



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

DOKTORA TEZİ

**CİNSİYET HORMONLARININ AKRİLAMİD
TOKSİSİTESİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA
ARAŞTIRILMASI**

FEDAA ABO RAS

**DANIŞMAN
PROF.DR. GÜL ÖZHAN**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2024

İTHAF

Anneme, Hocalarıma ve Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora yolculuğum boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni aydınlatan, her daim ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Gül Özhan'a derin minnettarlığımı sunarım.

Eğitimin sürecimde rehberlik eden, karşılaştığım problemlerde yanımda duran Doç. Dr. Mahmut Fırat Kenanoğlu hocama teşekkürlerimi ifade etmek isterim.

Her koşulda yanımda olarak desteklerini hissettiren, hayatımın en değerli varlıkları olan anneme, kardeşlerime, aileme ve kıymetli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-38172

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. AA.....	2
2.1.1. AA Toksikokinetiği	7
2.1.2. AA Toksisitesi.....	10
2.2. Cinsiyet Hormonları ve ES.....	18
2.2.1. ES Farma/Toksikokinetiği	24
2.2.2. ES Toksisitesi.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	30
3.2. Kullanılan Kimyasal ve Kitler	31
3.3. Kullanılan Yöntemler	32
3.3.1. Hücre Kültür Koşulları	32
3.3.2. Hücre Canlılığının Tespiti	34
3.3.3. Hücre Proliferasyonunun Tespiti	35
3.3.4. Genotoksisitenin Tespiti	35
3.3.5. Oksidatif Hasarın Tespiti	37
3.3.6. Apoptoz Değerlendirmesi	41
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	42
4. BULGULAR	43
4.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	43
4.2. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi	46

4.3. Genotoksisitenin Değerlendirilmesi	48
4.4. Oksidatif Hasarın Değerlendirilmesi.....	49
4.5. Apoptozun Değerlendirilmesi.....	54
5. TARTIŞMA	55
KAYNAKLAR.....	61
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	88



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Türkiye'de gıdalardaki AA miktarları (Arusoğlu, 2015; Rifai ve Saleh, 2020).	3
Tablo 3-1: Maruziyet esnasında deney ortamındaki tercih edilen hücre yoğunlukları....	33
Tablo 3-2: Testlere göre AA ve ES maruziyet koşulları.....	33
Tablo 3-3: MTT testinde kullanılan maruziyet koşulları.	34
Tablo 4-1: Oksidatif hasar potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerin tayini için kullanılacak standartlar ile hazırlanan ölçü eğrisi bilgileri.	50
Tablo 4-2: AA, ES ve kombine maruziyet gruplarının MCF-7 hücresi üzerine oksidatif hasar oluşturma potansiyeli.....	52
Tablo 4-3: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerine apoptoz oluşturma potansiyeli ...	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: AA'nın kimyasal yapısı (Lingnert ve ark. 2002)	2
Şekil 2-2: AA'nın oluşma mekanizmaları (Xu ve ark., 2014)	6
Şekil 2-3: Akrilik asitten ve amino asitlerden AA oluşumu (Yaylayan ve ark., 2005).....	6
Şekil 2-4: Östrojenlerin yapısal formülleri (Kuhl, 2005).....	20
Şekil 2-5: ES'nin reaktivitesi (Yager ve Liehr, 1996).....	26
Şekil 4-1: AA'nin 24 saat maruziyetinde sitotoksik etkisi.	43
Şekil 4-2: ES'nin 24 saat maruziyet durumundaki sitotoksik etkisi.....	44
Şekil 4-3: 0,1 nM ES varlığında AA'nin MCF-7 hücre canlılığına etkisi.	45
Şekil 4-4: 10 nM ES varlığında AA'nin MCF-7 hücre canlılığına etkisi.	45
Şekil 4-5: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerinde koloni oluşturma miktarı.....	46
Şekil 4-6: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerinde migrasyon oranı.....	47
Şekil 4-7: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerinde genotoksik etkisi.	48
Şekil 4-8: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerinde ROS indüksiyonu.....	49
Şekil 4-9: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerine oksidatif hasar oluşturma potansiyeli	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

8-OHdG	8-Hidroksi-2-deoksiguanozin
AA	Akrilamid
ATP	Adenin trifosfat
BMD	Benchmark karşılaştırmalı doz
CAT	Katalaz
CYP	Sitokrom P450
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	Enzim bağlı immun test
ES	Estradiol
FAO	Gıda Tarım Örgütü
FBS	Fötal sıgır serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GA	Glisidamid
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH	Glutatyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H9c2	Sıçan kardiyobiyoplast hücre dizisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC ₅₀	%50 Maksimum inhibisyon konsantrasyonu
LC ₅₀	%50 Ölümcül konsantrasyon
LH	Luteinize edici hormon
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
LOAEL	Advers etkinin görüldüğü en düşük seviye
MDA	Malondialdehit
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolyum

NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
NMA	Normal erime noktalı agaroz
NOAEL	Hiçbir advers etkinin görülmediği en yüksek seviye
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PC	Protein karbonil
PI	Propidium iyodür
ROS	Reaktif oksijen türevleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SCE	Kardeş kromatid değişimi
TDI	Tolere edilebilir günlük alım miktarı
TSH	Tiroid uyarıcı hormon
T-SOD	Total süperoksit dismutaz
WHO	Dünya sağlık örgütü

ÖZET

Abo Ras, F. (2024). Cinsiyet Hormonlarının Akrilamid Toksisitesine Etkilerinin İn Vitro Koşullarda Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Akrilamid (AA), yüksek karbonhidrat ve düşük protein içeriği olan yiyeceklerin yüksek sıcaklıkta pişirilmesiyle oluşur. Literatür verilerine göre AA karsinogeneze neden olacak şekilde hormon sistemlerine müdahale edebileceği düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, diyetle AA alımının endometrial, over ve östrojen reseptörü pozitif meme kanserleri ve meme kanseri mortalitesi riski arasında pozitif ilişkiler olabileceğini bildirmektedir. Sentetik oral östrojen bileşiği etinilestradiolün, çoğu doğum kontrol hapında bulunan gonadal yapılara zarar verdiği ve gonadal büyümeyi engellediği gösterilmiştir. Tez çalışmasında, AA ve östrojenin temel formu 17 β -estradiolün (ES) tek başına ve kombine maruziyet durumunda insan meme adenokarsinom MCF-7 hücresinde genetik materyal ve hücresel düzeyde toksik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla; hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etki, oksidatif hasar ve apoptoz oluşturma potansiyeli değerlendirilmiştir. ES'nin AA toksisitesi üzerine modülatör etki gösterdiği, düşük ES konsantrasyonlarında AA'nın sitotoksik etkisini azalttığı ve dolayısıyla da ES'nin koruyucu olabileceği gözlenirken, yüksek ES konsantrasyonlarında, AA'nın toksik etkisinin ES ile daha da arttığı tespit edilmiştir. AA, ES ve kombinasyonları MCF-7 hücreleri üzerine genotoksik etki göstermiş, lipid, protein ve DNA üzerinde oksidatif hasar riskini arttırmış, MCF-7 hücresinin buna karşı antioksidan yanıt oluşturduğu gözlenmiş, ancak oksidatif hasar göstergelerine rağmen apoptotik etki gözlenmemiştir. AA ve ES'ye insan popülasyonunda geniş ölçüde maruz kaldığı göz önüne alındığında, elde edilen verilerin halk sağlığı açısından değerli olduğu, ES ve AA maruziyetiyle ilişkili risklerin daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasına katkı sağlayacağı ve riskleri azaltmak için stratejiler geliştirmeye yardımcı olacağı beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, 17 β -estradiol, MCF-7 hücresi, Hücre proliferasyonu, Oksidatif hasar, Genotoksisite

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-38172

ABSTRACT

Abo Ras, F. (2024). In Vitro Investigation of the Effects of Sex Hormones on Acrylamide Toxicity. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Toxicology, PhD Thesis. Istanbul.

Acrylamide (AA) is formed by cooking foods with high carbohydrate and low protein content at high temperature. According to literature data, AA is thought to interfere with hormone systems to cause carcinogenesis. Epidemiological studies report that dietary AA intake may have positive associations with the risk of endometrial, ovarian and estrogen receptor positive breast cancers and breast cancer mortality. The synthetic oral estrogen compound ethinylestradiol has been shown to damage gonadal structures and inhibit gonadal growth in most contraceptives. In this thesis, the toxic effects of AA and 17 β -estradiol (ES), the basic form of estrogen, on human breast adenocarcinoma MCF-7 cells at the genetic material and cellular level were investigated. For this purpose, the effect on cell viability and proliferation, oxidative damage and apoptosis potential were evaluated. It was observed that ES showed modulatory effect on AA toxicity, decreased the cytotoxic effect of AA at low ES concentrations and thus ES may be protective, while at high ES concentrations, the toxic effect of AA was further increased by ES. AA, ES and their combinations showed genotoxic effects on MCF-7 cells, increased the risk of oxidative damage to lipids, proteins and DNA, induced an antioxidant response in MCF-7 cells, but no apoptotic effect was observed despite indications of oxidative damage. Given the widespread exposure to AA and ES in the human population, it is expected that the data obtained are of public health value, will contribute to a more detailed understanding of the risks associated with ES and AA exposure, and will help to develop strategies to reduce risks.

Keywords: Acrylamide, 17 β -estradiol, MCF-7 cells, Cell proliferation, Oxidative damage, Genotoxicity

This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit.
Project No: TDK-2021-38172

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1950'li yıllardan beri çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılan AA, polimerlerdeki çözünürlüğü, yapışmayı ve çapraz bağlanmayı artıran çok yönlü bir vinil monomeridir. Ayrıca, AA'nın gıdalarda, özellikle de yüksek sıcaklıkta pişirme işlemleri sırasında karbonhidrat açısından zengin öğelerde olduğu, ilk kez 2002 yılında rapor edilmiştir; bu, kızartma, fırınlama veya kavurma gibi işlemlerin ardından yaygın olarak tüketilen gıdalardaki varlığına işaret etmektedir.

Kadınların AA'ya maruz kalma yolları, endüstriyel bağlamları, sigarayı, diyet alımını ve hatta kozmetik kullanımını kapsayan çok yönlüdür. Bu kadınların çoğu aynı zamanda oral kontraseptif veya hormon replasman tedavisi olarak ES tüketmektedir. Bu nedenle, AA ve ES'nin birleşik etkilerinin incelenmesi, potansiyel olumsuz sonuçların tahmin edilmesi açısından çok önemlidir ve bunların kadın sağlığı üzerindeki ortak etkilerine ilişkin titiz bilimsel araştırmaların önemine işaret etmektedir.

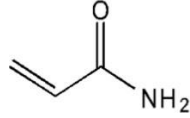
Endüstriyel süreçler, beslenme alışkanlıkları, sigara içme ve diğer çevresel faktörler, potansiyel olarak kadınların önemli bir bölümünü etkileyen yaygın AA maruziyetine yol açmıştır. Bu kadınların çoğu, oral kontraseptif, hormon replasman tedavileri veya diğer tıbbi tedaviler dahil olmak üzere çeşitli amaçlarla eşzamanlı olarak ES kullanabilmektedir. Bu eşzamanlı maruziyeti, ES ve AA'nın potansiyel sinerjistik etkilerine ilişkin endişeleri artırmaktadır. Potansiyel sağlık etkileri göz önüne alındığında, bu maddelerin insan sağlığı üzerindeki birleşik etkilerini anlamak zorunlu hale gelmektedir. Bu yüzden çalışmamız ES ve AA arasındaki etkileşimden kaynaklanan sağlık sonuçlarını açıklamaya çalışmaktadır.

Tez çalışmasında hedef, MCF-7 hücreleri üzerindeki birleşik etkilerine odaklanan ES ve AA arasındaki etkileşimlerin araştırılmasıdır. MCF-7 hücreleri, lümen, östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanserinin fenotipik özelliklerinin çoğunu sergiledikleri için meme kanserini incelemek için yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Hücre canlılığı için MTT testi, koloni hücre oluşum testi, çizgi testi ile hücre migrasyon kapasitesi tayini, DNA hasarı için COMET testi, oksidatif stres testleri, apoptoz testi ve reaktif oksijen türleri (ROS) testi gibi *in vitro* testler uygulanacak olup ES ve AA'nın hücresel işlev üzerindeki etkisinin değerlendirilmesine yardımcı olmak hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AA

AA, 2-propenamid (C_3H_5NO) yapısındadır (Şekil 2-1). Su, etanol, eter ve kloroformda çözünür, beyaz, kristalize ve kokusuzdur (Das ve Srivastav, 2012).



Şekil 2-1: AA'nın kimyasal yapısı (Lingnert ve ark. 2002).

AA 1950'lerden beri endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Mills ve ark., 2008). AA, polimerlerin suda çözünürlüğünü, yapışmasını ve çapraz bağlanmasını geliştiren bir vinil monomeridir (National Toxicology Program, 2005). AA monomeri ayrıca doğrudan fotopolimerizasyon sistemlerinin bir bileşeni olarak yapıştırıcılarda, harçlarda ve vinil polimerlerdeki çapraz bağlama maddelerinde kullanılmaktadır (National Toxicology Program, 2005). AA kolaylıkla polimerize edilerek poliakrilamide dönüştürülebilmektedir. Poliakrilamid, kağıt üretimi sırasında güçlendirme yardımcısı, su arıtma sırasında topaklaştırıcı, toprak iyileştirme maddesi ve baraj temelinde dolgu maddesi, tünel ve kanalizasyon inşaatlarında derz dolgu maddesi olarak gibi çeşitli kullanım alanları mevcuttur (Mills ve ark., 2008). Kullanım alanları; tekstil, çelik üretimi, su arıtma, kağıt ve kağıt hamuru üretimi, toprak ve kum stabilizasyonuna yönelik inşaatlar, ham petrol ve petrol rafinerisi, maden işleme, beton üretimi, şeker rafinasyonu, sağlık tesisleri ve biyoteknoloji laboratuvarları gibi çeşitli sektörlerle uzanmaktadır. Geniş uygulama yelpazesi, AA monomerinin ve AA polimerinin birçok sektördeki endüstriyel önemini ve çeşitli katkılarını vurgulamaktadır (National Toxicology Program, 2005).

AA bilimsel çalışmalarda, yapısal ve işlevsel proteinlerdeki SH gruplarını seçici olarak değiştirmek ve proteinlerin yapısını ve işlevini aydınlatmak için tasarlanmış çalışmalarda triptofan flüoresanını söndürücü olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Poliakrilamid jeller, araştırma laboratuvarında proteinleri ve diğer bileşikleri elektroforez ile ayırmak için kullanılmaktadır (Friedmen, 2003).

Gıdalarda AA oluşumu ilk olarak 2002'de İsveç Ulusal Gıda Otoritesi ve Stockholm Üniversitesi tarafından rapor edilmiştir (Arvanitoyannis ve Dionisopoulou, 2014). AA, karbonhidratça zengin gıdaların kızartma, ızgara, fırınlama, kavurma, ızgara ve kızartma sırasında 120°C (248°F) ve üzeri sıcaklıklarda ısıtma işlemleri sırasında oluşmaktadır. Yüksek sıcaklıkta karbonhidrat ve aminoasit varlığında oluşan AA, glikoz/fruktoz ile asparagin içeriğinden dolayı patates ve tahıl gibi gıda ürünlerinde en yüksek düzeylerde varlığı rapor edilmiştir (Lineback ve ark., 2012; Rifai ve Saleh, 2020) (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Türkiye'de gıdalardaki AA miktarları (Arusoğlu, 2015; Rifai ve Saleh, 2020).

Ürün	AA miktarı (µg/kg)
Patates cipsi	1312
Patates kızartması	537
Hamur ürünleri	36
Fırınlanmış ürünler	112
Bisküvi, kraker, tost	423
Kahvaltılık tahıllar	298
Mısır cipsi	218
Sütlü ekmek	50
Kahve tozu	200
Çikolata tozu	75
Balık ve deniz ürünler	35
Kümes hayvanları	52
Adana kebab	127

Patates ve tahıl ürünlerinde AA oluşumundan sorumlu başlıca sınırlayıcı faktörler indirgen şekerler (glikoz ve fruktoz) ve serbest asparagin (amino asit) olup ürün çeşidi, hasat mevsimi, iklim koşulu, toprak bileşimi ve tarımsal uygulamalar AA oluşum seviyesi üzerinde etkilidir (Stojanovska ve Tomovska, 2015).

AA maruziyetinin gıdadan sonra önemli bir kaynak da sigaradır (Mojska ve ark., 2016; Arvanitoyannis ve Dionisopoulou, 2014; Moldoveanu ve Gerardi, 2011). Bir sigarada ortalama 679,3 ng AA olabilir. Günde ortalama 20 sigara içilmesi halinde günde 0,5 µg AA alımına maruz kalınabileceği bildirilmiştir. Ham tütündeki AA seviyeleri sigara dumanından daha düşüktür. Tütünlerdeki AA seviyeleri yaklaşık 100 ng/g veya daha düşüktür. Bazı çalışmalar AA'nın sigara içme sürecinde oluştuğunu doğrulamıştır (Bušová ve ark., 2020).

Özellikle halka açık içme suyu kaynaklarında topaklaştırıcı olarak poliakrilamid kullanılarak arıtılması sonucu AA maruziyeti önem kazanmaktadır (Bušová ve ark., 2020). İçme suyunun kalitesi konusunda dünya çapında çeşitli standartların mevcuttur. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation, WHO) yönergesine göre içme suyu için limit 0,5 µg/L'dir. Avrupa Birliği de 0,1 µg/L olarak limitini belirlemiştir (Arusoğlu, 2015). Türkiye'de ise ambalajlı içme suyu örneklerinde AA konsantrasyonu 0,012 µg/L ile 0,035 µg/L arasında bildirilmiştir (Akgün ve Sunar, 2020).

AA, geniş kapsamlı endüstriyel kullanımından da içme suyu kaynaklarına salınabilmektedir. AA, suda hızlı çözünürlüğü ve hareketliliği nedeniyle yüzey ve yer altı su kaynaklarına bulaşma riski yüksektir. AA'nın nitrojen ve karbon kaynağı olarak bakteriyel kullanımı, sudaki AA indirgenmesinin ana yoludur. AA, farklı endüstriyel proseslerde yaygın olarak kullanıldığından, çevreye inorganik AA bulaşması büyük bir tehdittir ve halk sağlığı için potansiyel tehlikelere sahiptir (Tepe ve Çebi, 2019). Poliakrilamidin kullanıldığı fabrikaların atık sularındaki AA konsantrasyonları genellikle <1-50 µg/L arasında değişmektedir (National Toxicology Program, 2005).

1984 yılında kozmetik endüstrisi Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA)'ne 43 kozmetik formülasyonun poliakrilamid içerdiğini bildirmiştir. Bu ürünler, %1'e varan konsantrasyonlara sahip saç, tırnak ve cilt bakım ürünlerini içermektedir. Poliakrilamid, kozmetiklerde, şampuanlarda köpük oluşturunca olarak ve suya maruz kaldıktan sonra güneş koruyucularının ciltte kalmasına yardımcı olmak da dahil olmak üzere çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Aynı zamanda nemlendiricilerde, losyonlarda, tıraş kremlerinde ve sabunlarda da bulunmaktadır. Poliakrilamidli kozmetikler cildin her bölgesine uygulanabilmekte ve saatlerce ciltte kalabilmektedir (Shank ve ark., 2022). AA, deriden emildikten sonra gastrointestinal

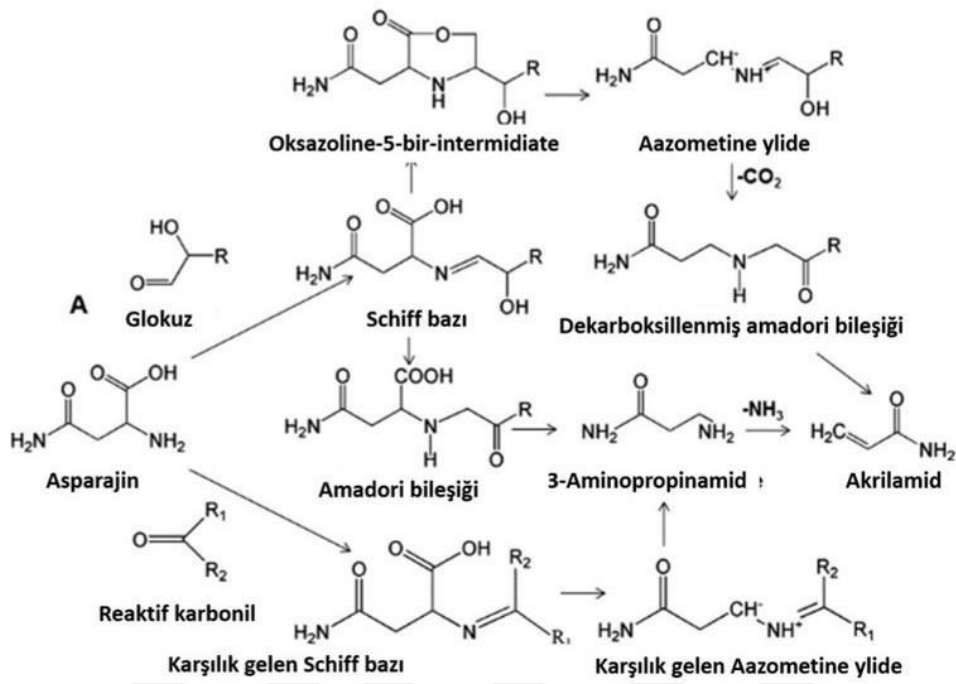
sistemine geçebilmektedir. AA'nın kozmetik ürünlerde kullanımı, nüfus üzerinde oldukça önemli bir yük oluşturmaktadır (Busova ve ark., 2020).

Özetle, AA tüm yollardan alınabilmektedir; inhalasyon (endüstri, kanalizasyon hattı bakımı, sigara vb), oral (içme suyu, yüksek AA içerikli gıda vb) ve dermal yol (endüstri, kozmetik ürün, araştırma laboratuvarları vb) (Carere, 2006).

FDA'ya göre, diyetle AA alımı yaklaşık 0,4 µg/kg/gün'dür. Çocuklarda ve ergenlerde, daha düşük vücut ağırlığı ve farklı tüketimler nedeniyle daha yüksektir ve en yüksek AA alım limiti 6,9 µg/kg/güne kadar çıkmıştır (Kopp ve Dekant, 2009).

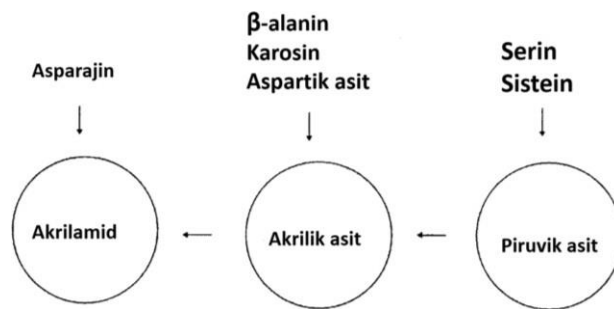
Yapılan çalışmalarda AA'nın asparajin üzerinden doğrudan veya amonyağın akrilik asit ile reaksiyonu yoluyla oluştuğu rapor edilmiştir (Yaylayan ve ark., 2005).

Asparajinden doğrudan AA oluşum yolu 2 yolla açıklanmaktadır. Birinci yol, özellikle glikoz gibi karbonhidratların mevcut olduğu durumlarda Maillard reaksiyonu ile başlamaktadır. Asparajin bir dizi dönüşüme uğrarken Schiff bazı oluşmakta ve ardından da bir dizi reaksiyon ile AA oluşmaktadır. Ayrıca, Maillard reaksiyonu sırasında oluşan Schiff bazı alternatif bir yol da izleyebilmekte ve yolak amadori bileşiği üzerinden yürümektedir (Xu, ve ark., 2014; Stadler ve Scholz, 2004). İkinci yol ise Strecker reaksiyonudur. Glikoz yerine 2,3-butandion gibi reaktif karbonil bileşiğinin varlığında oluşmaktadır. Azometineylide karşılık gelen Schiff bazı ile reaksiyon devam etmekte ve 3-aminopropinamid üzerinden AA oluşmaktadır (Schieberle ve ark., 2005, Xu ve ark., 2014, Blank ve ark., 2005) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: AA'nın oluşma mekanizmaları (Xu ve ark., 2014).

Akroleinden AA'nın oluşum yolu ikinci oluşum yoludur (Zhang, 2009). Akrolein oldukça reaktif bir bileşik olup gliserolün ve amino asitlerin parçalanması ve Maillard reaksiyonu sonucu yaygın oluşan asetaldehit veya formaldehitin varlığı dahil olmak üzere çeşitli yollardan üretilmektedir. Akrolein, akrilik asit oluşturmak üzere bir dönüşüm sürecine girmekte ve AA oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Xu ve ark., 2014, Taeymans ve ark., 2004; Lingnert ve ark., 2002; Lineback ve ark., 2012) (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: Akrilik asitten ve amino asitlerden AA oluşumu (Yaylayan ve ark., 2005).

2.1.1. AA Toksikokinetiği

AA'nın düşük moleküler ağırlığı ve sudaki yüksek çözünürlüğü, biyolojik membranlardan kolay geçmesini sağlamaktadır (Besaratina ve Pfeifer, 2007). AA, mukoza zarları tarafından hızla emildiğinden solunum, oral ve deri yolu ile emilir ve vücutta yaygın dağılmaktadır (Carere, 2006; Fuhr ve ark., 2006; Sumner ve ark., 2003). AA ve poliakrilamid emilim oranı uygulama alanına bağlı olarak farklılık göstermektedir (Sumner ve ark., 2003). Sıçan derisinden geçiş çalışmasında AA'nın i.v. veya dermal uygulama sonrası kan düzeyleri karşılaştırıldığında AA dozlarının %25'inin deri yoluyla emildiği rapor edilmiştir (Dearfield ve ark., 1988). AA'nın dermal temas durumunda erkek farelerin germ hücrelerinde kromozomal hasar tespit edilmiş, dermal uygulamanın oral uygulamaya kıyasla cilt tümör başlatma potansiyelinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (Sumner ve ark., 2003).

Sıçan, domuz ve köpeklerde yapılan çalışmalarda herhangi bir maruziyet yoluyla emilen AA'nın vücutta hızla dağıldığı bildirilmiştir (National Toxicology Program, 2005). Miller ve ark. (1982) AA'nın sıçanlarda kas (%48), deri (%15), kan (%12) ve karaciğer (%7) dokularında dağılımın yüksek olduğunu, beyin, omurilik ve siyatik sinir gibi sinir dokularında ise %1'den az olduğunu bildirmiştir. Minyatür domuz ve av köpeklerinde kan, beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve akciğerlerde AA tespit edilmiş, karaciğer ve böbrekte daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu rapor edilmiştir. Altı köpek yavrusu (33 fetüs) ve 7 domuz yavrusu (45 fetüs) incelenmiştir. Köpeklerde AA'nın, %17,7'lik plasental dağılım faktörü ile hem anne hem de fetal dokulara kolaylıkla dağılmıştır. Domuzlarda plasental dağılım faktörü %31 olduğunu bildirilmiştir (Ikeda ve ark., 1985). Yapılan bir diğer çalışmada sıçan testislerinde AA'nın gecikmiş emilimi bildirilmiştir. Bu gecikmenin muhtemelen testislerdeki yüksek lipid içeriği ve AA'nın polar yapısına bağlı olarak emilim sürecinin daha yavaş olması ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Marlowe ve ark., 1986).

