

## ÖZET

Doktora Tezi

### AKRİLAMİT UYGULANAN SIÇANLARIN KEMİK İLİĞİ HÜCRELERİNDE MİTOTİK AKTİVİTE İLE EMPERİPOLEZ VE MİKRONÜKLEUS SIKLIĞININ BELİRLENMESİ

Yeşim YENER  
Selçuk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Musa DİKMENLİ

2008, 101 Sayfa

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Musa DİKMENLİ  
Prof. Dr. Turan GÜVEN  
Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK  
Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK  
Prof. Dr. Haydar ÖZTAŞ

Bu çalışmada, karbonhidrat bakımından zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta pişirilmeleri esnasında oluşan akrilamitin, sıçan kemik iliğinde megakaryositik emperipolez ve mitotik aktivite ile mikronükleus sıklığına etkisi incelenmiştir. Çalışma boyunca 8 haftalık *Sprague Dawley* ırkı erkek albino sıçanlar kullanılmıştır. Megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesinin ve mitotik aktivitenin belirlenmesi için; 30, 45 ve 60 mg/kg dozlarındaki akrilamit gavaj yolu ile sıçanlara beş ardışık gün boyunca uygulanmıştır. Son uygulamadan 24 saat sonra incelenen kemik iliği numunesinde, sadece uygulanan en yüksek dozun megakaryositik emperipolezin yoğunluğunu önemli derecede azalttığı, megakaryositler tarafından yutulan hücrelerin daha çok nötrofil granülositler olduğu ve megakaryositler ve bunlar tarafından yutulan hücrelerde morfolojik dejenerasyonun meydana gelmediği tespit edilmiştir. Mitotik aktivitenin belirlenmesi için yapılan çalışmada, sadece uygulanan 45 ve 60 mg/kg'lık akrilamit dozlarının sıçan kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerini önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. Akrilamit uygulaması kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerinde azalmaya bağlı olarak, megakaryositik emperipolez yoğunluğunu önemli derecede düşürmüştür.

Mikronükleus sıklığının belirlenmesinde ise, 125, 150 ve 175 mg/kg dozlarındaki akrilamit sıçanlara gavaj yolu ile tek doz olarak uygulanmış ve uygulamadan 48 saat sonra kemik iliği numunesi incelendiği zaman, mikronükleuslu

polikromatik eritrositlerin sayılarında önemli derecede artış belirlenmiş ve kemik iliği hücrelerinde sitotoksik etki meydana getirdiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Akrilamit, kemik iliği, megakaryositik emperipolez, mitotik aktivite, mikronükleus test.

**ABSTRACT****PhD Thesis****THE DETERMINATION OF MITOTIC ACTIVITY, MEGAKARYOCYIC  
EMPERİPOLESIS AND MICRONUCLEUS DENSITY IN RATS  
ADMINISTRATED ACRYLAMIDE****Yeşim YENER****Selçuk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology****2008, 101 Page****Supervisor: Assist. Prof. Dr. Musa DİKMENLİ  
Prof. Dr. Turan GÜVEN  
Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK  
Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK  
Prof. Dr. Haydar ÖZTAŞ**

In this study it was aimed that the effect of acrylamide, formed from carbohydrate rich foods during cooked at high temperatures, on megakaryocytic emperipolesis, mitotic activity and micronucleus frequency from rat bone marrow. Throughout this study, 8-week-old male *Sprague Dawley* strain rats were used. To determine the incidence of megakaryocytic emperipolesis and mitotic activity 30, 45 and 60 mg/kg b.w. acrylamide dosages were gavaged to rats for five consecutive days. By investigating bone marrow sample after 24 hours from last application, it was found that only the highest dosage significantly decreased the incidence of megakaryocytic emperipolesis and it was also observed the types of marrow cells engulfed by megakaryocytes were mostly neutrophil granulocytes and both megakaryocytes and engulfed cells didn't show morphologically degenerations. In the determination of mitotic activity, it was found that only 45 and 60 mg/kg b.w. acrylamide dosages significantly caused to decrease the mitotic activity of rat bone marrow cells. In the end of the study, it was observed that the application of acrylamide significantly decreased the incidence of megakaryocytic emperipolesis depending on the decreasing mitotic activity of bone marrow cells.

For the determining of micronucleus frequency 125, 150 and 175 mg/kg b.w. acrylamide dosages were gavaged to rats as a single dose and by examining the bone marrow sample after 48 hours from the application, it was observed that every dosage significantly increased the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and also showed sitotoxic effect on bone marrow cells.

**Keywords:** Acrylamide, bone marrow, megakaryocytic emperipolesis, mitotic activity, micronucleus test.

## ÖNSÖZ

Akrilamit poliakrilamit üretiminde kullanılan bir monomerdir. Poliakrilamit, moleküler biyolojide kullanılan Poliakrilamit Jel Elektroforez (PAGE) tekniğinin en önemli maddesi olup, protein ve DNA dizilerinin ayrıştırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca bu madde içme ve atık suların arıtımında, kozmetikte, yapıştırıcılarda, vernik ve boyalarda, kâğıt üretiminde ve asfalt üretiminde de kullanılır. Akrilamitin son zamanlarda karbonhidrat bakımından zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta pişirilmeleri esnasında kendiliğinden oluştuğunun tespit edilmesi ve bunun gıdalarla birlikte farklı oranlarda vücuda girmesi akrilamite olan ilgiyi arttırmış ve bu maddenin bilinmeyen yönlerinin aydınlatılması ve oluşturabileceği risklerin saptanması için çalışmalar başlatılmıştır.

Mikronükleus testi, mutajenler ve klastojenler tarafından indüklenen DNA hasarının belirlenmesinde hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kullanılan sitogenetik bir testtir.

Megakaryositik emperipolez ise son yıllarda ilgi çeken tartışmalı bir konudur. Megakaryositik emperipolez, megakaryositlerin çeşitli kemik iliği hücrelerini içine alması veya yutması şeklinde tanımlanmaktadır.

Bu çalışmada normal ve akrilamit uygulanan *Sprague Dawley* cinsi sıçanlarda megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesi ve kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerinin bu olayın olması üzerinde bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca mikronükleus test yöntemi kullanılarak akrilamitin, sıçanlarda da klastojenik etki gösterip göstermediği araştırılmıştır.

Bu araştırma “Akrilamit uygulanan sıçanların kemik iliği hücrelerinde mitotik aktivite ile emperipolez ve mikronükleus sıklığının belirlenmesi” isimli doktora tez projesi haline getirilmiş ve Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 06101002 nolu proje ile desteklenmiştir.

Araştırmanın gerçekleştirilmesinde her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Musa DİKMENLİ’ye, tez izleme komitemde olup, engin bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim Sayın Hocam Prof. Dr. Turan GÜVEN’e ve

istediğim her zaman değerli vaktini ayırıp bana yol gösteren Sayın Hocam Prof. Dr. Haydar ÖZTAŞ’a içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmamın her aşamasında katkılarını esirgemeyen can dostum Arş. Gör. Sema ÖZKADİF’e, maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim canım anneme ve babama ve son olarak da tez çalışmam süresince bana göstermiş olduğu sonsuz sabır ve yardımlarından dolayı sevgili eşim Dünder YENER’e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

### **Sayfa No:**

|                                                                                                            |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                                                  | i    |
| ABSTRACT.....                                                                                              | iii  |
| ÖNSÖZ.....                                                                                                 | iv   |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                                           | vi   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                       | viii |
| TABLolar DİZİNİ.....                                                                                       | x    |
| KISALTMALAR.....                                                                                           | xii  |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                              | 1    |
| 1.1. Maillard Reaksiyonu İle Akrilamit Oluşumunun Mekanizması.....                                         | 2    |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....                                                                                 | 13   |
| 2.1. Akrilamitin Vücut İçerisindeki Dağılımı ve Metabolizması.....                                         | 13   |
| 2.1.1. Akrilamitin DNA ve Hemoglobin komplekslerini oluşturmaları.....                                     | 16   |
| 2.2. Megakaryositik Emperipolez.....                                                                       | 21   |
| 2.3. Mitotik Aktivite.....                                                                                 | 26   |
| 2.4. Mikronükleus Testi.....                                                                               | 27   |
| 3. MATERYAL VE METOT.....                                                                                  | 32   |
| 3.1. Deney Hayvanları.....                                                                                 | 32   |
| 3.2. Kullanılan Kimyasallar.....                                                                           | 37   |
| 3.3. Megakaryositik Emperipolez.....                                                                       | 37   |
| 3.4. Mitotik Aktivite.....                                                                                 | 38   |
| 3.5. Mikronükleus Testi.....                                                                               | 39   |
| 3.6. Verilerin Analizi.....                                                                                | 41   |
| 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....                                                                                | 42   |
| 4.1 Deney ve Kontrol Grubu <i>Sprague Dawley</i> Sıçanların Kemik İliğinde Megakaryositik Emperipolez..... | 42   |
| 4.1.1. Kontrol grubu sıçanlarda gözlenen megakaryositik emperipolez.....                                   | 50   |
| 4.1.2. 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubu sıçanlarda megakaryositik emperipolez.....              | 50   |
| 4.1.3. 45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubu sıçanlarda megakaryositik emperipolez.....             | 51   |
| 4.1.4. 60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubu sıçanlarda megakaryositik emperipolez.....            | 52   |
| 4.1.5. Kontrol ve deney grubu bulgularının karşılaştırılması.....                                          | 53   |

**Sayfa No:**

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2. Kontrol ve Deney Grubu <i>Sprague Dawley</i> Sıçanların Kemik İliğinde Mitotik Aktivite.....        | 56 |
| 4.2.1. Kontrol grubu sıçanlarda mitotik aktivite.....                                                    | 56 |
| 4.2.2. 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubu sıçanlarda mitotik aktivite.....                      | 57 |
| 4.2.3. 45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubu sıçanlarda mitotik aktivite.....                     | 58 |
| 4.2.4. 60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubu sıçanlarda mitotik aktivite.....                    | 58 |
| 4.2.5. Kontrol ve deney gruplarının mitotik aktivite bakımından karşılaştırılması.....                   | 59 |
| 4.3. Kontrol ve Deney Grubu <i>Sprague Dawley</i> Sıçanların Kemik İliğinde Mikronükleus Testi.....      | 62 |
| 4.3.1. Kontrol grubu sıçanlardaki mikronükleus testi sonuçları.....                                      | 66 |
| 4.3.2. 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubu sıçanlardaki mikronükleus testi sonuçları.....       | 66 |
| 4.3.3. 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubu sıçanlardaki mikronükleus testi sonuçları.....      | 67 |
| 4.3.4. 175 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubu sıçanlardaki mikronükleus testi sonuçları.....     | 68 |
| 4.3.5. Kontrol ve deney gruplarında mikronükleus testinden elde edilen sonuçların karşılaştırılması..... | 69 |
| 5. TARTIŞMA.....                                                                                         | 75 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                                                | 86 |
| 7. KAYNAKLAR.....                                                                                        | 89 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### **Sayfa No:**

|                     |                                                                                                                                                                                          |    |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1.</b>   | Maillard reaksiyonu sonucunda oluşan dikarbonil ürünlerin varlığında metionin ve asparagin amino asitlerinden Strecker indirgenmesiyle meydana gelen akrilamitin oluşum mekanizması..... | 4  |
| <b>Şekil.1.2.</b>   | Farklı aminoasitlerin akrilamit oluşturmalarındaki önerilen rolleri (Yaylayan ve ark. 2004).....                                                                                         | 6  |
| <b>Şekil 2.1.1.</b> | Akrilamitin glisidamite dönüşüm metabolizması, glutatyon konjugasyonu ve hemoglobin ve DNA komplekslerinin oluşumu. GSH: Glutatyon (Gamboa da Costa ve ark. 2003).....                   | 17 |
| <b>Şekil 3.1.1.</b> | Uygulama süresince sıçanların barındırıldıkları Polikarbonat kafesler.....                                                                                                               | 33 |
| <b>Şekil 3.1.2.</b> | Kuyrukları işaretlenmiş sıçanlar.....                                                                                                                                                    | 33 |
| <b>Şekil 3.1.3.</b> | Hayvanlara akrilamitin uygulamasının yapıldığı gavaj.....                                                                                                                                | 34 |
| <b>Şekil 3.1.4.</b> | Gavaj yolu ile akrilamitin uygulanış biçimi.....                                                                                                                                         | 35 |
| <b>Şekil 3.1.5.</b> | Sıçanlardan çıkarılıp kaslarından iyice temizlenen femur kemikleri.....                                                                                                                  | 36 |
| <b>Şekil 3.1.6.</b> | Kemik iliği numunesinin vakumlu tüplere aktarılması.....                                                                                                                                 | 37 |
| <b>Şekil 4.1.1.</b> | Kontrol grubu sıçanlara ait iki adet olgun megakaryosit ve bir adet promegakaryosit.....                                                                                                 | 43 |
| <b>Şekil 4.1.2.</b> | Deney grubu sıçanların kemik iliğindeki promegakaryoblast tarafından yutulan nötrofil lökosit ve yutulan hücrelerin etrafında gözlenen açık renkteki alan.....                           | 44 |
| <b>Şekil 4.1.3.</b> | Deney grubu sıçanların kemik iliğindeki promegakaryosit tarafından yutulan bir adet kemik iliği hücresi.....                                                                             | 45 |
| <b>Şekil 4.1.4.</b> | Deney grubu sıçanlara ait ve sitoplazmalarında iki adet kemik iliği hücresi bulunduran olgun megakaryosit.....                                                                           | 45 |

**Sayfa No:**

|                      |                                                                                                                                |    |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.1.5.</b>  | Deney grubu sıçanlara ait ve sitoplazmasında üç adet kemik iliği hücresi bulunduran megakaryosit.....                          | 46 |
| <b>Şekil 4.1.6.</b>  | Deney grubu sıçanların kemik iliğindeki megakaryoblast tarafından yutulan bir adet granülsüz lökosit.....                      | 47 |
| <b>Şekil 4.1.7.</b>  | Deney grubu sıçanlara ait ve içerisine 4 adet kemik iliği hücresi almış olgun megakaryosit.....                                | 47 |
| <b>Şekil 4.1.8.</b>  | Deney grubu sıçanlara ait ve içerisine 6 adet kemik iliği hücresi almış olgun megakaryosit.....                                | 48 |
| <b>Şekil 4.1.9</b>   | Deney grubu sıçanlara ait ve içerisine 7 adet kemik iliği hücresi almış olgun megakaryosit.....                                | 48 |
| <b>Şekil 4.1.10.</b> | Deney grubu sıçanlara ait ve içerisine iki adet kemik iliği hücresi almış ve bir tanesini de almakta olan promegakaryosit..... | 49 |
| <b>Şekil 4.3.1</b>   | Kontrol grubu sıçanların kemik iliğinde mikronükleuslu olmayan PCE ve NCE'ler.....                                             | 63 |
| <b>Şekil 4.3.2.</b>  | Deney grubu sıçanların kemik iliğinde MNPCE ve normal PCE ve NCE'ler.....                                                      | 64 |
| <b>Şekil 4.3.3.</b>  | Deney grubu sıçanların kemik iliğinde MNPCE görülmektedir.....                                                                 | 64 |
| <b>Şekil 4.3.4.</b>  | Deney grubu sıçanların kemik iliğine ait yakınlştırılmış çekimde MNPCE görülmektedir.....                                      | 65 |

## TABLOLAR DİZİNİ

### **Sayfa No:**

|                       |                                                                                                                                                |    |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 4.1.1.1.</b> | Kontrol grubu sıçanlarda megakaryositik emperipolez oranları.....                                                                              | 50 |
| <b>Tablo 4.1.2.1.</b> | 30 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda megakaryositik emperipolez oranları.....                                                               | 51 |
| <b>Tablo 4.1.3.1.</b> | 45 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda megakaryositik emperipolez oranları.....                                                               | 51 |
| <b>Tablo 4.1.4.1.</b> | 60 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda megakaryositik emperipolez oranları.....                                                               | 52 |
| <b>Tablo 4.1.5.1.</b> | Kontrol ve deney gruplarının megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesi bakımından karşılaştırılması.....                                  | 53 |
| <b>Tablo 4.1.5.2.</b> | Megakaryositik emperipolez deneyinde kontrol ve deney grup varyanslarının homojenliğini belirleyen Levene Testi sonucu.....                    | 54 |
| <b>Tablo 4.1.5.3.</b> | Kontrol ve deney gruplarının megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesi bakımından karşılaştırıldığı Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu..... | 54 |
| <b>Tablo 4.1.5.4.</b> | Kontrol ve deney grup ortalamalarının farklılıklarını gösteren Duncan Testi sonucu.....                                                        | 55 |
| <b>Tablo 4.2.1.1.</b> | Kontrol grubu sıçanlarda mitotik aktivite oranları.....                                                                                        | 56 |
| <b>Tablo 4.2.2.1.</b> | 30 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mitotik aktivite oranları.....                                                                         | 57 |
| <b>Tablo 4.2.3.1.</b> | 45 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mitotik aktivite oranları.....                                                                         | 58 |
| <b>Tablo 4.2.4.1.</b> | 60 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mitotik aktivite oranları.....                                                                         | 59 |
| <b>Tablo 4.2.5.1.</b> | Kontrol ve deney gruplarının mitotik aktivite bakımından karşılaştırılması.....                                                                | 59 |

|                                                                                                                                                   | <b><u>Sayfa No:</u></b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Tablo 4.2.5.2.</b> Mitotik aktivite deneyinde kontrol ve deney grup varyanslarının homojenliğini belirleyen Levene Testi sonucu.....           | 60                      |
| <b>Tablo 4.2.5.3.</b> Kontrol ve deney gruplarının mitotik aktivite bakımından karşılaştırıldığı Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu.....            | 61                      |
| <b>Tablo 4.2.5.4.</b> Kontrol ve deney grup ortalamalarının farklılıklarını gösteren Duncan Testi sonucu.....                                     | 61                      |
| <b>Tablo 4.3.1.1.</b> Kontrol grubu sıçanlarda mikronükleus testinden elde edilen sonuçlar.....                                                   | 66                      |
| <b>Tablo 4.3.2.1.</b> 125 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mikronükleus testinden elde edilen sonuçlar.....                                   | 67                      |
| <b>Tablo 4.3.3.1.</b> 150 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mikronükleus testinden elde edilen sonuçlar.....                                   | 68                      |
| <b>Tablo 4.3.4.1.</b> 175 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mikronükleus testinden elde edilen sonuçlar.....                                   | 69                      |
| <b>Tablo 4.3.5.1.</b> Kontrol ve deney grupları arasında mikronükleus testinden elde edilen sonuçlarının % olarak karşılaştırılması.....          | 70                      |
| <b>Tablo 4.3.5.2.</b> Mikronükleus testinde kontrol ve deney grup varyanslarının homojenliğini belirleyen Levene Testi sonucu.....                | 70                      |
| <b>Tablo 4.3.5.3.</b> Kontrol ve deney gruplarının mikronükleus oluşum sıklığı bakımından karşılaştırıldığı Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu..... | 71                      |
| <b>Tablo 4.3.5.4.</b> Kontrol ve deney grup ortalamalarının farklılıklarını gösteren Duncan Testi sonucu.....                                     | 71                      |
| <b>Tablo 4.3.5.5.</b> Kontrol ve deney grup varyanslarının homojenliğini belirleyen Leven testi sonucu.....                                       | 72                      |
| <b>Tablo 4.3.5.6.</b> Kontrol ve deney gruplarının PCE/NCE oranları bakımından karşılaştırıldığı Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu.....            | 73                      |
| <b>Tablo 4.3.5.7.</b> Kontrol ve deney grup ortalamalarının farklılıklarını gösteren Duncan Testi sonucu.....                                     | 73                      |

**KISALTMALAR**

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| CYP2E1..... | Sitokrom P4502E1                      |
| DMS.....    | Demarkasyon Membran Sistemi           |
| DNA.....    | Deoksiribonükleik asit                |
| GST.....    | Glutasyon-S-Transferaz                |
| i.p. ....   | İntraperitoneal                       |
| MNPCE.....  | Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit |
| MNRET.....  | Mikronükleuslu Retikülositleri        |
| NCE.....    | Normokromatik eritrosit               |
| NHMA.....   | N-Hidroksimetilakrilamit              |
| PCE.....    | Polikromatik eritrosit                |
| RNA.....    | Ribonükleik asit                      |
| TK.....     | Timidin Kinaz                         |
| v.a.....    | Vücut ağırlığı                        |
| µm ....     | Mikrometre                            |

## 1. GİRİŞ

Akrilamit,  $C_3H_5NO$  ( $CH_2=CH-CONH_2$ ) molekül formülüne ve 71.08 molekül ağırlığına sahip, renksiz, kokusuz kristal halinde olan, aseton, metanol, etanol gibi polar çözücüler ile suda çözünebilen ve hidrolize edildiği zaman akrilik asite dönüşen bir monomerdur (IARC 1994). Akrilamit, yüksek moleküler ağırlığa sahip poliakrilamitin üretiminde poliakrilamit monomeri olarak kullanılır. Poliakrilamit ise; içme ve atık suların arıtılmasında, kâğıt hamuru ve kâğıt üretiminde, ham petrol işleme aşamasında, maden, mineral, asfalt üretiminde, toprak ve kum arıtımında yoğun olarak kullanılır. Daha az oranda ise; kozmetik sanayinde katkı maddesi olarak, elektroforezde, moleküler biyoloji uygulamalarında, fotoğraf filminde, yapıştırıcı imalatında, verniklerde, boyalarda ve diş hekimliğindeki alaşımların hazırlanmasında kullanılmaktadır (European Union Risk Assessment Report 2002).

1950’li yıllardan bu yana akrilamit ve onun polimerizasyonu sonucu oluşan poliakrilamit bu alanlarda kullanılırken, İsveçli bazı araştırmacılar, akrilamitin kızartılmış ve fırınlanmış gıdalarda, özellikle patates cipsleri ve Fransız kızartmalarında 30-2300  $\mu g/kg$  seviyesinde kendiliğinden oluştuğunu saptamışlardır (Stadler ve ark. 2002). Bu bulguların akrilamitin besinler yolu ile de insanlara geçebileceğini göstermesi nedeni ile araştırmacıların akrilamite olan ilgisini arttırmıştır. Akrilamit oluşumunun pek çok gıdanın pişirilmesi sırasında ortaya çıktığı gösterilmiştir (Taeymans ve ark. 2004). Örneğin, bu oluşum patates (Gökmen ve ark. 2006), tahıllar (Elmore ve ark. 2005), ekmek (Mustafa ve ark. 2005), badem (Amrein ve ark. 2005), kahve (Andrzejewski ve ark. 2004) gibi belli gıdalarda sağlanmış olup, bu oluşuma etki eden faktörleri bulmak için çalışmalar yapılmıştır. Tahıl ve ekmekler daha az oranda akrilamit içerirken patates cipsi ve Fransız kızartmalarının daha yüksek oranda akrilamit içerdikleri saptanmıştır (Rosen ve Hellenas 2002, Ono ve ark. 2003, Mendel 2003). Ayrıca akrilamitin bebek mamalarında, atıştırmak için hızlı yenen yiyeceklerde, fındık veya ceviz gibi kabuklu yiyecekler ile bunlardan elde edilen yağlarda, çikolata ürünlerinde, kahve ve çeşitli kurutulmuş gıdalarda yüksek oranlarda bulunduğu bilinmektedir (Rosen ve Hellenas 2002, Ono ve ark. 2003, Mendel 2003). Akrilamitin kızartılmamış veya

kaynatılmamış gıdalarda bulunmaması nedeni ile bu maddelerin besinlerin yüksek sıcaklıkta ısıtılmaları sırasında gerçekleşebileceğini akla getirmiştir. İstenilen renk, lezzet ve aromayı meydana getirmek için herhangi bir enzim kullanmadan gerçekleşen Maillard kahverengileştirme reaksiyonunu oluşturmak amacıyla yüksek ısıya ihtiyaç duyulması da bu maddenin besin maddelerinde oluşumuna katkıda bulunmuş olabilir (Coughlin 2003). Patates cipsleri, Fransız kızartmaları, ekmek ve işlenmiş tahıllar gibi nişastalı gıdaların 120°C'nin üzerinde ısıtılmaları sonucunda akrilamit oluştuğunun gözlenmesi, 100°C'den daha yüksek ısıların akrilamit oluşumu için yeterli olduğu sonucunu ortaya koymuştur. Araştırmacılar 120°C'den daha yüksek ısı kullanıldığında veya besinlerin pişirme süreleri uzatıldıklarında kızartılan, fırınlanan, kavrulan veya tost yapılan gıdalarda daha fazla miktarda akrilamitin oluştuğunu öne sürmüşlerdir (Tareke ve ark. 2002). Akrilamit oluşumu ve bunların mekanizmaları ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Mottram ve ark. 2002, Stadler ve ark. 2002, Weibhaar ve Gutsche 2002, Yaylayan ve Stadler, 2005).

Akrilamit oluşumunu gösteren birkaç mekanizma olmasına rağmen Maillard reaksiyonunun genel kabul gören mekanizma olduğu bilinmektedir. Pişirilen gıdalarda akrilamitin oluştuğunun ortaya çıkarılması ve bu oluşumu sağlayan Maillard Reaksiyonunun detaylarının çok iyi bilinmemesi temel kimyasal reaksiyonlar hakkındaki genel bilgilerin eksikliğini ve daha fazla araştırmaların yapılmasının zorunlu olduğunu göstermektedir.

### **1.1. Maillard Reaksiyonu İle Akrilamit Oluşumunun Mekanizması**

Isı ile muameleleri sırasında indirgenmiş şekerler ile amino asitler arasında gerçekleşen Maillard Reaksiyonu'nun bir sonucu olarak gıdalarda akrilamit meydana gelmektedir.

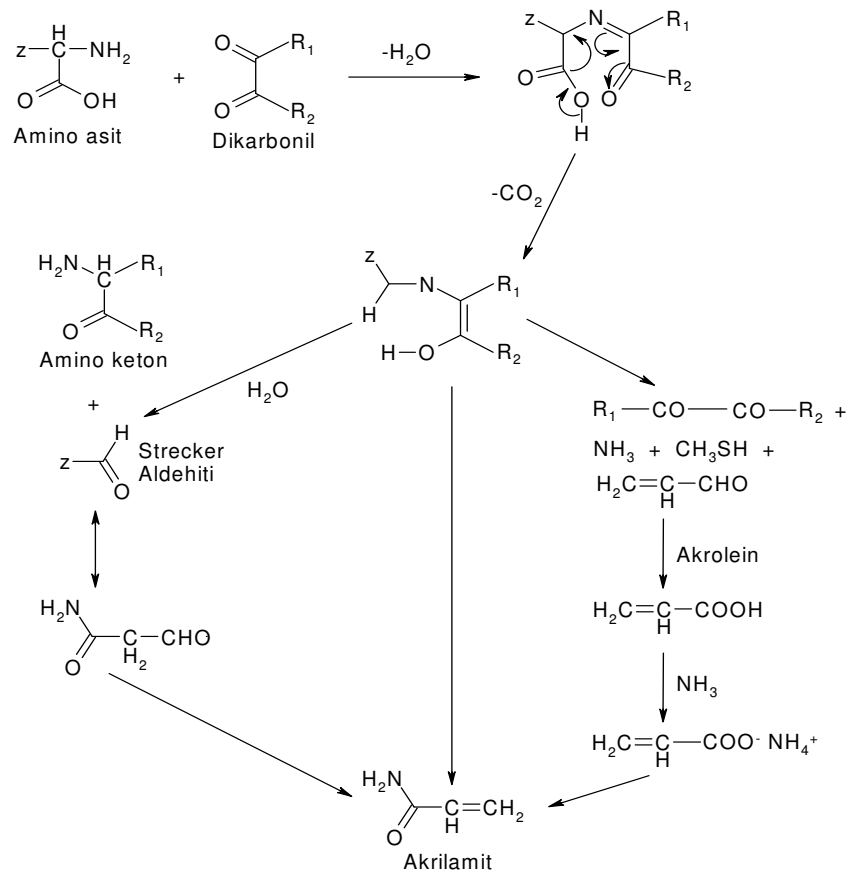
Patates ve tahıllarda bulunan temel amino asitlerden asparagin amino asiti Maillard reaksiyonu neticesindeki akrilamitin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Fırında pişirme ve kavurma sırasında gıdalarda meydana gelen renk ve lezzet Maillard reaksiyonunun ürünleri sonucunda oluşmaktadır. Bu reaksiyonda bir amino asitin, bir aldehite dönüşmesi için dekarboksile (karboksil grubunun ayrılması) ve deamine (amino grubunun ayrılması) olması sonucu oluşan ara ürünler

Streker indirgenmesine uğramaktadır. Asparagin amino asiti iki karbon atomuna bir zincirle bağlı bir amino grubu içermesi nedeni ile uygun bir reaktant konumundadır. Yapılan bir çalışmada glukoz ile asparagin amino asitinin yanı sıra akrilamit için uygun karbon yapısına sahip olmayan diğer amino asitler arasında da bir seri Maillard reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Fosfat tamponu bulunan işaretli cam tüplerde bulunan eşit miktarda asparagin ile glukoz 185°C’de reaksiyona sokulduğunda bir mol amino asitten 221 mg gibi önemli bir miktar akrilamitin oluştuğu gözlenmiştir. Benzer reaksiyon glukoz ile glisin, sistein, metionin, glutamin, aspartik asit gibi amino asitler arasında da gerçekleştirilmiştir. Ancak bunlardan akrilamit oluşumu gözlenmemiştir (Mottram ve ark. 2002).

Asparagin ile akrilamit arasında yapısal bir bağlantının olduğu gösterilmiş olup, yapılan çalışmalarda akrilamitin üç karbon atomu ile bir azot atomunun asparaginden geldiği tespit edilmiştir (Zyzak ve ark. 2003). Yapılan başka bir çalışmada eşit miktarlarda asparagin amino asiti ile glukozun 180°C’de 30 dakika kaynatılması ile bir mol asparaginden 368 µmol akrilamitin oluştuğu görülmüştür (Stadler ve ark. 2002). Ayrıca ısıya dayalı olarak gerçekleştirilen çalışmalarda ısının 120°C’den 170°C’ye kadar çıkarılması durumunda oluşan akrilamit miktarında bir artış görülmüştür (Tareke ve ark. 2002). Protein bakımından zengin gıdaların ısıtılması sonucu orta seviyede (5-50 µg/kg) akrilamit oluşurken, patates ve pancar gibi karbonhidrat bakımından zengin gıdalarda daha fazla miktarda (150-4000 µg/kg) akrilamit meydana gelmiştir. Bugüne kadar ısıtılmamış ve kaynatılmamış gıdalarda akrilamit oluşumuna rastlanmamıştır (Mendel 2003).

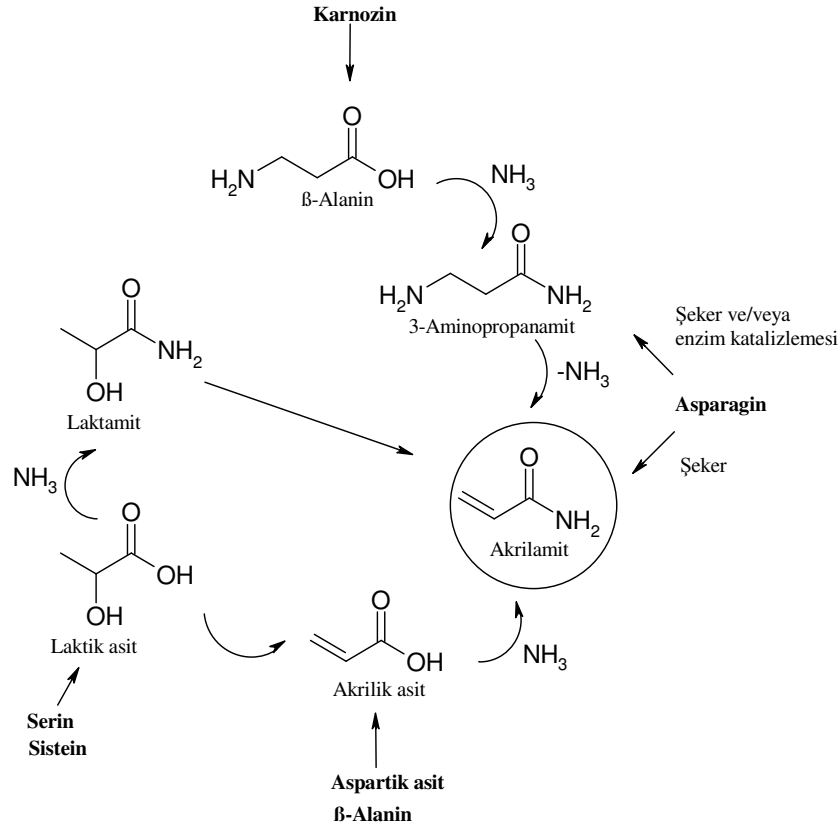
Akrilamit oluşumu ile Streker indirgenmesi arasındaki ilişkinin açığa çıkarılması amacıyla yapılan bir testte glukoz yerine Maillard Reaksiyonu sonucunda oluşan dikarbonil bileşiklerden biri olan 2,3-butanedion kullanılmıştır. Asparaginin butanedion ile reaksiyona girmesine izin verildiğinde akrilamit oluşturulmuştur (Şekil 1.1). Dikarbonil reaktant ve Streker indirgenmesi gerektiren akrilamit oluşumu, sadece asparaginin tek başına 185°C ısıtıldığı durumlarda gözlenmemiştir. Butanedion ve diğer amino asitler arasında gerçekleştirilen herhangi bir sistemde sadece metioninin dışında önemli miktarda akrilamit oluşumu saptanmamıştır (Mottram ve ark. 2002, Stadler ve ark. 2002, Weibhaar ve Gutsche, 2002). Asparagin amino asiti varlığında metioninden yada diğer amino asitlerden akrilamit

oluşumunun mekanizması sırasında muhtemelen önce bir dekarboksilasyon ve metioninin metionala ( $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CHO}$ ) deaminasyonudur. Daha sonra ise Schiff kökünü (N-glikosilasparagin) oluşturmak için asparagin  $\alpha\text{-NH}_2$  grubu ile reaksiyona girerek aldehit gibi davranması ile olur. Schiff kökü ise akrilamiti oluşturmak için dekarboksilatif deaminasyona uğrayan N-glikosite dönüşür. Bu mekanizma metioninin doğrudan akrilamite dönüşmediğini ancak daha çok glukoz benzer şekilde karbonil bileşik kaynağı olarak kullanıldığını göstermektedir (Mendel 2003).



