 \pm 1,41
	1	17,23 \pm 2,12	55,94 \pm 1,13	2,19 \pm 0,64
	10	22,10 \pm 1,02*	57,1 \pm 1,06	2,98 \pm 0,75
	100	33,35 \pm 1,17**	61,97 \pm 1,56*	4,02 \pm 1,03*
	1000	45,42 \pm 0,98**	71,89 \pm 1,18*	6,06 \pm 1,15**
AA + KUR (2,5 μM)	0	7,01 \pm 0,76	46,08 \pm 1,04	1,47 \pm 0,23
	1	16,35 \pm 1,67•	53,75 \pm 2,18	1,99 \pm 0,73
	10	19,57 \pm 1,15•	56,16 \pm 2,01	2,65 \pm 0,16•
	100	29,88 \pm 1,08••	60,02 \pm 1,74•	3,87 \pm 0,93•
	1000	33,99 \pm 1,64••#	69,60 \pm 1,13•#	5,47 \pm 0,52••#



Şekil 4.5.2.1: Akrlamidin farklı konsantrasyonlarının TM3 Leydig hücrelerine 24 saat maruziyeti sonunda elde edilen komet testi floresan mikroskop görüntüleri (40X büyütme) A: Kontrol, B: 1 µM, C:10 µM, D: 100 µM, E:1000 µM, F: Pozitif Kontrol.



Şekil 4.5.2.2: Akrilamidin ve kurkuminin TM3 Leydig hücrelerine 24 saat maruziyeti sonunda elde edilen komet testi floresan mikroskop görüntüleri (40X büyütme) A: Kurkumin, B: 1 µM+Kur , C:10 µM+Kur, D: 100 µM+Kur, E:1000 µM+Kur, F: Pozitif Kontrol.

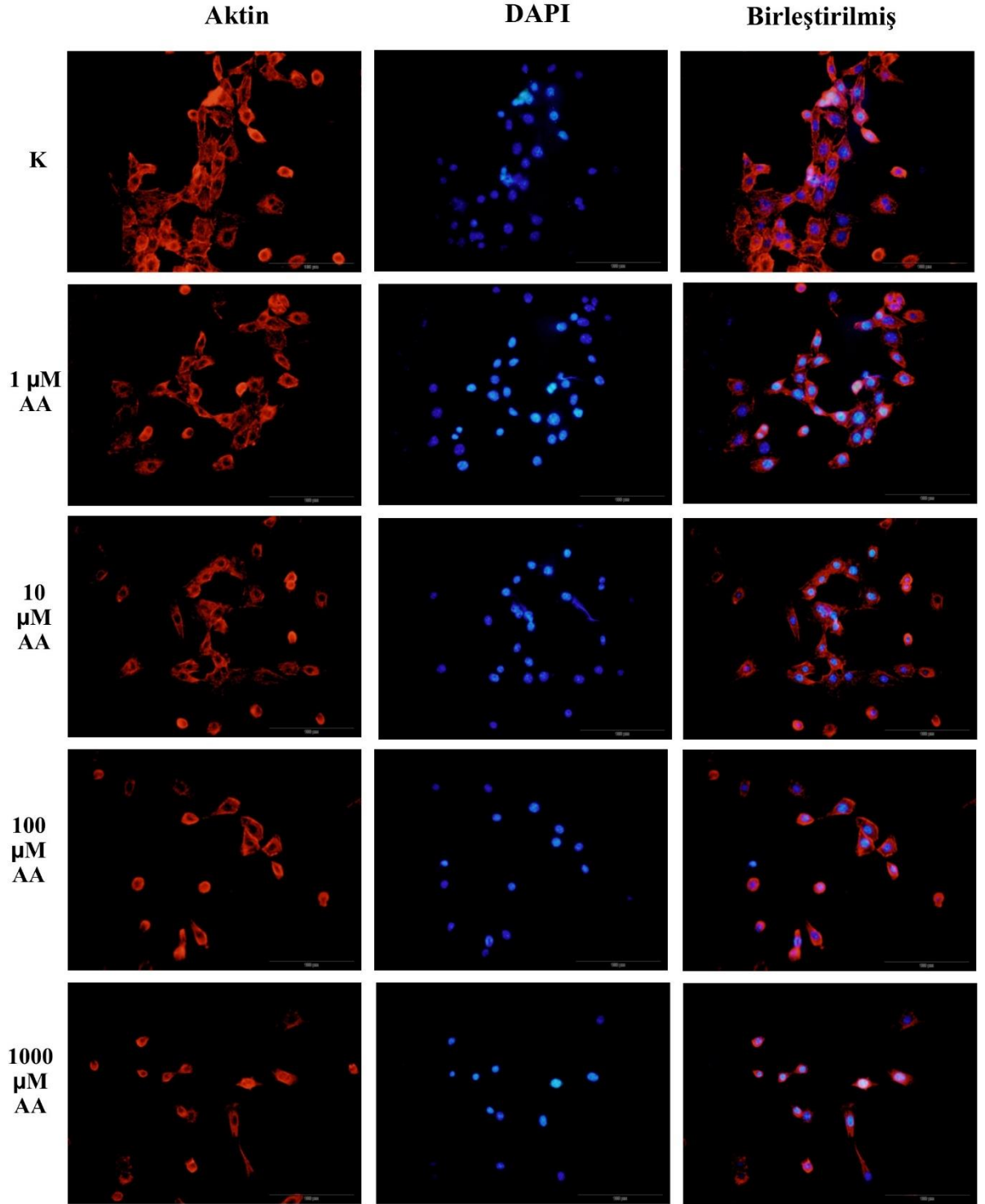
4.6. İMMÜNFLORESAN BULGULARI

Akrilamid ve kurkumine maruz bırakılan Leydig hücrelerinde aktin hücre iskeleti, mikrotubuller ve konneksin 43 immunfloresan boyama tekniği uygulanarak floresan mikroskopi ile incelenmiştir. Mikrotubuller ve konneksin işaretlemesi için spesifik antikolar kullanılmıştır, aktin boyaması ise falloidin ile gerçekleştirilmiştir. Hücre iskeleti elemanları ve hücre hücre iletişim bağlantılarının incelendiği preparatlarda hücre nükleusu DAPI ile işaretlenmiştir.

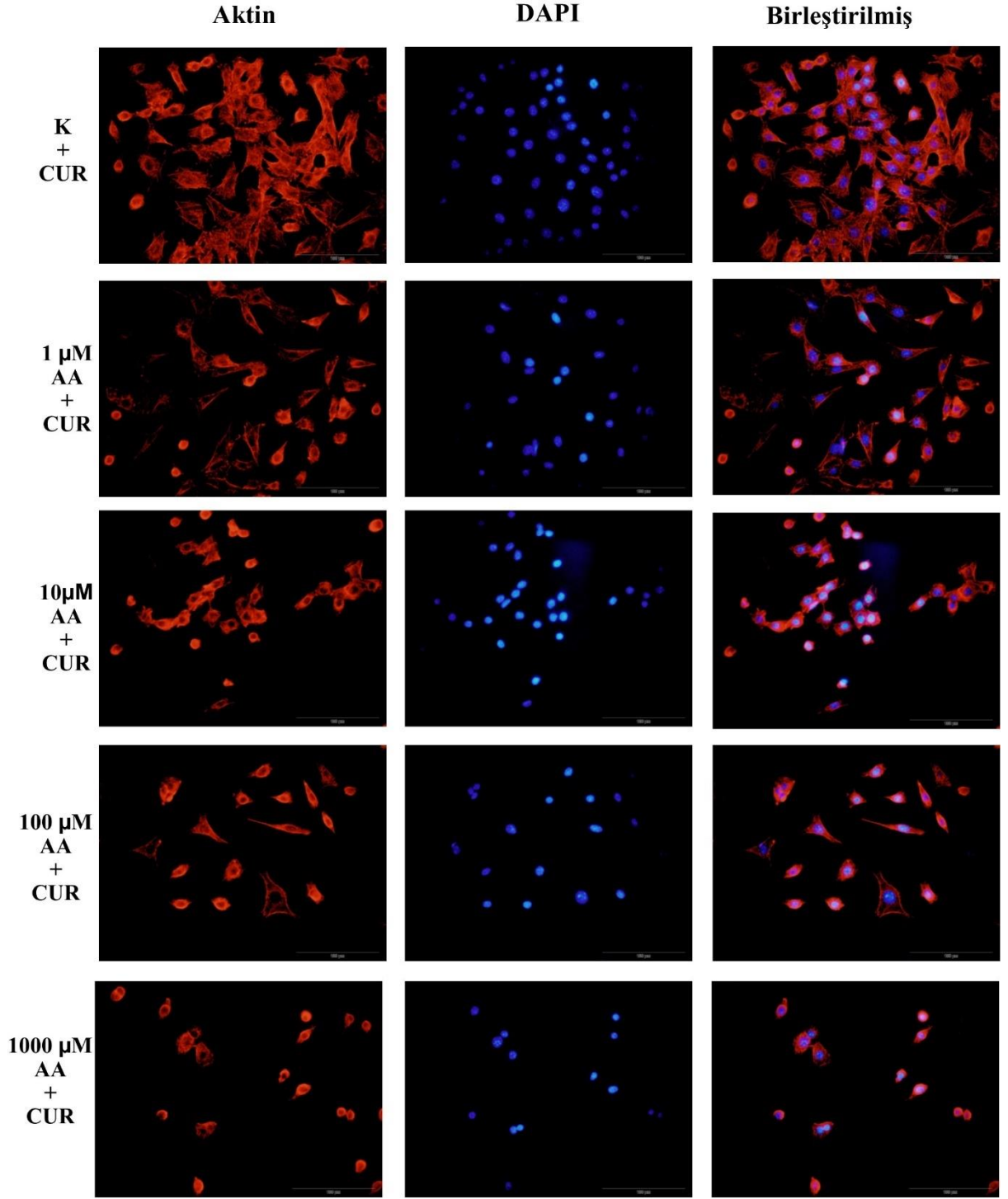
Aktin hücre iskeleti kontrol grubunda düzenli demetler halinde sitoplazma boyunca uzanırken artan akrilamid konsantrasyonuna bağlı olarak aktin filamentlerinin organizasyonu bozulduğu ve yoğunluğunun azaldığı görülmüştür (Şekil 4.6.1) Floresan mikroskop bulgularına göre kurkumin ilavesi ile falloidin ışımada artış görülmesi kurkuminin aktin organizasyonu üzerinde akrilamide karşı iyileştirici etkisi olduğunu göstermektedir (Şekil 4.6.2).