Yapılan bir çalışmada insanlarda AA'nın plasentadan süte geçişi ölçülmüştür İzole edilmiş ve perfüze edilmiş üç insan plasentasında AA'nın *in vitro* transferi ölçüldüğünde AA'nın ortalama plasental penetrasyonunun 5-30 dk'lık perfüzyon sırasında %18,2-23,2 olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın süte geçiş değerlendirmesinde ise AA'nın oral alımdan birkaç saat sonra süte geçtiği bildirilmiştir (Sörgel ve ark., 2002). Günlük 500 mL anne sütü tüketen bir bebeğin, annesinin yüksek oranda AA yüklü gıda tüketmesi

durumunda, AA'ya maruz kalma miktarı yaklaşık 10 µg olabileceği, annenin daha az miktarda patates cipsi yediğinde dahi AA alımının yaklaşık 2 µg olabileceği rapor edilmiştir. Benzer şekilde, doğumdan sonra emzirme döneminde de bebeklerin AA'ya maruziyetlerini devam ettiği rapor edilmiştir (Sörgel ve ark., 2002). Fetüs ve anne kanındaki AA dozlarının birbirine yakın olduğu, kordon kanındaki adukt düzeylerinde gözlenen artışın, gebelik aşamasıyla ilişkili olduğu, kordon kanındaki hemoglobin (Hb) adukt düzeylerinin 3. trimesterdeki fetal maruziyeti temsil ettiğini gösterdiği rapor edilmiştir (von Stedingk, 2011).

AA'nın 3 olası reaktivite yolu vardır:

(i) Radikal aracılı polimerizasyon ile AA poliakrilamide dönüştürülmektedir. Bu işlem oksijensiz ortamda en iyi şekilde gerçekleşmektedir. Ancak bu sürecin AA ile genetik hasar oluşması potansiyeli açısından önemi henüz bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar bu sürecin, sperm hücrelerinin daha az oksijene sahip olması sebebiyle, AA'nın kemik iliği ve germ hücrelerini farklı şekilde etkilemesinin açıklaması olabileceğini düşünmektedir (Dearfield ve ark., 1995). Segal ve ark. (1989) AA'nın risklerinde monomer yapı ile sperm protamini arasındaki doğrudan etkileşimin muhtemel olacağı bildirilmiştir.

(ii) İkinci reaktivite mekanizması Michael reaktivitesidir. α ve β karbonları arasında çift bağa sahip olan Michael bileşikleri ilk kez 1880'lerde tanımlanmıştır. Bu tip kimyasallara tiyol, hidroksi veya amino gruplarının eklenmesi ile olan reaksiyonlara genel olarak 'Michael tipi' reaksiyonlar denmektedir. Bu reaktivite, proteindeki -SH gruplarının alkilasyonu, kromozom kırılması yoluyla genetik hasara yol açabilmektedir. AA, α ve β karbonları arasında çift bağ bulunması nedeniyle, bu kimyasallardan biri olarak kabul edildiğine göre aynı hasarlara yol açabilmektedir (Dearfield ve ark., 1995).

(iii) AA'nın oksitlenmesidir. AA, fare, sıçan ve insanlarda büyük ölçüde glisidamid (GA) olarak adlandırılan 2,3-epoksi propiyonamite oksitlenmektedir. İnsanlarda, alınan bir AA dozunun en az %6'sı epoksit GA'ya dönüştürülmektedir. Bu metabolik aktivasyona öncelikle karaciğerde sitokrom P450 (CYP) 2E1 aracılık etmektedir (Carere, 2006; Kraus ve ark., 2013; Watzek ve ark., 2012). CYP2E1'den yoksun farelerde, AA dozunun oral alımını takiben GA veya GA'dan türetilmiş metabolitlerin oluşmadığı kanıtlanmıştır. Bu da, AA'nın *in vivo* metabolizmasında rol oynayan ana enzimi CYP2E1'in olduğunu göstermektedir (Sumner, 2003). İnsanlarda ise

GA oluşumunun kanıtı, yüksek düzeyde AA'ya maruz kalan işçilerden alınan Hb örneklerinde gösterilmiştir. AA ve GA'nın her ikisi de dokular arasında eşit olarak dağılmıştır ve sıçanlarda yarı ömürleri yaklaşık 5 saattir (Carere, 2006).

AA ve metaboliti GA, SH gruplarından ve N-terminal valinlerin amino gruplarından, Hb ve DNA ile reaksiyona girerek aduktlar oluşturmaktadır (Sörgel ve ark., 2002). Hb-aduktlarının oluşma oranı, alınan AA dozunun yaklaşık %12'sidir (Carere, 2006). AA'nın DNA ile adukt oluşumu yavaş bir şekilde gerçekleşmekteyken GA'nın DNA ile aduktlarının oluşma kapasitesi daha fazla ve hızlıdır (World Health Organization, 2002; Atay ve ark., 2005). AA'ya maruz kalan fare ve sıçanlarda tespit edilen tek adduk, guanin ile GA olduğu bildirilmiştir (World Health Organization, 2002). Bununla birlikte, Çin hamsteri V79H3 hücrelerinde GA-DNA aduktları N7-(2-karbamoil-2-hidroksietil)guanin (N7-GA-Gua) ve N3-(2-karbamoil-2-hidroksietil)adenin (N3-GA-Ade) üretmesine göre GA, AA'dan daha sitotoksik ve klastojeniktir. GA konsantrasyonu ve N7-GA-Gua seviyeleri, doğrusal bir doz-yanıt ilişkisi sunmakta ve N7-GA-Gua seviyeleri ile kromozomal hasar düzeyleri arasında güçlü bir korelasyon olduğu, AA'nın GA tarafından kromozomal hasar ve DNA adukt oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (Xu ve ark., 2014).

AA, Hb N-terminal valini gibi yapısal ve çözünebilir plazma proteinlerinde bulunan tiyol veya amino grupları dahil olmak üzere nükleofilik merkezlere bağlanabilmektedir. Bu aduktların eritrositlerin yaklaşık 3-4 aylık yaşam süresi boyunca birikmektedir. Dolayısıyla, bu reaksiyonlardan oluşan aduktların ölçülmesiyle AA'nın uzun süreli maruziyet biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadır. Buna karşılık glutatyon (GSH) aduktları, merkaptürik asitler olarak bilinen N-asetil sistein tiyoeterlere metabolik işlemlere tabi tutulmaktadır. Bu merkaptürik asitler, maruziyetten sonraki yaklaşık 48 saat içinde idrarla hızla atılmaktadır. Bu nedenle AA'nın kısa süreli maruziyet için biyobelirteçler olarak daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Eisenbrand, 2020).

AA atılımında birinci yol idrar yoludur. Farklı yollar ile AA'ya maruz bırakılan hayvanlarda AA ve türevlerinin yaklaşık %40-70'i idrarda, %5-6'sı dışkıda, %6'sı solunum yoluyla ve %15'i de dışkıda bulunmuştur (Fennell ve Friedman, 2005).

2.1.2. AA Toksisitesi

AA Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından olası insan kanserojeni (sınıf 2A) olarak sınıflandırılmıştır (Soares ve ark., 2015). AA'ya dermal temas veya solunum yoluyla mesleki maruziyet, polimer üretiminde bir ara madde olarak veya AA içeren derz dolgu malzemelerinin kullanımı sırasında potansiyel olarak ortaya çıkabilmektedir. AA içeren bir enjeksiyon maddesi kullanan tünel işçilerinde AA zehirlenmesinin semptomatik yan etkilerinin gözlemlenmesi nedeniyle AA ile ilgili endişeler artmıştır (Sumner, 2003).

AA'nın etki mekanizması: Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, AA'ya maruziyetinin, metabolik analizle belirlendiği üzere lipid metabolizmasını önemli ölçüde değiştirdiği, koenzim A ve GSH sentezini etkileyen pantotenik asit seviyelerinin azalmasıyla yer alıyor; bu da yağ asidi β -oksidasyonunun bozulduğunu ve oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Özellikle izobütiril-L-karnitindeki bir azalma, mitokondriyal β -oksidasyonun bozulduğunu göstermiştir. Dikarboksilik asitlerin yüksek seviyeleri ve sfingosin-1-fosfatın (S1P) azalması, β -oksidasyon süreçlerinde ve sfingolipid metabolizmasında değişiklik olduğunu ve karaciğer fonksiyon bozukluğunun sinyalini verdiğini göstermiştir. Gliserofosfolipid metabolizmasındaki değişiklikler, LysoPC ve LysoPE seviyelerinin azalmasıyla gözlenmiş, bu da karaciğer hasarına işaret etmektedir. Ayrıca, azalan esansiyel omega-3 yağ asitleri DHA (dokosaheksaenoik asit) ve EPA (eikosapentaenoik asit) ile birlikte değişen karaciğer fonksiyon belirteçleri ve lipid profilleri, AA ile ilişkili nörotoksisite potansiyeli anlamına gelmektedir. Çalışmada aynı zamanda sitrik asit seviyelerinin azaldığı vurgulanmış ve bu durum enerji metabolizması üzerine bir etki olduğu ve AA'ya maruz kalma nedeniyle artan oksidatif stres ve karaciğer hasarına işaret ettiği yönünde değerlendirilmiştir. Dolayısıyla da çalışma AA'nın lipid metabolizması, karaciğer ve nörolojik sağlık üzerine karmaşık etkilerinin mekanizmalarını açıklayabilmektedir (Cao ve ark., 2018).

AA, DNA, temel proteinlere ve enzimlere bağlanan, hem somatik hem de germ hücrelerinde kromozomal ve genetik mutasyonlara neden olan biyolojik bir alkilleyici ajandır. AA'nın etkileri, yalnızca mesleki olarak maruz kalan işçiler üzerinden değil aynı zamanda günlük yaşamda da ortaya çıkması ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmıştır. AA, WHO, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve Gıda Tarım Örgütü (FAO) gibi otoritelerin öncelikleri arasında yer almaktadır (Bušová ve ark., 2020).

Bir kohort çalışmada 9 yıl süre ile erkeklerde gıdalarda oluşan AA karsinogenisitesi değerlendirilmiş ve lokalize ve ilerlemiş prostat kanseri vakaları rapor edilmiştir (Virk-Baker ve ark. 2014). Monomer ve polimer AA'ya $<0,1-1,0 \text{ mg/m}^3$ (toplam iş günü ortalaması) konsantrasyon aralığında mesleki maruz kalan 371 çalışanda ölüm oranı incelenmiş ve mortalite düzeylerinde istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiştir. Çalışma verilerine göre ölümlerdeki kanser vakalarında artış olsa da istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiş ve bu artışın daha önce organik boyalara maruz kalan alt gruptaki solunum kanserlerine bağlı olabileceği bildirilmiştir (Sobel, 1986).

EFSA CONTAM Paneli, AA toksisitesinin dört temel sonucunu nörotoksisite, erkek üremesi üzerindeki etkiler, gelişimsel toksisite ve kanserojenlik olduğu belirlemiştir. Benchmark karşılaştırmalı doz (BMD) analizi, nörotoksisite ve karsinogenisiteye ilişkin deneysel veriler kullanılarak yapılmıştır. Nörotoksisite açısından en düşük BMDL_{10} , 2 yıl boyunca içme suyuna maruz kalan erkek F344 sıçanlarında periferik (siyatik) aksonal sinir dejenerasyonu vakalarından elde edilen $0,43 \text{ mg/kg}$ vücut ağırlığı/gündür. EFSA CONTAM paneli aynı zamanda 2 yıl boyunca sürekli olarak AA'ya maruz kalan erkek B6C3F1 farelerinde Harderian bezi tümörlerinin görülme sıklığına ilişkin verilerden elde edilen en düşük BMDL_{10} 'u ($0,17 \text{ mg/kg}$ vücut ağırlığı/gün) seçmiştir (EFSA, 2015).

İki yıl süre ile içme suyundan AA'ya maruz kalan erkek ve dişi B6C3F1 fareleri ile F344/N sıçanlarında karsinogenite değerlendirilmiş, sıçanlarda vücut ağırlıklarında doza bağlı azalma tespit edilirken farelerde de hayatta kalma doza bağlı olarak önemli düzeyde azalmıştır. Histopatolojik incelemede doza bağlı olmak üzere farelerde Harder bezi ve akciğer tümörü, erkek farelerde ön mide tümörü, dişi farelerde meme, over ve deri tümörlerinde, sıçanlarda tiroid tümörlerinde, erkek sıçanlarda testis, kalp ve pankreas tümörlerinde, dişi sıçanlarda klitoral bez, meme, ağız boşluğu ve deri tümör insidanslarında artışlar görülmüştür (Beland ve ark., 2013; Beland ve ark., 2015).

İki önemli rapor, AA'nın sıçanlarda gözlemlenen kanser için insanla ilişkisini ve etki mekanizmasını değerlendirdiğinde sıçanlarda yüksek AA dozlarına oral maruz kalmanın neden olduğu iki ana tümörü saptamıştır. Bunlardan biri tiroid tümörü, diğeri ise tunika vajinalis mezotelyoma olup, Leydig hücreli tümörü düşündürmektedir (Haber ve ark., 2009).

AA ile yapılan *in vitro* çalışmaların neticesinde; AA, memeli gen mutasyon analizlerinde şüpheli, negatif veya zayıf pozitif sonuçlar gösterirken, kromozomal anormallikleri, mikronükleus, SCE, poliploidi, anöploidi ve diğer mitotik bozuklukları indüklemiştir (Carere, 2006). AA ve GA'nın fare lenfoma hücrelerinde klastojenik etkiye neden olduğu bildirilirken GA'nın DNA adukt mekanizması ile mutajeniteyi indüklediği, AA'nın ise GA aduktı haricindeki bir mekanizma ile mutasyoniteyi indüklediği rapor edilmiştir (Mei ve ark., 2010). AA, doğrudan hasar (genotoksik) veya genlerin ekspresyonu değiştirerek (epigenetik) DNA'yı etkileyebilmektedir. Epigenetik değişiklikler doza bağlı olma eğilimindedir ve sıklıkla geri dönüşlüdür (Park ve ark., 2002; Exon, 2006). AA, *Salmonella typhimurium* kullanılarak yapılan Ames testi verilerine göre gen mutasyonlarını indüklememiştir (Shipp ve ark., 2006). Buna karşılık GA, *S. typhimurium* TA15 35 ve TA100'de metabolik aktivasyon (S9 karışımı) varlığına bağlı olmaksızın gen mutasyonlarını indüklemiştir. Çalışmada, AA'nın pozitif mutajenik etki göstermemesinin S9 karışımındaki CYP2E1 eksikliği ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Jagerstad ve Skog, 2005).

AA'nın potansiyel mutajenitesi, L5178Y fare lenfoma hücreleri ve V79 Çin hamsteri hücreleri, Big Blue fare hücreleri ve B6C3F1/Tk fare hücreleri gibi memeli hücre dizileri kullanılarak *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. AA, hipoksantin-guanin fosforibosil-transferaz (HPRT) ve timidin kinaz (TK) lokuslarındaki mutasyon frekanslarında artışa yol açmaktadır (Mei ve ark., 2010; Shipp ve ark., 2006; von Tungeln ve ark., 2012). Ayrıca insan lenfoblastoid TK6 hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda (≥ 10 mM) mikronükleus ve TK testlerinde hafif derecede genotoksik etki göstermiştir (Koyama ve ark., 2006). AA'nın larval beslenme sonrası *Drosophila melanogaster* üzerinde hem somatik mutasyon hem de cinsiyete bağlı resesif mutasyon gösterdiği bildirilmiştir (Dearfield ve ark., 1995).

AA'nın nörotoksitesi: Sinir sistemi, AA için önemli bir hedeftir. AA'ya kronik maruziyet sonrası hafıza, öğrenme ve bilişsel işlevlerle ilgili bazı beyin bölgelerinde periferik sinir ve sinir terminallerinde dejenerasyon gözlenmiştir (Matoso ve ark., 2019). AA'nın nörotoksite ve karsinojenik etkileri için tolere edilebilir günlük alım (TDI) 40 ve 2,6 µg/kg va/gün olarak belirlenmiştir (Mollakhalili-Meybodi ve ark., 2021). İçme suyuyla AA'ya maruz kalan sıçanlarda AA risk değerlendirmesi için yapılan iki çalışmanın sonuçlarına göre periferik nöropati için advers etkinin görüldüğü en düşük

seviye (LOAEL) 2 mg/kg/gün ve hiçbir advers etkinin görülmediği en yüksek seviye (NOAEL) 0,5 mg/kg/gün olarak bildirilmiştir (World Health Organization, 2002; Johnson ve ark., 1986).

Tünel işçilerinin AA ve N-metilolakrilamid içeren derz dolgu maddesine mesleki maruziyet durumunda hafif ve geri dönüşlü periferik sinir sistemi semptomları gözlenmiştir (Friedman, 2003). AA yüksek dozlarda sıçanlarda arka bacak felcine ve periferik nöropatiye neden olmuştur (Jin ve ark., 2008). Periferik sinir semptomlarının şiddeti ile Hb aduktalarının seviyeleri arasında doza bağlı ilişki olduğunu düşündüren korelasyon bulunmuştur (Rifai ve Saleh, 2020).

AA'ya maruz bırakılan sıçanlarda serebellar Purkinje hücre hasarı ve distal aksonların bozulması ile terminal sinirlerin bozulmasını takiben bilişsel işlevlerin bozulmasına ve serebral korteks, talamus ve hipokampusta hasara yol açtığı bildirilmiştir (Parzefall, 2008). Kedi, sıçan, fare, kobay, tavşan ve maymunlar üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde AA'ya maruziyet sonrası ataksi, arka bacaklarda anormal konumlandırma ve iskelet kası zayıflığı rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada, sıçanların primer astrositlerinde AA'nın neden olduğu apoptozun, BV-2 mikrogial hücrelerinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve apoptozla sonuçlandığını göstermiştir (Zamani, 2017). AA'ya maruz kalma sinir terminali hasarına neden olduğundan, AA'nın belli popülasyonlarda Alzheimer gelişimindeki artışa katkıda bulunabileceği varsayılmıştır (Pruser ve Flynn, 2011).

AA sinirlere iki olası mekanizma yoluyla zarar verebilir: (i) sinir hücreleri arasında sinyallerin taşınmasından sorumlu olan sinir liflerindeki kinesin ile ilgili motor proteinlerini bozmaktadır. Bu bozulma, sinir hücreleri içindeki önemli moleküllerin hareketini yavaşlatarak sinir hasarına yol açabilmektedir. (ii) AA'nın sinir uçlarında sinir hücresi keseciklerinin hedef zarlarıyla birleşme sürecine müdahale etmesidir. Bu süreç başarısız olduğunda nörotransmitterlerin salınımı azalır ve sinir uçlarının bozulmasına neden olmaktadır (Exon, 2006).

AA'nın immünotoksitesi: Dişi BALB/c farelerinde yapılan bir çalışmada AA'nın nihai vücut ağırlığını, dalak ve timus ağırlıklarını ve lenfosit sayılarını azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca lenf bezleri, timus ve dalakta patolojik değişiklikler izlenmiştir. AA'nın kan lenfositlerinde %T lenfosit hücrelerini ve doğal öldürücü hücreleri (NK) de önemli ölçüde azaltabileceği bildirilmiştir (Fang ve ark., 2014).

AA'nın hepatotoksitesi: AA ve GA'nın erkek fare karaciğeri üzerindeki toksik etkileri incelendiğinde, histopatolojik bulgular her iki maddenin de oksidatif hasara neden olduğunu göstermiştir. GA ve AA maruziyeti, oksidatif hasar, kanser ve inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir. Buna karşılık, anti-apoptoz, tümör baskılanması ve yağ asidi sentezine bağlı genlerin ifadesinde bir düşüş kaydedilmiştir. Her iki madde de karaciğer tümörü baskılayıcı Bcl2'nin ekspresyonunu azaltırken, kansere bağlı genler Rad51 ve EGFR proteininin ekspresyonunu arttırmıştır (Chen ve ark., 2018).

Yetişkin sıçanlar 21 gün süre ile yüksek AA dozuna (25 mg/kg/gün) maruz bırakıldıklarında karaciğer GSH seviyelerinde ve genel antioksidan kapasitesinde önemli bir azalmaya yol açmıştır. AA uygulaması ayrıca aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz gibi çeşitli karaciğer enzimlerinin seviyelerinin düşmesine ve süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerinin azalmasına yol açmıştır (Gedik ve ark., 2017). AA'ya maruziyet, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol seviyelerinde azalmanın yanı sıra toplam kolesterol, trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol düzeylerinde artışa neden olmuştur (Ghorbel ve ark., 2017). Zebra balığında yürütülen bir çalışmada, AA içeren suya maruziyetleri, 26 saat içinde akut ölümlere yol açmıştır. Bu akut maruziyeti, kan şekeri seviyelerinde, trigliseritlerde, hepatik inflamasyonda ve karaciğerde yağ birikiminde dikkate değer değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Kim ve ark., 2015).

İçme suyunda AA ve GA'a maruz bırakılan erkek transgenik farelerde hepatik mitokondriyal fonksiyon ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler incelendiğinde mitokondri ile ilişkili genin transkripsiyonel profili, 3- β -hidroksisteroid dehidrojenaz ailesi genlerinde önemli düzeyde aşağı regülasyon tespit edilmiştir. Ayrıca lipid metabolizması ile ilişkili genler de AA ve GA tarafından değiştirilmiştir. Oksidatif fosforilasyonla ilişkili genlerin, özellikle yüksek adenin tri fosfat (ATP) seviyeleri ile ilişkili olan ve AA'ya maruziyet sırasında karaciğerde artan bir enerji ihtiyacına işaret eden ATP sentaz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde indüklemiştir. AA ile muamele edilen fareler, azalmış GSH seviyeleri ile bağlantılı olarak önemli ölçüde daha yüksek glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi göstermiştir ki bu durum AA'nın karaciğerde GSH ile konjugasyon oranının artması ile ilişkilidir (Lee, 2012).

AA'nın tiroid hormonları üzerine etkileri: Erkek F344 sıçanlarına 14 gün süresince içme suyu ile 50 mg/kg/gün dozda AA verildiğinde serum T4 seviyeleri önemli ölçüde düşmüştür. Ancak daha düşük AA dozlarında (2,5 veya 15 mg/kg/gün) serum T4 veya TSH düzeyleri etkilenmemiştir. Yüksek AA dozlara maruziyette hipofiz bezinin daha fazla TSH salgılamasına neden olan T3 veya T4 seviyelerinin azalmasıyla tetiklenebileceği ve zamanla da bu durumun tiroiddeki hücre büyümesini artırabileceği ve potansiyel olarak tümörlere yol açabileceği bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2018).

Fischer 344 dişi farelerde 2 gün süreli akut AA uygulamasının ardından plazma T4, tiroid uyarıcı hormon (TSH) ve prolaktin serum seviyeleri ile hipofiz bezindeki TSH ve prolaktin içeriğinde önemli düzeyde değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, 7 günlük maruziyet sonrası, plazma T4 seviyesinde doza bağlı hafif artış ve TSH serum konsantrasyonunda düşüş olmuştur. Tiroid bezinin morfolometrik analizi, AA'ya maruz kalan farelerin kolloidal alanında önemli bir azalma ve foliküler hücre yüksekliğinde bir artış olduğunu göstermektedir (Matoso ve ark., 2019).

AA'nın endokrin sistem üzerine toksisitesi: AA'nın insanlarda üreme toksisitesine ilişkin herhangi bir vaka bildirilmemiştir. Ancak deney hayvanlarında yüksek dozda AA'nın üremeye zarar verdiği ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Çeşitli doz ve sürelerde AA'ya maruz kalma durumunda fertilitede azalma, yavru boyutlarında küçülme, düzensiz sperm morfolojisi, düşük sperm sayısı, çiftleşme aktivitesinde azalma ve testis ağırlığında azalma olduğu görülmüştür (Zamani, 2017). Yilmaz ve ark. (2017) tarafından AA ve GA'nın fare Leydig (TM3) ve Sertoli hücreleri (TM4) üzerinde etkisi incelendiğinde hücre canlılığında azalma, oksidatif stres ve apoptoz indüksiyonu bildirilmiştir.

AA'nın kemirgenlerdeki germ hücrelerinde daha fazla DNA hasarına neden olduğu bildirilmiş, ancak AA'nın DNA'ya doğrudan zarar vermediği belirtilmiştir. AA kinesin motor proteinlerine müdahale edebilir ve bu proteinler hücre bölünmesinde, özellikle kromozomların doğru şekilde hareket etmesine ve ayrılmasına yardımcı olan iğ liflerinin oluşturulmasında rol oynamaktadır. Kinesin motor proteinlerinin düzgün çalışmaması halinde hücre bölünmesi sırasında DNA'nın dağılımında hatalar gözlenebilmektedir. Ayrıca, AA spermdeki protaminleri de değiştirdiği için sperm DNA'sı etkilenebilmektedir (Exon, 2006).

AA'nın zararlı etkileri iki yolla olabilmektedir; birincisi spermatid protaminlere bağlanarak baskın ölüme neden olabilmekte ve sperm morfolojisini olumsuz

etkileyebilmektedir. İkinci yol ise motor proteinlerine bağlanarak aksonların distal kısmına zarar verebilir ki bu hasar arka bacaklarda zayıflık gibi semptomlara yol açabildiğinden çiftleşmeyi ve sperm hareketini olumsuz şekilde etkileyebilmektedir (Tyl ve Friedman, 2003).

AA ile *in vivo* akut maruziyet durumunda seminal veziküllerde gözle görülür değişiklikler ve fetal kayıplarda önemli artışlar gözlenmiş ve bu durum gebeliklerin ciddi oranda sonlanmasına neden olmuş, ancak, sperm fonksiyonuna ve dölleme yeteneğinde azalmaya neden olmadığı bildirilmiştir (Skerrett-Byrne ve ark., 2021).

AA'ya maruz kalan dişilerden elde edilen yavruların, maruz kalmayan erkeklerle çiftleştirildiğinde, gecikmiş bir vajinal açılma sergilediği ve bu durumun östrojen/progesteron dengesinde potansiyel değişikliklere işaret ettiği gözlenmiştir (Shipp ve ark., 2006). Wei ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada AA dişi farelerde üreme sistemi üzerine olumsuz etki göstermiş, vücut ve organ ağırlıklarında azalma, korpus lutea sayısında azalma, serum progesteron seviyelerinde doza bağlı azalma tespit edilmiştir.

Doğum öncesi AA'ya maruz kalan yenidoğan domuzların övenlerinde foliküler atrezi üzerine etkiler araştırılmış ve vimentin filamentlerinin süreçteki rolü vurgulanmış, oosit apoptozunun foliküler atreziyi tetikleyerek over folikül sayısını azalttığı vurgulanmıştır. AA indüklü apoptozun vimentin filamentlerinin bozulmasıyla bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Hułas-Stasiak ve ark., 2013).

Annenin AA tüketimi ile anne ve yenidoğan cinsiyet hormonu düzeyleri arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada gebelik sırasında AA alımı değerlendirilmiş, anne serumunda östradiol, estriol ve testosteron konsantrasyonları ölçülmüş, AA alımının artması ile doğumda göbek kordonunda yüksek ES düzeylerinin gözlemlendiği bildirilmiş, ancak, AA alımı ile annenin kanındaki hormon düzeyleri arasında herhangi bir bağlantı bildirilmemiştir. Çalışmada AA alımı ile baş çevresi arasında da pozitif bir ilişki gözlenmiştir (Nagata ve ark., 2019).

Diyetle AA alımı ile endometrial kanser riski arasındaki ilişkinin nicel bir değerlendirmesini sağlamak için retrospektif kohort çalışmalarının bir meta-analizi yapıldığında endometrial kanser riski, genel olarak diyetle AA alımıyla ilişkili olduğunu görülmüştür. Bununla birlikte, hiç sigara kullanmayan kadınlar arasında, yüksek oranda

AA diyeti tüketen kadınlarda endometrial kanser riski önemli ölçüde artmıştır (Je, 2015). Bir başka çalışmada, AA alımı ile endometriyal kanser riski, özellikle de tip I endometriyal kanser riski arasındaki ve özellikle hiç sigara içmeyen veya oral kontraseptif kullanmayan kadınlar arasındaki ilişkiyi araştırılmıştır. Diyet AA'sı ile genel veya tip I endometrial kanser riski arasında anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır. Ancak sigara içmeyen veya oral kontraseptif kullanmayan kadınlarda tip I ile gözle görülür bir bağlantı görülmüştür (Obo'n-Santacana ve ark., 2014). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir diğer çalışmada, sigara içmeyen 768 postmenopozal kadında AA veya GA'nın Hb aduktları ile endometriyal kanser veya tip I endometrial kanser riski arasında gözlemlenen bir ilişki olmadığı bildirilmiştir.