**Şekil 1.1.** Maillard reaksiyonu sonucunda oluşan dikarbonil ürünlerin varlığında metionin ve asparagin amino asitlerinden Strecker indirgenmesiyle meydana gelen akrilamitin oluşum mekanizması

Bazı araştırmacılar akrolein ve akrilik asitin akrilamit oluşumundaki etkilerini araştırmışlardır. Akrolein yağların oksidatif dekarboksilasyonunda bulunduğu farklı metabolik yolların kullanılması ile oluşabilir ve akrilamiti oluşturmak için akrilik asit kullanılabilir. Belirli şartlar altında asparagin ve akrolein beraberce belirli bir akrilamit oluşturabilirler. Akrilik asit, amitleri oluşturan aminodehidroksilasyon reaksiyonu ile akrilamiti oluşturmak için amonyum ile reaksiyona girebilir. Akrilik asit yolu Maillard Reaksiyonu yardımı ile yoğun bir şekilde farklı model sistemde çalışılmış olup, reaksiyon akrilamit reaksiyonuna benzerlik gösterir. Akrilamiti oluşturmak için yarım asit uygun amidi sağlamak için amonyum ile reaksiyona girmek zorundadır. Amonyum amino asitin termolizi esnasında salınabilir. Model test tüp sisteminde salınan amonyum ile amino asitten oluşan karışım 200°C'de 10 dakika tutulduğunda bir mol amino asitten en fazla 75 µmol akrilamit oluşturur ki bu da asparagin yolu ile elde edilen ürünün yaklaşık %5'ini oluşturur (Yaylayan ve Stadler 2005). Asparagine ek olarak diğer amino asitler de akrilamit oluşumuna katılmaktadır (Şekil 1.2). Örneğin, L-alanin ve L-arjinin 180°C'nin üzerindeki ısıda akrilik asit salımını yapmaktadır. Ette bulunan karnozin (kasta bulunan kimyasal bir madde) maddesinin hidrolizi boyunca β-alanin salınabilmekte akrilamit ve onun türevlerinin oluşumu ile sonuçlanan akrilik asiti oluşturabilmektedir (Yaylayan ve ark. 2004). Akrilamitin oluşumunu sağlayan birkaç potansiyel yol olmasına rağmen, akrilik asit yolunun, reaksiyonun etkili bir şekilde oluşabilmesi için diğerlerine göre daha yüksek ısıya ihtiyaç duyması ve serbest amonyumun kısıtlanması nedeni ile gıdalarda çok etkili olmadığı görülmektedir. Serin ve sistein gibi diğer amino asitler amonyumun varlığında pürivik asit yolu ile laktik asite dönüştürülebilir ve amonyum varlığında ise laktamit ve akrilamit üretebilir (Yaylayan ve ark. 2004).



**Şekil.1.2.** Farklı aminoasitlerin akrilamit oluşturmalarındaki önerilen rolleri (Yaylayan ve ark. 2004)

Gıdalarda asparagin ile monosakkaritler arasında meydana gelen reaksiyonun bir sonucu olarak akrilamit oluşumu, hemen hemen asparagin bakımından zengin tahıl ve patates gibi bitkisel kökenli gıdaların pişirilmeleri sırasında oluşması ile açıklanabilir (Rosen ve Hellenas 2002). Patates cipslerinin üretiminde kullanılan patateslerdeki toplam amino asitin %40'ı asparagindir. Yine asparagin buğday unundaki toplam serbest amino asit miktarının %14'ünü, çavdarda ise toplam serbest amino asit içeriğinin %18'ini oluşturmaktadır (Martin ve Ames 2001).

Kızartma aşamasında patates cipslerinin renginde meydana gelen değişim cips yapımında kullanılan yağın ve akrilamit içeriğinin kontrolünde önemli bir parametredir. Aynı zamanda oluşan kızarmış patates rengi, yüzeyde oluşan indirgenmiş şeker içeriği ile sıcaklık ve kızartma süresine bağlı olarak meydana gelen Maillard reaksiyonunun bir göstergesidir (Pedreschi ve ark. 2004, Pedreschi ve

ark. 2005). Bazı araştırmacılar kaynatarak ya da beyazlatarak şeker içeriğinin düşürülmesinin patates cipslerinde akrilamit konsantrasyonunu yaklaşık %60 oranında azalttığını rapor etmişlerdir (Haase ve ark. 2003, Pedreschi ve ark. 2004). Bununla birlikte mikrodalga fırınlar yardımıyla yapılan ısıtma işlemi akrilamit oluşumu için uygun bir ortam oluşturmaktadır (Tareke ve ark. 2002, Tatatsuki ve ark. 2004). Ayrıca mikrodalga fırında asparagin-glukoz, asparagin-fruktoz ve asparagin-sükroz arasındaki etkileşim sonucu meydana gelen akrilamit seviyeleri ölçülmüş olup, asparagin-glukoz ve asparagin-fruktoz arasında yüksek ısı kullanılarak daha kısa süre ısıtılması veya düşük ısı kullanılarak daha uzun süre ısıtılması durumunda oluşabilecek akrilamit miktarının artacağı buna karşın asparagin-sükroz arasında ise hem kullanılan ısının hem de ısıtma süresinin arttırılması durumunda oluşabilecek akrilamit miktarının da artacağı tespit edilmiştir (Zhang ve ark. 2007).

İsveçli araştırmacılar (Stadler ve ark. 2002), tarafından akrilamitin besinlerde kendiliğinden oluştuğunun ortaya konması ve bu yolla da insanlar tarafından yüksek oranlarda vücuda alınıyor olması, insanlar üzerinde oluşturabileceği potansiyel zararlarının belirlenebilmesi yönünde çalışmaların yapılmasını gerektirmiştir.

Akrilamitin kanser yapıcı özelliğinin olup olmadığının araştırılması için fare ve sıçanlarda çok sayıda çalışma yürütülmüştür. İki yıl boyunca sıçanlarla ve farelerle gerçekleştirilen çalışmalarda, çeşitli uygulama şekillerinde verilen akrilamitin tümör oluşumuna sebep olduğu belirlenmiştir (Rice 2005). Akrilamitin sıçanların içme sularına karıştırılarak verilmesi ile gerçekleştirilen çalışmada, akrilamitin kanser yapıcı özelliğinin olduğu ve erkek sıçanlarda testis ve tiroid tümörlerinin, dişi sıçanlarda ise meme fibroadenoması ve tiroid tümörlerinin olduğu belirlenmiştir (Friedman ve ark. 1995). Akrilamitin subakut olarak muamelesi sonucunda tiroid, testis mezotelyumu ve adrenal medulla gibi hedef dokularda akrilamitin kanser yapıcılığında rolü olan DNA sentezinin arttığı görülmüştür (Lafferty ve ark. 2004). *In vivo* ve *in vitro* olarak gerçekleştirilen laboratuvar testlerinde akrilamitin ve onun temel metaboliti olan glisidamitin yüksek dozlarda genotoksik etki gösterdiği de belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında akrilamitin ve glisidamitin kromozom kırıklarına ve kromozomlarda nokta mutasyonlarına sebep olduğu (Rice 2005), bazı test sistemlerinde ise anöplodiye sebep olan kromozom aberasyonuna ve mitotik bozukluklara yol açtığı görülmüştür (Dearfield ve ark. 1995). Akrilamitin fare

spermatozoidlerinde ve sıçan kemik iliğinde anöploidiye sebep olduğunun gösterilmesi için yapılan bir çalışmada, 120 mg/kg dozundaki akrilamitin hem üreme hem de vücut hücrelerinde hücre döngüsünde gecikmelere sebep olduğu belirlenmiştir (Gassner ve Adler 1996). Ayrıca uygulanan aynı dozun *i.p.* olarak uygulamasının fare kemik iliğinde kromozom aberasyonunu arttırdığı ve mitotik indekste ise azalmaya neden olduğu da tespit edilmiştir (Adler ve ark. 1988, 1993). Hem dolaşım kanındaki eritrositlerde hem de kemik iliği PCE'lerinde gerçekleştirilen çok sayıdaki mikronükleus çalışmalarında ise akrilamitin açık bir şekilde genotoksik etkisinin olduğu ortaya konmuştur (Cao ve ark. 1993, Cihák ve Vontorková 1988, Paulsson ve ark. 2002). Fare ve sıçanlar kullanılarak yapılan mikronükleus çalışmalarında akrilamitin farelerde mikronükleus oluşumunu arttırdığı (Paulsson ve ark. 2002, Yang 2005, Manjanatha ve ark. 2006), sıçanlarda ise mikronükleus oluşumunu etkilemediği belirlenmiştir (Paulsson ve ark. 2002).

Temel hematopoetik ve lenfoid organ olan kemik iliğinin morfolojik olarak değerlendirilmesi kimyasal maddelerin toksik özelliklerinin anlaşılması ve güvenilir olup olmadıklarının tespit edilmesi açısından önemli veriler sunmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğunda kemik iliği değerlendirmelerinden elde edilen parametreler kimyasal maddelere karşı vücudun direkt ya da dolaylı olarak gösterdiği tepkinin ortaya konması açısından önem arz etmektedir.

Kaba incelemelerde görünüş bakımından ‘‘sarı’’ ve ‘‘kırmızı’’ olmak üzere iki çeşit kemik iliği tanımlanmaktadır. ‘‘Sarı kemik iliği’’ normal şartlarda kan yapımından sorumlu olmayıp ancak şiddetli kanama ve hipoksiya durumlarında kırmızı kemik iliğine dönüşerek hematojen hale gelmektedir. ‘‘Kırmızı kemik iliği’’ aktif veya hematojendir. Yeni doğanlarda bütün kemik iliği kırmızıdır ve kan hücrelerini üretmede aktiftir (Junqueira ve ark. 1998).

Memelilerin kemik iliği hücreleri arasında megakaryositler, büyüklük ve çekirdek yapıları ile diğerlerinden kolayca ayırt edilebilen hücrelerdir. Dolaşım kanında bulunan ve hayati önem taşıyan trombosit yapımı için özelleşmişlerdir (Italiano ve Shivdasani 2003). Genellikle kemik iliğinde bulunan progenitör (megakaryosit öncülleri) hücrelerden meydana gelirler ve olgunlaşma aşaması esnasında, sitoplazma ve çekirdeklerinde eş zamanlı olarak meydana gelen morfolojik değişiklikler sonucunda büyüklükleri artar (Zucker-Franklin 2003).

Megakaryosit sitoplazmasında meydana gelen temel değişiklikler, sitoplazma içerisindeki farklı bölgeleri plazma zarı tarafından sınırlandırılmış büyük bölmelere ayırarak DMS'yi meydana getirmektedir (Zucker-Franklin 2003, Schulze ve ark. 2006). DMS trombosit yapım aşaması esnasında proplateletleri oluşturacak platelete özgü  $\alpha$ -granüllerini içine almaktadır. Bu arada kromozomların birkaç kez iç duplikasyon döngüsü geçirmesi sonucunda da çekirdek çok loblu bir yapı kazanmaktadır (Mahaut-Smith ve ark. 2003). Bunun sonucunda farklılaşma sürecinin belli bir aşamasından sonra sitokinez geçirmeksizin tekrarlanan çekirdek bölünmeleri neticesinde poliploid DNA içeriğine sahip olurlar. Sitoplazmik gelişim ve ploidi oranının artmasıyla birlikte bir megakaryositin büyüklüğü ve üretebildiği trombosit sayısı da artmaktadır.

Memeliler arasındaki birkaç farklılığa rağmen megakaryositlerin olgunlaşması ile ilgili morfolojik değişiklikler fare, sıçan ve insanlarda benzerlik göstermektedir (Schmitt ve ark. 2001). Belirgin yapısal özelliklerin temelinde, fare ve sıçanlar ile insan megakaryosit öncülleri 4 grupta toplanmaktadır (Zucker-Franklin 2003). Bunlar, trombositlere özgü proteinleri oluşturan, küçük tek çekirdekli **promegakaryoblast**, 15-50  $\mu\text{m}$  çapında, büyük, oval yada böbrek şeklinde çekirdeği ve birkaç çekirdekçisi olan, sitoplazmasında çok sayıda ribozom ve iyi gelişmiş bir ribozomlu endoplazmik retikulumu bulunan **megakaryoblast**, 20-70  $\mu\text{m}$  çapında, düzensiz şekilli çekirdeği ve bol sitoplazması olan, iyi gelişmemiş DMS'ye sahip **promegakaryosit** ve son olarak da çapları 100  $\mu\text{m}$ 'ye kadar ulaşabilen, çok loblu bir çekirdek ihtiva eden ve sitoplazması sentriol, birkaç biyosentetik olarak aktif olan organel ve pek çok  $\alpha$ -granül ihtiva eden çekirdeği çevreleyen bir bölge, iyi gelişmiş DMS ve trombosit bölgeleri içeren ara madde, hücre iskelet proteinleri ve mikrotübüllerce zengin, organel içermeyen periferik bölge olmak üzere üç bölgeye ayrılmış **olgun megakaryosit** (Zucker-Franklin 2003). Megakaryoblastların promegakaryosit ve olgun megakaryositlere dönüşmelerine paralel olarak DMS de daha iyi gelişmekte, sitoplazmadaki granüllerin sayısı, çekirdeğin loblara ayrılması ve kromatin yoğunluğu artmaktadır.

**Emperipolez**, hücreler arası etkileşimde “bir hücrenin başka bir hücreyi içine alması, yutması veya bir hücrenin başka bir hücrenin içerisine göçü” anlamında kullanılan bir terimdir. **Megakaryositik emperipolez** ise “megakaryositlerin çeşitli

kemik iliği hücrelerini içine alması veya yutması şeklinde tanımlanmaktadır. Yutulan bu hücreler, megakaryositlerin bir organeli olan DMS içerisine yerleşebilirler ve megakaryosit sitoplazması içerisine doğru göç edebilme yeteneğindedirler (Thiele ve ark. 1984, De Pasquale ve ark. 1985).

Emperipolez olayının patofizyolojik önemi kesin olmamakla birlikte, çeşitli kanser türleri, değişik tümörler, trombosit bozuklukları, hipoksiya (oksijen yetmezliği), demir eksikliği anemisi ve kan kaybı durumlarında önemli ölçüde artış gösterdiği pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Chycewski ve ark.1994, Dzieciol ve ark. 1994, Kinkor ve ark. 2002, Saxena ve ark. 2002, Shen ve Wen, 2004, Brooks ve ark. 2005, Kong ve ark, 2005, De Candia ve ark. 2007). Kemik iliği megakaryositlerinde görülen bu olayın yoğunluk derecesinin tek başına hastalıkların teşhisinde bir öneminin olup olmadığı tartışma konusudur. Olayın fizyolojik mekanizması ile ilgili bazı hipotezler ortaya atılmakla beraber henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir.

Kemik iliği yetişkin kemiricilerde temel hematopoietik organdır ve hematopoietik hücrelerin bölünmeleri sırasında kimyasal maddenin verilmesi kromozom hasarına ya da mitoz aygıtının engellenmesine yol açmaktadır. Bu kromozom parçaları ya da tüm kromozomlar hücre bölünmesi esnasında geride kalmakta ve mikronükleusu oluşturmaktadır (Lambert ve ark. 2005). Oluşan bu mikronükleusun sıklığının belirlenmesi mikronükleus test sistemi ile gerçekleştirilir. Bu sistem, mutajenler ve klastojenler tarafından indüklenen DNA hasarının belirlenmesinde hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak kullanılan sitogenetik bir testtir. Mikronükleus testi, uygulanan kimyasalın olgun olmayan PCE’lerde oluşturduğu kromozom kayıplarını ve kromozom hasarlarını ayrıca dolaşım kanındaki olgun olan NCE’in oluşumu üzerindeki etkisini belirlemektedir. Mikronükleus, mitozun anafaz evresinde kardeş çekirdeğe katılmayan tüm kromozom ya da kromozom parçalarından oluşmuş nükleer DNA ihtiva eden küçük parçacıklardır ve çekirdeğin 1/5 ile 1/20’si arasında bir büyüklüğe sahiptir (Lambert ve ark. 2005).

Mikronükleus oluşum mekanizması şöyle özetlenebilir; mitoz hücre bölünmesinin anafaz evresinde sentrik elementler kutuplara çekilirken, klastojenik aktivite sonucu ortaya çıkmış asentrik (sentromersiz) elementler ve iğ ipliği mekanizmasında oluşan hata sonucu iğ ipliklerine bağlanamamış kromozomlar

kutuplara çekilemeyerek geride kalırlar. Bu kromozomlar hücre bölünmesi sonrasında sitoplazmada, hücre çekirdeğinden ayrı olarak zarla çevrili bir yapı oluştururlar. Bu yapılara **mikronükleus** denir. Mikronükleuslar kromozom parçaları içerdikleri için çekirdek boyaları ile boyanabilmektedirler. Genellikle mikronükleus içeren hücrelerde tek bir tane bulunmasına rağmen, kullanılan maddenin klastojenik aktivitesine bağlı olarak iki ya da üç tane de olabilmektedir. Eritrositlerin olgunlaşması aşamasında hücre çekirdeği atılırken mikronükleuslar atılmazlar ve sitoplazmada kalırlar (EPA 1996).

Mikronükleuslar birkaç tip hücrede görülürler. Bunlar myeloblastlar, myelositler ve eritrositlerdir. Az sitoplazmalı ve büyük nükleuslu olan kemik iliği hücrelerinde myeloblast ve myelosit kolay ayırt edilemediği için bunlar değerlendirilmeye alınmazlar (Schmid 1975). Eritrosit mikronükleusu analiz etmek için özellikle iyi çalışılmaktadır çünkü son mitozu takiben yaklaşık 6 saatlik bir periyotta PCE'yi veren eritroblast olgunlaşması esnasında çekirdek atılır ve böylelikle mikronükleusu saptamak kolaylaşır (Mavourni ve ark. 1990). Buna ilaveten PCE hala RNA içermektedir ve bu nedenle Giemsa ile mavimsi gri ve akrinin turuncusu ile kırmızımsı boyanmaktadır. Bu durum PCE'lerin, akrinin turuncusu ile renksiz ya da Giemsa ile turuncu olarak boyanan, hemoglobin ihtiva eden olgun eritrosit (NCE)'lerden ayrılmasına olanak sağlamakta ve mikronükleuslu olan hücrelerin belirlenmesini kolaylaştırmaktadır (Krishna ve Hayashi 2000).

Mikronükleus testinde test maddesinin sitotoksitesisi, rutin olarak sitotoksik etki gösteren kimyasal ile muamele sonrasında NCE'ten yana artması ile gösterilen PCE'in NCE'e oranı ile tespit edilmektedir. Kimyasal ile muamele edilen hayvanlarda PCE/NCE oranının kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalması, uygulanan kimyasal maddenin kemik iliğine ulaştığını ve çekirdekli hücrelerin bölünmesi ve olgunlaşmaları üzerinde toksik etki meydana getirdiğini göstermektedir (Lambert ve ark. 2005). Bu da NCE'lerin çoğalma oranındaki azalmaya bağlı olarak eritrosit oluşumunda bozukluk meydana getirmektedir (Cicchetti ve ark.1999).

Sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilen mikronükleus testi, organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir (Demirel ve Zamani, 2002).

Akrilamitin fare ve sıçan kemik iliği hücreleri üzerinde kromozom aberasyonuna ve mitotik bozukluğa sebep olması, kemik iliği hücrelerinin mitoz bölünmelerini azaltması ve bazı mutasyonlara yol açması gibi etkileri incelenmiş olup, kemik iliği megakaryosit hücrelerinde gözlenen emperipolez olayı üzerine yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Uygulanan akrilamitin megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesine olan etkisinin belirlenmesinin, akrilamitin kemik iliği hücrelerinde sebep olduğu genotoksik ve klastojenik (kromozom kırıklarına sebep olma) etkilerinin değerlendirilmesi konusunda bir fikir verip vermeyeceğinin ortaya konması ayrı bir önem arz etmektedir. Ayrıca akrilamitin farelerde mikronükleus oluşumuna sebep olduğunu gösteren birçok çalışma bulunurken (Adler ve ark. 1988, Titenko-Holland ve ark. 1998, Dobrzynska ve Gajewski 2000, Abramsson-Zetterberg 2003, Yang ve ark. 2005, Manjanatha ve ark. 2006), sıçanlarda mikronükleus oluşumuna neden olmadığını öne süren bir çalışmaya rastlanmıştır (Paulsson ve ark. 2002). Uygulanan akrilamit dozunun arttırılması durumunda, sıçanlarda da mikronükleus oluşumunun gözlenip gözlenemeyeceğinin belirlenmesi açısından bu çalışma önem arz etmektedir.

Bu literatür bilgileri doğrultusunda bu tezde, normal ve akrilamit uygulanan *Sprague Dawley* cinsi sıçanların kemik iliği megakaryosit hücrelerinde gözlenen megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesi ve kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerinin bu olayın olması üzerinde bir etkisinin olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca akrilamitin sıçanlarda da klastojenik etki gösterip göstermediği sıçan kemik iliği eritrositlerinde mikronükleus test yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Akrilamitin Vücut İçerisindeki Dağılımı ve Metabolizması

Akrilamitin gıdalarda bulunduğu saptanması insanların akrilamite olan ilgilerini arttırmış olup, bu maddenin zararlı etkileri ile ilgili çalışmaları ivmelendirmiştir. Bu maddenin zararlı etkilerinin ortaya konulması amacıyla *in vivo* hayvan deneyleri ve doku kültürü çalışmaları ağırlık kazanmıştır.

Akrilamitin dokularda hızlı bir şekilde yayıldığı gözlenmiştir. Vücut ağırlıklarına göre 1 mg/kg dozunda akrilamitin oral olarak köpeklere veya domuzlara verilmesi sonucu bu maddenin yaklaşık olarak %30-%50'lik bir oranının kas dokusunda biriktiği gözlenmiştir. Köpeklerde kas dokusundan sonra en fazla yaklaşık %14 civarında karaciğerde biriktiği gözlenirken, domuzlarda ise verilen dozun yaklaşık %20'sinin sindirim sisteminde bulunduğu gözlenmiştir (Ikeda ve ark. 1987).

Akrilamitin vücut içerisinde dağılımı ve atılımı ile ilgili yapılan çalışmalar sıçanlarda oral olarak alınan akrilamitin kolay bir şekilde absorbe edildiğini göstermiştir (Ikeda ve ark. 1987).

Erkek sıçanlar ile yapılan bir çalışmada  $^{14}\text{C}$  ile işaretlenmiş 50 mg/kg akrilamit sıçanlara vücut ağırlıklarına göre oral yol ile verilmiş olup, akrilamitin sindirim sisteminden hızlı bir şekilde absorbe edildiği saptanmıştır. Yirmisekiz saat sonra en yüksek akrilamit aktivitesi sindirim sisteminde bulunmuş olup, bunu akciğer, kemik iliği ve deri izlemiştir. 144 saat sonra en yüksek total aktivite akciğer>pankreas>adrenal>özafagus olarak belirlenmiştir. Bu maddenin karaciğer ve böbrekte birikim yaptığı kadar erkek üreme sisteminde de biriktiği saptanmıştır. Akrilamitin plasentaya geçmesinin mümkün olduğu, alınan dozun %1.0'ından daha az bir kısmının sinir sisteminde de biriktiği görülmüştür. Akrilamit çoğunlukla kas ve deride bulunur ve esas olarak böbrekler tarafından atılır. Atılımının %10'unun ise dışkı ile olduğu saptanmıştır (Kady ve ark. 1996).

Bir sıçan deneyinde 3 ppm dozundaki akrilamitin 6 saat süresince solunum yolu ile alınmasını takiben 24 saat sonra sıçanlarda absorbe edilen akrilamitin büyük

çoğunluğunun sırası ile kanda, deride, dalakta ve akciğerde toplandığı gözlenmiştir. Aynı dozun farelere uygulanması durumunda akrilamitin farklı bir dağılım gösterdiği saptanmıştır. Buna göre absorbe edilen dozun büyük kısmının deride daha sonra sırası ile deri altı yağ dokusunda, testislerde ve kanda bulunduğu rapor edilmiştir (Sumner ve ark. 2001).

Yine sıçanlar ile yapılan *in vivo* bir çalışmada, akrilamitin deri yolu ile absorpsiyonunun yaklaşık %14-61'i arasında değişim gösterdiği saptanmıştır (Sumner ve ark. 2001).

Sıçanlardan, domuzlardan ve insandan alınan deri örneklerinden elde edilen *in vitro* verilere göre; uygulanan akrilamitin sıçanlar tarafından %42-93'ünün, domuzlar tarafından %94'ünün ve insan derisi tarafından %27-33'ünün absorbe edildiği gösterilmiştir (Diembeck ve ark. 1998, Marty 1998).

Akrilamitin 100-160 mg/kg'lık dozunun vücut ağırlıklarına göre sıçan ve farelere dermal uygulamasını takiben dağılımı incelenmiş ve uygulamadan 24 saat sonra her iki türde de en yüksek akrilamit seviyesinin deride olduğu saptanmıştır. Sıçanlarda kırmızı kan hücrelerinde yaklaşık olarak 1µmol/g akrilamit tespit edilmiş olup, akrilamit konsantrasyonunun uygulama bölgelerinde daha yüksek olduğu saptanmıştır (Sumner ve ark. 2001).

10, 50 ve 100 mg/kg'lık akrilamit dozlarının sıçanlara damar içi uygulanmasından sonra, bu maddenin büyük çoğunluğunun kırmızı kan hücrelerinde biriktiği gözlenmiştir (Ramsey ve ark. 1984). Verilen akrilamitin kanda yüksek oranda bulunmasının nedeni hem akrilamitin hem de onun bir metaboliti olan glisidamitin kompleksleri oluşturmak için hemoglobine iyi bir şekilde bağlanabilme yeteneği ile ilgilidir (Calleman ve ark. 1990).

Vücut içerisine giren akrilamit iki temel metabolik yolu izleyerek metatabolize olur. Bunlardan birincisi GST enziminin katalizlediği glutatyon ile birleşmesidir (Sumner ve ark. 1992). Bu yol sıçanlarda ve farelerin idrarlarında bulunan bir metabolit olan N-asetil-S-(3-amino-3-oksopropil) sistein oluşumu ile sonuçlanır. Hem sıçan hem de farelerde oluşan temel metabolit kabaca sıçanlarda gözlenen idrar metabolitlerinin %70'i ve farelerde gözlenen idrar metabolitinin %40'ı olan N-asetil-S-(3-amino-3-oksopropil) sistein'dir. N-asetil-S-(2-karbamoletil) sistein ise insan idrarından atılan temel metabolittir (Friedman 2003). Akrilamitin ikinci metabolik

yolu ise ara epoksit olan glisidamiti oluşturacak epoksidasyondur (Calleman ve ark. 1990, Sumner ve ark. 1992, Ghanayem ve ark. 2000). Kemirgenlerde glisidamiti veren epoksidasyon reaksiyonu CYP2E1 ile katalize edilmekte olup (Sumner ve ark. 1999), glisidamit ya merkapturik asiti oluşturmak için glutatyon ile birleşmekte ya da epoksit hidrolaz yardımıyla metabolize olmaktadır (Kirman 2003). Akrilamitin epoksit metaboliti olan glisidamit, glisidamitin hidroliz ürünü (2,3-dihidroksipropionamid) ve glisidamit ile glutatyon konjugasyonu sonucunda oluşan hidroliz ürünleri (N-asetil-S-(3-amino-2-hidroksi-3-oksopropil) sistein ve N-asetil-S-(1-karbamol-2-hidroksietil) sistein) akrilamit ile muamele edilen sıçanlarla farelerin idrarlarında tespit edilmiştir (Sumner ve ark. 1992). CYP2E1'den yoksun farelere oral olarak 50 mg/kg akrilamit uygulandıktan sonra, idrarlarında glisidamit ya da glisidamitten oluşan metabolitler tespit edilememiştir (Sumner ve ark. 1999). Bu bulgular akrilamitin *in vivo* metabolizmasında CYP2E1'in temel enzim olduğunu ve diğer sitokrom P450'lerin P4502E1'in yokluğunda akrilamiti metabolize edemediklerini göstermektedir.

Akrilamitin metabolizması *in vivo* ortamda kemirgenlere işaretli akrilamit verilerek gerçekleştirilmiş olup, bu metabolitlerin araştırılması ve ölçümleri ise <sup>13</sup>C-NMR spektroskopisi ile yapılmıştır (Sumner ve ark. 1999, 2003). <sup>13</sup>C-NMR kullanılarak CYP2E1'den yoksun fareler ve yaban fareleri ile yapılan karşılaştırma metabolit belirlemesi çalışmalarında, CYP2E1 eksikliğinde <sup>13</sup>C-akrilamit ile muamele edilen farelerin idrarlarında glisidamitin ya da glisidamitten türeyen metabolitlerin bulunmadığı başka bir deyişle vücuttan atılmadıkları gösterilmiştir (Sumner ve ark. 1999). Bu çalışmalardan *in vivo* olarak akrilamitin glisidamite dönüşümünde fonksiyonel CYP2E1'e ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır. Aynı laboratuarda daha sonra gerçekleştirilen çalışmalarda, yaban fareleri ile CYP2E1'den yoksun fareler karşılaştırıldıkları zaman CYP2E1'den yoksun farelerin akrilamitin neden olduğu erkek üreme hücre mutajenitesine karşı korunduğu gösterilmiştir (Ghanayem ve ark. 2005a). Bu bulgular akrilamit ile muamele edilen farelerde erkek üreme hücre mutajenisitesinin oluşumu için akrilamitin oksidasyonuna ve muhtemelen glisidamite dönüşümüne aracılık eden CYP2E1'e ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Günümüzde akrilamit ile gerçekleştirilen çalışmaların hedefleri, CYP2E1'den yoksun fareler kullanılarak akrilamitin sebep olduğu mutajenisite,

üreme toksisitesi ve kanser oluşumuna etkilerinin moleküler ve metabolik esaslarını belirlemeye yöneliktir. Özellikle bu çalışmalar, CYP2E1'den yoksun fareler ile yaban fareleri kullanılarak akrilamitin glisidamite dönüşüm metabolizmasını karşılaştırmak ve CYP2E1'den yoksun fareler ile yaban farelerinin kanlarındaki hemoglobin kompleksleri ile akrilamitin etkisinin gözlemlendiği karaciğer, akciğer ve testisler gibi hedef organlardaki DNA komplekslerinin oluşumunu kıyaslamak amacıyla tasarlanmaktadır.

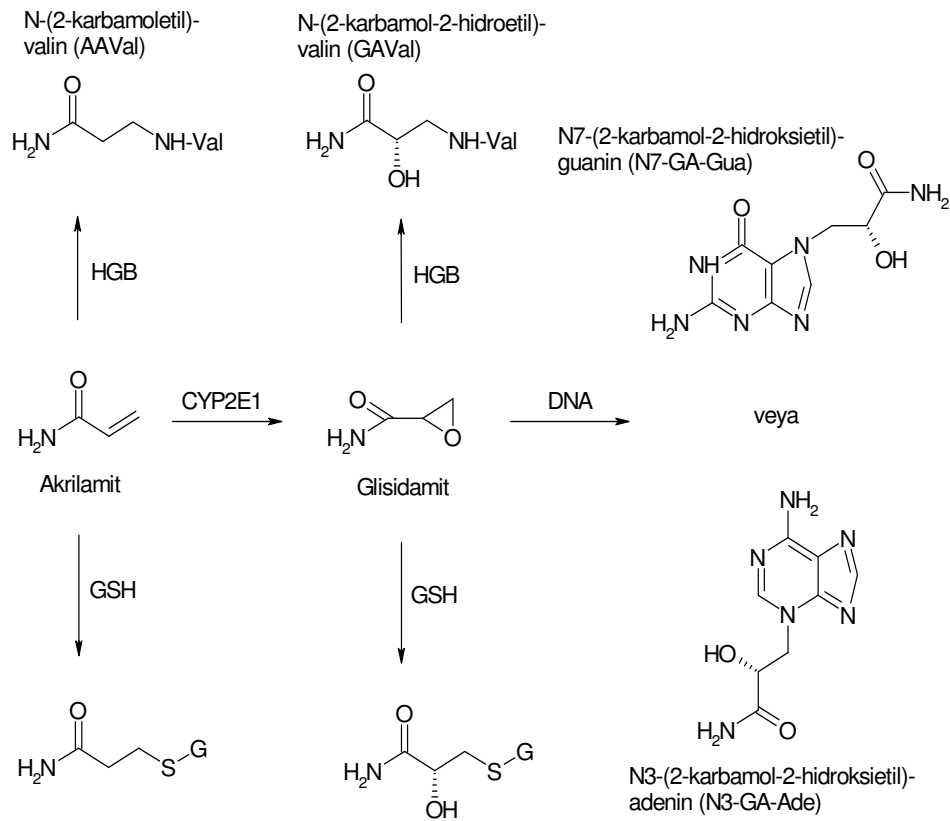
### 2.1.1. Akrilamitin DNA ve Hemoglobin komplekslerini oluşturmaları

Hem akrilamit hem de akrilamitin metaboliti olan glisidamit, hemoglobin ve DNA ile reaksiyona girerek akrilamitin metabolik etkisini gösterir.

