



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



Yüksek Lisans Tezi

**FURANIN LEYDİĞ HÜCRELERİNDE GENOTOKSİK
PROFİLİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Buse YILMAZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Banu ORTA YILMAZ**

Mart, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, 2.03.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Banu ORTA YILMAZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Yasemin AYDIN
Üniversite
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN
Üniversite
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 38599 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Yılmaz, B., Orta Yılmaz, B., Evaluation of the genotoxic profile of furan in Leydig cells, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, Ankara, Turkey, 14- 16 Aralık 2022, sf. 5.

ÖNSÖZ

Gerçekleştirilen bu çalışma, furan maruziyetinin TM3 Leydig hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin ve genotoksik profilinin açığa çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgileri, tecrübeleri ve fikirleriyle bana yol gösteren, özellikle tez çalışmam sırasındaki anlayışı, sabrı ve yardımlarından dolayı çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Banu ORTA YILMAZ'a ve lisans üstü eğitimim boyunca değerli bilgileri, tecrübeleri ve fikirleri ile her konudaki yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Doç. Dr. Yasemin AYDIN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca her zaman desteklerini hissettiğim ve laboratuvar çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz sevgili arkadaşlarım Biyolog Yasemin Ülkü DİKBASAN, Biyolog Ertan ÇALMAZ, Biyolog Emine ÇAKIR, Biyolog Hatice KURTEL, Biyolog Burcu KESKİN ve Biyolog Cansel ACI KUŞAN'a çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, en zor zamanlarımda yanımda olan ve bana güç veren canım anneme ve babama, kardeşim Özge YILMAZ'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Mart 2023

Buse YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. TESTİS.....	4
2.1.1. Leydig Hücresi	6
2.2. FURAN	8
2.2.1. Furanın Genel Özellikleri	8
2.2.2. Furanın Oluşum Mekanizmaları	8
2.2.3. Furan İçeren Besinler ve Maruziyet	9
2.2.4. Furan Metabolizması	12
2.2.5. Furan Toksisitesi	13
2.2.6. Furanın Erkek Üreme Sistemi Üzerindeki Toksisitesi	14
2.3. GENOTOKSİSİTE	16
2.3.1. Genotoksisite Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	16
2.3.1.1. Bakteriyel (<i>Salmonella typhimurium</i>) Geri Mutasyon Testi (AMES Testi)	17
2.3.1.2. Gama H2AX Testi	18
2.3.1.3. Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPRT) İleri Mutasyon Testi.....	18
2.3.1.4. Komet Testi	18
2.3.1.5. Mikronukleus Testi.....	19
2.3.1.6. Kardeş Kromatid Değişimi Testi	20
2.3.1.7. Kromozomal Aberasyon Testi.....	22
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	23

3.1. TM3 HÜCRE HATTI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	23
3.2. HÜCRELERİN PASAJLANMASI	24
3.3. HÜCRELERİN DONDURULMASI, SAKLANMASI VE ÇÖZÜLMESİ.....	24
3.4. DENEY GRUPLARININ HAZIRLANMASI VE MARUZİYET	25
3.5. HÜCRE CANLILIĞI VE SİTOTOKSİSİTE.....	26
3.5.1. MTT Testi.....	26
3.5.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi.....	27
3.6. GENOTOKSİSİTE	27
3.6.1. Komet Testi	27
3.6.1.1. Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması.....	28
3.6.1.2. Preparatların hazırlanması ve boyanması	28
3.6.2. Mikronukleus Testi.....	29
3.6.2.1. Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması.....	29
3.6.2.2. Preparatların hazırlanması ve boyanması	30
3.6.3. Kromozom Aberasyonu Testi.....	31
3.6.3.1. Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması.....	31
3.6.3.2. Preparatların hazırlanması ve boyanması	31
3.7. İSTATİSTİK ANALİZ	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI.....	33
4.1.1. MTT Bulguları.....	33
4.1.2. LDH Bulguları.....	34
4.2. GENOTOKSİSİTE BULGULARI	35
4.2.1. Komet Bulguları	35
4.2.2. Mikronukleus Bulguları.....	39
4.2.3. Kromozomal Aberasyon Bulguları.....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.1: Seminifer epitelde spermatogenik süreç (Loveland ve diğ., 2017).	4
Şekil 2.1.1.1: Leydig hücrelerinin morfolojik görünüşleri.	6
Şekil 2.2.1.1: Furanın kimyasal yapısı.	8
Şekil 2.2.4.1: Furanın toksikokinetik profili (Arisseto, 2016).	12
Şekil 2.3.1.1: Genotoksik hasar türleri ve tayin yöntemleri.	17
Şekil 2.3.1.4.1: Komet testi basamakları (Gunasekaran ve diğ., 2015).	19
Şekil 2.3.1.5.1: Mikronukleus testi ile tayin edilen bazı kromozom anormallikleri (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).	20
Şekil 2.3.1.6.1: Hücre döngüsünün G1 fazında uyarılan parasentrik inversiyon ile KKD oluşumu (Wojcik ve Obe, 2007).	21
Şekil 2.3.1.7.1: Yapısal kromozom aberasyonunun dört farklı tipi (Nenoi, 2015).	22
Şekil 4.1.1.1: Furanın 24 saatlik maruziyetinin sonunda TM3 Leydig hücre canlılığı üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi (**p<0,01; ***p<0,001).	33
Şekil 4.1.2.1: TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat süren furan uygulamasının hücrelerdeki laktat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi (**p<0,01; ***p<0,001).	34
Şekil 4.2.1.1: H ₂ O ₂ grubuna ait hasarlı komet görüntüleri (40X).	36
Şekil 4.2.1.2: Kontrol grubuna ait hasarsız komet görüntüleri (40X).	36
Şekil 4.2.1.3: F1 grubuna ait komet görüntüleri (40X).	37
Şekil 4.2.1.4: F2 grubuna ait komet görüntüleri (40X).	37
Şekil 4.2.1.5: F3 grubuna ait komet görüntüleri (40X).	38
Şekil 4.2.2.1: A) Bir nukleuslu hücre; B) İki nukleuslu hücre; C) Üç nukleuslu hücre; D) Dört nukleuslu hücre.	40
Şekil 4.2.2.2: Furan kaynaklı TM3 Leydig hücrelerinde A) mikronukleus; B) nukleoplazmik köprü; C) nukleer tomurcuk; D) nukleer kabarcık görünümü.	40
Şekil 4.2.3.1: Normal metafaz kromozomu yayılımı (40X).	42

Şekil 4.2.3.2: Sentrik halka, delesyon ve gap bulunan metafaz hücresi (40X).....	42
Şekil 4.2.3.4: Sentrik füzyon bulunan metafaz hücresi (40X)	43
Şekil 4.2.3.3: Disentrik kromozom bulunan metafaz hücresi (40X).....	43
Şekil 4.2.3.5: Kromozom kırığı bulunan metafaz hücresi (40X).	44



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.2.1.1: Furanın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	8
Tablo 2.2.3.1: USFDA'ya analizlerine göre, en yüksek düzeyde furan maruziyetine sebep olan gıda türleri (Bolger ve diğ., 2009)	11
Tablo 3.1.1: TM3 hücre hattının karakteristik özellikleri.	23
Tablo 3.4.1: Genotoksisite testlerinde kullanılan maruziyet grupları.....	25
Tablo 4.2.1.1: TM3 Leydig hücrelerinde komet testi parametreleri ile belirlenen furan kaynaklı DNA hasarı *: kontrol grubuna göre (**p<0,01, ***p<0,001).	35
Tablo 4.2.2.1: Furan maruziyetinin TM3 Leydig hücrelerindeki mikronukleus içeren binukleuslu hücre sıklığı ve nuklear bölünme indeksi üzerine etkileri *: kontrole göre (*p<0,05).	39
Tablo 4.2.3.1: Furan uygulanan TM3 Leydig hücrelerinde kromozomal aberasyon içeren yüzde hücre sayısı *: kontrole göre (*p<0,05).	41

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
Gn-RH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
LH	: Luteinize edici hormon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
stAR	: Steroidogenik akut regülatör protein
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
CYP11A1	: Sitokrom P450 yan zincir kırıcı
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
XRE	: Ksenobiyotik
ARE	: Antioksidan duyarlı
AhR	: Arilhidrokarbon reseptörü
CYP2E1	: Sitokrom P450 2E1
BDA	: cis-2-büten-1,4dialdehit
MDA	: Malondialdehit
AMES	: Bakteriyel (<i>Salmonella typhimurium</i>) geri mutasyon test
HPRT	: Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz
MN	: Mikronukleus
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
KA	: Kromozomal aberasyon
BrdU	: 5-bromo-2-deoksiüridin
ATCC	: American Type Culture Collection
DMSO	: Dimetil sülfoksit
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
LDH	: Laktat dehidrogenaz
NMPA	: Normal erime noktalı agaroz
LMPA	: Düşük erime noktalı agaroz

DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
NTP	: National Toxicology Program
PSA	: Penisilin-Streptomisin-Amfoterin
NAD	: Nikotinamid adenxcxcscin dinükleotid



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FURANIN LEYDİĞ HÜCRELERİNDE GENOTOKSİK PROFİLİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Buse YILMAZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Banu ORTA YILMAZ

Bu çalışmada, furanın TM3 Leydig hücreleri üzerinde oluşturabileceği muhtemel genotoksik mekanizmasının açığa çıkarılması amaçlanmaktadır.

Furan, pişirme, saklama ve işleme teknikleri sırasında birçok gıda bileşenin termal bozunması sonucu oluşan sıvı, renksiz ve yüksek uçuculuğa sahip bir organik kimyasaldır. Aynı zamanda furan, sentetik bir ara ürün olarak kimyasal sanayide de yaygın olarak kullanılmaktadır. Kahve, meyve suları, işlenmiş bebek maması, kavanoz ve konserve yiyecekler gibi ısıtıl işlem süreçlerinden geçmiş gıdalarda ortaya çıkan, nispeten yüksek miktarlardaki furan kontaminasyonu sebebiyle bu bileşiğin vücuda alınımı kaçınılmazdır.

Sıçan ve fareler ile yapılan çalışmalar, furanın çeşitli dokulardaki sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkisini ortaya çıkararak günlük diyet ile kronik olarak alınan furanın insan sağlığı üzerinde yol açabileceği olumsuz etkilerine dikkat çekmektedir. Furan maruziyetinin nefrotoksisiteye, hepatotoksisiteye, immünotoksisiteye ve üreme toksisitesine yol açtığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Furan, Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı tarafından “olası insan kanserojeni (Grup 2B)” olarak sınıflandırılmıştır. Bunun dışında, toksik bir kimyasal olan furan, prostat kanserinde biyobelirteç olarak da kullanılabilir. Erkek üreme sistemi üzerinde yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, furanın antioksidan enzim aktivitelerini baskılayıp reaktif oksijen türlerinin üretimini uyararak oksidatif strese yol açtığını ve germ, Leydig ve Sertoli hücrelerindeki apoptotik hücre sayısını arttırdığını, sperm canlılığı ve

hareketliliğini azalttığını bildirmiştir. Furan maruziyetinin kemirgenlerdeki folikül uyarıcı hormon, luteinize edici hormon ve testosteron salınımını baskılaması anti-androjenik etkisini göstermektedir. Şimdiye kadar olan literatür bilgisine göre, furanın genotoksik etki mekanizması oldukça tutarsız ve tartışmalıdır. Buna rağmen, erkek üreme sistemi üzerindeki genotoksik etkisine yönelik hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

TM3 Leydig hücre soyu furanın 750, 1500 ve 3000 μM konsantrasyonları ile 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Maruziyet süresinin tamamlanmasının ardından, furanın TM3 Leydig hücrelerinde yol açtığı sitotoksisite, hücre canlılık testi ve laktat dehidrogenaz enzim seviyelerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmiştir. Furan kaynaklı DNA hasarı, mikronukleus, komet ve kromozomal aberasyon testleri ile gösterilmiştir. Bulgular hücre canlılığının azalıp laktat dehidrogenaz aktivitesinin arttığını, komet parametrelerinin, mikronukleus oluşumunun ve yapısal kromozomal aberasyonun arttığını göstermiştir. Bu bulgular, furanın TM3 Leydig hücrelerinde DNA hasarını uyararak genotoksisiteye ve DNA hasarı kaynaklı sitotoksisiteye sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Mart 2023, 75 sayfa.

Anahtar kelimeler: furan, Leydig hücreleri, genotoksisite, sitotoksisite, DNA hasarı

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EVALUATION OF THE GENOTOXIC PROFILE OF FURAN IN LEYDIG CELLS

Buse YILMAZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Banu ORTA YILMAZ

In this study, it is aimed to reveal the possible genotoxic mechanism of furan on TM3 Leydig cells.

Furan is a liquid, colorless and highly volatile organic chemical formed as a result of thermal decomposition of many food components during cooking, storage and processing techniques. Furan is also widely used in the chemical industry as a synthetic intermediate. Intake of this compound is inevitable due to the relatively high levels of furan contamination that occurs in foods that have undergone heat treatment processes such as coffee, juices, processed baby food, jars and canned foods.

Studies on rats and mice draw attention to the negative effects of furan on human health by revealing the cytotoxic, genotoxic and carcinogenic effects of furan in various tissues. According to research, furan exposure causes nephrotoxicity, hepatotoxicity, immunotoxicity, and reproductive toxicity. Furan has been classified as "a possible human carcinogen (Group 2B)" by the International Agency for Research on Cancer. Moreover, furan, a toxic chemical, can be employed as a biomarker in prostate cancer. *In vivo* and *in vitro* studies on the male reproductive system have reported that furan suppresses antioxidant enzyme activity and stimulates the production of reactive oxygen species, leading to oxidative stress, increasing the number of apoptotic cells in germ, Leydig and Sertoli cells, and decreasing sperm viability and

motility. In rodents, furan inhibits the secretion of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone, proving its anti-androgenic activity. According to the literature so far, the genotoxic mode of action of furan is quite inconsistent and controversial. However, there are no studies on its genotoxic effect on the male reproductive system.

The TM3 Leydig cell line was treated with 750, 1500 and 3000 μ M concentrations of furan for 24 hours. After the end of the exposure time, the cytotoxicity of furan in TM3 Leydig cells was determined by cell viability test and spectrophotometric measurement of lactate dehydrogenase enzyme levels. Furan-induced DNA damage was demonstrated by micronucleus, comet and chromosomal aberration tests. The results demonstrated an increase in comet parameters, micronucleus production, and structural chromosomal abnormalities, as well as a decrease in cell viability and an increase in lactate dehydrogenase activity. These findings revealed that furan induces DNA damage in TM3 Leydig cells, causing genotoxicity and DNA damage-induced cytotoxicity.

March 2023, 75 pages.

Keywords: furan, Leydig cells, genotoxicity, cytotoxicity, DNA damage

1. GİRİŞ

Günümüzde gıdalara lezzet, kıvam, renk, koku gibi özellikler kazandırmak ve mikroorganizmalardan korumak için çeşitli ısı işlemler uygulanmaktadır (Durling, 2008). Gıdaların ısı ile muamelesi besin değerlerini etkilediği gibi gıda kontaminantları denilen yeni bileşiklerin oluşumuna da sebep olmaktadır (Leskova ve diğ., 2006). Karbonhidratça zengin pişmiş gıdalarda bulunan ve potansiyel bir kanserojen olan akrilamidin keşfi ile birlikte vücuda alımı kaçınılmaz olan ısı kaynaklı gıda kontaminatlarına hem kamuoyunun hem de bilim dünyasının ilgisi artmıştır. Furan, insan sağlığı üzerinde toksik etkileri olabilecek ısı kaynaklı gıda kontaminantlarından biridir. 2004 yılında, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından yapılan araştırmaya göre kahve, bebek maması, pişmiş et ve ekmek gibi gıda ürünlerinin pişirme tekniği, sıcaklığı ve süresine bağlı olarak 100 µg/g ve üzeri seviyelerde furan içerdiği bildirilmiştir (Durling, 2008).

Furan (C_4H_4O), birçok gıda ürününün işlenme ve pişirilme süreçlerinde ısı işlemleri sonucu ortaya çıkan renksiz, uçucu, lipofilik özellikli heterosiklik bir organik bileşiktir. Furan oluşumunun birincil yolu, karbonhidrat ve amino asit gibi biyomoleküllerin termal degradasyonudur (Maga ve diğ., 1979). Buna ek olarak, furan çevrede tütün dumanı ve araç egzoz gazlarında bulunmakla birlikte, çeşitli farmasötik ve kimyasal ajanların, pestisitlerin ve stabilizatörlerin sentezinde ara madde olarak da kullanılan bir kimyasaldır (Rehman ve diğ., 2019; Alam ve diğ., 2017). Hem gıda yolu hem de hava yolu ile günlük olarak vücuda alımı kaçınılmaz olan yüksek furan seviyeleri, toksik etkileri sebebiyle endişeleri üzerine çekmektedir.