Menopoz sonrası kadınlarda diyetle alınan AA'nın over kanseri riski ile ilişkisini inceleyen bir çalışmada, AA metabolizması ve AA'nın kansere yol açabileceği olası yollarla ilgili genlerde genetik değişiklikleri ele alınmış, 57 SNP (tek nükleotid polimorfizmi) ve 2 gen delesyonu incelenmiş, ancak, herhangi bir istatistiksel anlamlı etkileşim bulunmamıştır. Çalışmada AA'nın cinsiyet hormonları üzerindeki etkileri nedeniyle over kanserine yol açabileceği vurgulanmıştır (Hogervorst ve ark., 2017). Bununla birlikte AA alımı ile cinsiyet hormonları arasında, endometriyal, over ve meme kanserinde gözlenen artan risklere kesin biyolojik bir ilişki açık olarak gösterememekle yanı sıra AA ve cinsiyet hormonları arasındaki ilişki, menopoz ve aşırı kilo durumuna göre farklılık gösterebileceği bildirilmiştir (Hogervorst ve ark., 2013a).

Postmenopozal kadınlarda tanı öncesi AA maruziyetinin meme kanseri vakalarında mortalite ile ilişkili olup olmadığını değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada tanı öncesi meme kanseri hastalarının AA'ya maruziyetlerinin mortalite ile ilişkili olabileceği ve özellikle endokrin ile ilişkili meme kanseri tiplerini ilgilendirebileceği vurgulanmıştır (Olsen ve ark., 2012). Aksine, diyetle AA alımı ile invaziv meme kanseri insidansı arasındaki ilişkinin incelendiği kohort çalışmasında 17 yılı aşkın bir takip süresince meme kanseri risk faktörlerini kontrol eden çok değişkenli analizlerde, uzun süreli AA alımı ile genel olarak veya östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü durumu ile meme kanseri riski arasında istatistiksel anlamlı ilişki gözlenmemiştir. AA alımı ile meme kanseri riski arasındaki ilişki, sigara içme durumuna göre farklılık göstermemiştir (Larsson ve ark., 2009). Benzer şekilde, menopoz öncesi kadınlar arasında AA alımı ile meme kanser riski arasındaki ilişki incelenmiş, AA

maruziyeti ile tümör oluşumu arasında sigara içme ve östrojen ve progesteron reseptör durumu arasında ilişki gözlenmemiştir (Wilson, 2009).

AA maruziyeti ile ES arasındaki ilişkinin incelenmesi, literatür verilerinde henüz netlik kazanmamış olmasından dolayı oldukça önem taşımaktadır. AA'nın hormonal denge, özellikle de ES üzerindeki etkilerinin sağlık sonuçları üzerinde potansiyel etkileri söz konusudur. Gebelik sırasında yüksek AA alımıyla bağlantılı olarak yenidoğanlarda yüksek ES seviyeleri, AA ile hormon seviyeleri arasındaki doğrudan etkileşimi vurgulamaktadır. Ayrıca, AA'ya maruz kalan dişilerin yavrularında östrojen/progesteron dengesinde gözlenen değişiklikler, bu maruziyetin potansiyel üreme yansımalarına işaret etmektedir. AA alımı ile over ve endometriyum gibi bazı kanserlerin oluşum riski arasındaki bağlantı henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamışken, ES ile bu kanser türleri arasındaki bilinen etkileşimler, AA-östradiol ilişkisinin anlaşılmasının kritikliğini vurgulamaktadır. ES'nin üreme sağlığı, büyüme ve çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığı göz önüne alındığında, AA'nın seviyeleri üzerindeki etkisinin anlaşılması, AA'nın daha geniş sağlık etkileri hakkında fikir verebilmektedir.

2.2. Cinsiyet Hormonları ve ES

Östrojenin temel formu olan ES'ye yüksek düzeyde maruziyet cinsiyet hormonlarının dengesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Yüksek ES seviyeleri hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenini üzerinde bir inhibisyona neden olmaktadır (Smit ve ark., 2005a). Bu inhibisyon, hipotalamustan gonadotropin salgılayan hormonun (GnRH) salgılanmasının azalmasına ve ardından hipofiz bezinden folikül uyarıcı hormonun (FSH) ve luteinize edici hormonun (LH) salınımında azalmaya yol açmaktadır. FSH ve LH seviyelerindeki düşüş, foliküler gelişim, yumurtlama ve spermatogenezde aksamalar da dahil olmak üzere over ve testis fonksiyonlarının değişmesine neden olabilmektedir. Ayrıca, yüksek ES seviyeleri diğer seks steroidlerinin biyosentezini ve metabolizmasını etkileyerek genel hormonal dengeyi ve libido, üreme sağlığı ve ikincil cinsel özellikler gibi fizyolojik süreçleri etkileyebilmektedir (Herbison, 2015).

Menopoz öncesi kadınlarda östrojen üretimi öncelikle overde gerçekleşmekte, başlangıç molekülü olarak kolesterol kullanılarak çeşitli dönüşüm adımlarını içermektedir (Simpson, 2003; Miller, 2013; Payne ve Hales, 2004). Aromataz enzimi (CYP19A1), androstenedionu kadınlarda ana östrojen tipi olan estrona dönüştürmektedir (Simpson ve ark., 2002). Bu süreç, hipotalamustan GnRH salgılayan hormonu nedeniyle salınan LH

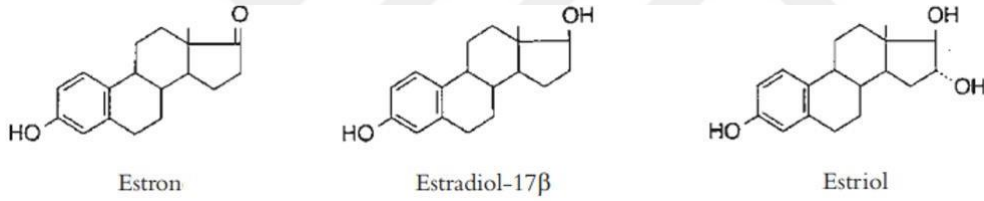
ve FSH gibi hormonlar tarafından kontrol edilmektedir (Plant ve Marshall, 2001). Östrojenler hem erkeklerde hem de kadınlarda çok sayıda fizyolojik fonksiyonu etkileyen temel hormonlardır (Şekil 2-4). Kadınlarda ikincil cinsel özelliklerin gelişimini, adet döngüsünün düzenlenmesini ve hamileliğin sürdürülmesini sağlamaktadır (Hewitt ve Korach, 2003). Menopoz sonrası kadınlarda östrojen üretimi, over aktivitesinin durması nedeniyle esas olarak yağ gibi dokulara doğru hareket etmektedir (Simpson, 2003). Her ne kadar kolesterol ile başlasa da süreç daha çok adrenal bezler gibi dokulara dayanır ve vücut ağırlığı gibi faktörlerden etkilenmektedir (Bulun ve ark., 2009; Labrie, 2015; Davis ve ark., 2012; Janssen ve ark., 2010). Erkeklerde östrojen, yağ, kemik ve testis gibi dokularda bulunan aynı aromataz enzimi (CYP19A1) yoluyla androjenlerin östrojen formlarına dönüştürülmesiyle yapılmaktadır (Roth ve ark., 2008). Erkeklerde östrojen üretimi, başta testislerde olmak üzere çeşitli dönüşümlere uğrayan kolesterol ile başlamakta ve hipotalamus ve hipofiz bezi tarafından düzenlenmektedir (Miller, 2013; Carreau ve ark., 2003; Plant ve Marshall, 2001). Kadınlara göre daha az miktarlarda üretilmesine rağmen erkeklerde de östrojen kemik sağlığını, libidoyu ve potansiyel olarak bilişsel yetenekleri etkilemektedir (Finkelstein ve ark., 2013).

Literatür verilerine göre; eş zamanlı aromataz indüksiyonu ve AA'ya maruziyeti, endokrin bozulması ve ilgili sağlık sonuçları açısından yüksek bir risk oluşturabilmektedir. Aromataz, androjenlerin östrojenlere dönüşümünde rol oynamakta ve indüksiyonu vücutta östrojen seviyelerinin artmasına neden olabilmektedir. Yüksek östrojen seviyeleri, meme kanseri, endometriozis ve diğer östrojene bağımlı hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi durumla ilişkilendirilmiştir. Öte yandan AA potansiyel kanserojen özelliklere sahiptir. Aromataz indüksiyonu ve AA'ya maruziyeti nedeniyle artan östrojenin birleşik etkisi, hormonla ilişkili kanserler ve diğer bozuklukların riskini arttırabilmektedir.

Östrojenler her iki cinsiyet için de iskelet bütünlüğünü desteklemek (Riggs, 2000) yanı sıra kardiyovasküler etkileri de vardır. Özellikle arteriyel elastikiyetin korunması, menopoz öncesi kadınlarda kardiyovasküler hastalık görülme sıklığının azalmasına neden olmaktadır (Mendelsohn ve Karas, 1999). Menopoz sonrası hormonun azalması kardiyovasküler riskleri arttırmaktadır (Newson, 2018). Östrojenler aynı zamanda bilişsel ve duygusal beyin fonksiyonlarını da etkilemekte ve Alzheimer gibi hastalıklara karşı koruma sağlayabilmektedir (Vina ve Lloret, 2010). Adet döngüsü, menopoz, yaşam tarzı,

obezite ve yaşlanma gibi faktörler kadın ve erkeklerde östrojen düzeylerini değiştirebilmektedir (Hale ve Burger, 2009; Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative Group. 2003; Finkelstein ve ark., 2013; Roth ve ark., 2008). Prostat kanseri tedavilerinde kullanılan onadotropin salgılayan hormon agonist ilaçları, aromataz enzimini hedef alarak östrojeni azaltabilmektedir (Badawy ve ark., 2012; Smith ve ark., 2005).

Östrojenik hormonlar, A halkasında fenolik yapıya sahip C18 steroidleridir. En güçlü insan östrojeni, 17 β konumunda, yani steroid iskeletinin sert düzleminin üzerinde bir hidroksi grubuna sahip olan ES'dir (Kuhl, 2005) (Şekil 2-2). ES'nin önemi ve oral kontraseptifler ve hormon replasman tedavileri de dahil olmak üzere çok sayıda farmasötik formülasyondaki varlığı nedeniyle, kadın sağlığı yönetiminde temel rolünü kanıtlayan bir östrojenik bileşik olarak çalışma için seçilmiştir.



Şekil 2-4: Östrojenlerin yapısal formülleri (Kuhl, 2005).

ES biyosentezi, steroidojenik yolda bir dizi enzimatik dönüşüme uğrayan kolesterol ile başlamaktadır. Overde kolesterol, CYP450'nin enzimatik etkisiyle pregnenolona, pregnenolon progesterona, ardından da progesteron 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β -HSD), 17 α -hidroksilaz/17,20-liyaz (CYP17A1) ve 17 β -hidroksisteroid dehidrogenazı (17 β -HSD) içeren bir dizi enzimatik yolla androstenediona dönüştürülmekte olup son adım androstenedionun aromataz (CYP19A1) enzimi ile estrona ve ardından 17 β -HSD ile ES'ye indirgenmektedir (Miller, 2013; Simpson, 2003). Kadınlarda over ve erkeklerde testisler tarafından üretilmekte ve ikincil cinsel özelliklerin gelişmesinden, kemik sağlığının korunmasından ve adet döngüsünün düzenlenmesinden sorumludur (Zhang ve ark., 2017).

ES'nin fonksiyonları özetle;

- Kemik büyümesini desteklemekte, kemik yoğunluğunu korumakta ve osteoporozun önlenmesine yardımcı olmaktadır. Menopoz sonrası düşük ES seviyeleri osteoporoz riskini artırabilmektedir (Riggs, 2000).

- Kan basıncı için hayati önem taşıyan arter duvarının elastikiyetine yardımcı olarak kalbe ve arterlere fayda sağlamaktadır. ES'ye bağlı menopoz öncesi kadınlar genellikle aynı yaştaki erkeklere göre daha düşük kardiyovasküler hastalık riskine sahiptir (Mendelsohn ve Karas, 2005).

- Ruh halini, hafızayı ve zihinsel süreçleri etkilemektedir. Bilişsel işleve, belleğe ve ruh hali dengesine katkıda bulunan nöroprotektif özelliklere sahiptir (Hogervorst, 2013b; Luine, 2014; Galea, ve ark. 2017).

- Vücut yağ dağılımını ve metabolizmasını etkiler ve HDL seviyesini yükseltip LDL seviyesini düşürerek kolesterolü etkilemektedir (Blüher, 2019; Walsh ve ark., 1991).

- Bağışıklık hücresi fonksiyonunu, sitokin üretimini ve genel bağışıklığı etkileyerek doğuştan ve edinilmiş bağışıklık tepkilerini modüle etmektedir (Klein ve Flanagan, 2016; Straub, 2007).

- İdrar yollarının sağlığını ve işlevselliğini desteklemektedir. ES'deki değişiklikler enfeksiyonlar da dahil olmak üzere idrar sorunlarına yol açabilmektedir (Robinson ve Cardozo, 2003).

- Cilt kalınlığı, nemi ve elastikiyetini artırır, yara iyileşmesini hızlandırmakta ve muhtemelen yaşlanmaya karşı koruma sağlayarak cilde fayda sağlamaktadır. Özellikle cilt yaşlanması için çok önemli olan kolajen üretimini etkilemektedir. Menopoz sonrası kadınlarda ES'deki düşüş, cilt kolajeninin azalmasıyla ilişkilidir (Thornton, 2002; Affinito ve ark., 1999).

- Özellikle ES, bilişsel işlevler üzerinde karmaşık etkilere sahiptir ve potansiyel nöroprotektif özellikler göstermektedir. Menopoz sonrası kadınlarda bilişsel sağlık üzerindeki olumlu etkisi belirlenmiş (Gleason ve ark., 2015) ve nörolojik fonksiyondan ziyade nöroproteksiyonda daha güçlü bir rol oynadığı öne sürülmektedir (Engler-Chiurazzi, ve ark., 2017). ES'nin beyin dopamin sistemi ile etkileşimi, özellikle Parkinson hastalığı bağlamında, östrojen reseptörlerinin nigrostriatal dopamin

sistemindeki potansiyel terapötik rolünü vurgulamaktadır (Morale ve ark., 2006). Ayrıca, nöron plazma zarlarındaki östrojen sinyali, fizyolojik, patolojik ve terapötik etkileri vurgulanmıştır (Lopez ve Tena-Sempere, 2015). Ancak ES ile demans riski arasındaki bağlantı, ES kullanımı ve demansla ilişkisi hâlâ tartışmalıdır (Shao ve ark., 2012; Shumaker ve ark., 2004).

ES, çeşitli terapötik farmasötik preparasyonlar halinde formüle edilmiş güçlü ve yaygın bir endojen östrojendir. Uygulamaları, özellikle kadın sağlığında olmak üzere çeşitli tıbbi endikasyonları kapsamaktadır:

- Oral kontraseptif: ES, progesteron ile birlikte, progestinin over-hipofiz-over eksenini üzerindeki baskılayıcı etkisini arttırmak için oral kontraseptif kullanılmaktadır (Stanczyk ve ark., 2013).
- Menopozal hormon replasmanı: Sıcak basması ve ruh hali değişimleri gibi menopoz semptomlarını hafifletmektedir. Progesteronlarla birlikte endometriyal hiperplaziyi ve kanser risklerini azaltmaktadır (Al-Safi ve Santoro, 2014)
- Vulvovajinal atrofi tedavisi: Topikal ES uygulamaları, vajinal rahatsızlık ve idrar yolu sorunları dahil genitoüriner menopoz semptomlarını tedavi etmektedir (North American Menopause Society, 2013).
- Osteoporozun önlenmesi: Kemik yoğunluğunu korumak ve menopoz sonrası kadınlarda osteoporozun önlenmesine yardımcı olmak kullanılmaktadır (Rizzoli ve ark., 2010).
- Hipogonadizm tedavisi: Menopoz öncesi kadınlar için östradiol, östrojen eksikliğine bağlı over yetmezliği ve Turner sendromu gibi durumları gidermektedir (Klein ve Phillips, 2019).
- Transseksüel hormon tedavisi: Trans kadınlarda östradiol, dişileştirici hormon tedavisinin bir bileşenidir ve ikincil cinsel özelliklerin büyümesini kolaylaştırmaktadır (Hembree ve ark., 2017).
- *In vitro* fertilizasyon: Endometriyumun implantasyona hazırlanması için kontrollü over hiperstimülasyon protokollerine yardımcı olmaktadır (Homann ve ark. 2003).

- Prostat kanseri tedavisi: Prostat kanseri tedavilerinde testosteronu baskılamak için kullanılan yüksek doz ES tedavisinin, kardiyovasküler yan etki riskleri nedeniyle kullanımı azalmıştır (Ockrim ve ark., 2006).

Çevredeki birincil ES kaynakları, insan ve hayvanlardan atılımdır. İdrar ve dışkıda bulunan ES de dahil olmak üzere doğal ve sentetik östrojenler, kanalizasyon sistemine girer ve sonunda suya karışmaktadır. Uygun olmayan şekilde atılan östrojen içeren ilaçlar ve kişisel bakım ürünleri, ES'nin çevresel yükünü artırır (Khanal ve ark., 2006). Yüzey suyu, yeraltı suyu ve hatta içme suyu gibi çevresel matrislerde ES'nin tespit edildiğini bildirilmiştir. ES küresel olarak farklı çevresel matrislerde yaygın olması sebebiyle araştırma ve izlemenin artırılması gereği vurgulanmaktadır (Liu ve ark., 2011).

Çevrede ES varlığının çeşitli potansiyel sonuçları vardır. İlk olarak, suda yaşayan organizmaların üreme sağlığını etkileyebilmektedir. Örneğin, ES'ye maruz kalma, erkek balıklarda dişileşme ile ilişkilendirilmiştir, bu da çarpık cinsiyet oranlarına ve nihayetinde popülasyon düşüşüne yol açmaktadır (Jobling ve ark., 2006; Nash ve ark., 2004). İçme suyunda ES'ye uzun vadeli, düşük düzeyde maruz kalmanın potansiyel insan sağlığı etkileri tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte hormonun endokrin sistem üzerindeki bilinen etkileri göz önüne alındığında daha fazla araştırma yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2009).

ES, çok düşük konsantrasyonlarda dahi suda yaşayan türlerin üremesi ve hayatta kalması üzerinde güçlü etkiler göstermektedir. Balıklarda, ES'nin cinsiyet oranını dişilere doğru eğilimerek cinsiyet değişimine neden olduğu gösterilmiştir (Länge ve ark., 2001). Bunun nedeni, ES'nin endojen hormonları taklit edebilmesi ve bu organizmalarda endokrin sistemin normal işleyişini bozabilmesidir. Balıklarda gözlemlenen diğer etkiler arasında doğurganlığın bozulması, anormal gonadal gelişim ve zayıflamış bağışıklık sistemleri nedeniyle hastalığa karşı artan duyarlılık yer almaktadır (Desbrow ve ark., 1998; Hinfray ve ark., 2006).

İnsan sağlığı üzerine potansiyel etkileri için çevredeki ES'yi belirli sağlık sorunlarıyla ilişkilendiren doğrudan kanıtlar sınırlı olsa da endişe verici olabileceği bildirilmektedir. Östrojenik bileşiklere kronik, düşük dozda maruz kalmanın, meme kanseri gibi hormona bağlı kanserlerin yanı sıra üreme bozuklukları ve nörogelişimsel sorunların gelişimine katkıda bulunabileceğini öne süren araştırmalar yapılmıştır (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2009; Rochester, 2013).

2.2.1. ES Farma/Toksikokinetiği

ES'nin transdermal yoluyla uygulanması, menopoza sonrası kadınlarda semptomları hafifletmek için sıklıkla kullanılan hormon replasman tedavisi için avantajlı bir tedavi yöntemidir (Kuhl, 2005). Farmakokinetik profili dikkate alındığında, transdermal olarak uygulandığında ES'in biyoyararlanımı, oral uygulamaya kıyasla önemli ölçüde üstündür, daha kararlı ES seviyelerine katkıda bulunmakta ve oral dozlama ile ilişkili dalgalanan konsantrasyonların yaygın sorununu önlemektedir (O'Connell, 1995). Transdermal olarak ES, spesifik formülasyona ve uygulama yöntemine bağlı olarak, uygulanan dozun yaklaşık %20-100'ü doğrudan kan dolaşımına salınmaktadır (Kuhl, 2005; Sitruk-Ware ve ark., 2007).

ES vajinal tablet veya krem şeklinde uygulandığında hızla emildiğini ve birkaç saat içinde pik seviyelere ulaştığını bildirilmiştir. Hepatik ilk geçiş metabolizması nedeniyle sistemik biyoyararlanım düşük kalsa da vajinal dokuda yeterli konsantrasyonlara ulaşılmakta ve hedeflenen terapötik etkiler sağlanmaktadır (Notelovitz ve ark., 2002). Emilim hızı, spesifik formülasyon, emilim arttırıcıların varlığı ve vajinal pH ve mikrobiyotadaki bireysel farklılıklar gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Sturdee ve Panay, 2010). ES'nin vajinal uygulaması, özellikle vajinal kuruluk ve dispareni gibi menopozal ürogenital semptomlar için lokal bir tedavidir (Notelovitz ve ark., 2002). Vajinal uygulamada, ES'YE sistemik maruziyeti azaltabilen ve dolayısıyla ilişkili sistemik yan etkileri en aza indirebilen ilk geçiş metabolizmasını atlamaktadır (Santen ve ark., 2015).

ES nazal yoldan uygulandığında maksimum plazma konsantrasyonuna hızlı bir şekilde ulaşılması, hızlı dağılım ve kısa emilim yarı ömrü ile karakterize edilen bir farmakokinetik profildir. ES çözeltisi içeren burun spreyi formülasyonu menopoza semptomlarını azaltmak için kullanılmaktadır (Dooley ve ark., 2001).

ES, çeşitli fizyolojik bariyerlere yüksek düzeyde geçebilmektedir. Lipofilik bir bileşik olarak, hedef dokulardaki hücre içi reseptörlerle etkileşime girmek için hücre zarları boyunca hızla yayılmaktadır (Österlund, 2000). Dolaşımdaki ES'nin önemli bir oranı, öncelikle cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) ve albümin olmak üzere plazma proteinlerine bağlanmakta, yaklaşık %1-2'si bağlanmamış veya serbest kalmaktadır (Södergard, 1982). Bu serbest formu biyolojik olarak aktiftir ve kan-beyin bariyerini geçerek sinirsel süreçleri etkileyebilmekte ve sinir iletimini modüle

edebilmektedir (Brinton ve ark., 2008). ES plasenta bariyerini geçebilmekte, ancak, bu geçirgenliğin kesin boyutu gebelik yaşı ve hormon konsantrasyonu dahil birçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (Petraglia ve ark., 1996).

Oral yoldan alınan ES, kapsamlı ilk geçiş metabolizmasına maruz kalmakta ve farklı biyolojik aktivitelere sahip birkaç metabolitin oluşmasına yol açmaktadır (Kuhl, 2005). Gastrointestinal kanalda emilmekte ve portal ven yoluyla karaciğere taşınmaktadır. Karaciğerde, biyoyararlanımını ve güvenlik profilini değiştiren önemli bir metabolizmadan geçmektedir (Davey, 2018; Cui ve ark., 2013). Oral yoldan uygulanan ES'nin biyoyararlanımı ilk geçiş metabolizması nedeniyle genellikle diğer uygulama yollarına kıyasla daha düşüktür ve tahminler tipik olarak %10'un altındadır (Davey, 2018). Metabolizmanın ardından, ES'nin birincil metaboliti olan estron, ES'nin karaciğerde estrona dönüştürülmesi nedeniyle ES'ye göre daha yüksek konsantrasyonlarda dolaşabilmektedir (Simpson ve ark., 2002). ES oral alındığında hızlı bir şekilde emilmekte ve doza bağlı olarak dolaşımda farklı seviyelere ulaşmaktadır. ES ile 2 mg'lık doz sonrası 6-10 saat içinde 30-50 pg/mL'lik pik plazma seviyeleri görülmüştür (Stanczyk ve ark., 2013).

ES'nin oksidatif metabolizmasında iki ana geri dönüşümsüz faz 1 metabolik reaksiyonu vardır. İlk yol, A halkasının C2 veya C4'te hidroksilasyonunu içermektedir. Bu da katekolestrojenlerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla bu katekolestrojenleri DNA aduktları oluşturabilmekte ve oksidatif DNA hasarına yol açan mutajenik kinonlara oksitlenebilmektedir (Sampson ve ark., 2017). Karaciğerde ES'nin yaklaşık %80'i 2-hidroksiestradiole ve %20'si 4-hidroksiestradiole dönüştürülmektedir. CYP1A1, CYP1A2 ve CYP3A4 enzimleri temel olarak 2-hidroksilasyondan sorumluyken, CYP1B1 ve CYP3A5'in rolleri ES 4-hidroksilasyonundadır. Hidroksilasyondan sonra meydana gelen katekolestrojenler daha sonra katekolestrojen-ortometil transferaz adı verilen bir enzim tarafından metoksi-metabolitlere dönüştürülebilmektedir. İkinci yolu, D halkasının C16a'sına 16a-hidroksi-estron ve estriol oluşumuna yol açan bir hidroksi grubunun eklenmesiyle gerçekleştirilmektedir (Tsuchiya ve ark., 2005; Kuhl, 2005). 16a-hidroksi-estron bileşiği orta ila güçlü mitojenik etkilerle estrogen reseptörüne kovalent olarak bağlanabilmektedir (Sampson ve ark., 2017). ES katekolleri önemli östrojenik aktiviteye sahiptir. Hem ES hem de estron katekolleri, reaktif semikinonların ve kinonların oluşturulmasında öncü görevi

seviyelerini etkilemezken, östrojen kullanıcılarında yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterolünde daha düşük artışlara neden olmaktadır. Sigara içen ve östradiol alan kadınlarda östradiol konsantrasyonu daha düşük ve atrofik endometride daha az değişiklik görülmektedir (O'Connell, 1995). Sigara içmenin kadınlarda ES emilimini etkileyebildiği tespit edilmiş olsa da, sigara dumanında bulunan bir bileşen olan AA'nın bu etkileşimde rol oynayıp oynamadığı henüz belirlenmemiştir. AA ile ES arasındaki potansiyel ilişkiyi aydınlatmak için araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Östrojen ve ES metabolitleriyle ilişkili potansiyel risk, son yıllarda, özellikle menopoza sonrası kadınlarda meme kanseri bağlantısına araştırılmıştır. Çok sayıda çalışmada, dolaşımdaki yüksek ES, estron ve estron sülfat düzeylerinin meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olduğunu bildirilmiştir (Fuhrman ve ark., 2012).

2.2.2. ES Toksisitesi

ES kullanımının kardiyovasküler riskleri yaş, menopoza sonrası ve öncesi var olan kardiyovasküler koşullar gibi faktörlerden etkilenmektedir (Mikkola ve Clarkson, 2002). ES de dahil olmak üzere hormon replasman tedavisinin menopoza hemen sonra başlatıldığında faydalı olabileceğini, ancak geciktiğinde zararlı olabileceği öne sürülmektedir (Rossouw ve ark., 2007). ES'nin endotel fonksiyonunun artması ve inflamasyonun azalması dahil olmak üzere kardiyovasküler faydaları olsa da, özellikle menopoza sonrası kadınlarda veya kardiyovasküler risk faktörleri olanlarda tromboz ve ilişkili hastalık riskini artırabilmektedir (Barrett-Connor, 2007; Renoux ve ark., 2010; Rossouw ve ark., 2002). Genetik profiller ve genetik polimorfizm östrojen tedavisi kullananlarda kardiyovasküler riskleri etkileyebilmektedir (Herrington ve ark., 2002). Ayrıca transdermal ES gibi östrojen uygulama yöntemi, metabolizmadaki farklılıklar ve pıhtılaşma faktörü üretimi üzerindeki etkiler nedeniyle kardiyovasküler etkilerini modüle edebilmektedir (Olié ve ark., 2011).