Deney süresi tamamlandığında akrilamid maruziyetinin mikrotubul organizasyonu üzerinde de olumsuz etkileri olduğu görülmüştür. Tubulin dağılımında artan akrilamid konsantrasyonuna bağlı olarak gelişen kalınlaşma ve kısalmalar 10 μM akrilamid konsantrasyonundan itibaren görülmüştür ve mikrotubullerin hücre çevresindeki ışımaları giderek azalmıştır (Şekil 4.6.3). Akrilamidin kurkumin ile birlikte uygulandığı gruplarda mikrotubul organizasyonundaki bozulmalar sadece akrilamide yüksek konsantrasyonlarında (1000 μM) maruz bırakılan gruplarda saptanmıştır (Şekil 4.6.4).

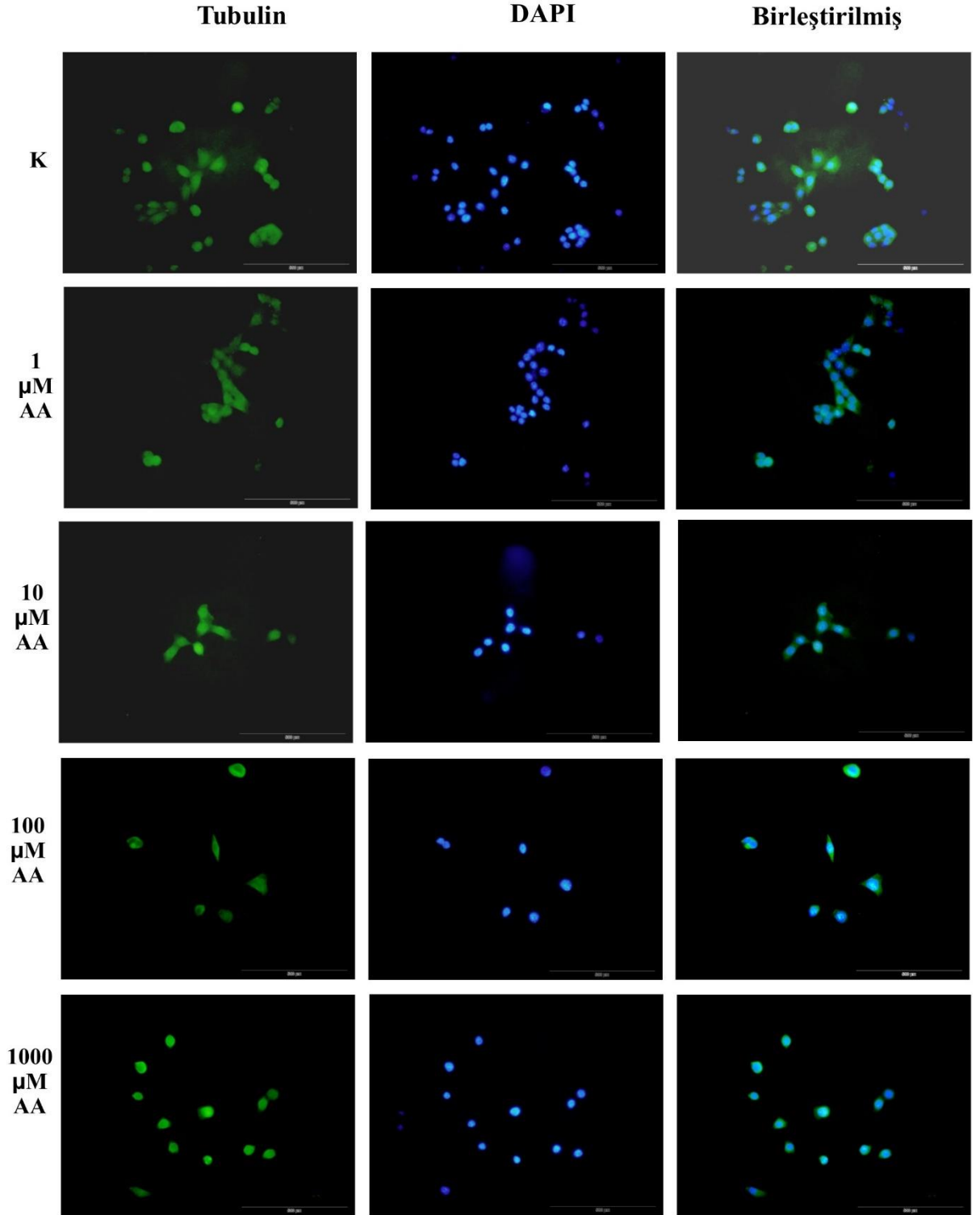
Akrilamidin farklı konsantrasyonlarına ve akrilamid ile birlikte kurkumine maruz bırakılan Leydig hücrelerinde kontrol gruplarında konneksin 43'ün yoğun dağılımında olduğu ve kuvvetli ışımaya yaptığı görülmektedir. Akrilamid uygulanan gruplarda konsantrasyon artışına bağlı olarak konneksin 43 dağılımında azalmalar görülmüştür (Şekil 4.6.5). Ayrıca kurkuminin akrilamid kaynaklı oluşan hasara karşı koruyucu bir etkisi olduğu floresan mikroskopisi sonucu elde edilen fotoğraflarda görülmektedir (Şekil 4.6.6).



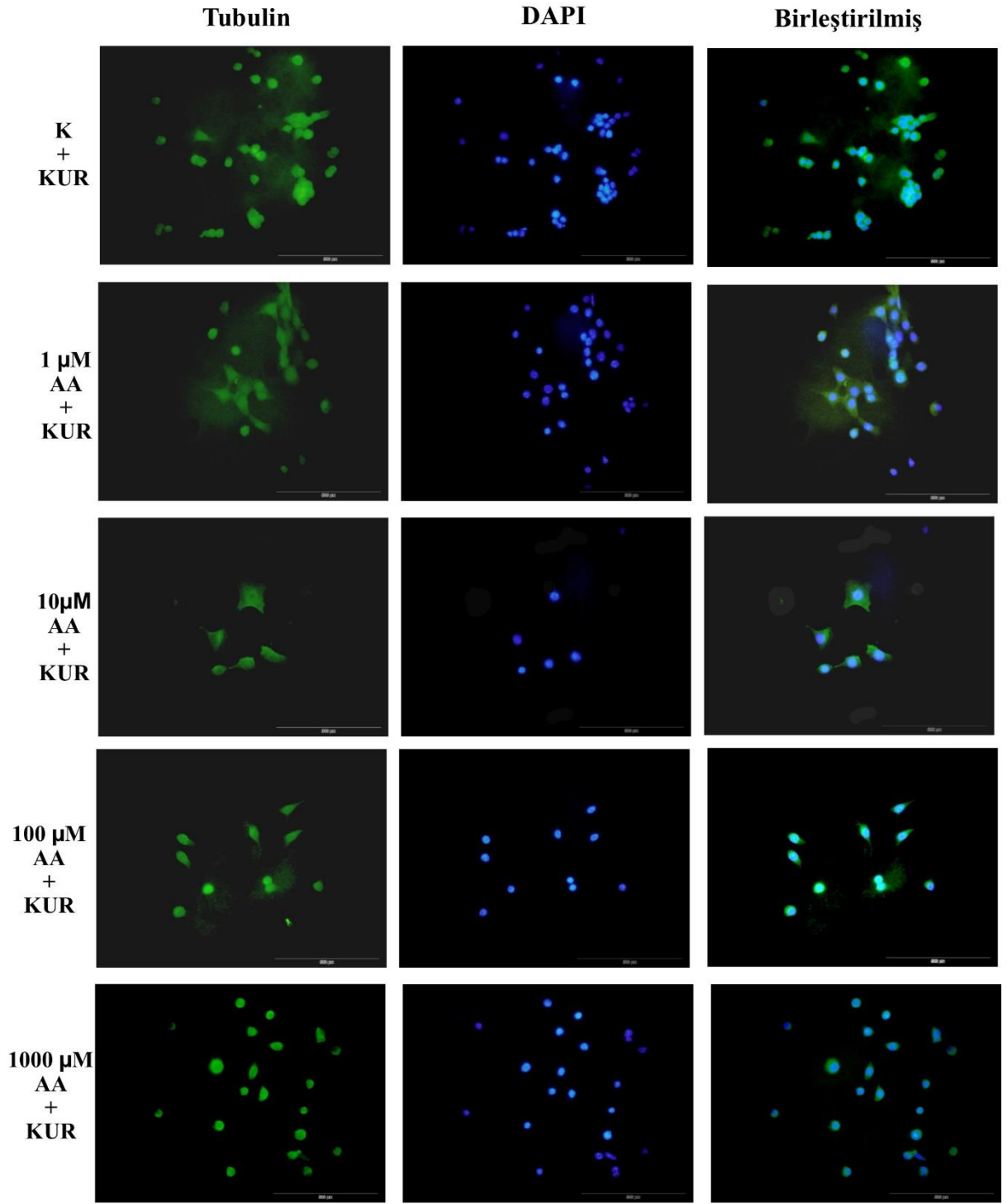
şekil 4.6.1: TM3 Leydig hücrelerinde akrilamidin aktin filamentleri üzerine etkileri.



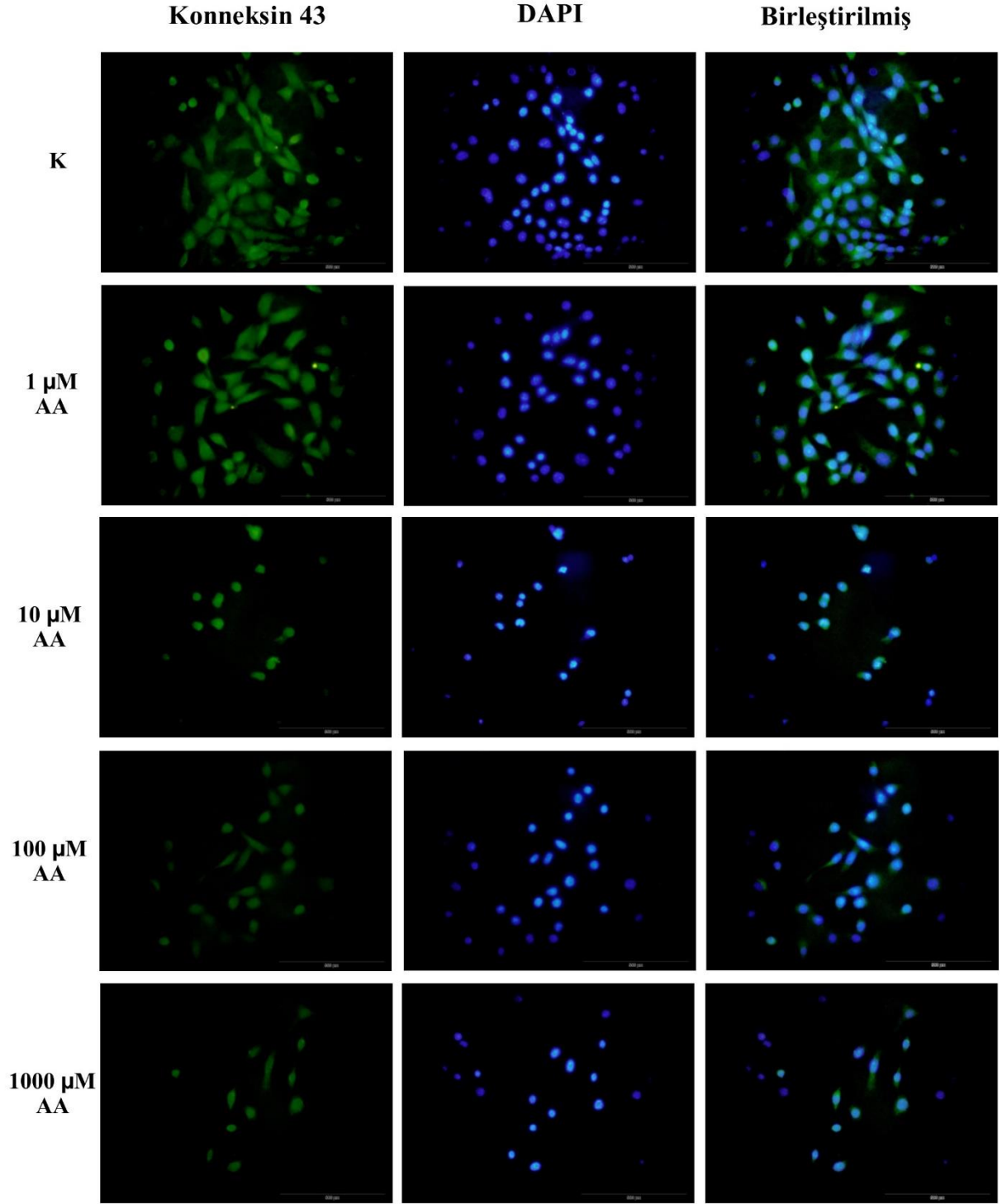
şekil 4.6.2: TM3 Leydig hücreslerinde akrilamid ile kurkuminin aktin filamentleri üzerine etkileri.