Furan, hayvan çalışmalarından elde edilen kanıtlara dayanarak Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından insanlar için olası kanserojen (grup 2B) olarak sınıflandırılmaktadır (IARC, 1995). Furan karsinojenitesi ile ilgili yapılan çalışmalar hem genotoksik mekanizmalara (örn., kardeş kromatid değişimi, DNA tek zincir kırıkları) hem de genotoksik olmayan mekanizmalara (oksidatif stres) işaret ettiğinden furanın etki mekanizması belirsiz kalmıştır (Russo ve diğ., 2021; Cordelli ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2014). Önceki yapılan genotoksikite testlerine göre, farklı hücre soylarında ve *in vivo* deneylerde furanın kromozom aberasyonu oluşumunu uyardığını, mikronukleus içeren hücre sıklığında ve DNA

hasarını gösteren komet oluşumunda artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Russo ve diğ., 2021; Pandır ve diğ., 2015; Cordelli ve diğ., 2010). Buna ek olarak, furan maruziyetinin sıçan ve farelerin böbrek, karaciğer, bağırsak, akciğer gibi farklı organlarındaki 8-hidroksideoksiguanozin oluşumunu arttırarak oksidatif DNA hasarını uyardığını bildirilmiştir (Wang vd., 2014; Alam vd., 2017; Russo vd., 2021).

Vücuda alınan pek çok toksik bileşik DNA hasarını, reaktif oksijen türleri üretimini ve lipid peroksidasyonunu uyarması nedeniyle hücre sağkalımı için bir tehdit oluşturur (Rehman ve diğ., 2020). Bu bileşiklerden biri olan furan, düşük polaritesi nedeniyle hücre membranlarından hızlı bir şekilde geçmekte ve hücrede endokrin bozucu olarak rol oynamaktadır (Cooke ve diğ., 2014). Önceki çalışmalar, furanın karaciğer ve böbrek dokularında reaktif oksijen türleri üretimi ile total antioksidan enzim kapasitesi arasındaki dengeyi bozarak oksidatif hasara yol açtığını ve apoptoz sıklığını arttırdığını göstermektedir (Cordelli ve diğ., 2010; de Conti ve diğ., 2014, 2015).

Furanın memeli erkek üreme sistemi üzerindeki risk değerlendirmesine yönelik bilgi sınırlıdır. Literatürdeki bulgulara göre furan, testis dokusunda antioksidan enzim seviyelerinde düşüşe, Leydig ve germ hücrelerinde apoptoza, folikül uyarıcı hormon, luteinizan hormon ve testosteron salınımında azalmaya, malondialdehit seviyelerinde artışa, testis ve epididimis dokularında bozukluklara, sperm canlılığı, sayısı ve hareketliliğinde düşüşe neden olmuştur (Rehman ve diğ., 2019; Karacaoglu ve Selmanoglu, 2010; Owumi ve diğ., 2020; El-Hakim ve diğ., 2018). Buna ek olarak, furanın sperm hücrelerinde reaktif oksijen türleri üretimini arttırarak mutajeniteye yol açan oksidatif DNA hasarını uyardığı bildirilmiştir (Pandir, 2015).

Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda, furanın çeşitli biyolojik sistemler üzerindeki toksik etkileri bildirilmiştir. Ancak furanın erkek üreme sisteminde neden olduğu genotoksik etkilere yönelik bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, farklı furan konsantrasyonlarının TM3 Leydig hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik ve genotoksik hasar araştırılmıştır. Tezin “Genel Kısımlar” başlığının altında testis yapısı, Leydig hücreleri, furan ve genotoksisite konularından ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

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

Yapılan testler sonucunda elde edilen veriler tezin “Bulgular” bölümünde verilmiştir.

Tezin “Tartışma ve Sonuç” başlığında ise, elde edilen bulgular değerlendirilmiş ve mevcut literatür bilgisi göz önünde bulundurularak sonuca varılmıştır.

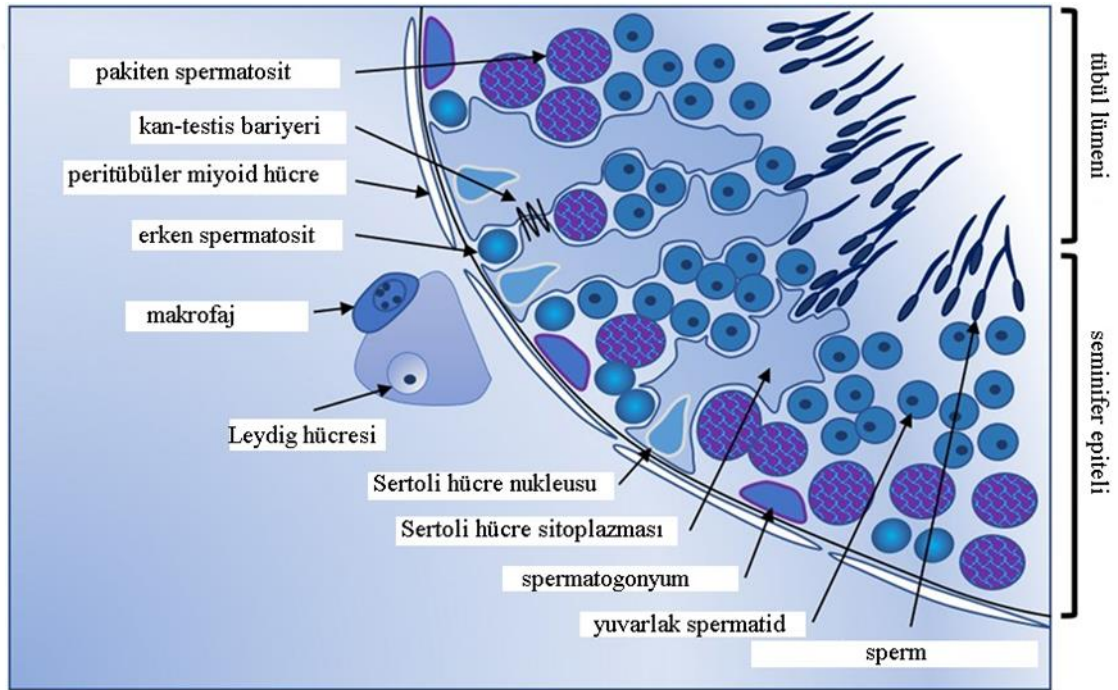
Yapılan bu çalışma ile furanın TM3 Leydig hücrelerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Furanın sitotoksik etkileri hücre canlılığı testi ve laktat dehidrogenaz enzim aktivite seviyelerinin tayini ile değerlendirilmiştir. Genotoksik profili ise kromozom aberasyonu, komet ve mikronukleus testi gibi DNA klastojenik aktivite analizlerinde yaygın olarak kullanılan tahliller ile belirlenmiştir.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. TESTİS

Erkek üreme sistemi, spermin oluşumunu, geçici olarak depolanmasını ve vücut dışına atılmasını sağlayan iç (prostat, epididimis, testis, seminal vezikül, vas deferens) ve dış (penis, skrotum) genital organlardan oluşmaktadır (Gurung ve diğ. 2022; Kierszenbaum, 2006). Testis yapısının olgun sperm üretimi (spermatogenez) ve steroid hormon sentezi (steroidogenez) olmak üzere iki temel fonksiyonu vardır (Alves ve diğ., 2013).



Şekil 2.1.1: Seminifer epitelde spermatogenez süreci (Loveland ve diğ., 2017).

Testisler, memelilerde karın boşluğunun dış kısmında, sinir ucu bakımından zengin skrotum ile çevrili sağ ve sol olmak üzere iki parçadan oluşan ovoid şekilli organlardır. Vücut boşluğunun dış kısmındaki yerleşimlerinden dolayı testis sıcaklığının vücut sıcaklığından 2-3°C daha düşük olması, sperm canlılığı ve spermatogenez için uygun sıcaklığı sağlamaktadır (Johnson ve Byrne, 2003; Kadioğlu ve diğ., 2004).

Testis yapısı, seminifer tübül ve interstisyel alan olmak üzere iki ana bölmeden oluşur. Seminifer tübüller, sperm üretimi yani spermatogenez sürecinin gerçekleştiği alandır. Kompleks bir hücresel süreç olan spermatogenez, androjenlerin, gonadotropinlerin ve diğer

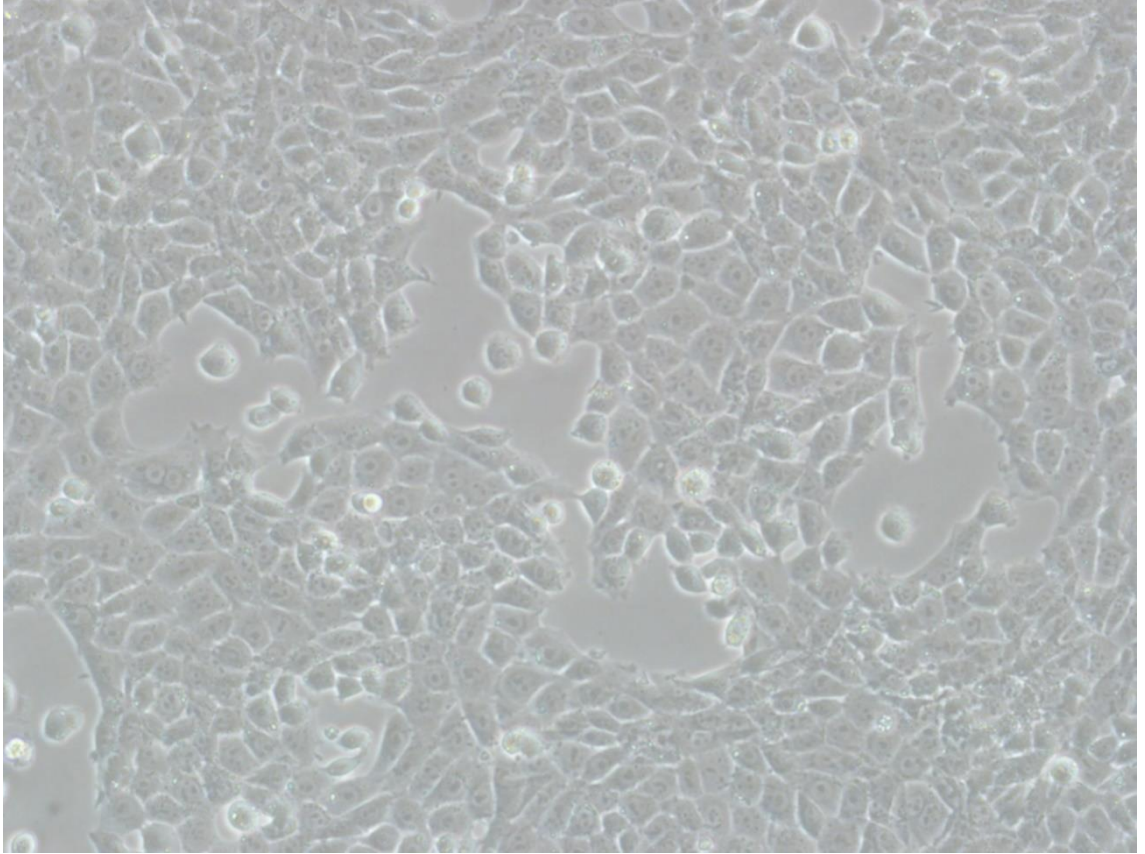
önemli biyomoleküllerin (testosteron, folikül uyarıcı hormon (FSH), gonadotropin salgılatıcı hormon (Gn-RH), luteinize edici hormon (LH)) kontrolü altında gerçekleşir (Chojnacka ve diğ., 2016). Spermatogenez sırasında bazal membrana konumlanan farklılaşmamış spermatogonia ($2n$) mitoz geçirir ve B tipi spermatogonia spermatositlere dönüşür. Ardından, spermatositler mayozu tamamlayarak spermatidlere (n), spermatidler ise spermiyogenez yoluyla farklılaşarak sperme dönüşür. Bu olaylar sonucunda seminifer epitel somatik hücre tipleri, Sertoli hücresi ve farklı fazlardaki germ hücrelerini içerir (Nakata, 2018; Kızılay ve Altay, 2019).

Sertoli hücreleri, seminifer tübülün bazalından lümene doğru uzanan somatik hücrelerdir ve spermatogenezin her aşamasında germ hücreleri için destekleyici bir ortam sağlarlar. Bazal lamina yakınlarında konumlanan komşu Sertoli hücrelerinin birbiriyle yaptığı sıkı bağlantılar kan-testis bariyerini oluşturmaktadır. Sertoli hücrelerinin oluşturduğu bu bariyer, seminifer tübüllerde bulunan ileri seviyedeki germ hücrelerini kanla taşınan yabancı maddelerden korumakta, antisperm antikorlarının gelişimini engellemekte ve germ hücrelerinin gelişip olgunlaşabilmesi için gereken mikro çevreyi sağlamaktadır (Mawhinney ve diğ., 2012).

Seminifer tübüllerin arasında bulunan interstisyel alan gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır. Bu alanda, kan ve lenf damarları, sinir lifleri, immün hücreler (makrofajlar, mast hücreleri, T hücreleri, dentritik hücreler ve “natural killer” hücreler), fibroblastlar, farklılaşmamış mezenşimal hücreler ve Leydig hücreleri bulunmaktadır (Fawcett, 1966; Perez ve diğ., 2012).

2.1.1. Leydig Hücresi

1850 yılında, Alman anatomist ve zoolog Franz von Leydig tarafından, memeli testisinin seminifer tübülleri arasında tek tek ya da küme halinde bulunan hücreler tanımlanmıştır (Trainer, 1995; Zirkin ve Papadopoulos, 2018). Leydig hücresi olarak isimlendirilen interstisiyel alandaki bu hücreler, steroid üreten hücreler ile benzer olarak bol miktarda düz yüzlü endoplazmik retikulum, değişken sayıda lipid damlacığı, belirgin bir nukleolus ve ovoid ya da yuvarlak şekilli nukleusa sahip poligonal şekilli hücreler olarak karakterize edilirler (Hedger ve Kretsel, 2000). Leydig hücrelerinin morfolojik görünümleri **şekil 2.1.1.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1.1.1: Leydig hücrelerinin morfolojik görünümleri.

Androjen sentez ve salınımından sorumlu Leydig hücrelerinin, fetal ve erişkin Leydig hücresi olmak üzere iki tipi vardır. Bu iki hücre tipi birbirinden morfolojik yapı, androjen sentez kapasitesi ve düzenlenme mekanizmaları bakımından farklılık gösterirler (Haider, 2004). Kök hücrelerden farklılaşan ve sitoplazmasında bol miktarda lipid damlacığı içeren fetal Leydig

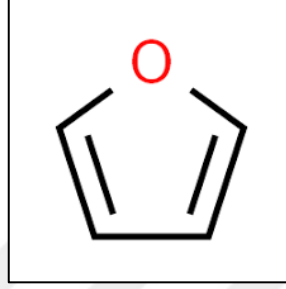
hücreleri, beynin maskülinizasyonu ve erkek ürogenital sistem oluşumu için yüksek düzeylerde androjen üretir. Doğumdan itibaren azalan testosteron üretimi erişkin Leydig hücrelerinin olgunlaşmasıyla birlikte tekrar yüksek seviyelere ulaşır. Erişkin Leydig hücreleri, önceden var olan fetal Leydig hücreleri yerine interstisyel alanda bulunan neonatal testis kök hücrelerinden farklılaşır (Ge ve diğ, 2009; Zirkin ve Papadopoulos, 2018). Erişkin Leydig hücreleri, fetal Leydig hücrelerinden daha fazla oranda LH reseptörüne sahiptir (Shan ve Hardy, 1992).