Akrilamitin ve glisidamitin oluşturduğu hemoglobin kompleksleri hemoglobinin N kısmında bulunan valin amino asitinin  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> grubu arasında gerçekleşen reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır ve bu yapıları akrilamite maruz kalan insan ve hayvanların kanlarında saptamak mümkündür (Barber ve ark. 2001, Sumner ve ark. 2003, Mendel 2003). Akrilamitin hemoglobin ile meydana getirdiği kompleks [N-(2-karbomoetil)-L-valin], glisidamitin hemoglobin ile meydana getirdiği kompleks ise [N-(2-karbomoetil-2-hidroksietil)-RS-valin]] olarak bilinir (Şekil 2.1.1).

Akrilamitin epoksit metaboliti glisidamit olup, kuvvetli mutajen ve kanserojen olarak bilinen bu epoksitler (molekülleri bir oksijen ve iki karbon atomu içeren üç halkalı organik bir bileşik) oldukça reaktiftirler ve DNA ile etkileşime girerek DNA komplekslerinin oluşumuna neden olurlar (Ghanayem ve ark. 2000, Melnick 2002). Oluşan DNA kompleksleri çoğunlukla kanser oluşumunda etkilidirler (Ghanayem ve ark. 2000, Melnick 2002). Çünkü kanserojen maddelerin veya onların reaktif metabolitlerinin DNA kompleksleri oluşturmaları kanserogenezin başlangıç evresi olarak bilinir (Friedman 2003, Gamboa da Costa ve ark. 2003, Ghanayem 2005b, Maniere ve ark. 2005). Glisidamitin oluşturduğu DNA kompleksleri akrilamit kaynaklı kanserojenite, üreme toksisitesi ve mutajeniteden sorumludur (Friedman 2003, Ghanayem ve ark. 2005a).

Glisidamit *in vitro* olarak DNA ile reaksiyona girerek bir guanin türevi (N7-(2-karbomol-2-hidroksietil) guanin) ve iki adenin türevi (N3-(2-karbomol-2-hidroksietil) adenin ve N1-(2-karboksi-2-hidroksietil)-2'-deoksiadenozin)'in oluşumuna neden olur (Şekil 2.1.1). *In vivo* olarak sıçanlara ve farelere akrilamit uygulaması düşük oranda N7-(2-karbomol-2-hidroksietil) guanin ve N3-(2-karbomol-2-hidroksietil) adenin oluşumuna neden olur (Gamboa da Costa ve ark. 2003).



**Şekil 2.1.1.** Akrilamitin glisidamite dönüşüm metabolizması, glutatyon konjugasyonu ve hemoglobin ve DNA komplekslerinin oluşumu (Gamboa da Costa ve ark. 2003)

Kemirgenlerde akrilamitin glisidamiti veren epoksidasyon reaksiyonu CYP2E1 ile katalize edilmesi nedeni ile son yapılan çalışmalarda CYP2E1'den yoksun fareler

kullanılmış olup, bu çalışmalarda akrilamit ile muamele edilen farelerde vücut ve üreme hücre mutajenitesinin oluşumunun CYP2E1'e bağlı olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. Akrilamitin glisidamiti veren epoksidasyonunda ve DNA ve hemoglobin komplekslerinin oluşumunda CYP2E1'in rolünün belirlenmesi için yürütülen çalışmada ise; CYP2E1'den yoksun fareler ile normal fareler 50 mg/kg dozundaki akrilamit ile *ip* yolla muamele edilmişlerdir. Fareler uygulamadan 6 saat sonra öldürülerek kan ve doku örnekleri alınmıştır. Buna göre, CYP2E1'den yoksun farelerdeki akrilamit ve glisidamitin plazma seviyeleri normal farelere göre daha yüksek bulunmuştur. Normal farelere akrilamit uygulaması karaciğer, akciğer ve testislerde DNA'nın N7-(2-carbomol-2-hidroksietil) guanin ve N3-(2carbomol-2-hidroksietil) adenin komplekslerinde büyük artış gösterirken akrilamit ile muamele edilen CYP2E1'den yoksun farelerin dokularındaki N7-(2-carbomol-2-hidroksietil) guanin komplekslerinin seviyesi normal farelerinkinden 52-66 kat daha düşük bulunmuştur. Akrilamit ile muamele edilen normal farelerdeki akrilamit ve glisidamitin hemoglobin ile oluşturduğu komplekslerde de önemli artış saptanmıştır. Sonuçta CYP2E1'in, glisidamitin DNA ve hemoglobin komplekslerinin oluşmasına neden olan, akrilamitin glisidamiti veren epoksidasyonundan sorumlu temel enzim olduğu ortaya konmuştur (Ghanayem ve ark. 2005b).

Fennell ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada akrilamitin insanlara oral ve dermal uygulamasından sonra oluşan hemoglobin kompleksleri karşılaştırılmış ve hormon seviyeleri ölçülmüştür. İdrara ait olan metabolitlerin yaklaşık olarak %86'sının GSH konjugasyonundan ve ekstrekte N-asetil-S-(3-amino-3-oksopropil) sistein ve onun S-oksidinden geldiği tespit edilmiştir. Dermal uygulamada akrilamitin ve glisidamitin hemoglobin ile oluşturdukları komplekslerin seviyelerinin oral uygulamadaki seviyelerden daha düşük olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmada, insanların kemirgenlerden daha düşük derecede glisidamit yolu ile akrilamiti metabolize ettikleri ve akrilamitin dermal olarak alımının oral alımı ile gözlenenin yaklaşık olarak %6.6'sı kadar olduğu gösterilmiştir.

Doerge ve ark. (2005) tarafından yürütülen çalışmada, erkek ve dişi F344 cinsi sıçanlara, 0.1 mg/kg dozundaki akrilamitin diyet, gavaj ya da damar içi akut uygulaması ve yine eşit miktardaki glisidamit dozunun damar içi veya gavaj uygulaması yapıldıktan sonra ratların serum ve dokularındaki akrilamit ve glisidamit

toksikokinetiği karşılaştırılmıştır. Akrilamit oral uygulamadan sonra hızlı bir şekilde absorbe edilmiş, geniş ölçüde dokulara yayılarak karaciğer DNA kompleks seviyelerinin artışına sebep olmuştur. Akrilamitin varlığının gavaj uygulamasından sonra %60-98 ve diyetle alımından sonra %32-44 oranında olduğu tespit edilmiştir. Akrilamitin damar içi uygulaması sonrasında ilk geçiş metabolizması veya diğer kinetik değişikliği glisidamitin damar içi uygulaması ile karşılaştırıldığı zaman daha yüksek (2 ile 7 kat) bulunmuştur. Oral uygulamasını takiben glisidamit metabolizmasında oluşan benzer etki daha önce farelerde de gözlenmiştir. Bu bulgular gıdalardaki akrilamit içeriğinin azaltılması halinde glisidamit oluşumu ve onu takiben DNA komplekslerinin oluşumunun da en aza indirilebileceğini göstermektedir.

11 haftalık Fischer 344 cinsi dişi sıçanlara 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 ve 10.0 mg/kg dozlarındaki akrilamit gavaj yolu ile gebeliğin yedinci gününden başlayarak günlük olarak verilmiştir. Annenin doz uygulaması yavrular doğdukları zaman sonlandırılmış ve annelerine verilen akrilamit dozları yavrulara doğumlarından sonra birinci gün ile 22. gün boyunca günlük olarak gavaj yolu ile verilmiştir. Yavruların doğumlarından sonra 4. günden 22. güne kadar davranış değerlendirilmeleri test edilmiştir. Akrilamite maruz kalan yavruların vücut ağırlıklarında 1.0 mg/kg gibi düşük dozlarda alınan akrilamitin bile istatistiksel olarak önemli düşüşe neden olduğu gözlenmiştir. Gözlerin açılması ve vücut kıllarının gelişiminde istatistiksel olarak fark görülmemiştir. Ayrıca akrilamitin yavruların açık alan aktivitelerinde önemli bir etki oluşturmadığı da tespit edilmiştir. Bu sonuçlar; akrilamit muamelesi sonucunda süten kesmeden önce hareket düzenlenmesinde (motor koordinasyonu) ve gelişimde gözlenebilir zararların ortaya çıktığını göstermiştir (Garey ve ark. 2005).

Akrilamit toksisitesi, *Salmonella* mutajenisite testi, Çin hamsteri akciğer fibroblastlarında kromozom aberasyonu, farede mikronükleus oluşumu ve sıçanlarda üreme toksisitesi yolu ile değerlendirilmiştir. Akrilamit Ames testine göre, TA98 ve TA100 türlerinde mutajenik potansiyel göstermiştir. Ayrıca, hem kromozomal aberasyon testi hem de mikronükleus testi akrilamitin genotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Farelerde akrilamitin 12.5 mg/kg'dan daha yüksek dozu periferik kan hücrelerinde mikronükleusları önemli derecede arttırmıştır. 7-8 haftalık

erkek *Sprague-Dawley* cinsi erkek sıçanlara (200-250 gr) 0, 5, 15, 30, 45 ve 60 mg/kg dozlarındaki akrilamit gavaj yolu ile beş ardışık gün boyunca uygulanmış ve son uygulamadan 72 saat sonra hayvanlar dekapite edilip testisleri çıkarılarak akrilamitin toksisitesi incelenmiştir. Akrilamitin en yüksek dozu olan 60 mg/kg uygulanan gruptaki hayvanların vücut ve testis ağırlıklarında azalma gözlenmiştir. Ayrıca akrilamit ile muamele edilen bütün gruplardaki hayvanların epididimis ağırlıkları da azalmıştır. Doza bağlı olarak kauda epididimiste sperm sayıları önemli derecede azalmıştır. 60 mg/kg dozu ile muamele edilen hayvanların seminifer tüplerinde histopatolojik lezyonlar gözlenmiştir. Kalın ve çok tabakalı tübüler endotelyum ve seminifer tüpçüklerde fazla miktarda çok çekirdekli dev hücre oluşumları gözlenmiştir. Sonuç olarak; akrilamit ökaryotik hücrelerin ve farelerin genotoksitesine sebep olmakla birlikte aynı zamanda erkek sıçanların üreme hücrelerinde de toksikolojik etkiler göstermektedir (Yang ve ark. 2005).

Pelucchi ve ark. (2006) tarafından yapılan araştırmada, diyetset akrilamit alımı ile ağız boşluğu ve yutak (749 hasta, 1772 kontrol), yemek borusu (395 hasta, 1066 kontrol), kalın bağırsak (1394 kalın bağırsak kanseri, 886 rektal kanseri, 4765 kontrol), gırtlak (527 hasta, 1297 kontrol), göğüs (2900 hasta, 3122 kontrol), yumurtalık (1031 hasta, 2411 kontrol) ve prostat (1294 hasta, 1451 kontrol) kanseri olan hastalar arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Çok değişkenli lojistik regresyon (gerileme, ilişki arama) modelleri kullanılarak olasılık oranları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre akrilamit alımı ile göğüs ve diğer yaygın kanser olma riski arasında birbirine uygun ilişki gözlenmemiştir.

IARC tarafından 1994 yılında, akrilamit “muhtemelen insan kanserojeni” olarak sınıflandırılmıştır. Akrilamit ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda ya da meslekleri nedeni ile akrilamite maruz kalan insanlarda akrilamitin herhangi bir karsinojenik etkisinin olduğunu gösteren delillerin yetersiz olması, uzun süre içme suları ile yüksek dozda akrilamit ile muamele edilen her iki cinsiyetteki hayvanlarda çeşitli bölgeleri etkileyen çok yönlü tümörlerin gelişmiş olması, akrilamitin *in vivo* hayvan modelleri ve *in vitro* hücre kültürlerinde genotoksik etki göstermiş olması ve vinil karbamat ve akrilonitril gibi diğer karsinojenlere yapısal olarak benzerlik göstermesi akrilamitin muhtemelen insan kanserojeni olarak sınıflandırılmasına sebep olmuştur (Exon 2006).

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda insan, fare ve sıçanlara uygulanan akrilamit değişik yönleri ile ele alınmış olup, bu tez çalışmasında kullanılan sıçanların kemik iliğindeki mitotik aktivite, mikronükleus oluşumu ve emperipolez olayı ile ilgili literatür bilgileri aşağıda sunulmuştur.

## **2.2. Megakaryositik Emperipolez**

İlk defa Humble ve ark. (1956), insan kemik iliği doku kültüründeki megakaryositlerin sitoplazmaları içerisinde lenfositlerin varlığını gözlemişler ve bu olaya “emperipolez” adını vermişlerdir. Aynı araştırmacılar lenfositlerin megakaryositlere ve kötü huylu tümör hücrelerine karşı bir ilgisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Ioachim (1965), normal ve kanserli hücrelerden elde ettiği karışık hücre kültüründeki lenfoid hücrelerin davranışını ışık mikroskopuyla incelemiştir. Araştırmacı normal ve kanserli lenfositlerin her ikisinin de adeta diğer hücrelere doğru çekildiğini ve çoğunlukla bu hücrelerin sitoplazması içerisine girdiğini (emperipolez) bildirmiştir.

Shamoto (1981), miyelositik lösemide megakaryositik emperipolezi faz kontrast ve elektron mikroskopuyla incelemiş, bazı hematopoietik hücrelerin megakaryoblastlar tarafından yutulduğunu ve olayın bazı yönleri ile gerçek bir fagositozdan farklılık gösterdiğini belirtmiştir. Araştırmacı aynı zamanda faz kontrast mikroskobu ile yutulan hücrelerin megakaryoblast sitoplazması içerisinde aktif hareketlerini gözlemiş ve bu hücrelerin canlılıklarını koruduğunu bildirmiştir.

Tavassoli (1981 ve 1986) ile Tavassoli ve Aoki (1981 ve 1989), sıçanlar üzerinde deneysel olarak oluşturulan kan kaybının megakaryositik emperipolezi önemli ölçüde arttırdığını ve aşırı kan kaybının bu olayı yönlendirdiğini kaydetmişlerdir. Işık ve elektron mikroskopuyla yaptıkları gözlemlerinde, megakaryositlerin genellikle kemik iliğinin sinüs endotheliumuna yakın bölgelerde bulunduğunu belirterek, megakaryositlerin kemik iliği ve kan dolaşımı arasında ilik-kan bariyerinin bir elemanı olduğu görüşünü ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılara göre, aşırı kan kaybı sonucu kan hücre sayısında meydana gelen azalma, dolaşım kanının

hücre ihtiyacını arttırmakta, bu ise ilik-kan bariyeri arasındaki hücre trafiğini hızlandırmaktadır. Bazı hücreler ilik dokudan kan dokuya geçmek için megakaryositleri bir taşıyıcı olarak kullanmakta ve böylece çok daha hızlı bir şekilde kan dolaşımına katılabilmektedirler.

Chiu (1984), sıçanların kemik iliği numuneleri üzerinde ışık mikroskopuyla yaptığı çalışmasında eritrosit, lenfosit ve granülositlerin megakaryositler tarafından yutulduğunu, bir megakaryosit tarafından yutulan hücre sayısının 1-3 arasında değiştiğini fakat bunun bazen 10 hücreye kadar yükseldiğini, iltihap ve tümör durumlarında ise bu işe karışan megakaryosit sayısında artış görüldüğünü kaydetmiştir.

De Pasquale ve ark. (1985), megakaryositik emperipolezi kanser hastalarının kemik iliği numunelerinde ışık mikroskopuyla incelemişlerdir. Granülositlerin megakaryositler tarafından yutulduğunu ve hem megakaryositlerin hem de yutulan granülositlerin morfolojik bakımdan herhangi bir değişikliğe uğramadığını belirterek, megakaryosit sitoplazmasının granülositler için kemik iliğinin elverişsiz şartlarına karşı koruyuculuk görevi yapan bir sığınak teşkil edebileceği hipotezini ortaya atmışlardır.

Cashell ve Buss (1992), çeşitli hastaların kemik iliği biyopsilerinde megakaryositik emperipolezi ışık mikroskopuyla incelemişler ve patolojik durumlarda artış gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Chyczewski ve ark. (1994), sıçanlarda suni olarak beyin oksijen yetmezliği oluşturmuşlar ve bunun kemik iliğinde megakaryositik emperipolez üzerine etkisini ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde incelemişlerdir. Yapılan gözlemlerde megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesinin deney grubu hayvanlarda kontrol grubu hayvanlara göre önemli derecede arttığı ve megakaryosit sitoplazması içerisinde görülen hücrelerin daha çok granülositler ve eritroblastlar olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, megakaryositik emperipolez olayının oksijen yetmezliği ve muhtemelen kemik iliği aktivitesinin sinirsel olarak uyarılması nedeni ile arttığı bildirilmiştir.

Dzieciol ve ark. (1994 ve 1995), megakaryositlerin diğer kemik iliği hücrelerinin dolaşım kanına verilmesinde bir fonksiyonunun olup olmadığını anlayabilmek için sıçanlar üzerinde kanama şoku oluşturmuşlar ve megakaryositik

emperipolez olayının sıklık derecesini ışık ve elektron mikroskobu ile araştırmışlardır. Aynı araştırmacılar, kanama şoku oluşturulan sıçanlarda megakaryositik emperipolezde önemli ölçüde artış meydana geldiği sonucundan hareketle, kemik iliği hücrelerinin kana verilmesinde ve ilik-kan bariyeri oluşturulmasında megakaryositlerin rol oynayabileceklerini belirtmişlerdir.

Boll ve ark. (1997), immün yetmezliği, thrombocytopenia (trombosit azlığı), lösemi ve anemili hastaların kemik iliğinden hazırladıkları doku kültürü üzerinde faz-kontrast sinematografi ile yaptıkları çalışmada, lenfositlerin megakaryositik hücrelerle sürekli temas halinde bulunduğunu ve genellikle granüler megakaryositlerin sitoplazması içerisine girdiğini gözlemişlerdir.

Sami ve Pasteur (1998), kanser hastalarının kemik iliği numunelerinde ışık mikroskobuyla yaptıkları incelemede, megakaryositlerin sitoplazması içerisinde çok sayıda nötrofil bulunduğunu gözlemişler ve kanser hastalarında bu olaya çok sık rastlanmasına rağmen megakaryositik emperipolezin fizyolojik ve patolojik nedenlerinin halen kesinlik kazanmadığını belirtmişlerdir.

Lee ve ark. (1999), insan fetal karaciğerindeki Kupffer hücreleri üzerinde ışık ve elektron mikroskobu ile yaptıkları incelemelerinde, Kupffer hücrelerinin 4-8 arasında eritroblast ihtiva ettiklerini ve emperipoetik eritroblastların proeritroblasttan retikülosite kadar olan çeşitli olgunlaşma aşamalarında olduklarını tespit etmişlerdir. Elektron mikroskobik incelemelerinde hem emperipoetik eritroblastların hem de içinde bulundukları Kupffer hücrelerinin hasar görmediklerini tespit etmişlerdir. Ayrıca Kupffer hücreleri içindeki eritroblastların çoğalma yeteneğinde olduklarını gösteren mitoz aşamasında olan emperipoetik hücre gözlemişlerdir. Çalışmaları sonucunda, fetal karaciğerindeki eritroblast olgunlaşmasını destekleyen mekanizmalardan bir tanesinin emperipolez olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Dikmenli (2000), *Spalax leucodon* (körfare) kemik iliğinde megakaryositik emperipolez olayının oluşumu üzerine ultraviyole radyasyonunun etkisini incelediği çalışmada, 56, 112 ve 168 saat süre ile ışınlanan hayvanlarda, ultraviyole radyasyonunun ışınlama süresine bağlı olarak megakaryositik emperipolez olayını ışınlanmamış hayvanlara göre önemli derecede arttırdığını tespit etmiştir. Ayrıca megakaryositler tarafından yutulan hücrelerin daha çok nötrofil granülositler

olduğunu ve megakaryositler ve bunlar tarafından yutulan hücrelerde morfolojik bir dejenerasyon meydana gelmediğini tespit etmiştir.

Megakaryositlerin sitoplazmaları içerisindeki hematopoietik hücrelerin emperipolezisi pek çok patolojik durum ile ilişkilendirilerek tanımlanmaktadır. İleri derecede trombositoz (kanda trombositlerin artması) görülen hastaların çoğunda nötrofillerin megakaryosit içerisine girmesi ile oluşan nötrofil emperipolezin artması yaygın olarak görülmektedir (Cashell ve Buss 1992). Bu durumda sadece nötrofil ya da eosinofil gibi polimorfonükleer hücrelerin emperipolezindeki artışın olmadığı aynı zamanda bu hücrelerin spesifik ya da patolojik olarak megakaryositler ile etkileşime girdiği de vurgulanmaktadır (Schmitt ve ark. 2000, Centurione ve ark. 2004). Dzieciol ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada Non-Hodgkin's lenfoma (NHL)'li hastaların kemik iliğinde emperipolez olayını incelemişlerdir. Bunun için hastaların cinsi, yaşı ve hastalığın klinik aşamasına uygun olarak, NHL'nin farklı histolojik tipleri (kronik lenfositik lösemi (chronic lymphocytic leukaemia-CLL), kıllı hücre lösemisi (hairy cell leukaemia-HCL), çok yönlü miyelom (omurilik tümörü) (multiple myeloma-MM)) gözlenen 30 hasta analiz edilmiştir. Kemik iliği biyopsisi fiksatif solüsyonda bekletilip parafine gömülerek gerçekleştirilmiştir. Bu kesitlere hematoksil-eosin ve monoklonal antibodi CD 61 uygulanmıştır. İnsan kemik iliğindeki megakaryositik emperipolez olayı CLL hastalarının 5'inde ve HCL hastalarının 1'inde olmak üzere 6 hastada gözlenmiştir. Megakaryositlerin sitoplazmaları içerisinde çok sık olarak lenfositler, nadir olarak da eosinofilik granülositler olmak üzere tek hematopoietik hücreler gözlenmiştir. Hastaların yaşı, cinsiyeti, hastalığın klinik aşaması ve NHL'nin histolojik tipleri ile megakaryositik emperipolezin sıklığı arasında hiçbir ilişki bulunamamıştır.

Lopes ve ark. (2003), Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) tanısı konmuş hastanın biyopsi kesitlerini ışık mikroskopunda inceledikleri zaman sitoplazmalarında neoplazmaya ait (neoplastik), yaşayabilen durumda olan, hematopoietik hücreleri içeren çok sayıda histiyositlerin varlığını gözlemişlerdir. Elektron mikroskobu ile de bu gözlemleri doğrulamışlardır. Bu olayda Rosai-Dorfman hastalığının ne klinik olarak ne de histolojik olarak bir kanıtı bulunamamıştır. Bu çalışmada emperipolezin sadece Rosai-Dorfman hastalığı ile

sınırlandırılmaması gerektiğini ve non-Hodgkin lenfoma'sı gibi diğer durumlarda da oluşabileceğini vurgulamışlardır.

Shintatu ve Yutani (2004), Creutzfeldt-Jacob (CJD) hastası olan insanlarda, beynin beyaz maddesinde bulunan astrosit hücrelerinin oligodentrositleri içlerine alması ile gözlenen emperipolez olayını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada, harap olmuş beyaz madde içerisinde sitoplazmalarında bir veya birkaç tane oligodentrosit içeren çok sayıda hipertrofik astrosit hücreleri gözlemişlerdir. CJD'deki beyaz madde içerisindeki bu tip emperipolezin yaygınlığını beyaz madde lezyonlarının sertliği ile ilişkilendirmişlerdir.

Gan ve ark. (2005), ektranodal Rosai-Dorfman hastalığının teşhisini hematoksilen-eosin ve immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Rosai- Dorfman hastalığının lezyonlarını, bol sitoplazmalı, S-100 protein boyamada pozitif sonuç veren, kese şeklinde çekirdeği ve küçük bazofilik çekirdekçiği olan ve ayrıca içerisinde lenfositleri, plazma hücrelerini ve diğer iltihap gösteren hücreleri barındıran (emperipolez) büyük histiyosit (makrofaj)'lerin varlığı ile tanımlamışlardır.

Newman ve ark. (2007), Rosai-Dorfman hastalığının histolojik incelemesinde, lenfositofagositozun (emperipolez) göze çarptığını vurgulamaktadırlar. Deride gözlenen lenfosit emperipolezinin lenf düğümlerinde gözleneninkinden daha az dikkati çektiğini ve teşhise ait lenf nodülleri olmadığı zaman gelişmiş ektranodal Rosai-Dorfman hastalığının tanısının yapılabilmesi için, kolaylıkla ayırt edilebilen çok sayıdaki S-100 pozitif histiyositlerin ve göze çarpan lenfositofagositozun varlığının gerektiğini belirtmişlerdir.

De Candia ve ark. (2007), Gray platelet sendromlu hastanın kemik iliği numunesini inceledikleri zaman, hücrelerin aşırı derecede çoğaldığını (hipersellülarite) ve göze çarpacak yoğunlukta megakaryositik emperipolez olayının olduğunu tespit etmişlerdir. %80 ve daha fazla megakaryositte emperipolez olayının gözlendiğini ve bu megakaryositlerin sitoplazmalarında 2-4 arasında nötrofil ihtiva ettiklerini belirtmişlerdir.

### 2.3. Mitotik Aktivite

Adler ve ark. (1988), 50-150 mg/kg dozundaki akrilamiti intraperitoneal olarak verilen farelerin spermatogoniumda ve kemik iliği hücrelerinde mitoz hücreler incelenerek kromozom aberasyonunu ve mitotik indeksi belirlemeye çalışmışlardır. Kromozomal kemik iliği testinde de pozitif sonuç elde edilmiştir. Spermatogoninin mitotik bölünmesindeki aberasyon çalışmasında, 150 mg/kg akrilamit uygulamasında spermatogonial mitozun sıklığında (mitotik indeks) önemli derecede azalma gözlenmiştir. Kemik iliği testinin aksine, spermatogoninin akrilamit ile muamelesinden 24 saat sonra kromozomal aberasyonda hiçbir artış gözlenmemiştir. Akrilamitin 100 mg/kg'lık dozu kemik iliği hücrelerinin mitotik indeksinde azalmaya sebep olmuştur. Doz-cevap çalışmasında ise kemik iliği mitotik indeksinde sadece en yüksek dozun (150 mg/kg) uygulanmasından 18 saat sonra önemli derecede azalma gözlenmiştir.

Adler ve ark. (1993), 120 mg/kg dozundaki akrilamiti erkek farelere *i.p.* yol ile uygulamışlar ve *in vitro* ve *in vivo* olarak hücrelerin bölünmesine olan etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında *in vitro* olarak V79 Çin hamster hücreleri, *in vivo* olarak da fare kemik iliği hücreleri kullanılmıştır. Akrilamit ile muamele edilen V79 Çin Hamster hücrelerinin iğ ipliklerinde meydana gelen düzensizliğin uygulanan akrilamit konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Ayrıca mitotik blok ve ana-telofaz şeklin birbirine bağlı ortadan kaybolması 0.01 ile 1.0 mg/ml arasında değişen akrilamit uygulamasını takiben 6 saat sonra gözlenmiştir. Akrilamitin erkek farelere 120 mg/kg dozunun *i.p.* olarak uygulaması sonucunda kemik iliği hücrelerinde mitotik durgunluğa yol açmamıştır. Fakat muameleden bir ile üç saat sonra hayli yoğun ve dağılmış kromatidli hücrelerin sıklığında mitotik ilerlemenin bir göstergesi olarak azalma gözlenmiştir. Muameleden 2 ile 22 saat sonra akrilamit fare spermatositlerinde ikinci ve birinci mayoz bölünme oranındaki azalma ile belirlenen mayotik (mayoz bölünmedeki) gecikmeye sebep olmuştur. Bu mayotik gecikme genelde interfaz evresinin uzaması yüzünden gerçekleşmiştir. Sonuçta akrilamitin *in vitro* ve *in vivo* olarak hücre bölünmesinde bozukluğa neden olduğunu belirtmişlerdir. Adler ve ark. (1993)'ları kolşisinin etkisine benzer şekilde akrilamitin de iğ ipliklerinin işleminde meydana getirdiği karışıklık neticesinde *in vitro*

memeli hücrelerinde anöploidiye sebebiyet verebileceğini vurgulamışlardır. *In vivo* olarak özellikle spermatositlerde hücre bölünmesinin ilerlemesi akrilamit tarafından değiştirilmiştir. İğ ipliklerinin fonksiyonu üzerindeki etkisi açıklanamamıştır fakat bu değişiklik kromozomların ayrılmasında hataya sebep olmuştur.

Martins ve ark. (2007), V79 Çin hamsteri kullanarak memeli hücrelerde akrilamit ve glisidamitin sebep olduğu DNA hasarını incelemişler ve bu incelemelerinde kullandıkları bazı testlerin yanında kromozom aberasyonu ve mitotik indeksi de araştırmışlardır. Çalışmalarının sonunda, hem akrilamitin hem de glisidamitin kromozom aberasyonuna sebep olduğunu ve mitotik indekste de azalma meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

Sickles ve ark. (2007), mikrotübül motor proteini kinezin üzerine akrilamitin etkisini araştırmak için sıçan testislerinden protein ile ilgili kinezin genlerini izole ederek rekombinant DNA tekniği ile bu proteinleri ifade ettirip akrilamitin ve glisidamitin mitotik/mayotik iğ iplikleri ile ilgili kinezin motor proteinleri üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Bu motor proteinlerinin inhibisyonu, akrilamitin potansiyel kanserojenik etkisi kadar mutajenitesi, hücre döngüsü ve üreme üzerine olan etkisi ile de ilişkilendirilmiştir. Çalışma sonunda farklı kinezin proteinlerinin akrilamit ve glisidamit tarafından inhibe edildiği gözlenmiştir. Bu inhibisyon neticesinde akrilamit ile muamele edilen bölünmekte olan hücrelerin kromozomları kutuplara göç etmeden metafaz plağında kalmıştır. Bu durum depolimerize olan mikrotübül kinezin proteininin akrilamit tarafından inhibe edilmesi ile kromozomların metafaz plağından kutuplara doğru hareketlerindeki bozukluk ve mitotik aktivitenin azalması ile sonuçlanmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda hücre bölünmesinde örneğin *in vitro* çalışmalarda kromozomal aberasyonu, mitotik hücre bölünmesinde azalma, mikronükleus oluşumu ve poliploidi, *in vivo* çalışmalarında ise, dominant letal etki, kalıtsal translokasyon ve sperm üretimindeki kayıplar gibi önemli anormallikler gözlenmiştir.

#### 2.4. Mikronükleus Testi

Adler ve ark. (1988), 50-150 mg/kg dozundaki akrilamiti *i.p.* olarak verilen farelerin kemik iliğinde mikronükleus testi yapmışlar ve kemik iliğindeki

mikronükleus sıklığının uygulanan doza bağlı olarak arttığını ve 100 mg/kg akrilamit uygulamasından 24 saat sonra da en yüksek seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir.

Titenko-Holland ve ark. (1998), akrilamitin erkek farelere uygulanmasından sonra akrilamit uygulanmayan dişi farelerle çiftleştirilmesi sonucunda meydana gelen dört günlük embriyodaki akrilamitin sebep olduğu gelişim anormallikleri ile mikronükleus oluşumunu incelemişlerdir. Bunun için 50 mg/kg dozundaki akrilamit *i.p.* yolu ile beş ardışık gün boyunca erkek farelere uygulanmıştır. Uygulamanın sonunda akrilamit ile muamele edilmemiş dişi fareler ile akrilamit ile muamele edilmiş erkek fareler 5-17 gün arasında çiftleştirilmiş ve spermatozoa (5-7 günleri arasında), geç spermatidler (8-10 günleri arasında) ve orta ve geç spermatidler (11-17 günleri arasında) olmak üzere çeşitli postmayotik hücre örnekleri alınmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda postmayotik muameleden sonra spermatogenesis esnasında morfolojik olarak anormal embriyoların oranında önemli bir artış gözlenmiştir (kontrol %14.8, muamele grubu %88.7). Akrilamit morfolojik olarak normal ve anormal embriyolardaki mikronükleus içeren hücrelerin sıklığında kontrole kıyasla 10-20 kat artışa sebep olmuştur. Anormal embriyoların çekirdeklerinin kontrole kıyasla önemli derecede büyüdüğü, ayrıca anormal embriyoların mikronükleusları ise normal embriyoların mikronükleuslarından daha büyük olduğu tespit edilmiştir.