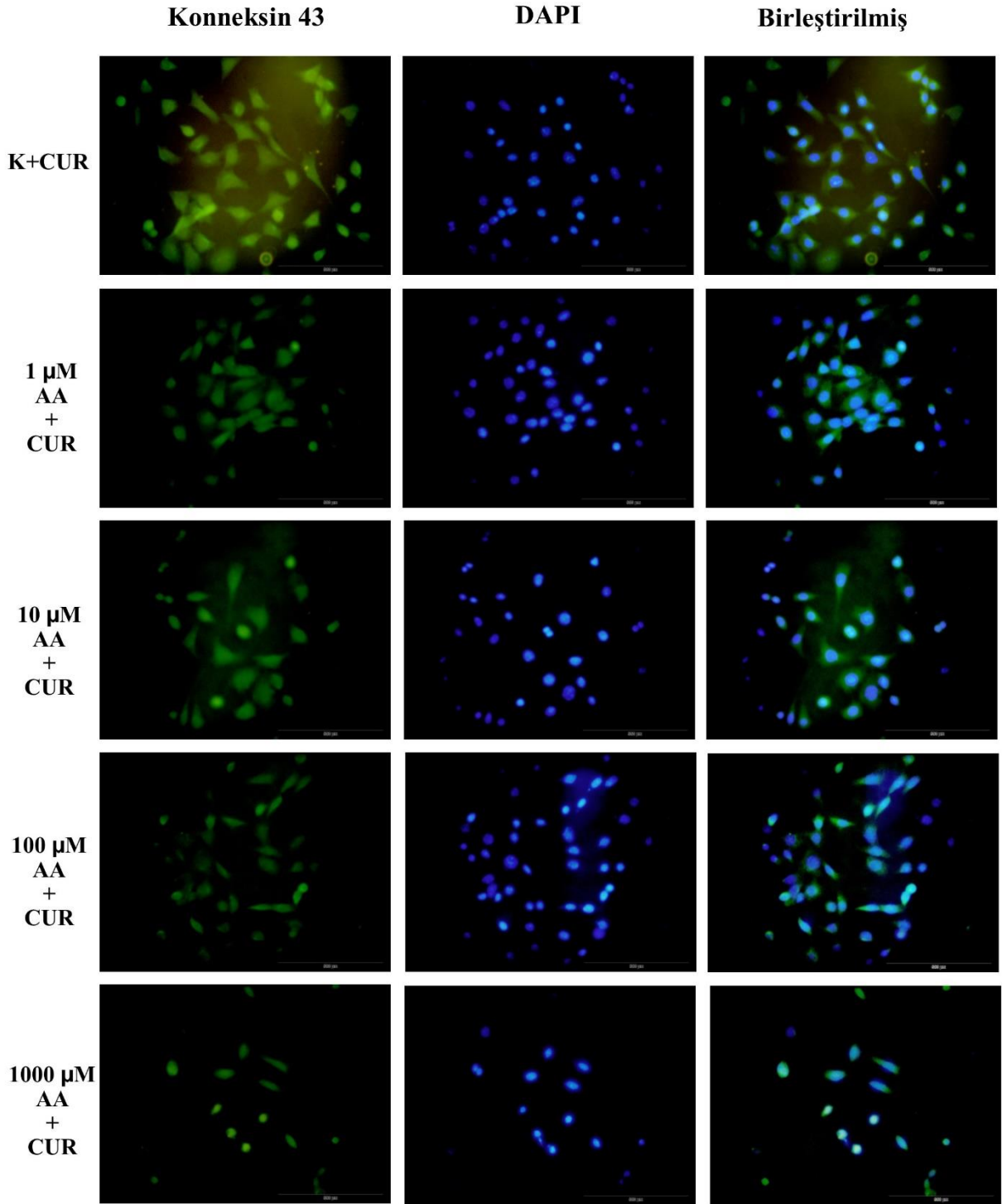
şekil 4.6.3: TM3 Leydig hücreslerinde akrilamidin tubulin üzerine etkileri.



şekil 4.6.4: TM3 Leydig hücreslerinde akrilamid ve kurkuminin tubulin üzerine etkileri.



şekil 4.6.5: TM3 Leydig hücrelerinde akrilamidin konneksin 43 üzerine etkileri.



şekil 4.6.6: TM3 Leydig hücreslerinde akrilamid ve kurkuminin konneksin 43 üzerine etkileri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akrilamid, sanayide polimer, kozmetik, kâğıt, tekstil, atık su iyileştirme ve laboratuvar jellerinin üretimi gibi pekçok uygulama alanında endüstriyel bir kimyasal olarak kullanılmaktadır (Friedman, 2003). Bununla birlikte Nisan 2002’de akrilamidin ısıtma işleme maruz kalmış yiyeceklerde oluştuğu tespit edilmiştir (Tareke ve diğ., 2002). Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar sonucunda akrilamidin farklı konsantrasyonlarda nörotoksisite (30 mg/kg/gün), genotoksisite (20 mg/kg/gün), reproduktif toksisite (5–60 mg/kg/day) ve embriyonik toksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (Dobrovolsky ve diğ., 2016; Yang ve diğ., 2005; Lakshmi ve diğ., 2012; Şen ve diğ., 2015), ayrıca akrilamid IARC tarafından insanlar için potansiyel karsinojen olan kimyasallar grubuna dahil edilmiştir (IARC, 1994).

Son yıllarda, erkek infertilite vakaları küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Akrilamid kaynaklı testiküler hasar ve üreme sistemindeki fonksiyonel değişiklikler de erkek üreme sağlığı için büyük endişe yaratmaktadır. Kemirgenler ile yapılan çalışmalarda oral olarak uygulanan akrilamidin (5, 10 mg/kg/gün) sperm sayısında, canlılığında azalmaya neden olurken anormal sperm morfolojisinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Kermani-Alghoraishi ve diğ., 2010). Farklı konsantrasyonlarda akrilamide maruz bırakılan sıçan testislerinde de seminifer tübüllerde çok nükleuslu dev hücreler, vakuolleşme ve apoptotik hücre oluşumları gözlenmiştir (Yang ve diğ., 2005). Bunlarla birlikte akrilamidin Leydig hücrelerinde steroidogenik yolakta rol oynayan temel transkripsiyon faktörleri ve genler üzerinde ekspresyon düzeylerinde oluşturduğu baskı ile üretilen testosteron düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (Yildizbayrak ve Erkan, 2018). Akrilamidin erkek üreme sistemindeki etkileri üzerine yapılan pek çok çalışma olmasına rağmen insanlara ulaşabilen düşük konsantrasyonlardaki akrilamidin Leydig hücreleri üzerindeki toksik etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Leydig hücre fonksiyonunun bozulması erkek üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği için bu tez çalışmasında TM3 Leydig hücre soyu *in vitro* model olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda kurkuminin, akrilamidin toksik etkilerine karşı olası koruyucu rolünü değerlendirmek için, kurkumin yokluğunda veya kurkumin varlığında akrilamide maruz bırakılan Leydig hücrelerinde sitotoksisite, ROS üretimi, antioksidan kapasite, apoptoz, MAPK yolağı, hücre iskeleti ve genotoksisite araştırılmıştır.

Akrilamidin çeşitli sistemlerde ve hücre tiplerinde hücre canlılığı üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Akrilamidin sinir sistemi üzerindeki etkilerinin incelendiği iki farklı çalışmada sıçan adrenal medulla hücrelerine 2, 4, 6, 8 ve 10 mM, nöronal hücrelere ise 1,25, 2,5 ve 5 mM akrilamidin 24 saat uygulanması sonucunda her iki hücre tipinde de hücre canlılığında konsantrasyon bağımlı bir düşüş gözlenmiştir (He ve diğ., 2017b; Song ve diğ., 2017). Albalawi ve diğerlerinin (2017) insan retinal pigment hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada 24 saat süre ile uygulanan 0,7, 1 ve 2 mM akrilamidin hücre canlılığını anlamlı olarak düşürdüğü bildirilmiştir. Kanser hücre soyları ile yapılan çalışmalarda ise akrilamidin düşük konsantrasyonlarda (1 – 100 μ M) hepatositlerin hücre canlılığında artışa neden olduğu görülürken kolon adenokarsinoma hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda (2,5 – 40 mM) hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir (Shan ve diğ., 2014; Chen ve diğ., 2013). Üreme sistemi ile ilgili çeşitli hücre soyları ile yapılan çalışmalarda da Leydig hücrelerinde (0,5 – 6 mM) ve Sertoli hücrelerinde (10, 1000 μ M) akrilamidin hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur (Aydın, 2018; Sun ve diğ., 2018; Yılmaz ve diğ., 2017). Yapılan *in vitro* çalışmaların yanısıra akrilamid maruziyeti yapılmış sıçanlardan elde edilen Leydig hücrelerinde de hücre canlılığında azalma olduğu gösterilmiştir (Camacho ve diğ., 2012; Yang ve diğ., 2005).