Leydig hücrelerinin temel fonksiyonu olan testosteron biyosentezinin düzenlenmesinde, LH ve steroidogenik akut regülatör protein (StAR) ana rol oynamaktadır. Gn-RH, uyarımı ile salınan LH, Leydig hücre membranında bulunan LH reseptörlerine bağlanarak siklik adenosin monofosfat (cAMP) konsantrasyonunun artmasına neden olan adenilat siklazı aktive eder (Zirkin ve Papadopoulos, 2018). Leydig hücrelerinin bu akut uyarımı, kolesterolün intraselüler lipid damlacıklarından mitokondriye transferini sağlar. Testosteron üretiminde kilit olay olan kolesterolün mitokondrinin dış membranından iç membranına geçişi, StAR protein ve periferaltip benzodiazepin reseptör arasındaki karmaşık süreci içerir (Ge ve diğ, 2009). Mitokondriye aktarılan kolesterol moleküllerinden, mitokondri iç zarında konumlanan sitokrom P450 yan zincir kırıcı (CYP11A1) enzimi ile pregnenolon oluşumu gerçekleşir. Pregnenolan ise düzyüzlü endoplazmik retikulumda gerçekleşen birtakım enzimatik reaksiyonlar sonucunda testosterona dönüştürülür (Beattie ve diğ, 2015).

2.2. FURAN

2.2.1. Furanın Genel Özellikleri

1960'lı yıllarda, işlenmiş gıdalarda tespit edilen furan, dört karbon ve bir oksijen atomundan oluşan heterosiklik organik bileşiktir (Grey ve Shrimpton, 1967; Seok ve diğ., 2015). **Şekil 2.2.1.1**'de furanın kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.2.1.1: Furanın kimyasal yapısı. .

Düşük kaynama noktalı, renksiz, lipofilik ve yüksek uçuculuk özelliklerine sahip olan furan, yüksek enerjili radyasyon ve 150-250°C'ye varan sıcaklıklarla muamele edilen doğal gıda bileşenlerinin kimyasal yapılarının bozulması sonucunda bir yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır (Bolger ve diğ.; Mogol ve Gökmen, 2016). Buna ek olarak, furan öncelikle pirol, tetrahidrofuran, tiyofen olmak üzere birçok farmasötik ve kimyasal maddenin, insektisit, reçine, cila ve çözücünün sentezinde de ara ürün olarak kullanılmaktadır (Bolger ve diğ., 2009; Alizadeh ve diğ., 2018).

Tablo 2.2.1.1: Furanın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Furan (C₄H₄O)	
<i>Moleküler ağırlığı</i>	68.07 g/mol
<i>Yoğunluk</i>	936 kg/m ³
<i>Kaynama sıcaklığı</i>	31,3 °C
<i>Erime noktası</i>	-85,6 °C

2.2.2. Furanın Oluşum Mekanizmaları

Gıdalarda bulunan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), askorbik asit, amino asitler, karotenler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküllerin, oksidatif veya termal

koşullar ile muamelesi sonucu farklı mekanizmalar yoluyla furan oluşumu gerçekleşmektedir (Batoool ve diğ., 2020). Farklı literatür çalışmaları, furan oluşumunun dört ana mekanizmaya dayandığını bildirmiştir:

(1) *PUFA ve karotenoidlerin oksidasyonu yoluyla furan oluşumu*, PUFA'ların reaktif oksijen türleri tarafından oksidatif bozunması sonucu oluşan 4-hidroksi-2-alkenaller gibi insanlar için karsinojenik olduğu bilinen bir dizi istenmeyen lipid peroksidasyon ürününün üretimi yoluyla olmaktadır.

(2) *Karbonhidratların termal degradasyonu veya yeniden düzenlenmesi yoluyla furan oluşumu*, gıdaların yüksek sıcaklıklarla pişirilmesi ile uyarılan Maillard reaksiyonu veya enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu ile gerçekleşir. Aminoasitlerin varlığında Maillard reaksiyonu sonucu pentoz ve heksoz şekerlerinin indirgenmesi ile 3-deoksi-, 1-deoksi-, aldotetroz ve 2-deoksi-3-keto-aldotetroz gibi reaktif bileşikler üretilir. Ara ürün olarak üretilen aldotetroz türevleri, kolaylıkla furana dönüşebilmektedir.

(3) *Aminoasitlerin termal degradasyonu yoluyla furan oluşumu* süreci, reaksiyona katılan aminoasit türüne bağlıdır. Serin ve sistein gibi aminoasitler Strecker reaksiyonu yoluyla glikoaldehit; dekarboksilasyon ile asetaldehit üretebildiklerinden furan oluşturmak için şeker veya diğer glikolaldehit kaynaklarına ihtiyaç duymazlar. Glikolaldehite metabolize edilen bu aminoasitler furan oluşturmak için halka yapısına dönüşür. Bununla birlikte, furan oluşumu için şekere ihtiyaç duyan α -alanin gibi aminoasitlerin glikoaldehit ile reaksiyonlarından yüksek miktarda furan üretilir (Moro ve diğ., 2012; Seok ve diğ., 2015).

(4) *Askorbik asidin ısı kaynaklı oksidasyonu*, furan oluşum mekanizmalarının sonuncusudur. Askorbik asit hızlı bir şekilde dehidroaskorbik aside oksitlenir ve daha sonra furana ve aldotetroza dönüştürülecek olan 2,3-diketogulonik aside hidrolize olur (Vranová ve Ciesarová, 2009).

2.2.3. Furan İçeren Besinler ve Maruziyet

Hem ticari olarak hem de ev yapımı hazırlanan yiyecek ve içeceklere istenilen özellikleri kazandırmak, mikroorganizmalardan korumak, biyoyararlanımını iyileştirmek gibi amaçlarla

fırlama, kavurma, pişirme, pastörizasyon ve sterilizasyon olmak üzere pek çok termal işlem uygulanmaktadır (Durling, 2008; Seok ve diğ., 2015).

2004 yılında Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yapılan konserve ve kavanozlanan gıdalardaki furan seviyesi analiz raporu, bu maddenin oluşumunun sert termal işlemlerin ve aynı zamanda, sızdırmazlık ve ambalajlamanın bir sonucu olarak ortaya çıktığını göstermiştir (FDA, 2004). Çalışmalar sonucunda, furan analizi için teknikler son derece gelişmiştir. Furanın daha iyi anlaşılmasıyla yaygın tüketilen gıda ürünlerinde bulunan furanın riskleri hakkında kamuoyu ilgisi oluşmuştur ve bu da tüm ticari gıda ürünlerinde kullanılan hammadde araştırmalarına yol açmıştır (Seok ve ark., 2015). Isıl işlem gören yiyeceklere uygulanan sıcaklığın, ısı uygulama süresinin, gıdalarda bulunan furan öncüllerinin çeşidi ve konsantrasyonlarının furan oluşumu seviyesine etki ettiği tespit edilmiştir (Senyuva ve Gokmen, 2007).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ısıl işlem görmüş gıda ürünlerindeki furan konsantrasyonları ile ilgili araştırmasındaki bulgularına göre en yüksek furan konsantrasyonları granül, demlenmiş ve kavrulmuş kahvede (42-3,660 ng/g), karamelde (220-400 ng/g), soya sosunda (17-90 ng/g), bebek mamasında (0,2 - 3,2 ng/g), fırın (22-24 ng/g) ve et ürünlerinde (13-17 ng/g) bulunmaktadır (Crew ve Castle, 2007; Seok ve diğ., 2015; EFSA, 2010). Etle yapılan konserve çorbalar, sos ve makarnalar da yüksek konsantrasyonlarda furan içeriğine sahiptir. Ancak, furanın yüksek uçuculuk özelliği sebebiyle, bu ürünler açık kaplarda ısıtıldığında maruz kalınan miktar azalmaktadır (Bolger ve diğ., 2009). Buna ek olarak, fındık, hidrolize soya proteini, soya protein izolatı, sodyum kazeinat, et suyu, diğer konserve et çeşitleri, balık protein konsantresi, kolza tohumu proteini gibi besinleri de içeren daha birçok gıda ürününde de furan oluşumu tespit edilmiştir (Maga, 1979).

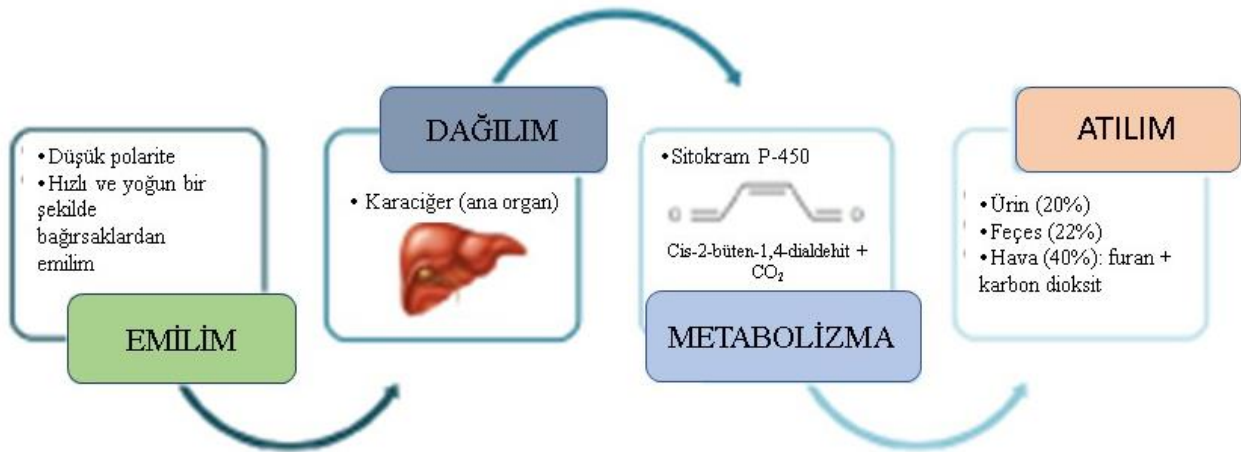
Tablo 2.2.3.1: USFDA'ya analizlerine göre, en yüksek düzeyde furan maruziyetine sebep olan gıda türleri (Bolger ve diğ., 2009)

Gıda Çeşidi	Furan Seviyesi (µg/kg bw/day)
Demlenmiş kahve	0,15
Acı biber	0,04
Tahıllar	0,01
Tuzlu atıştırmalıklar	0,01
Et içeren çorbalar	0,01
Fasülye ve domuz eti	0,004
Konserve makarna	0,004
Konserve çalı fasülyesi	0,004
Makarna sosları	0,004
Meyve suları	0,001
Konserve ton balığı	0,001

EFSA'nın termal işlem görmüş ticari gıda ürünlerindeki furan seviyelerini analiz etmek için topladığı verilere göre, günlük ortalama furan alımı yetişkinlerde tahminen 0,03-0,59 ng/g değerlerindeyken, bebeklerde günde 0,09-0,22 ng/g seviyeleri arasında değişmektedir (Seok ve ark. 2015, EFSA, 2010). Total furan maruziyetinin yaklaşık %85'ine karşılık gelen kahve tüketimi, yetişkinler için furan maruziyetinin ana kaynağıdır (Seok ve ar., 2015). Kahve, yüksek kavurma sıcaklıklarında birbiriyle reaksiyona giren ve degradasyona uğrayan protein ve karbonhidrat gibi öncülleri içerdiğinden, bu gıdada diğerlerine kıyasla daha yüksek oranlarda furan oluşumu gerçekleşir (Batoool ve diğ., 2020). Bebeklerde ise asıl furan kaynakları günlük ürünler, kavanozlanmış bebek mamaları ve meyve suları gibi paketlenen ve yüksek sıcaklıklara maruz kalan gıda ürünleridir (Seok ve diğ., 2015). Paketlenmiş veya kavanozlanmış sebzelerdeki en yüksek furan seviyeleri özellikle kabak, fasülye ve tatlı patatesten belirlenmiştir (Crews ve Castle, 2007).

2.2.4. Furan Metabolizması

Furan, düşük polaritesi sebebiyle hücre membranlarından kolayca geçerek çeşitli organlara dağılır ve yüksek verimle vücuttan atılır (Mariotti diğ., 2013; Crews ve Castle; 2007). Tekrarlanan oral dozlarda furan emilimi, hızlı ve yoğun bir şekilde bağırsak ve akciğerlerden olmaktadır (Vranová ve Ciesarová, 2009). Radyoaktivite çalışmaları, furanın tek bir dozunun %84'ünün 24 saat içerisinde yüksek verimle metabolize edildiğini, geri kalanının ise atıldığını göstermiştir (Crews ve Castle; 2007). Furan atılımı, idrar, dışkı ve verilen hava yoluyla olmaktadır. Tekrarlanan doz maruziyeti sonrasında, furan birikimi yüksek oranda karaciğer, böbrek ve gastrointestinal sistemde gerçekleşmektedir. Dokulara ulaşan furan düzeyleri, karaciğerin ilk-geçiş metabolizması ile furanı kan dolaşımından elimine etme kapasitesine bağlıdır (Mariotti ve diğ., 2013).



Şekil 2.2.4.1: Furanın toksikokinetik profili (Arisseto, 2016).

Furan, hücresel ve metabolik etkilerini ksenobiyotik- (XRE) ve antioksidan duyarlı (ARE) DNA elementleriyle bağlantılı arilhidrokarbon reseptörü (AhR) ile etkileşime girerek gösterir (El-Hakim ve diğ., 2018). Furan biyoaktivasyonu, başlıca sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) olmak üzere sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilmesiyle başlamaktadır (Bolger ve diğ., 2009). Furanın biyotransformasyonundan sorumlu CYP2E1 enziminin önemli seviyeleri, endoplazmik retikulum, plazma zarı, peroksizom, lizozom, mitokondri, golgi aygıtı gibi hücre kompartmanlarında bulunmaktadır. Furanın CYP2E1 enzimi tarafından metabolize edilmesi sırasında çift bağlarından birinin oksidasyonu sonucu furan halkası açılır ve cis-2-büten-1,4dialdehit (BDA, maleik dialdehit), bir α,β -doymamış di-aldehit ve CO₂ oluşumu gerçekleşir (Alizadeh ve diğ., 2018 ; Vranová ve Ciesarová, 2009). Furanın birincil metaboliti olan BDA,

yüksek derecede reaktif ve sitotoksik özellikler sergilemektedir (Vranová ve Ciesarová, 2009). Bu bileşik, protein ve nükleozitler gibi nükleofilik makromoleküllere kovalent bağlarla geri dönüşümsüz olarak bağlanabilmektedir (Heppner ve Schlatter, 2007; Bakhiya ve Appel, 2010).

2.2.5. Furan Toksisitesi

Furanın günlük diyet ve hava yoluyla yüksek miktarda ve kronik maruziyeti, toksik doğası nedeniyle endişe konusu olmuştur (Rehman ve diğ., 2020). Furanın, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından “olası insan karsinojeni” (grup 2B) olarak tanımlanmasının ardından, bu bileşiğin canlılar üzerindeki olası toksik etkilerine yönelik araştırmalara gösterilen ilgi artmıştır (IARC, 1995). Önceki çalışmalar, furanın insan ve hayvanların biyolojik sistemleri üzerinde doza bağlı bir şekilde sitotoksik ve karsinojenik bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir (Concurso ve diğ., 2018). Hayvanlar üzerinde yapılan deneyler, furanın düşük konsantrasyonlardaki maruziyetinin bile hayvanlarda oldukça toksik olduğunu göstermektedir. Sıçanlara ve farelere verilen furanın yüksek dozlarının, hücre proliferasyonunu, DNA hasarını ve hepatik nekrozu uyardığı gösterilmiştir (Kaya, 2019). Buna ek olarak, sıçan ve farelerin sağkalımını azaltmış; karaciğer, ince bağırsak, böbrek ve ovaryum dokularında hasara yol açmıştır (Heppner ve Schlatter, 2007; Uçar ve Pandır, 2017). Furana maruz bırakılan sıçanlarda, artan malondialdehit (MDA) seviyeleri ve düşen antioksidan enzim seviyeleri gibi sitotoksik etkiler belirlenmiştir (Alam ve diğ., 2017). Ayrıca bu bileşik, ATP kaybı ile birlikte hepatik mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun ayrışmasına neden olmuş ve böylelikle, hücre ölümünde rol oynayan sitotoksik enzimlerin aktivasyonuna yol açmıştır (Russo ve diğ., 2021). Furan hepatotoksisitesinin ise, furanın oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin DNA’yı dolaylı yoldan etkilemesiyle gerçekleştiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Hickling ve diğ., 2010).

Avrupa EFSA’nın yayınladığı toksisite risk değerlendirmesine göre, belirli bir seviye üzerindeki furan dozlarının büyük olasılıkla fare ve sıçanların biyolojik sistemlerindeki genotoksik mekanizmaları etkileyerek karsinojeniteyi uyardığı bildirilmiştir (Kaya, 2019). Bununla birlikte, kronik düşük dozlardaki furan maruziyetinin kanserle daha fazla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Jestoi ve diğ., 2009).