ES dahil olmak üzere östrojenlerin, çeşitli hayvan modellerinde üreme sisteminin morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel gelişimini etkilediği ve bir dizi üreme bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (Larsson ve ark., 2000). Hayvan modellerinde, ES'nin anneye uygulanması halinde erkek yavrularda hipospadias ve kriptorşidizm insidansında artış tespit edilmiştir (Kalfa ve ark., 2015). ES, hücre sağkalımı, sinaptogenez ve plastisite süreçlerinde normal beyin gelişimi için gereklidir. Fetal beyin gelişimi sırasındaki anormal ES'nin seviyeleri, uzun süreli nörodavranışsal değişikliklere

yol açabilmektedir. Hayvan çalışmaları, aşırı ES'ye doğum öncesi maruz kalmanın, cinsel farklılaşma ile ilgili yetişkin davranışlarında ve preoptik alan ve amigdala tarafından modüle edilen saldırganlık ve kaygı gibi diğer davranışlarda değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir (McCarthy, 2008).

ES, meme, endometriyum, over ve potansiyel olarak prostat gibi hormona duyarlı kanserlerle karmaşık şekilde bağlantılıdır. Çalışmalar, yüksek endojen östrojen düzeylerinin, özellikle ES'nin menopoz sonrası kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığını tutarlı bir şekilde göstermektedir (Eliassen ve Hankinson, 2008). Benzer şekilde, ES de dahil olmak üzere östrojenlere uzun süreli maruziyeti, özellikle menopoz sonrası kadınlarda endometriyal kanser ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Allen, 2008). Yüksek serum ES düzeyleri artan over kanseri riskleriyle de ilişkilendirilmiştir (Tworoger ve ark., 2008).

Sıçanlarda sürekli östrojen maruziyeti, yüksek dozlarda meme adenokarsinomlarına, daha düşük dozlarda ise fibroadenomlara yol açmaktadır. Bu modellerdeki kritik bağlantı, artan hiperplastik prolaktin salgılayan hücrelerden kaynaklanan belirgin hiperprolaktinemi ve hipofiz hiperplazisidir. Bu modellerde östrojenlerin neden olduğu tümör oluşumunun fonksiyonel hipofiz bezine bağlı olduğu gösterilmiştir. Östrojenin karsinojen mekanizma, spesifik nükleer reseptör alfaya (ER- α) bağlanması ve büyüme faktörlerinin artan üretimi yoluyla meme hücresi proliferasyonunu etkilemesidir. Bununla birlikte, Wnt-1 onkogeni geliştiren meme tümörlerini eksprese eden ER-a farelerinden elde edilen kanıtlar, östrojenlerin genotoksik, ER-a bağımsız bir mekanizma yoluyla meme kanserini tetikleyebileceğine dair doğrudan kanıt sağlamaktadır. Bu veriler, overleri alınmış farelere ES uygulandığında da desteklenmekte, bu da saf antiöstrojen varlığında bile daha yüksek bir tümör insidansı ile sonuçlanmaktadır (Russo ve Russo, 2006).

ES'nin meme kanserindeki rolü, metabolik yan ürünlerine karmaşık bir şekilde bağlıdır. İki metabolit, 2-hidroksiestron ve 16a-hidroksiestron arasındaki denge, meme kanseri riskini etkileyebilmektedir. Yüksek 16a-hidroksiestron seviyeleri, artan meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (Yager ve Davidson, 2006). Bu metabolitler, DNA'ya kovalent olarak bağlanan reaktif kinon türleri üretebilir ve potansiyel olarak DNA mutasyonlarına, depurinasyona ve DNA adukt oluşumuna yol açabilmektedir. Bu genetik değişiklikler, özellikle hormona duyarlı dokularda onkogeneze bağlantılıdır (Yager,

2015). ES'nin 4-hidroksiestradiole dönüşmesi ve daha sonra kinon türleri üretmek üzere oksitlenmesi, genotoksik potansiyelinin kanıtı olarak sayılmaktadır. Bu kinon türü DNA ile reaksiyona girerek depurinasyona ve apuridik bölgelerin oluşmasına yol açabilmekte, bu da karsinogenezi tetikleyen mutasyonlarla sonuçlanabilmektedir (Cavalieri ve Rogan, 2011). Özellikle CYP450 enzimleri ve katekol-*O*-metiltransferaz gibi bu hormonal metabolik dönüşümlerde yer alan enzimler, genetik farklılıklar nedeniyle bireyler arasında farklı ekspresyon ve aktiviteye sahiptir. Bu değişkenlik, östrojen kaynaklı DNA hasarına duyarlılığı etkileyebilmekte ve önemli bir endişe kaynağını oluşturmaktadır (Weinshilboum ve Wang, 2006). Buna ek olarak, yapılan bir çalışmada 2-hidroksiestron/16- α hidroksiestron oranının (2/16) meme kanseri riskinin bir belirteci olabileceği bildirilmiştir (Kabat ve ark., 2006). Östrojenlerin artan 16 α -hidroksilasyonu ve azalmış 2-hidroksilasyonu ile farede meme tümörü insidansı ile ilişkili olduğu ve meme kanserli kadınlarda da bu durumun saptandığını bildirmiştir (Schneider ve ark., 1982; Bradlow ve ark., 1985)

Prostat kanseriyle ilgili olarak östrojenin rolü karmaşıktır. İlerlemiş vakalarda tedavi olarak kullanılmasına rağmen, bazı veriler ES'yi de kapsayan östrojenin, prostat epitel hücreleri üzerindeki etkisinden dolayı prostat kanserinin başlatılmasında veya ilerlemesinde potansiyel bir rolü olabileceğine işaret etmektedir (Bosland, 2005).

ES ile progesteron arasındaki etkileşim, hormona duyarlı kanser riskini önemli ölçüde belirlemektedir. Spesifik olarak endometriyum kanserinde östrojenin endometrium üzerindeki proliferatif etkisi, progesteronun farklılaştırıcı etkisi ile dengelenmektedir. Progesteronun stabilize edici etkisi olmadan kalıcı olarak yüksek ES'ye maruz kalma, endometrial kanser riskini artırabilmektedir (Allen ve ark., 2008).

Ayrıca ES DNA metilasyonu yoluyla gen transkripsiyonunu değiştirmesi, estrogen reseptörleri yolundan demetilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin modifiasyonları indüklemesinden dolayı bir epigenetik karsinojen olarak kabul edilmektedir (Kovács ve ark., 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (15-300 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik pipet (1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir otomatik pipet (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	Wisecry Daihan Scientific
Dijital kamera (TEM Jeol-1011 ile bağlı)	Olympus-Veleta TEM
Elektroforez tankı ve güç kaynağı	Thermo Scientific
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus (CKX4)
Floresan mikroskop	Olympus (BX 53)
Hassas terazi	Mettler (H20)
Karbondioksitli inkübatör	Thermo Scientific (Heracell 150i)
Laminar akımlı kabin (Biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan
Mikrodalga fırın	Beko
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek (Epoch)
Mili-Q saf su cihazı	Millipore-Gradient
Orbital çalkalayıcı	Stuart (SSM1)
Otoklav	Hirayama (HV-50L)
Otomatik hücre sayma cihazı	Luna (L10001-Logos Biosystems)
pH metre	Hanna (PH 211)
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich (Micro 200)
Soğutmalı santrifüj	Hettich (Universal 32R)
Ultrasonik banyo	Elma (Transsonic T460/H)
Vorteks	Ika (NC 28405)

3.2. Kullanılan Kimyasal ve Kitler

17 β -estradiol (ES)	Sigma E2758-250MG
8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ELISA kiti	YH Biosearch laboratory (YHB0050Hu)
5,5'-Ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)	Sigma D8130
Akrilamid (AA)	Affymetrix
Albümin bovin serum (BSA)	Amresco (97063-626)
Antibiyotik çözeltisi	Multicell (450 201EL)
Apoptoz ELISA kiti (Annexin V-FTIC/P)	Biolegend (640914)
Bio-Rad protein tayin kiti	Biorad (5000001)
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (A1933)
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Biomatik (A2424)
Düşük erime noktalı agaroz (LMA)	Himedia (RM 861)
Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri/ Ham's F-12 karışımı (DMEM F-12)	Multicell (319-075-CL)
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Multicell (625 060 CG)
Fosfat tampon çözeltisi (PBS) (10X)	Multicell (311-012-CL)
Fötal sığır serum (FBS)	Capricon (FBS-12A)
Glutatyon (GSH)	Fluka 49755
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) %30	Riedel-de Haen
Malondialdehit (MDA) ELISA kiti	YH Biosearch Laboratory (YHB1955Hu)
MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür)	Biomatik (A3338)
Normal erime noktalı agaroz (NMA)	Himedia (MB002)
Protein karbonil (PC) ELISA kiti	YH Biosearch laboratory (YHB2482Hu)
Reaktif oksijen türü (ROS) ELISA kiti	ab113851 DCFDA/ H ₂ DCFDA
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck 6462
Sodyum klorür (NaCl)	Merck 1.06400

Sodyum sitrat	Bio-Optica (15-M103)
Total süperoksit dismutaz (SOD)	Elabscience E-BC-K020-M
Tripan mavisi	Fluka (93595)
Tripsin (1: 250)	Multicell (625-035-TG)
Triton X-100	Sigma T8787
Trizma baz	Merck 8382B007

3.3. Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Hücre Kültür Koşulları

İnsan meme adenokarsinom hücresi MCF-7 (ATCC® HTB-22™), sıvı nitrojen buharında özel soğutucu bir kaptaki muhafaza edildi. Ardından 37°C'de bir su banyosuyla aktif hale getirildi. Toplanan hücreler, 15 mL'lik falkonda birleştirildi ve üzerine 5 mL serum içeren besiyeri eklendi. Karışım 3 dk 1200 rpm'de santrifüj edildi ve üstteki sıvı uzaklaştırıldı. DMSO'nun tamamen uzaklaştırılması için bu adım bir kez daha uygulandı. Ardından, hücre 1 mL serumlu besiyeri ile süspande edildi ve 25 cm²'lik flaska transfer edilerek 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ oranında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, hücre üzerine taze besiyeri eklendi ve hücre yoğunluğu faz-kontrast mikroskopla gözlemlendi.

Hücrelerin pasajlama sürecinde; flastaki besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS (1X) ilavesi ile temizlendi. Ardından, tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Bu işlem sırasında, hücreler kısa bir süre 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren ortamda bekletildi. Ardından, serumlu besiyeri eklenerek santrifüj edildi. Hücre sayısı mikroskopta hesaplandı ve uygun bir konsantrasyonda yeni besiyeri ortamına aktarıldı (Tablo 3-1). Yukarıda belirtilen şartlarda hücreler inkübasyona alındı.

Hücre deneylerinde potansiyel riskleri en aza indirmek için, muhafaza edilmek üzere olan hücre topluluğuna, her 10⁶ hücre başına 1 mL stok solüsyonu eklenip dondurma işlemi gerçekleştirildi. Hücreler, soğuk koşullara dirençli kriyo kaplarda saklandı ve belirli süreler için sıvı nitrojen tankında, öncelikle -20°C'de yarım saat, ardından -80°C'de 16 ila 24 saat arası muhafaza edildi.

Tablo 3-1: Maruziyet esnasında deney ortamındaki tercih edilen hücre yoğunlukları.

Testler	Hücre yoğunluğu
Hücre canlılığının tespiti (MTT)	15×10^3 - 25×10^3
Hücre proliferasyonun tespiti (Koloni oluşum testi)	10^3
Hücre migrasyon kapasite tayini (Çizik testi)	10^6
Genotoksisite tespiti (Komet testi)	2×10^5
Oksidatif hasarın tespiti (ROS testi)	2×10^5
Oksidatif hasarın tespiti (MDA, PC, 8-OHdG, GSH, CAT, SOD testleri)	2×10^5
Apoptoz testi	2×10^5

AA ve ES konsantrasyonları hücre kültür besiyerinde maruziyet öncesinde taze olarak hazırlandı. Deney koşullarına, hücre dizisine ve maruziyet maddelerine göre maruziyet konsantrasyonları farklılık gösterdi. 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂'li bir ortamda hücreler, 24 saat süresince AA ve ES çözeltileriyle Tablo 3-2'ye göre hazırlandı.

Tablo 3-2: Testlere göre AA ve ES maruziyet koşulları.

Grup ismi	Grup içeriği
A10	10×10^6 nM AA
A10/E0.1	10×10^6 nM AA + 0,1 nM ES
A10/E10	10×10^6 nM AA + 10 nM ES
A1	1×10^6 nM AA
A1/E0.1	1×10^6 nM AA + 0,1 nM ES
A1/E10	1×10^6 nM AA + 10 nM ES
E0.1	0,1 nM
E10	10 nM

Deney öncesinde hücre kültürü ortamdaki besiyerinin uzaklaştırılmasının ardından PBS (1X) ile yıkanıp tripsin-EDTA ile tripsinize edildi, PBS (1X) ile yıkandı ve 1200 rpm hızında santrifüj edilerek ayrılan hücreler analize alındı. Sitotoksisite (MTT), hücre proliferasyonu (koloni oluşturma ve hücre migrasyonu çizgi testi), genotoksisite

(Komet), oksidatif hasar ve apoptoz testleri uygulandı. Sadece MTT testinde hücreler tripsinizasyon yapılmadan doğrudan analiz edildi.

3.3.2. Hücre Canlılığının Tespiti

Hücre canlılığının tespiti MTT sitotoksitesite testi ile gerçekleştirildi.

Kullanılan çözelti: MTT çözeltisi (5 mg/mL) için 250 mg MTT 50 mL PBS (1X) içinde çözülde. Çözelti +4°C’de ve karanlıkta saklandı.

Testin yapılışı: AA, ES ve kombinasyonların sitotoksitesitesi farklı konsantrasyonlarda MTT test ile değeriendirildi. 15×10^3 – 25×10^3 hücre/100 µL/kuyu yoğunluğunda hücreler 96 kuyulu mikropalakalara eklenip 37°C ve %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS (1X) ile yıkandı ve Tablo 3-3’ye göre hazırlanan test maddeleri eklenerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyulara 25 µL MTT solüsyonu eklenip 37°C ve %5 CO₂ koşullarında 2 saat daha inkübe edildi. İnkübasyonun ardından MTT içeren solüsyonlar kuyulardan alındı. Formazan tuzlarını çözmek üzere her kuyuya 100 µL DMSO eklendi ve 150 rpm’de 5 dk çalkalandı. Sonrasında, 590-690 nm dalga boyunda absorbansı spektrofotometre ile ölçülerek kaydedildi. Test, her konsantrasyon için en az 3 kez tekrarlandı. Maruziyet materyallerine maruz bırakılmamış hücreler ise negatif kontrol (NK) olarak kullanıldı. Test maddeleri ile muamele edilmeyen NK’daki enzim aktivitesine bağılı olarak gözlenen absorbans, OD %100 canlılığa eşdeğer olarak kabul edildi. Enzim aktivitesindeki inhibisyon aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\% \text{ inhibisyon konsantrasyonu (IC)} = 100 - (\text{ort. } OD_{\text{madde}} \times 100 / \text{ort. } OD_{\text{negatif kontrol}})$$

Ölüm konsantrasyonunun ölçüm eğrisi elde edildikten sonra, eğri üzerinde %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) değeri hesaplandı.

Tablo 3-3: MTT testinde kullanılan maruziyet koşulları.

Gruplar	Konsantrasyon aralığı (nM)
AA	1×10^6 – 10×10^6
ES	0,0005 – 5000
AA + ES	0.1 ES + ($0,5 \times 10^6$ – 15×10^6) AA
AA + ES	10 ES + ($0,5 \times 10^6$ – 15×10^6) AA

3.3.3. Hücre Proliferasyonunun Tespiti

Hücre proliferasyonunun tespiti koloni oluşum ve çizik test ile gerçekleştirildi.

Koloni oluşumu testi: Altı kuyulu mikropalakalara yaklaşık 10^3 hücre/2 mL/kuyu olacak şekilde (Tablo 3-1) dağıtılan hücreler, 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve belli konsantrasyonlarda test maddeleri eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı (Tablo 3-2). Ertesi gün besiyeri tazelandı ve 10 gün süre ile inkübasyona devam edildi. İnkübasyon sonunda, kuyular PBS ile yıkandı ve hücreler 5 dk soğuk metanol ile sabitlendi ve 20 dk kristal mor (%10 metanol içinde % 0,5 oranda) ile boyandı. Daha sonra fazla boya distile su ile uzaklaştırıldı ve mikropalakalar oda sıcaklığında kurutuldu. Koloni oluşumlarının sonuçları doğal ışık altında fotoğraflandı ve koloniler manuel olarak sayıldı.

Hücre migrasyonu, hücrelerin bölgeden ayrılarak çeşitli dokulara gitmelerini sağlamaktadır. Bu göç, özellikle gelişim sırasında, organ oluşumu sırasında ve yara iyileşmesi sürecinde, hücre proliferasyonunu tetikleyebilmektedir. Hücre proliferasyonu, hücre sayısının artmasını sağlamakta ve bu artış, dokuların büyümesi ve gelişmesi için önemlidir. Dolayısıyla, hücre migrasyonu ve hücre proliferasyonu birbirini tamamlayan süreçlerdir ve birlikte çalışarak birçok biyolojik olayı düzenlemektedir.

Çizik testi ile hücre migrasyon kapasitesi tayini: ES ve AA'nın hücre göçü üzerine etkisi çizgi testi ile değerlendirildi. Oniki kuyulu mikropalakalara yaklaşık 10^6 hücre/2 mL/kuyu olacak şekilde (Tablo 3-1) dağıtılan hücreler, 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Daha sonra 200 μL 'lik pipet ucu kullanılarak lineer çizgi ile çizilerek bir yara açıldı ve ortam PBS (1X) ile yıkandı. Çizgiler, 40×100 büyütme ile mikroskop altında fotoğraflandı. Ardından besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri ile belli konsantrasyonlardaki test maddeleri eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı (Tablo 3-2). Çizgiler aynı alanlardan tekrar fotoğraflandı ve Image J programı kullanılarak çizgi açılma yüzdesi hesaplandı.

3.3.4. Genotoksisitenin Tespiti

Genotoksisitenin tespiti Komet test ile gerçekleştirildi.

Kullanılan çözeltiler:

Düşük erime noktalı agaroz (LMA) çözeltisi (%0,65): 32,5 mg LMA 5 mL PBS (1X)'de çözüldü. Çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak taze hazırlandı.

Normal erime noktalı agaroz (NMA) çözeltisi (%0,65): 0,65 g NMA 100 mL steril suda çözüldü. Çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak taze hazırlandı.

NaOH çözeltisi (10 M): 200 g NaOH steril su ile 500 mL'ye tamamlandı.

EDTA çözeltisi (0,2 M): 37,2 g EDTA steril su ile 500 mL'ye tamamlandı. Çözelti + 4°C'de saklandı.

Lizis stok çözeltisi: 146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA, 1,2 g trizma baz steril su ile 1000 mL'ye tamamlandı. 10 M NaOH çözeltisi ile pH 10'a ayarlandı ve +4 °C saklandı.

Lizis çözeltisi: 66,75 mL Lizis stok çözeltisi, 7,5 mL DMSO, 0,75 mL triton-X 100 karıştırıldı. Çözelti taze olarak hazırlandı.

Nötralizasyon tamponu (0,4 M): 24,25 g Trizma baz steril su ile 500 mL'ye tamamlandı. Çözelti 10 N HCl ile pH 7,5'e ayarlandı.

Elektroforez tamponu: 30 mL 10 M NaOH, 5,4 mL 0,2 M EDTA steril su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

EtBr stok çözeltisi (%0,01): 5 mg EtBr steril su ile 50 mL'ye tamamlandı.

EtBr çözeltisi (%0,002): 100 µL EtBr stok çözeltisine 400 µL steril su ilave edildi.

Testin yapılışı: MCF-7 hücreleri, her biri 2×10^5 hücre içerecek biçimde 6 kuyulu mikrolakalara ekilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerleri kaldırıldı ve hücreler Tablo 3-2'de belirtilen konsantrasyonlarda maruziyet maddeleriyle 24 saat süreyle muamele edildi. PK olarak 3 saat süre ile 100 µM H₂O₂ maruziyet kullanıldı, NK için ise besiyeri kullanıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından, her kuyu PBS (1X) ile yıkandı ve hücrelerin tripsinizasyonu için hücre ortamına % 0,2 tripsin solüsyonundan 0,5 mL eklendi. Elde edilen hücre süspansiyonu, 2 kez PBS (1X) ile yıkanıp 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.

NMA çözeltisi 50 mL'lik falkonda hazırlandı. Uç kısmı rodajlı lamalar NMA çözeltisine daldırıldı ve fazla agaroz lamın rodajlı kısmından temizlendi. Lamlar, agarozun katılaşması için oda sıcaklığında bir gece bekletildi ve ardından +4°C'de 1 ay süre ile muhafaza edildi.

Hücreler, 300 µL PBS (1X) içerisinde süspande edildi ve süspansiyondan 100 µL alınıp, hücrelere zarar vermeden oda sıcaklığındaki 100 µL LMA çözeltisiyle karıştırıldı

ve NMA ile önceden kaplanmış lamalar üzerine yayıldı, lamalar lamellerle örtüldü. Lamlar, agarozun donması için 20 dk +4°C'de bekletildi. Donmuş agarozun üzerinden lameller kaldırıldı ve lamalar lizis solüsyonuyla dolu şaleler içinde karanlık ortamda +4°C'de bir gece bekletildi. Lamlar lizis solüsyonunun içinden alınarak +4°C'de soğutulmuş elektroforez tamponlu tanka yerleştirildi. DNA sarmallarının açılması için lamalar 20 dk bekletildi, ardından 20 dk süreyle 20 volt ve 300 mA akımla DNA'nın anoda doğru hareketi sağlandı. Yürütme işleminin bitiminde lamalar, nötralizasyon tamponu içinde +4°C'de 10 dk bekletildi, soğuk distile suyla yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Deneyin her konsantrasyonu için en az 2 tekrar yapıldı ve bu tekrarlar aynı koşullarda gerçekleştirildi.

Her bir lam üzerine 100 µL taze etidyum bromür çözeltisi damlatıldı ve lamelle kapatılıp mikroskopta incelendi. Sayım ve değerlendirme aşamaları floresan mikroskopta (40x10 büyütme) gerçekleştirildi. Her lamda farklı bölgelerden olmak üzere 100-200 hücre sayıldı. Sayılan hücrelerde DNA hasar tespitinin değerlendirilmesi komet görüntü işleme ve analiz programı (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, Suffolk, UK) ile gerçekleştirildi. DNA hasarının derecelendirilmesinde kuyruktaki DNA yoğunluk yüzdesi kullanıldı.

3.3.5. Oksidatif Hasarın Tespiti

Oksidatif hasarın tespiti ROS, MDA, PC, 8-OHdG, GSH, CAT ve SOD testleri ile gerçekleştirildi.

Hücresel ROS testi (DCFDA/H₂DCFDA)

Kit içeriği: 20 mM DCFDA (DMSO'da) 35 µL, tampon (10X) 10 mL, 55 mM TBHP 50 µL.

Testin yapılışı: Deney için gereken MCF-7 hücre sayısına ulaşıldıktan sonra, her birine 2x10⁵ hücre olacak şekilde 6 kuyulu mikropalakalara ekildi. 24 saat inkübasyon sürecinin ardından besiyerleri kaldırıldı ve Tablo 3-2'de belirtilen konsantrasyonlara göre hücreler maruziyet maddeleriyle 24 saat muamele edildi. Deneyde PK olarak 100 µM H₂O₂ kullanıldı ve hücreler 3 saat süreyle PK'e maruz bırakıldı. NK'da ise hücre kültür besiyeri tercih edildi. 24 saatlik inkübasyonun sonunda kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı ve hücre tripsinizasyonu için % 0,2 tripsinden 0,5 mL eklendi. Hücre süspansiyonu, PBS (1X) ile 2 kez 1200 rpm'de 3 dk süreyle santrifüj edilerek yıkandı. Ardından, hücreler 1x10⁶ hücre/mL konsantrasyonunda DCFDA solüsyonunda süspande edilip boyandı ve

karanlık bir ortamda 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Boyama işleminden sonra, hücreler PBS (1X) ile yıkanarak santrifüj edildi ve 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde yeni besiyerinde süspende edildi. Ardından, boyalı hücreler her kuyuya 10^5 hücre olacak şekilde koyu renkli, şeffaf tabanlı 96 kuyulu mikropalakaya ekildi ve Ex/Em (485/535 nm) değerleri spektrofotometrede ölçüldü.

MDA, PC ve 8-OHdG ELİSA testi

Kit içeriği: Kaplanmış ELISA 96'lık mikropalaka, standart çözelti 9 mmol/L $1 \times 0,5$ mL $1 \times 0,5$ mL, streptavidin-HRP 1x6 mL, stop çözeltisi 1x6 mL, kromojenik reaktif A 1x6 mL, kromojenik reaktif B 1x6 mL, standart seyreltme çözeltisi 1x1,5 mL, yıkama çözeltisi (30 X) 20 mL.

Testin yapılışı: Çift antikor sandviç teknolojisine dayalı ELISA kitleri kullanıldı. Yaklaşık olarak 25 cm²'lik flaska 2×10^3 hücre/5 mL yoğunluğunda hücreler eklenerek 37°C'de ve %5 CO₂'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sürecinin ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 mL PBS (1X) ile yıkandı. Taze besiyeri eklenerek Tablo 3-2'ye göre maruziyet gerçekleştirildi. 24 saatlik maruziyetin sonunda, hücreler 2 mL PBS (1X) ile toplamda 3 defa yıkandı. Her yıkama işlemi sonrasında 1200 rpm'de 3 dk süreyle santrifüj edildi. Hücrelere %0,2 oranında tripsin-EDTA eklenerek tripsinize edildi. Tripin mavi boyasıyla boyanan hücreler sayıldı ve yoğunlukları 2×10^5 hücre/mL olacak şekilde hücre pelleti oksidatif hasar tespi için hazırlandı.

Kit protokolü takip edilerek, 1×10^3 hücre/mL konsantrasyonda hücre süspansiyonları oluşturuldu ve test zamanına kadar -20°C'de muhafaza edildi. Hücre duvarlarını yıkmak ve içerisindeki enzimleri serbest bırakmak için hücreler birkaç kez derin dondurucudan (-20°C) çıkarılıp tekrar donduruldu. Testten 30 dk önce hücreler derin dondurucudan alındı ve 2500 rpm'de 20 dk süreyle santrifüj edildi. 96 Kuyulu mikropalakalara, içerisinde MDA, PC veya 8-OHdG monoklonal antikor bulunan 40 µL süpernatant eklendi. Ardından, kuyulara 10 µL hücre süspansiyonu ve 50 µL streptavidin-HRP eklenerek dikkatlice karıştırıldı. 37°C'de 60 dk süreyle inkübe edildikten sonra, her kuyuya 50 µL kromojenik reaktif A ve 50 µL kromojenik reaktif B eklendi ve tekrar dikkatlice karıştırıldı. Karışım 10 dk daha 37 °C'de inkübe edildi ve ardından 50 µL stop çözeltisi eklenerek inkübasyon sonlandırıldı. Elde edilen çözeltinin 450 nm'deki absorbansı mikropalaka okuyuculu spektrofotometre ile ölçüldü.