Yapılan bu *in vitro* çalışmada 6, 12, 24, 48 ve 72 saat süre ile akrilamidin 0,1 – 10000 μ M arasındaki on iki farklı konsantrasyonu TM3 hücrelerine uygulanmıştır ve konsantrasyon ve zaman bağımlı bir şekilde hücre canlılığında anlamlı düşüşler görülmüştür. Yukarıda bahsedilen *in vitro* çalışmalarda kullanılan akrilamid konsantrasyonları günlük olarak maruz kalınan konsantrasyonların oldukça üzerindedir (He ve diğ., 2017; Song ve diğ., 2017, Zamani ve diğ., 2017). Yapmış olduğumuz bu çalışmada uygulanan akrilamid (1, 10, 100, 1000 μ M) konsantrasyonları kardiyomiyositlere (Walters ve diğ., 2014) ve karaciğer karsinoma (Shan ve diğ., 2014) hücreleri ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi insanlara ulaşabilen konsantrasyonlardır. 24 saatlik maruziyet sonunda akrilamid TM3 hücre canlılığında yalnızca 1000 μ M konsantrasyonda anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Bununla beraber kurkumin TM3 hücre canlılığında, alkol ile birlikte kurkumin uygulanmış farelerden izole edilen Leydig hücreleri ile yapılan çalışma (Gianessi ve diğ., 2008) ile tutarlı olarak iyileştirici etki göstermiştir.

Laktat dehidrogenaz vücutta tüm dokularda eksprese edilen sitozolik bir enzimdir. LDH enzimi pirüvatın laktata dönüşmesini katalize ederken NADH'dan NAD⁺ oluşmasında rol oynar. Bu

dönüşüm oksidatif fosforilasyon aracılı ATP üretiminin bozulduğu hipoksik durumlar için oldukça kritiktir. Doku hasarı olduğu zaman ve stres koşullarında aktivitesinde artış olan LDH enzimi hücre sitotoksitesinin belirteci olarak gösterilmektedir (Alegre ve diğ., 2015). Akrilamidin LDH aktivitesi üzerindeki etkilerini inceleyen insan ve kemirgenlere ait farklı hücre soyları ile gerçekleştirilmiş *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. İnsan nöronal ve glial hücre soyları ile gerçekleştirilen bir çalışmada 24 saatlik akrilamid maruziyetinin nöronal hücrelerde 0,5 mM konsantrasyondan, glial hücrelerde ise 5 mM konsantrasyondan itibaren LDH aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (Chen ve diğ., 2009). İnsan sindirim kanalı hücreleri ile yapılan çalışmalarda 16 saatliklik 1 mM akrilamid uygulamasının hücrelerde LDH salınımına neden olduğu gösterilmiştir (Zödl ve diğ., 2007; Rodriguez ve diğ., 2010). Jiang ve diğ. (2018)'nin yaptıkları çalışmada ise 5 M akrilamidin 16 saat süre ile uygulanması sonucu LDH aktivitesi %80 oranında artış izlenmiştir. Akrilamidin erkek üreme sistemi hücreleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada Leydig ve Sertoli hücrelerinde 10 µM konsantrasyondan itibaren LDH seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2017).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada 24 saatlik akrilamid maruziyetinin TM3 hücrelerinde LDH seviyelerini arttırması, yukarıda bahsedilen çalışmalarda olduğu gibi akrilamidin Leydig hücrelerinde oluşturduğu sitotoksiteyi desteklemektedir. Akrilamidin farklı konsantrasyonlarına kurkumin ilave edilerek oluşturulan gruplarda ise LDH seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma görülmesi, Naik ve diğerlerinin (2004) yaptıkları çalışmada olduğu gibi kurkuminin LDH aktivitesini azaltma yönündeki etkileri ile tutarlılık göstermektedir.

Homoostatik denge bozulduğunda ve serbest radikal oluşumu hücre sel savunma kapasitesinin üzerinde olduğu durumlarda oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres hücrelerin protein ve DNA içeriğine doğrudan zarar verebilme yeteneğindedir (Rahal ve diğ., 2014). Çeşitli hücre soyları ile yapılan çalışmalar akrilamid maruziyeti sonucu oluşan hücre içi ROS'un oksidatif stres ile sonuçlandığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda R2C Leydig hücrelerinde 1,925 mM, retinal pigment hücrelerinde 0,7 ve 1 mM ve nöronal hücrelerde 1,25 – 5 mM akrilamidin 24 saatlik maruziyeti sonucunda hücrelerde oluşan total ROS miktarında anlamlı artışlara neden olduğu tespit edilmiştir (Sun ve diğ., 2018; Albalawi ve diğ., 2017; Song ve diğ., 2017). Yapmış olduğumuz bu çalışmada 24 saat maruziyet sonucunda akrilamidin 10 µM konsantrasyonundan itibaren OH⁻ radikali seviyelerini, 1000 µM konsantrasyonunda ise

H₂O₂ seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür. Bu sonuçlar çeşitli hücre soylarında akrilamid maruziyeti sonrasında ölçülen total ROS miktarları ile tutarlılık göstermektedir.

Stres koşulları altında, serbest radikaller ve membran lipidlerinde bulunan doymamış yağ asitleri arasında gerçekleşen bir zincir reaksiyon olan lipid peroksidasyonu hücre membranı, yapısı ve fonksiyonunda değişikliklere neden olmaktadır (Albalawi ve diğ., 2017). Böbreküstü bezinden izole edilen PC12 hücrelerinde 2,5 mM konsantrasyonda (Pan ve diğ., 2017), Leydig ve Sertoli hücrelerinde 10 ve 1000 µM konsantrasyonlarda (Yılmaz ve diğ., 2017) ve splenosit hücrelerinde 10 ve 25 mM konsantrasyonlarda (Zamani ve diğ., 2017) oksidatif stres ile ilişkili akrilamid toksisitesinin lipid peroksidasyonu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Erkek sıçanlarla yapılan *in vivo* çalışmalarda akrilamid maruziyeti sonrasında testikular dokuda ve plazmada *in vitro* çalışmalar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Hamdy ve diğ., 2012; Yousef ve El-Demerdash, 2006).

Hücrelerde degedayona uğramış oksidant durumunun bir belirteci ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyeleri yapılan bu *in vitro* çalışmada artan akrilamid konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermesi daha önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Cao ve diğerlerinin 2008 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada kurkumin HepG2 hücrelerine uygulanan akrilamid maruziyeti sonrasında ROS üretimi üzerinde iyileştirici etki göstermiştir. Priyadarsimi ve diğerlerine göre kurkuminin serbest radikal temizleyici aktivitesi OH[•] radikalinin fenolik gruplarından H atomu çıkarabilme özelliğinden kaynaklanmaktadır (Priyadarsini ve diğ., 2008). TM3 Leydig hücrelerine akrilamid maruziyeti yapılan bu çalışmada da kurkumin MDA ve OH[•] radikali seviyelerini baskılamıştır.

Hücre savunma sistemi enzimatik ve enzimatik olmayan (glutatyon gibi) antioksidanlar aracılığı ile normal koşullar altında hücre içi redoks dengesinin korunmasında görevlidir (He ve diğ., 2017). Biyolojik sistemlerde birinci derece öneme sahip olan SOD, CAT ve GPx antioksidan enzimleri serbest radikallerin oluşuma karşı rol oynarlar. Hücrelerde reaktif oksijen türlerinin üretilmesi sonucu görülen oksidatif stres redoks dengesinin bozulması ile sonuçlanır (Jiang ve diğ., 2018). Yapılan çalışmalar akrilamidin antioksidan savunma sistemini baskıladığı göstermektedir. Albalawi ve diğerlerinin retinal pigment epitelyum hücreleri ile yaptıkları çalışmada 0,7 ve 1 mM akrilamidin glutatyon seviyeleri ile SOD ve CAT enzim aktivitelerini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Albalawi ve diğ., 2017). 6 mM akrilamide maruz

bırakılan PC12 hücrlerinde SOD aktivitesi ve glutasyon seviyelerinde önemli düşüşler gözlenmiştir (He ve diğ., 2017). Sıçan bağırsak epitel hücreleri ile yapılan bir diğcr çalışmada ise 5mM akrilamidin SOD ve GPx aktivitelerini baskıladığı rapor edilmiştir (Jiang ve diğ., 2018). Akrilamidin antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkileri çok farklı hücre soylarında çalışılmış olmasının yanısıra üreme sistemi hücreleri ile yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Leydig ve Sertoli hücreleri ile yapılan bir çalışmada her iki hücre tipinde de akrilamidin GPx ve SOD aktivitelerini 10 ve 1000 µM konsantrasyonlarında anlamlı olarak düşürürken, CAT aktivitesinin sadece 1000 µM konsantrasyonunda azalttığı bildirilmiştir (Aydin, 2018).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre 24 saatlik akrilamid maruziyeti 10 µM ve üzeri konsantrasyonlarda SOD ve GPx, 100 µM ve üzeri konsantrasyonlarda ise CAT seviyelerinde anlamlı düşüşlere neden olarak TM3 Leydig hücrelerinin antioksidan kapasitesinin azalmasına neden olmuştur. Bu bağlamda TM3 hücrelerinde ROS oluşumunda görülen değişiklikler ve bozulan antioksan enzim seviyeleri yapılan diğcr *in vitro* çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Albalawi ve diğ., 2017; Aydin, 2018). Kurkumin akrilamid tarafından oluşturulan oksidatif stresi GPx ve CAT seviyelerini iyileştirerek önlemesi sisplatin ve aseton toksisitesine karşı glutasyon ve GPx aktivitelerini arttırdığı çalışmaları benzerlik göstermektedir (Dai ve diğ., 2015; İlbey ve diğ., 2009).

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, hücre homoestazisinde ve enerji bağımlı biyokimyasal mekanizmalarda rol oynayan oldukça kompleks bir süreçtir (Jin ve El Deiry, 2005). Hücrelerde çevresel toksinler ve endokrin bozucu kimyasallar gibi ajanların maruziyeti sonucunda oluşan oksidatif stres, özellikle mitokondriyal membrana hasar vererek apoptozun uyarılmasına neden olur. Memeli sistemlerinde apoptotik sinyal kaskadları temel olarak iki yol ile uyarılır: i) ölüm reseptör yolu, ii) mitokondriyal yol. Çeşitli sistemlerde ve hücrelerde akrilamid ile uyarılmış apoptoz mekanizması çalışılmıştır ve akrilamidin genellikle mitokondriyal yolu uyararak apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Pan ve diğ., 2017; Jiang ve diğ., 2018). 2,5 ve 5 mM akrilamid PC2 hücrelerinde apoptozu uyarırken, sıçan intestinal hücreleri ile gerçekleştirilen bir diğcr çalışmada 5 mM akrilamidin mitokondriyal apoptotik yolağı aktive ettiği gösterilmiştir (Pan ve diğ., 2017; Jiang ve diğ., 2018). Erkek sıçanlar ile gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalar da akrilamid maruziyetinin testis dokusunda apoptozu uyardığı rapor edilmiştir (Camacho ve diğ., 2012; Yang ve diğ., 2005). Sun ve diğcrleri (2018) yaptıkları çalışmada 1,925 mM akrilamidin

R2C Leydig hücrelerinde erken apoptozu uyardığını bildirmişlerdir. TM3 Leydig hücreleri ile daha önce gerçekleştirdiğimiz bir çalışmada akrilamidin proapoptatik ve antiapoptatik genler arasındaki dengeyi Bcl2/Bax oranının düşüşü yönünde bozarak ve kaspaz 3 aktivitesi ile p53 ekspresyonunu artırarak bozduğu gösterilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2017).