Furanın tümör başlatıcı mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Furanın inflamasyon, oksidatif stres, hücre proliferasyonu ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonunu etkilemesinden dolayı karsinojen özellik gösterdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Tryndyak

ve diğ., 2017). Düşük dozlarda furan verilen sıçanların karaciğerinde hücre döngüsü kontrolü ve apoptoz ile ilgili genlerin ifadesinde değişim meydana geldiği görülmüştür (Chen ve diğ., 2010).

Literatürde furan maruziyetinin onkogenlerde benzersiz mutasyonları uyarmasından dolayı genotoksik bir mekanizma yoluyla karaciğer tümör oluşumuna sebep olduğuna yönelik kanıtlar bulunmaktadır (Peterson, 2012). Furan, sıçan karaciğerinde düşük seviyelerde DNA eklentilerine, DNA çift zincir kırığı oluşumunun artmasına; farelerde ise kromozom aberasyonu oranının artmasına neden olmuştur (Peterson, 2012; Russo ve diğ., 2021). Yapılan çalışmalar, hem furan hem de sitotoksik metaboliti olan BDA'nın zayıf bir mutajenik aktivite sergilediğini, fakat klastojenik hasarın tetikleyicileri olduklarını göstermiştir (Russo ve diğ., 2021).

2.2.6. Furanın Erkek Üreme Sistemi Üzerindeki Toksisitesi

Erkek üreme sistemi hassas yapısı nedeniyle, pestisitler ve gıda kontaminatları gibi vücuda alınan birçok yabancı maddenin hedefi olmaktadır (Alizadeh ve diğ., 2018). Isı kaynaklı gıda kontaminantlarından biri olan furanın, genotoksik, sitotoksik ve apoptotik bir uyarıcı olduğu bilinmektedir (Heppner ve Schlatter, 2007; Karacaoğlu ve Selmanoğlu, 2010; Rehman ve diğ., 2019). Bu toksik bileşiğin erkek sıçanların üreme sistemi yapısı ve fonksiyonu üzerinde zararlı bir etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Kısır erkeklerden alınan sperm örneklerinde, fertil erkeklerden daha yüksek seviyede furan içeriğinin bulunması, furan ile kısırlık arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir (Owumi ve diğ., 2020). Anneye uygulanan yüksek düzeylerdeki furan maruziyeti sonucunda, yavrularda günlük sperm üretiminin azalması ve östrus dengesinin bozulması furanın F1 nesli üzerindeki zararlı etkilerini açığa çıkarmıştır (Rehman ve diğerleri, 2020).

Furanın potansiyel zararlı etkileri çeşitli üreme parametreleri kullanılarak test edilmiş ve erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. Furanın üreme toksisitesinin değerlendirildiği çalışmalar, furan maruziyetinin spermatogenezin devamında bozukluğa, üreme organlarının büyümesini, FSH ve LH salınımını etkileyerek kısırlığa neden olduğunu bildirmiştir (Karacaoğlu ve Selmanoğlu, 2010; Abd El-Hakim ve diğ., 2018; Rehman ve diğ., 2020). Buna ilaveten, furan sıçanlarda salgılanan testosteron seviyelerinde azalmaya sebep olarak antiandrojenik etki göstermiş; sperm canlılığı, sayısı ve hareketliliğini azaltmış; Leydig ve germ hücrelerinde apoptozu uyarmıştır (Cooke ve diğ., 2014; Rehman ve diğ., 2019).

Yüksek doz furan maruziyeti sıçanlarda seminal vezikül ağırlığının azalmasına, prostat ağırlıklarının ise artmasına sebep olmuştur (Karacaoğlu ve Selmanoğlu, 2010). Buna ek olarak, patolojik bulgular furanın testis ve epididimis dokularında da değişikliklere neden olduğunu göstermiştir (Alizadeh ve diğ., 2018; Rehman ve diğ., 2019). Furan uygulaması çeşitli hücrelerin histolojik yapısında bozukluklara, antioksidan enzim aktivitelerinde, proinflamatuar sitokinler ve malondialdehit seviyelerinde önemli değişikliklere yol açmış; reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini uyararak sperm ve lenfositlerde dolaylı yoldan DNA hasarına neden olmuştur (Cooke ve diğ., 2014; El-Akabawy ve El-Sherif, 2016; Uçar ve Pandır, 2017; Abd El-Hakim ve diğ., 2018).



2.3. GENOTOKSİSİTE

Genetik toksisite veya genotoksisite terimi, endojen ve eksojen ajanların DNA ve kromozom yapısında meydana getirdiği DNA kırılmaları, DNA eklentileri, gen mutasyonları, kromozomdaki sayısal ve yapısal değişiklikler gibi hasarları içermektedir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Endojen ajanlar, hücre metabolizmasının yan ürünü olarak oluşan lipid peroksidasyon ürünleri, reaktif oksijen ve nitrojen türleri, östrojen metabolitleri ve endojen alkilasyon ajanları olabilmektedir. Eksojen ajanlara ise iyonize radyasyon, ultraviyole ışığı, hava kirliliği, ağır metaller, sigara dumanı ve çeşitli kimyasallar örnek verilebilir (Hoeijmakers, 2009).

Genetik materyalde meydana gelen hasarlar hücrenin onarım mekanizmaları tarafından doğru ve zamanında onarılmazsa DNA dizisi değişimi ile sonuçlanır. DNA dizisi değişimi sonucu meydana gelen mutasyonlar, ilgili genin fonksiyonunun farklılaşmasına ya da kaybına neden olur. Meydana gelen bu hasarların ölümcül olmaması durumunda kalıtsal değişiklikler yani mutasyonlar ortaya çıkar (Choy, 1996; Kramer, 1998). DNA'nın yapısında bozukluklara yol açan mutajenler, DNA'yı direkt ya da genomik bilgilere göre anlatımı yapılan proteinlerle etkileşime girerek dolaylı yoldan etkilerler (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Mutasyonların etkisi, etkilenen gene ve dokuya göre değişmektedir. Somatik hücrelerin yapısal DNA içeriğinde meydana gelen hasar kanser gelişiminden sorumlu olabilirken, germ hücrelerinin genetik materyalindeki hasar, ökaryotik organizmalarda kalıtsal mutasyonlara sebep olarak doğum kusurlarına yol açabilir (Choudhuri ve diğ., 2021).

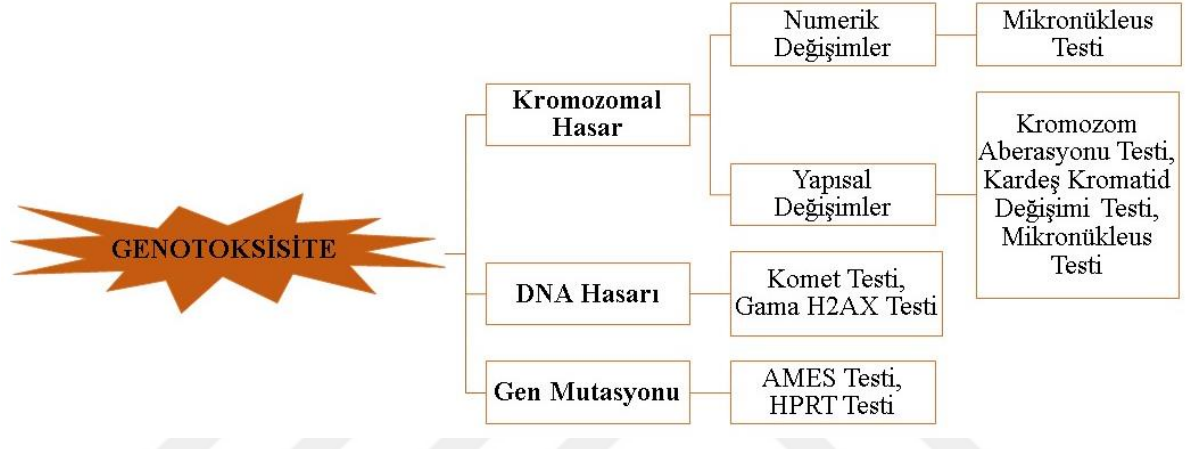
Meydana gelen genetik değişimler ile genomik kararsızlık, kanser, kısırlık, erken yaşlanma kardiyovasküler hastalık ve metabolik sendromlar dahil olmak üzere birçok patolojik durumun kaynağında rol oynar. Bununla birlikte, nükleer ve mitokondriyal DNA hasarlarının, Huntington, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi pek çok nörodejeneratif bozukluklarla ilişkili olduğu da bilinmektedir (Ren ve diğ., 2017; Turkez ve diğ., 2017).

2.3.1. Genotoksisite Analizinde Kullanılan Yöntemler

Genotoksisite testleri, çeşitli fiziksel veya kimyasal ajanların DNA'ya direkt ya da metabolik ürünler ile dolaylı yoldan verdiği zararı tespit etmek amacıyla geliştirilmiş *in vivo* ve *in vitro* testleri kapsamaktadır (Sezginer ve Dane, 2016). Yaygın olarak kullanılan genotoksisite testleri, bakteriyel (*Salmonella typhimurium*) geri mutasyon testi (AMES), gama H2AX testi,

hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HPRT) ileri mutasyon testi, komet (kuyruklu yıldız) testi, mikronukleus (MN) testi, kardeş kromatid değişimi (KKD) testi ve kromozomal aberasyon (KA) testidir (Garcia-Canton ve diğ., 2012; Yüzbaşıoğlu ve diğ., 2014).

Bileşiklerin mutajenik ve genotoksik etkinliğinin belirlenmesinde tek bir testin yeterli olamayacağı, DNA hasarı için istatistiksel olarak daha güçlü ve hassas sonuçların elde edilmesinde farklı testlerin kombine edilmiş uygulamalarının gerekliliği vurgulanmaktadır (Choy, 1996; Zeiger, 1998; Araldi ve diğ., 2015).



Şekil 2.3.1.1: Genotoksik hasar türleri ve tayin yöntemleri.

2.3.1.1. Bakteriyel (*Salmonella typhimurium*) Geri Mutasyon Testi (AMES Testi)

Ames Testi, bir kimyasalın mutajenik potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu test, triptofan veya histidin gibi esansiyel bir amino asidin ekspresyonunu baskılayan mutant bir gen taşıyan çeşitli *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* suşları ile yapılmaktadır. Mutajenik ajan, mutant gende ters mutasyona neden olarak esansiyel amino asit ekspresyonunun gerçekleşmesine yol açmaktadır (Turkez ve diğ., 2017). Ames testi, yaygın olarak kullanılan, ucuz, hızlı ve kısa zamanlı bakteriyel bir testtir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

2.3.1.2. Gama H2AX Testi

Genotoksinle maruziyet sonucu, DNA hasar yanıtında rol oynayan histon H2AX'in hızla fosforile edilmesi ve gama H2AX'e dönüşümü, oluşan DNA çift zincir kırığına verilen birincil yanıttır. Gama H2AX testi kullanılarak, DNA çift zincir kırıklarının olduğu bölgelerdeki nükleer ışımlar ile DNA hasarı görselleştirilir (Watters ve diğ., 2009). Gama H2AX ışımlarının DNA çift zincir kırıkları ile doğrudan bir korelasyon vermesi, DNA hasarının kantifikasyonuna olanak sağlar (Garcia-Canton ve diğ., 2012).

2.3.1.3. Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPRT) İleri Mutasyon Testi

HPRT geni ileri mutasyon testi, toksik bir nükleozit analogu olan 6-tioguanin varlığında, pürin biyosentezinde ve nükleotid kurtarma yolağında rol oynayan bir enzim olan HPRT enziminin mutasyona uğradığı hücrelerin tespit edilmesine olanak sağlar (Aidoo ve diğ., 1997; Parry ve diğ., 2005). X kromozomu üzerinde tek bir kopya şeklinde konumlanan HPRT geni, memeli DNA dizilerinde gerçekleşen gen mutasyonlarının araştırılmasında model gen olarak kullanılır (Johnson, 2012). Bu test, çerçeve kayması mutasyonları, baz çifti mutasyonları, inversiyon, delesyon ve heterolog kromozom rekombinasyonları gibi DNA'da meydana gelen değişimleri büyük ölçüde yansıtabilmektedir (Yüzbaşıoğlu ve diğ., 2014).

2.3.1.4. Komet Testi

Tek hücreli jel elektroforezi veya komet testi, vücuda alınan çeşitli genotoksinlerin uyardığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının, DNA-protein/ DNA-DNA çapraz bağlanma bölgelerinin ve hasar tamirinde gerçekleşen bozuklukların tespitini amaçlayan çalışmalarda kullanılan bir genotoksisite tayin yöntemidir (Singh ve diğ., 1988; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Diğer genotoksisite testlerine kıyasla komet testi, neredeyse her ökaryot hücre popülasyonuna uygulanabilirliği, küçük miktarlarda örnek kullanımı, hızlı ve basit sonuç alınması, DNA hasarına duyarlılığının yüksek olması ve verilerin tek tek hücre düzeyinde analizinin sağlanması bakımından avantajlara sahiptir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Komet testinin, kullanılan elektroforez tamponun pH'ına bağlı olarak alkali (pH >13) ve nötral (pH 8.4) yöntemler olmak üzere iki farklı versiyonu vardır. Sadece çift zincir kırıklarının saptanabildiği nötral yöntemle kıyasla, alkali yöntem daha yüksek hassasiyete sahip olduğundan hem tek hem de çift zincir kırıklarının tespitine imkan vermektedir (Ren ve diğ., 2017).

Komet yöntemi, lizis işleminden sonra hücredeki farklı elektrik yükü ve molekül ağırlıklarına sahip DNA moleküllerinin elektromanyetik alanda yürütülerek bir komet kuyruğu oluşturmaları ve bu komet kuyruğu uzunluğunun ölçülerek hücredeki DNA hasar miktarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Garcia-Canton ve diğ., 2017). Bu yöntemde, hücrelerin agarozaya yerleştirilmesinin ardından, lizis işlemi gerçekleştirilir, hücreler alkali elektroforez tamponunda yürütülür ve son olarak, nötralizasyon işleminin ardından DNA floresan boyası ile boyanır. Lam üzerinde bulunan hücrelerin DNA'sının hasarsız olması durumunda kuyruk oluşumu gerçekleşmezken, hasarlı DNA parçaları yüklerine ve molekül ağırlıklarına göre elektriksel alanda yürüyerek kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).



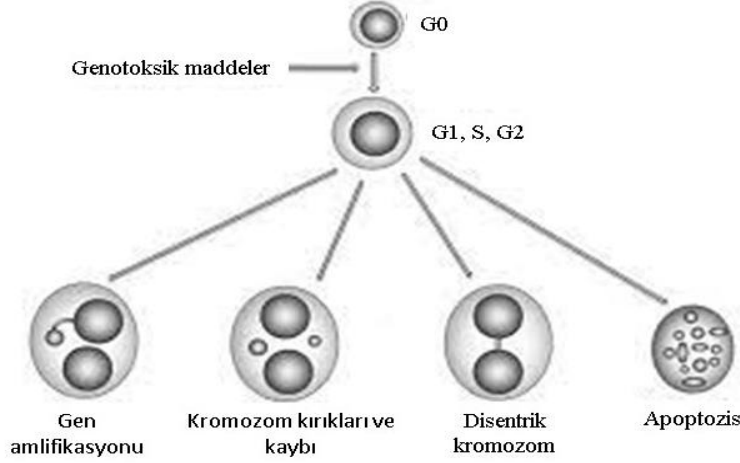
Şekil 2.3.1.4.1: Komet testi basamakları (Gunasekaran ve diğ., 2015).

2.3.1.5. Mikronukleus Testi

In vitro mikronukleus testi, anöploid ve/veya kromozom fragmantasyonunu uyaran genotoksik ajanlara maruz kalmış hücrelerdeki sitogenetik hasarın tayininde kullanılan bir mutajenite testidir (Araldi ve diğ., 2015). Fenech ve arkadaşları (1999) tarafından geliştirilen yöntemde, mitotik bölünme sırasında karyokinezden sonra gerçekleşen sitokinez, aktin polimerizasyonu inhibitörü olan sitokalsin-B kullanılarak inhibe edilir ve tek bir hücrede iki nukleuslu hücreler elde edilir. Böylelikle, oluşan binukleat (iki nukleuslu) hücrelerdeki mikronukleuslar sayılarak mitoz geçiren hücreler ve mikronukleus sıklığı belirlenir (Garcia-Canton ve diğ., 2012). Mikronukleus, metafazda durdurulmuş hücrelerdeki kromozom aberasyonlarına kıyasla daha hızlı ve kolay değerlendirilir. Ayrıca, bu yöntemde yüzlerce

yerine binlerce hücredeki mikronukleusun değerlendirilmesi testin daha yüksek doğruluk vermesine sebep olur (Speit, 2002).