Deneyler, her maruziyet konsantrasyonu için en az 2 tekrar ve aynı koşullarda farklı 2 günde çalışmak üzere toplam en az 4 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. NK olarak maruziyet maddelerine maruz bırakılmamış hücreler benzer şekilde analize hazırlandı. Her bir parametre için kitlerle birlikte tedarik edilen standart çözeltiler için de kit protokolüne uygun analizler gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak her bir parametre için standart konsantrasyon-absorbans ölçü eğrisi hazırlandı. Tekrarların ortalaması alınarak hazırlanan ölçü eğrilerinde, sonuçlar sırasıyla MDA, PC ve 8-OHdG için ($\mu\text{g}/\text{mg}$, nmol/mg , $\mu\text{g}/\text{mg}$) olarak gösterilmiştir (Tablo 4-1). Maruziyet ortamındaki MDA, PC ve 8-OHdG miktarları da sırasıyla ($\mu\text{g}/\text{mg}$, nmol/mg , $\mu\text{g}/\text{mg}$) protein üzerinden değerlendirilmiştir. 10^4 hücre için protein miktarı tespit edildikten sonra, seyreltme faktörleri göz önünde bulundurularak aşağıdaki formüle göre $\mu\text{mol}/\text{g}$ protein cinsinden hesaplama yapıldı.

$$\text{Sonuç değeri} = B \times C$$

A: Test ortamının 1 mL 'sindeki hücre sayısı = 10^4 hücre/40 $\mu\text{L} \times 1000 \mu\text{L}$

B: Test ortamının 1 mL 'sindeki protein miktarı (g) = 10^4 hücredeki protein miktarı (μg) $\times 10^{-9} \times A$

C: Test ortamının 1 mL 'sindeki oksidatif hasar parametre miktarı (MDA için μmol , PC ve 8-OHdG için μg) = 40 μL 'deki oksidatif hasar parametre miktarı $\times 25$

MDA, PC ve 8-OHdG tayini için hücre maruziyet ortamındaki protein miktarı Bradford yöntemini temel alan Bio-Rad protein tayin kiti ile gerçekleştirildi (Bradford, 1976). Test, protein içeriğinin konsantrasyonuna bağlı olarak boya molekülünün proteine farklı renk tepkileri vermesi prensibine dayanmaktadır. Coomassie blue, asidik bir boya olup, proteinlerin aromatik amino asit kalıntılarına bağlanmakta ve bağlanma sonucu oluşan renk tepkisinin absorbansı 595 nm'de ölçülür. 96 Kuyulu mikrolakalara konulan 200 μL BSA standartı veya hücre süspansiyonu (10^4 hücre) içerisine 10 μL taze hazırlanmış boya çözeltisi ilave edildi. BSA standart çözeltileri, konsantrasyonları 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 ve 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olacak şekilde taze hazırlandı. Karışımlar oda sıcaklığında 5-10 dk inkübasyonun ardından 595 nm'de mikrolaka okuyucu spektrofotometre ile ölçüldü. BSA standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine dayanarak her bir örnek için 10^4 hücredeki protein miktarı μg cinsinden belirlendi.

Toplam süperoksit dismutaz (T-SOD) tayini

Kit içeriği: Tampon çözeltisi 12 mL, nitrozojenik ajan 0,07 mL, substrat solüsyonu 1,2 mL, enzim stok çözeltisi 0,15 mL, enzim seyreltici 1,5 mL.

Testin yapılışı: Test, absorbans ölçülerek tespit edilen nitrit oluşturmak üzere hidroksilamin ile reaksiyona giren süperoksit anyon serbest radikallerini ($O_2^{\cdot-}$) üretmek için ksantin ve ksantin oksidaz reaksiyon sistemi kullanıldı. Kit protokolüne göre kontrol-kör, kontrol ve hücre süspansiyonu kuyulara 5 µL PBS (1X) ilave edildi, ardından tüm kuyulara 90 µL hazırlanmış tampon solüsyonu ilave edildi. Enzim stok solüsyonu ve diğer ajanları içeren hazırlanan solüsyondan 30 µL kontrol ve hücre süspansiyon kuyulara ilave edildi. Enzim stoğu içermeyen hazırlanan solüsyondan ise 30 µL kontrol-kör kuyulara eklendi. Mikroplaka çalkalandı ve 50 dk 37°C'de inkübe edildi ve kuyulara 180 µL kromojenik ajan ilave edildi. Mikroplaka tekrar çalkalandı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra mikroplaka okuyucu ile 550 nm'de absorbansları ölçüldü. T-SOD aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$T-SOD \text{ aktivitesi (U/mg protein)} = i \div 50\% \times V1/V2 \times f \div Cpr$$

i: SOD'in inhibisyon oranı (%),

$$i = (A1-A3) (A2-A3) / A1-A3 \times 100\% = A1-A2 / A1-A3 \times 100\%$$

A1: 550 nm'deki kontrol kuyusunun absorbans değeri

A2: 550 nm'deki örnek kuyusunun absorbans değeri

A3: 550 nm'deki boş kuyunun absorbans değeri

V1: Reaksiyon solüsyonunun toplam hacmi, mL

V2: Reaksiyon sistemine eklenen örnek hacmi, mL

f: Testten önce örneğin seyreltme faktörü

Cpr: Örnekteki protein konsantrasyonu (g protein/L)

Katalaz (CAT) testi

CAT enzimi H_2O_2 'yi ayrıştırdığı için hücrelerin oksidatif stres seviyelerini belirlemek için kullanılır (Aebi, 1984). Testte CAT tarafından H_2O_2 ayrışma hızı spektrofotometrik ölçülür. Hücre pelleti test için hazır hale getirildi. Fosfat tamponu (pH 7.0), H_2O_2 ve CAT içeren hücre süspansiyonu içeren bir reaksiyon karışımı ilave edilerek 25°C'de 1-2 dk inkübe edildi ve ardından 240 nm'deki absorbans ölçüldü. Reaksiyon

karişımının 240 nm'deki absorbansı, $t_0=0$ sn ve $t=150$ sn zaman dilimlerinde ölçüldükten sonra $k=(2,3/t) (\log A_0/A_1)$ denklemi ile hesaplandı. Spesifik aktivite, standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak mg protein başına k olarak ifade edilir. A_0 ve A_1 sırasıyla t_0 ve t_1 zaman dilimlerinde 240 nm'de ölçülen absorbans değerlerini ifade etmektedir.

GSH testi

Kullanılan çözeltiler:

GSH standart çözelti: 25 mg GSH 25 mL'ye su ile tamamlandı.

Çöktürme çözeltisi: 1,67 g Metafosforik asid, 0,2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 30 g NaCl 100 mL'ye su ile tamamlandı.

Sodyum sitrat çözeltisi (%1): 1 g Sodyum sitrat 100 mL suda çözüldü.

Belirtme reaktifi (5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit, DTNB): 40 mg DTNB %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek 100 mL'ye su ile tamamlandı.

Disodyum hidrojen fosfat çözeltisi (0,3 M): 107,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (1000 mL'ye su ile tamamlandı.

GSH tayini Sedlak ve Lindsay yöntemine dayanan Beutler'in modifikasyonu (Sedlak ve Lindsay, 1968) ile gerçekleştirildi. Yöntem, DTNB'nin dokulardaki serbest sülfhidril gruplarıyla 1:1 oranında 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit oluşturulması reaksiyonuna dayanmaktadır. 1,2 mL Hücre süspansiyonu 1,8 mL çöktürme çözeltisi karıştırılarak santrifüj edildi ve süpernatant alındı. Ardından, 0,6 mL GSH standart çözeltisi veya süpernatant 2,4 mL disodyum hidrojen fosfat çözeltisi ve 0,3 mL DTNB solüsyonu ile birleştirildi. Karişım oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra, absorbansı 412 nm dalga boyunda köre karşı ölçüldü.

3.3.6. Apoptoz Değerlendirmesi

Apoptoz değerlendirme Anneksin V-FITC/PI testi ile gerçekleştirildi.

Kit içeriği: Anneksin V-FITC 0,5 mL, propidium iyodür (PI) 1 mL, Anneksin V bağlayıcı tamponu 50 mL.

Testin yapılışı: Yaklaşık 2×10^5 hücre/5 mL yoğunluğunda hücre, Tablo 3.1'e göre flaska aktarıldı ve 37°C sıcaklıkta %5 CO_2 atmosferinde 24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 mL PBS (1X) ile yıkandı. Ardından taze besiyerinde Tablo 3-2'ye göre maruziyet çözeltileri eklendi. Hücre

süspansiyonları, kit protokolü doğrultusunda 1×10^6 hücre/mL konsantrasyonuna getirildi. Hücre süspansiyonuna 5 μ L Annexin V-FITC ve 10 μ L PI ilave edildi ve karışım oda sıcaklığında 15 dk karanlık ortamda bekletildi. Hazırlanan 100 μ L'lik karışım kapalı bir lam üzerine yayıldı. Hücreler, mavi (B), yeşil (G) ve ultraviyole (UV) floresan filtreler yardımıyla analiz edilerek, erken ve geç apoptoz ile nekroz durumları değerlendirildi.

Annexin, V-FITC (yeşil floresans) ve PI (kırmızı floresans) ile eş zamanlı boyanan bir yapıya sahip olup, canlı (FITC-/PI-), erken apoptotik (FITC+/PI-), geç apoptotik (FITC+/PI+) veya nekrotik (FITC-/PI+) olarak değerlendirildi. Sonuçlar, toplam hücre taşıyıcısının yüzdesi olarak rapor edildi. Her bir test için en az 2 tekrar ve aynı çözeltilerle 2 farklı günde en az 4 tekrar yapıldı. NK olarak, maruziyet maddelere maruz kalmamış hücreler benzer şekilde analiz için hazırlandı.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 17.0 for Windows paket programı kullanılarak tek yönlü varyans (ANOVA) analizi (Post Hoc-Tukey ve Dunnet testi) uygulandı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

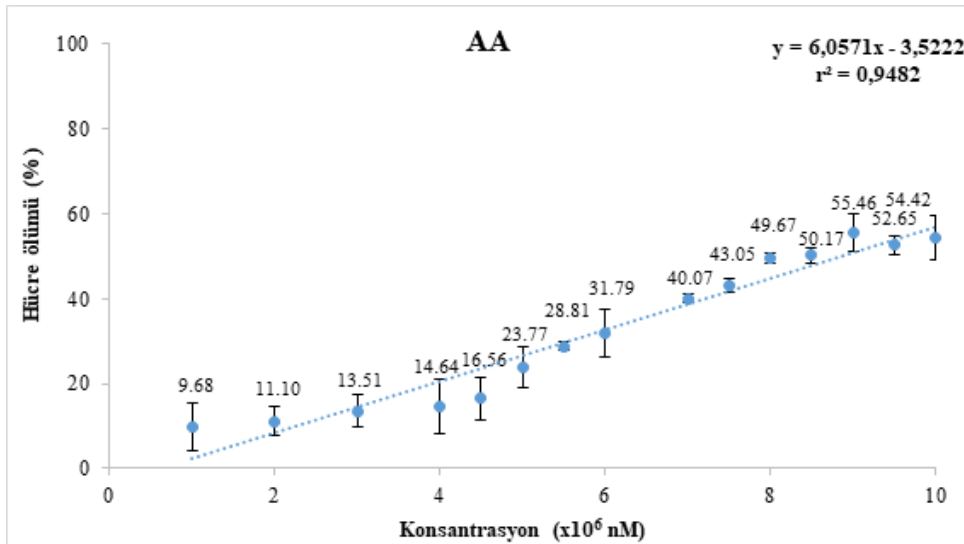
4. BULGULAR

Çalışmada, insan meme kanseri hücresi MCF-7 üzerine AA, ES ile AA ve ES'nin farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla; hücre canlılığı MTT testi ile, hücre proliferasyonunu koloni oluşum testi ile, hücre migrasyon kapasitesi çizgi testi ile, genotoksik potansiyeli komet testi ile, oksidatif hasar tespiti ROS, MDA, PC, 8-OHdG, GSH, CAT ve T-SOD tayini ile ve apoptoz oluşumu üzerine etkisi Annexin V-FTIC/PI testi ile değerlendirilmiştir.

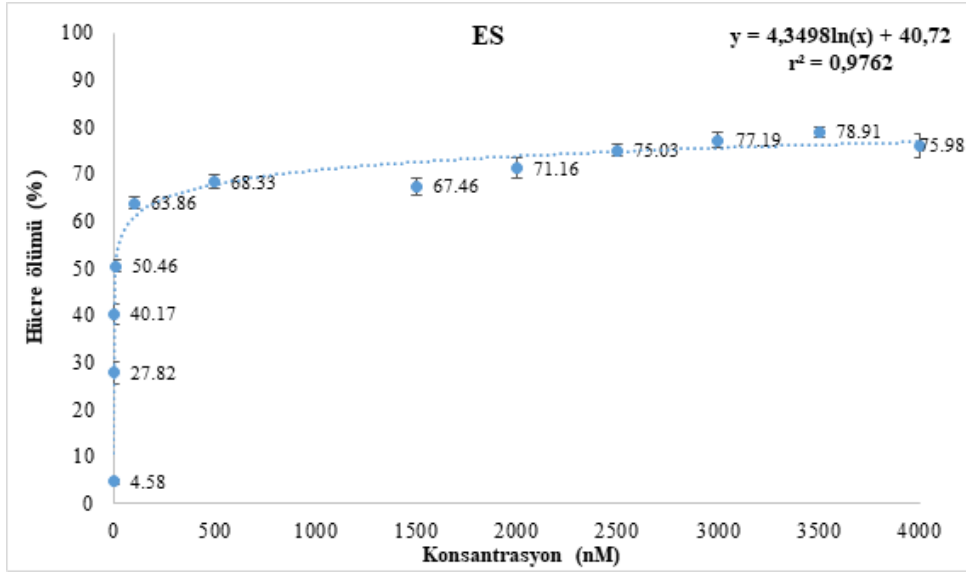
4.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

MCF-7 hücrelerinin AA ($1-10 \times 10^6$ nM), ES (0-4000 nM) ve iki farklı ES konsantrasyon (0,1 nM ve 10 nM) varlığında AA'nın $0-15 \times 10^6$ nM aralığındaki farklı konsantrasyonlarından oluşan kombinasyonlarına (Tablo 3-3) 24 saat süre maruz bırakılmasının ardından hücre canlılığı MTT sitotoksikite testi ile değerlendirilmiştir.

AA'ya maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde canlılık doza bağlı azalmış ve IC_{50} değeri $8,84 \times 10^6$ nM olarak belirlenmiştir (Şekil 4-1). ES'ye maruz bırakılan hücrelerde ise hücre canlılığı logaritmik olarak azalma göstermiş ve IC_{50} değeri 8,11 nM olarak belirlenmiştir (Şekil 4-2).



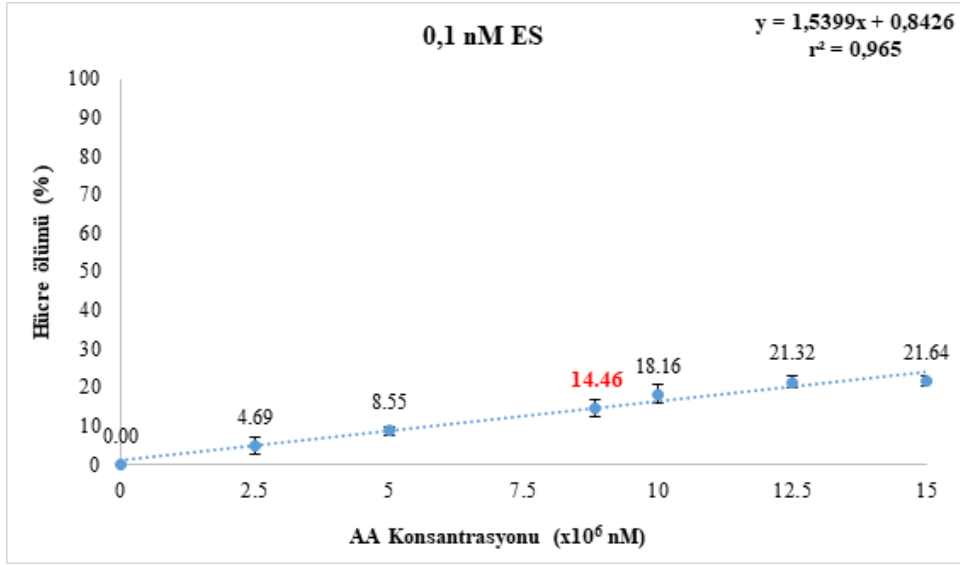
Şekil 4-1: AA'nin 24 saat maruziyetinde sitotoksik etkisi.



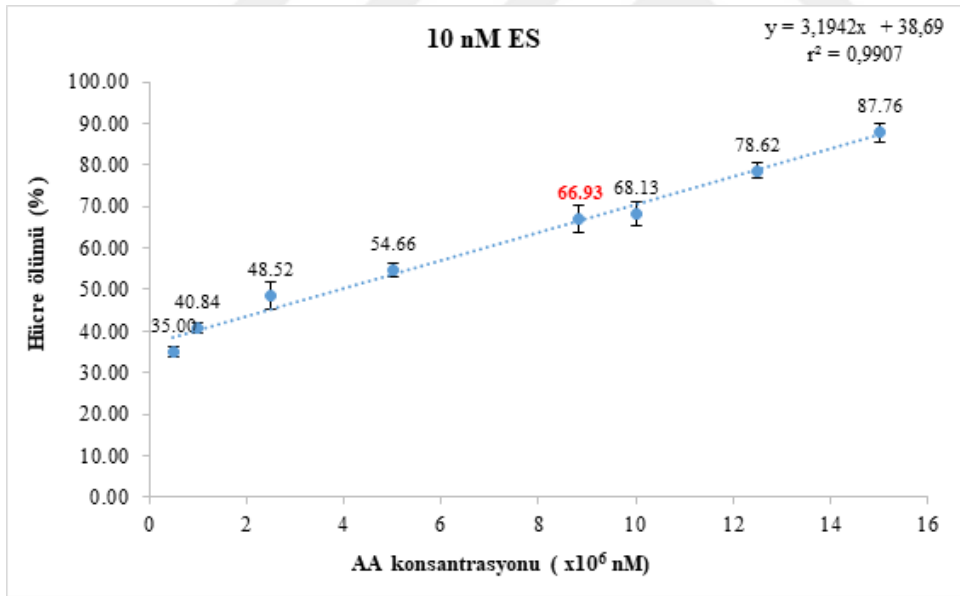
Şekil 4-2: ES'nin 24 saat maruziyet durumundaki sitotoksik etkisi.

Hücre canlılığı verilerine göre iki farklı ES konsantrasyonu tercih edilerek 0,1 nM ve 10 nM ES varlığında AA toksisitesi $0,5-15 \times 10^6$ nM konsantrasyon aralığında değerlendirilmiştir (Şekil 4-3; Şekil 4-4). En yüksek AA konsantrasyonu (15×10^6 nM) $\%87,3 \pm 1,25$ ölüme neden olurken bu oran 0,1 nM ES varlığında $\%21,64 \pm 1,25$ 'e düşmektedir. Benzer şekilde; diğer AA maruziyet konsantrasyonlarında da hücre ölümü farklı oranlarda azalmıştır (Şekil 4-3). 10 nM ES varlığında ise aksi gözlenmiş, yüksek konsantrasyon AA maruziyetinde gözlenen $\%87,3 \pm 1,25$ ölüm 10 nM ES varlığında $\%87,76 \pm 2,34$ 'e yükselmiştir. Benzer şekilde; diğer AA maruziyet konsantrasyonlarında da hücre ölümü farklı oranlarda azalmıştır (Şekil 4-4).

AA'nın MCF-7 hücre hattında tespit edilen IC_{50} değeri $8,84 \times 10^6$ nM 0,1 nM ES varlığında $\%14,46 \pm 2,25$ ölüme (Şekil 4-3), 10 nM ES varlığında ise $\%66,93 \pm 3,21$ ölüme (Şekil 4-4) neden olmuştur.



Şekil 4-3: 0,1 nM ES varlığında AA'nin MCF-7 hücre canlılığına etkisi.

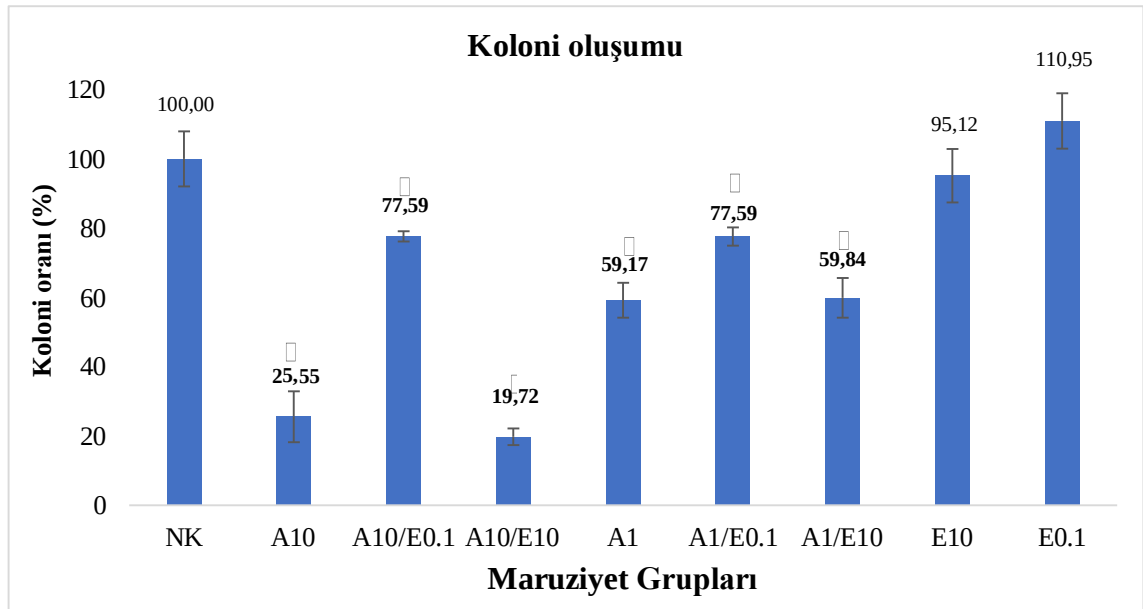


Şekil 4-4: 10 nM ES varlığında AA'nin MCF-7 hücre canlılığına etkisi.

4.2. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

MCF-7 hücrelerinin AA (1×10^6 nm ve 10×10^6 nM), ES (0,1 nM ve 10 nM) ve iki farklı ES konsantrasyon (0,1 nM ve 10 nM) varlığında AA'nın 1×10^6 nm ve 10×10^6 nM konsantrasyonlarından oluşan kombinasyonlarına (Tablo 3-3) 24 saat süre maruz bırakılmasının ardından hücre proliferasyon üzerine etkisi koloni oluşum testi ve hücre migrasyon kapasitesi için çizgi testi ile değerlendirilmiştir.

Kontrol grubuna kıyasla; tüm AA maruziyet gruplarında koloni sayısında azalma tespit edilirken ($p \leq 0,001$) sadece ES ile maruz bırakılan gruplardaki koloni sayısında istatistiksel anlamlılık düzeyinde değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4-5). 0,1 nM ES varlığında AA'nın MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerine negatif etkisinde azalma tespit edilmiştir. Örneğin; hücre proliferasyonu kontrole göre A10 maruziyet grubunda %25,55 ve E0.1 maruziyet grubunda %110,95 iken 0,1 nM ES varlığında 10×10^6 nM konsantrasyondaki AA'nın etkisi %22,55'den %77,59'a yükselmiş, diğer bir değişle de %110,95'den %77,59'a düşmüştür. 10 nM ES varlığında 0,1 nM ES maruziyetine göre proliferasyonda azalma tespit edilmiş, bu durum AA ve ES kombinasyonlarına da yansımıştır (Şekil 4-5).

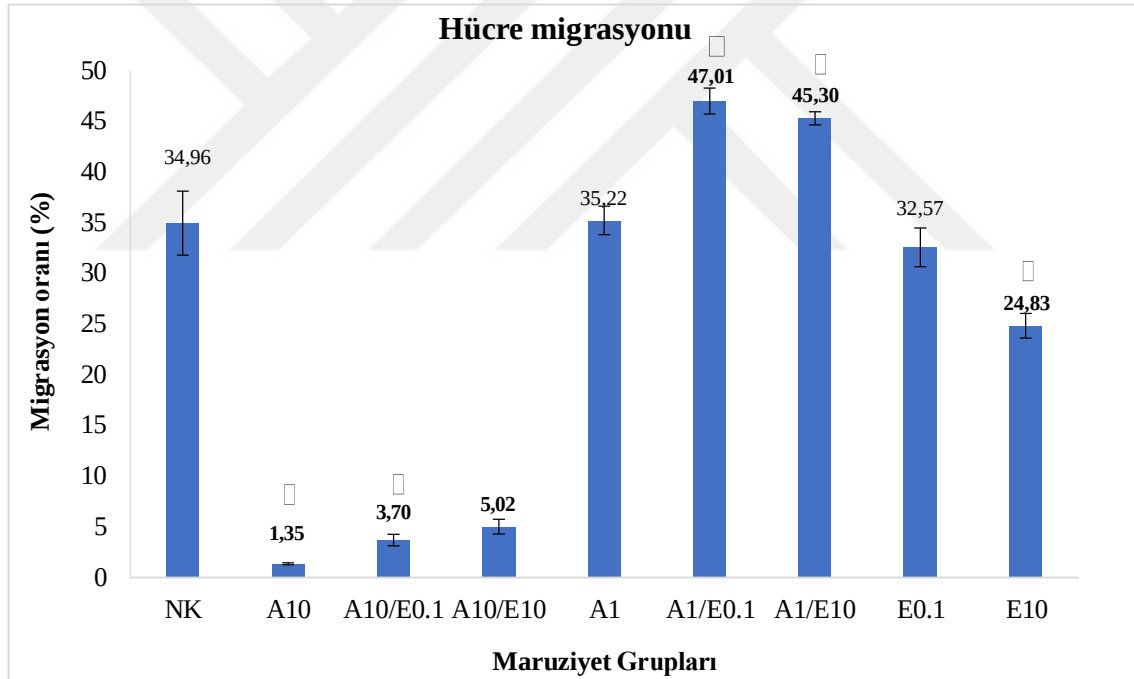


Şekil 4-5: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerinde koloni oluşturma miktarı.

*kontrolle kıyasla $p < 0,05$ NK:

Negatif kontrol

Kontrol grubuna kıyasla; 10×10^6 nM AA maruziyetinde hücre migrasyonu önemli ölçüde inhibe edilirken ($\leq 25,89$ kat ya da kontrole göre %96, $p=0,000$) 1×10^6 nM konsantrasyonda migrasyonda azalma olsa da istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir ($p=0,000$). ES'ye maruz bırakılan hücrelerde 0,1 nM için değişim gözlenmemiş, ancak, 10 nM maruziyette kontrole kıyasla anlamlı düşüş tespit edilmiştir ($\leq 1,40$ kat ya da 29 % kontrole göre, $p=0,000$). Kombinasyon gruplarının değerlendirilmesinde; AA'nın MCF-7 hücrelerindeki migrasyonunun ES varlığında indüklendiği gözlenmiştir. ES'nin tek başına hem düşük hem de yüksek maruziyet konsantrasyonlarında olduğu gibi AA ile olan kombinasyonlarında da ES düşük dozlarda AA'nın migrasyonu azaltıcı etkisini engellediği ve migrasyonun arttığı gözlenmiştir, yüksek dozlarda ise bu etkinin daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerinde migrasyon oranı.

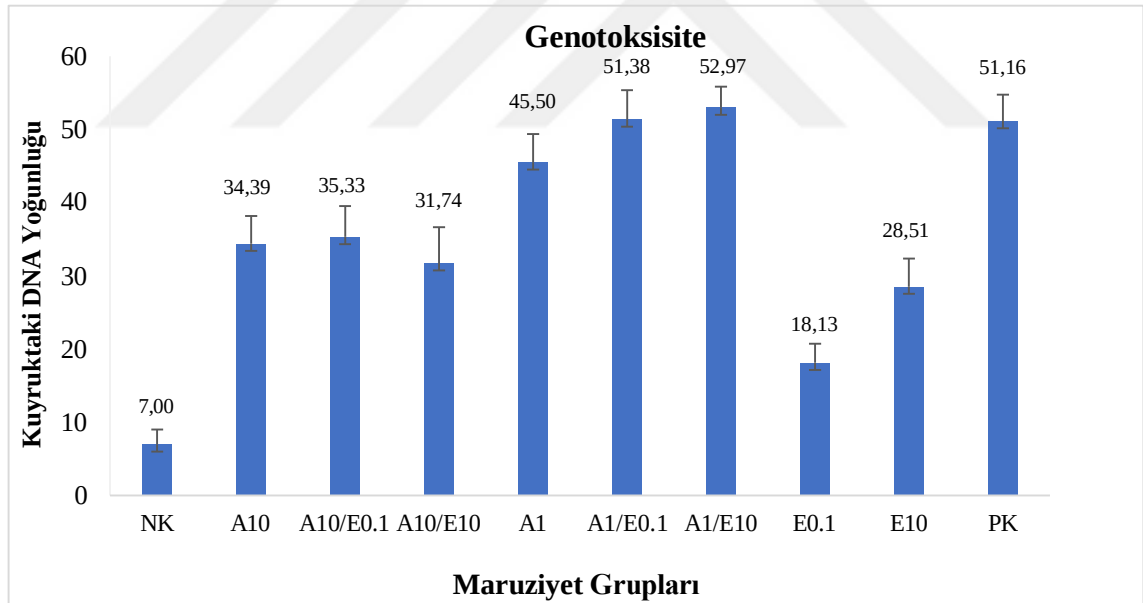
*kontrole kıyasla $p < 0,05$

NK: Negatif kontrol

4.3. Genotoksisitenin Değerlendirilmesi

MCF-7 hücrelerinin AA (1×10^6 nm ve 10×10^6 nM), ES (0,1 nM ve 10 nM) ve iki farklı ES konsantrasyon (0,1 nM ve 10 nM) varlığında AA'nın 1×10^6 nm ve 10×10^6 nM konsantrasyonlarından oluşan kombinasyonlarına (Tablo 3-3) 24 saat süre maruz bırakılmasının ardından genotoksik etki potansiyelini değerlendirmek üzere komet testi yapılmıştır (Şekil 4-7).