Dobrzynska ve Gajewski (2000), kemik iliği mikronükleus testi ve sperm morfoloji testi kullanarak erkek farelerin üreme ve vücut hücreleri üzerine X ışını ile akrilamitin birlikte etkisini incelemişlerdir. Çalışmada X ışını farelerin bütün vücuduna 0.05-0.25 Gy dozunda, akrilamit ise 75 mg/kg dozunda *i.p.* olarak uygulanmıştır. Üç ayrı grubun ikisine akrilamit ve X ışını yalnız olarak ve diğer gruba da X ışını muamelesinden hemen sonra akrilamit uygulaması yapılarak ikisi birlikte uygulanmıştır. Üreme hücrelerine yapılan birleştirilmiş uygulama her birinin tek başına gösterdiği etkiyi daha da yükseltmiştir. Sonuçlar sperm başı anormallikleri ve döllemenin azalması ile gösterilebilen geç spermatidlerin ve spermatozoanın hasarına karşı olan duyarlılığı doğrulamaktadır. Akrilamitin tek başına yapılan uygulamasında vücut hücrelerinin gösterdiği duyarlılık üreme hücrelerinin gösterdiği duyarlılık ile benzerlik göstermiştir. Hem akrilamitin hem de X ışınının tek başına uygulaması mutajenik etki oluşturmamasına rağmen, akrilamitin ve X ışınının

birleştirilmiş uygulaması ise kemik iliği PCE'lerde mikronükleus oluşumunu arttırmıştır.

Paulsson ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada akrilamit ve *N*-metilolakrilamitin genotoksik etkisini ve fare ve sıçanların bu maddelere karşı duyarlılıklarını değerlendirmişlerdir. Akrilamit ve *N*-metilolakrilamitin fare ve sıçanlarda oluşturdukları hemoglobin komplekslerinin analizi yapılmış ve genotoksik etki ise *in vivo* mikronükleus test kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için fareler *i.p.* olarak 25, 50 ve 100 mg /kg dozunda akrilamit ve 35, 71 ve 142 mg/kg dozunda *N*-metilolakrilamit ile sıçanlar ise *i.p.* olarak 100 mg/kg dozunda akrilamit ve 142 mg/kg dozunda *N*-metilolakrilamit ile muamele edilmiştir. Fare ve sıçanlarda akrilamitin *N*-metilolakrilamit'e göre daha yüksek oranda hemoglobin komplekslerinin oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Sıçanlarla karşılaştırıldıkları zaman farelerdeki epoksit metabolitlerinin daha yüksek seviyede olduğunun tespit edilmesi de uygulanan iki tip akrilamitin farelerde daha verimli metabolize olduğunu göstermiştir. Farelerde her iki akrilamit uygulanan doza bağlı olarak hem hemoglobin komplekslerinin oluşumunda hem de periferik kan eritrositlerindeki mikronükleus oluşumunda artışa sebep olurken, *N*-metilolakrilamitin sebep olduğu mikronükleus oluşumu sıklığındaki artış akrilamitin sebep olduğu mikronükleus oluşumu sıklığındaki artışın yarısı kadar olduğu tespit edilmiştir. Sıçanlarda ise uygulanan 100 mg/kg dozundaki akrilamitin kemik iliği eritrositlerindeki mikronükleus oluşum sıklığında hiçbir artışa sebep olmadığı gözlenmiştir. Buradan da farelere oranla sıçanların akrilamitin kanserojenik etkisine karşı daha az duyarlı olduğu sonucu çıkarılmıştır.

Abramsson-Zetterberg (2003), yaptıkları çalışmalarında iki deney gerçekleştirerek, farelere uygulanan akrilamitin bir seri düşük dozunun periferik kanda mikronükleus testi ile etkisini incelemiştir. İlk deneyde 0 ile 100 mg/kg arasında değişen 22 farklı dozdaki akrilamitin etkisine, ikinci deneyde ise 0 ile 30 mg/kg arasında değişen 7 farklı dozdaki akrilamitin etkisine bakmıştır. Akrilamit farelere *i.p.* olarak uygulanmıştır. Her iki deneyde de kontrole kıyasla uygulanan tüm dozlarda mikronükleuslu eritrositlerin sıklığında belirgin bir artış gözlenmiştir.

Witt ve ark. (2003), *Salmonella* testi ve mikronükleus testinde inaktif kanserojen olarak bulunan NHMA'nın sürekli olarak yavrulayan farelerde üreme

üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, anne ve babaya ait farelere içme suyu vasıtasıyla 13 hafta NHMA uygulaması (en yüksek doz 360 ppm) sonrasında embriyonik ölümlerin arttığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar NHMA ile muamele edilen erkek farelerde üreme hücrelerinde kromozom hasarının oluştuğunu göstermiştir. Fakat içme suyuna NHMA verilerek yapılan 13 haftalık uygulamada mikronükleuslu periferel kan eritrositlerinin sıklığı yükselmemiştir. Bu yüzden NHMA, vücut hücrelerinde hasar oluşturmayıp üreme hücrelerinde genetik hasara sebebiyet verdiği ortaya konmuştur.

Yang ve ark. (2005), *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçanlara beş ardışık gün boyunca 0, 5, 15, 30, 45 ve 60 mg/kg dozundaki akrilamiti gavaj yolu ile uygulamışlar ve akrilamitin üreme sistemi üzerindeki toksisitesini incelemişlerdir. Ayrıca 0, 18.13, 36.25, 72.5, 100 ve 145 mg/kg dozundaki akrilamit gavaj yolu ile tek doz olarak farelere uygulanmış ve periferel kan eritrositlerinde mikronükleus sıklığı incelenmiştir. Üreme sistemi toksisitesi çalışmasında, akrilamitin en yüksek dozu olan 60 mg/kg ile test edilen grupta vücut ağırlıklarında ve testis ağırlıklarında azalma gözlenmiştir. Ayrıca akrilamit ile muamele edilen bütün gruplarda epididimis ağırlıkları da azalmıştır. Uygulanan doza bağlı olarak kauda epididimisinde sperm sayıları önemli derecede azalmıştır. 60 mg/kg ile muamele edilen sıçanların seminifer tüplerinde histopatolojik lezyonlar gözlenmiştir. Yapılan mikronükleus testi sonuçlarına göre ise, akrilamit, 36.25 mg/kg ve bu dozun altında uygulanan dozlarda periferel kan eritrositlerinde mikronükleusa sebep olmazken, 72.5, 100 ve 145 mg/kg dozlarında mikronükleus sıklığında istatistiksel olarak önemli artış göstermiştir. Yapılan çalışmalarda akrilamitin sadece ökaryotik hücrelerde ve farelerde genotoksositeye sebep olmadığı aynı zamanda erkek sıçanların üreme sistemleri üzerinde de toksikolojik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Koyama ve ark. (2006), insan lanfoblastoid TK6 hücre kültüründe akrilamit ve glisidamitin DNA hasarı oluşturup oluşturmadığının tespiti için Comet testi, klastojenitelerini belirlemek için mikronükleus testi ve gen mutasyonu için de *TK* testi kullanmışlar ve sonuçta, akrilamitin mikronükleus ve *TK* testlerinin sonucuna göre orta derecede genotoksik olduğunu, buna karşın glisidamitin gerçekleştirilen bütün testlerde konsantrasyona bağlı olarak kuvvetli bir şekilde pozitif sonuç verdiğini tespit etmişlerdir.

Manjanatha ve ark. (2006), akrilamit ve glisidamitin *in vivo* olarak genotoksisitesini araştırmak için yaptıkları bazı testlerin yanında dolaşım kanında da mikronükleus oluşum sıklığını incelemişlerdir. Bunun için, 0, 100 ve 500 mg/l dozundaki akrilamit ve bu dozlara eşit miktardaki glisidamiti Big Blue farelere 4 hafta boyunca içme sularına karıştırarak vermişler ve son uygulamadan 24 saat sonra dolaşım kanındaki MNRET’leri değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda kontrole kıyasla, uygulanan en yüksek dozda, hem akrilamitin hem de glisidamitin erkek farelerde MNRET’lerin sıklığında önemli derecede artış meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, S.Ü. Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından yetiştirilen, ağırlıkları 180-200 gr arasında değişen, 8 haftalık erkek *Sprague Dawley* cinsi albino sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma boyunca 20 tanesi (15'i deney 5'i kontrol grubunu oluşturmak üzere) emperipolez deneyinde, 20 tanesi (15'i deney 5'i kontrol grubunu oluşturmak üzere) mitotik aktivitenin belirlenmesinde ve 20 tanesi (15'i deney 5'i kontrol grubunu oluşturmak üzere) de mikronükleus sıklığının belirlenmesinde olmak üzere toplam 60 adet sıçan kullanılmıştır. Çalışmanın uygulama kısmı S.Ü. Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde, kemik iliği preparatlarının hazırlanma işlemi ise S.Ü. Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi A.B.D. Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar 121°C'de otoklave edilebilen, polikarbonat malzemeden yapılmış kafeslerde barındırılmıştır (Şekil 3.1.1). Kafes gövdesinin ebatları, 425x266x175 mm ve taban alanı 800 cm<sup>2</sup>'dir ve her kafeste 5 hayvan olacak şekilde tutulmuştur. Hayvanlar kafeslere rastgele dağıtılmıştır. Sıçanlar Purina marka standart sıçan yemi ile beslenmiş, su olarak çeşme suyu kullanılmıştır. Yem ve su *ad libitum* olarak sağlanmıştır. Deneyin uygulama süresi boyunca sıçanlar, 20±2 °C sıcaklık, %50 bağıl neme sahip, sabah 7'den akşam 7'ye kadar olan 12 saat aydınlık-12 saat karanlık foto periyotlu ve saatte 15 kez havalandırılan laboratuvar koşullarında barındırılmışlardır. Akrilamit uygulamasının her hayvanın günlük ağırlıklarına göre yapılması nedeni ile kafes içerisinde bulunan hayvanların birbirleri ile karışmasını engellemek için sıçanların kuyrukları boyanarak işaretlenmiştir (Şekil 3.1.2).



**Şekil 3.1.1** Uygulama süresince sıçanların barındırıldıkları polikarbonat kafesler



**Şekil 3.1.2.** Kuyrukları işaretlenmiş sıçanlar

Uygulanacak akrilamitin dozu sıçanların günlük ağırlıklarına göre tespit edilmiş olup, distile suda çözülerek gavaj yolu ile hayvanlara verilmiştir (Şekil 3.1.3, 3.1.4). Sadece mitotik aktivitenin belirlenmesi çalışmasında doz uygulamasından 24 saat sonra, kemik iliği numunesi alınmadan 2 saat önce sıçanlar tartılıp, vücut ağırlıklarına göre 3 mg/kg dozundaki kolşisin distile suda çözülerek intraperitoneal olarak uygulanmıştır.



**Şekil 3.1.3.** Hayvanlara akrilamitin uygulamasının yapıldığı gavaj

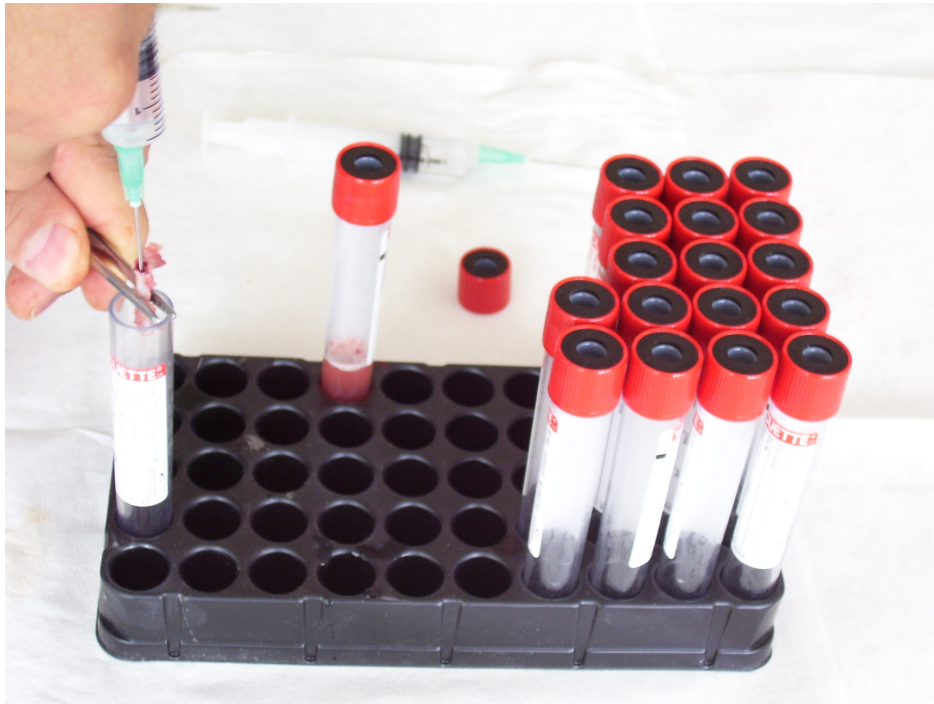


**Şekil 3.1.4.** Gavaj yolu ile akrilamitin uygulanış biçimi

Akrilamit uygulamasından sonra her üç çalışma için belirlenen aralıkta kemik iliği numunesi alınmıştır. Numune alınırken ölüm sonrası değişikliklere sebebiyet vermemek için sıçanların ölümünü takiben 3 dakika içerisinde her iki bacdaktan femur kemiğı çıkartılmış (Şekil 3.1.5) ve kemik iliğı steril, vakumlu tüplere aktarılmıştır (Şekil 3.1.6).



**Şekil 3.1.5.** Sıçanlardan çıkarılıp kaslarından iyice temizlenen femur kemikleri



**Şekil 3.1.6.** Kemik iliği numunesinin vakumlu tüplere aktarılması

### 3.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda sıçanlara uygulanan akrilamit (CAS no. 79-06-1) %99 saflığındadır. Mitotik aktivitenin tespitinde kullanılan kolşisin (Cas No. 64-86-8) ve akrilamit Sigma'dan temin edilmiştir.

### 3.3. Megakaryositik Emperipolez

Megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesinin belirlenmesinde uygulanacak akrilamitin dozu daha önce gerçekleştirilen pilot çalışmasının sonucuna göre tespit edilmiştir. Buna göre 30, 45 ve 60 mg/kg dozundaki akrilamit 5 ardışık gün boyunca hayvanların vücut ağırlıklarına göre uygulanmıştır. Emperipolez deneyi için her doz ve kontrol grubunda 5'er sıçan olmak üzere toplam 20 sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar günlük olarak tartılmış ve uygulanacak dozlar hayvanların günlük vücut ağırlıklarına göre, distile suda çözülerek gavaj yolu ile verilmiştir. Doz hacmi 0.5 ml olarak ayarlanmıştır. Akrilamit uygulaması her gün aynı saatte gerçekleştirilmiştir. Son uygulamadan 24 saat sonra hayvanların ketamin (90 mg/kg v.a.) ile anestezileri sağlanmış ve anestezi altında iken servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülerek femur kemikleri çıkartılmıştır. Sağ ve sol femur kemiği arasında ilik hücre yoğunluğu bakımından önemli derecede farklılık bulunmadığından (Chen ve ark. 1972) her ikisi de incelemelerde kullanılmıştır. Çıkartılan kemikler kaslarından iyice temizlenerek görünür hale getirilmiştir (Şekil 3.1.5). İki ucundan kesilerek pens ile tutulmuş ve bir enjektör yardımı ile kemiğin açık uçlarından bir tanesinden fizyolojik serum basınçla fışkırtılarak kemik iliği santrifüj tüpüne aktarılmıştır (Şekil 3.1.6). Kemik içindeki iliğin tamamı elde edilene kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Tüpler dengelendikten sonra 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant pastör pipeti ile alınmıştır. Tüp içerisinde kalan kısım yeniden süspanse edilerek kemik iliği numunesi daha önceden temizlenmiş lamalar üzerine yayılıp havada kurutulmuş ve mutlak metil alkolde 20 dakika tespit edilmiştir. Her hayvandan 5 preparat hazırlanmış ve May Grunwald-Giemsa ile boyanmıştır. Enthellan ile kapatılıp kodlanarak hazırlanan daimi preparatlar "Olympus

CX21FS1'' marka ışık mikroskobunda incelenerek, Olympus BX50 marka araştırma mikroskobunda mikrografları alınmıştır.

Megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesinin belirlenebilmesi için, 400 büyütmede her preparat üzerinde, morfolojik olarak tanınabilen megakaryositik seriye ait toplam 100 adet hücre (her hayvan örneğinde 500 hücre) rastgele sayılmıştır. 20 µm'den küçük olan megakaryositik hücreler ışık mikroskobu düzeyinde, diğer kemik iliği hücreleri ile karışabileceğinden sayım işlemine dâhil edilmemiştir. Sayım işlemi yapılan hücrelerde emperipolez görülen megakaryosit sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkartılmıştır.

### 3.4. Mitotik Aktivite

Kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerinin megakaryositik emperipolez olayının oluşma sıklığı ile bir ilişkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için, emperipolez olayının oluşma sıklığının belirlenmesi amacıyla hayvanlara uygulanan akrilamit dozları ve bu dozların uygulama süreleri değiştirilmeden akrilamitin kemik iliği hücrelerinin mitotik aktiviteleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bundan dolayı; 30, 45 ve 60 mg/kg dozlarındaki akrilamit 5 ardışık gün boyunca uygulanmıştır. Mitotik aktivite deneyi için her doz ve kontrol grubunda 5'er sıçan olmak üzere toplam 20 sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar günlük olarak tartılmış ve uygulanacak dozlar hayvanların günlük vücut ağırlıklarına göre, distile suda çözülerek gavaj yolu ile verilmiştir. Doz hacmi 0.5 ml olarak ayarlanmıştır. Akrilamit uygulaması her günün aynı saatinde gerçekleştirilmiştir. Mitotik aktivite için metafaz preparatları Preston'a (1987) göre yapılmıştır. Bunun için; akrilamitin son uygulamasından 24 saat sonra 3 mg/kg v.a. dozundaki kolşisin distile suda çözülerek intraperitoneal olarak sıçanlara enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 2 saat sonra hayvanların ketamin (90 mg/kg v.a.) ile anesteziyi yapılarak, hayvanlar anestezi altındayken servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülüp femur kemikleri çıkartılmış ve kaslarından iyice temizlenerek görünür hale getirilmiştir (Şekil 3.1.5). Her iki femura ait kemik iliği 2 ml %2.2'lik sodyum sitrat ihtiva eden enjektörler ile fişkırtılarak santrifüj tüpüne aktarılmıştır (Şekil 3.1.6). Tüpler dengelendikten sonra

kemik iliği numunesi 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Hücrelere 37°C’de ön ısıtma yapılmış 0.075 M 5 ml KCl ilave edilerek karışım süspanse edilip 37°C’de 15-20 dakika etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 1000 rpm’de 5 dakika tekrar santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Hücreler taze olarak hazırlanmış 4 ml soğuk Carnoy’s Fiksatif (Metanol ve Glacial asetik asit karışımı 3:1, v:v) içerisinde oda sıcaklığında dik tutularak 20 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra hücreler 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kalan kısım yeniden süspanse edilmiş ve üzerine 2 ml taze Carnoy’s fiksatifinden ilave edilip oda sıcaklığında 20 dakika tekrar fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra hücreler 1000 rpm’de 5 dakika tekrar santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Taze fiksatif ilave edilmiş ve geride kalan kısım fiksatif ile birlikte 0.5 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Hücreler pastör pipeti yardımı ile süspanse edilmiş ve nemli temiz lamlara 3-4 cm yukarıdan damlatılarak yayılmıştır. Lamlar oda sıcaklığında kurutulmuş ve %10’luk Giemsa ile 20 dakika boyanmıştır. Boyamadan sonra ksilolde şeffaflaştırma yapılmış, enthellan ile kapatılıp kodlanarak daimi preparat haline getirilmiştir. Her hayvandan 2 preparat yapılmıştır. “Olympus CX21FS1” marka ışık mikroskopunda 1000 büyütmede her hayvan örneğinde rastgele 1000 hücre sayılmış ve bunların içerisindeki interfaz hücrelerinin sayıları ile metafaz evresindeki hücrelerinin sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkartılmıştır.

### 3.5. Mikronükleus Testi

Akrilamitin *Sprague Dawley* ırkı albino erkek sıçan kemik iliğinde klastojenik ve sitotoksik etki oluşturup oluşturmadığını belirlemek için her grupta 5 sıçan olmak üzere toplam 20 sıçan kullanılmıştır. Bu sıçanlardan 4 grup oluşturulmuş ve gruplardan bir tanesi kontrol grubu, diğer üç tanesi de deney grubu olarak belirlenmiştir. Deney gruplarına verilecek akrilamit dozları daha önce gerçekleştirilen pilot çalışma sonucunda tespit edilmiştir. Pilot çalışmada maksimum tolere edilebilen doz miktarı 175 mg/kg olarak bulunmuş bu doz uygulanacak en yüksek doz olarak kabul edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda mikronükleus

sıklığını belirlemek için sıçanlara en yüksek akrilamit dozu olarak 100 mg/kg uygulanmıştır ve bu dozun *Sprague Dawley* ırkı sıçanlarda mikronükleus oluşumuna etki etmediği gözlenmiştir (Paulsson ve ark. 2002). Bu sebepten dolayı da bu çalışmada sıçanlara uygulanacak en düşük doz 125 mg/kg olarak seçilmiştir. Ara doz olarak da 150 mg/kg uygulanmıştır. Buna göre 125, 150 ve 175 mg/kg dozlarındaki akrilamit distile suda çözülerek gavaj yolu ile sıçanlara tek doz olarak uygulanmıştır. Uygulamada sıçanlar tartılarak doz ayarlaması vücut ağırlıklarına göre yapılmıştır ve doz hacmi 0.5 ml olarak ayarlanmıştır. Çalışmada doz-yanıt ilişkisine bakılmıştır. Bundan dolayı uygulanan dozlar farklılık gösterirken numune alma aralığı her üç dozda da sabit tutulmuştur. Düşük doz çalışmalarında periferik kan daha az değişkenlik gösterdiğinden dolayı daha iyi çalışılmaktadır fakat sıçanlarda dalak MNPCE'leri seçici olarak uzaklaştırdığı için mikronükleus çalışmalarında sıçanlar kullanıldığı zaman dolaşım kanı yerine kemik iliği tercih edilmektedir (Paulsson ve ark. 2003). Bu bilgi ışığı altında çalışmamızda mikronükleus sıklığını tespit etmek üzere dolaşım kanı (periferik kan) yerine kemik iliği kullanılmıştır. Kemik iliği preparatları ilk kez Schmid (1975) tarafından geliştirilip, laboratuvar koşullarımıza göre uyarlanan bir yöntem ile hazırlanmıştır. Buna göre; akrilamit uygulamasından 48 saat sonra hayvanların ketamin (90 mg/kg v.a.) ile anesteziyi yapılarak, hayvanlar anestezi altındayken servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülüp femur kemikleri çıkartılmıştır. Çıkartılan kemikler kaslarından iyice temizlenerek görünür hale getirilmiştir (Şekil 3.1.5). İki ucundan kesilerek pens ile tutulmuş ve her femura ait kemik iliği içerisinde 1 ml sığır serumu ihtiva eden enjektör ile santrifüj tüpüne aktarılmıştır (Şekil 3.1.6). Bu işlem yine 1 ml sığır serumu ihtiva eden enjektör ile diğer ucundan da verilerek kemik iliğinin tamamının santrifüj tüpüne aktarılması sağlanmıştır. Dolayısıyla her femur için 2 ml sığır serumu kullanılmıştır. Kemik iliği numunesi 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Geride kalan kısma bir damla sığır serumu konularak süspanse edilmiş ve temiz lamlar üzerine ikinci bir lam yardımı ile yayılmıştır. Lamlar havada kurutulmuş ve metil alkolde 10 dakika fikse edilmiştir. %0.25'lik May Grunwald boyası ile 5 dakika boyanmış, saf su ile yıkanmış, %0.125'lik May Grunwald boyası ile 5 dakika tekrar boyanarak, saf su ile hafifçe yıkanmıştır. Son olarak %20'lik Giemsa boyası ile 30 dakika boyanıp saf su ile yıkandıktan sonra havada kurumaya bırakılmıştır.

Boyamadan bir gün sonra enthellan ile kapatılarak, kodlanmış ve daimi preparat haline getirilmiştir. Her hayvandan 2 preparat hazırlanmıştır. “Olympus CX21FS1” marka ışık mikroskobunda 1000 büyütmede her preparat üzerinde rastgele 1000 adet PCE (her hayvan örneğinde 2000 hücre) sayılmış ve bunların içerisindeki MNPCE’lerin sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkartılmıştır. Mikronükleusların tanısı, Schmid (1975)’e göre yapılmıştır.

1000 toplam eritrositte sayılan PCE ile NCE arasındaki oran kemik iliği hücrelerini etkileyen kimyasal maddenin toksisitesini göstermesi açısından önemli bir indekstir (Lambert ve ark. 2005). Kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman kimyasal ile muamele edilen hayvanlardaki PCE/NCE oranında gözlenen önemli azalma, uygulanan kimyasal maddenin kemik iliğine ulaştığının ve nükleuslu prekürsör (öncü) eritrosit hücrelerinin çoğalmasını ve olgunlaşmasını engelleyerek eritrosit oluşumunu azalttığının bir göstergesidir. (Cicchetti ve ark. 1999). Bunun için sitotoksikite kontrolü ve doz yanıt etkisini belirlemek için kontrol grubu ve tüm doz gruplarındaki her hayvanda rastgele toplam 1000 eritrosit (PCE ve NCE) sayılarak PCE/NCE oranı tespit edilmiştir. Preparatlara ait fotoğraflar Olympus BX50 marka araştırma mikroskobunda alınmıştır.

### 3.6. Verilerin Analizi

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel işlemleri SPSS paket programında yapılmıştır. Bunun için; grup varyanslarının homojenliğini test etmek üzere “Levene” testi uygulanmıştır. Deney grubu ortalamaları arasında farklılık olup olmadığını sınamak üzere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve eğer deney grupları ortalamaları arasında farklılık varsa gözlenen bu farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek üzere de grup ortalamaları üzerinde “Anova-Duncan” testi uygulanmıştır ve  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

### 4.1. Deney ve Kontrol Grubu *Sprague Dawley* Sıçanların Kemik İliğinde Megakaryositik Emperipolez

*Sprague Dawley* kemik iliğinde ışık mikroskobu düzeyinde yaptığımız bu çalışmada, çapları 20 µm'den daha büyük olan megakaryositik hücrelerin diğer kemik iliği hücrelerinden net bir şekilde ayırt edilebildiği gözlenmiştir. Çapları 20 µm'den daha küçük olan megakaryosit öncüleri ise büyüklük ve şekil benzerliği nedeni ile diğer ilik hücreleri ile karıştırılacağından dolayı bunları kesin olarak ayırt etmek mümkün olmamıştır. *Sprague Dawley* ırkı sıçanlarda morfolojik bakımdan tanınabilen kemik iliği megakaryositleri, diğer memeli canlılardaki megakaryositler ile şekil ve yapı itibarıyla büyük benzerlik göstermektedir. Bu megakaryositik hücreler büyüklük, çekirdek şekli ve sitoplazmanın boyanma özelliğine göre farklılaşma sırasıyla promegakaryoblast, megakaryoblast, promegakaryosit ve olgun megakaryosit olmak üzere ışık mikroskobu düzeyinde 4 grupta sınıflandırılmıştır. Bazı kemik iliği yayma preparatlarında gözlenen az sayıdaki piknotik çekirdekli mikromegakaryositler bu gruplandırma işlemine dâhil edilmemiştir. May-Grunwald-Giemsa metodu ile boyanan megakaryosit hücrelerinin hem çekirdeklerinin hem de sitoplazmalarının iyi boyandığı görülmüştür (Şekil 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6)

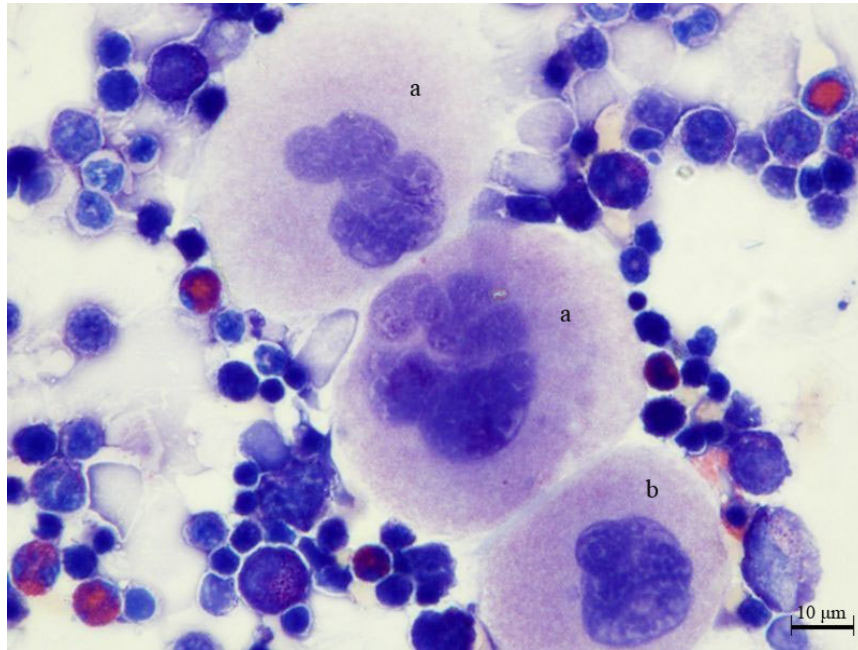
Büyüklük bakımından diğer kemik iliği hücrelerinden ayırt edilebilen ilk megakaryositik hücreleri promegakaryoblastlardır. Yapılan gözlemlerde bunların büyüklüklerinin genellikle 20-24 µm arasında değiştiği, oval şeklinde, segment oluşumu göstermeyen tek bir çekirdeğe sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.1.2). Megakaryositik serinin diğer hücreleri ile karşılaştırıldığında, *Sprague Dawley* ırkı sıçanların kemik iliği yaymalarında az sayıda promegakaryoblastlara rastlanmıştır.

Megakaryoblastların büyüklüklerinin genellikle 25-40 µm arasında değiştiği, koyu boyanan çekirdeklerinin U, C veya böbrek şeklinde ve sitoplazmasının yarısını veya yarısından daha fazlasını kaplamış olduğu görülmüştür. *Sprague Dawley* ırkı

sıçanların kemik iliği yaymalarında megakaryoblastların promegakaryoblastlara göre daha fazla sayıda oldukları gözlenmiştir.

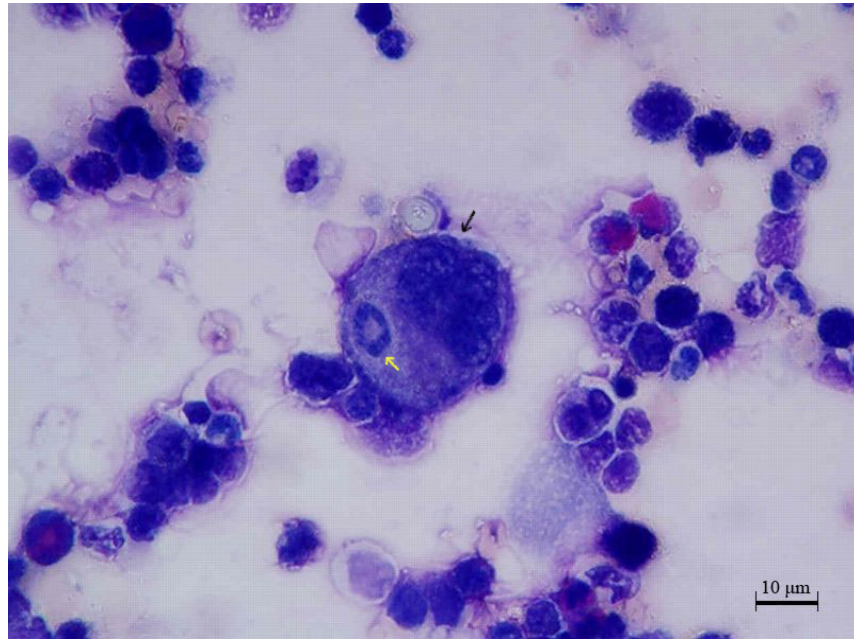
Promegakaryositlerin büyüklüklerinin genellikle 30-60  $\mu\text{m}$  arasında değiştiği ve çekirdeklerinin sitoplazmanın yarısını kapladığı gözlenmiştir. Sitoplazmanın megakaryoblastlarda gösterdiği bazofilik yapının burada daha az olduğu görülmüştür (Şekil 4.1.3).