Yapmış olduğumuz bu çalışmanın sonuçlarına göre akrilamid TM3 hücrelerinde apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü uyarmaktadır. 10 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda erken apoptotik ve apoptotik hücrelerin oranı ile nekroz görülme sıklığında yukarıda bahsedilen çalışmalarda olduğu gibi anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bununla birlikte kurkumin TM3 hücrelerinde akrilamidden kaynaklanan apoptotik ve nekrotik hücre ölümü üzerinde iyileştirici bir rol oynamıştır. Bu sonuçlar kurkuminin testikuler toksisite ve apoptozu sisplatin maruziyetine karşı iyileştirdiği çalışmadaki sonuçlar ile paralellik göstermektedir (İlbey ve diğ., 2009).

Hücre iskeleti, hücreyi fiziksel ve kimyasal olarak hücre dışı matrikse ve komşu hücrelere bağlayan ve hücre bileşenlerinin organizasyonunu sağlayan, plazma membranından nükleusa kadar uzanan üç boyutlu ağısı bir yapıdır (Fletcher ve Mullins, 2010). Ökaryotiklerde hücre iskeleti hücre boyunca uzanan filamentli yapıları oluşturan üç ana protein ailesinden oluşur: i) farklı aktin izoformlarından oluşan mikrofilamentler, ii) ara filamentler, iii) tubulinlerden oluşan mikrotubuller (Ramaekers ve Bosman, 2004). Hücre şeklinin ve bütünlüğünün korunmasında hayati önem taşıyan hücre iskeleti bileşenlerinden mikrofilamentlerin ve mikrotubullerin hasara uğraması çeşitli hücre tiplerinde apoptoz görülme sıklığını arttırmaktadır (Flusberg ve diğ., 2001; Domnina ve diğ., 2002). Hücre iskeletinin kimyasal ajanlar ile bozulması hücrede moleküler seviyede değişikliklere neden olmaktadır (Blinska, 1989).

Ökaryotik hücrelerde yüksek oranda korunmuş yapısal bir protein olan aktin hücre morfolojisi, hareketlilik, üreme, doku onarımı gibi birçok mekanizmada kritik bir öneme sahiptir (Lee ve Dominguez, 2010). Aktin filamentlerinin organizasyonunda meydana gelen değişikliklerin apoptoz farklı evrelerine eşlik ettiği bilinmektedir. Bunlar apoptozun erken aşamalarında hücrelerin yuvarlaklaşması, ilerleyen evrelerde hücre mebrnında oluşan çıkıntılar ve son aşamada aktin hücre iskeletinin degradasyona uğraması ile oluşan apoptotik cisimciklerin fagositozunun gerçekleşmesi olarak sıralanmaktadır (Charras ve diğ., 2006). Aktinin apoptozun morfolojik özellikleri ile olan ilişkisi, aktinin apoptoz sinyallerinin aracısı veya başlatıcısı olabileceğine dair kuşku uyandırmaktadır. Sarmal olarak düzenlemiş tubulin monomerlerinde oluşan mikrotubuller mitoz bölünmede, hücre içi haberleşmede ve hücre hareketinde rol

oyunlar (Ramaekers ve Bosman, 2004). Yapılan çalışmalar aktin ve mikrotubullerin pek çok hücreyel olayda anahtar rol oynadığını göstermektedir.

Akrilamidin çeşitli sistemlerde hücre iskeleti organizasyonunu bozarak hücre hasarına ve apoptozu uyardığını neden olduğu gösteren *in vivo* (Recio ve diğ., 2017; Stasiak ve diğ., 2013; Yu ve diğ., 2006; Yi ve diğ., 2006) ve *in vitro* (Arocena ve diğ., 2006; Sickles ve diğ., 2007) çalışmalar bulunmaktadır. 20 ve 40 mg/kg akrilamide 8 hafta süre ile maruz bırakılan sıçanlardan izole edilen sinir hücrelerinde pelette bulunan α , β -tubulin ve aktin seviyelerinde meydana gelen değişiklikler ile akrilamid kaynaklı oluşan nöropatid ilişkilendirilmiştir (Yu ve diğ., 2006; Yi ve diğ., 2006). Sığır lens epitel hücreleri ile yapılan bir diğer çalışma 5mM akrilamide 4 saat süre ile maruz bırakılan hücrelerde vimentin, tubulin ve aktin monomerlerini işaretlemiştir ve hücre iskeleti elemanlarının üçünün de hasara uğradığını rapor etmektedir (Arocena ve diğ., 2006). Erkek üreme sisteminde akrilamidin hücre iskeleti üzerindeki etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Recio ve diğerlerinin 2017 yılında erkek sıçanlarla yaptıkları çalışmada 31 gün boyunca 12 mg/kg akrilamid maruziyeti gerçekleştirilmiştir. Sıçanlardan izole edilen testislerde aktin filamentlerinin ve kalsiyum sinyallerinin değişime uğradığı görülmüştür. Akrilamidin testiste aktin filamentleri ve kalsiyum sinyallenmesi ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinde meydana getirdiği değişikliklerin altında yatan mekanizmanın oluşturduğu protein-eklentileri ve protominlere bağlanması olduğu düşünülmektedir (Recio ve diğ., 2017).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada 1, 10, 100 ve 1000 μ M akrilamide 24 saat süre ile tek başına maruz bırakılan Leydig hücrelerinde 100 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda aktin ve tubulin filamentlerinin dejenarasyona uğraması Arocena ve diğerleri (2006) ile Recio ve diğerlerinin (2017) yaptıkları çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte kurkuminin hücre iskeleti üzerinde koruyucu etkisi olduğu görülmüştür.

Plazma membranının esas yapısal bileşenlerinden olan neksuslar (gap junction) hücre büyümesinin kontrolü, hormon yanıt verebilirliği, hücreler arası homeostazi gibi pek çok hücreyel süreçte önemli rol oynayanlar (Zhang ve diğ., 2016). Neksusların protein yapı taşları olan konneksinler, küçük moleküllerin ve iyonların hücreler arası geçişini sağlayan proteinlerdir (Li ve diğ., 2013). Memeli genomlarında farklı organ ve hücre tiplerine göre karakteristik bir yayılım gösteren 20 veya daha fazla konneksin kodlanmaktadır. Erkek üreme sisteminde en çok çalışılan konneksin olan konneksin 43 spermatogenezin sağlıklı bir şekilde

yürütülmesi, kan testis bariyerinin homeostazisi için kritik öneme sahiptir. Bunlarla birlikte Sertoli hücrelerinde meydana gelen konneksin 43 delesyonunun Leydig hücrelerinin hiperplazisi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Brehm ve diğ., 2007). Yapılan çalışmalar Leydig hücrelerinde ifade edilen tek konneksin türünün, konneksin 43 olduğunu rapor etmiştir (Points ve diğ., 2010) ancak daha sonra konneksin 36 ve konneksin 45'in de Leydig hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir (Li ve diğ., 2013). TM3 Leydig hücreleri ile gerçekleştirilen bu çalışmada artan konsantrasyona bağlı olarak azalan konneksin 43 ışımasının Leydig hücrelerinde akrilamidin neksus organizasyonuna hasar verdiğini düşündürmektedir.

MAP kinaz sinyal yolağı hücre dışı sinyalleri hücre mebranından nükleusuna taşınmasında üstlendiği görev ile bilinmektedir. Erkek üreme sisteminde MAP kinaz yolağının aktivasyonu spermatogenez sürecinin aksamasına ve testikuler hücrelerde fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bildirilmiştir (Li ve diğ., 2009). Pan ve diğerlerinin yaptığı çalışmada 2,5 ve 5 mM akrilamid 24 saat süre ile maruz bırakılan PC12 hücrelerinde JNK ve p38 fosforilasyonu artış göstererek hücrelerin apoptoza uğramasına neden olmuştur. Bununla birlikte 0,6 – 5 mM akrilamid uygulanan gruplarda ERK1/2 fosforilasyonunda azalma tespit edilmiştir (Pan ve diğ., 2017). Yapılan bir diğer çalışmada 4 saatlik 3 mM akrilamid maruziyeti fare epidermal hücrelerinde ERK fosforilasyonunu kontrol grubuna göre arttırmıştır (Lim ve diğ., 2011). Makrofaj hücreleri ile yapılan çalışmada ise düşük konsantrasyonlarda (<1 mM) uygulanan akrilamidin JNK, p38 ve ERK1/2 fosforilasyonunu arttırarak hücreleri senesense götürdüğü rapor edilmiştir (Kim ve diğ., 2014). Daha önceki raporların sonuçları ile paralel olarak, yapmış olduğumuz çalışmada 10 µM ve üzeri konsantrasyonlarda akrilamidin JNK, p38 ve ERK1/2 fosforilasyonunun arttırdığı böylelikle akrilamidin düşük konsantrasyonlarda bile MAP kinaz yolağının aktivasyonunu tetiklediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca kurkuminin akrilamid maruziyeti sonucu aktive olan MAP kinaz yolağındaki kinazların fosforilasyonunu azalttığı bulunmuştur.

Akrilamidin gösterdiği genotoksiste ve DNA hasarının mekanizması halen tam olarak bilinmemekle birlikte, genel olarak akrilamidin kimyasal yapısı gereği makromoleküllere eklenti (DNA adduct) yapması ve metaboliti olan glisidamid kaynaklı genotoksik etki gösterdiği düşünülmektedir (Nixon ve diğ., 2012). Akrilamid aminoasitlerdeki, glutatyon ve proteinlerdeki sistein-tiol gruplarını içeren nükleofillere karşı kimyasal reaktivite göstermesinden kaynaklı olarak biyolojik sistemlerde bulunan makromoleküller ile Micheal tarzı eklentiler oluşturur (Chen ve diğ., 2010). Metaboliti olan glisidamid protein ve DNA'ya

karşı akrilamide oranla çok daha yüksek bir reaktivite göstermektedir. Akrilamidin neden olduğu oksidatif stresin DNA üzerinde pirimidinlerin oksidatif modifikasyona uğraması ile ilişkilendirilmektedir. Hücrelerde akrilamid ve glisidamid kaynaklı DNA lezyonlarının tamiri için başvurulan baz kesip çıkarma onarımı DNA kırıklarının oluşmasına neden olmaktadır (Martins ve diğ., 2006). Akrilamidin sitogenetik etkileri insanlara ve deney hayvanlarına ait çeşitli hücre tiplerinde *in vivo* (Algarni, 2018; Katen ve diğ., 2016; Nixon ve diğ., 2012; Tan ve diğ., 2013; Yener ve Dikmenli, 2009) ve *in vitro* (Baum ve diğ., 2005; Blasiak ve diğ., 2004; Cao ve diğ., 2008; Chen ve diğ., 2010; Jiang ve diğ., 2007; Koyama ve diğ., 2006; Sun ve diğ., 2018) olarak DNA iplik kırıklarını tespit eden komet testi ve sitoplazmadaki küçük kromozom fragmetlerini işaretleyen bir mutajenite testi olan mikronükleus testi ile belirlenmiştir.