Kontrol grubuna kıyasla AA, ES ve kombine maruziyet grupları istatistiksel anlamlılık düzeyinde genotoksik etki göstermiştir ($p=0,000$). Komet testi ile DNA hasarını indüklemeye potansiyelleri sırası ile $A1/E10 \sim A1/E0.1 > A1 > A10 \sim A10/E0.1 > A10/E10 > E10 > E0.1$ olarak tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre; AA ES'den daha yüksek genotoksik hasar potansiyeline sahip iken etkiler ES'de doza bağlı iken AA'daki etkinin doza bağlı olmadığı gözlenmiştir. Kombine maruziyet durumunda; özellikle düşük dozlarda sinerjik etki gözlenmiştir (Şekil 4-7).

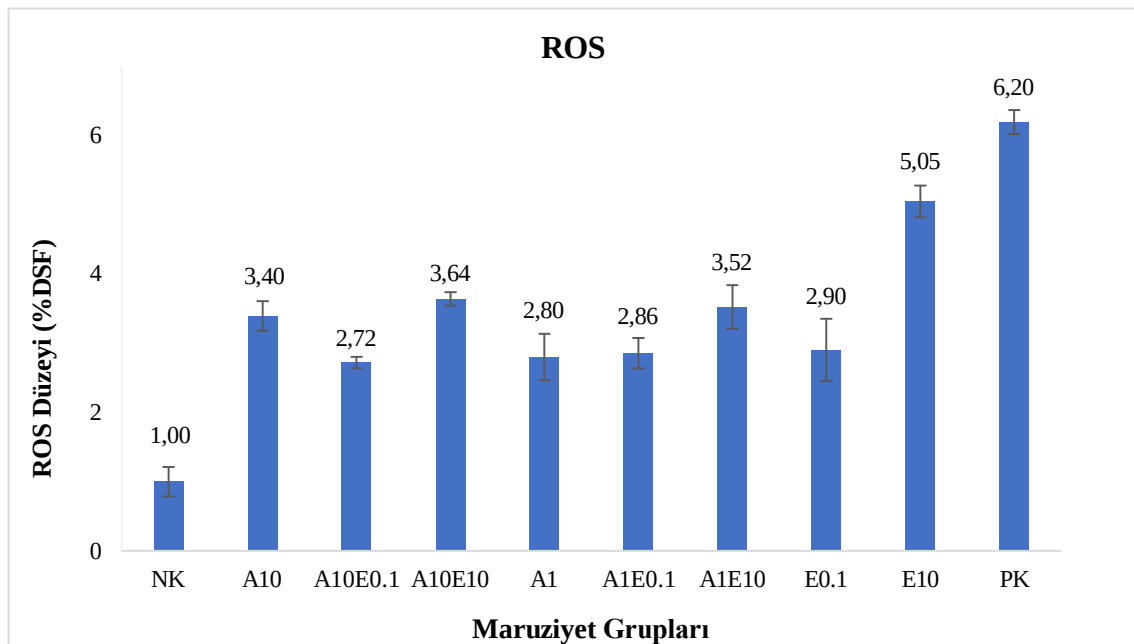


Şekil 4-7: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerinde genotoksik etkisi. Kontrolle kıyasla tüm maruziyet grupları için $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. NK: Negatif kontrol, PK: pozitif kontrol

4.4. Oksidatif Hasarın Değerlendirilmesi

MCF-7 hücrelerinin AA (1×10^6 nm ve 10×10^6 nM), ES (0,1 nM ve 10 nM) ve iki farklı ES konsantrasyon (0,1 nM ve 10 nM) varlığında AA'nın 1×10^6 nm ve 10×10^6 nM konsantrasyonlarından oluşan kombinasyonlarına (Tablo 3-3) 24 saat süre maruz bırakılarak oksidatif hasar oluşturma potansiyelleri ROS, MDA, PC, 8-OHdG, GSH, CAT ve SOD düzeyleri üzerinden, öncelikle ilgili tayinlerin standart eğrilerinin oluşturulmasını (Tablo 4-1) takiben değerlendirilmiştir (Tablo 4-2; Şekil 4-8; Şekil 4-9).

ROS tayin verileri: Tüm maruziyet gruplarında kontrole kıyasla ROS düzeylerinde artış tespit edilmiştir ($p=0,000$). AA maruziyet gruplarında ROS düzeyleri doza bağlı olmaksızın artış gösterirken ($\geq 3,39$ kat, $p=0,000$) ES gruplarındaki artışın doza bağlı olduğu gözlenmiştir ($\geq 2,9$ kat, $p=0,000$). Yüksek doz ES maruziyet grubundaki (10 nM) ROS düzeyi yüksek doz AA maruziyet grubundaki (10×10^6 nM) ROS düzeyinden (5.05, $p=0.000$) kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak, oksidatif hasar oluşturma potansiyeli antioksidan savunma sisteminin de etkisi ile şekillendiğinden sadece ROS verileri ile AA ve ES maruziyetin oksidatif hasar potansiyelini değerlendirmek yetersiz olacaktır. Kombine gruplarda ise ES varlığının AA'nın ROS indüksiyonuna etkisi istatistiksel anlamlılık göstermemiştir ($p=0,000$) (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerinde ROS indüksiyonu. Kontrole kıyasla tüm maruziyet grupları için $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. NK: Negatif kontrol, PK: pozitif kontrol

AA, ES ve kombinasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu oksidatif hasar oluşturma potansiyelini değerlendirmek için ROS yanı sıra çeşitli biyogöstergelerin analizi (MDA, PC, 8-OHdG, T-SOD, CAT ve GSH) gerçekleştirilmiştir. Miktar tayini ilgili analizdeki standart çözeltileri ile elde edilen ölçü eğrileri üzerinden hesaplanarak yapılmıştır (Tablo 4-1). Hesaplamalarda elde edilen sonuçlar, 10^4 hücrede bulunan protein miktarının belirlenmesinin ardından, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak MDA $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein, PC nmol/mg protein, 8-OHdG $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein, T-SOD $\text{ünite}/\text{mg}$ protein, CAT $\text{ünite}/\text{mg}$ protein ve GSH $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4-1: Oksidatif hasar potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerin tayini için kullanılacak standartlar ile hazırlanan ölçü eğrisi bilgileri.

Standart	Konsantrasyon aralığı	Ölçü eğri denklemi	r^2
Protein	25; 50; 100; 200; 400; 800 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$y=0,0029x+0,3642$	0,9919
MDA	0,25; 50; 100; 200; 300; 450 ng/mL	$y=0,0005x+0,1424$	0,9281
PC	0,20; 40; 80; 160; 240; 360 nmol/L	$y=0,0316x+0,1883$	0,9788
OHdG	0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$y=0,0004x+0,1443$	0,9649
GSH	0,70; 1,42; 2,83; 5,68; 11,36; 16,36; 22,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$y=0,0271x-0,0006$	0,9948

MDA tayin verileri: Kontrol grubuna kıyasla yüksek doz maruziyet gruplarında (AA 10×10^6 nM, ES 10 nM) lipid üzerine önemli oksidatif hasar göstergesi olan MDA düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir ($\geq 1,84$ kat, $p=0,000$). Kombine gruplarda; 0,1 nM ES varlığında AA'nın MDA düzeyinde azalma gözlenmiş, ancak istatistiksel düzeyde anlamlılık tespit edilmemiştir. 10 nM ES varlığında ise AA'nın sebep olduğu MDA düzeyinde artış gözlenmiş ve bu durum yüksek doz ES'nin de MDA oluşturma potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir (Tablo 4-2; Şekil 4-9).

PC tayin verileri: Kontrol grubuna kıyasla tüm maruziyet gruplarında (AA, ES ve kombine) protein üzerine önemli oksidatif hasar göstergesi olan PC düzeylerinde doza bağlı anlamlı artış gözlenmiştir ($\geq 2,1$ kat, $p \leq 0,003$) Kombine gruplarda; ES varlığında AA'nın PC oluşturma etkisindeki değişimde istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlenmemiştir ($p \geq 0,000$) (Tablo 4-2; Şekil 4-9).

8-OHdG tayin verileri: Kontrol grubuna kıyasla tüm maruziyet gruplarında (AA, ES ve kombine) DNA üzerine önemli oksidatif hasar göstergesi olan 8-OHdG düzeylerinde doza bağlı anlamlı artış gözlenmiştir ($\geq 3,65$ kat, $p=0,000$). AA ve ES grupları kıyaslandığında AA gruplarının neden olduğu 8-OHdG düzeylerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($\geq 3,75$ kat, $p=0,000$). Kombine gruplarda; ES varlığında AA'nın 8-OHdG oluşturma etkisindeki değişimde istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlenmemiştir ($p=0,000$) (Tablo 4-2; Şekil 4-9).

GSH tayin verileri: Kontrol grubuna kıyasla AA maruziyet gruplarında (1×10^6 nM ve 10×10^6 nM) GSH düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir ($\geq 1,86$ kat, $p \leq 0,037$). GSH seviyelerindeki bu artış, esasen hücrenin, AA'nın zararlı etkilerine karşı koruyucu mekanizmalarını güçlendirmenin bir yoludur. Hücrel redoks dengesini korumak ve oksidatif hasarı önlemek için uyarlanabilir bir yanıtı temsil etmektedir. ES maruziyet gruplarında ise kontrole kıyasla GSH tüketimi gözlenmiştir ($\geq 0,72$ kat, $p \leq 0,044$). Kombine gruplarda; ES varlığında AA'nın GSH miktarı üzerine etkisinde değişim gözlenirse de değişim istatistiksel düzeyde anlamlılık göstermemiştir ($p=0,000$) (Tablo 4-2; Şekil 4-9).

T-SOD tayin verileri: Kontrol grubuna kıyasla tüm maruziyet gruplarında (AA, ES ve kombine) T-SOD düzeylerinde istatistiksel anlamlı değişim tespit edilmemiştir ($p=0,000$) (Tablo 4-2; Şekil 4-9).

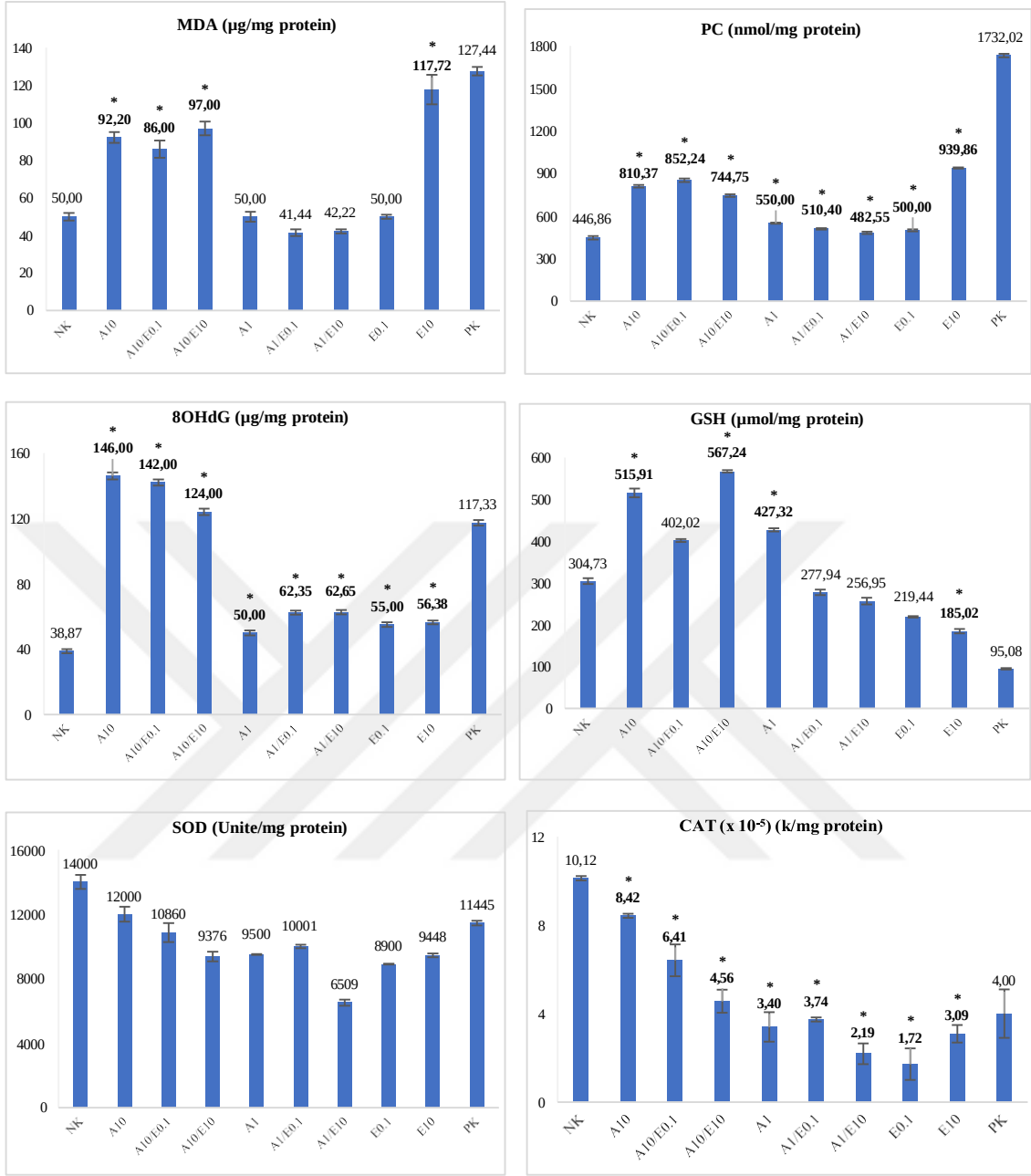
CAT tayin verileri: Kontrol grubuna kıyasla tüm maruziyet gruplarında (AA, ES ve kombine) CAT düzeylerinde azalma meydana gelmiş, 10×10^6 nM AA maruziyeti haricinde diğer gruplardaki değişim istatistiksel anlamlılık göstermiştir ($\geq 0,83$ kat, $p \leq 0,01$). Tüm kombine gruplarda CAT düzeyinde azalma tespit edilmiş olup ES varlığında AA'nın CAT düzeyi üzerine olan etkisi değerlendirilememiştir. Gruplarda kontrole göre anlamlı değişim tespit edilmiş olsa da AA ve ES kombinasyon grupları arasında istatistiksel düzeyde anlamlılık gözlenmemiştir ($p \geq 0,000$) (Tablo 4-2; Şekil 4-9).

Tablo 4-2: AA, ES ve kombine maruziyet gruplarının MCF-7 hücresi üzerine oksidatif hasar oluşturma potansiyeli.

	MDA (µg/mg protein)	PC (nmol/mg protein)	8-OHdG (µg/mg protein)	GSH (µg/mg protein)	T-SOD (ünite/mg protein)	CAT (x10 ⁻⁵) (ünite/mg protein)
NK	50,00±2,00	446,86±12,34	38,87±1,26	304,73±7,15	14000,00±438,30	10,12±0,10
A10	92,20±2,88	810,37±9,25	146,00±2,14	515,91±10,41	12000,00±457,61	8,42±0,09
A10/E0.1	86,00±4,58	852,24±12,21	142,00±1,91	402,02±3,61	10860,07±595,55	6,41±0,72
A10/E10	97,00±3,61	744,75±9,54	124,00±2,01	567,24±2,71	9376,00±302,86	4,56±0,52
A1	50,00±2,63	550,00±3,62	50,00±1,56	427,32±4,02	9500,00±33,55	3,40±0,67
A1/E0.1	41,44±1,79	510,40±5,31	62,35±1,29	277,94±6,67	10000,56±110,79	3,74±0,09
A1/E10	42,22±1,12	482,55±8,31	62,65±1,41	256,95±8,17	6509,46±184,13	2,19±0,47
E0.1	50,00±1,11	500,00±6,72	55,00±1,41	219,44±1,84	8900,00±21,27	1,72±0,71
E10	117,72±7,86	939,86±4,29	56,38±1,17	185,02±5,42	9448,48±117,27	3,09±0,39
PK	127,44±2,26	1732,02±12,54	117,33±1,74	95,08±1,61	11444,97±146,19	4,00±1,09

NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol

Kalın ifade istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0,05$)



Şekil 4-9: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerine oksidatif hasar oluşturma potansiyeli.

*Kontrolle kıyasla $p < 0,05$

NK: Negatif kontrol, PK: pozitif kontrol

Özetle; MCF-7 hücrelerinde 10×10^6 nm AA ve 10 nm ES maruziyeti tüm hücre biyomoleküllerinde oksidatif hasara sebep olabileceği, 1×10^6 nm AA ve 0,1 nm ES maruziyeti protein ve DNA'da hasar oluşturabileceği, ES varlığında AA'nın etkisinde değişim olmadığı gözlenmiştir. Antioksidan sistem üzerine etkiler açısından değerlendirildiğinde ise; düşük dozlarda GSH tüketimi gözlenirken, yüksek dozlarda aksine GSH düzeylerinde hücrenin muhtemel koruması olarak artış gözlenmiş, T-SOD

düzeyleri değişmemiş, CAT düzeylerinde de tüm maruziyet grupları için tüketim tespit edilmiş olup AA ve ES'nin oksidatif hasar potansiyeli verilerini desteklemektedir. ES varlığının AA toksisitesine etkisi, düşük dozlarda pozitif yönde etkilerken yüksek dozlarda negatif etkilemiştir.

4.5. Apoptozun Değerlendirilmesi

MCF-7 hücrelerinin AA (1×10^6 nM ve 10×10^6 nM), ES (0,1 nM ve 10 nM) ve iki farklı ES konsantrasyon (0,1 nM ve 10 nM) varlığında AA'nın 1×10^6 nM ve 10×10^6 nM konsantrasyonlarından oluşan kombinasyonlarına (Tablo 3-3) 24 saat süre maruz bırakılmasının ardından apoptoz indüklemeye potansiyeli Anneksin V-FTIC/PI apoptoz testi aracılığıyla değerlendirilmiştir. Tüm maruziyet gruplarında apoptotik oluşum gözlenmemiştir (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Maruziyet gruplarının MCF-7 hücrelerine apoptoz oluşturma potansiyeli.

Maruziyet Grupları	Hücre Ölüm Oranı %	
	Nekroz	Apoptoz
NK	0,00	0,00
A10	0,00	0,00
A10/E0.1	0,00	0,00
A10/E10	0,02	0,13
A1	0,00	0,00
A1/E0.1	0,00	0,00
A1/E10	0,00	0,00
E0.1	0,00	0,00
E10	0,00	0,00
PK	40,0	0,00

NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol

$p \leq 0.05$

5. TARTIŞMA

AA toksisitesinin sağlık üzerine önemli etkilerini, özellikle de yaygın günlük maruziyet göz önüne alındığında, ES'nin hormonal fonksiyonları ve biyolojik süreçleri modüle etmedeki kritik rolünü kabul ederek, AA ve ES'nin tek başlarına ve birbirleri ile etkileşimleri halindeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. AA'ya maruz kalma ile hormonal etki arasındaki etkileşimin, özellikle de bu etkileşimlerin hücresel sağlığı ve bütünlüğünü etkileme durumunun detaylı araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkileri ile genotoksosite, oksidatif hasar ve apoptoz oluşturma potansiyelleri insan meme adenokarsinomu MCF-7 hücre hatları üzerine 24 saat süre ile maruziyeti takiben incelenmiştir.

AA'nın IC_{50} değeri, literatürdeki veriler ile uyumlu olup $8,84 \times 10^6$ nM olarak tespit edilmiştir. İnsan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücrelerinde $7,18 \times 10^6$ nM (Cao ve ark., 2008), insan kolon adenokarsinomu Caco-2 hücrelerinde $5,9 \times 10^6$ nM (Nowak ve ark., 2020), fare fibroblast NIH/3T3 hücrelerinde $6,73 \times 10^6$ nM (Şahintürk, ve ark., 2018), V79 hücrelerinde 5×10^6 nM (Baum ve ark., 2005) ve insan akciğer A549 hücrelerinde $4,6 \times 10^6$ nM (Kacar ve ark., 2018) olarak rapor edilmiştir.

ES'nin IC_{50} değeri 8,11 nM olarak tespit edilmiş olup literatürde hücre hatlarının ES'ye duyarlılıklarının farklı olduğu görülmektedir. Çalışmamızda olduğu gibi; MCF-7 hücrelerinde yapılan bir çalışmada 1 nM maruziyette %31 (çalışmamızda $40,17 \pm 2,21$) hücre ölümü gözlenmiştir (Burow ve ark., 1999). Literatüre göre; insan hepatoselüler karsinom LCL-PI 11 hücrelerinde 3×10^3 nM (Sanaei ve ark. 2018) ve 50×10^3 nM (Oda ve ark. 2002) sitotoksosite gözlenmiştir.

AA'nın toksisitesi iki farklı ES konsantrasyon (0,1 ve 10 nM) varlığında incelenmiştir. Yüksek AA konsantrasyonunda hücre ölümü %87,3 iken 0,1 nM ES varlığında %21,64'e düşmüş, ancak, düşük AA ve yüksek ES varlığında bu etkileşim gözlenmemiştir. IC_{50} değeri açısından yorumlanması halinde; AA'nın MCF-7 hücre hattındaki IC_{50} değeri olan $8,84 \times 10^6$ nm'de 0.1 nM ES varlığında hücre ölümünün $14,46 \pm 2,25$ 'e gerilediği, 10 nM ES varlığında ise $66,93 \pm 3,21$ 'e yükseldiği tespit edilmiştir. ES'nin IC_{50} değerinin 8,11 nM olduğu da göz önünde buldurulduğunda ES'nin AA toksisitesi üzerine modülatör etki gösterdiği, düşük ES konsantrasyonlarında AA'nın sitotoksik etkisini azalttığı ve dolayısıyla da ES'nin koruyucu olabileceği gözlenirken, yüksek ES konsantrasyonlarında, AA'nın toksik etkisinin ES ile daha da arttığı tespit

edilmiştir. Veriler MCF-7 hücre hattının hormon düzeylerine bağlı olarak farklı yanıtlar verebileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu durum hormonların ve toksik maddelerin hücresel etkileşimlerinin karmaşıklığını ve bu etkileşimlerin hücre tipine göre nasıl değişebileceğinin önemini göstermektedir.

AA, ES ve kombinasyonlarının hücre proliferasyonu üzerine etkisi incelendiğinde; AA maruziyet gruplarında kontrol grubuna kıyasla koloni sayısında azalma gözlenmiştir ($p \leq 0,001$). AA literatürde sitotoksik etki ile ilişkilendirilmiş ve hücre proliferasyonunu artırdığına dair herhangi bir bulgu rapor edilmemiştir. Fazendeiro (2013) tarafından yapılan bir çalışmada 10 mM AA varlığında V79 hücrelerinde sitotoksikite tespit edilirken, özellikle yüksek konsantrasyonlarda AA'nın hücre proliferasyonunda önemli bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. ES'nin hücre canlılığına etkisi ile ilgili literatürdeki verilere göre; $10 - 10 \times 10^4$ nM konsantrasyon aralığında MCF-7 hücrelerinde (Seeger ve ark., 2004), 10-1000 nM konsantrasyon aralığında MCF-7 hücrelerinde (Lippert ve ark., 2003), 0.1 – 1000 nM konsantrasyon aralığında insan OVCAR-3 adenokarsinom hücrelerinde (Maleki ve ark., 2015) ve 0,1 nM konsantrasyonda MCF-7 hücrelerinde (Song ve ark., 2005) proliferasyonu indüklediği bildirilmiştir. Çalışmamızda; ES ile maruz bırakılan gruplarda anlamlı bir değişiklik saptanmamış ($p > 0,05$), ancak, düşük ES varlığında AA'nın MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu üzerine negatif etkisinde azalma olduğu gözlenmiştir.

Bilindiği üzere, hücre migrasyonu, gelişim, organ oluşumu ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde hücre proliferasyonunu tetikleyen önemli bir mekanizmadır. Dokuların büyümesi ve gelişmesi için hücre sayısının artışı sağlayan hücre proliferasyonu, genellikle hücre migrasyonunu gerektirir. Bu iki süreç, vücudun sağlıklı gelişimi, doku onarımı ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Çalışmada; hücre migrasyonu yüksek AA maruziyetinde önemli ölçüde düşerken ($\leq 25,89$ kat ya da %96, $p=0,000$) düşük AA maruziyetinde değişmemiştir ($p > 0,05$). Benzer şekilde, hücre migrasyonu yüksek ES maruziyetinde azalmış ($\leq 1,40$ kat ya da %29, $p=0,000$), düşük maruziyette değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Kombinasyon gruplarının değerlendirilmesinde; AA'nın MCF-7 hücrelerindeki migrasyonunun ES varlığında artmış olduğunu gözlenmiştir. Düşük ES dozlarında AA'nın hücre migrasyonunu azalttığını gözlenmiştir. Zhao ve ark. (2014) tarafından yürütülen bir çalışmada, 100 nM ES ile maruziyet durumunda MCF-7 hücrelerindeki migrasyonun engellendiği ve yüksek

konsantrasyonlarda E2'nin MCF-7 hücrelerinin büyümesini durdurduğu, düşük konsantrasyonlarda ise migrasyonu teşvik ettiği rapor edilmiştir.

Çalışmamızda, AA, ES ve kombinasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine genotoksik olduğu tespit edilmiştir ($p=0,000$). Komet testi verilerine göre; DNA hasarını indüklenme potansiyelleri sırası ile $A1/E10 \sim A1/E0.1 > A1 > A10 \sim A10/E0.1 > A10/E10 > E10 > E0.1$ olarak tespit edilmiştir. AA'nın ES'e kıyasla daha yüksek genotoksik hasar potansiyeline sahip olduğu ve bu etkilerin ES için doza bağlı, AA için ise doza bağlı olmadığı gözlenmiştir. Özellikle düşük dozlarda sinerjik etki tespit edilmiştir. Literatür verilerine göre; AA'nın çeşitli hücre tipleri ve modellerinde farklı genotoksik etkiler gösterdiği görülmektedir. AA, $0,625-2,5 \times 10^6$ nM konsantrasyon aralığında HepG2 hücrelerinde DNA hasarı kontrole benzer düzeyde gözlenmiştir (Jiang ve ark., 2007). Sıçan F344 15 mg/kg AA tedavisinden takiben adrenal bezde kontrole kıyasla DNA hasarının 2 kat artığı bildirilmiştir (Klauning ve Kamendulis, 2005). Caco-2 hücrelerinde $1,25 \times 10^6$ nM konsantrasyonunda DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir (Nowak ve ark., 2020).

Çalışmamızda AA, ES ve kombinasyonlarının MCF-7 hücrelerinde oksidatif hasar oluşturma potansiyelleri ROS, MDA, PC, 8-OHdG, GSH, T-SOD, CAT düzeyleri üzerinden değerlendirilmiştir.