Olgun megakaryositlerin büyüklüklerinin ise genellikle 50-80  $\mu\text{m}$  arasında değiştiği bazen de bu sınırın üzerine çıktığı gözlenmiştir. *Sprague Dawley* ırkı sıçanların kemik iliği yaymalarında megakaryositik serinin en çok rastlanan ve en büyük olan hücreleri olduğu görülmüştür. Koyu boyanan çekirdekleri belli ve sabit bir görünümünden ziyade değişik şekiller almıştır. Genellikle tek veya çok loblu bir yapı gösteren çekirdekteki lob sayısının olgunlaşmaya paralel olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1.1). Çekirdeğin sitoplazmaya göre çok az yer işgal ettiği ve hücrenin büyük bir bölümünü sitoplazmanın oluşturduğu görülmüştür. Işık mikroskobu düzeyinde incelendikleri zaman sitoplazmadaki çekirdek dışında diğer organeller belirgin olarak görülememiştir.

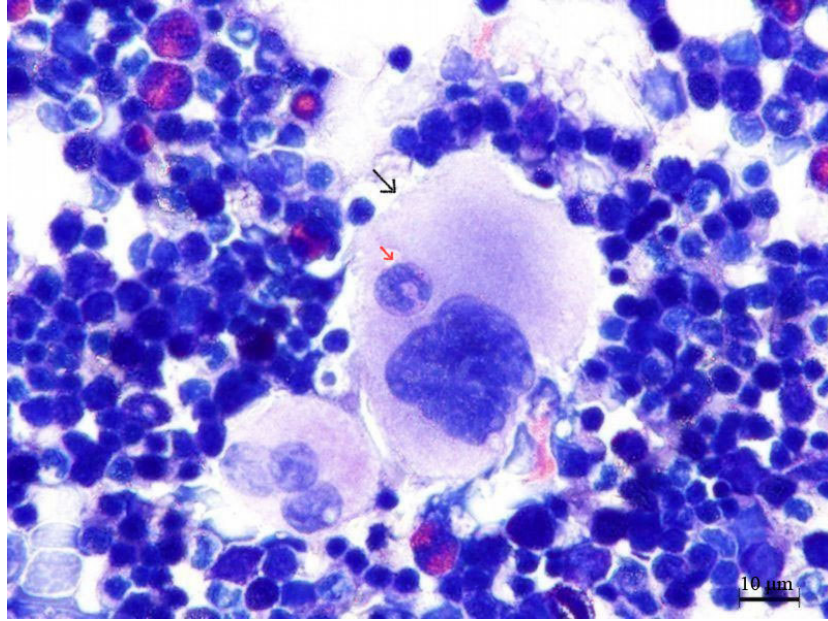


**Şekil 4.1.1.** Kontrol grubu sıçanlara ait iki adet olgun megakaryosit (a) ve bir adet promegakaryosit (b)

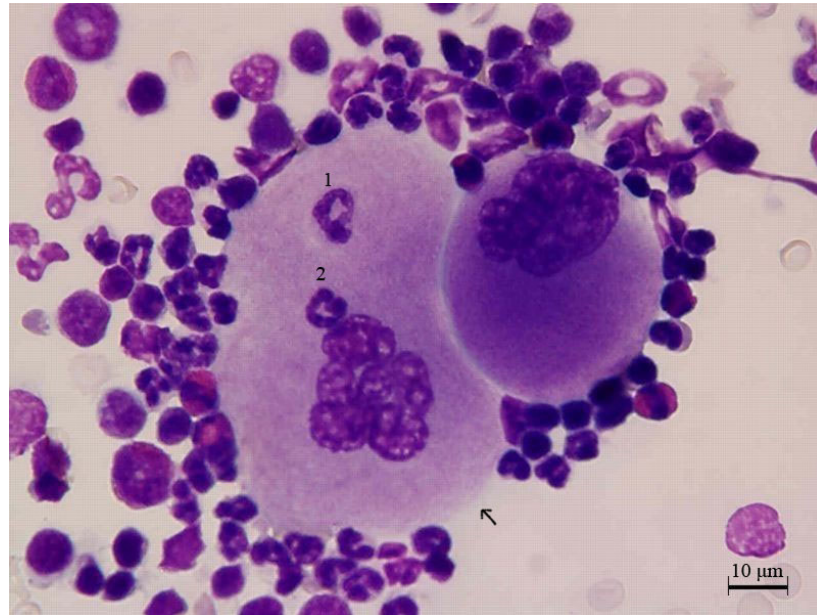
Akrilamitin *Sprague Dawley* sıçan kemik iliğindeki megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesine olan etkisini belirlemek için hazırlanan kemik iliği yayma preparatları incelendiği zaman, bazı megakaryositik hücrelerin çeşitli kemik iliği hücrelerini sitoplazmaları içerisine aldıkları çok bariz bir şekilde görülmüştür (Şekil 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9, 4.1.10). Yapılan bütün taramalarda, çeşitli kemik iliği hücrelerini sitoplazmasında taşıyan megakaryositik hücrelerin çoğunlukla olgun megakaryositler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.4, 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9). Sitoplazmasında ilik hücresi bulunduran promegakaryoblast, megakaryoblast veya promegakaryositlere çok az rastlanmıştır (Şekil 4.1.2, 4.1.3, 4.1.6). Bir megakaryosit tarafından yutulan hücre sayısının çoğunlukla 1-3 arasında değiştiği (Şekil 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.10), bazen de bu sınırın üzerine çıktığı görülmüştür (Şekil 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9). Ayrıca yutulan hücrenin etrafını saran açık bir alan megakaryosit sitoplazması ile bir sınır teşkil etmektedir (Şekil 4.1.2, 4.1.5, 4.1.7, 4.1.9). Bu sınır yutulan hücreyi megakaryosit sitoplazmasından ayırmaktadır.



**Şekil 4.1.2.** Deney grubu sıçanların kemik iliğindeki promegakaryoblast (siyah okla gösterilen) tarafından yutulan nötrofil lökosit (sarı okla gösterilen) ve yutulan hücrelerin etrafında gözlenen açık renkteki alan

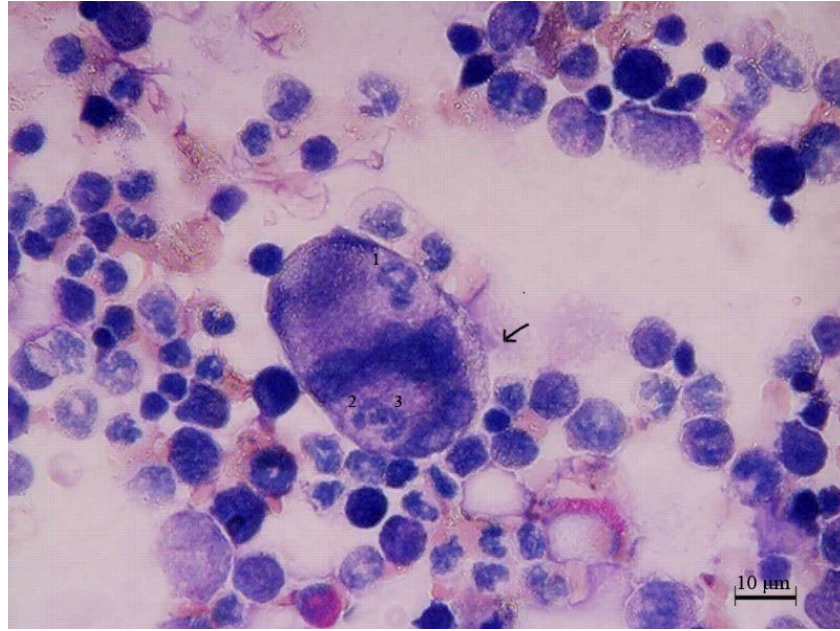


**Şekil 4.1.3.** Deney grubu sıçanların kemik iliğindeki promegakaryosit (siyah okla gösterilen) tarafından yutulan bir adet kemik iliği hücresi (kırmızı okla gösterilen)

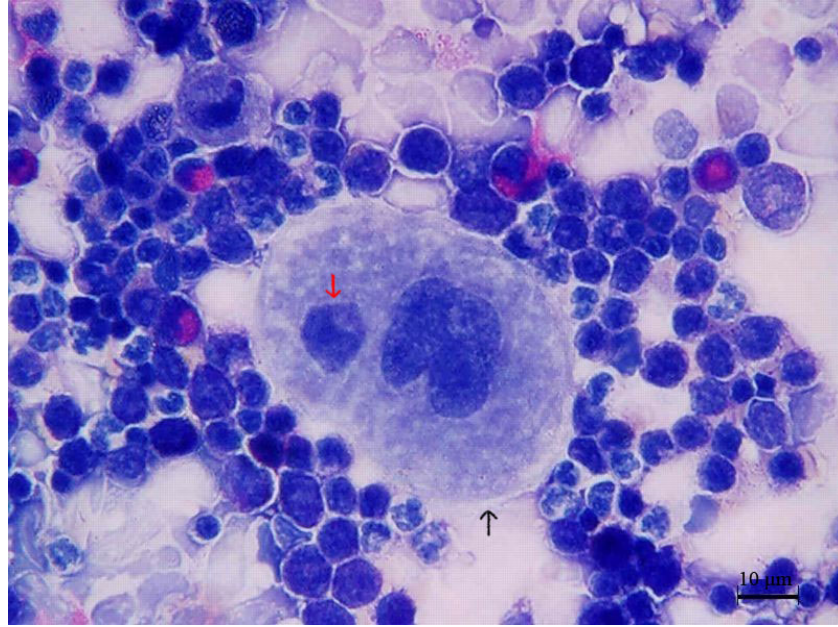


**Şekil 4.1.4.** Deney grubu sıçanlara ait ve sitoplazmalarında iki adet kemik iliği hücresi (1, 2) bulunduran olgun megakaryosit (okla gösterilen)

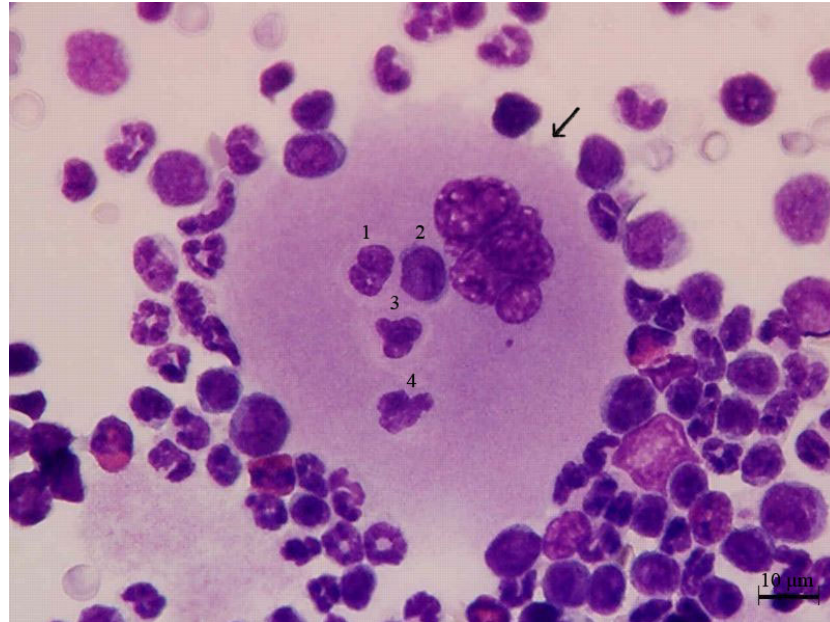
Megakaryositlerin ve megakaryositler tarafından yutulan kemik iliği hücrelerinin özellikle çekirdek ve sitoplazma yapılarını korudukları gözlenmiştir. Fagositozun belirleyici özelliği olan fagozom oluşumuna da rastlanmamıştır. Yutulan hücreler genellikle sitoplazma ve bazen de çekirdek tarafından çevrenilmiş vaziyettedir (Şekil 4.1.5). Megakaryositler tarafından yutulan hücrelerin, çeşitli tipteki kemik iliği hücreleri olabileceği gibi, daha çok olgun granülositler olduğu, bu granülositlerden de en çok nötrofillerin emperipoleze uğradığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.8, 4.1.9). Granülsüz lökositlerin de megakaryositler tarafından yutulduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.6, 4.1.10).



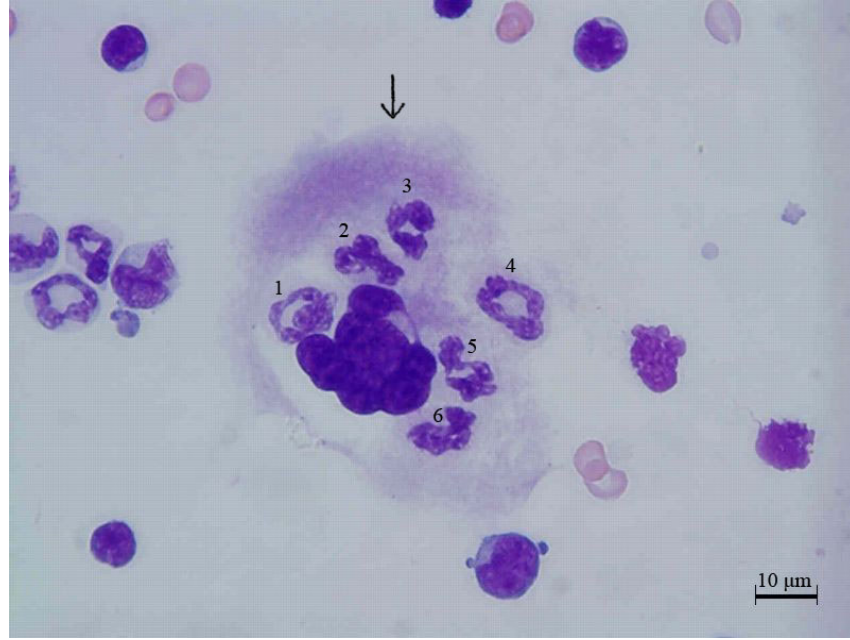
**Şekil 4.1.5.** Deney grubu sıçanlara ait ve sitoplazmasında üç adet kemik iliği hücresi (1, 2, 3) bulunduran megakaryosit (okla gösterilen)



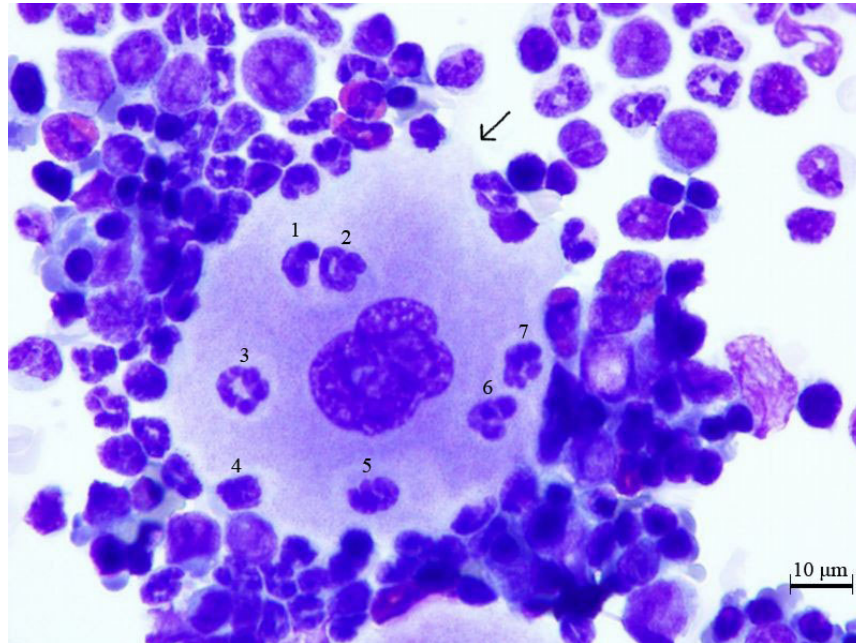
**Şekil 4.1.6.** Deney grubu sıçanların kemik iliğindeki megakaryoblast (siyah okla gösterilen) tarafından yutulan bir adet granülsüz lökosit (kırmızı okla gösterilen)



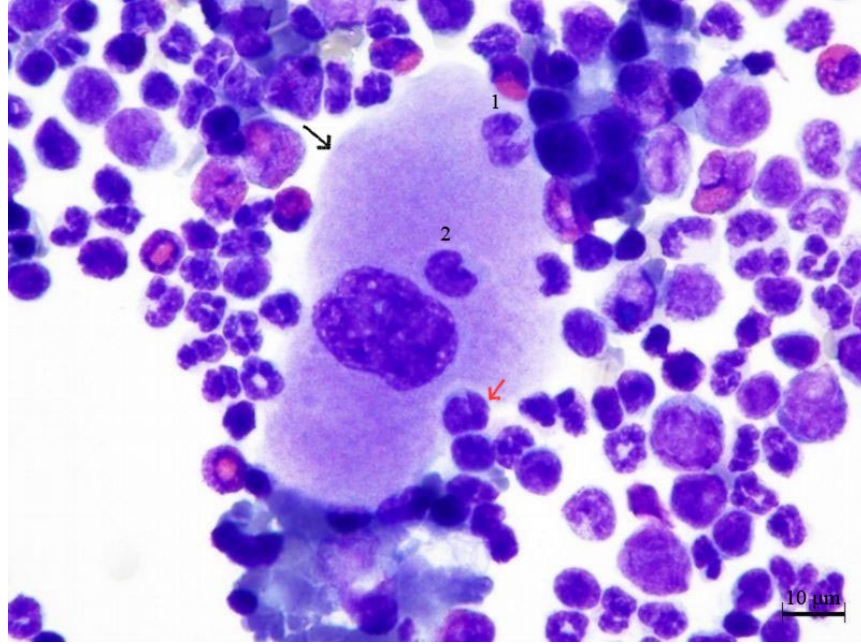
**Şekil 4.1.7.** Deney grubu sıçanlara ait ve içerisine 4 adet kemik iliği hücresi (1, 2, 3, 4) almış olgun megakaryosit (okla gösterilen)



**Şekil 4.1.8.** Deney grubu sıçanlara ait ve içerisinde 6 adet kemik iliği hücresi (1, 2, 3, 4, 5, 6) almış olgun megakaryosit (okla gösterilen)



**Şekil 4.1.9.** Deney grubu sıçanlara ait ve içerisinde 7 adet kemik iliği hücresi (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) almış olgun megakaryosit (okla gösterilen)



**Şekil 4.1.10.** Deney grubu sıçanlara ait ve içerisine iki adet kemik iliği hücresi (1, 2) almış ve bir tanesini (kırmızı okla gösterilen) de almakta olan promegakaryosit (siyah okla gösterilen)

#### 4.1.1. Kontrol grubu sıçanlarda gözlenen megakaryositik emperipolez

Kontrol grubu sıçanlara akrilamit içermeyen distile su gavaj yolu ile verilmiştir. Sıçanların kemik iliklerinden hazırlanan preparatlardan elde edilen sayımların sonuçları Tablo 4.1.1.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.1.1.** Kontrol grubu sıçanlarda megakaryositik emperipolez oranları

| <b>Kontrol Grubu</b>   |                        |                  |                               |                                |
|------------------------|------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Örnek No               | Toplam Preparat Sayısı | Toplam MK Sayısı | Emperipolez Görülen MK Sayısı | Megakaryositik Emperipolez (%) |
| 1                      | 5                      | 500              | 60                            | 12                             |
| 2                      | 5                      | 500              | 53                            | 10.6                           |
| 3                      | 5                      | 500              | 48                            | 9.6                            |
| 4                      | 5                      | 500              | 48                            | 9.6                            |
| 5                      | 5                      | 500              | 55                            | 11                             |
| <b>Grup Ortalaması</b> |                        |                  | <b>52.80</b>                  | <b>% 10.56</b>                 |

Tablo 4.1.1.1’de görüldüğü gibi; kontrol grubu sıçanların kemik iliğinde emperipolez görülen megakaryosit sayılarının grup ortalaması **52.80** olarak bulunmuştur ve rastgele sayılan 2500 megakaryositin ortalama **%10.56**’sında emperipolez olayının gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu gruptan elde edilen değerler, kontrol değerleri olarak ele alınmış ve diğer grupların sonuçlarını karşılaştırmak için kullanılmıştır.

#### 4.1.2. 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubu sıçanlarda megakaryositik emperipolez

Akrilamitin 30 mg/kg olan birinci uygulama dozu sıçanlara vücut ağırlıklarına göre gavajla beş ardışık gün boyunca verilmiş ve bu uygulama sonucunda hazırlanan preparatların mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.2.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.2.1.** 30 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda megakaryositik emperipolez oranları

| <b>30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubu</b> |                        |                  |                               |                                |
|----------------------------------------------------|------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Örnek No                                           | Toplam Preparat Sayısı | Toplam MK Sayısı | Emperipolez Görülen MK Sayısı | Megakaryositik Emperipolez (%) |
| 1                                                  | 5                      | 500              | 50                            | 10                             |
| 2                                                  | 5                      | 500              | 54                            | 10.8                           |
| 3                                                  | 5                      | 500              | 48                            | 9.6                            |
| 4                                                  | 5                      | 500              | 52                            | 10.4                           |
| 5                                                  | 5                      | 500              | 57                            | 11.4                           |
| <b>Grup Ortalaması</b>                             |                        |                  | <b>52.20</b>                  | <b>% 10.44</b>                 |

Tablo 4.1.2.1’de görüldüğü gibi, 30 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanların kemik iliğinde emperipolez görülen megakaryosit sayılarının grup ortalaması **52.20** olarak bulunmuştur ve rastgele sayılan 2500 megakaryositin ortalama **%10.44**’ünde emperipolez olayının gözlemlendiği tespit edilmiştir.

#### **4.1.3. 45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubu sıçanlarda megakaryositik emperipolez**

Akrilamitin 45 mg/kg olan ikinci uygulama dozu sıçanlara vücut ağırlıklarına göre gavajla beş ardışık gün boyunca verilmiş ve bu uygulama sonucunda hazırlanan preparatların mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.3.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.3.1.** 45 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda megakaryositik emperipolez oranları

| <b>45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubu</b> |                        |                  |                               |                                |
|-----------------------------------------------------|------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Örnek No                                            | Toplam Preparat Sayısı | Toplam MK Sayısı | Emperipolez Görülen MK Sayısı | Megakaryositik Emperipolez (%) |
| 1                                                   | 5                      | 500              | 48                            | 9.6                            |
| 2                                                   | 5                      | 500              | 60                            | 12                             |
| 3                                                   | 5                      | 500              | 48                            | 9.6                            |
| 4                                                   | 5                      | 500              | 44                            | 8.8                            |
| 5                                                   | 5                      | 500              | 58                            | 11.6                           |
| <b>Grup Ortalaması</b>                              |                        |                  | <b>51.60</b>                  | <b>% 10.32</b>                 |

Tablo 4.1.3.1’de görüldüğü gibi, 45 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanların kemik iliğinde emperipolez görülen megakaryosit sayılarının grup ortalaması **51.60** olarak bulunmuştur ve rastgele sayılan 2500 megakaryositin ortalama **%10.32**’sinde emperipolez olayının gözlemlendiği tespit edilmiştir.

#### **4.1.4. 60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubu sıçanlarda megakaryositik emperipolez**

Akrilamitin 60 mg/kg olan son uygulama dozu sıçanlara vücut ağırlıklarına göre gavajla beş ardışık gün boyunca verilmiş ve bu uygulama sonucunda hazırlanan preparatların mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.4.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.4.1.** 60 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda megakaryositik emperipolez oranları

| <b>60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubu</b> |                        |                  |                               |                                |
|------------------------------------------------------|------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Örnek No                                             | Toplam Preparat Sayısı | Toplam MK Sayısı | Emperipolez Görülen MK Sayısı | Megakaryositik Emperipolez (%) |
| 1                                                    | 5                      | 500              | 32                            | 6.4                            |
| 2                                                    | 5                      | 500              | 42                            | 8.4                            |
| 3                                                    | 5                      | 500              | 40                            | 8                              |
| 4                                                    | 5                      | 500              | 34                            | 6.8                            |
| 5                                                    | 5                      | 500              | 32                            | 6.4                            |
| <b>Grup Ortalaması</b>                               |                        |                  | <b>36</b>                     | <b>% 7.2</b>                   |

Tablo 4.1.4.1’de görüldüğü gibi, 60 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanların kemik iliğinde emperipolez görülen megakaryosit sayılarının grup ortalaması **36** olarak bulunmuştur ve rastgele sayılan 2500 megakaryositin ortalama **%7.2**’sinde emperipolez olayının gözlemlendiği tespit edilmiştir.

#### 4.1.5. Kontrol ve deney grubu bulgularının karşılaştırılması

Akrilamitin *Sprague Dawley* sıçan kemik iliğinde gözlenen megakaryositik emperipolez sıklığına olan etkisinin araştırılmasında, kontrol grubu ile deney gruplarından elde edilen sayımlar sonucunda belirlenen grup ortalamaları ile megakaryositik emperipolezin yüzde ortalamaları Tablo 4.1.5.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.5.1.** Kontrol ve deney gruplarının megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesi bakımından karşılaştırılması

| Gruplar | Denek sayısı | Toplam Megakaryosit Sayısı | Emperipolez Görülen MK Sayısı | Grup Ortalamaları | Megakaryositik Emperipolez (%) Ortalamaları |
|---------|--------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------|---------------------------------------------|
| Kontrol | 5            | 2500                       | 264                           | <b>52.80</b>      | <b>10.56</b>                                |
| 30mg/kg | 5            | 2500                       | 261                           | <b>52.20</b>      | <b>10.44</b>                                |
| 45mg/kg | 5            | 2500                       | 258                           | <b>51.60</b>      | <b>10.32</b>                                |
| 60mg/kg | 5            | 2500                       | 180                           | <b>36</b>         | <b>7.2</b>                                  |

Tablo 4.1.5.1'de görüldüğü gibi kontrol grubunda emperipolez görülen megakaryosit sayılarının ortalaması 52.80 ve yüzde ortalaması 10.56 olarak bulunmuştur. 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubunda emperipolez görülen megakaryosit sayılarının ortalaması 52.20 ve yüzde ortalaması 10.44 olarak bulunmuştur. 45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubunda emperipolez görülen megakaryosit sayılarının ortalaması 51.60 ve yüzde ortalaması 10.32 olarak bulunmuştur. 60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubunda emperipolez görülen megakaryosit sayılarının ortalaması 36 ve yüzde ortalaması 7.2 olarak bulunmuştur.

Akrilamitin megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesine olan etkisinde kontrol ve deney grup ortalamaları ve yüzdeleri arasında gözlenen farklılığın ortaya konması için Duncan Testi yapılmıştır. Bunun için önce kontrol ve deney grup varyanslarının homojen olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu homojenliği belirlemek üzere "Levene" testi yapılmıştır. Test sonucu Tablo 4.1.5.2.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.5.2.** Megakaryositik emperipolez deneyinde kontrol ve deney grup varyanslarının homojenliğini belirleyen Levene Testi sonucu

| Levene Testi | Serbestlik Derecesi 1 | Serbestlik Derecesi 2 | P    |
|--------------|-----------------------|-----------------------|------|
| 2.339        | 3                     | 16                    | .112 |

Tablo 4.1.5.2’de görüldüğü gibi; megakaryositik emperipolez deneyine ait kontrol ve deney grup varyanslarının homojen olduğu saptanmıştır ( $F=2.339$   $P>0.05$ ). Bu homojenlikten dolayı, kontrol ve deney grubu ortalamaları arasında farklılık olup olmadığını sınamak üzere Tek Yönlü Varyans Analizi yapılmıştır. Yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu ise Tablo 4.1.5.3’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.5.3.** Kontrol ve deney gruplarının megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesi bakımından karşılaştırıldığı Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu

| Değişim Kaynağı | Kareler Toplamı | Serbestlik Derecesi | Kareler Ortalaması | F oranı | P    |
|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------|------|
| Gruplar Arası   | 987.750         | 3                   | 329.250            | 10.436  | .000 |
| Gruplar İçi     | 504.800         | 16                  | 31.550             |         |      |
| Toplam          | 1492.550        | 19                  |                    |         |      |

Tablo 4.1.5.3’de görüldüğü gibi; kontrol ve deney grupları arasında megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesi bakımından farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001$ ).

Yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi sonucunda kontrol ve deney grup ortalamaları arasında gözlenen farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek üzere grup ortalamaları üzerinde ‘‘Duncan’’ testi uygulanmış ve sonuçlar 0.05 anlam düzeyine göre Tablo 4.1.5.4.’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.5.4.** Kontrol ve deney grup ortalamalarının farklılıklarını gösteren Duncan Testi sonucu

| Emperipolez | N | p=0,05 |       |
|-------------|---|--------|-------|
|             |   | 1      | 2     |
| 60 mg/kg    | 5 | 36.00  |       |
| 30 mg/kg    | 5 |        | 51.60 |
| 45 mg/kg    | 5 |        | 52.20 |
| Kontrol     | 5 |        | 52.80 |
| P           |   | 1.000  | .754  |

p<0.05'e göre

Tablo 4.1.5.4'de görüldüğü gibi; 60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubundaki sıçanların kemik iliğinde gözlenen emperipolezin yoğunluk derecesi, 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların, 45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki sıçanların ve kontrol grubundaki sıçanların kemik iliğinde gözlenen megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların, 45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki sıçanların ve kontrol grubundaki sıçanların kemik iliğinde gözlenen megakaryositik emperipolezin yoğunluk dereceleri karşılaştırıldıklarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Akrilamitin *Sprague Dawley* ırkı erkek sıçanların kemik iliğindeki megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesine etkisinin incelendiği deney sonuçlarına göre;

- 30 mg/kg ve 45 mg/kg dozlarında uygulanan akrilamitin kontrol grubu ile karşılaştırıldıkları zaman, megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesini etkilemediği tespit edilmiştir (Tablo 4.1.5.4).
- 60 mg/kg dozundaki akrilamitin ise 30 mg/kg ve 45 mg/kg akrilamit dozları ile kontrol grubuna göre megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesini istatistiksel açıdan önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir (Tablo 4.1.5.4).

#### 4.2. Kontrol ve Deney Grubu *Sprague Dawley* Sıçanların Kemik İliğinde Mitotik Aktivite

Akrilamitin *Sprague Dawley* ırkı albino erkek sıçan kemik iliği hücrelerindeki mitotik aktivite üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemek için her biri 5 hayvan örneğinden oluşan 4 grup kontrol ve deney grupları olarak ayrılmıştır. Megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesinin kemik iliği hücrelerinin mitotik aktiviteleri ile bir ilişkisinin olup olmadığı araştırılacağı için, emperipolez deneyinde kullanılan akrilamit dozları ve uygulama süresi bu çalışma için de kullanılmıştır. Bunun için; sıçanların vücut ağırlıklarına göre 30 mg/kg, 45 mg/kg ve 60 mg/kg dozlarındaki akrilamit gavajla beş ardışık gün boyunca sıçanlara verilmiştir. Hazırlanan kemik iliği preparatlarında, her hayvanda rastgele 1000 hücre sayılmış ve metafaz evresindeki hücreler sayılarak mitotik aktivite tespit edilmiştir.

##### 4.2.1. Kontrol grubu sıçanlarda mitotik aktivite

Kontrol grubu sıçanlara akrilamit içermeyen distile su gavaj yolu ile verilmiş ve hazırlanan kemik iliği preparatlarındaki sayımlardan mitotik aktivitenin grup ortalaması ve yüzde ortalaması çıkarılmıştır. Kontrol grubundan elde edilen sayımların sonuçları Tablo 4.2.1.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.1.1.** Kontrol grubu sıçanlarda mitotik aktivite oranları

| <b>Kontrol grubu</b>   |                     |                       |                      |                         |
|------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| Örnek No               | Toplam hücre sayısı | İnterfaz hücre sayısı | Metefaz hücre sayısı | Metafaz hücre oranı (%) |
| 1                      | 1000                | 969                   | 31                   | 3.1                     |
| 2                      | 1000                | 970                   | 30                   | 3                       |
| 3                      | 1000                | 968                   | 32                   | 3.2                     |
| 4                      | 1000                | 965                   | 35                   | 3.5                     |
| 5                      | 1000                | 960                   | 40                   | 4                       |
| <b>Grup ortalaması</b> |                     |                       | <b>33.60</b>         | <b>3.36</b>             |

Tablo 4.2.1.1’de görüldüğü gibi; kontrol grubundaki mitoz hücre sayısı ortalaması 33.60 olarak bulunmuştur ve sayılan 5000 hücrenin %3.36’sının metafaz evresinde olduğu tespit edilmiştir. Bu gruptan elde edilen değerler, kontrol değerleri olarak ele alınmış ve diğer grupların sonuçlarını karşılaştırmak için kullanılmıştır.