İnsan hepatokarsinoma hücreleri ile gerçekleştirilen iki farklı çalışmada 2,5 – 20 mM aralığında 4 farklı konsantrasyonda akrilamide 1 saat süre ile maruz bırakılan hücrelerde komet ve mikronükleus testleri gerçekleştirilmiştir. Komet testi sonuçlarına göre akrilamidin 2,5 mM konsantrasyondan itibaren kuyruk uzunluğu, kuyrukta bulunan % DNA ve kuyruk momenti parametrelerinde anlamlı artışlara sebep olurken, 24 saatlik maruziyette 0,625 mM konsantrasyonunda mikronükleus testinde pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir (Cao ve diğ., 2004; Jiang ve diğ., 2007). Akrilamidin 1 saat süre ile 0,1 - 50 μ M konsantrasyon aralığında uygulandığı insan lenfosit hücrelerinde komet kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti 0,1 μ M'dan itibaren anlamlı artış göstermesiyle birlikte akrilamid kuyruktaki % DNA miktarında 0,5 μ M'da anlamlı bir fark oluşturmuştur (Blasiak ve diğ., 2004). Koyama ve diğerlerinin (2006) insan lenfosit hücre soyu ile yapılan bir diğer çalışmada ise 2,5 – 14 mM akrilamid maruziyetinde komet kuyruk uzunluğunda anlamlı bir fark bulunmadığı ancak mikronükleus sayısında artış olduğu bildirilmiştir. Kültüre edilmiş akciğer hücreleri ile yapılan çalışmalarda 1000 – 6000 μ M konsantrasyonlarında 24 saat akrilamid uygulaması sonucunda mikronükleus sayısında artış, 2000 μ M konsantrasyonundan itibaren kromozom aberasyonu ve nükleer bölünme indeksinde artan konsantrasyona bağlı bir azalma olduğu görülmüştür (Baum ve diğ., 2005; Martins ve diğ., 2006). Chen ve diğerlerinin (2010) insan astrositom hücreleri ile gerçekleştirdikleri bir diğer çalışmada ise 48 saatlik akrilamid maruziyetinde komet kuyruk uzunluğu ve kuyrukta bulunan % DNA 0,5 mM akrilamid uygulanan gruplarda artış gösterirken kuyruk momenti 2 mM konsantrasyonunda anlamlı olarak artmıştır. Akrilamidin genotoksik etkilerini araştıran çok farklı hücre tipleri ile gerçekleştirilmiş çalışmalar olmasına rağmen erkek üreme sisteminde oluşturduğu genotoksiste ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Uzun süreli akrilamid maruziyetinin erkek fareler üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada 6, 9 ve 12 ay süre ile akrilamid uygulanan farelerden izole edilen spermatsositlerde kuyruktaki % DNA miktarları karşılaştırıldığında 6 aylık maruziyette 1 µg/ml akrilamide maruz kalan gruplarda anlamlı artış gözlenmişken 9 aylık maruziyette 0,001 µg/ml dozundan itibaren istatistiksel anlam olduğu bildirilmiştir (Nixon ve diğ., 2012). Bir diğer çalışmada ise 6 ay süre ile 1 µg/ml akrilamid uygulanan erkek farelerin yavrularından elde edilen spermatozoalarda genotoksik hasar olduğu komet testi ile belirlenmiştir (Katen ve diğ., 2016). Kültüre edilmiş sıçan Leydig hücrelerinde 1,925 mM ve 3,250 mM akrilamidin 24 saat süre ile uygulanması sonucunda komet kuyruk uzunluğu, kuyruktaki % DNA ve Olive kuyruk momenti değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu rapor edilmiştir (Sun ve diğ., 2018).

Mikronükleus ve komet testleri ile akrilamidin genotoksik etkilerinin ve kurkuminin koruyucu potansiyelinin araştırıldığı bu çalışmada akrilamidin tek başına uygulandığı gruplarda yukarıdaki benzer çalışmalarda görüldüğü gibi komet testi bulgularından kuyruktaki % DNA miktarında 10 µM ve kuyruk uzunluğu ile Olive kuyruk momentinde 100 µM konsantrasyondan itibaren artış izlenmiştir. Bununla birlikte nükleer bölünme indeksi sonuçları hücre canlılığı sonuçlarını da destekler nitelikte olup Baum ve diğerlerinin (2005) akciğer hücreleri ile yaptıkları çalışmada olduğu gibi artan akrilamid konsantrasyonuna bağlı olarak düşüş göstermektedir. Akrilamidin 100 ve 1000 µM konsantrasyonlarında görülen mikronükleus sıklığı çeşitli hücre tiplerinde akrilamidin mikronükleus testinde pozitif sonuç verdiği çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Algarni, 2018; Baum ve diğ., 2005; Koyama ve diğ., 2006). Akrilamid ve kurkuminin birlikte uygulandığı gruplarda ise, TM3 Leydig hücrelerinde genotoksik etkide anlamlı azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Bu durum daha önce akrilamidin yüksek konsantrasyonlarına karşı karaciğer karsinoma hücrelerinde (Cao ve diğ., 2008) ve quinoaseton maddesine karşı hepatosit hücrelerinde (Dai ve diğ., 2015) kurkuminin anti-genotoksik etkilerini inceleyen çalışmaların sonuçları ile örtüşmektedir.

Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında akrilamidin hücre fonksiyonları üzerindeki toksitesinin ve kurkuminin olası iyileştirici etkilerinin ortaya çıkarılmasında erkek üreme sistemi için esas olan Leydig hücreleri *in vitro* model olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar akrilamidin hücre canlılığını maksimum %80 seviyelerine indiren düşük konsantrasyonlarda bile Leydig hücrelerinin hücresel fonksiyonlarında ve hücre iskeletinde hasara sebep olduğunu, ROS oluşumunu tetikleyerek lipid peroksidasyonuna yol açtığı böylelikle Leydig hücrelerinde

antioksidan-oksidan dengesini bozduğunu göstermektedir. Ayrıca oksidatif stresi uyarması ve MAPK yolağını aktive etmesiyle ilişkili olarak Leydig hücrelerinde apoptozu tetiklediğini ve genotoksisiteye neden olduğunu göstermektedir. Leydig hücrelerinde akrilamidin oluşturduğu bu hasara karşı kurkuminin antioksidan olarak koruyucu bir etki gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.



KAYNAKLAR

- Aydin, Y., 2018, Acrylamide and its metabolite glycidamide can affect antioxidant defenses and steroidogenesis in Leydig and Sertoli cells, *Toxicological and environmental chemistry*, 100 (2), 247-257.
- 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, 543-553.
- Alegre, E., Sammamed, M., Fernandez-Landazuri, S., Zubiri, L., Gonzalez, A., 2015, Circulating biomarkers in malignant melanoma, *In advances in clinical chemistry*, 69, 47-89.
- Algarni, A.A., 2018, Genotoxic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells, *Caryologia*, 71(2), 160-165.
- Amrein, T.M., Andres, L., Escher, F., Amadò, R., 2007, Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options, *Food additives and contaminants*, 24sup1, 13-25.
- Amrein, T.M., Lukac, H., Andres, L., Perren, R., Escher, F., Amadò, R., 2005, Acrylamide in roasted almonds and hazelnuts, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 7819-7825.
- Araldi, R.P., de Melo, T.C., Mendes, T.B., de Sá Júnior, P.L., Nozima, B.H.N., Ito, E.T., de Cassia Stocco, R., 2015, Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 72, 74-82.
- Arocena, M., 2006, Effect of acrylamide on the cytoskeleton and apoptosis of bovine lens epithelial cells, *Cell biology international*, 30 (12), 1007-1012.
- Atay, N.Z., Çalgan, D., Özakat, E., Varnalı T., 2005, Acrylamide and glycidamide adducts of guanine, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 728: 249-251.
- Atmaca, E., ve Aksoy, A., 2009. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 20 (2), 79 – 83.
- Baum, M., Fauth, E., Fritzen, S., Herrmann, A., Mertes, P., Merz, K., 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.
- Becalski, A., Lau, B., Lewis, D., Seaman, S., 2003, Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 802-808.
- Besaratnia, A., Pfeifer, G.P., 2003, Weak yet distinct mutagenicity of acrylamide in mammalian cells, *Journal of the national cancer institute*, 95: 12
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012, Oxidative stress and antioxidant defense, *World allergy organization journal*, 5 (1), 9.

- Blasiak, J., Gloc, E., Wozniak, K., Czechowska, A., 2004, Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes, *Chemico-biological interactions*, 149 (2-3), 137-149.
- Brehm, R., Zeiler, M., Rüttinger, C., Herde, K., Kibschull, M., Winterhager, E., Konrad, L. 2007. A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *The American journal of pathology*, 171 (1), 19-31.
- Camacho, L., Latendresse, J.R., Muskhelishvili, L., Patton, R., Bowyer, J.F., Thomas, M., Doerge, D.R., 2012, Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of fischer 344 rats, *Toxicology letters*, 211 (2), 135–143.
- Cao, J., Liu, Y., Jia, L., Jiang, L.P., Geng, C.Y., Yao, X.F., 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.
- Charras, G.T., Hu, C.K., Coughlin, M., Mitchison, T.J., 2006, Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs, *The journal of cell biology*, 90, 175:477
- Chen, J.H., Wu, K.Y., Chiu, M., Tsou, T.C., Chou, C.C., 2009, Acrylamide-induced astroglial and apoptotic responses in human astrocytoma cells, *Toxicology in vitro*, 23(5), 855-861.
- Chen, J.H., Tsou, T.C., Chiu, I.M., Chou, C.C., 2010, Proliferation inhibition, DNA damage, and cell-cycle arrest of human astrocytoma cells after acrylamide exposure, *Chemical research in toxicology*, 23 (9), 1449-1458.
- Chen, W., Feng, L., Shen, Y., Su, H., Li, Y., Zhuang, J., Zhang, L., Zheng, X., 2013, Myricitrin inhibits acrylamide-mediated cytotoxicity in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress, *BioMed research international*, 2013, 1-7.
- Christensen A.K., 2007, *History of Leydig cell Research*, Contemporary Endocrinology: The Leydig Cell in Health and Disease In: Payne A. H., Hardy M. P. (ed.), Part 1 Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 3-33.
- Doerge, D.R., Young, J.F., Chen, J.J., DiNovi, M.J., Henry, S.H., 2008, Using dietary exposure and physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in human risk extrapolations for acrylamide toxicity, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (15), 6031–6038.
- Deogade, S., Ghate, S., 2015, Curcumin: Therapeutic applications in systemic and oral health, *International journal of biological & pharmaceutical research*, 6 (4), 281–290.
- Dobrovolsky, V.N., Pacheco-Martinez, M.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.
- Domnina, L., Ivanova, O., Cherniak, B., Skulachev, V., Vasiliev, J., 2002, Effects of the inhibitors of dynamics of cytoskeletal structures on the development of apoptosis induced by the tumor necrosis factor, *Biochemistry (Moscow)*, 67 (7), 737-746.