Klastojen ve anojenlere maruziyet sonucu oluşan mikronukleuslar genel olarak, mitotik iğdeki kusurlardan, anormal kromozom ayrılmalarından, hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki bozukluk ya da eksiklerden ve kromozom kırıklarından kaynaklanır ve mitoz bölünme sırasında esas nukleustan ayrılan asentrik veya tam kromozom fragmanlarından köken alırlar (Araldi ve diğ., 2015; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Buna ek olarak, mikronukleus oluşumu onkogenik süreçte yaygın olarak gözlemlenen DNA amplifikasyonundan da ortaya çıkmaktadır (Araldi ve diğ., 2015). Bu nukleustan ayrı konumlanan kromozomlar ya da kromozom parçaları nüklear zar ile kaplanır ve nüklear boyama sonrasında morfolojik olarak daha küçük boyutlardaki nukleusa benzerler (Turkez ve diğ., 2017).



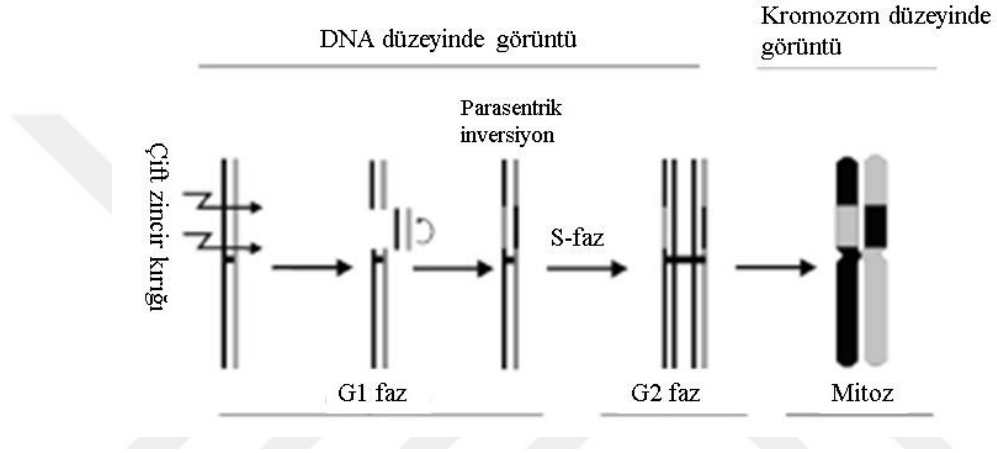
Şekil 2.3.1.5.1: Mikronukleus testi ile tayin edilen bazı kromozom anormallikleri (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

2.3.1.6. Kardeş Kromatid Değişimi Testi

Kardeş kromatid değişimi testi, çeşitli genotoksin ve mutajenlere maruziyet sonrası meydana gelen kromozomların yapısal değişiminin ve kromozom kararsızlığı sendromuyla sonuçlanan DNA onarım kusurlarının araştırılmasında ve kanserin izlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılan bir sitogenetik testtir. KKD oluşumunun izlenmesi, çeşitli ajanlarla uyarılan DNA hasarının tayininde çok hızlı, kolay ve hassas bir yöntemdir (Lialiaris, 2013.)

Kardeş kromatid değişimi, DNA replikasyonu sırasında iki kardeş kromatitte kırık oluşumunu, özdeş DNA segmentlerinin karşılıklı değişimini ve çift zincirdeki kırıkların onarılarak yeniden birleşmesini içeren süreçtir (Wilson ve Thompson, 2007). KKD testinde, hücre kültürüne

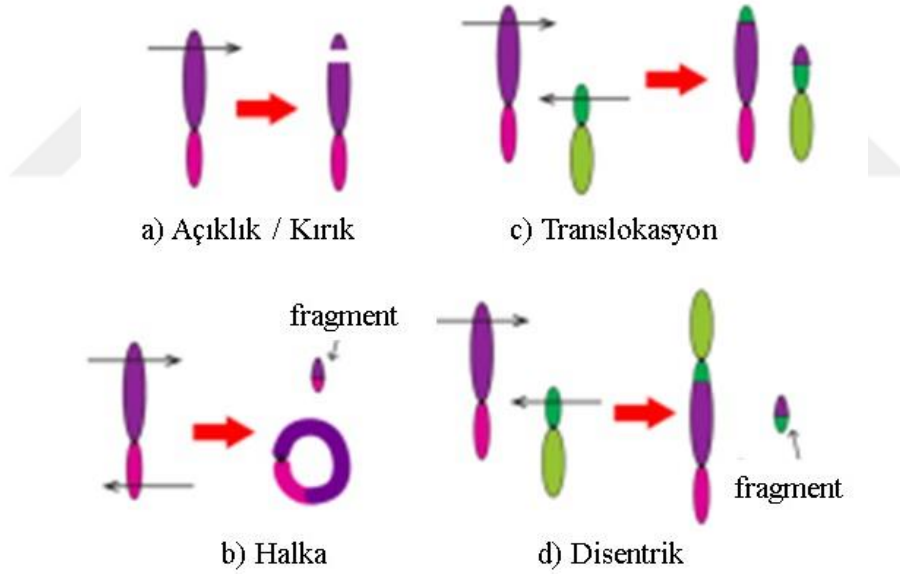
timidin analoğu olan 5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU) eklenerek iki replikasyon döngüsü geçirilir. Hücrelerin en iyi görüldüğü metafaz evresinde durdurmak için ortama kolşisin gibi iğ ipliği oluşumunu engelleyici madde uygulanır. Son olarak, kromozomlar boyanarak görünür hale getirilir. Boyama sonrasında, aynı kromozoma ait kromatitlerden biri koyu diğeri (dizilerin sadece birinde timin içeren) ise açık renk (iki DNA zincirinde BrdU içeren kromatit) görünür. Elde edilen bu boyanma farkı ile DNA’da kardeş kromatidler arasında karşılıklı değişim olan bölgeler tespit edilir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Turkez ve diğ., 2017).



Şekil 2.3.1.6.1: Hücre döngüsünün G1 fazında uyarılan parasentrik inversiyon ile KKD oluşumu (Wojcik ve Obe, 2007). .

2.3.1.7. Kromozomal Aberasyon Testi

Kromozomal aberasyon (KA) testi, genotoksik maddeler tarafından uyarılan ve çeşitli genetik hastalıkların etiolojisinde rol oynayan kromozom veya kromatid kırıklarının, numerik değişimlerin (anöploidi), translokasyonun ve diğer kromozomal yeniden düzenlemelerin tespit edilmesinde kullanılır (Turkez ve diğ., 2017; Jan ve diğ., 2020). Bu test, hücrelerin kolşisin ya da kolsemid uygulaması ile mitozun metafaz evresinde durdurulmasının ardından, hücrelerdeki onarılmayan DNA kırıklarının ve onarım mekanizmaları tarafından yanlış onarılan DNA çift zincir kırıklarından köken alan kromozomal bozuklukların boyama prosedürü ile mikroskop altında görüntülenerek analiz edilmesine olanak sağlar (Obe ve diğ., 2002; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Yapılan analizler sonucu, yüksek kromozom aberasyonu sıklığının, artan kanser riskiyle bağlantılı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Bonassi ve diğ., 2004; Jain ve diğ., 2018).



Şekil 2.3.1.7.1: Yapısal kromozom aberasyonunun dört farklı tipi (Nenoi, 2015). .

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, TM3 Leydig hücre soyu farklı furan konsantrasyonlarına 24 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu hücreleri %0,1'lik etanol içeren kültür medyumunda, deney grubundaki hücreler ise %0,1 etanol içeren kültür medyumunda hazırlanmış farklı furan konsantrasyonları ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Maruziyet süresinin tamamlanmasının ardından, furanın hücre canlılığı ve hücre içi sitotoksikite üzerine etkisi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Furana maruz kalan hücrelerde oluşan DNA hasarını tahmin etmek amacıyla, komet yöntemi, mikronukleus yöntemi ve kromozom aberasyonu yöntemi uygulanmıştır.

3.1. TM3 HÜCRE HATTI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan TM3 hücre hattı 11-13 günlük genç BALB/c farelerinin testis dokusunda bulunan Leydig hücrelerinden elde edilmiş tümorogenik olmayan bir hücre hattıdır. TM3 Leydig hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan temin edilmiş olup *in vitro* ortamda uygun koşullarda çoğalması sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan TM3 hücre hattına ait bilgiler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.1.1: TM3 hücre hattının karakteristik özellikleri.

TM3 LEYDİĞ HÜCRE HATTI	
Organizma	<i>Mus musculus</i>
Doku	Testis
Morfoloji	Epitel
Kültür özellikleri	Adherent tip hücre

TM3 hücrelerinin *in vitro* ortamda uygun koşullarda çoğaltılıp hücresel fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gerekli bileşenlerden oluşan kültür medyumuna hazırlanmıştır. Hücreler, 50:50 DMEM/F12 kültür medyumuna, hücre çoğalması için gerekli olan %5 at serumu, %2,5 fetal sıgır serumu, 2.5 mM L-Glutamin, 0.5 mM Sodyum Pirüvat, 1.2 g/L Sodyum Bikarbonat, 15 mM HEPES ve PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterin) gibi bileşenlerin ilavesiyle hazırlanmış kültür medyumunda çoğaltılmış olup %5 CO₂ ve %95 hava içeren 37°C

sıcaklıktaki inkübatörde 75 cm²'lik kültür kaplarının içerisinde inkübe edilmiştir. Hücreler günlük olarak mikroskopla gözlemlenip gerektiğinde kültür medyumları değiştirilmiş ve hücre yoğunluğuna göre haftada 2-3 kez düzenli olarak pasajlama işlemi yapılmıştır.

3.2. HÜCRELERİN PASAJLANMASI

Kültür kaplarındaki hücreler yaklaşık %70-80 doluluk oranına ulaştıklarında haftada iki-üç kere olmak üzere pasajlama işlemi yapılmıştır. Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşmış kültür kaplarının içerisindeki kültür medyumunun çekilerek uzaklaştırılmasının ardından, hücreler 3 ml %0,25 tripsin-0.53mM EDTA ile 37°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, kültür kabı yüzeyinden kalkan hücrelere 5 ml kültür medyumunu eklenerek tripsin etkinliği inhibe edilmiştir. Kültür kabındaki hücre süspansiyonuna pipetaj yapılarak hücreler toplanmış ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktararak 1500 g'de 5 dakika oda ısısında santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, elde edilen pelete taze kültür medyumunu eklenerek pipetaj yapılmıştır. Pipetaj işlemi ile medyum içerisinde homojen dağılan hücreler hemositometre kullanılarak sayılmış ve deneyler için istenilen miktardaki hücre, taze kültür medyumunu içeren kültür kaplarına ekilerek 37°C' deki %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir.

3.3. HÜCRELERİN DONDURULMASI, SAKLANMASI VE ÇÖZÜLMESİ

Deneyler için ayrılan hücreler dışındaki ihtiyaç fazlası hücrelerin yaşlanmasını engellemek ve diğer deneylerde tekrardan kullanabilmek amacıyla hücreler dondurularak stok hazırlanmıştır. Hücrelere pasaj işlemi uygulamasının ardından, taze kültür medyum ile süspanse edilmiş 1900 µl hücre solüsyonu ve 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) 2 ml'lik kriyotüp içerisine aktarılmış ve hafifçe çalkalanmıştır. Deney süresince gerekli olacak hücre stoğu için kriyotüpler -20 °C'de bir gece bekletildikten sonra -86 °C'ye kaldırılmıştır. Uzun süreli stoklama için ise kriyotüpler -196 °C'lik sıvı azot tankına alınmıştır.

Deneylerde kullanılmak üzere -86 °C'lik derin dondurucudan çıkartılan hücreler, 37 °C'lik sıcak su banyosunda birkaç dakika bekletilmiş ve hızlı bir şekilde çözülmesi sağlanmıştır. Kriyotüp içerisindeki çözülen hücre süspansiyonu santrifüj tüplerine aktararak 1500 g'de 5 dakika oda ısısında santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelete 2 ml taze medyum ilave edilerek pipetaj yapılmış ve elde edilen hücre süspansiyonu taze medyum içeren kültür kaplarına aktarılmıştır. Ardından, kültür kapları 37 °C sıcaklıktaki %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüve kaldırılmıştır.

3.4. DENEY GRUPLARININ HAZIRLANMASI VE MARUZİYET

TM3 Leydig hücre soyuna uygulanan furan konsantrasyon aralığı, çeşitli hücre soyları üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar göz önüne alınarak belirlenmiştir (Mugford ve diğ., 1997; Pandir ve diğ., 2015; Rehman ve diğ., 2019; Russo ve diğ., 2021). Furan, öncelikle %0,1 etanolde çözündürülerek stok solüsyon hazırlanmış ve 0,2 µm milipor filtreden geçirilip sterile edilmiştir. Ardından, bu stok solüsyon kültür medyumuna ile sulandırılarak 0, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 µM'lık furan konsantrasyonları hazırlanmış ve hücrelere 24 saat süreyle uygulanmıştır.

MTT testi sonuçlarına göre, hücre canlılığını en fazla %80'e düşüren konsantrasyonlar olan 750, 1500 ve 3000 µM furan konsantrasyonları diğer deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelere ise %0,1 etanol içeren kültür medyumuna uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak, klastojenik ajan olduğu bilinen 300 µM H₂O₂ konsantrasyonu, hücrelere 24 saat süreyle uygulanmış ve oluşan DNA hasarı deney grupları ile kıyaslanmıştır.

Tablo 3.4.1: Genotoksisite testlerinde kullanılan maruziyet grupları.

Negatif Kontrol Grubu	Pozitif Kontrol Grubu	Furan Grupları
% 0,1 etanol içeren kültür medyumuna	300 uM H ₂ O ₂ + kültür medyumuna	750 µM Furan + % 0,1 etanol içeren kültür medyumuna • 1500 µM Furan + % 0,1 etanol içeren kültür medyumuna • 3000 µM Furan + % 0,1 etanol içeren kültür medyumuna

3.5. HÜCRE CANLILIĞI VE SİTOTOKSİSİTE

3.5.1. MTT Testi

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid (MTT) testi [Cell Proliferation Kit I (MTT) Roche-Germany], hücrenin toksik bir maddeye maruz kalması sonucu hücre canlılığında ve proliferasyonunda meydana gelen değişikliğin nicel olarak değerlendirilmesinde kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Sarı renkli tetrazolium tuzunun canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aktivitesiyle mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi, sadece metabolik olarak aktif olan hücrelerde görülmektedir. Mitokondriyal aktivite sonucu oluşan mor renkli formazan kristalleri, DMSO ve sodyum dodesil sülfat gibi bir çözücü kullanılarak çözünür hale getirilir ve reaksiyon sonucu oluşan renk spektrofotometrede okunur. Oluşan formazan miktarı, canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır.

MTT kolorimetrik hücre canlılığı testi için 96 kuyulu kültür kaplarına her kuyuya 5×10^3 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmış ve hücrelerin kuyulara tutunmasını sağlamak için 16-18 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin kuyulara tutunması için gerekli sürenin sonunda, eski medyum çekilip atılmış ve hücreler, %0,1 etanol içeren kültür medyumunda hazırlanmış 7 farklı furan konsantrasyonunda (250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 μM) 24 saat boyunca, 37°C 'de CO_2 'li etüvde inkübe edilmiştir. Maruziyet süresini tamamlandıktan sonra, kuyulardaki deney medyumları atılmış ve yerine, her kuyuya 10 μL MTT I solüsyonu konularak kültür kapları 4 saat 37°C 'de CO_2 'li inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca, sarı tetrazolium tuzunun hücredeki mitokondriyal aktivite sonucu uyarılması ile oluşan suda çözünmeyen mor formazan kristallerinin çözülmesi için, her kuyuya 100 μL sodyum dodesil sülfat içeren MTT II solüsyonu ilave edilip kültür kapları bir gece CO_2 inkübatöründe bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyuların absorbans değerleri Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) cihazında 540 nm dalga boyunda ölçülmüş ve deney üç kez tekrarlanmıştır. Hücre canlılığı yüzdesi hesaplanırken test maddesi ile muamele edilmemiş kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Elde edilen her absorbanstan körün absorbans değeri çıkartılarak hücre canlılığı yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.5.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi

Laktat dehidrogenaz enzimi, organizmadaki tüm hücrelerin sitoplazmalarında lokalize olan ve plazma membranı bütünlüğünün zarar görmesi durumunda kültür medyumuna salınan bir hücre içi enzimdir. Plazma membranındaki hasar ile birlikte aktivitesi artan LDH enzimi, ilk olarak laktatın pirüvata dönüşümünü katalize etmektedir. Bu dönüşüm ile birlikte de Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), NADH/H^+ 'ya indirgenmektedir. Sonraki adımda, katalizör madde NADH/H^+ dan H/H^+ bir tetrazolyum tuzunun kırmızı renkli formazana transformasyonunu gerçekleştirmektedir. Böylelikle, deney sırasında oluşan kırmızı formazan miktarı, süpernatanttaki LDH enzim aktivitesiyle ve dolayısıyla, hasar görmüş hücre miktarıyla doğrudan ilişkilidir.