#### 4.2.2. 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubu sıçanlarda mitotik aktivite

Akrilamitin 30 mg/kg olan birinci uygulama dozu sıçanlara vücut ağırlıklarına göre gavajla verilmiştir. Sıçanların kemik iliklerinden hazırlanan preparatlardan elde edilen sayımların sonuçları Tablo 4.2.2.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.2.1.** 30 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mitotik aktivite oranları

| 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubu |                     |                       |                      |                         |
|---------------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| Örnek No                                    | Toplam hücre sayısı | İnterfaz hücre sayısı | Metafaz hücre sayısı | Metafaz hücre oranı (%) |
| 1                                           | 1000                | 971                   | 29                   | 2.9                     |
| 2                                           | 1000                | 967                   | 33                   | 3.3                     |
| 3                                           | 1000                | 961                   | 39                   | 3.9                     |
| 4                                           | 1000                | 965                   | 35                   | 3.5                     |
| 5                                           | 1000                | 970                   | 30                   | 3                       |
| Grup ortalaması                             |                     |                       | 33.20                | 3.32                    |

Tablo 4.2.2.1’de görüldüğü gibi; 30 mg/kg akrilamit uygulaması sonucu hazırlanan preparatların sayımlarında mitoz hücre sayısı ortalaması 33.20 olarak bulunmuştur ve sayılan 5000 hücrenin %3.32’sinin metafaz evresinde olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.2.3. 45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubu sıçanlarda mitotik aktivite

Akrilamitin 45 mg/kg olan ikinci uygulama dozu sıçanlara vücut ağırlıklarına göre gavajla verilmiştir. Sıçanların kemik iliklerinden hazırlanan preparatlardan elde edilen sayımların sonuçları Tablo 4.2.3.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.3.1.** 45 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mitotik aktivite oranları

| <b>45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubu</b> |                     |                       |                      |                         |
|-----------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| Örnek No                                            | Toplam hücre sayısı | İnterfaz hücre sayısı | Metafaz hücre sayısı | Metafaz hücre oranı (%) |
| 1                                                   | 1000                | 974                   | 26                   | 2.6                     |
| 2                                                   | 1000                | 976                   | 24                   | 2.4                     |
| 3                                                   | 1000                | 979                   | 21                   | 2.1                     |
| 4                                                   | 1000                | 971                   | 29                   | 2.9                     |
| 5                                                   | 1000                | 973                   | 27                   | 2.7                     |
| <b>Grup ortalaması</b>                              |                     |                       | <b>25.40</b>         | <b>2.54</b>             |

Tablo 4.2.3.1’de görüldüğü gibi; 45 mg/kg akrilamit uygulaması sonucu hazırlanan preparatların sayımlarında mitoz hücre sayısı ortalaması 25.40 olarak bulunmuştur ve sayılan 5000 hücrenin %2.54’ünün metafaz evresinde olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.2.4. 60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubu sıçanlarda mitotik aktivite

Akrilamitin 60 mg/kg olan son uygulama dozu sıçanlara vücut ağırlıklarına göre gavajla verilmiş ve bu uygulama sonucunda hazırlanan preparatların mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2.4.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.4.1.** 60 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mitotik aktivite oranları

| <b>60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubu</b> |                     |                       |                      |                         |
|------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| Örnek No                                             | Toplam hücre sayısı | İnterfaz hücre sayısı | Metafaz hücre sayısı | Metafaz hücre oranı (%) |
| 1                                                    | 1000                | 984                   | 16                   | <b>1.6</b>              |
| 2                                                    | 1000                | 982                   | 18                   | <b>1.8</b>              |
| 3                                                    | 1000                | 978                   | 22                   | <b>2.2</b>              |
| 4                                                    | 1000                | 986                   | 14                   | <b>1.4</b>              |
| 5                                                    | 1000                | 980                   | 20                   | <b>2.0</b>              |
| <b>Grup ortalaması</b>                               |                     |                       | <b>18</b>            | <b>1.8</b>              |

Tablo 4.2.4.1’de görüldüğü gibi; 60 mg/kg akrilamit uygulaması sonucu hazırlanan preparatların sayımlarında mitoz hücre sayısı ortalaması 18 olarak bulunmuştur ve sayılan 5000 hücrenin %1.8’inin metafaz evresinde olduğu tespit edilmiştir.

#### **4.2.5. Kontrol ve deney gruplarının mitotik aktivite bakımından karşılaştırılması**

Akrilamitin *Sprague Dawley* sıçan kemik iliğindeki hücrelerin mitotik aktivitelerine olan etkisinin araştırılmasında, kontrol grubu ile deney gruplarından elde edilen sayımlar sonucunda belirlenen grup ortalamaları ile mitoz görülen hücrelerin yüzde ortalamaları Tablo 4.2.5.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.5.1.** Kontrol ve deney gruplarının mitotik aktivite bakımından karşılaştırılması

| Gruplar  | Denek sayısı | Toplam hücre sayısı | İnterfaz hücre sayısı | Metafaz hücre sayısı | Grup ortalaması | Metafaz hücre oranı ortalaması (%) |
|----------|--------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|------------------------------------|
| Kontrol  | 5            | 5000                | 4832                  | 168                  | <b>33.60</b>    | <b>3.36</b>                        |
| 30 mg/kg | 5            | 5000                | 4834                  | 166                  | <b>33.20</b>    | <b>3.32</b>                        |
| 45 mg/kg | 5            | 5000                | 4873                  | 127                  | <b>25.40</b>    | <b>2.54</b>                        |
| 60 mg/kg | 5            | 5000                | 4910                  | 90                   | <b>18</b>       | <b>1.8</b>                         |

Tablo 4.2.5.1’de görüldüğü gibi; kontrol grubunda metafaz evresinde olan hücre sayılarının ortalaması 33.60 ve metafaz hücre oranı ortalaması (%) ise 3.36 olarak bulunmuştur. 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubunda metafaz evresinde olan hücre sayılarının ortalaması 33.20 ve metafaz hücre oranı ortalaması (%) ise 3.32 olarak bulunmuştur. 45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubunda metafaz evresinde olan hücre sayılarının ortalaması 25.40 ve metafaz hücre oranı ortalaması (%) ise 2.54 olarak bulunmuştur. 60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubunda metafaz evresinde olan hücre sayılarının ortalaması 18 ve metafaz hücre oranı ortalaması (%) ise 1.8 olarak bulunmuştur.

Akrilamitin mitotik aktivite üzerine olan etkisinin incelenmesinde, kontrol ve deney gruplarından elde edilen metafaz evresinde olan hücrelerin grup ortalamaları ve yüzdeleri arasında gözlenen farklılığın ortaya konması için Duncan Testi yapılmıştır. Bunun için önce kontrol ve deney grup varyanslarının homojen olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu homojenliği belirlemek üzere “Levene” testi yapılmıştır. Test sonucu Tablo 4.2.5.2.’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.5.2.** Mitotik aktivite deneyinde kontrol ve deney grup varyanslarının homojenliğini belirleyen Levene Testi sonucu

| Levene Testi | Serbestlik Derecesi 1 | Serbestlik Derecesi 2 | P    |
|--------------|-----------------------|-----------------------|------|
| .247         | 3                     | 16                    | .862 |

Tablo 4.2.5.2’e görüldüğü gibi; mitotik aktivite deneyine ait kontrol ve deney grup varyanslarının homojen olduğu saptanmıştır ( $F=0.247$   $P>0.05$ ). Bu homojenlikten dolayı, kontrol ve deney grup ortalamaları arasında farklılık olup olmadığını sınamak üzere Tek Yönlü Varyans Analizi yapılmıştır. Yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu ise Tablo 4.2.5.3’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.5.3.** Kontrol ve deney gruplarının mitotik aktivite bakımından karşılaştırıldığı Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu

| Değişim Kaynağı | Kareler Toplamı | Serbestlik Derecesi | Kareler Ortalaması | F oranı | P    |
|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------|------|
| Gruplar Arası   | 821.750         | 3                   | 273.917            | 21.152  | .000 |
| Gruplar İçi     | 207.200         | 16                  | 12.950             |         |      |
| Toplam          | 1028.950        | 19                  |                    |         |      |

Tablo 4.2.5.3’de görüldüğü gibi; kontrol ve deney grupları arasında mitotik aktivite bakımından farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).

Yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi sonucunda kontrol ve deney grup ortalamaları arasında gözlenen bu farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek üzere grup ortalamaları üzerinde “Duncan” testi uygulanmış ve sonuçlar 0.05 anlam düzeyine göre Tablo 4.2.5.4.’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.5.4.** Kontrol ve deney grup ortalamalarının farklılıklarını gösteren Duncan Testi sonucu

| Mitotik Aktivite | N | p=0,05 |       |       |
|------------------|---|--------|-------|-------|
|                  |   | 1      | 2     | 3     |
| 60 mg/kg         | 5 | 18.00  |       |       |
| 45 mg/kg         | 5 |        | 25.40 |       |
| 30 mg/kg         | 5 |        |       | 33.20 |
| Kontrol          | 5 |        |       | 33.60 |
| P                |   | 1.000  | 1.000 | .863  |

$p < 0.05$ ’e göre

Tablo 4.2.5.4’de görüldüğü gibi; 60 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubundaki sıçanların kemik iliğindeki mitotik aktivite, 45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki sıçanların, 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların ve kontrol grubundaki sıçanların kemik iliğindeki mitotik aktiviteye göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

45 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki sıçanların kemik iliğindeki mitotik aktivite ise 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların ve kontrol grubu sıçanların kemik iliğindeki mitotik aktiviteden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). 30 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların kemik iliğindeki mitotik aktivite ve kontrol grubu sıçanların kemik iliğindeki mitotik aktive arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Akrilamitin *Sprague Dawley* ırkı erkek sıçanların kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerine olan etkisinin incelendiği deney sonuçlarına göre;

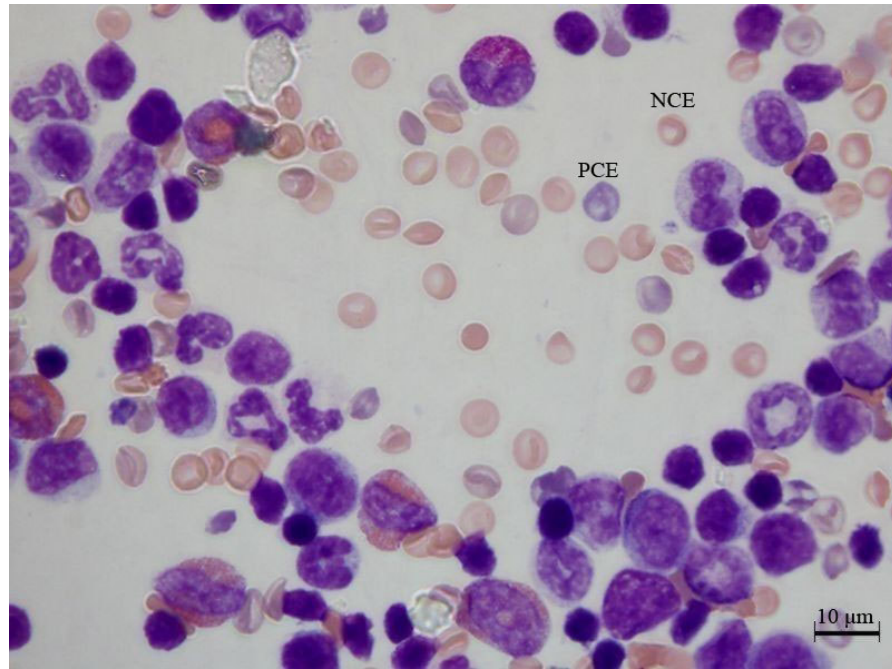
- 30 mg/kg akrilamit dozunun kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerini etkilemediği,
- 45 mg/kg akrilamit dozunun 30 mg/kg akrilamit dozuna ve kontrol grubuna göre kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerini önemli derecede azalttığı,
- 60 mg/kg akrilamit dozunun ise 45 mg/kg ve 30 mg/kg akrilamit dozlarına ve kontrol grubuna göre kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerini önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir.

#### **4.3. Kontrol ve Deney Grubu *Sprague Dawley* Sıçanların Kemik İliğinde Mikronükleus Testi**

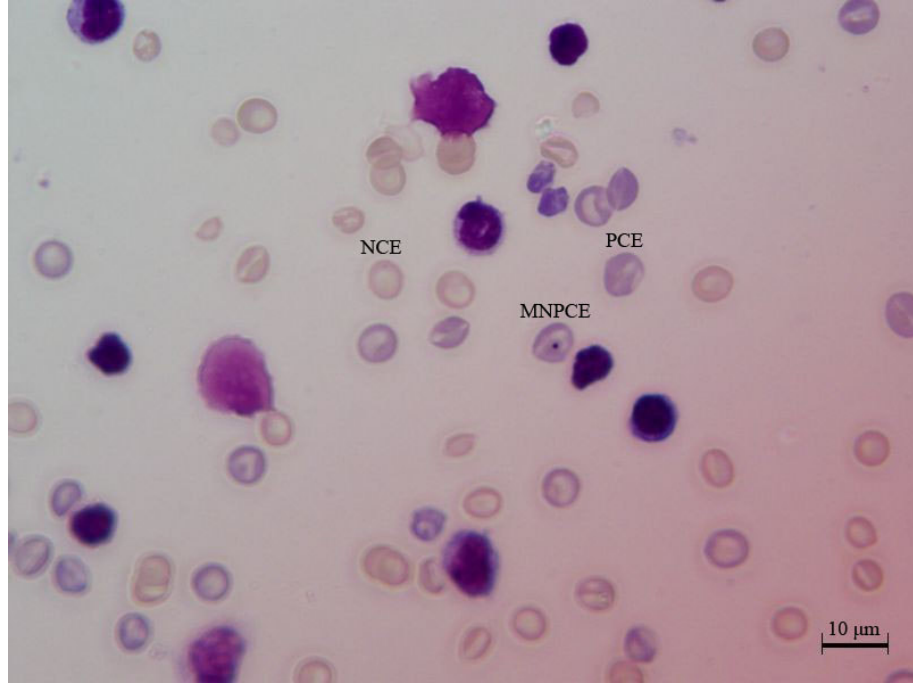
Akrilamitin *Sprague Dawley* ırkı albino erkek sıçan kemik iliğinde klastojenik ve sitotoksik etki oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için her biri 5 hayvan örneğinden oluşan 4 grup kontrol ve deney grupları olarak ayrılmıştır. Buna göre; 125 mg/kg, 150 mg/kg ve 175 mg/kg akrilamit dozları hayvanların vücut ağırlıklarına göre ayarlandıktan sonra distile suda çözülerek gavaj yolu ile tek doz olarak uygulanmıştır. Hayvanlardan hazırlanan preparatlar üzerinde rastgele 1000 adet PCE (her hayvan örneğinde 2000 hücre) sayılmış ve bunların içerisinde MNPCE'lerin sayıları tespit edilmiştir. Mikronükleusların tanısı Schmid'e (1975) göre yapılmıştır.

PCE'ler gelişimlerinin ara aşamasında olan, olgun olmayan eritrositlerdir. Yapılarında hâlâ ribozom bulundurlar ve ribozomların boyanma özelliklerinden dolayı olgun olan NCE'lerden ayırt edilebilirler. NCE'ler ise gelişimlerini tamamlamış olgun olan eritrositlerdir. Yapılarında ribozom bulundurmazlar ve bu nedenle boyanma özelliklerinden dolayı olgun olmayan PCE'lerden ayırt edilebilmektedirler (Krishna, 2000).

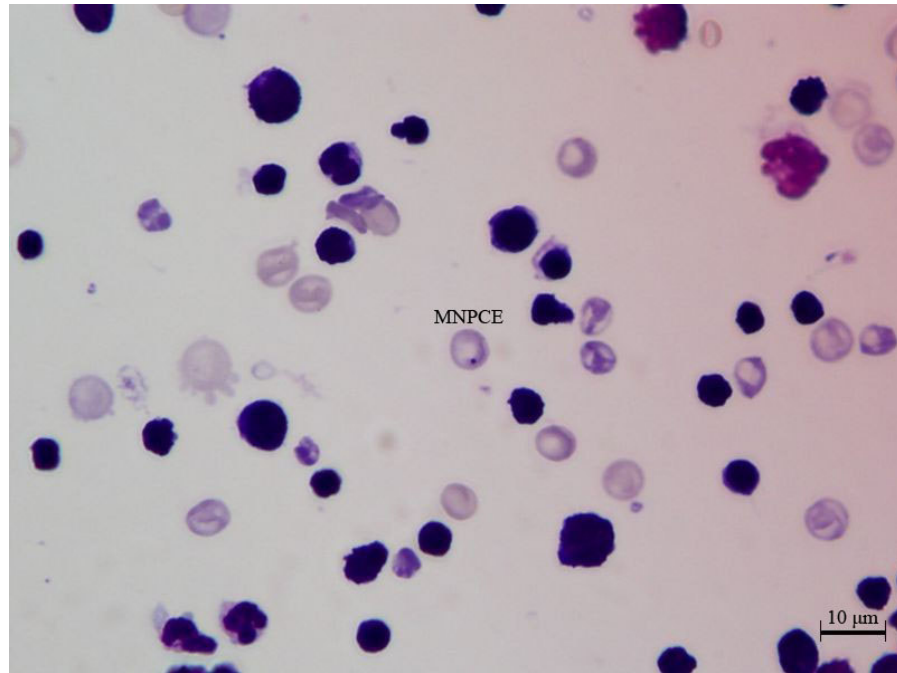
Buna göre; NCE'ler ışık mikroskopunda incelendikleri zaman sarımsı turuncu bir renkte görülürken (Şekil 4.3.1), PCE'ler ışık mikroskopunda incelendikleri zaman, mavi-yeşil arası bir renkte görülmektedirler (Şekil 4.3.1). Ayrıca PCE'ler (Şekil 4.3.1) yapı itibariyle, NCE'lerden daha büyüktürler (Şekil 4.3.1 ve 4.3.2). PCE'lerin içerisinde oluşan mikronükleuslar ise, ana çekirdeğin üçte bir ya da daha az çapında, boyanma özelliği ana çekirdeğin boyanma özelliği ile aynı, yuvarlak şekilli, koyu mavi renkli olması nedeni ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler (Şekil 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4).



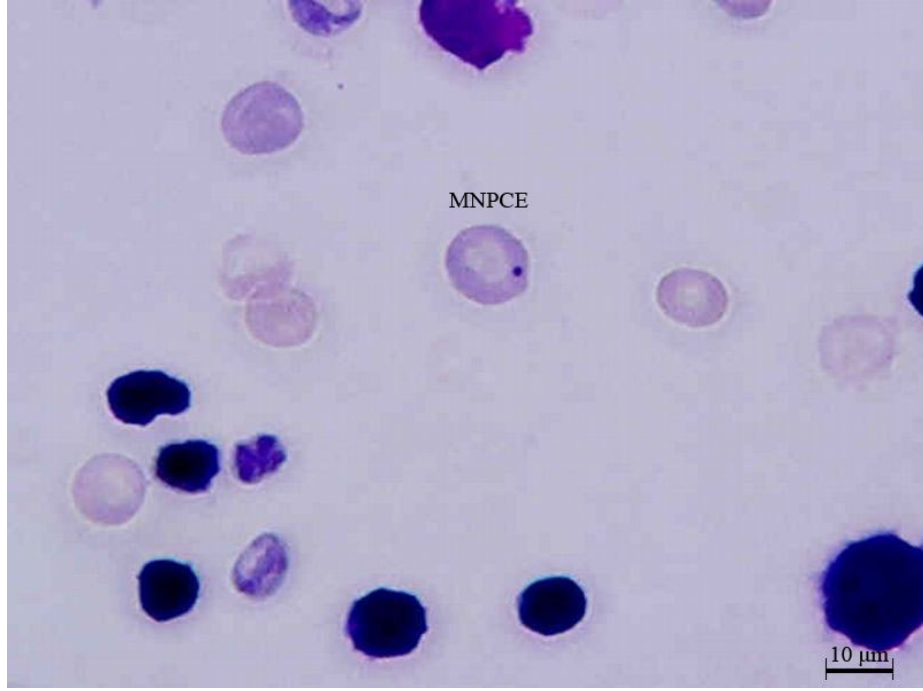
**Şekil 4.3.1** Kontrol grubu sıçanların kemik iliğinde mikronükleuslu olmayan PCE ve NCE'ler



**Şekil 4.3.2.** Deney grubu sıçanların kemik iliğinde MNPCE ve normal PCE ve NCE'ler



**Şekil 4.3.3.** Deney grubu sıçanların kemik iliğinde MNPCE görülmektedir



**Şekil 4.3.4.** Deney grubu sıçanların kemik iliğine ait yakınlaştırılmış çekimde MNPCE görülmektedir

#### 4.3.1. Kontrol grubu sıçanlardaki mikronükleus testi sonuçları

Kontrol grubu sıçanlara akrilamit içermeyen distile su gavaj yolu ile verilmiştir. Sıçanların kemik iliklerinden hazırlanan preparatlardan elde edilen sayımların sonuçları Tablo 4.3.1.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.1.1.** Kontrol grubu sıçanlarda mikronükleus testinden elde edilen sonuçlar

| Kontrol grubu   |            |       |                 |                            |            |            |               |
|-----------------|------------|-------|-----------------|----------------------------|------------|------------|---------------|
| Örnek No        | Toplam PCE | MNPCE | MNPCE Oranı (%) | Toplam Eritrosit (PCE+NCE) | PCE Sayısı | NCE Sayısı | PCE/NCE Oranı |
| 1               | 2000       | 8     | 0.40            | 1000                       | 661        | 339        | 1.94          |
| 2               | 2000       | 5     | 0.25            | 1000                       | 565        | 435        | 1.30          |
| 3               | 2000       | 7     | 0.35            | 1000                       | 595        | 405        | 1.47          |
| 4               | 2000       | 8     | 0.40            | 1000                       | 622        | 378        | 1.65          |
| 5               | 2000       | 5     | 0.25            | 1000                       | 655        | 345        | 1.90          |
| Grup Ortalaması |            | 6.6   | % 0.33          | Grup Ortalaması            |            |            | 1.652         |

PCE: Polikromatik Eritrosit, MNPCE: Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit, NCE: Normokromatik Eritrosit

Tablo 4.3.1.1’de görüldüğü gibi; kontrol grubundaki mikronükleuslu PCE’lerin grup ortalaması 6.6 olarak bulunmuştur. Sayılan 10.000 PCE’in ortalama %0.33’ünde mikronükleus oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca sayılan toplam 5000 eritrositin 3098’inin PCE, 1902’sinin de NCE olduğu tespit edilmiştir. PCE’lerin NCE’lere oranının grup ortalaması ise 1.652 olarak bulunmuştur. Bu gruptan elde edilen değerler, kontrol değerleri olarak ele alınmış ve diğer grupların sonuçlarını karşılaştırmak için kullanılmıştır.

#### 4.3.2. 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubu sıçanlardaki mikronükleus testi sonuçları

Akrilamitin 125 mg/kg olan birinci uygulama dozu sıçanlara vücut ağırlıklarına göre gavajla verilmiş ve bu uygulama sonucunda, hazırlanan preparatlardan elde edilen sayım sonuçları Tablo 4.3.2.1.’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.2.1.** 125 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mikronükleus testinden elde edilen sonuçlar

| <b>125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubu</b> |            |              |                 |                            |            |            |               |
|-----------------------------------------------------|------------|--------------|-----------------|----------------------------|------------|------------|---------------|
| Örnek No                                            | Toplam PCE | MNPCE        | MNPCE Oranı (%) | Toplam Eritrosit (PCE+NCE) | PCE Sayısı | NCE Sayısı | PCE/NCE Oranı |
| 1                                                   | 2000       | 11           | <b>0.55</b>     | 1000                       | 588        | 412        | <b>1.43</b>   |
| 2                                                   | 2000       | 14           | <b>0.70</b>     | 1000                       | 524        | 476        | <b>1.10</b>   |
| 3                                                   | 2000       | 12           | <b>0.60</b>     | 1000                       | 528        | 472        | <b>1.12</b>   |
| 4                                                   | 2000       | 13           | <b>0.65</b>     | 1000                       | 498        | 502        | <b>0.99</b>   |
| 5                                                   | 2000       | 11           | <b>0.55</b>     | 1000                       | 524        | 476        | <b>1.10</b>   |
| <b>Grup ortalaması</b>                              |            | <b>12.20</b> | <b>% 0.61</b>   | <b>Grup Ortalaması</b>     |            |            | <b>1.148</b>  |

PCE: Polikromatik Eritrosit, MNPCE: Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit, NCE: Normokromatik Eritrosit

Tablo 4.3.2.1’de görüldüğü gibi; 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki mikronükleuslu PCE’lerin grup ortalaması 12.20 olarak bulunmuştur. Sayılan 10.000 PCE’in %0.61’inde mikronükleus oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca sayılan toplam 5000 eritrositin 2662’sinin PCE, 2338’inin de NCE olduğu tespit edilmiştir. PCE’lerin NCE’lere oranının grup ortalaması ise 1.148 olarak bulunmuştur.

#### **4.3.3. 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubu sıçanlardaki mikronükleus testi sonuçları**

Akrilamitin 150 mg/kg olan ikinci uygulama dozu sıçanlara vücut ağırlıklarına göre gavajla verilmiş ve bu uygulama sonucunda, hazırlanan preparatlardan elde edilen sayım sonuçları Tablo 4.3.3.1.’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.3.1.** 150 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mikronükleus testinden elde edilen sonuçlar

| <b>150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubu</b> |            |              |                 |                            |            |            |               |
|------------------------------------------------------|------------|--------------|-----------------|----------------------------|------------|------------|---------------|
| Örnek No                                             | Toplam PCE | MNPCE        | MNPCE Oranı (%) | Toplam Eritrosit (PCE+NCE) | PCE Sayısı | NCE Sayısı | PCE/NCE Oranı |
| 1                                                    | 2000       | 10           | <b>0.50</b>     | 1000                       | 505        | 495        | <b>1.02</b>   |
| 2                                                    | 2000       | 11           | <b>0.55</b>     | 1000                       | 528        | 472        | <b>1.12</b>   |
| 3                                                    | 2000       | 15           | <b>0.75</b>     | 1000                       | 549        | 451        | <b>1.22</b>   |
| 4                                                    | 2000       | 16           | <b>0.80</b>     | 1000                       | 563        | 437        | <b>1.29</b>   |
| 5                                                    | 2000       | 14           | <b>0.70</b>     | 1000                       | 493        | 507        | <b>0.97</b>   |
| <b>Grup ortalaması</b>                               |            | <b>13.20</b> | <b>% 0.66</b>   | <b>Grup Ortalaması</b>     |            |            | <b>1.124</b>  |

PCE: Polikromatik Eritrosit, MNPCE: Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit, NCE: Normokromatik Eritrosit

Tablo 4.3.3.1’de görüldüğü gibi; 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki mikronükleuslu PCE’lerin grup ortalaması 13.20 olarak bulunmuştur. Sayılan 10.000 PCE’in %0.66’sında mikronükleus oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca sayılan toplam 5000 eritrositin 2638’inin PCE, 2362’sinin de NCE olduğu tespit edilmiştir. PCE’lerin NCE’lere oranının grup ortalaması ise 1.124 olarak bulunmuştur.

#### **4.3.4. 175 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubu sıçanlardaki mikronükleus testi sonuçları**

Akrilamitin 175 mg/kg olan son uygulama dozu sıçanlara vücut ağırlıklarına göre gavajla verilmiş ve bu uygulama sonucunda hazırlanan preparatların mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3.4.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.4.1.** 175 mg/kg akrilamit uygulanan sıçanlarda mikronükleus testinden elde edilen sonuçlar

| <b>175 mg/kg akrilamit uygulanan III deney grubu</b> |            |              |                 |                            |            |            |               |
|------------------------------------------------------|------------|--------------|-----------------|----------------------------|------------|------------|---------------|
| Örnek No                                             | Toplam PCE | MNPCE        | MNPCE Oranı (%) | Toplam Eritrosit (PCE+NCE) | PCE Sayısı | NCE Sayısı | PCE/NCE Oranı |
| 1                                                    | 2000       | 23           | <b>1.15</b>     | 1000                       | 478        | 522        | <b>0.92</b>   |
| 2                                                    | 2000       | 21           | <b>1.05</b>     | 1000                       | 449        | 551        | <b>0.81</b>   |
| 3                                                    | 2000       | 30           | <b>1.50</b>     | 1000                       | 458        | 542        | <b>0.85</b>   |
| 4                                                    | 2000       | 26           | <b>1.30</b>     | 1000                       | 455        | 545        | <b>0.84</b>   |
| 5                                                    | 2000       | 24           | <b>1.20</b>     | 1000                       | 345        | 655        | <b>0.53</b>   |
| <b>Grup ortalaması</b>                               |            | <b>24.80</b> | <b>% 1.24</b>   | <b>Grup Ortalaması</b>     |            |            | <b>0.79</b>   |

PCE: Polikromatik Eritrosit, MNPCE: Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit, NCE: Normokromatik Eritrosit.

Tablo 4.3.4.1’de görüldüğü gibi; 175 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubundaki mikronükleuslu PCE’lerin grup ortalaması 24.80 olarak bulunmuştur. Sayılan 10.000 PCE’in %1.24’ünde mikronükleus oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca sayılan toplam 5000 eritrositin 2185’inin PCE, 2815’inin de NCE olduğu tespit edilmiştir. PCE’lerin NCE’lere oranının grup ortalaması ise 0.79 olarak bulunmuştur.

#### **4.3.5. Kontrol ve deney gruplarında mikronükleus testinden elde edilen sonuçların karşılaştırılması**

Akrilamitin *Sprague Dawley* sıçan kemik iliği polikromatik eritrositlerindeki mikronükleus oluşum sıklığı üzerine olan etkisinin araştırılmasında, kontrol grubu ile deney gruplarından elde edilen sayımlar sonucunda belirlenen grup ortalamaları, MNPCE’lerin yüzde ortalamaları ile PCE/NCE oranları Tablo 4.3.5.1.’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.5.1.** Kontrol ve deney grupları arasında mikronükleus testinden elde edilen sonuçlarının % olarak karşılaştırılması

| Gruplar  | Toplam PCE | MNPCE | MNPCE Oranı (%) | Grup Ortalaması | Toplam Eritrosit (PCE+NCE) | PCE Sayısı | NCE Sayısı | PCE/NCE Oranı |
|----------|------------|-------|-----------------|-----------------|----------------------------|------------|------------|---------------|
| Kontrol  | 10000      | 33    | <b>0.33</b>     | <b>6.60</b>     | 5000                       | 3098       | 1902       | <b>1.652</b>  |
| 125mg/kg | 10000      | 61    | <b>0.61</b>     | <b>12.20</b>    | 5000                       | 2662       | 2338       | <b>1.148</b>  |
| 150mg/kg | 10000      | 66    | <b>0.66</b>     | <b>13.20</b>    | 5000                       | 2638       | 2362       | <b>1.124</b>  |
| 175mg/kg | 10000      | 124   | <b>1.24</b>     | <b>24.80</b>    | 5000                       | 2185       | 2815       | <b>0.79</b>   |

**PCE: Polikromatik Eritrosit, MNPCE: Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit, NCE: Normokromatik Eritrosit**

Tablo 4.3.5.1.'de görüldüğü gibi; kontrol grubundaki MNPCE hücrelerin ortalaması 6.60, 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki MNPCE'lerin ortalaması 12.20, 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki MNPCE'lerin ortalaması 13.20 ve 175 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubundaki MNPCE'lerin ortalaması da 24.80 olarak bulunmuştur. Bu gruplardaki MNPCE'lerin yüzdelerinin grup ortalamaları ise sırasıyla 0.33, 0.61, 0.66 ve 24.80 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, PCE/NCE oranlarının gruplara göre dağılımı da sırasıyla 1.652, 1.148, 1.124 ve 0.79 olarak hesaplanmıştır.

Yapılan mikronükleus testte, kontrol ve deney gruplarından elde edilen mikronükleuslu PCE'lerin grup ortalamaları ve yüzdeleri arasında gözlenen farklılığın ortaya konması için Duncan Testi yapılmıştır. Bunun için önce kontrol ve deney grup varyanslarının homojen olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu homojenliği belirlemek üzere “Levene” testi yapılmıştır. Test sonucu Tablo 4.3.5.2.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.5.2.** Mikronükleus testinde kontrol ve deney grup varyanslarının homojenliğini belirleyen Levene Testi sonucu

| Levene Testi | Serbestlik Derecesi 1 | Serbestlik Derecesi 2 | P    |
|--------------|-----------------------|-----------------------|------|
| 2.075        | 3                     | 16                    | .144 |

Tablo 4.3.5.2'de görüldüğü gibi; mikronükleus test deneyine ait kontrol ve deney grup varyanslarının homojen olduğu saptanmıştır ( $F=2.075$   $P>0.05$ ). Bu

homojenlikten dolayı, kontrol ve deney grup ortalamaları arasında farklılık olup olmadığını sınamak üzere Tek Yönlü Varyans Analizi yapılmıştır. Yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu ise Tablo 4.3.5.3’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.5.3.** Kontrol ve deney gruplarının mikronükleus oluşum sıklığı bakımından karşılaştırıldığı Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu

| Değişim Kaynağı | Kareler Toplamı | Serbestlik Derecesi | Kareler Ortalaması | F oranı | P    |
|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------|------|
| Gruplar Arası   | 875.600         | 3                   | 291.867            | 52.119  | .000 |
| Gruplar İçi     | 89.600          | 16                  | 5.600              |         |      |
| Toplam          | 965.200         | 19                  |                    |         |      |

Tablo 4.3.5.3’de görüldüğü gibi; kontrol ve deney grupları arasında mikronükleus oluşumu sıklığı bakımından farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).

Yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi sonucunda kontrol ve deney grup ortalamaları arasında gözlenen farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek üzere grup ortalamaları üzerinde “Duncan” testi uygulanmış ve sonuçlar 0.05 anlam düzeyine göre Tablo 4.3.5.4.’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.5.4.** Kontrol ve deney grup ortalamalarının farklılıklarını gösteren Duncan Testi sonucu

| Mikronükleus Test | N | p=0,05 |       |       |
|-------------------|---|--------|-------|-------|
|                   |   | 1      | 2     | 3     |
| Kontrol           | 5 | 6.60   |       |       |
| 125 mg/kg         | 5 |        | 12.20 |       |
| 150 mg/kg         | 5 |        | 13.20 |       |
| 175 mg/kg         | 5 |        |       | 24.80 |
| P                 |   | 1.000  | .514  | 1.000 |

$p < 0.05$ ’e göre

Tablo 4.3.5.4’de görüldüğü gibi; 175mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubundaki sıçanların kemik iliğindeki PCE’de oluşan mikronükleus sıklığı, 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki sıçanların, 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların ve kontrol grubundaki sıçanların kemik iliğindeki PCE’de oluşan mikronükleus sıklığına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki sıçanların kemik iliğindeki mikronükleus oluşum sıklığı ile 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların kemik iliğindeki mikronükleus oluşum sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamış fakat bu iki grup kontrol grubundaki sıçanların kemik iliğindeki PCE’de oluşan mikronükleus sıklığı ile karşılaştırıldıkları zaman istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Yapılan mikronükleus testte, akrilamitin *Sprague Dawley* sıçan kemik iliğinde sitotoksik etki meydana getirip getirmediğini tespit etmek için PCE/NCE oranlarına bakılmıştır. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen PCE/NCE oranlarının grup ortalamaları arasında gözlenen farklılığın ortaya konması için Duncan Testi yapılmıştır. Bunun için önce kontrol ve deney grup varyanslarının homojen olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu homojenliği belirlemek üzere “Levene” testi yapılmıştır. Test sonucu Tablo 4.3.5.5.’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.5.5.** Kontrol ve deney grup varyanslarının homojenliğini belirleyen Leven testi sonucu

| Levene Testi | Serbestlik Derecesi 1 | Serbestlik Derecesi 2 | P    |
|--------------|-----------------------|-----------------------|------|
| 1.350        | 3                     | 16                    | .294 |

Tablo 4.3.5.5’de görüldüğü gibi; mikronükleus test deneyinde kontrol ve deney gruplarında PCE ile NCE oranlarına ait grup varyanslarının homojen olduğu saptanmıştır ( $F=1.350$   $P>0.05$ ).

Bu homojenlikten dolayı, kontrol ve deney grup ortalamaları arasında farklılık olup olmadığını sınamak üzere Tek Yönlü Varyans Analizi yapılmıştır. Yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu ise Tablo 4.3.5.6’da gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.5.6.** Kontrol ve deney gruplarının PCE/NCE oranları bakımından karşılaştırıldığı Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu

| Değişim Kaynağı | Kareler Toplamı | Serbestlik Derecesi | Kareler Ortalaması | F oranı | P    |
|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------|------|
| Gruplar Arası   | 1.895           | 3                   | .632               | 17.619  | .000 |
| Gruplar İçi     | .574            | 16                  | .036               |         |      |
| Toplam          | 2.469           | 19                  |                    |         |      |

Tablo 4.3.5.6’da görüldüğü gibi; PCE/NCE oranları bakımından kontrol ve deney grupları arasında oluşan farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001$ ).

Yapılan Tek Yönlü Varyans Analizi sonucunda kontrol ve deney grup ortalamaları arasında gözlenen farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek üzere grup ortalamaları üzerinde ‘‘Duncan’’ testi uygulanmış ve sonuçlar 0.05 anlam düzeyine göre Tablo 4.3.5.7.’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.5.7.** Kontrol ve deney grup ortalamalarının farklılıklarını gösteren Duncan Testi sonucu

| PCE/NCE Oranları | N | p=0,05 |        |        |
|------------------|---|--------|--------|--------|
|                  |   | 1      | 2      | 3      |
| 175 mg/kg        | 5 | .7900  |        |        |
| 150 mg/kg        | 5 |        | 1.1240 |        |
| 125 mg/kg        | 5 |        | 1.1480 |        |
| Kontrol          | 5 |        |        | 1.6520 |
| P                |   | 1.000  | .844   | 1.000  |

$p<0.05$ ’e göre

Tablo 4.3.5.7’de görüldüğü gibi; 175mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubundaki sıçanların kemik iliği sayımlarından elde edilen PCE ile NCE oranları, 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki sıçanların, 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların ve kontrol grubundaki sıçanların kemik iliği sayımlarından elde edilen PCE ile NCE oranlarından istatistiksel olarak anlamlı

bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki sıçanların ve 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların kemik iliği sayımlarından elde edilen PCE ile NCE oranları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır fakat bu iki grup kontrol ile karşılaştırıldıkları zaman istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Akrilamitin *Sprague Dawley* ırkı erkek sıçanların kemik iliğinde gerçekleştirilen mikronükleus test sonucunda;

- 125 mg/kg ve 150 mg/kg akrilamit dozunun kemik iliğinde kontrole kıyasla mikronükleuslu PCE'leri istatistiksel açıdan önemli derecede arttırdığı fakat bu iki grup kendi aralarında karşılaştırıldıkları zaman mikronükleuslu PCE'lerin oranları bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir.
- 175 mg/kg akrilamit dozunun ise, kemik iliğinde kontrole ve uygulanan diğer iki doza göre mikronükleuslu PCE'leri istatistiksel açıdan önemli derecede arttırdığı tespit edilmiştir.

Yapılan mikronükleus testinde akrilamitin kemik iliği hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturup oluşturmadığının tespit etmek için kontrol ve deney gruplarında PCE/NCE oranları karşılaştırılmıştır. Buna göre;

- 125 mg/kg ve 150 mg/kg akrilamit dozunun kemik iliğinde kontrole kıyasla PCE/NCE oranlarında istatistiksel açıdan önemli derecede azalma meydana getirdiği fakat bu iki grup kendi aralarında karşılaştırıldıkları zaman PCE/NCE oranları bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir.
- 175 mg/kg akrilamit dozunun ise, kemik iliğinde kontrole ve uygulanan diğer iki doza göre PCE/NCE oranlarını istatistiksel açıdan önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Seçilen akrilamit dozlarının megakaryositik emperipolez olayı üzerine olan etkisinin incelenmesinde, 5'i kontrol grubunu ve 15'de deney grubunu oluşturmak üzere toplam 20 adet *Sprague Dawley* ırkı erkek sıçanlar kullanılmış ve bu sıçanların kemik iliklerinden hazırlanan preparatların ışık mikroskobu altında yapılan incelemelerinde hem megakaryositik emperipolez olayının morfolojik olarak değerlendirmesi hem de uygulanan akrilamit dozlarının bu olayın görülme sıklığı üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

*Sprague Dawley* ırkı erkek sıçanlardan elde edilen kemik iliğinde morfolojik olarak tanımlanan megakaryositik hücre tipleri ışık mikroskobu ile net bir şekilde birbirlerinden ayırt edilebilmiştir. Kemik iliği preparatları üzerinde morfolojik olarak tanımlanan megakaryositik seriye ait hücrelerden en çok olgun megakaryositlere rastlanmıştır (Şekil 4.1.1.). Diğer megakaryositik hücre tiplerine özellikle de promegakaryoblastlara az sayıda rastlanması, bunların bir başka hücre tipine farklılaşma sürelerinin oldukça kısa olduğunu göstermektedir. Morfolojik bakımdan tanımlanan megakaryositik hücre tipleri *Sprague Dawley* ve diğer memeli canlılarda şekil ve yapı itibarıyla büyük benzerlik göstermektedir.

Bazı araştırmacılar megakaryositik emperipolezi bir fagositoz olayı olarak değerlendirmişlerdir (Halil ve Baret 1980, Sobolewski 1980, Zucker-Franklin 1981, Lam 1991). Fakat bu çalışmada yaptığımız gözlemlere göre, bu olay gerçek fagositozdan farklı bir durum sergilemektedir. Emperipoleze iştirak eden bütün megakaryositler ve bunların sitoplazmaları içerisinde bulunan hücreler üzerinde yaptığımız ışık mikroskobu gözlemlerinde, megakaryositler ve yutulan hücrelerde herhangi bir morfolojik dejenerasyona rastlanmamıştır (Şekil 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9, 4.1.10). Özellikle, megakaryositler tarafından yutulan hücrelerin çekirdeklerinin normal yapılarını korudukları görülmüştür (Lee 1989). Bilindiği gibi fagositoz olayında lizozomal enzimler işe karışmakta, fagozom oluşmakta ve partiküller sindirilmektedir. Megakaryositlerin sitoplazması içerisinde bulunan hücrelerin etraflarında fagositik bir vakuolün (fagozom) bulunmaması ve sitoplazma içerisinde bulunan bu hücrelerin bozulmadan kalabilmeleri bunun bir

fagositoz olamayacağını göstermektedir. Chiu (1984), Tanaka ve ark. (1994), Bobik ve Dabrowski (1995), fare ve sıçanların kemik ilikleri üzerinde ışık mikroskobu ile yaptıkları çalışmada, megakaryositler ve bunlar tarafından yutulan hücrelerin morfolojik yapılarının normal olduğunu ve buna bağlı olarak da olayın fagositozdan farklı görüldüğünü belirtmektedirler. Shamoto (1981), faz-kontrast sinematografi ve elektron mikroskopta; Migita ve ark. (1992), ışık ve elektron mikroskopta; Boll ve ark. (1997), faz-kontrast sinematografide olayı incelemişler ve megakaryositlerin sitoplazması içerisinde bulunan hücrelerin uzun süre canlı kalabildiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca Lee ve ark. (1999), insan fetal karaciğerindeki Kupffer hücreleri üzerinde ışık ve elektron mikroskobu ile yaptıkları incelemelerinde, Kupffer hücreleri içindeki eritroblastların çoğalma yeteneğinde olduklarını gösteren mitoz aşamasında olan emperipoetik hücre gözlemişlerdir. Dikmenli (2000) ultraviyole radyasyonunun *Spalax leucodon* kemik iliğindeki megakaryositik emperipolez olayı üzerine olan etkisi araştırdığı çalışmada, 56, 112 ve 168 saat süreyle ultraviyoleye maruz bırakılan hayvanlarda ışınlama süresine bağlı olarak megakaryositik emperipolez olayının arttığını gözlemiştir. Ayrıca emperipoleze uğrayan hücrelerin yapılarında bozulma meydana gelmediği, bu nedenle de bu durumun fagositozdan farklı olduğunu vurgulamıştır. Thiele ve ark. (1984), De Pasquale ve ark. (1985), Tavassoli (1986), Lee (1989), ışık ve elektron mikroskobu ile yaptıkları çalışmalarda, megakaryositler tarafından yutulan hücrelerin demarkasyon membran sisteminin boşluklarına yerleştiklerini ve normal yapılarını koruyabildiklerini öne sürmüşlerdir. Burada demarkasyon sisteminin boşluklarına yerleşen hücrelerin enzim aktivitesinden korunabileceği düşüncesi de akla gelmektedir. Çalışmamızdaki gözlemlerimiz ve literatür bilgileri ışığında konuyu analiz ettiğimiz zaman, megakaryositik emperipolezin fagositozdan farklı bir olay olduğu görünmektedir. Bizim bulgularımızla bu konu üzerinde çalışan diğer araştırmacıların bulguları arasında büyük çapta bir farklılık bulunmamaktadır.

Megakaryositler tarafından yutulan kemik iliği hücrelerinin megakaryosit içerisinde çekirdek veya çoğu zaman sitoplazma tarafından çevrelendiği gözlenmiştir (Şekil 4.1.5). Ayrıca çalışmamızda bir tek megakaryosit tarafından yutulan hücre sayısının genellikle 1-3 arasında değiştiği (Şekil 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.10), bazen de bu sınırın üzerine çıktığı görülmüştür (Şekil 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9).

Parmley ve ark. (1982), Leven ve Tablin (1988), Bobik ve Dabrowski (1995), sadece olgun megakaryositlerin; Tanaka ve ark. (1994), Boll ve ark. (1997) ise çoğunlukla olgun megakaryositlerin emperipoleze iştirak ettiğini belirtmektedirler. Çalışmamızda, megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesinde, olgun megakaryositlerin belirleyici rol oynadığı tespit edilmiştir. Çünkü promegakaryoblast, megakaryoblast ve promegakaryositlerde rastladığımız emperipolez sayısı bütün örneklerde birkaçı geçmezken (Şekil 4.1.2, 4.1.3, 4.1.6), olgun megakaryositlerde çok yoğun bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.1.4, 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9). Emperipolezin megakaryoblast ve promegakaryosit hücre formlarında çok az görülmesinin bir sebebi de demarkasyon membran sistemi ile ilgili olabilir. Megakaryoblast ve promegakaryositlerde Demarkasyon Membran Sistemi olgun megakaryositlerdeki kadar iyi gelişmemiştir (Mahaut-Smith ve ark. 2003). Megakaryositler tarafından yutulan hücrelerin, dışa açık bir kanaliküler sistem olan Demarkasyon Membran Sistemi'nin boşlukları içerisine yerleştiklerini düşündüğümüzde, Demarkasyon Membran Sisteminin çok iyi geliştiği ve bütün sitoplazmaya yayıldığı olgun megakaryositlerde emperipolezin neden daha yoğun olarak görüldüğünün sebebi açıklanabilir. *Sprague Dawley* kemik iliğinde megakaryositler tarafından yutulan hücrelerin daha çok granülositler olduğu gözlenmiştir. Granülositlerden de en çok nötrofillere rastlanmıştır (Şekil 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.8, 4.1.9). Bu durum nötrofillerin diapedez potansiyellerinin yüksek olmasından kaynaklanabilir. Migita ve ark. (1992), kesin olmamakla beraber, nötrofillerin membran yüzeyinde bulunan Ig-G moleküllerinin megakaryositik emperipolez olayında önemli bir rolünün olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bobik ve Dabrowski (1995), çoğunlukla nötrofillerin megakaryositik emperipoleze uğradığını belirtmektedirler. Parmley ve ark. (1982) ise yutulan hücrelerin sadece nötrofiller olduğunu, nötrofil öncülleri ve diğer kemik iliği hücrelerinin megakaryosit sitoplazmasında bulunmadığını ifade etmektedirler. Çalışmamızda granülsüz lökositlerin de megakaryositler tarafından yutulduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.6, 4.1.10). Ayrıca bir megakaryosit içerisinde hem granüllü hem de granülsüz lökositlerin aynı anda bulundukları da gözlenmiştir. (Şekil 4.1.7, 4.1.10). Yapılan incelemelerde megakaryosit sitoplazması içerisine giren eritrosit öncüllerine ise rastlanmamıştır.

*Sprague Dawley* rat kemik iliği üzerinde yaptığımız bu çalışmada, sadece 60 mg/kg akrilamit uygulanan hayvanlardaki megakaryositik emperipolezin yoğunluğunda kontrol grubu ve diğer iki deney gruplarına (30 mg/kg ve 45 mg/kg) kıyasla önemli derecede azalma meydana gelmiştir. Uygulanan diğer dozlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman megakaryositik emperipolezin yoğunluğuna etki etmediği tespit edilmiştir (Tablo 4.1.5.4).

Emperipolez olayının çeşitli kanser türleri, değişik tümörler ve kan kaybı durumlarında önemli ölçüde artış gösterdiği pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Dzieciol ve ark. 1994, Kinkor ve ark. 2002, Shen ve Wen 2004, Brooks ve ark. 2005, Kong ve ark, 2005, De Candia ve ark. 2007). Ayrıca, De Candia ve ark. (2007), Gray Platelet Sendrom'lu hastanın kemik iliği numunesini inceledikleri zaman, hücrelerin aşırı derecede çoğaldığını (hipersellülarite) ve göze çarpacak yoğunlukta megakaryositik emperipolez olayının olduğunu tespit etmişlerdir. Yüzde seksen ve daha fazla megakaryositte emperipolez olayının gözlemlendiğini ve bu megakaryositlerin sitoplazmalarında 2-4 arasında nötrofil ihtiva ettiklerini belirtmişlerdir. Yine Tavassoli (1981), Tavassoli ve Aoki (1989) ve Dzieciol ve ark. (1994), sıçanlar üzerinde deneysel olarak oluşturulan kan kaybının megakaryositik emperipolez olayını önemli ölçüde arttırdığını ve aşırı kan kaybının bu olayı yönlendirdiğini kaydetmişlerdir. Işık ve elektron mikroskobu ile yaptıkları gözlemlerinde, megakaryositlerin genellikle kemik iliğinin sinüs endotheliumuna yakın bölgelerinde bulunduğunu belirterek megakaryositlerin kemik iliği ve kan dolaşımı arasında ilik-kan bariyerinin bir elemanı olduğu görüşünü ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılara göre; aşırı kan kaybı sonucu kan hücre sayısında meydana gelen azalma, dolaşım kanının hücre ihtiyacını arttırmakta, bu ise ilik-kan bariyeri arasında hücre trafiğini hızlandırmaktadır. Kan hücrelerinin üretildiği yer olan kemik iliğindeki bazı hücreler ilik dokudan kan dokuya geçmek için megakaryositleri bir taşıyıcı olarak kullanmakta ve bariyerin ilik tarafında megakaryosit sitoplazmasına girmektedirler. Daha sonra bu hücreler canlılıklarını yitirmeden bariyerin diğer tarafında megakaryosit sitoplazmasından çıkarak kan dolaşımına katılmaktadırlar. Böylece çok daha hızlı bir şekilde kan dolaşımına geçebilmektedirler. Megakaryositlerin, ilik-kan bariyeri arasında hızlı hücre geçişini sağlayan böyle bir

mekanizmaya aracılık etmesi ise megakaryositik emperipolezin yoğunluk derecesini önemli ölçüde arttırmaktadır.

Kan kaybına bağlı olarak megakaryositik emperipolez yoğunluğunda meydana gelen artma, dolaşım kanının artan hücre ihtiyacını karşılamak için kemik iliği hücrelerini mitotik hücre bölünmesine sevk etmekte ve bu durum neticesinde megakaryositik emperipolez olayını da hücre bölünmesinin artışına paralel olarak arttırabilmektedir. Yine tümör ve kanser oluşumu durumlarında emperipolez olayında gözlenen artış bu şekildeki bir sebep-sonuç ilişkisi ile açıklanabilir.

Bunlara ilaveten, Adler ve ark. (1988, 1993) yaptıkları çalışmalarda akrilamitin kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerinde kontrole kıyasla önemli derecede azalma meydana getirdiğini belirtmişlerdir. Sickles ve ark. ise (2007), mikrotübül motor proteini kinezin üzerine akrilamitin etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmalarında, farklı kinezin proteinlerinin akrilamit ve glisidamit tarafından inhibe edildiğini tespit etmişlerdir. Bu inhibisyonda mikrotübül kinezin proteini depolimerize olmuş ve bu inhibisyona bağlı olarak kromozomların metafaz plağından kutuplara doğru hareketlerinde bozukluk meydana gelmiştir. Bu durum ise, mitotik aktivitenin azalması ile sonuçlanmıştır.

Çalışmamızda, yapılan diğer araştırmalar da göz önünde bulundurularak, emperipolez yoğunluğunun kemik iliği hücrelerinin mitotik aktiviteleri ile bir ilgisinin olup olmadığının açığa çıkarılmasına çalışılmıştır. Bu amaçla, emperipolez yoğunluğunun belirlenmesi için hayvanlara uygulanan akrilamit dozları ve bu dozların uygulanma süreleri değiştirilmeden, akrilamitin kemik iliği hücrelerinin mitotik aktiviteleri üzerine olan etkisi araştırılmış, bu hücrelerin bölünmelerinde artma ya da azalma olup olmadığı, değişikliğin megakaryositik emperipolez yoğunluğunu etkileyip etkilemediğinin tespitine çalışılmıştır. Yapılan mitotik aktivite deneyi sonucunda ise, 45 mg/kg ve 60 mg/kg dozlarındaki akrilamitin sıçanların kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerini kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2.5.4).

Akrilamitin kemik iliği hücrelerinin mitotik aktiviteleri üzerine azaltıcı yönde etki göstermesi ile sonuçlanan çalışmamız, daha önce Adler ve ark. (1988, 1993), Martins ve ark. (2007) ve Sickles ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilen ve benzer sonuçlar bulunan çalışmaları destekler niteliktedir.

Ayrıca hem megakaryositik emperipolezin yoğunluğunda meydana gelen azalma, hem de kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerinde meydana gelen azalma, hücre bölünmesinin bu olayın yoğunluk derecesini etkilediğini göstermektedir. Bu bulgular, aşırı derecede kan kaybı durumunda ya da tümör ve kanser oluşumu durumlarında emperipolez olayının yoğunluğundaki artma ile sonuçlanan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Emperipolez olayının patofizyolojik önemi kesin olmamakla birlikte, çeşitli kanser türleri, değişik tümörler, trombosit bozuklukları, hipoksiya (oksijen yetmezliği), demir eksikliği anemisi ve kan kaybı durumlarında önemli ölçüde artış gösterdiği pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Chycewski ve ark.1994, Dzieciol ve ark. 1994, Saxena ve ark. 2002, Kinkor ve ark. 2002, Shen ve Wen 2004, Brooks ve ark. 2005, Kong ve ark, 2005, De Candia ve ark. 2007). Kemik iliği megakaryositlerinde görülen bu olayın yoğunluk derecesinin tek başına hastalıkların teşhisinde bir önemi olup olmadığı tartışma konusudur. Olayın fizyolojik mekanizması ile ilgili bazı hipotezler ortaya atılmakla beraber henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Bu mekanizmaların aydınlatılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez kapsamında, akrilamitin kemik iliğindeki megakaryositlerde görülen megakaryositik emperipolezin yoğunluğu ile kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerinin bu olay ile olan ilişkisinin araştırılmasının dışında, akrilamitin klastojenik etkilerinin *Sprague Dawley* sıçan kemik iliği eritrosit hücrelerinde mikronükleus test yöntemi ile araştırılması da yapılmıştır. Bir maddenin genetik etkileri araştırılırken en sık başvurulan yöntem ekonomik ve en kısa süreli olması nedeniyle *in vitro* testlerdir. Ancak, bu testlerin, *in vivo* test sistemleri ile desteklenmeleri gerekmektedir. Mikronükleus test sistemi de memelilerdeki *in vivo* test sistemleri arasında basit, klastojenlere (kromozom kırıkları oluşturan) karşı duyarlı, en ekonomik ve en kısa sürede sonuç alınan bir yöntem olması nedeni ile genetik toksikoloji çalışmalarında çok geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Ayrıca bu yöntem, sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılabilmesi ve istatistiksel yönden daha

anlamalı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajlar sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (Naccarati ve ark. 2000, Labay ve ark. 2001).

Açık bir şekilde mutajenik ya da klastojenik etkiye sahip olan genotoksik ajanlar için doz-cevap ilişkisi doğrusal olmaktadır. Çok sayıda gerçekleştirilen mikronükleus çalışmaları akrilamitin bariz bir şekilde genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Cihák ve Vontorková, 1988, Cao ve ark. 1993, Paulsson ve ark. 2002). Ayrıca TK-, HGRPT-Testi, Ames testi, SCE testi gibi diğer test sistemlerinin sonuçları da akrilamitin açık bir şekilde klastojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Abramsson-Zetterberg 2003). Adler ve ark. (1988), 50-150 mg/kg dozundaki akrilamitin intraperitoneal olarak verilen farelerin kemik iliğindeki mikronükleus sıklığında uygulanan doza bağlı olarak artma gözlemiş ve 100 mg/kg akrilamit uygulamasından 24 saat sonra da en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmiştir. Titenko-Holland ve ark. (1998), farelere 50 mg/kg dozundaki akrilamitin *i.p.* olarak beş ardışık gün boyunca uygulamasında, akrilamitin morfolojik olarak normal ve anormal embriyolardaki mikronükleus içeren hücrelerin sıklığında kontrole kıyasla 10-20 kat artışa sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Dobrzynska ve Gajewski (2000), fare kemik iliği mikronükleus testi kullanarak vücut hücreleri üzerine X ışını ile akrilamitin birlikte olan etkisini incelemişler ve akrilamitin ve X ışınının birleştirilmiş uygulamasının kemik iliği polikromatik eritrositlerinde mikronükleus oluşumunu önemli derecede arttırdığını tespit etmişlerdir. Paulsson ve ark. (2002) yaptıkları çalışmalarında, 100 mg/kg akrilamitin fare ve *Sprague Dawley* cinsi sıçanlara *i.p.* olarak uygulamasında farelerin dolaşım kanında, sıçanların da kemik iliğinde mikronükleus oluşum sıklığını incelemişler ve farelerde mikronükleus sıklığında artış gözlerken, sıçanların kemik iliğinde akrilamitin mikronükleus sıklığını etkilemediğini tespit etmişlerdir. Abramsson-Zetterberg (2003), uygulanan akrilamitin bir seri düşük dozunun fare periferik kanında mikronükleus test ile etkisini incelemiş ve deneylerinde kontrole kıyasla uygulanan tüm dozlarda mikronükleuslu eritrositlerin sıklığında belirgin bir artış gözlemiştir. Paulsson ve ark. (2003), akrilamitin genotoksik metaboliti olan glisidamitin, fare ve *Sprague Dawley* cinsi sıçanlarda mikronükleus oluşumuna olan etkisini incelemişler ve farelerin dolaşım kanında doza bağlı olarak mikronükleus sıklığında artış gözlerken, sıçanların kemik iliğinde doz artışına bağlı olmadan da olsa az derece mikronükleus sıklığında

artışa sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca glisidamitin, uygulanan en yüksek dozda sıçanların vücut ağırlıklarında azalma meydana getirdiğini ve kemik iliğindeki eritrositlerin sayısında olan düşme ile kendini belli eden kemik iliği toksisitesine sebep olduğunu göstermişlerdir. Yang ve ark. (2005), farelere gavaj yolu ile uyguladıkları akrilamitin dolaşım kanında 72.5, 100 ve 145 mg/kg dozlarında mikronükleus sıklığında istatistiksel olarak önemli artış meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Manjanatha ve ark. (2006), farelere içme suları ile verdikleri akrilamitin dolaşım kanındaki MNRET'lerin sıklığında önemli derecede artış meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Martins ve ark. (2007), yaptıkları çalışmalarında akrilamitin temel metaboliti olan glisidamitin akrilamitten iki kat daha klastojenik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda *Sprague Dawley* ırkı sıçanlara vücut ağırlıklarına göre 125, 150 ve 175 mg/kg dozlarındaki akrilamit gavaj yolu ile verilmiş ve uygulamadan 48 saat sonra kemik iliği numunesi, mikronükleuslu PCE'lerin sayılmasıyla belirlenen mikronükleus oluşum sıklığı ve PCE/NCE oranları sonucuna göre toksisite gösterip göstermemesi bakımından değerlendirilmiştir. Kemik iliği preparatları incelendiği zaman, hücrelerin iyi boyandığı ve NCE'lerin yapılarında ribozom bulundurmadıklarından dolayı ışık mikroskobunda sarımsı turuncu bir renkte görüldüğü (Şekil 4.3.1), PCE'lerin ise yapılarında ribozom bulundurduklarından dolayı ışık mikroskobunda mavi-yeşil arası bir renkte görüldüğü (Şekil 4.3.1) tespit edilmiştir. Ayrıca PCE'lerin yapı itibarıyla, olgun olan eritrosit hücrelerinden (NCE'lerden) daha büyük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3.1, 4.3.2). PCE'lerin içerisinde oluşan mikronükleuslar ise, ana çekirdeğin üçte bir ya da daha az çapında, boyanma özelliği ana çekirdeğin boyanma özelliği ile aynı, yuvarlak şekilli, koyu mavi renkli olması nedeni ile kolaylıkla ayırt edilebilmiştir (Şekil 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4).

Mikronükleus oluşum sıklığı için yapılan sayım sonuçlarında ise; uygulanan en yüksek 175 mg/kg akrilamit dozunun kemik iliği MNPCE'lerin sayılarını %1.24 oranında arttırdığı ve bu oranın kontrol grubundan elde edilen oran (%0.33) ile karşılaştırıldığı zaman yaklaşık 4 kat olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.3.5.1). Ayrıca 175 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubundaki mikronükleus oluşum oranının 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki mikronükleus oluşum oranı ile karşılaştırıldığı zaman iki kat ve 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney

grubundaki mikronükleus oluşum oranı ile karşılaştırıldığı zaman ise, 1.88 kat arttırdığı tespit edilmiştir (Tablo 4.3.5.1). 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney grubundaki sıçanların MNPCE'lerinin oranı (%0.61) ile 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki sıçanların MNPCE'lerinin oranı (%0.66) karşılaştırıldığı zaman istatistiksel açıdan anlamlı bir fark oluşturmadığı fakat bu iki deney grubu kontrol grubu (%0.33) ile karşılaştırıldığı zaman mikronükleus sıklığında önemli derecede artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Tablo 4.3.5.1, 4.3.5.4). Bu nedenle 125 ve 150 mg/kg dozlarının *Sprague Dawley* kemik iliği mikronükleus oluşumu üzerinde fark yaratmayışı, bu iki dozun benzer etki gösterdiğini ve bundan sonra gerçekleştirilecek mikronükleus çalışmalarında bu dozlardan birisinin tercih edilmesi gerektiğini öne sürmek mümkündür.

Literatür bilgilerine göre akrilamitin sadece farelerde, akrilamitin temel metaboliti olan glisidamitin ise hem fare hem de sıçanlarda mikronükleus oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise akrilamit uygulamasının sıçan kemik iliği PCE'lerinde açık bir şekilde mikronükleus oluşumunu arttırdığı görülmüştür (Tablo 4.3.5.4). Yaptığımız çalışma, Paulsson ve ark.'nın (2002), *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçanlar ile gerçekleştirdikleri ve akrilamitin mikronükleus oluşum sıklığında artış meydana getirmediğini tespit ettikleri çalışma ile karşılaştırıldığı zaman üç farklı durumun olduğu gözlenmiştir. Paulsson ve ark. (2002) çalışmalarında, akrilamiti intraperitoneal olarak sıçanlara uygulamışlar, kemik iliği numunesini uygulamadan 24 saat sonra almışlar ve uygulanacak olan en yüksek akrilamit dozunu ise 100 mg/kg olarak seçmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise akrilamit gavaj yolu ile sıçanlara uygulanmış, kemik iliği numunesi 48 saat sonra alınmış ve uygulanacak en yüksek doz olarak da 175 mg/kg dozu seçilmiştir. Çalışmamızda mikronükleus testinde açık bir şekilde pozitif sonuç alınması bu sebeplere bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca akrilamit vücuda gıdalar yolu ile alındığından dolayı, çalışmamızda mikronükleus sıklığının belirlenmesi için akrilamitin sıçanlara intraperitoneal yol yerine gavaj yolu ile verilmesi tercih edilmiştir. Akrilamitin vücuttaki metabolizasyonu sonucunda oluşan temel metaboliti glisidamit olup (Calleman ve ark. 1990, Sumner ve ark. 1992, Ghanayem ve ark. 2000, Paulsson ve ark. 2002, Sumner ve ark. 2003), hem insan hem de deney hayvanlarında, ağız yoluyla alınan akrilamitin önemli bir kısmı metabolik olarak,

akrilamitin kanser oluşumunda önemli bir rolü olan reaktif ve genotoksik epoksit metaboliti glisidamite dönüşmektedir (Rice 2005). Glisidamit ile gerçekleştirilen mikronükleus çalışmalarında ise, glisidamitin mikronükleus oluşumunu arttırdığı (Paulsson ve ark. 2003, Koyama ve ark. 2006, Manjanatha ve ark. 2006), ayrıca glisidamitin akrilamite göre iki kat daha fazla klastojenik etki gösterdiği de tespit edilmiştir (Martins ve ark. 2007). Yapılan bu çalışmalardan özellikle Paulsson ve ark. (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçanlar kullanılmış ve glisidamitin kemik iliği PCE'lerinde mikronükleus artışına sebep olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda mikronükleus sıklığında aldığımız pozitif sonuçlar uygulanan akrilamit dozunun çok yüksek olmasına bağlı olarak, akrilamitin vücut içerisindeki metabolizasyonu sonucu fazla miktarda glisidamitin oluşması ve bu oluşan glisidamitin de akrilamite nazaran yüksek klastojenik aktivitesinden dolayı mikronükleus oluşum sıklığını arttırmış olması ile açıklanabilir.