- Eastmond, D.A., Tucker, J.D., 1989, Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody, *Environmental and molecular mutagenesis*, 13, 34–43.
- ECVAM, 2013. EURL ECVAM Strategy to Avoid and Reduce Animal use in Genotoxicity Testing. (2013) JRC Scientific and Policy Report.
- Ellis, R.E., Yuan, J., Horvitz, H.R., 1991, Mechanisms and functions of cell death, *Annual review of cell and developmental biology*, 7, 663-698.
- European Food Safety Authority. (2014). Refined exposure assessment for curcumin (E 100). *European food safety authority journal*, 12 (10), 3876
- Evans, H.J., 1997, Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view, *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 392 (1), 5-10.
- Fenech, M., 2007, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature protocols*, 2 (5), 1084.
- Fennell, T.R., Sumner, S.C.J., Snyder, R.W., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W.E., Friedman, M., 2005, Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans, *Toxicological science*. 85 (1), 447–459.
- Fletcher, D.A., Mullins R.D., 2010, Cell mechanics and the cytoskeleton, *Nature*, 463, 485–492.
- Flusberg, D., Numaguchi, Y., Ingber, D., 2001, Cooperative control of akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells, *Molecular biology of the cell*, 12 (10), 3087-3094.
- Food Drink Europe. "Acrylamide toolbox 2013." (2013).
- Friedman, M., 2015, Acrylamide: inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans, *Food & function*, 6 (6), 1752-1772.
- Friedman, M., 2003, Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide: a review, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (16), 4504–4526.
- Gartner, L.P ve Hiatt, J.L., 2015, *Cell biology and histology*, 7th ed., BRS, Maryland
- Gharsalli, T., 2016, Comet Assay on Toxicogenetics. Several Studies in Recent Years on Several Genotoxicological Agents, *Journal of environmental and analytical toxicology*, 6 (6), 418.
- Girma, K.B., Lorenz V., Blaurock, S., Edelmann, F., 2005, Coordination chemistry of acrylamide, *Coordination chemistry reviews*, 249, 1283-1293.

- Giannessi, F., Giambelluca, M.A., Grasso, L., Scavuzzo, M.C., Ruffoli, R., 2008, Curcumin protects Leydig cells of mice from damage induced by chronic alcohol administration, *Medical science monitor*, 14 (11), 237-242.
- Gouda, S.G., Khalil, M.S., Naim, M.M., 2011, Curcumin protects against testicular damage and genotoxicity induced by acrylamide in male albino mice, *Egyptian journal of histology*, 34 (2), 333-345.
- Haider, S.G., 2004, Cell biology of Leydig cells in the testis, *International review of cytology*, 233 (4), 181-241.
- Hales, D.B., 2002, Testicular Macrophage Modulation of Leydig Cell Steroidogenesis, *Journal of reproductive immunology*, 57 (1), 3-18.
- Hardy P.M., Chen G., Ge R., 2008. *The Role of Leydig cell in spermatogenic function*, Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, In: Cheng C.Y. (ed.), Chapter 14, Landes Bioscience and Springer Science Business Media, 255-269.
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017a, Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species, *Cellular physiology and biochemistry*, 44(2), 532-553.
- He, Y., Tan, D., Mi, Y., Bai, B., Jiang, D., Zhou, X., Ji, S., 2017b, Effect of epigallocatechin-3-gallate on acrylamide-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells, *Human experimental toxicology*, 36 (10), 1087-1099.
- Hosseini, A., Hosseinzadeh, H., 2018, Antidotal or protective effects of *Curcuma longa* (turmeric) and its active ingredient, curcumin, against natural and chemical toxicities: A review, *Biomedicine and pharmacotherapy*, 99, 411-421.
- Hunter T., 2000, Signaling and beyond, *Cell*, 100, 113–27.
- IARC, 1994, Acrylamide In Some Industrial Chemicals. Vol 60 of IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 389–441. Lyon: World Health Organization.
- Ilbey, Y.O., Ozbek, E., Cekmen, M., Simsek, A., Otunctemur, A., Somay, A., 2009, Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Human reproduction*, 24, 1717–1725.
- Jiang, L., Cao, J., An, Y., Geng, C., Qu, S., Jiang, L., Zhong, L. 2007, Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells, *Toxicology in vitro*, 21 (8), 1486-1492.
- Jiang, G., Zhang, L., Wang, H., Chen, Q., Wu, X., Yan, X., Xie, M., 2018, Protective effects of a *Ganoderma atrum* polysaccharide against acrylamide induced oxidative damage via a mitochondria mediated intrinsic apoptotic pathway in IEC-6 cells, *Food & function*, 9 (2), 1133-1143.

- Katen, A.L., Stanger, S.J., Anderson, A.L., Nixon, B., Roman, S.D., 2016, Chronic acrylamide exposure in male mice induces DNA damage to spermatozoa; Potential for amelioration by resveratrol, *Reproductive Toxicology*, 63, 1-12.
- Kermani-Alghoraishi, M., Anvari, M., Talebi, A.R., Amini-Rad, O., Ghahramani, R., Miresmaili, S.M., 2010, The effects of acrylamide on sperm parameters and membrane integrity of epididymal spermatozoa in mice, *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology*, 153 (1), 52–55.
- Kerr J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer* 26, 239–571.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002, Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicologic pathology*, 30 (6), 620-650.
- Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Honma, M., 2006, Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 603 (2), 151-158.
- Kulaksız, G. Sancar, A., 2007, Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser, *Turk Journsl of Biochemistry*, 32 (3), 104-111.
- Lakshmi, D.K., Gopinath, G. Jayanthi, S. Anjum, D. Prakash, G. Sudhandiran, 2012, Ameliorating Effect of Fish Oil on Acrylamide Induced Oxidative Stress and Neuronal Apoptosis in Cerebral Cortex, *Neurochemical Research* 37 (9),1859–1867.
- Lao, C. D., Ruffin, M.T., Normolle, D., Heath, D.D., Murray, S.I., Bailey, J.M., Brenner, D.E., 2006, Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC complementary and alternative medicine*, 6 (1), 10.
- Lawen, A. 2003, Apoptosis—an introduction, *Bioessays*, 25 (9), 888-896.
- Lee, S.H., Dominguez, R., 2010, Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells, *Molecules and cells*. 29, 311–325.
- Li, D., Sekhon, P., Barr, K.J., Márquez-Rosado, L., Lampe, P. D., Kidder, G.M., 2013, Connexins and steroidogenesis in mouse Leydig cells, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 91 (2), 157-164.
- LoPachin, R.M., 2002, The role of fast axonal transport in acrylamide pathophysiology: Mechanism or epiphenomenon? *Neurotoxicology* 23, 253-257
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002, The protein kinase complement of the human genome, *Science*, 298, 1912–1934.
- Martins, C., Oliveira, N.G., Pingarilho, M., Gamboa da Costa, G., Martins, V., Marques, M. M., Gaspar, J.F. 2006, Cytogenetic damage induced by acrylamide and glycidamide in

- mammalian cells: correlation with specific glycidamide-DNA adducts, *Toxicological sciences*, 95 (2), 383-390.
- Martin, L.J., 2016, Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation, *Molecular reproduction and development*, 83 (6), 470-487.
- Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., Márquez, J., 2012, Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Archives of toxicology*, 86 (11), 1649-1665.
- Mescher, L., 2015, *Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap*, Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul, ISBN: 9786053351429
- Mohamed S.A.K.S, Sabita, U., Rajendra S.V., Raman D., 2017, Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods, *Global journal of Pharmacy & pharmaceutical Science*, 1(5)
- Morrison, D.K., 2012, MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4 (11), a011254.
- Mottram, D.S., Wedzicha B.L., Dodson A.T., 2002, Food chemistry: acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature*, 419, 448-449.
- Nagarathna, P.K.M., Wesley, M.J., Reddy, P.S., Reena, K., 2013, Review on genotoxicity, its molecular mechanisms and prevention, *International journal of pharmaceutical sciences review and research*, 22 (1), 236-43.
- Naik, R.S., Mujumdar, A.M., Ghaskadbi, S., 2004, Protection of liver cells from ethanol cytotoxicity by curcumin in liver slice culture in vitro, *Journal of ethnopharmacology*, 95 (1), 31-37.
- Natarajan, A.T., 1993, Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. *Environ health perspect*, 101(3), 225- 229.
- Nixon, B.J., Stanger, S.J., Nixon, B., Roman, S.D., 2012, Chronic exposure to acrylamide induces DNA damage in male germ cells of mice, *Toxicological sciences*, 129 (1), 135-145.
- Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E., 1990, Heterogeneity in radiationinduced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the “comet” assay, *Radiation research*, 122, 86 –94.
- Patlevič, P., Vašková, J., Švorc Jr, P., Vaško, L., & Švorc, P. 2016, Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases, *Integrative medicine research*, 5 (4), 250-258.
- Payne, A.H., Youngblood, G.L., 1995, Regulation of Expression of Steroidogenic Enzymes in Leydig Cells, *Biology of Reproduction*, 52, 217-225.