Bu yöntem için, 96 kuyulu kültür kaplarına her kuyuya 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin kuyulara tutunması için geçen sürenin ardından, hücreler %0,01 etanol içeren kültür medyumunda hazırlanmış üç farklı furan konsantrasyonu (750, 1500 ve 3000 μM) ile 24 saat boyunca 37°C 'de CO_2 'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, enzim ve boya solüsyonlarını içeren deney karışımından kuyu başına 100 μl ilave edilmiş ve kültür kapları karanlıkta 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonlanmasıyla birlikte meydana gelen sitotoksisite, 492 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Laktat dehidrogenaz aktivitesi yüzdesi hesaplanırken test maddesi ile muamele edilmemiş kontrol grubunun LDH seviyesi %100 olarak kabul edilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden görün absorbans değeri çıkartılarak LDH aktivitesi yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.6. GENOTOKSİSİTE

3.6.1. Komet Testi

Komet testinde kullanılan deney prosedürü ve çözeltiler için Singh ve arkadaşları (1988) ile Tice ve arkadaşlarının (2000) yöntemleri laboratuvar koşullarımıza göre modifiye edilerek kullanılmıştır.

3.6.1.1. Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması

%1,5 Normal erime noktalı agaroz (NMPA) çözeltisi: 750 mg NMPA üzerine 50 mL distile su eklenip mikrodalga fırında kontrollü bir şekilde ısıtılarak çözüldü.

%0,5 Düşük erime noktalı agaroz (LMPA) çözeltisi: 50 mg LMPA üzerine 10 mL PBS eklenip mikrodalga fırında kontrollü bir şekilde ısıtılarak çözüldü.

Lizis solüsyonu: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA ve 10 mM Tris 198 mL distile su içerisinde çözüldü. Solüsyon pH'ı 10'a ayarlandıktan sonra içerisine 2 ml TritonX-100 ve %10 DMSO ilave edilerek 200 mL'ye tamamlandı.

Elektroforez tamponu: Elektroforez tamponu için 300 mM NaOH ve 1 mM Tris 800 mL distile su içerisinde çözüldü ve pH>13 olacak şekilde ayarlandı.

Nötralizasyon solüsyonu: 0,4 M Tris 200 mL distile su içerisinde çözüldü ve pH 7,5'e ayarlandı.

Boyama solüsyonu: DAPI distile su ile seyreltilerek kullanıldı.

3.6.1.2. Preparatların hazırlanması ve boyanması

Pasaj işleminin ardından hemositometre ile sayılan TM3 Leydig hücreleri, komet testi için altı kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Kontrol ve deney gruplarını oluşturmak üzere, kültür kaplarına tutunan hücrelere üç farklı furan konsantrasyonu ve 300 μ M H_2O_2 konsantrasyonu 24 saat süreyle uygulanmıştır. Maruziyet süresi tamamlandığında, hücreler tripsinizasyon işlemi ile toplanıp 1500 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiş ve sonrasında, pelet PBS ile sulandırılmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonu ile eritilmiş %0,05'lik LMPA (37°C) 1:6 oranında karıştırılıp pipetaj işlemi yapılmıştır. Elde edilen homojen hücre süspansiyondan 30 μ L alınıp, deney gününden önce %1,5'luk NMPA'ya daldırılarak kaplanan lamaların üzerine yayılmış ve lamel ile üzeri kapatılmıştır. Lamalar +4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda, lamel agarın hasar görmemesine dikkat edilerek yavaşça çekilip atılmıştır. Ardından, lamalar şale içerisine yerleştirilmiş ve taze hazırlanan soğuk lizis tamponu içerisinde karanlık ortamda bir saat boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Lizis süresinin tamamlanmasının ardından, lamalar elektroforez tankına aralıksız ve agar kaplı taraf yukarıda kalacak şekilde yerleştirilmiştir. Ardından, soğuk alkali elektroforez tamponu ile doldurulan tank, DNA çift sarmalının açılmasını sağlamak amacıyla +4°C'de bekletilmiştir. 20 dk'lık

bekleme süresinin sonunda, 300 mA, 25 V'ta 30 dk süre ile elektroforez gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi bittiğinde lamalar saf su ile yıkanmış ve nötralizasyon tamponu ile üç kez beşer dakikalık periyotlarla muamele edilmiştir.

Nötralizasyon süreci tamamlandığında, lamalar beş dakika boyunca 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile boyanmıştır. Boyanan lamalar yıkanıp kurumaya bırakılmış ve kuruduktan sonra floresan mikroskop ile görüntülenerek fotoğraflanmıştır. Elde edilen fotoğraflar ile her lamdan 100'er hücre Cometscore 2. Programı üzerinde değerlendirilmiştir. DNA hasarı, bilgisayar programında bulunan komet kuyruk %DNA içeriği, kuyruk uzunluğu ve Olive kuyruk momenti parametreleri kullanılarak belirlenmiştir.

☞ Işıktan kaynaklanacak ilave bir DNA hasarını engellemek amacıyla deney, lizis basamağından itibaren karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Mikronukleus Testi

Mikronukleus sayısını tespit etmek için Fenech (2007) tarafından geliştirilen test protokolü laboratuvar koşullarımıza uyarlanarak uygulanmıştır.

3.6.2.1. Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması

Sitokalsin-B çözeltisi: DMSO içerisinde çözülerek hazırlanan 2 M Sitokalsin B stok çözeltisi 4 µg/mL olacak şekilde kültür medyumuna ile seyreltilmiştir.

Hipotonik çözelti (0,075 M): 112 mg KCl 20 mL ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Carnoy fiksatif: 3 birim soğuk methanole 1 birim glasiyel asetik asit eklenerek hazırlanmıştır.

Sorensen tamponu: 51mL tampon A (0,06 M Na₂HPO₄) üzerine 49 mL tampon B (0,06 M KH₂PO₄) ilave edildikten sonra karışımın pH'ı 6,8'e ayarlanmıştır.

%4'lük Giemsa çözeltisi: 4 mL Giemsa solüsyonu ile 96 mL Sorensen tamponu karıştırılarak elde edilmiştir.

3.6.2.2. Preparatların hazırlanması ve boyanması

TM3 Leydig hücreleri kontrol ve deney gruplarını oluşturmak üzere altı kuyulu kültür kaplarına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilip 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edilmiştir. Ayrıca, pozitif kontrol grubundaki hücrelere $300 \mu\text{M}$ H_2O_2 konsantrasyonu uygulanmıştır. Maruziyet süresinin sonunda, kuyulardaki eski medyumlar çekilip atılmış ve yerine hücrenin sitoplazmik bölünmesini baskılayacak olan sitokalsin-B çözeltisi eklenmiştir. 20 saat süreyle 37°C 'de inkübasyonun ardından hücreler tripsinizasyon işlemi ile toplanıp 15 mL'lik falkonlara aktarılmış ve 1500 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, peletin üzerine KCl hipotonik solüsyon eklenip beş dakika oda ısısında bekletilmiştir. Bekleme süresi tamamlandığında, hücre süspansiyonuna pipetaj yapılmış ve üzerine taze hazırlanmış soğuk Carnoy fiksatif ilave edilip santrifüj işlemi tekrar edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, peletin üzerine Cornay fiksatif damla damla eklenip tekrar santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pelet üzerine Cornay fiksatif eklenerek pipetaj yapılmıştır. Bu işlem hücre süspansiyonu tamamen berraklaşana kadar tekrar edilmiştir. Tüpün içerisindeki hücre süspansiyonu hücreler üst üste gelmeyecek şekilde temiz lamlara yayılmış ve lamalar oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan preparatlar Giemsa çözeltisi ile sekiz dakika boyanmıştır. Boyanma süresinin sonunda, lamalar distile su ile yıkanmış ve tekrar kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar kuruduktan sonra, ışık mikroskopunda her grup için rastgele 1000 binokleat hücre seçilerek 40X'lık objektifte incelenerek % mikronukleus sıklığı değerlendirilmiştir. Bu çalışma için deney 3 kez tekrar edilmiştir.

Mikronukleus değerlendirmesi aşağıda verilen kriterlere uygun olarak yapılmıştır:

- Değerlendirmeye dahil edilen hücreler iki nukleusa sahip olmalı ve bu nukleuslar birbirine büyüklük, şekil ve boyama yoğunluğu bakımından neredeyse eşit olmalıdır.
- Mikronukleusların büyüklüğü ana nukleusun çapının yaklaşık olarak 1/16 ila 1/3'ü arasında olmalıdır.
- Mikronukleuslar, ana nukleus ile aynı boyanma yoğunluğunda ve boyutu haricinde özdeş olmalıdır.
- Mikronukleusların nuklear sınırları belirgin olmalıdır, ana nukleustan ayırt edilebilmelidir.

☞ Ayrıca, sitotoksiste belirteci olan hücre bölünmesinin baskılanmasının açığa çıkarılmasında kullanılan nuklear bölünme indeksini hesaplamak için her preparattan rastgele sayılan 500 hücre değerlendirilmiş ve bir, iki, üç ve dört nukleusa sahip hücreler sayılmıştır. Nuklear bölünme indeksi, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Eastmond ve Tucker, 1989).

$$\text{NBI} = [M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4] / N$$

NBI: nuklear bölünme indeksi, M_1 : bir nukleuslu hücre, M_2 : iki nukleuslu hücre, M_3 : üç nukleuslu hücre, M_4 : dört nukleuslu hücre, N: toplam hücre sayısı

3.6.3. Kromozom Aberasyonu Testi

Kromozom aberasyonu tespiti için Registre ve Proudlock (2016) tarafından geliştirilen test protokolü laboratuvar koşullarımıza göre modifiye edilerek uygulanmıştır.

3.6.3.1. Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması

Kolşisin solüsyonu: Mitotik zehir olarak kullanılan Kolşisin solüsyonu distile su içerisinde hazırlanmış ve 0,06 µg/mL olacak şekilde deney medyumuna ilave edilmiştir.

Sorensen tamponu: 51 mL tampon A (0,06 M Na_2HPO_4) üzerine 49 mL tampon B (0,06 M KH_2PO_4) ilave edildikten sonra karışımın pH'ı 6,8'e ayarlanmıştır.

%4'lük Giemsa çözeltisi: 4 mL Giemsa solüsyonu ile 96 mL Sorensen tamponu karıştırılarak %4 oranında boya eriği elde edilmiştir.

Fiksatif: 3 birim soğuk methanole 1 birim glasiyel asetik asit eklenerek hazırlanmıştır.

Hipotonik çözelti (0,075 M): 112 mg KCl 20 mL ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.6.3.2. Preparatların hazırlanması ve boyanması

TM3 Leydig hücreleri kontrol ve deney grupları olacak altı kuyulu kültür kaplarına hücre yoğunluğu 5×10^5 olacak şekilde ekilip inkübatörde $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Maruziyet süresinin sonunda, gruplara kolşisin eriğinden 0,06 µg kolşisin/ml besi yeri olacak şekilde eklenmiş ve hücreler iki saat boyunca kolşisine tabi tutulmuştur. 1,5 hücre

döngüsünü tamamlayacak şekilde planlanan maruziyet süresinin sonunda, hücreler tripsinizasyon işlemi ile toplanmıştır. Ardından, her tüpe 37°C'lik KCl hipotonik çözeltisinden eklenip pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiş ve hücre süspansiyonu 45 dakika 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda deney tüpleri beş dakika 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pelete yavaş bir şekilde soğuk fiksatiften eklenip nazikçe pipetaj yapılmış ve tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra tüpte 0,5-0,7 mL süpernatant bırakılarak pasteur pipetiyle pipetaj yapılmıştır. Homojen haldeki hücre süspansiyonundan alınan birer damla yaklaşık 30 cm uzaklıktan lamın farklı alanlarına damlatıldıktan sonra lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan lamlar, taze hazırlanan %4'lük Giemsa çözeltisi ile yaklaşık 15 dakika boyanmıştır. Boyama sonrasında, lamlardaki fazla boya saf su ile yıkanarak temizlenmiştir. Lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan preparatlar binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile 1000X büyütmede incelenmiştir. 50 metafaz analiz edilerek gözlemlenen kromozom anormallikleri skorlanmıştır.

Skorlama sırasında metafaz kromozomlarındaki gap, kromozom/kromatid kırıkları, sentrik halka, delesyon, sentrik füzyon ve disentrik kromozom gibi yapısal anormallikler değerlendirilmiştir.

3.7. İSTATİSTİK ANALİZ

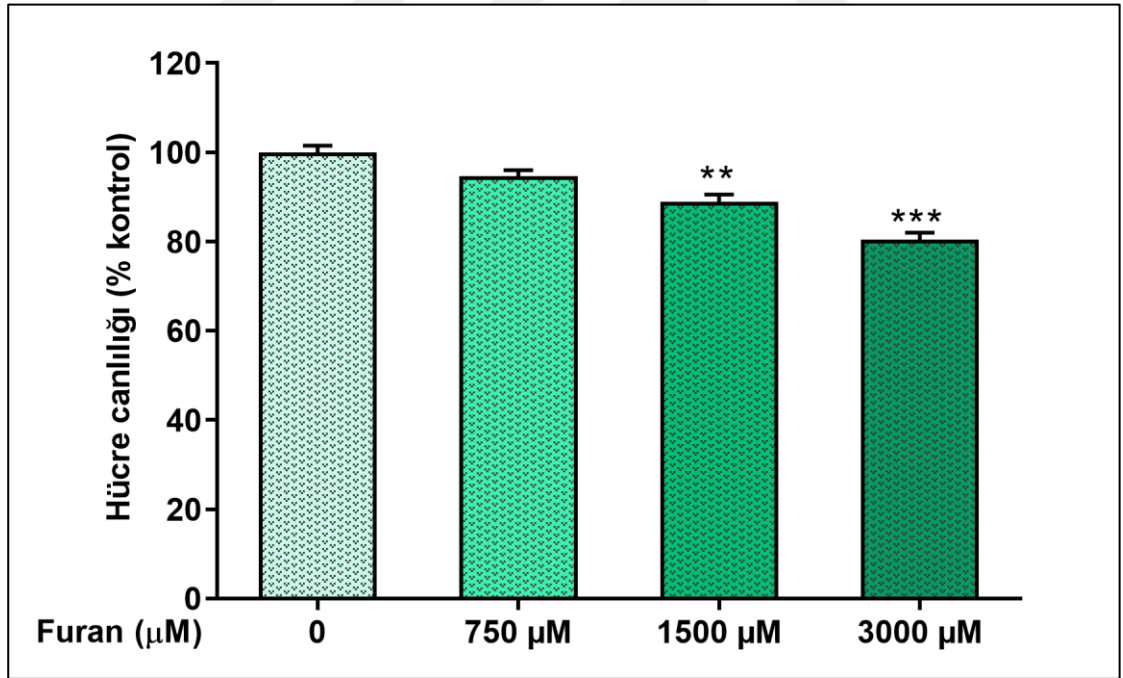
Deney gruplarında uygulanan konsantrasyon ile değişen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Graphpad Prism 9.3.1 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için ilk olarak olarak Kolmogorov-Smirnov normalite testi uygulanmış ve ardından One-Way ANOVA yöntemi ile Tukey's testi kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde $p < 0,05$, $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ anlamlılık düzeyi esas alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI

4.1.1. MTT Bulguları

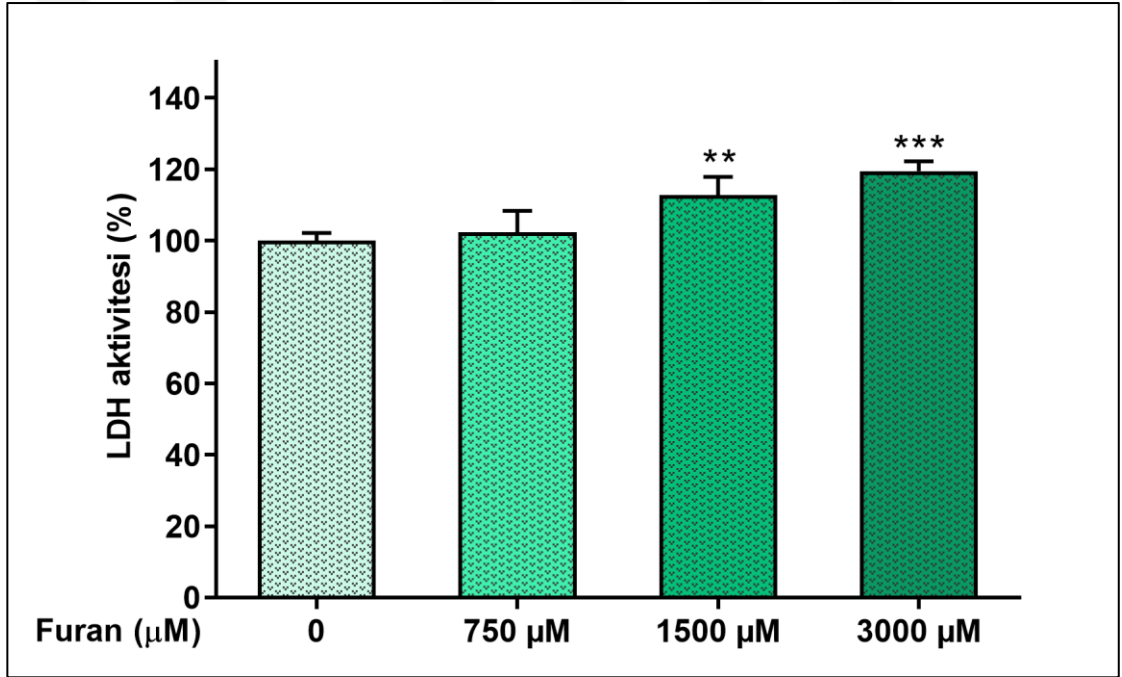
TM3 Leydig hücre soyuna 24 saat süreyle maruz bırakılan üç farklı furan konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. MTT testi sonuçlarına göre, TM3 Leydig hücrelerinin hücre canlılığı kontrol grubu ile kıyaslandığında, furanın 750 μM konsantrasyonu hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişim meydana getirmezken; 1500 ve 3000 μM furan konsantrasyonu uygulanan grupların hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p < 0,01$; $p < 0,001$). Kontrol ve deney gruplarındaki yüzde hücre canlılık oranları şekil 4.1.1.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1.1.1: Furanın 24 saatlik maruziyetinin sonunda TM3 Leydig hücre canlılığı üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.1.2. LDH Bulguları

TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat süren furan maruziyeti sonunda kontrol ve deney gruplarındaki % LDH aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülerek maruziyet sonucu meydana gelen sitotoksosite belirlenmiştir (şekil 4.1.2.1). Maruziyet süresi sonunda, kontrol ve üç farklı furan konsantrasyonu LDH miktarı bakımından kıyaslandığında kontrol grubuna göre 1500 ve 3000 μM furan konsantrasyonlarında anlamlı bir artış tespit edilmiştir (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Şekil 4.1.2.1: TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat süren furan uygulamasının hücrelerdeki laktat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

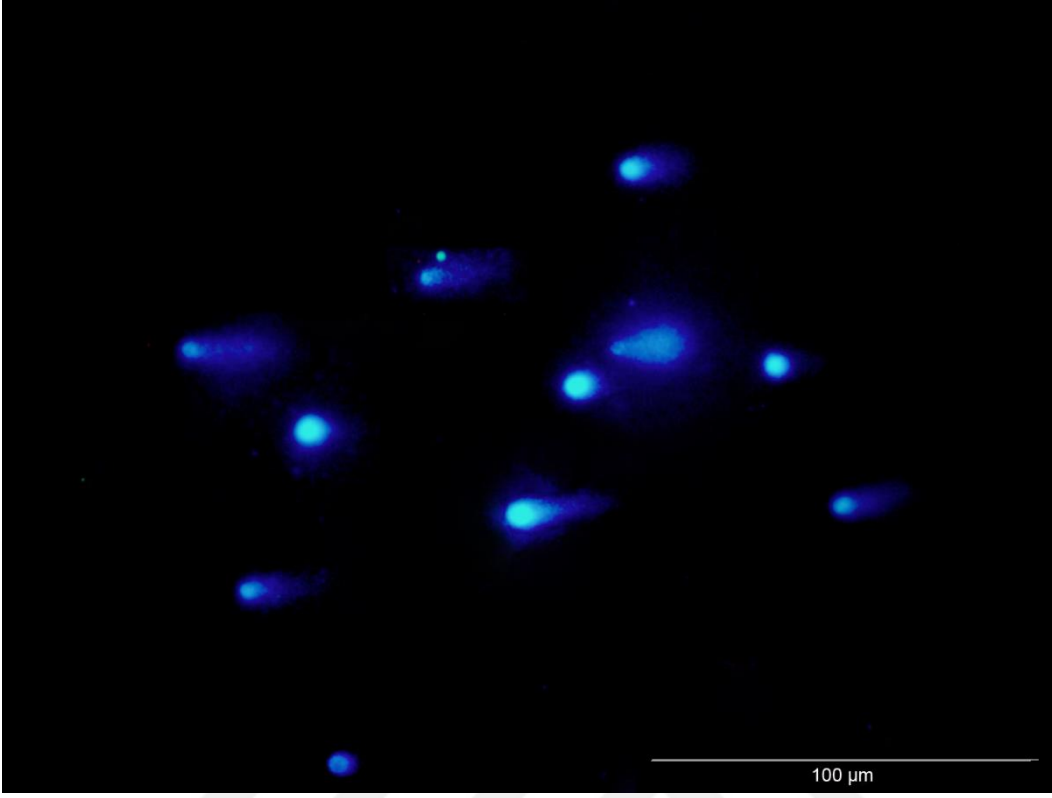
4.2. GENOTOKSİSİTE BULGULARI

4.2.1. Komet Bulguları

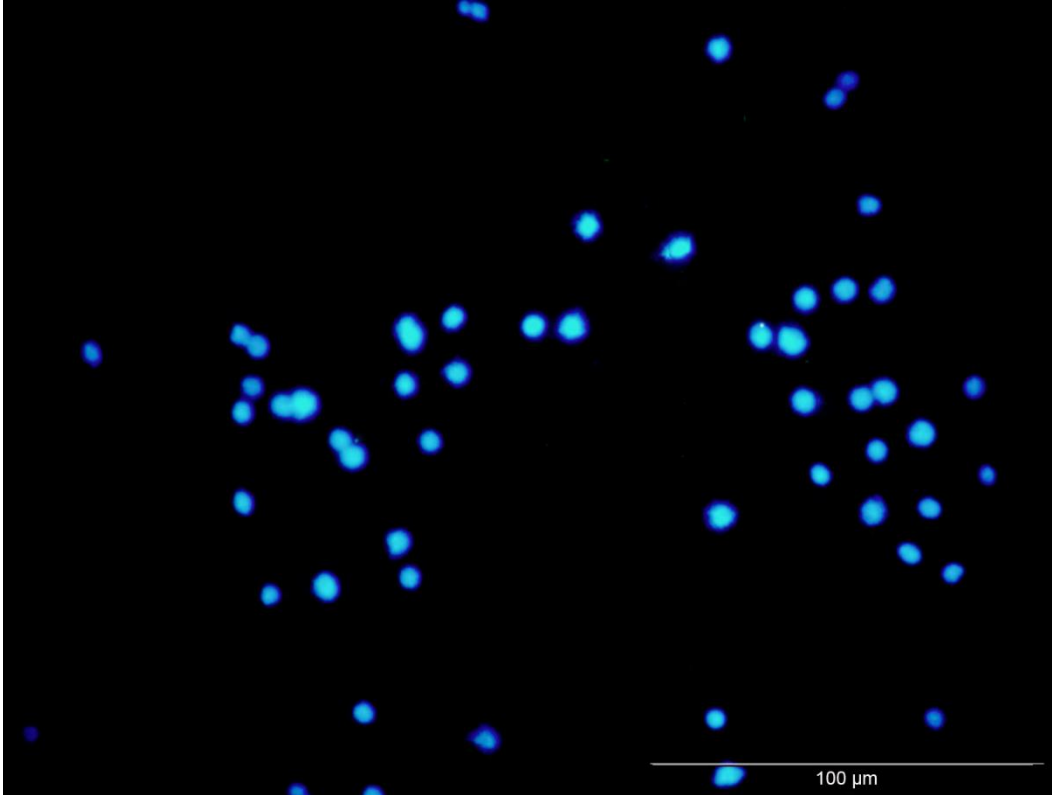
Furanın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinde meydana gelen DNA hasarı, komet testi ile komet kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA miktarı ve Olive kuyruk momenti parametrelerine bakılarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.2.1.1). DNA hasarı belirteçlerinden olan kuyruk uzunluğu ve kuyrukta bulunan % DNA miktarı furan gruplarında konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,001$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1500 ve 3000 μM furan konsantrasyonlarında Olive kuyruk momenti parametresinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,01$, $p<0,001$).

Tablo 4.2.1.1: TM3 Leydig hücrelerinde komet testi parametreleri ile belirlenen furan kaynaklı DNA hasarı *: kontrol grubuna göre (** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

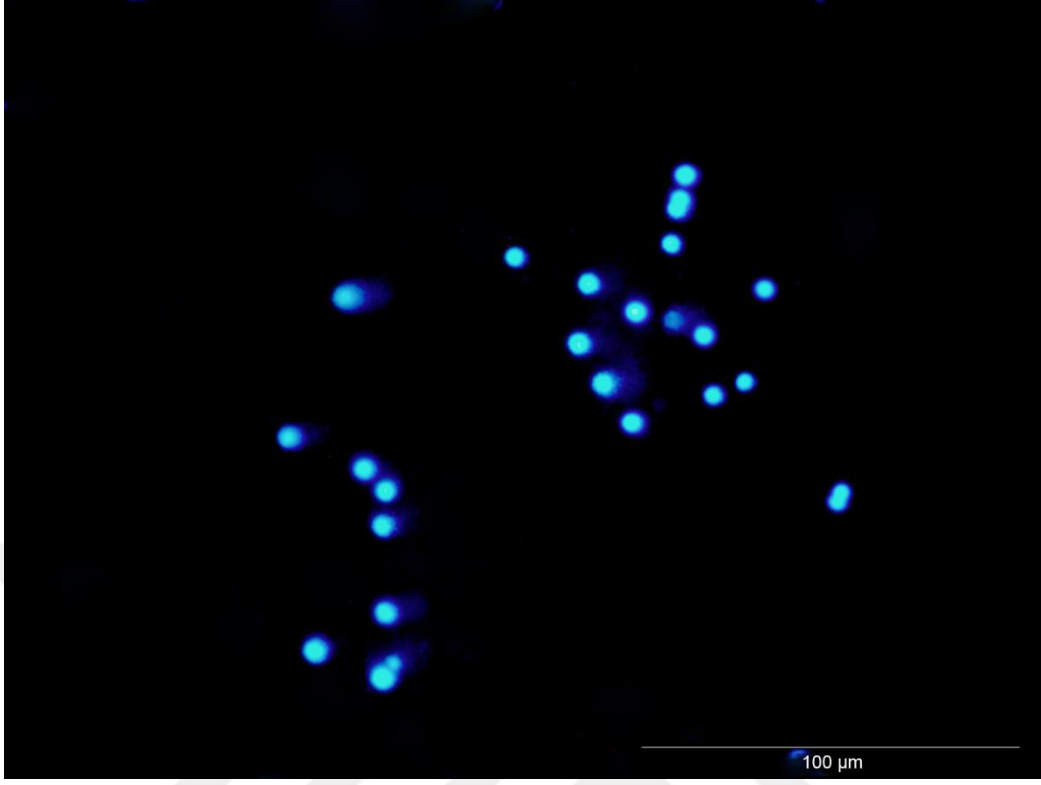
Maruziyet	Kuyruk uzunluğu (μm)	Kuyruk %DNA miktarı	Olive kuyruk momenti
H ₂ O ₂ (300 μM)	80,60 $\pm$ 4,63	79,67 $\pm$ 5,88	11,88 $\pm$ 2,87
Kontrol	1,66 $\pm$ 0,51	8,58 $\pm$ 3,25	1,14 $\pm$ 0,15
F1 (750 μM)	20,38 $\pm$ 1,18***	21,04 $\pm$ 1,77***	3,10 $\pm$ 0,84
F2 (1500 μM)	28,55 $\pm$ 3,02***	34,98 $\pm$ 5,10***	6,58 $\pm$ 1,56**
F3 (3000 μM)	48,40 $\pm$ 4,03***	44,00 $\pm$ 4,30***	10,27 $\pm$ 3,11***



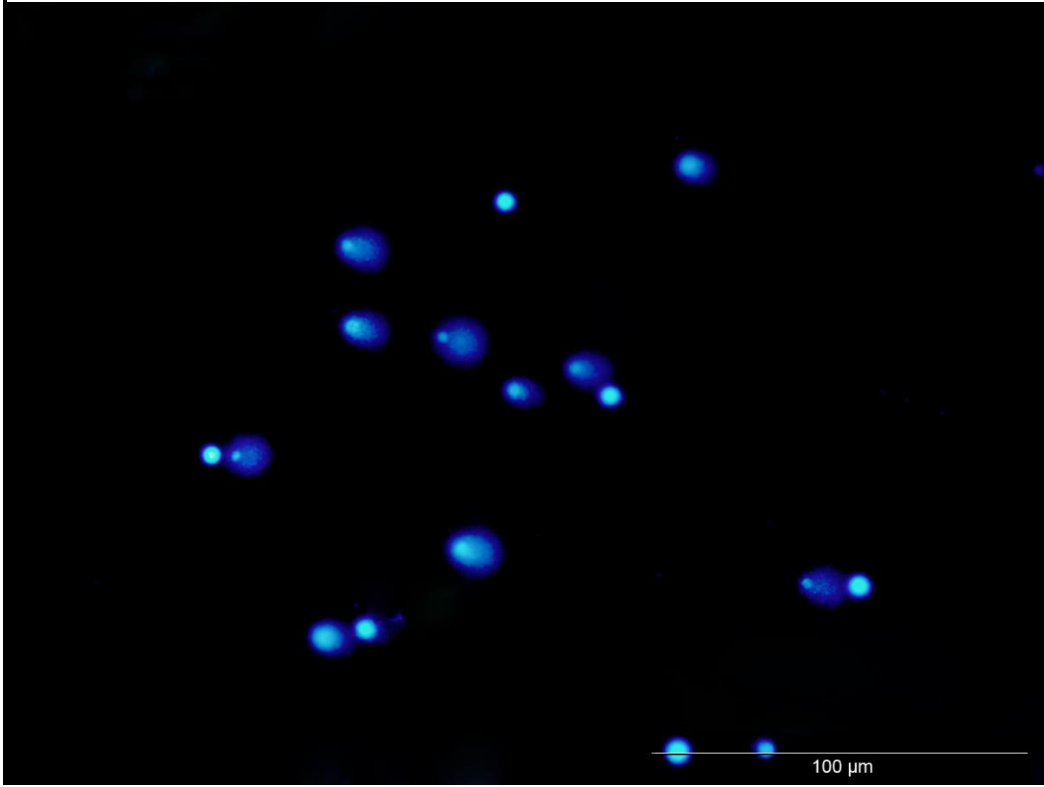
Şekil 4.2.1.1: H₂O₂ grubuna ait hasarlı komet görüntüleri (40X).