MCF-7 hücrelerine AA, ES ve kombine olmak üzere tüm maruziyet gruplarında ROS düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla artış gözlenmiş, AA maruziyet gruplarında doza bağlı olmaksızın ($\geq 3,39$ kat) gözlenen artış ES gruplarında doza bağlı olarak ($\geq 2,90$ kat) gerçekleşmiştir. Özellikle, yüksek doz ES maruziyet grubunda (10 nM) ROS düzeyi, yüksek doz AA maruziyet grubuna (10×10^6 nM) göre çok daha yüksek (5,05 kat) bulunmuştur. Benzer şekilde; insan akciğer BEAS-2B hücrelerinde 2×10^6 nM ve 3×10^6 nM AA ile maruziyette (Kacar ve ark., 2019), insan HepG2 karaciğer hücrelerinde 10×10^6 nM, 20×10^6 nM ve 40×10^6 nM AA ile maruziyette (Jiang ve ark., 2007), primer sıçan astrosit hücrelerinde 1×10^6 , 2×10^6 , $3,5 \times 10^6$ nM AA ile maruziyette (Yang ve ark., 2021), U2OS hücreinde AA 10×10^3 nM konsantrasyonda (Song ve ark., 2021) ROS düzeyinin arttığı rapor edilmiştir. ES'nin insan meme kanseri ve nöroblastoma hücrelerinde ROS üretimini artırarak hücre hareketini etkilediği ve gen ekspresyonunu kontrol eden proteinlerin fonksiyonunu geliştirdiği bildirilmiştir (Feltz ve ark., 2005). Ayrıca, insan

OVCAR-3 adenokarsinom hücrelerinde 100 nM ES dozunun ROS üretimini tetiklediği gözlenmiştir (Maleki ve ark., 2015).

AA varlığında kontrole kıyasla lipid peroksidasyon ürünü MDA düzeyinde, protein oksidasyon ürünü PC düzeyinde, DNA oksidasyon ürünü 8-OHdG düzeyinde oksidatif hasarı indüklemiştir. Benzer şekilde, ES varlığında da MDA, PC ve 8-OHdG düzeylerinde artış gözlenmiştir. Sadece 1×10^6 nM AA ve 0,1 nM ES maruziyetinde MDA düzeyleri kontrole yakın düzeylerde gözlenmiştir (Tablo 4-2).

AA maruziyetinde (1×10^6 nM, 10×10^6 nM) GSH düzeylerinde kontrole göre artış, CAT düzeylerinde de azalma gözlenmiştir. GSH düzeylerinde artış hücrenin oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olarak değerlendirilebilir. T-SOD düzeylerinde değişim tespit edilmemiştir. Yüksek konsantrasyon ES (10 nM) ile maruziyette GSH tüketilmiş, yüksek ve düşük konsantrasyon ES maruziyetinde (0,1 nM ve 10 nM) CAT düzeylerinde azalma gözlenmiştir. AA'nın oksidatif hasar oluşturma potansiyelinin ES varlığında daha da arttığı tespit edilmiştir (Tablo 4-2).

Çalışmadan elde edilen bulgulara benzer şekilde; HepG2 hücrelerinde 20×10^6 nM konsantrasyonda AA'ya maruziyette 8-OHdG yoğunluğunu kontrole göre dört kat (Jiang, 2007) ve 40 mg/kg AA dozuna maruz kalan sıçanlarda 8-OHdG kontrole 12 kat arttığını bildirilmiştir (Alturfan ve ark. 2012). AA'ya $0,6 \times 10^6$, $1,25 \times 10^6$, $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , 10×10^6 nM konsantrasyonlarda maruz bırakılan sıçan feokromositoma PC12 hücrelerinde (Pan ve ark., 2018), MDA seviyelerinde beyin, karaciğer, böbrek ve testis sıçan dokularında sırasıyla 1,9 , 1,6 , 1,7 ve 1,8 kat arttığı (Alturfan ve ark. 2012), fare Leydig ve Sertoli hücrelerinde (10×10^3 , 1×10^6 nM AA) (Yılmaz ve ark., 2017), sıçan karaciğer hücrelerinde (25mg/kg) (Gedik ve ark., 2017; Ghorbel ve ark., 2017) ve astrositlerde ($2,5 \times 10^6$, $3,5 \times 10^6$ nM AA) (Yang ve ark., 2021) anlamlı artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Benzer şekilde; sıçan karaciğer dokusunda yapılan bir çalışmada 25 mg/kg konsantrasyonda AA'ya maruziyet durumunda SOD ve CAT düzeylerinde artış tespit edilmiştir (Gedik ve ark., 2017). Ayrıca eritrositlerde AA'ya ($0,25 \times 10^6$, $0,50 \times 10^6$ ve $1,00 \times 10^6$ nM) maruz kaldıktan sonra CAT aktivitelerinde sırasıyla %9-%43 ve %24-%36 oranında azalma olduğu kaydedilmiştir (Catalgol ve ark. 2009). V79 hücrelerinde yapılan çalışmalarda AA'nın (6×10^6 nM) konsantrasyonunda GSH'nin tükenmesini neden olduğu rapor edilmiştir (Puppel ve ark., 2005; Ghorbel ve ark., 2017). Zhu ve ark. (2008) AA'ya (40 mg/kg haftada 3 doz 3 doz 10 hafta boyunca) maruz kalan erkek Wister sıçanlarda GSH'deki düşüşün antioksidan sistem bastırıldığında yaygın olarak görülen bir fenomen olan ROS ile reaksiyonlarda tüketim oranının artmasıyla ilişkilendirilebileceğini bildirmiştir (Zhu ve ark. 2008).

AA'nın oksidatif hasara sebep olabileceğini rapor eden başka çalışmalar da mevcuttur (Chen ve ark., 2018; Çelik ve ark., 2018; Jiang ve ark., 2007; Pan ve ark., 2018). Bu veriler, AA'nın potansiyel olarak hücrenin antioksidan kaynaklarını tüketebileceğini ve hücreyi oksidatif hasara karşı daha duyarlı hale getirebileceğini göstermektedir. Dolayısıyla da çalışmamız, AA'nın oksidatif stresi indükleyerek DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve antioksidan savunma modülasyonuna yol açabileceği yönünde verileri sunmakta olup literatürdeki AA toksisitesine ilişkin ortak anlayışa katkıda bulunmaktadır.

Thilagam ve ark. (2010), ES maruziyetinin bir balık türü olan Japon levreğinde ROS düzeyini artırdığını ve CAT aktivitesini azalttığını göstermiştir. Cavalieri ve ark. (2000) ES metabolitlerinin süperoksit anyon radikalleri ve H₂O₂ oluşumuna yol açabileceğini ve önemli hücre hasara neden olabileceğini vurgulamaktadır.

Özetle; MCF-7 hücrelerinin AA ve ES maruziyeti sonucu lipid, protein ve DNA üzerinde oksidatif hasar riskinin arttığı, hücrenin buna karşı antioksidan yanıt oluşturduğu gözlenmiştir. ES'nin koruyucu etki ihtimali sadece AA'nın yüksek dozlarında MDA düzeyleri artarken, ES'nin bu etkiyi azalttığı sonucu ile desteklenmektedir. Ancak, genel oksidatif hasar potansiyel durumu AA ve ES'nin maruziyet dozlarında oksidatif hasar yol açabileceği yönündedir.

AA, ES ve kombinasyonlarının apoptoz üzerine etkileri değerlendirildiğinde, maruziyet gruplarında gözlenen oksidatif hasar göstergelerine rağmen apoptotik etki gözlenmemiştir. Bu durum, AA ve ES'nin potansiyel anti-apoptotik etkilerine ve MCF-7 hücrelerinin apoptotik etkiye dirençli olmasına bağlanabilir (Simstein ve ark., 2003).

Yapılan çalışmalara göre apoptozun baskılanmasının birinci nedeni, AA ve ES'nin potansiyel anti-apoptotik etkilerine sahip olmasıdır. AA'nın 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunun farelerde anti-apoptoz, tümör baskılama ve yağ asidi sentezi ile ilgili genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2018). Benzer şekilde AA'nın sıçan dokularında tümör gelişimi için DNA sentezini apoptoz veya mitozda gözlenen herhangi bir değişiklik olmaksızın arttırdığı gözlenmiştir (Lafferty ve ark., 2004). Hücre proliferasyonunu uyaran ve çeşitli hücre tiplerinde hücre ölümünü önleyen bir mitojen olarak (Song ve Santen, 2003) ES'nin endotelial hücre kültüründe apoptozu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Alvarez ve ark., 1997).

İkinci nedeni ise, MCF-7'de içsel apoptotik dirence katkıda bulunabilecek, mitojenle aktiveleşen protein kinaz (MAPK) ailesinden MEK5-BMK1-Erk5 gibi ek potansiyel antiapoptotik proteinleri ortaya çıkaran gen dizisi çalışmalarına göre MCF-7 hücrelerinde apoptoz direnci olabilmektedir (Simstein ve ark., 2003). AA ve ES'nin anti-apoptotik etkileri ve MCF-7 hücrelerinin doğal apoptotik direnci, çalışmamızda gözlemlenen apoptotik tepkilerin eksikliğini destekleyebilir. Bununla birlikte, oksidatif stres belirteçlerinin varlığı, hücrelerin stres altında olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla hücrelerin nekroz veya otofaji gibi diğer hücre ölüm yollarına geçebileceği veya yaşlanma veya dönüşüm gibi değişikliklere uğrayabileceği düşünülebilir. Bu nedenle, apoptoz tayin verilerimize göre apoptoz indüksiyonu gözlenmemiş olsa da AA ve ES maruziyeti halinde farklı potansiyel hücresel tepkileri kapsamlı şekilde değerlendirmek üzere ileri kapsamlı değerlendirmenin yapılması yerinde olacaktır.

Sonuç olarak; çalışmamızda AA ve ES maruziyetinin MCF-7 hücrelerine etkileri oksidatif hasar, hücre ölümü ve proliferasyon süreçleri açısından değerlendirilmiştir. ES'nin AA toksisitesi üzerine modülatör etki gösterdiği, düşük ES konsantrasyonlarında AA'nın sitotoksik etkisini azalttığı ve dolayısıyla da ES'nin koruyucu olabileceği gözlenirken, yüksek ES konsantrasyonlarında, AA'nın toksik etkisinin ES ile daha da arttığı tespit edilmiştir. AA, ES ve kombinasyonları MCF-7 hücreleri üzerine genotoksik etki göstermiştir. MCF-7 hücrelerinin AA ve ES maruziyeti sonucu lipid, protein ve DNA üzerinde oksidatif hasar riskinin arttığı, hücrenin buna karşı antioksidan yanıt oluşturduğu gözlenmiştir. AA, ES ve kombinasyonlarına maruziyet gruplarında oksidatif hasar göstergelerine rağmen apoptotik etki gözlenmemiştir. Elde edilen veriler, ES ve AA arasındaki etkileşime ışık tutacağı ve potansiyel olarak meme hücrelerinde yeni toksisite mekanizmalarını ortaya çıkarabilmesi açısından önem taşımaktadır. AA ve ES'nin sağlık üzerine etkilerini daha iyi anlamak için başlangıç verilerini oluşturmakta olup bu konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ilham vermektedir. Hem ES hem de AA'ya insan popülasyonunda geniş ölçüde maruz kalınması göz önüne alındığında, bulguların halk sağlığı için önemli etkileri olabilmektedir. Ancak, *in vitro* koşulların insan vücuduyla tam uyumlu olmaması gibi kısıtlamaları bulunmaktadır. Bu sebeple, elde edilen bulguların ileri ve kapsamlı proje ile detaylı incelenmesi halinde kanser oluşumunda ve tedavisinde yeni stratejiler geliştirmeye katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Affinito, P., Palomba, S., Sorrentino, C., Di Carlo, C., Bifulco, G., Arienzo, M.P. ve ark. (1999). Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen. *Maturitas*, 33(3): 239-247. Erişim 22.01.2023 [https://doi.org/10.1016/S0378-5122\(99\)00077-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5122(99)00077-8).

Akgün, S. ve Sunar, İ. (2020). LC-MS/MS ile ambalajlanmış içme suyunda akrilamid tayini. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 91, 92 Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2020.76259>.

Allen, N.E., Key, T.J., Dossus, L., Rinaldi, S., Cust, A., Lukanova, A. ve ark. (2008). Endogenous sex hormones and endometrial cancer risk in women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Endocrine Related Cancer*, 2008 Jun; 15(2):485-497. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0064>.

Al-Safi, Z.A. ve Santoro, N. (2014). Menopausal hormone therapy and menopausal symptoms. *Fertility and Sterility*, 101(4):905-915. Erişim 22.01.2023.. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.02.032>.

Alturfan, A. A., Tozan-Beceren, A., şehirli, A. Ö., Demiralp, E., şener, G., & Omurtag, G. Z. (2012). Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Molecular biology reports*, 39, 4589-4596. Erişim: 22.01.2024 https://scholar.google.com/scholar?output=instlink&q=info:3K4Cd3X5C3QJ:scholar.google.com/&hl=tr&as_sdt=0,5&scillfp=8055310062757623434&oi=lle

Alvarez Jr, R.J., Gips, S.J., Moldovan, N., Wilhide, C.C., Milliken, E.E., Hoang, A.T. ve ark. (1997). 17 β -estradiol inhibits apoptosis of endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(2):372-381. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7085>.

Arusoğlu, G. (2015). Akrilamid oluşumu ve insan sağığına etkileri. *Akademik Gıda*, 13(1):61-71. Erişim ..22.01.2023 G. Arusoğlu *Akademik Gıda* 13(1) (2015) 61-71.

Erişim 22.01.2023. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1186426>.

Arvanitoyannis, I.S. ve Dionisopoulou, N. (2014). Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6):708-733. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.606378>.

Atay, N.Z., Çalgan, D., Özakat, E., Varnali, T. (2005). Acrylamide and

glycidamide adducts of Guanine. *Journal of Molecular Structure*, 728(1-3):249-251. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2005.06.039>.

Badawy, A.M., Elnashar, A.M., Mosbah, A.A. (2012). Aromatase inhibitors or gonadotropin-releasing hormone agonists for the management of uterine adenomyosis: a randomized controlled trial. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 91(4):489-495. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2012.01350.x>.

Barrett-Connor, E. (2007). Hormones and heart disease in women: The timing hypothesis. *American Journal of Epidemiology*, 166(5):506-510. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm214>.

Baum, M., Fauth, E., Fritzen, S., Herrmann, A., Mertes, P., Merz, K. ve ark. (2005). Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1-2):61-69. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.11.007>.

Beland, F.A., Mellick, P.W., Olson, G.R., Mendoza, M.C., Marques, M.M., Doerge, D.R. (2013). Carcinogenicity of acrylamide in B6C3F1 mice and F344/N rats from a 2-year drinking water exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 51:149-159. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.017>.

Beland, F.A., Olson, G.R., Mendoza, M.C., Marques, M.M., Doerge, D.R. (2015). Carcinogenicity of glycidamide in B6C3F1 mice and F344/N rats from a two-year drinking water exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 86:104-115. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.017>.

Besaratinia, A. ve Pfeifer, G.P. (2007). A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis*, 28(3):519-528. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm006>.

Blank, I., Robert, F., Goldmann, T., Pollien, P., Varga, N., Devaud, S. ve ark. (2005). Mechanisms of acrylamide formation: Maillard-induced transformation of asparagine. In *Chemistry and safety of acrylamide in food* (pp. 171-189). Springer US. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.004>.

Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5):288-298. Erişim 22.01.2023 <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>

Bosland, M. C. (2005). The role of estrogens in prostate carcinogenesis: a rationale for chemoprevention. *Reviews in Urology*, 7(3), S4. Erişim 22.01.2023. PMID: 16985878.

Bradlow, H.L., Hershcopf, R.J., Martucci, C.P., Fishman, J. (1985). Estradiol 16 alpha-hydroxylation in the mouse correlates with mammary tumor incidence and presence of murine mammary tumor virus: a possible model for the hormonal etiology of breast cancer in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(18):6295- 6299. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.18.6295>.

Brinton, R.D., Thompson, R.F., Foy, M.R., Baudry, M., Wang, J., Finch, C.E. ve ark. (2008). Progesterone receptors: form and function in brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(2):313-339. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.02.001>.

Bulun, S.E., Lin, Z., Zhao, H., Lu, M., Amin, S., Reierstad, S. ve ark. (2009). Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1155(1):121-131. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03705.x>.

Burow, M.E., Tang, Y., Collins-Burow¹, B.M., Krajewski, S., Reed, J.C., McLachlan, J.A. ve ark. (1999). Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, 20(11):2057-2061. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.11.2057>.

Bušová, M., Bencko, V., Laktičová, K.V., Holcátová, I., Vargová, M. (2020). Risk of exposure to acrylamide. *Central European Journal of Public Health*, 28:S43-S46. Eriřim 22.01.2023 <https://doi.org/10.21101/cejph.a6177>.

Canonico, M., Oger, E., Plu-Bureau, G., Conard, J., Meyer, G., Lévesque, H. ve ark. (2007). Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the Esther study. *Circulation*, 115(7):840-845. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.642280>.

Cao, C., Shi, H., Zhang, M., Bo, L., Hu, L., Li, S. ve ark. (2018). Metabonomic analysis of toxic action of long-term low-level exposure to acrylamide in rat serum. *Human and Experimental Toxicology*, 37(12):1282-1292. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1177/0960327118769708>.

Cao, J., Liu, Y., Jia, L., Jiang, L. P., Geng, C. Y., Yao, X. F. ve ark. (2008). Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells

by ROS scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24):12059-12063. Erişim 22.01.2023. <https://doi.org/10.1021/jf8026827>.

Carere, A. (2006). Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. *Annali-Istituto Superiore Di Sanita*, 42(2):144-155. Erişim 22.01.2023. PMID: 17033134.

Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1):1-6. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-35>.

Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J.G., Rogan, E., Roy, D. (2000). Chapter 4: Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNA adducts and mutations. *JNCI Monographs*, 2000(27):75-94. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024247>.

Cavalieri, E.L. ve Rogan, E.G. (2011). Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(3-5):169-180. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.03.008>.

Catalgol, B., Özhan, G., Alpertunga, B. (2009). Acrylamide-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Human Experimental Toxicology*, 28(10), 611-617. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1177/0960327109350664>.

Chen, D., Liu, H., Wang, E., Yan, H., Ye, H., Yuan, Y. (2018). Toxicogenomic evaluation of liver responses induced by acrylamide and glycidamide in male mouse liver. *General Physiology and Biophysics*, 37(2):175-184. Erişim 22.01.2024.

https://doi.org/10.4149/gpb_2017034.

Cui, J., Shen, Y., Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*, 19(3):197-209. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007>.

Çelik, F.S., Cora, T., Yigin, A.K. (2018). Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of acrylamide in HEK293 cell line. *Journal of Cancer Prevention and Current Research*, 9:260-264. Erişim 22.01.2024. <http://doi.org/10.15406/jcpcr.2018.09.00365>.

Das, A.B. ve Srivastav, P.P. (2012). Acrylamide in snack foods. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(3):163-169. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.3109/15376516.2011.623329>.

Davey, D.A. (2018). Menopausal hormone therapy: a better and safer future. *Climacteric*, 21(5):454-461. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1080/13697137.2018.1439915>.

Davis, S.R., Castelo-Branco, C., Chedraui, P., Lumsden, M.A., Nappi, R.E., Shah,

D. ve ark. (2012). Understanding weight gain at menopause. *Climacteric*, 15(5):419-429. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.3109/13697137.2012.707385>.

Dearfield, K.L., Abernathy, C.O., Ottley, M.S., Brantner, J.H., Hayes, P.F. (1988). Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 195(1):45-77. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(88\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0165-1110(88)90015-2).

Dearfield, K.L., Douglas, G.R., Ehling, U.H., Moore, M.M., Segal, G.A., Brusick,

D.J. (1995). Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of mutagenesis*, 330(1-2):71-99. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00037-J](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00037-J).

Desbrow, C.E.J.R., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science and Technology*, 32(11):1549- 1558. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1021/es9707973>.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A.M. ve ark. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4):293-342. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>.

Dooley, M., Spencer, C.M., Ormrod, D. (2001). Estradiol-intranasal: a review of its use in the management of menopause. *Drugs*, 61(15):2243-2262. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161150-00012>.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6), 4104. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104>.

Eisenbrand, G. (2020). Revisiting the evidence for genotoxicity of acrylamide (AA), key to risk assessment of dietary AA exposure. *Archives of Toxicology*, 94(9):2939-2950. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02794-3>.

Eliassen, A.H. ve Hankinson, S.E. (2008). Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers: prospective studies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 630:148-165. Erişim 22.01.2024. PMID: 18637490.

Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative Group. (2003). Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(16):1218-1226. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1093/jnci/djg022>.

Engler-Chiurazzi, E.B., Brown, C.M., Povroznik, J.M., Simpkins, J.W. (2017). Estrogens as neuroprotectants: estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury. *Progress in Neurobiology*, 157:188-211. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.008>.

Exon, J.H. (2006). A review of the toxicology of acrylamide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9(5):397-412. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1080/10937400600681430>.

Jin, F. A. N. G., Liang, C. L., Jia, X. D., & Ning, L. I. (2014). Immunotoxicity of acrylamide in female BALB/c mice. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27(6): 401-409. Erişim 22.01.2024 <https://doi.org/10.3967/bes2014.069>.

Fazendeiro, M.S.P.P. (2013). DNA damage induced by acrylamide: roe of genetic polymorphisms in DNA damage levels. Erişim 22.01.2024.

<https://run.unl.pt/bitstream/10362/10000/1/Fazendeiro%20Marta%20TD%202013.pdf>

Felty, Q., Xiong, W.C., Sun, D., Sarkar, S., Singh, K.P., Parkash, J. ve ark. (2005). Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry*, 44(18):6900-6909. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1021/bi047629p>.

Fennell TR, Friedman MA. Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Adv Exp Med Biol.* 2005;561:109-16. Erişim 22.01.2024. [https://doi:10.1007/0-387-24980-X_9](https://doi.org/10.1007/0-387-24980-X_9). PMID: 16438293.

Finkelstein, J.S., Lee, H., Burnett-Bowie, S.A.M., Pallais, J.C., Yu, E.W., Borges,

L.F. ve ark. (2013). Gonadal steroids and body composition, strength, and sexual function in men. *New England Journal of Medicine*, 369(11):1011-1022. Erişim 22.01.2024. [https://doi:10.1056/NEJMoa1206168](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1206168).

Fischer, W.H., Keiwan, A., Schmitt, E., Stopper, H. (2001). Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis*, 16(3):209-212. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1093/mutage/16.3.209>.

Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16):4504-4526. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1021/jf030204+>

Fuhr, U., Boettcher, M.I., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A. ve ark. (2006). Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 15(2):266-271. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0647>.

Fuhrman, B.J., Schairer, C., Gail, M.H., Boyd-Morin, J., Xu, X., Sue, L.Y. ve ark. (2012). Estrogen metabolism and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(4):326-339. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1093/jnci/djr531>.

Galea, L.A., Frick, K.M., Hampson, E., Sohrabji, F., Choleris, E. (2017). Why estrogens matter for behavior and brain health. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 76:363-379. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.024>.

Gedik, S., Erdemli, M.E., Gul, M., Yigitcan, B., Bag, H.G., Aksungur, Z. ve ark. (2017). Hepatoprotective effects of crocin on biochemical and histopathological alterations following acrylamide-induced liver injury in Wistar rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 95:764-770. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.139>.

Ghorbel, I., Elwej, A., Chaabene, M., Boudawara, O., Marrakchi, R., Jamoussi, K. ve ark. (2017). Effects of acrylamide graded doses on metallothioneins I and II induction and DNA fragmentation: Biochemical and histomorphological changes in the liver of adult rats. *Toxicology and Industrial Health*, 33(8):611-622. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1177/0748233717696613>.

Gleason, C.E., Dowling, N.M., Wharton, W., Manson, J.E., Miller, V.M., Atwood, C.S. ve ark. (2015). Effects of hormone therapy on cognition and mood in recently postmenopausal women: findings from the randomized, controlled KEEPS—cognitive and affective study. *PLoS Medicine*, 12(6):e1001833. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001833>.

Haber, L.T., Maier, A., Kroner, O.L., Kohrman, M.J. (2009). Evaluation of human relevance and mode of action for tunica vaginalis mesotheliomas resulting from oral exposure to acrylamide. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53(2):134-149. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.12.008>.

Hale, G.E. ve Burger, H.G. (2009). Hormonal changes and biomarkers in late reproductive age, menopausal transition and menopause. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 23(1):7-23. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2008.10.001>

Hembree, W.C., Cohen-Kettenis, P.T., Gooren, L., Hannema, S.E., Meyer, W.J., Murad, M.H., (2017). Endocrine treatment of gender-dysphoric/gender-incongruent persons: an endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(11):3869-3903. Erişim 22.01.2024 <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01658>.

Herbison, A.E. (2015). Physiology of the adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 399-467. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00011-9>.

Herrington, D.M., Howard, T.D., Brosnihan, K.B., McDonnell, D.P., Li, X., Hawkins, G.A. ve ark. (2002). Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation*, 105(16):1879-1882. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000016173.98826.88>.

Hewitt, S.C. ve Korach, K.S. (2003). Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors a and b in reproductive tissues. *Reproduction*, 125(2):143-149. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250143>.

Hinfray, N., Porcher, J.M., Brion, F. (2006). Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 144(3):252-262. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.09.002>.

Hogervorst, J.G., Fortner, R.T., Mucci, L.A., Tworoger, S.S., Eliassen, A.H., Hankinson, S.E. ve ark. (2013a). Associations between dietary acrylamide intake and plasma sex hormone levels. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 22(11), 2024-2036. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0509>.

Hogervorst, E. (2013b). Effects of gonadal hormones on cognitive behaviour in elderly men and women. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(11):1182-1195. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1111/jne.12080>.

Hogervorst, J.G., van den Brandt, P.A., Godschalk, R.W., van Schooten, F.J., Schouten, L.J. (2017). Interactions between dietary acrylamide intake and genes for ovarian cancer risk. *European Journal of Epidemiology*, 32:431-441. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s10654-017-0244-0>.

Hohmann, F.P., Macklon, N.S., Fauser, B.C. (2003). A randomized comparison of two ovarian stimulation protocols with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle-stimulating hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long GnRH agonist protocol. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(1):166-173. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020788>.

Hułas-Stasiak, M., Dobrowolski, P., Tomaszewska, E., Kostro, K. (2013). Maternal acrylamide treatment reduces ovarian follicle number in newborn guinea pig offspring. *Reproductive Toxicology*, 42:125-131. Eriřim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.007>.

Ikeda, G.J., Miller, E., Sapienza, P.P., Michel, T.C., King, M.T., Sager, A.O. (1985). Maternal-foetal distribution studies in late pregnancy. II. Distribution of [1-14C]

acrylamide in tissues of beagle dogs and miniature pigs. *Food and Chemical Toxicology*, 23(8):757-761. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90271-6](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90271-6).

Jägerstad, M., ve Skog, K. (2005). Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 574(1-2):156-172. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.01.030>.

Janssen, I., Powell, L.H., Kazlauskaitė, R., Dugan, S.A. (2010). Testosterone and visceral fat in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) fat patterning study. *Obesity*, 18(3):604-610. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.251>.

Je, Y. (2015). Dietary acrylamide intake and risk of endometrial cancer in prospective cohort studies. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 291:1395-1401. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3595-8>.

Jiang, L., Cao, J., An, Y., Geng, C., Qu, S., Jiang, L., ve ark. (2007). Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicology in Vitro*, 21(8):1486- 1492. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.011>.

Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M. ve ark. (2006). Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives*, 114(1):32-39. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1289/ehp.8050>.

Johnson, K.A., Gorzinski, S.J., Bodner, K.M., Campbell, R.A., Wolf, C.H., Friedman, M.A., ve ark. (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 85(2):154-168. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90109-2](https://doi.org/10.1016/0041-008X(86)90109-2).

Kabat GC, O'Leary ES, Gammon MD, Sepkovic DW, Teitelbaum SL, Britton JA, ve ark. (2006). Estrogen metabolism and breast cancer. *Epidemiology*, 17(1):80-88. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000190543.40801.75>.

Kacar, S.E.D.A.T., Vejselova, D., Kutlu, H.M., Sahinturk, V. (2018). Acrylamide-derived cytotoxic, anti-proliferative, and apoptotic effects on A549 cells. *Human and Experimental Toxicology*, 37(5):468-474. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1177/0960327117712386>.