- Pingot D., Pyrzanowski, K., Michałowicz, J., Bukowska, B., 2013, Toxicity of acrylamide and its metabolite - glycidamide (in Polish). *Medycyna Pracy*, 64, 259-270.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., Seger, R., 2011, The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et biophysica acta*, 1813, 1619–1633.
- Rachwał, D., Nebesny, E., 2012, Reduction of acrylamide content in food products. *Bromat Chemical Toksykology*, 2, 219-227.
- Corvi, R., Madia, F., 2017, In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? *Food and chemical toxicology*, 106, 600-608.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014.
- Raju, J., Roberts, J., Taylor, M., Patry, D., Chomyshyn, E., Caldwell, D., Mehta, R., 2015, Toxicological effects of short-term dietary acrylamide exposure in male F344 rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39 (1), 85-92.
- Ramaekers, F.C.S., Bosman, F.T., 2004, The cytoskeleton and disease. *The Journal of Pathology: A journal of the pathological society of great britain and Ireland*, 204 (4), 351-354.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N., 2006, Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113, 189-207.
- Recio, L., Friedman, M., Marroni, D., Maynor, T., Chepelev, N.L., 2017, Impact of acrylamide on calcium signaling and cytoskeletal filaments in testes from F344 rat, *International journal of toxicology*, 36 (2), 124-132.
- Rodríguez-Ramiro, I., Ramos, S., Bravo, L., Goya, L., Martín, M.Á. 2011, Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway, *The Journal of nutritional biochemistry*, 22 (12), 1186-1194.
- Roskoski Jr, R., 2012, ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*, 66 (2), 105-143.
- Rydberg, B., Johanson, K.J., 1978, Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In *DNA repair mechanisms* (pp. 465-468). Academic Press.
- Şen, E., Tunali, Y., Erkan, M., 2015, Testicular Development of Male Mice Offsprings Exposed to Acrylamide and Alcohol During the Gestation and Lactation Period, *Human & experimental toxicology*, 34 (4): 401–414.

- Settels, E., Bernauer, U., Palavinskas, R., 2008, Human CYP2E1 mediates the formation of glycidamide from acrylamide. *Archives of toxicology*, 82, 717–27.
- Shan, X., Li, Y., Meng, X., Wang, P., Jiang, P., Feng, Q., 2014, Curcumin and (–)-epigallocatechin-3-gallate attenuate acrylamide-induced proliferation in HepG2 cells. *Food and chemical toxicology*, 66, 194-202.
- Sharma, P., Singh, R., 2010, Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male Wistar rats, *Bulletin of environmental contaminant and toxicology* 84 (4), 378-384.
- Sickles, D.W., Stone, J.D., Friedman, M.A., 2002, Fast axonal transport: A site of acrylamide neurotoxicity? *Neurotoxicology* 23, 223-251.
- Sickles, D.W., Sperry, A.O., Testino, A., Friedman, M., 2007, Acrylamide effects on kinesin-related proteins of the mitotic/meiotic spindle, *Toxicology and applied pharmacology*, 222 (1), 111-121.
- Sies, H., 1991, Oxidative stress: from basic research to clinical application, *The American journal of medicine*. 91 (3), S31-S38.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A., 1988, Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175, 184–191.
- Son, Y., Cheong, Y.K., Kim, N.H., Chung, H.T., Kang, D.G., Pae, H.O. 2011, Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways? *Journal of signal transduction*, 2011.
- Song, H.X., Wang, R., Geng, Z.M., Cao, S.X., Liu, T.Z., 2008, Subchronic exposure to acrylamide affects reproduction and testis endocrine function of rats. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 14 (5), 406–410.
- Song, G., Liu, Z., Wang, L., Shi, R., Chu, C., Xiang, M., Tian, Q., Liu, X., 2017, Protective effects of lipoic acid against acrylamide-induced neurotoxicity: involvement of mitochondrial energy metabolism and autophagy. *Food Function*, 8 (12), 4657-4667.
- Stadler R., Blank I., Varga N., Robert F., Hau J., Guy P.A., 2002, Acrylamide from Maillard reaction products, *Nature*, 419, 449-450.
- Sun, J., Li, M., Zou, F., Bai, S., Jiang, X., Tian, L., Ou, S., Jiao, R., Bai, W., 2018, Protection of cyanidin-3-O-glucoside against acrylamide-and glycidamide-induced reproductive toxicity in leydig cells, *Food and chemical toxicology*. 119, 268-274.
- Svechnikov K., Izzo G., LAndreh L., Weisser J., Söder O., 2010, Endocrine Disruptors and Leydig cell Function, *Journal of biomedicine and biotechnology*, 684504
- Swedish National Food Administration. (2002). Information about acrylamide in food. www.slv.se.

- Tan, D., Li, L., Wang, S., Wei, B., Zhang, X., Sun, B., Ji, S., 2013, The cytogenetic effects of acrylamide on *Carassius auratus* peripherial blood cells, *Food and chemical toxicology*, 62, 318-322.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Törnqvist, M., 2002, Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal of agriculture food Chemistry*, 50 (17): 4998–5006.
- Tice, R., Vasquez, M. 1998, Protocol for the application of the pH> 13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. *Sigma (x-100)*, 503, 465-8353.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Sasaki, Y. F., 2000, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3): 206-221.
- Trainer T.D., 1995, *Testes and Excretory Duct System*, Histology for Pathologists, In: Mills S.E. (ed.), Chapter 37, Raven Press, Philadelphia.
- United States Enviromental Protection Agency, 2007, Toxicological Review Of Acrylamide, *Enviromental protection agency*, 79-06-1.
- Veza, T., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Utrilla, M., Rodriguez-Cabezas, M., Galvez, J. 2016, Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review, *Nutrients*, 8 (4), 211.
- Wilson M.D., 2001, Prospects for research for disorders of the endocrine system, *JAMA: The journal of the american medical association*, 285 (5), 624-627.
- Xu, G., Shi, Y., 2007, Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis, *Cell research*, 17 (9), 759.
- Yang, H.J., Lee, S.H., Jin, Y., Choi, J.H., Han, D.U., Chae, C., Lee, M.H., Han, C.H., 2005, Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reproductive Toxicology*, 19 (4), 527–534.
- Ye, L., Z. J. Su, R. S. Ge., 2011, Inhibitors of Testosterone Biosynthetic and Metabolic Activation Enzymes, *Molecules*, 16 (12): 9983–10001.
- Yener, Y., Dikmenli, M. 2009, Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment, *Food and chemical toxicology*, 47 (8), 2120-2123.
- Yi, C., Xie, K., Song, F., Yu, L., Zhao, X., Li, G., Yu, S. 2006, The changes of cytoskeletal proteins in plasma of acrylamide-induced rats, *Neurochemical research*, 31 (6), 751-757.
- Yildizbayrak, N., Erkan, M., 2018, Acrylamide disrupts the steroidogenic pathway in Leydig cells: possible mechanism of action, *Toxicological and environmental chemistry* 100 (2), 235-246.

- Yilmaz, B.O., Yildizbayrak, N., Aydin, Y., Erkan, M., 2017, Evidence of acrylamide-and glycidamide-induced oxidative stress and apoptosis in leydig and sertoli cells, *Human and experimental toxicology*, 36 (12), 1225–1235.
- Yu, S., Son, F., Yu, J., Zhao, X., Yu, L., Li, G., Xie, K., 2006, Acrylamide alters cytoskeletal protein level in rat sciatic nerves, *Neurochemical research*, 31 (10), 1197-1204.
- Zamani, E., Shaki, F., AbedianKenari, S., Shokrzadeh, M., 2017, Acrylamide induces immunotoxicity through reactive oxygen species production and caspase-dependent apoptosis in mice splenocytes via the mitochondria-dependent signaling pathways. *Biomedicine pharmacotherapy*, 94, 523-530.
- Želazna, K., Rudnicka, K., Tejs, S. 2011, In vitro micronucleus test assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environmental Biotechnology*, 7, 70-80.
- Zhang, J., Jin, S., Zhao, J., Li, H. 2016, Effect of dibutyl phthalate on expression of connexin 43 and testosterone production of leydig cells in adult rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 47, 131-135.
- Zhao, H., 2015, Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review.
- Zödl, B., Schmid, D., Wassler, G., Gundacker, C., Leibetseder, V., Thalhammer, T., Ekmekcioglu, C., 2007, Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicology*, 232 (1-2), 99-108.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nebahat YILDIZBAYRAK
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	05.07.2013

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

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

Makale ve Bildiriler
<p>Makaleler</p> <p>Orta-Yılmaz B., Yildizbayrak N., Aydın Y., Erkan M., Evidence of acrylamide and glycidamide induced oxidative stress and apoptosis in Leydig and Sertoli cells, <i>Human and Experimental Toxicology</i>, (2017)</p> <p>Yildizbayrak N., Erkan M.B., Acrylamide disrupts the steroidogenic pathway in Leydig cells: possible mechanism of action, <i>Toxicological and Environmental Chemistry</i>, (2018)</p> <p>Orta-Yılmaz B., Yildizbayrak N., Erkan M. Sodium arsenite-induced detriment of cell function in Leydig and Sertoli cells: the potential relation of oxidative damage and antioxidant defense system, <i>Drug and Chemical Toxicology</i>, (2018)</p>

Perker M.C., Orta Yılmaz B., **Yıldızbayrak N.**, Aydın Y., Erkan M. Protective effects of curcumin on biochemical and molecular changes in sodium arsenite-induced oxidative damage in embryonic fibroblast cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, e22320, (2019)

Yıldızbayrak N., Erkan M., Therapeutic effect of curcumin on acrylamide induced apoptosis mediated by MAPK signaling pathway in Leydig cells, *Journal of Biochemichal and Molecular Toxicology*, (2019).

Bildiriler

Orta-Yılmaz B., **Yıldızbayrak N.**, Erkan M*. Effects of Acrylamide and Glycidamide on Antioxidant Systems and Steroidogenic Enzymes on TM4 Sertoli Cell, 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, p. 136, Prag, ÇEK CUMHURİYETİ, 24-28 Ağustos 2014.

Orta-Yılmaz B., **Yıldızbayrak N.**, Erkan M*. "Arsenic Can Effect Leydig Cell Viability And Oxidative Damage In Vitro", 51st Congress of European Societies of Toxicology Bridging Science For Safety, Porto, PORTEKIZ, 13-16 Eylül 2015, vol.238, no.2, pp.135-135.

Yıldızbayrak N., Erkan M.B., "Effects of Curcumin on Acrylamide Induced Oxidative Damage In Leydig Cells", 3rd International Congress on Environmental Researches and Technology (ICERAT), Belgrad, SIRBISTAN, 8-12 Kasım 2017, pp.1-1

Yıldızbayrak N., Erkan M.B., "Therapeutic Effect of Curcumin on Acrylamide Induced Apoptosis Mediated by Mitogen Activated Protein Kinases Signaling Pathway in Leydig Cells", International Congress on Engineering and Life Science, KASTAMONU, TÜRKIYE, 26-29 Nisan 2018, pp.1-1

Orta Yılmaz B., Aydın Y., **Yıldızbayrak N.**, Perker M.C., Erkan M.B., "Anti-Oxidative Effects of Curcumin on Sodium Arsenite Induced Oxidative Damage in 3T3 Embryonic Fibroblast Cells", International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara Türkiye, 26-27 Nisan 2018, vol.1, no.1, pp.356-356

Fatih Dikmen, **Nebahat Yıldızbayrak**, Vahap Eldem, Melike Erkan The Comprehensive Characterization of Segmental Duplication in Zebrafish Genome International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences 21-23 November 2018 Ankara – Turkey