Mikronükleus testinde test maddesinin sitotoksitesisi, rutin olarak sitotoksik etki gösteren kimyasal ile muamele sonrasında NCE'ten yana artması ile gösterilen PCE'in NCE'e oranı ile tespit edilmektedir (Lambert ve ark. 2005). Kimyasal ile muamele edilen hayvanlarda PCE/NCE oranının kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalması, uygulanan kimyasal maddenin kemik iliğine ulaştığını, nükleuslu hücrelerinin bölünmesi ve olgunlaşmaları üzerinde toksik etki meydana getirdiğini göstermektedir (Lambert ve ark. 2005). Bu da NCE'lerin çoğalmasındaki azalmaya bağlı olarak eritrosit oluşumunda bozukluk meydana getirmektedir (Cicchetti ve ark.1999). Çalışmamızda mikronükleus testi için hazırlanan preparatlarda her hayvan örneğinde toplam 1000 eritrosit sayılmış ve bu eritrositler içerisindeki PCE ve NCE'lerin sayıları tespit edilerek, kontrol ve deney gruplarında PCE/NCE oranları belirlenmiştir. Deney gruplarından elde edilen oranlar kontrol grubu oranları ile karşılaştırıldıkları zaman istatistiksel açıdan önemli derecede azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Tablo 4.3.5.7). Deney gruplarında gözlenen azalma şekli mikronükleus testinde gözlenen artma şekli gibi olmuştur. Yani, 175 mg/kg akrilamit uygulanan III. deney grubundaki PCE/NCE oranı 0.79 olarak tespit edilmiş ve bu oran kontrol grubundaki PCE/NCE oranı (1.652) ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel açıdan önemli derecede düşük bulunmuş ve bu düşüş 0.86 oranında olmuştur (Tablo 4.3.5.1, 4.3.5.7). Aynı doz 125 mg/kg akrilamit uygulanan I. deney

grubundaki PCE/NCE oranı (1.148) ve 150 mg/kg akrilamit uygulanan II. deney grubundaki PCE/NCE oranı (1.124) ile karşılaştırıldığı zaman yine istatistiksel açıdan önemli derecede düşük bulunmuştur (Tablo 4.3.5.7). Bu düşüş 125 mg/kg uygulanan I. deney grubuna göre 0.36 oranında, 150 mg/kg uygulanan II. deney grubuna göre 0.33 oranında olmuştur (Tablo 4.3.5.1.). 125 mg/kg ve 150 mg/kg uygulanan deney gruplarının PCE/NCE oranları kontrol grubu oranları ile karşılaştırıldığı zaman yine istatistiksel açıdan önemli derecede düşük bulunmuştur (Tablo 4.3.5.7). Bu düşüşün 125 mg/kg uygulanan I. deney grubunda 0.50 oranında, 150 mg/kg uygulanan II. deney grubunda ise 0.53 oranında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3.5.1). Bu iki deney gruplarının oranları kendi aralarında karşılaştırıldıkları zaman ise istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın oluşmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.3.5.7).

İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda uygulanan akrilamit dozlarının hepsinin kemik iliğinde toksik etki oluşturduğu görülmüştür. Kemik iliği toksisitesinin en çok görüldüğü deney grubu en yüksek akrilamit dozunun (175 mg/kg) uygulandığı grup olmuştur. Bu deney grubunda tespit edilen mikronükleus sıklığındaki önemli artma PCE/NCE oranındaki önemli azalma ile birlikte değerlendirildiği zaman, bu artışın yüksek kemik iliği toksisitesinden kaynaklanmış olabileceğini söylemek mümkündür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akrilamit, içme ve atık sularının arıtımında kullanılan poliakrilamit üretiminde poliakrilamit monomeri olarak, kâğıt hamuru ve kâğıt üretiminde, madencilik ve mineral işleminde, çeşitli kozmetik ürünlerinin bileşiminde ve moleküler biyoloji araştırma laboratuvarı gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır (IARC 1994, Manière ve ark. 2005). 2002 yılına kadar akrilamit, endüstriyel veya mesleğe bağlı olarak dermal ya da işyerlerindeki aerosollerin solunması yoluyla vücuda alınan toksik bir madde olarak değerlendirilirken, akrilamitin son zamanlarda karbonhidrat bakımından zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta pişirilmeleri esnasında kendiliğinden oluştuğunun tespit edilmesi (Stadler ve ark. 2002) ve bunun gıdalarla birlikte farklı oranlarda vücuda alınıyor olması akrilamite olan ilgiyi arttırmış ve bu maddenin bilinmeyen yönlerinin aydınlatılması ve oluşturabileceği risklerin saptanması için çalışmalar başlatılmıştır. Kemiricilerle yapılan deneyler sonucunda, hem dişi hem de erkek fare ve sıçanlarda akrilamitin deneysel olarak kanserojen etkisinin olduğu ve foliküler tiroid tümörleri, skrotal mesothelioma, göğüs bezi tümörleri, akciğer karsinoması, glial beyin tümörleri, ağız boşluğu papilloması, uterin adenokarsinoması gibi farklı neoplastik etkilerinin olduğu saptanmıştır (IARC 1994, Rice 2005). Bu değerlendirilmeler neticesinde akrilamit, IARC (1994) tarafından “muhtemelen insan kanserojeni” (Grup 2A) olarak sınıflandırılmıştır. Fakat akrilamitin kansere sebep olma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Diyetle ilgili olarak alınan akrilamitin meydana getirdiği yan etkilerine dair kanıtlar hala yetersiz olup, akrilamitin insan sağlığı üzerine olan etkilerinin araştırılması için daha fazla araştırmaların yapılması gerekmektedir. Metabolizması, vücuttaki depolanma şekli, vücuttan atılımı ve bu maddenin metabolitlerine karşı nasıl bir yol izleneceği konusunda daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Nörotoksitesisi, üreme toksitesisi ve kanserojenitesi sağlıkla ilgili ciddi kaygılara sebep olduğu için özellikle uzun süren düşük seviyelerdeki akrilamite maruz kalma sonucunda neler olabileceği yapılacak çalışmalarla daha iyi anlaşılmalıdır. Akrilamitin ve onun metabolitlerinin genotoksitesisi, kanserojenitesi, vücuttaki kalıntıları, kimyası ve biyokimyası ile ilgili halen yürütülen 200’den fazla çalışma bulunmaktadır.

(FAO/WHO 2005). Bu çalışmaların tamamlanması diyetle birlikte alınan akrilamit ile oluşacak problemler ile ilgili kararların alınmasında temel bilgilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

Bu tezde, akrilamitin *Sprague Dawley* ırkı erkek sıçanların kemik iliğindeki megakaryositik emperipolezin yoğunluğunun, kemik iliği hücrelerinin mitotik aktiviteleri ile olan ilişkisi ve yine uygulanan akrilamit dozlarının kemik iliği hücrelerindeki olgun olmayan PCE'de oluşan mikronükleus sıklığına olan etkisi araştırılmıştır.

Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar özetlenecek olursa;

1. Akrilamit 30, 45 ve 60 mg/kg dozlarında 5 ardışık gün boyunca *Sprague Dawley* ırkı erkek sıçanlara gavaj yolu verilmiş ve sıçanların kemik iliğindeki megakaryositik emperipolezin yoğunluğuna etkisi incelenmiştir. Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldıkları zaman, uygulanan en yüksek akrilamit dozunun megakaryositik emperipolezin yoğunluğunu azalttığı, diğer dozların ise bu olayı etkilemedikleri görülmüştür.
2. Megakaryositik emperipolez olayının yoğunluğunun kemik iliği hücrelerinin mitotik aktiviteleri ile bir ilişkisinin olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla, megakaryositik emperipolez olayının yoğunluğunun belirlenmesi için yapılan çalışmada kullanılan akrilamit dozlarının, aynı uygulama şekli ve aynı uygulama aralığında kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerine olan etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, 60 mg/kg ve 45 mg/kg akrilamit dozları 30 mg/kg akrilamit dozu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman sıçanların kemik iliği hücrelerinin mitotik aktivitelerini önemli derecede azalttıkları tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman 30 mg/kg akrilamit dozunun ise kemik iliği hücrelerinin mitotik aktiviteleri üzerinde herhangi bir etki meydana getirmediği tespit edilmiştir. Yapılan değerlendirme neticesinde, megakaryositik emperipolezin yoğunluğunun kemik iliği hücrelerinin mitotik hücre bölünmelerinden etkilendiği sonucuna varılmıştır.
3. Son çalışmada ise; akrilamitin sıçanlarda da uygulanan doza bağlı olarak kromozom kırıklarına sebep olabileceğinin (klastojenik etki) ortaya konması amacı ile mikronükleus testi yapılmıştır. Bunun için; 175 mg/kg,

150 mg/kg ve 125 mg/kg dozlarındaki akrilamit tek doz olarak gavaj yolu ile sıçanlara uygulanmış ve kemik iliği PCE'lerinde meydana gelen mikronükleus oluşum sıklığı incelenmiştir. Uygulanan her üç akrilamit dozu da sıçanlarda mikronükleus oluşumunu arttırmış olup, en fazla artışın uygulanan en yüksek dozda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca uygulanan akrilamit dozlarının kemik iliğinde sitotoksik etki oluşturduğu da görülmüş olup, bu etkinin en fazla en yüksek olan doz grubunda olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan her üç çalışmadan da elde edilen sonuçlar literatür bilgilerin ışığı altında detaylı olarak tartışılmış ve akrilamitin *Sprague Dawley* ırkı sıçan kemik iliğinde incelenen konular dahilinde olumsuz yönde değişikliklere sebep olduğu tespit edilerek bilime bir katkı sağlanmıştır.

Akrilamitin hem diğer olumsuz etkilerinin hem de bu tez sonucunda tespit edilen olumsuz etkilerinin en aza indirilebilmesi için, gıdalardaki akrilamit oluşumunun azaltılması gerekmektedir. Bu durum gıdaların, ya karbonhidrat içeriklerinin ya da asparagin içeriklerinin azaltılması suretiyle gerçekleştirilebilir. Ayrıca akrilamit, karbonhidrat bakımından zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta pişirilmeleri sonucunda oluştuğu için, gıdaların ısıtılma süreleri ve derecelerinin akrilamit oluşumunu azaltacak yönde ayarlanması gerekmektedir.

Bu konu üzerindeki araştırmalar genişletilerek, insan ve çevre sağlığı açısından ortaya çıkabilecek risklere karşı daha fazla önlemler geliştirilmelidir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abramsson-Zetterberg, L., 2003. The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutation Research*, 535:215-222.
- Adler, I.D., Ingwersen, I., Kliesch, U. and El Tarras, A., 1988. Clastogenic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells. *Mutation Research*, 206:379-385.
- Adler, I.D., Zouh, R. and Schmid, E. 1993. Perturbation of cell division by acrylamide in vitro and in vivo. *Mutation Research*, 301:249-254.
- Amrein, T.M., Lukac, H., Andres, L., Peren, R., Escher, F. and Amadó, R., 2005. Acrylamide in roasted almonds and hazelnuts. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 53(20):7819-7825.
- Andrzejewski, D., Roach, J.A.G., Gay, M.L. and Musser, S.M., 2004. Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7):1996-2002.
- Barber, D.S., Hunt, J.R. and Ehrich, M.R., 2001. Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. *Neurotoxicology*, 22:341-353.
- Bobik, R. and Dabrowski, Z., 1995. Emperipolesis of marrow cells within megakaryocytes in the bone marrow of sublethally irradiated mice. *Annals of Hematology*, 70(2):91-95.
- Boll, I.T., Domeyer, C. and Buhner, C., 1997. Human megakaryoblastic proliferation and differentiation events observed by phase-contrast cinematography. *Acta Haematologica Switz.*, 97(3):144-152.
- Brooks, J.K., Nikitatis, N.G., Frankel, B.F., Papadimitrion, J.C. and Sauk, J.J., 2005. Oral inflammatory myofibroblastic tumor demonstrating ALK, p<sup>53</sup>, MDM2, CDK4, p<sup>Rb</sup>, and Ki-67 immunoreactivity in an elderly patient. *Oral inflammatory Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 99(6):716-726.
- Calleman, C.J., Bergmark, E. and Costa, L., 1990. Acrylamide is metabolized to glisidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chemical Research in Toxicology*, 3(5):406-412.

- Cao, J., Beisker, W., Nüsse, M. and Adler, I.D., 1993. Flow cytometric detection of micronuclei induced by chemicals in poly-and normochromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *Mutagenesis*, 8(6):533-541
- Cashell, A.W. and Buss, D.H., 1992. The frequency and significance of megacaryocytic emperipolesis in myeloproliferative and reactive states. *Annals of Hematology*, 64(6):273-276.
- Centurione, L., Di Baldassare, A., Zingeriello, M., Gatta, V., Rana, R.A., Langella, V., Di Virgilio, A., Vannucchi, A.M. and Migliaccio, A.R., 2004. Increased and pathological emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1 low mice. *Blood*, 104:3573-3580.
- Chen, L.T., Handler, E.E., Handler, E.S. and Weiss, L., 1972. An electron microscopic study of bone marrow of the rat in experimental myelogenous leukemia. *Blood*, 39:99-112.
- Chiu, T., 1984. Megakaryocytes with intracytoplasmic blood cells. *American Journal of Veterinary Research*, 45(4):769-770.
- Chyczewski, L., Debek, W. and Dzieciol, J., 1994. Influence of brain hypoxia on megakaryocytic emperipolesis in rats. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 32(3): 187-190.
- Cicchetti, R., Bari, M. and Argentin, G., 1999. Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: an in vivo study in mice. *Mutation Research*, 439:239-248.
- Cihák, R. and Vontorková, M., 1988. Cytogenetic effects of acrylamide in the bone marrow of mice. *Mutation Research*, 209(1-2):91-4.
- Coughlin, J.R., 2003. Acrylamide: What we have learned so far? *Food Technology*, 57(2):100.
- De Candia, E., Larocca, L.M., Pecci, A. and Balduini, C.L., 2007. Marked emperipolesis and increase P-Selectin expression on megakaryocytes in a novel case of gray platelet syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(1):193.
- De Pasquale, A., Paterlini, P. and Quaglino, D., 1985. Emperipolesis of granulocytes within megacaryocytes. *British Journal of Haematology*, 60:384-386.

- Dearfield, K.L., Douglas, G.R., Ehling, U.H., Moore, M.M., Sega, G.A. and Brusick, D.J., 1995. Acrylamide: A review its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutation Research*, 330:71-99.
- Demirel, S. ve Zamani, A. G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3):123-127.
- Diemberck, W., Dusing, H.J. and Akhiani, M., 1998. Dermal absorption and penetration of acrylamide ([C<sup>14</sup>]-acrylamide as Tracer) in different cosmetic formulations and polyacrylamide-solution after topical application to excised pig skin. Beiersdorf: Report 7061/PEN.203 for the Acrylamide Monomer Producers
- Dikmenli, M., 2000. Normal ve UV ile ışınlanan *Spalax leucodon* (Rodentia:Spalacide) kemik iliğinde megakaryositik emperipolesis ve mitotik aktivitenin incelenmesi. Yayınlanmamış Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Dobrzynska, M.M. and Gajewski, A.K., 2000. Induction of micronuclei in bone marrow and sperm head abnormalities after combined exposure of mice to low doses of X-rays and acrylamide. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 20:133-140.
- Doerge, D.R., Young, J.F., McDaniel, L.P., Twaddle, N.C. and Churchwell, M.I., 2005. Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208:199-209.
- Dzieciol, J., Debek, W. and Chyczewski, L., 1994. Phenomenon of emperipolesis of bone marrow megakaryocytes in experimental hemorrhage shock in rats. *Acta Haematologica Polonica*, 25(2): 165-169.
- Dzieciol, J., Debek, W. and Chyczewski, L., 1995. Megakaryocytes in the acute stage of experimental hemorrhagic shock. Part II. Megakaryocytic regulation of cell release from the rat bone marrow. *Roczniki Akademii Medycznej Białymstoku*, 40(1):94-98.
- Dzieciol, J., Lemancewicz, D., Kloczko, J., Boguslowicz, W. and Lebelt, A., 2001. Megakaryocytic emperipolesis in bone marrow of the patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 39(2):142-143.

- Elmore, J.S., Koutsidis, G., Dotson, A.T., Mottram, D.S. and Wedzicha, B.L., 2005. Measurement of acrylamide and its precursors in potato, wheat, and rye model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4):1286-1293.
- EPA, 1996, Health effects test guidelines, In vivo mammalian cytogenetics assay. OPPTS 870.5395
- European Union Risk Assessment Report: Acrylamide, 2002. Luxemburg, 210 p. European Union.
- Exon, J.H., 2006. A review of the toxicology of acrylamide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9:397-412.
- FAO/WHO, 2005. Acrylamide in food network. Acrylamide Infonet. <http://www.acrylamide-food.org/index.htm>
- Fennell, T.R., Sumner, S.C.J., Snyder, R.W., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W.E. and Friedman, M.A., 2005. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicological Sciences*, 85:447-449.
- Friedman, M., 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51:4504-4526.
- Friedman, M.A., Dulak, L.H., and Stedham, M.A. 1995. A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Fundamental and Applied Toxicology*, 27:95-105.
- Gamboa da Costa, G., Churchwell, M.I., Hamilton, L.P., Von Tungeln, L.S., Beland, F.A., Marques, M.M. and Doerge, D.R., 2003. DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chemical Research in Toxicology*, 16:1328-1337.
- Gan, M.F., Zhou, T., Yu, X.R., Yu, C.K., Zheng, H.H. and Cai, J.F., 2005. Extranodal Rosai-Dorfman disease. *Zhounghua Bing Li Xue Za Zhi*, 34(3): 137-139.
- Garey, J., Ferguson, S.A. and Paule, M.G., 2005. Developmental and behavioral effects of acrylamide in Fischer 344 rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 27:553-563.
- Gassner, P. and Adler, I.D., 1996. Induction of hypoploidy and cell cycle delay by acrylamide in somatic and germinal cells of male mice. *Mutation Research*, 367, 195-202.

- Ghanayem, B.I., McDaniel, P.L., Churchwell, M.I., Twaddle, N.C., Snyder, R., Fennell, T.R. and Doerge, D.R., 2005b. Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicological Sciences*, 88(2):311-318.
- Ghanayem, B.I., Witt, K.L., El Hadri, L., Hoffler, U., Kissling, G. E., Shelby, M.D. and Bishop, J.B., 2005a. Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: Evidence supporting a glycidamide-mediated mechanism. *Biology of Reproduction*, 72:157-163.
- Ghanayem, B.L., Wang, H. and Sumner, S., 2000. Using cytochrome P-450 gene knock-out mice to study chemical metabolism, toxicity and carcinogenicity. *Toxicologic Pathology*, 28, 839-850.
- Gökmen, V., Palazoğlu, T.K. and Şenyuva, H.Z., 2006. Relation between the acrylamide formation and time-temperature history of surface and core regions of French fries. *Journal of Food Engineering*, 77(4):972-976.
- Haase, N.U., Matthäus, B. and Vosmann, K., 2003. Minimierungsansätze zur Acrylamid-Bildung in pflanzlichen Lebensmitteln-aufgezeigt am Beispiel von Kartoffelchips. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 99:87-90.
- Halil, O. and Baret, A.J., 1980. Phagocytosis by megakaryocytes in malignant disorders. *British Journal of Haematology*, 46:161.
- Humble, J.G., Jayne, W.H.M. and Pulvertaft, R.J.V., 1956. Biological interaction between lymphocytes and other cells. *British Journal of Haematology*, 2:283-294.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1994. Acrylamide, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, some industrial chemicals, vol. 60. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 60, 389-443.
- Ikeda, G.E., Miller, E., Sapienza, P.P., Michel, T.C. and Inskip, P.B., 1987. Comparative tissue distribution and excretion of  $^{14}\text{C}$  acrylamide in beagle dogs and miniature pigs. *Food and Chemical Toxicology*, 25(11):871-875.
- Ioachim, H.L., 1965. Emperipolesis of lymphoid cells in mixed cultures. *Laboratory Investigation*, 14:1784-1808.

- Italiano J.E., Jr & Shivdasani, R.A., 2003. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *Journal of Thrombosis and Haemastasis*, 1:1174-1182.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. and Kelley, R.O., 1998. A Lange Medical Book Temel Histoloji, Çeviri editörü: Prof. Dr. Yener Aytekin, Barış Kitabevi, ISBN: 975-95331-2-X, Sayfa: 238.
- Kady, A.M., Kardos, S., Johnson, L.R., Friedman, M. and Abdel-Rahman, M.S., 1996. Pharmacokinetics of acrylamide after oral exposure in male rats. Toxicologist, Abstracts of SOT Annual Meeting, Abstract No 204, Issue of Fundam. Appl. Toxicol., 30, Part 2., March 1996.
- Kinkor, Z., Mukensnabl, P. and Michal, M., 2002. Inflammatory myxohyaline tumor with massive emperipolesis. *Pathology Research and Practice*, 198:639-642.
- Kirman, C.R., Gargas, M.L., Deksin, R., Toner-Navarro, L. and Andersen, M.A., 2003. A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 66:253-274.
- Kong, Y.Y., Lu, H.F., Zhu, X.Z., Wang, J., Shi, D.R. and Kong, J.C., 2005. Cutaneous Rosai-Dorfman disease. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 34(3):133-136.
- Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Tomoko, K., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, S.M., Kinae, N. and Honma, M., 2006. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutation Research*, 603:151-158.
- Krishna, G. and Hayashi, M., 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455:155-166.
- Labay, K., Ould-Elhkim, M., Kles, V., Guffroy, M., Poul, J.M. and Sanders, P., 2001. Effects of griseofulvin in medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 21:441-451.
- Lafferty, J.S., Kamendulis, L.M., Kaster, J., Jiang, J., and Klauning, J.E., 2004. Subchronic acrylamide treatment induces a tissue-specific increase in DNA synthesis in the rat. *Toxicology Letters*, 154:95-103.

- Lam, T.K., Prematilleke, M.N., Li, C.K., Fok, T.F., 1991. Megakaryocytic phagocytosis in a chromosomally normal neonate with transient myeloproliferative disorder. *Acta Haematologica*, 86:49-50.
- Lambert, I.B., Singer, T.M., Boucher, S.E. and Douglas, G.R., 2005. Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutation Research*, 590:1-280.
- Lee, K.P., 1989. Emperipolesis of hematopoietic cells within megakaryocytes in bone marrow of the rat. *Veterinary Pathology*, 26:473-478.
- Lee, W.B., Erm, S.K., Kim, K.Y. and Becker, R.P., 1999. Emperipolesis of erythroblasts within Kupffer cells during hepatic hemopoiesis in human fetus. *The Anatomical Report*, 256:158-164.
- Leven, R.M. and Tablin, F., 1988. Megakaryocyte and platelet ultrastructure in the Wistar Furth rat. *American Journal of Pathology*, 132(3):417-426.
- Lopes, L.F., Bacchi, M.M., Coelho, K.I., Filho, A.A. and Bacchi, C.E., 2003. Emperipolesis in a case of B-Cell Lymphoma: A rare phenomenon outside of Rosai-Dorfman disease. *Annals of Diagnostic Pathology*, 7(5): 310-313.
- Mahaut-Smith, M.P., Thomas, D., Higham, A.B., Usher-Smith, J.A., Hussain, J.F., Martinez-Pinna, J., Skepper, J.N. and Mason, M.J., 2003. Properties of the demarcation membrane system in living rat megakaryocytes. *Biophysical Journal* 84:2646-2654.
- Manière, I., Godard, T., Doerge, D.R., Churchweel, M.I., Guffroy, M., Laurentie, M. and Poul, J.M., 2005. DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutation Research*, 580:119-129.
- Manjanatha, M.G., Aidoo, A., Shelton, S.D., Bishop, M.E., McDaniel, L.P., Lyn-Cook, L.E. and Doerge, D.R., 2006. Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female Big Blue mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47:6-17.
- Martin, F.L. and Ames, J.M.J., 2001. Formation of Strecker aldehydes and pyrazines in a fried potato model system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49:3885-3892.
- Martins, C., Oliveira, N.G., Pingarilho, M., Gamboa da Costa, G., Martins, V., Marques, M.M., Beland, F.A., Churchwell, M.I., Doerge, D.R., Rueff, J. and Gaspar, J.F., 2007. Cytogenetic damage induced by acrylamide and glycidamide

- in mammalian cells: corelation with speciglycidamide-DNA adducts. *Toxicological Science*, 95(2):383-390.
- Marty, J.P., 1998. In vitro percutaneous absorpsiyon of acrylamide across human skin. Paris, France, Faculty of Pharmacy, Université de ParisSud.
- Mavourni, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A., 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US, Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 239:29-80.
- Melnick, R. L., 2002. Carcinogenicity and mechanistic insights on the behavior of epoxides and epoxide-forming chemicals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 982:177–189
- Mendel, F., 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:4504-4526.
- Migita, M., Fukunaga, Y., Watanabe, A., Marayuma, K., Ohta, K., Kaneko, K., Kaneda, M., Kakinuma, K. and Yamatoto, M., 1992. Emperipolexis of neutrophils by megakaryocytes and thrombocytopenia observed in a case of Kostmann's Syndrome during intravenous administration of high-dose rhG-CSF. *British Journal of Haematology*, 80:413-415.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B.L. and Dodson, A.T., 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419:448.
- Mustafa, A., Anderson, R., Rosèn, J., Kamal-Eldin, A. and Aman, P. 2005. Factors influencing acrylamide content and color in rye crisp bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15):5985-5989.
- Naccarati, A., Malinu, S., Mancuso, M., Sciliano and G., Migliore, L., 2000. Cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of mitochondrial disease patients. *Neurological Science*, 21:963-965.
- Newman, B., Hu, W.M., Nigro, K. and Gilliam, A.C., 2007. Aggressive histiocytic disorders that can involve the skin. *Journal of american academy of Dermatology*, 56:302-316.
- Ono, H., Chuda, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Yada, H., Ishizaka, M., Kobaya, H. and Yoshida, M., 2003. Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Additives and Contaminants*, 20:215-220.

- Parmley, R.T., Kim, T.H., Austin, R.L., Avarado, C.S., Ragab, A.H., 1982. Emperipolesis of neutrophils by dysmorphic megakaryocytes. *American Journal of Hematology*, 13:303-311.
- Paulsson, B., Grawe, J. and Törnqvist, M., 2002. Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mutation Research*, 516:101-111.
- Paulsson, B., Kotova, N., Grawé, J., Henderson, A., Granath, F., Golding, B. and Törnqvist, M., 2003. Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutation Research*, 535:15-24.
- Pedreschi, F., Kaack, K. and Granby, K., 2004. Reduction of acrylamide formation in fried potato slices. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie*, 37:679-685.
- Pedreschi, F., Moyano, P., Kaack, K. and Granby, K., 2005. Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Research International*, 38:1-9.
- Pelucchi, C., Galeone, C., Levi, F., Negri, E., Franceschi, S., Talamini, R., Bosetti, C., Giacossa, A. and Vecchia, C.L., 2006. Dietary acrylamide and human cancer. *International Journal of Cancer*, 118:467-471.
- Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M., 1987. Mammalian in vivo cytogenetic assays Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Research*, 189:157-165.
- Ramsey, J.C., Young, J.D. and Gorzinski, S.J., 1984. Acrylamide: Toxicodynamics in Rats. Health and Environmental Sciences, Toxicology Research Laboratory, Dow Chemical U.S.A., Midland, MI.
- Rice, J.M., 2005. The carcinogenicity of acrylamide. *Mutation Research*, 580:3-20.
- Rosen, J. and Hellenas, K.E., 2002. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, 127:880-882.
- Sami, K. and Pasteur, E., 1998. Images in Haematology. Emperipolesis. *American Journal of Haematology*, 59:64.
- Saxena, S., Beena, K.R., Bansal, A. and Bhatnagar, A., 2002. Emperipolesis is a common Breast Malignancy: A case report. *Acta Cytologica*, 46:883-886.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31:9-15.

- Schmitt, A, Jouault, H., Guichard, J. Wendling, F., Drouin, A. and Cramer, E.M., 2000. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood*, 96:1342-1347.
- Schmitt, A., Guichard, J., Masse J.M., Debili, N. and Cramer, E.M., 2001. Of mice and men comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Experimental Hematology*, 29:1295-1302.
- Schulze, H., Korpai, M., Hurov, J., Kim, S.W., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T. and Shivdasani, R.A., 2006. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*, 107(10):3868-3875.
- Shamoto, M., 1981. Emperipoiesis of hematopoietic cells in myelocytic leukemia. Electron microscopic and phase contrast microscopic studies. *Virchows Archive B:Cell Pathology*, 35:283-290.
- Shen, R. and Wen, P., 2004. Clear cell renal cell carcinoma with syncytial giant cells: a case report and review of the literature. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 128(12):1435-1438.
- Shintatu, M. and Yutani, C., 2004. Oligodendrocytes within astrocytes (emperipoiesis) in the white matter in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathologica*, 108:201-206.
- Sickles, D.W., Sperry, A.O., Testino, A. and Friedman, M., 2007. Acrylamide effects on kinesin-related proteins of the mitotic/meiotic spindle. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222:111-121.
- Sobolewski, S., 1980. Phagocytosis by megakaryocytes in malignant disorders (abstract). *British Journal of Haematology*, 45:173A.
- Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hav, J., Guy, P.A., Robert, M.C. and Reidiker, S., 2002. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419:449.
- Sumner, S.C., Bahman, A. and Williams, C.C., 2001. Acrylamide, metabolism, distribution and hemoglobin adducts in male F334 rats and B6C3F1 mice following inhalation exposure and distribution and hemoglobin adducts following dermal application to F344 rats. Research Triangle Park, NC.

- Sumner, S.C., Fennell, T.R., Moore, T.A., Chanas, B., Gonzales, F. and Ghanayem, B.I., 1999. Role of cytochrome P4502E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chemical Research in Toxicology*, 12:1110-1116.
- Sumner, S.C., Macneela, J.P. and Fennell, T.R., 1992. Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-<sup>13</sup>C] acrylamide in rats and mice using <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Research in Toxicology*, 5:81-89.
- Sumner, S.C., Williams, C.C., Snyder, R.W., Krol, W.L., Asgharian, B. and Fennell, T.R., 2003. Acrylamide: A comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral or inhalation exposure. *Toxicology Science*, 75:260-270.
- Taeymas, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R.H., Gondè, P., van Eijck, P., Lalljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Müller, D., Tallmadge, D., O'Brien, J., Thamson, S., Silvani, D. and Withmore, T., 2004. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(5):323-347.
- Tanaka, M., Aze, Y. and Fujita, T., 1994. Megakaryocytic emperipolesis in the rat bone marrow induced by lipopolysaccharide. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 56(6):1173-1175.
- Tareke, E., Rydberg, P. and Karlsson, P., 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:4998-5006.
- Tatatsuki, S., Nemoto, S., Sasaki, K. and Maitani, T., 2004. Production of acrylamide in agricultural products by cooking. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 45(1):44-48.
- Tavassoli, M. and Aoki, M., 1981. Migration of entire megakaryocytes through the marrow-blood barrier. *British Journal of Haematology*, 48:25-29.
- Tavassoli, M. and Aoki, M., 1989. Localization of megakaryocytes in the bone marrow. *Blood Cells*, 15:3-14.
- Tavassoli, M., 1981. Emperipolesis by megakaryocytes in blood loss. *British Journal of Haematology*, 49:660-661.

- Tavassoli, M., 1986. Modulation of megakaryocyte emperipolesis by phlebotomy: Megakaryocytes as a component of marrow-blood barrier. *Blood Cells*, 12:205-216.
- Thiele, J., Krech, R., Choritz, H. and Georgii, A., 1984. Emperipolesis-a peculiar feature of megakaryocytes as evaluated in chronic myeloproliferative diseases by morphometry and ultrastructure. *Virchows Archive B (Cell Pathology)*, 46:253-263.
- Titenko-Holland, N., Ahlborn, T., Lowe, X., Shang, N., Smith, M.T. and Wyrobek, A.J., 1998. Micronuclei and developmental abnormalities in 4-day mouse embryos after paternal treatment with acrylamide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31:206-217.
- WeiBhaar, R. and Gutsche, B., 2002. Formation of acrylamide in heated potato products-model experiments pointing to asparagine as precursor. *Dutsche Lebensmittel-Rundschau*, 98:397-400.
- Witt, K. L., Hughes, L.A., Burka, L.T., Mcfee, A.F., Mathews, J.M., Black, S.L. and Bishop, J.B., 2003. Mouse bone marrow micronucleus test results do not predict the germ cell mutagenicity of N-Hydroxymethylacrylamide in the mouse dominant lethal assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41:111-120.
- Yang, H.J., Lee, S.H., Jin, Y., Choi, J.H., Han, C.H. and Lee, M.H., 2005. Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *Journal of Veterinary Science*, 6(2):103-109.
- Yaylayan, V. and Stadler, R., 2005. Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective. *Journal of AOAC International*, 88(1): 268-273.
- Yaylayan, V.A., Perez Locas, C., Wnorowski, A. and O'Brien, J, 2004. The role of creatine in the generation of N-methylacrylamide: A new toxicant in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:5559-5565.
- Zhang, Y., Haoran, F. and Zhang, Y., 2007. Study on formation of acrylamide in asparagine-sugar microwave heating systems using UPLC-MS/MS analytical method. *Food Chemistry*, 108(2):542-550.
- Zucker-Franklin, D. and Grossi, C.E., 2003. Atlas of blood cells function and pathology. Third edition. 1002 pp. in two volumes, illustrated. Milan, Edi.Erme, ISBN 88-7051-252-5.

- Zucker-Franklin, D., 1981. Megakaryocytes and platelets, in Zucker-Franklin, D., Greaves, M.E., Marmont, M. (eds.), *Atlas of Blood cells: Function and Pathology*, pp 557. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Zyzak, D.V., Sanders, R.A., Stajanovic, M., Tallmadge, D.H., Eberhart, B.L., Ewald, D.K., Gruber, D.C., Morsch, T.R., Strothers, M.A., Rizzi, G.P. and Villagran, M.D., 2003. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16):4782-4787.