Kacar, S., Sahinturk, V., Kutlu, H.M. (2019). Effect of acrylamide on BEAS-2B normal human lung cells: Cytotoxic, oxidative, apoptotic and morphometric analysis. *Acta Histochemica*, 121(5):595-603. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.05.005>.

Kalfa, N., Paris, F., Philibert, P., Orsini, M., Broussous, S., Fauconnet-Servant, N. ve ark. (2015). Is hypospadias associated with prenatal exposure to endocrine disruptors? A French collaborative controlled study of a cohort of 300 consecutive children without genetic defect. *European Urology*, 68(6):1023-1030. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.05.008>.

Khanal, S.K., Xie, B., Thompson, M.L., Sung, S., Ong, S.K., Van Leeuwen, J. (2006). Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environmental Science and Technology*, 40(21):6537-6546. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1021/es0607739>.

Kim, S.M., Baek, J.M., Lim, S.M., Kim, J.Y., Kim, J., Choi, I. ve ark. (2015).

Modified lipoproteins by acrylamide showed more atherogenic properties and exposure of acrylamide induces acute hyperlipidemia and fatty liver changes in zebrafish. *Cardiovascular Toxicology*, 15:300-308. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1007/s12012-014-9294-7>.

Klaunig, J.E. ve Kamendulis, L.M. (2005). Mechanisms of acrylamide induced rodent carcinogenesis. In *Chemistry and safety of acrylamide in food* (pp. 49-62). Springer US. Erişim 22.01.2024. https://doi.org/10.1007/0-387-24980-x_4.

Klein, K.O. ve Phillips, S.A. (2019). Review of hormone replacement therapy in girls and adolescents with hypogonadism. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 32(5):460-468. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1016/j.jpag.2019.04.010>.

Klein, S.L. ve Flanagan, K.L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10):626-638. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>.

Kopp, E.K. ve Dekant, W. (2009). Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses. *Toxicology and Applied*

Pharmacology, 235(2):135-142. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.001>.

Kovács, T., Szabó-Meleg, E., Ábrahám, I.M. (2020). Estradiol-induced epigenetically mediated mechanisms and regulation of gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9):3177. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.3390/ijms21093177>.

Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M. ve ark. (2006). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 603(2):151-158. Erişim 22.01.204. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.11.006>.

Kraus, D., Rokitta, D., Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D. (2013). The role of human cytochrome P450 enzymes in metabolism of acrylamide in vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(5):346-351. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.3109/15376516.2012.759307>.

Kuhl, H. (2005). Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric*, 8(1), 3-63. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1080/13697130500148875>.

Kumar, J., Das, S., Teoh, S.L. (2018). Dietary acrylamide and the risks of developing cancer: facts to ponder. *Frontiers in Nutrition*, 5:323710. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00014>.

Labrie, F. (2015). All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissues by the mechanisms of intracrinology after menopause. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 145:133-138. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.06.001>.

Lafferty, J.S., Kamendulis, L.M., Kaster, J., Jiang, J., Klaunig, J.E. (2004). Subchronic acrylamide treatment induces a tissue-specific increase in DNA synthesis in the rat. *Toxicology Letters*, 154(1-2):95-103. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.07.008>.

Länge, R., Hutchinson, T.H., Croudace, C.P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P. ve ark. (2001). Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and*

Chemistry: An International Journal, 20(6):1216-1227. Erişim 22.01.2024.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620200610>.

Larsson, D.J., Hallman, H., Förlin, L. (2000). More male fish embryos near a pulp mill. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 19(12):2911-2917. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1002/etc.5620191210>.

Larsson, S.C., Åkesson, A., Wolk, A. (2009). Long-term dietary acrylamide intake and breast cancer risk in a prospective cohort of Swedish women. American Journal of Epidemiology, 169(3):376-381. Erişim 22.01.2024.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwn319>.

Lee, T., Manjanatha, M.G., Aidoo, A., Moland, C.L., Branham, W.S., Fuscoe, J.C., ve ark. (2012). Expression analysis of hepatic mitochondria-related genes in mice exposed to acrylamide and glycidamide. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 75(6):324-339. Erişim 22.01.2024.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2012.668160>.

Lineback, D.R., Coughlin, J.R., Stadler, R.H. (2012). Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. Annual Review of Food Science and Technology, 3:15-35. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101114>.

Lingnert, H., Grivas, S., Jägerstad, M., Skog, K., Törnqvist, M., Åman, P. (2002). Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. Scandinavian Journal of Nutrition, 46(4):159-172. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1080/110264802762225273>.

Lippert, C., Seeger, H., Mueck, A.O. (2003). The effect of endogenous estradiol metabolites on the proliferation of human breast cancer cells. Life Sciences, 72(8):877-883. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02305-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02305-6).

Liu, S., Ying, G.G., Zhao, J.L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L.J., ve ark. (2011). Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1218(10):1367-1378. Erişim 22.01.2024.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.014>.

Lopez, M. ve Tena-Sempere, M. (2015). Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26(8):411-421. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.003>.

Luine, V.N. (2014). Estradiol and cognitive function: past, present and future. *Hormones and Behavior*, 66(4):602-618. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.08.011>.

Maleki, J., Nourbakhsh, M., Shabani, M., Korani, M., Nourazarian, S.M., Dahaghi, M.R.O., ve ark. (2015). 17 β -Estradiol stimulates generation of reactive species oxygen and nitric oxide in ovarian adenocarcinoma cells (OVCAR 3). *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 8(3):e2332. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.17795%2Fijcp2332>.

Marlowe, C., Clark, M.J., Mast, R.W., Friedman, M.A., Waddell, W.J. (1986). The distribution of [¹⁴C] acrylamide in male and pregnant Swiss-Webster mice studied by whole-body autoradiography. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 86(3):457-465. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90373-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(86)90373-X).

Matoso, V., Bargi-Souza, P., Ivanski, F., Romano, M.A., Romano, R.M. (2019). Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food Chemistry*, 283:422-430 Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.054>.

McCarthy, M.M. (2008). Estradiol and the developing brain. *Physiological Reviews*, 88(1):91-134. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2007>.

Mei, N., Hu, J., Churchwell, M.I., Guo, L., Moore, M.M., Doerge, D.R. ve ark. (2008). Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2):628-636. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.093>

Mendelsohn, M.E. ve Karas, R.H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine*, 340(23):1801-1811. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1056/nejm199906103402306>.

Mendelsohn, M.E. ve Karas, R.H. (2005). Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*, 308(5728):1583-1587. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1126/science.1112062>.

Mikkola, T.S. ve Clarkson, T.B. (2002). Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovascular Research*, 53(3):605-619. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00466-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00466-7).

Miller, M.J., Carter, D.E., Sipes, I.G. (1982). Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 63(1):36-44. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(82\)90024-2](https://doi.org/10.1016/0041-008X(82)90024-2).

Miller, W.L. (2013). Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 379(1-2):62-73. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.014>.

Mills, C., Mottram, D.S., Wedzicha, B.L. (2008). Acrylamide. *Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks*:21-50. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1002/9780470430101>.

Mojška, H., Gielecińska, I., Cendrowski, A. (2016). Acrylamide content in cigarette mainstream smoke and estimation of exposure to acrylamide from tobacco smoke in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(3). Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.5604/12321966.1219187>

Moldoveanu, S.C. ve Gerardi, A.R. (2011). Acrylamide analysis in tobacco, alternative tobacco products, and cigarette smoke. *Journal of Chromatographic Science*, 49(3):234-242. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1093/chrsci/49.3.234>.

Mollakhalili-Meybodi, N., Khorshidian, N., Nematollahi, A., Arab, M. (2021). Acrylamide in bread: a review on formation, health risk assessment, and determination by analytical techniques. *Environmental Science and Pollution Research*, 28:15627-15645. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12775-3>.

Morale, M.C., Serra, P.A., L'Episcopo, F., Tirolo, C., Caniglia, S., Testa, N. ve ark. (2006). Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience*, 138(3):869-878. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.060>.

Nagata, C., Konishi, K., Wada, K., Tamura, T., Goto, Y., Koda, S., ve ark. (2019). Maternal acrylamide intake during pregnancy and sex hormone levels in maternal and umbilical cord blood and birth size of offspring. *Nutrition and Cancer*, 71(1):77-82. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1524018>.

Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G. ve ark. (2004). Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives*, 112(17):1725-1733. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1289/ehp.7209>.

National Toxicology Program. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of acrylamide. NTP CERHR MON. 2005 Feb;(14):v-I-2, II-xi-166, III-1-74. PMID: 15995732. Newson, L. (2018). Menopause and

cardiovascular disease. *Post Reproductive Health*, 24(1):44-49. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1177/2053369117749675>.

Management of symptomatic vulvovaginal atrophy: 2013 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2013 Sep;20(9):888-902; quiz 903-4. <https://doi.org/10.1097/GME.0b013e3182a122c2>.

Notelovitz, M., Funk, S., Nanavati, N., Mazzeo, M. (2002). Estradiol absorption from vaginal tablets in postmenopausal women. *Obstetrics and Gynecology*, 99(4):556-562. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(01\)01385-0](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(01)01385-0).

Nowak, A., Zakłos-Szyda, M., Żyżelewicz, D., Koszucka, A., Motyl, I. (2020). Acrylamide decreases cell viability, and provides oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Molecules*, 25(2):368-???. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.3390/molecules25020368>.

Obón-Santacana, M., Freisling, H., Peeters, P.H., Lujan-Barroso, L., Ferrari, P., Boutron-Ruault, M.C. ve ark. (2016). Acrylamide and glycidamide hemoglobin adduct levels and endometrial cancer risk: a nested case-control study in nonsmoking postmenopausal women from the EPIC cohort. *International Journal of Cancer*, 138(5):1129-1138. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1002/ijc.29853>.

Obón-Santacana, M., Kaaks, R., Slimani, N., Lujan-Barroso, L., Freisling, H., Ferrari, P., ve ark. (2014). Dietary intake of acrylamide and endometrial cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *British Journal of Cancer*, 111(5):987-997. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.328>.

Ockrim, J., Lalani, E.N., Abel, P. (2006). Therapy insight: parenteral estrogen treatment for prostate cancer—a new dawn for an old therapy. *Nature Clinical Practice Oncology*, 3(10):552-563. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1038/ncponc0602>.

O'Connell, M.B. (1995). Pharmacokinetic and pharmacologic variation between different estrogen products. *Journal of Clinical Pharmacology*, 35(9S):18S-24S. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1995.tb04143.x>.

Oda, T., Ikeda, N., Nakashima, S., Sato, Y. (2002). Cytotoxicity of estradiol, equilin, equilenin, and their derivatives on Chinese hamster V79 cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 25(1):75-82. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1081/DCT-100108473>.

Olié, V., Plu-Bureau, G., Conard, J., Horellou, M.H., Canonico, M., Scarabin, P. Y. (2011). Hormone therapy and recurrence of venous thromboembolism among postmenopausal women. *Menopause*, 18(5):488-493. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e3181f9f7c3>

Olsen, A., Christensen, J., Outzen, M., Olesen, P.T., Frandsen, H., Overvad, K. ve ark (2012). Pre-diagnostic acrylamide exposure and survival after breast cancer among postmenopausal Danish women. *Toxicology*, 296(1-3):67-72. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.03.004>.

Österlund, M.K., Grandien, K., Keller, E., Hurd, Y.L. (2000). The human brain has distinct regional expression patterns of estrogen receptor α mRNA isoforms derived from alternative promoters. *Journal of Neurochemistry*, 75(4):1390-1397. Erişim 22.01.2024ç <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751390.xç>

Pan, X., Wu, X., Yan, D., Peng, C., Rao, C., Yan, H. (2018). Acrylamide-induced oxidative stress and inflammatory response are alleviated by N-acetylcysteine in PC12 cells: Involvement of the crosstalk between Nrf2 and NF- κ B pathways regulated by MAPKs. *Toxicology Letters*, 288:55-64. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.002>.

Park, J., Kamendulis, L.M., Friedman, M.A., Klaunig, J.E. (2002). Acrylamide-induced cellular transformation. *Toxicological Sciences*, 65(2):177-183. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.177>.

Parzefall, W. (2008). Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4):1360-1364. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.027>.

Payne, A.H., Hales, D.B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25(6):947-970. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>.

Petraglia, F., Florio, P., Nappi, C., Genazzani, A.R. (1996). Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocrine Reviews*, 17(2):156-186. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-156>.

Plant, T.M. ve Marshall, G.R. (2001). The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocrine Reviews*, 22(6):764-786. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0446>.

Pruser, K.N. ve Flynn, N.E. (2011). Acrylamide in health and disease. *Frontiers in Bioscience-Scholar*, 3(1):41-51. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.2741/s130>.

Puppel, N., Tjaden, Z., Fueller, F., Marko, D. (2005). DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1-2):71-80. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.11.009>.

Renoux C, Dell'aniello S, Garbe E, Suissa S. Transdermal and oral hormone replacement therapy and the risk of stroke: a nested case-control study. *BMJ*. 2010 3;340:c2519. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1136/bmj.c2519>. PMID: 20525678.

Rifai, L. ve Saleh, F.A. (2020). A review on acrylamide in food: Occurrence, toxicity, and mitigation strategies. *International Journal of Toxicology*, 39(2):93-102. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1177/1091581820902405>.

Riggs, B.L. (2000). The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *Journal of Clinical Investigation*, 106(10):1203-1204. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1172/jci11468>.

Rizzoli, R., Bianchi, M.L., Garabédian, M., McKay, H.A., Moreno, L.A. (2010). Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. *Bone*, 46(2):294-305. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.10.005>.

Robinson, D. ve Cardozo, L.D. (2003). The role of estrogens in female lower urinary tract dysfunction. *Urology*, 62(4):45-51. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(03\)00676-9](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(03)00676-9).

Rochester, J.R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42:132-155. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>.

Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L. ve ark. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 288(3):321-333. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1001/jama.288.3.321>.

Rossouw, J.E., Prentice, R.L., Manson, J.E., Wu, L., Barad, D., Barnabei, V.M. ve ark. (2007). Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *Journal of the American Medical Association*, 297(13):1465-1477. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1001/jama.297.13.1465>.

Roth, M.Y., Amory, J.K., Page, S.T. (2008). Treatment of male infertility secondary to morbid obesity. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, 4(7):415-419. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0844>.

Russo, J.I.H.R. ve Russo, I.H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102(1-5):89-96. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.004>.

Sahinturk, V., Kacar, S., Vejselova, D., Kutlu, H.M. (2018). Acrylamide exerts its cytotoxicity in NIH/3T3 fibroblast cells by apoptosis. *Toxicology and Industrial Health*, 34(7):481-489. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1177/0748233718769806>.

Sampson, J.N., Falk, R.T., Schairer, C., Moore, S.C., Fuhrman, B.J., Dallal, C.M. ve ark. (2017). Association of estrogen metabolism with breast cancer risk in different cohorts of postmenopausal women. *Cancer Research*, 77(4):918-925. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1717>.

Sanaei, M., Kavooosi, F., Dehghani, F. (2018). Comparative analysis of the effects of 17-beta estradiol on proliferation, and apoptosis in hepatocellular carcinoma Hep G2

and LCL-PI 11 cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 19(9):2637. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.9.2637>.

Santen, R.J., Yue, W., Wang, J.P. (2015). Estrogen metabolites and breast cancer.

Steroids, 99:61-66. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.003>.

Schieberle, P., Köhler, P., Granvogl, M. (2005). New aspects on the formation and analysis of acrylamide. In *Chemistry and safety of acrylamide in food* (pp. 205-222). Springer US. Erişim 22.01.2024. https://doi.org/10.1007/0-387-24980-x_16.

Schneider, J., Kinne, D., Fracchia, A., Pierce, V., Anderson, K.E., Bradlow, H.L. ve ark. (1982). Abnormal oxidative metabolism of estradiol in women with breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(9):3047-3051. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.9.3047>.

Sedlak J ve Lindsay RH. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25:192-205. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4).

Seeger, H., Deuringer, F.U., Wallwiener, D., Mueck, A.O. (2004). Breast cancer risk during HRT: influence of estradiol metabolites on breast cancer and endothelial cell proliferation. *Maturitas*, 49(3):235-240. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.02.004>.

Sega, G.A., Alcota, R.P.V., Tancongco, C.P., Brimer, P.A. (1989). Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 216(4):221-230. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(89\)90008-3](https://doi.org/10.1016/0165-1161(89)90008-3).

Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Tilton, S.C. (2022). Safety assessment of polyacrylamide as used in cosmetics. Erişim 22.01.2024. https://www.cir-safety.org/sites/default/files/RR_Polyacrylamide.pdf.

Shao, H., Breitner, J.C., Whitmer, R.A., Wang, J., Hayden, K., Wengreen, H., ve ark. (2012). Hormone therapy and Alzheimer disease dementia: new findings from the Cache County Study. *Neurology*, 79(18):1846-1852. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318271f823>.

Shipp, A., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T., Bartow, H., Bounds, J., ve ark. (2006). Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(6-7):481-608. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1080/10408440600851377>.

Shumaker, S.A., Legault, C., Kuller, L., Rapp, S.R., Thal, L., Lane, D.S., ve ark. (2004). Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *Journal of the American Medical Association* 291(24):2947-2958. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1001/jama.291.24.2947>.

Simpson, E.R. (2003). Sources of estrogen and their importance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86(3-5):225-230. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00360-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00360-1).

Simpson, E.R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W.C., Robertson, K., Britt, K., ve ark. (2002). Aromatase—a brief overview. *Annual Review of Physiology*, 64(1):93-127. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081601.142703>.

Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C., Beckman, B. (2003). Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental Biology and Medicine*, 228(9):995-1003. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1177/153537020322800903>.

Sitruk-Ware, R.L., Menard, J., Rad, M., Burggraaf, J., de Kam, M.L., Tokay, B. A., ve ark. (2007). Comparison of the impact of vaginal and oral administration of combined hormonal contraceptives on hepatic proteins sensitive to estrogen. *Contraception*, 75(6):430-437. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2007.01.027>.

Skerrett-Byrne, D.A., Nixon, B., Bromfield, E.G., Breen, J., Trigg, N.A., Stanger, S.J., ve ark. (2021). Transcriptomic analysis of the seminal vesicle response to the reproductive toxicant acrylamide. *BMC BioMed Central Genomics*, 22:1-22. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07951-1>.

Smith, M.R., Lee, W.C., Brandman, J., Wang, Q., Botteman, M., Pashos, C.L. (2005). Gonadotropin-releasing hormone agonists and fracture risk: a claims-based

cohort study of men with nonmetastatic prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31):7897-7903. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.00.6908>.

Soares, C.M., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P. (2015). Acrylamide in coffee: Influence of processing. In *Processing and impact on active components in food* (pp. 575- 582). Academic Press. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00069-X>.

Sobel, W., Bond, G.G., Parsons, T.W., Brenner, F.E. (1986). Acrylamide cohort mortality study. *British Journal of Industrial Medicine*, 43(11):785-8. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1136/oem.43.11.785>.

Song, D., Xu, C., Holck, A.L., Liu, R. (2021). Acrylamide inhibits autophagy, induces apoptosis and alters cellular metabolic profiles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208:111543. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111543>.

Song, R.X.D. ve Santen, R.J. (2003). Apoptotic action of estrogen. *Apoptosis*, 8:55-60. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1023/a:1021649019025>.

Song, R.X.D., Zhang, Z., Mor, G., Santen, R.J. (2005). Down-regulation of Bcl-2 enhances estrogen apoptotic action in long-term estradiol-depleted ER+ breast cancer cells. *Apoptosis*, 10:667-678. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s10495-005-1903-2>.

Södergard, R., Bäckström, T., Shanbhag, V., Carstensen, H. (1982). Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 β to human plasma proteins at body temperature. *Journal of Steroid Biochemistry*, 16(6):801-810. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(82\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0022-4731(82)90038-3).

Sörgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M., Skott, A., Landersdorfer, C. (2003). Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy*, 48(6):267-274. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1159/000069715>.

Stadler, R.H. ve Scholz, G. (2004). Acrylamide: an update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control.

Nutrition Reviews, 62(12):449-467. Erişim 22.01.2024.
<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2004.tb00018.x>.

Stanczyk, F.Z., Archer, D.F., Bhavnani, B.R. (2013). Ethinyl estradiol and 17 β -estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception*, 87(6):706-727. Erişim 22.01.2024.
<https://doi.org/10.1016/j.contraception.2012.12.011>.

Stojanovska, S. ve Tomovska, J. (2015). Factors influence to formation of acrylamide in food. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 13(4):10-15. Erişim 22.01.2024.

https://eprints.uklo.edu.mk/id/eprint/4791/1/FACTORS_INFLUENCE_TO_FORMATI_ON_OF_ACRYLA.pdf

Stopper, H., Schmitt, E., Gregor, C., Mueller, S.O., Fischer, W.H. (2003). Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells. *Mutagenesis*, 18(3):243-247. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.3.243>.

Straub, R.H. (2007). The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Reviews*, 28(5):521-574. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0001>.

Sturdee, D.W. ve Panay, N.A. (2010). Recommendations for the management of postmenopausal vaginal atrophy. *Climacteric*, 13(6):509-522. Erişim 22.01.2024.
<https://doi.org/10.3109/13697137.2010.522875>.

Sumner, S.C., Williams, C.C., Snyder, R.W., Krol, W.L., Asgharian, B., Fennell, T.R. (2003). Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicological Sciences*, 75(2):260-270. Erişim 22.01.2024 <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg191>.

Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R.H., ve ark. (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. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1080/10408690490478082>.

Tepe, Y. ve Çebi, A. (2019). Acrylamide in environmental water: a review on sources, exposure, and public health risks. *Exposure and Health*, 11:3-12. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s12403-017-0261-y>.

Thilagam, H., Gopalakrishnan, S., Qu, H.D., Bo, J., Wang, K.J. (2010). 17 β estradiol induced ROS generation, DNA damage and enzymatic responses in the hepatic tissue of Japanese sea bass. *Ecotoxicology*, 19:1258-1267. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0510-3>.

Thornton, M.J. (2002). The biological actions of estrogens on skin. *Experimental Dermatology*, 11(6):487-502. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2002.110601.x>.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Letters*, 227(2):115-124. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.10.007>.

Tworoger, S.S., Lee, I.M., Buring, J.E., Hankinson, S.E. (2008). Plasma androgen concentrations and risk of incident ovarian cancer. *American Journal of Epidemiology*, 167(2):211-218. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm278>.

Tyl, R.W. ve Friedman, M.A. (2003). Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reproductive Toxicology*, 17(1):1-13. Erişim 22.01.2024. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00078-3).

Vina, J. ve Lloret, A. (2010). Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid- β peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(s2):S527-S533. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100501>

Virk-Baker, M.K., Nagy, T.R., Barnes, S., Groopman, J. (2014). Dietary acrylamide and human cancer: a systematic review of literature. *Nutrition and Cancer*, 66(5):774-790. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.916323>

von Stedingk, H., Vikstrom, A.C., Rydberg, P., Pedersen, M., Nielsen, J.K., Segerback, D., ve ark. (2011). Analysis of hemoglobin adducts from acrylamide, glycidamide, and ethylene oxide in paired mother/cord blood samples from Denmark. *Chemical Research in Toxicology*, 24(11):1957-1965. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1021/tx200284u>.

von Tungeln, L.S., Doerge, D.R., Gamboa da Costa, G., Matilde Marques, M., Witt, W.M., Koturbash, I., ve ark. (2012). Tumorigenicity of acrylamide and its

metabolite glycidamide in the neonatal mouse bioassay. *International Journal of Cancer*, 131(9):2008-2015. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1002/ijc.27493>.

Walsh, B.W., Schiff, I., Rosner, B., Greenberg, L., Ravnkar, V., Sacks, F.M. (1991). Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *New England Journal of Medicine*, 325(17):1196-1204. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1056/NEJM199110243251702>.

Watzek, N., Böhm, N., Feld, J., Scherbl, D., Berger, F., Merz, K.H., ve ark. (2012). N 7-glycidamide-guanine DNA adduct formation by orally ingested acrylamide in rats: a dose-response study encompassing human diet-related exposure levels. *Chemical Research in Toxicology*, 25(2):381-390. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1021/tx200446z>.

Wei, Q., Li, J., Li, X., Zhang, L., Shi, F. (2014). Reproductive toxicity in acrylamide-treated female mice. *Reproductive Toxicology*, 46:121-128. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.03.007>.

Weinshilboum, R. ve Wang, L. (2006). Pharmacogenomics: bench to bedside.

Focus, 3(3):739-441. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1176/foc.4.3.431>.

Wilson, K.M., Vesper, H.W., Tocco, P., Sampson, L., Rosén, J., Hellenäs, K.E., ve ark. (2009). Validation of a food frequency questionnaire measurement of dietary acrylamide intake using hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. *Cancer Causes and Control*, 20:269-278. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9241-7>.

World Health Organisation (WHO) (2002) Health implications of acrylamide in food: report of a joint FAO/WHO consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002. Publisher: World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Erişim 22.01.2024. <https://iris.who.int/handle/10665/42563>.

Xu, Y., Cui, B., Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G., ve ark. (2014). Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*, 69:1-12. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.037>

Yager, J.D. (2015). Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1–quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention–A review. *Steroids*, 99:56-60. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.006>.

Yager, J.D. ve Davidson, N.E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 354(3):270-282. Erişim 22.01.2024 <https://doi.org/10.1056/NEJMra050776>.

Yager, J.D. ve Leih, J.G. (1996). Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36(1):203-232. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.001223>.

Yang, L., Dong, L., Zhang, L., Bai, J., Chen, F., Luo, Y. (2021). Acrylamide induces abnormal mtDNA expression by causing mitochondrial ROS accumulation, biogenesis, and dynamics disorders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(27):7765-7776. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02569>.

Yaylayan, V.A. ve Stadler, R.H. (2005). Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. *Journal of AOAC International*, 88(1):262-267. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.1.262>.

Yaylayan, V.A., Perez Locas, C., Wnorowski, A., O'Brien, J. (2005). Mechanistic pathways of formation of acrylamide from different amino acids. In *Chemistry and safety of acrylamide in food* (pp. 191-203). Springer US. Erişim 22.01.2024. https://doi.org/10.1007/0-387-24980-x_15.

Yilmaz, B.O., Yildizbayrak, N., Aydin, Y., Erkan, M. (2017). Evidence of acrylamide-and glycidamide-induced oxidative stress and apoptosis in Leydig and Sertoli cells. *Human and Experimental Toxicology*, 36(12):1225-1235. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1177/0960327116686818>.

Zamani, E., Shokrzadeh, M., Fallah, M., Shaki, F. (2017). A review of acrylamide toxicity and its mechanism. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3(1):1-7. Erişim 22.01.2024. <http://dx.doi.org/10.18869/acadpub.pbr.3.1.1>.

Zhang, Q., Han, L., Wang, J., Lin, H., Ke, P., Zhuang, J., ve ark. (2017). Simultaneous quantitation of endogenous estrone, 17 β -estradiol, and estriol in human serum by isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical

laboratory applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409:2627-2638. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0207-z>.

Zhang, X. (2009). Simultaneous exposure to dietary acrylamide and corn oil developed carcinogenesis through cell proliferation and inhibition of apoptosis by regulating p53-mediated mitochondria-dependent signaling pathway. *Toxicology and Industrial Health*, 25(2):101-109. Erişim 22.01.2024.

<https://doi.org/10.1177/0748233709102948>.

Zhao, Z., Chen, C., Liu, Y., Wu, C. (2014). 17 β -Estradiol treatment inhibits breast cell proliferation, migration and invasion by decreasing MALAT-1 RNA level. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(2):388-393. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.006>.

Zhu, Y.J., Zeng, T., Zhu, Y.B., Yu, S.F., Wang, Q.S., Zhang, L.P. ve ark. (2008).

Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. *Neurochemical Research*, 33:2310-2317. Erişim 22.01.2024. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9730-9>.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

CİNSİYET HORMONLARININ AKRİLAMİD TOKSİSİTESİNE
ETKİLERİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%9

BENZERLİK ENDEKSİ

%8

İNTERNET KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%6

2

earsiv.odu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%1

3

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%1

4

acikerisim.nku.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

5

www.formas.se

İnternet Kaynağı

<%1

6

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%1

7

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

<%1

8

Submitted to The Scientific & Technological
Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

<%1

Submitted to Baskent University