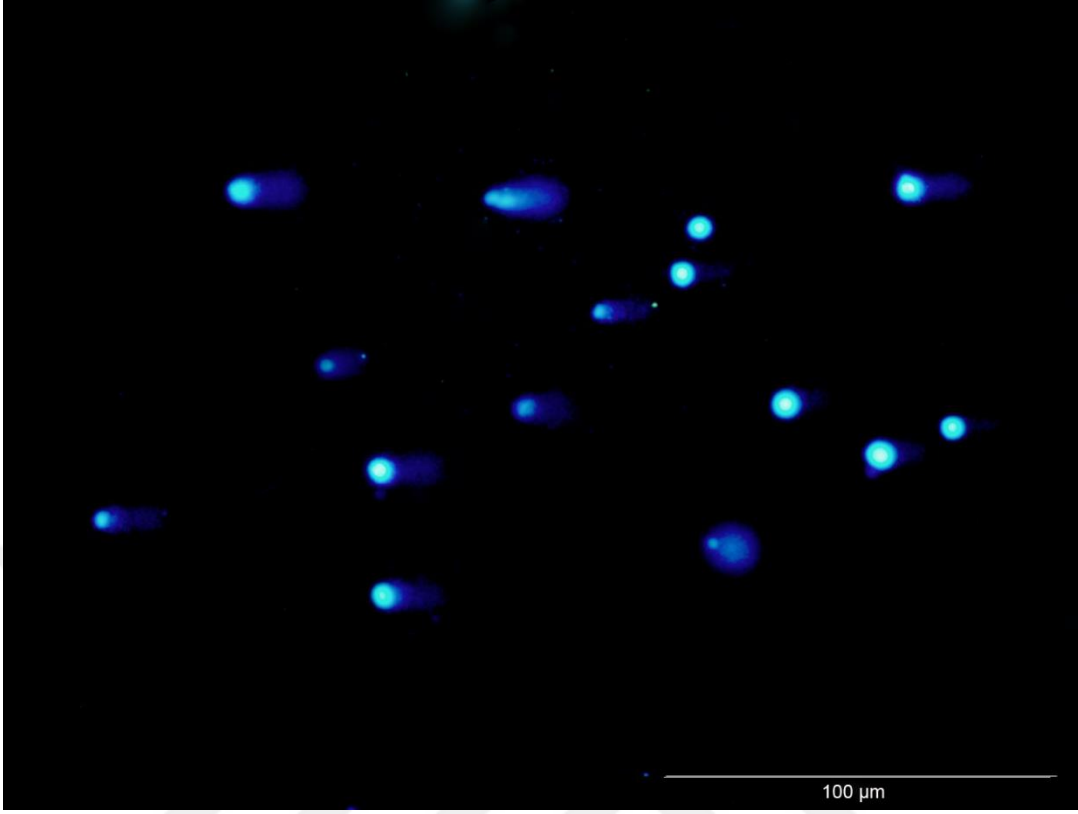
Şekil 4.2.1.2: Kontrol grubuna ait hasarsız komet görüntüleri (40X).



Şekil 4.2.1.3: F1 grubuna ait komet görüntüleri (40X).



Şekil 4.2.1.4: F2 grubuna ait komet görüntüleri (40X).



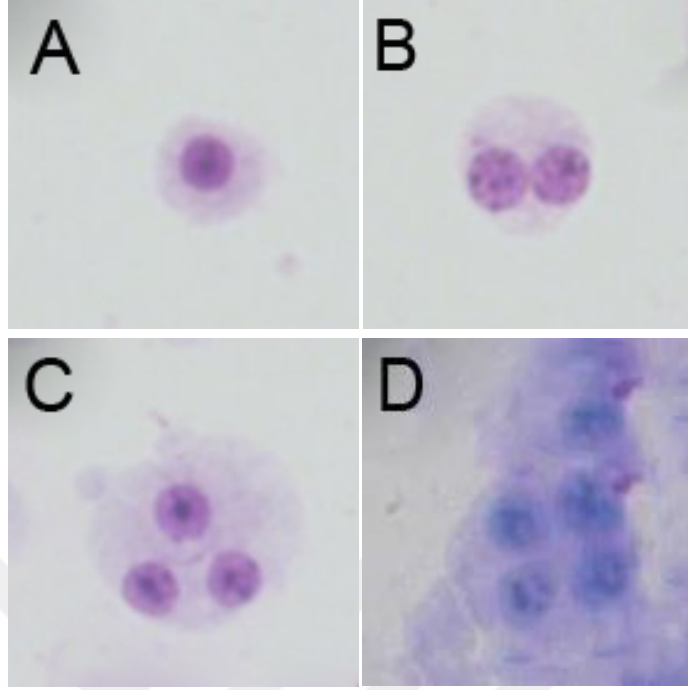
Şekil 4.2.1.5: F3 grubuna ait komet görüntüleri (40X).

4.2.2. Mikronukleus Bulguları

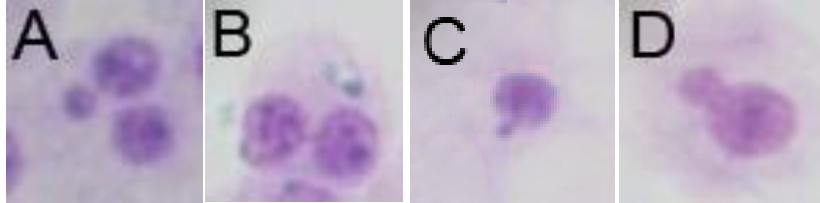
Furanın TM3 hücrelerinde neden olduğu mikronukleus oluşumu ve nükleer bölünme indeksi değişimleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen mikronukleus verilerine göre, 1500 ve 3000 μM furan konsantrasyonu uygulanan deney gruplarındaki mikronukleus içeren binükleat oranlarında istatistiksel olarak artış meydana gelmiştir ($p<0,05$). Buna ek olarak, üç farklı furan konsantrasyonuna maruz bırakılan TM3 Leydig hücreleri kontrol grubu ile nükleer bölünme indeksleri bakımından karşılaştırıldığında 1500 ve 3000 μM furan uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$). Elde edilen verilerin analizi sonucunda, 750 μM furana maruz bırakılan F1 grubunda ise görülen nükleer bölünme indeksindeki düşüşe ve mikronukleus oluşumuna karşın kontrol grubuyla arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

Tablo 4.2.2.1: Furan maruziyetinin TM3 Leydig hücrelerindeki mikronukleus içeren binükleuslu hücre sıklığı ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkileri *: kontrole göre ($*p<0,05$).

Maruziyet	Mikronukleus içeren binükleuslu hücre sıklığı (%)	Nükleer Bölünme indeksi
Kontrol	$0,16 \pm 0,40$	$1,24 \pm 0,00$
H ₂ O ₂ (300 μM)	$30,04 \pm 0,57$	$1,14 \pm 0,00$
F1 (750 μM)	$2,10 \pm 1,07$	$1,20 \pm 0,01$
F2 (1500 μM)	$4,20 \pm 1,80^*$	$1,19 \pm 0,03^*$
F3 (3000 μM)	$4,60 \pm 1,35^*$	$1,15 \pm 0,02^*$



Şekil 4.2.2.1: A) Bir nukleuslu hücre; B) İki nukleuslu hücre; C) Üç nukleuslu hücre; D) Dört nukleuslu hücre. .



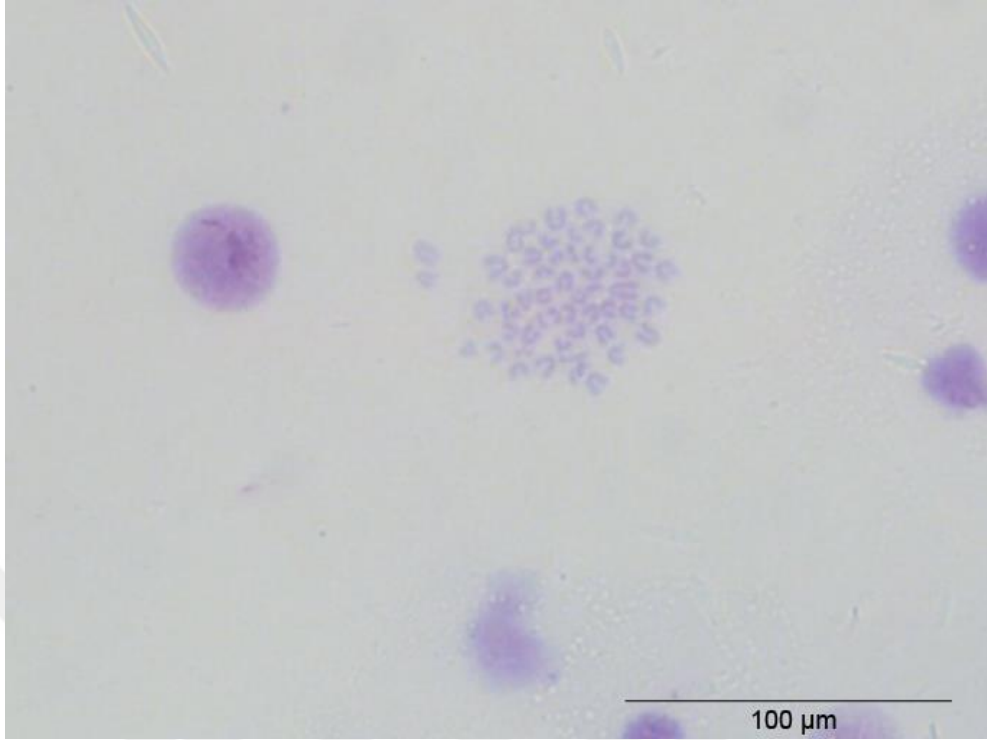
Şekil 4.2.2.2: Furan kaynaklı TM3 Leydig hücrelerinde A) mikronukleus; B) nukleoplazmik köprü; C) nuklear tomurcuk; D) nuklear kabarcık görünümü.

4.2.3. Kromozomal Aberasyon Bulguları

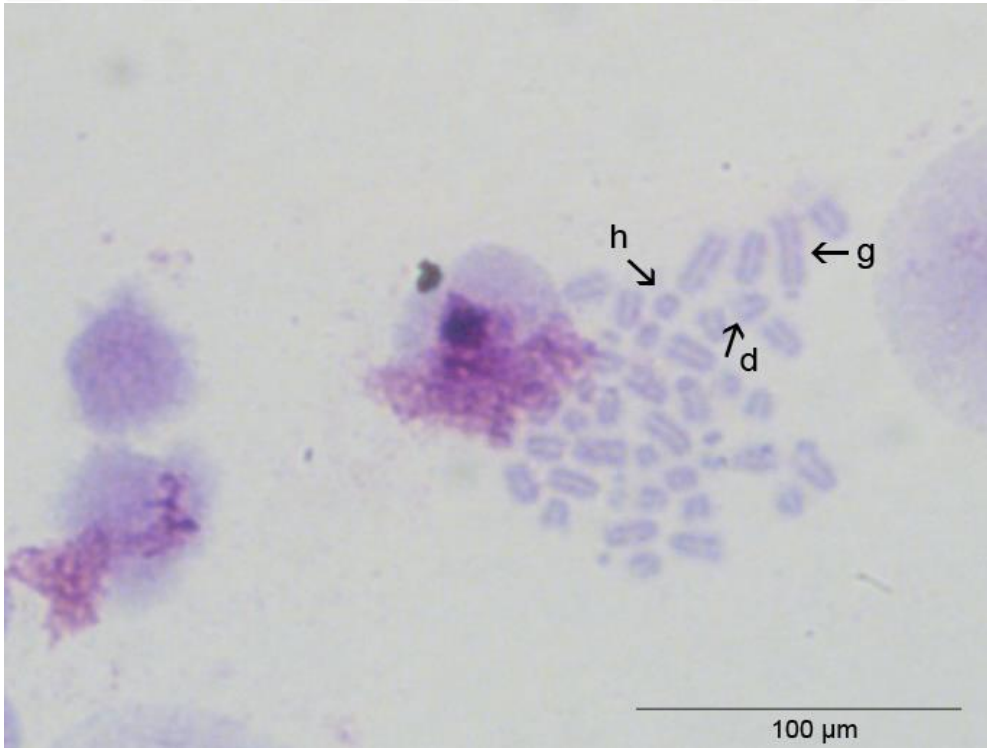
Furanın TM3 Leydig hücrelerinde yol açtığı yapısal kromozom anormallikleri metafaz yayılımlarının incelenmesi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, 24 saatlik furan maruziyetinin TM3 Leydig hücrelerindeki %toplam kromozomal aberasyon oranını konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Tablo 4.2.3.1). Furanın, sentrik halka (Şekil 0.3.2), kromatid/ kromozom kırığı (Şekil 0.3.3), disentrik kromozom (Şekil 0.3.4) ve sentrik füzyon (Şekil 0.3.5) gibi yapısal kromozom aberasyon tiplerinin oluşumunu kontrol grubuna kıyasla arttırdığı görülmüştür ($p<0,05$). Fakat, furan gruplarında, gap ve delesyon (Şekil 0.3.2) oranları kontrol grubu ile benzer çıkmış ve dolayısıyla, furanın bu kromozomal aberasyon tiplerinde anlamlı bir artışa neden olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 4.2.3.1: Furan uygulanan TM3 Leydig hücrelerinde kromozomal aberasyon içeren yüzde hücre sayısı *: kontrole göre ($*p<0,05$).

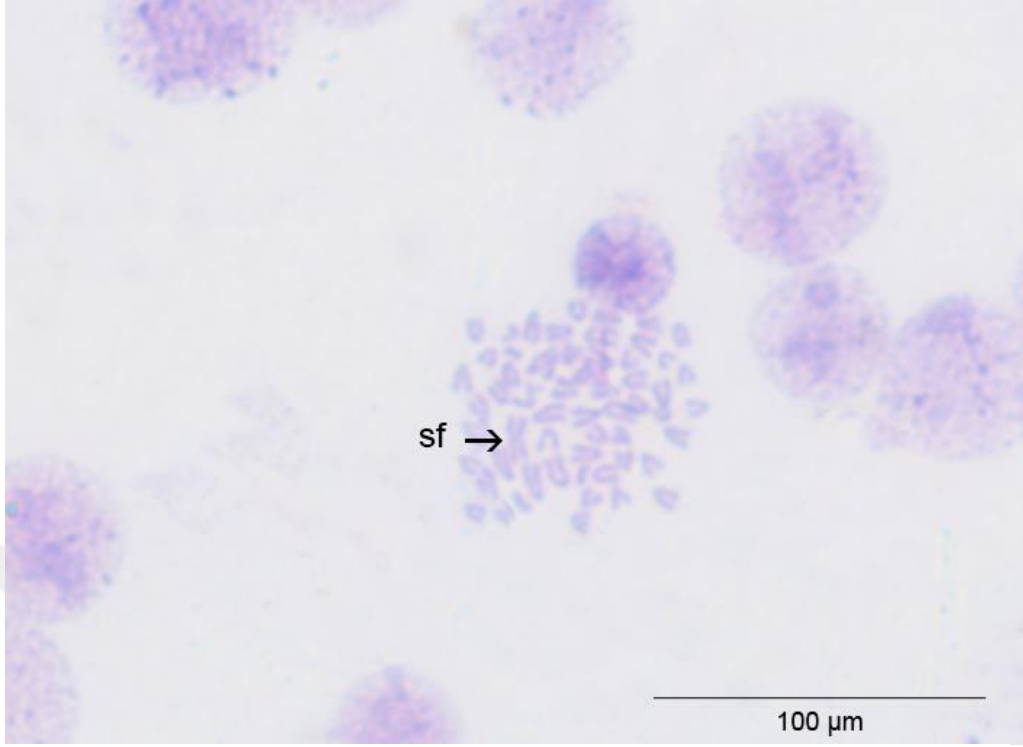
Kromozomal aberasyon tipleri	Kontrol	H ₂ O ₂ (300 μ M)	F1 (750 μ M)	F2 (1500 μ M)	F3 (3000 μ M)
Gap	4 $\pm$ 0,19	8 $\pm$ 0,27	6 $\pm$ 0,23	6 $\pm$ 0,24	4 $\pm$ 0,19
Kromatid/ kromozom kırığı	4 $\pm$ 0,30	20 $\pm$ 0,40	14 $\pm$ 0,35*	16 $\pm$ 0,30*	18 $\pm$ 0,38*
Sentrik halka	6 $\pm$ 0,24	12 $\pm$ 0,32	6 $\pm$ 0,23	10 $\pm$ 0,30	16 $\pm$ 0,37*
Disentrik kromozom	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 0,14	4 $\pm$ 0,19*	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 0,27
Sentrik füzyon	0 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0,30	2 $\pm$ 0,14	8 $\pm$ 0,27*	6 $\pm$ 0,23*
Delesyon	0 $\pm$ 0,14	6 $\pm$ 0,30	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 0,14
%Toplam KA	14 $\pm$ 0,20	58 $\pm$ 0,30	32 $\pm$ 0,22*	40 $\pm$ 0,23*	48 $\pm$ 0,28*



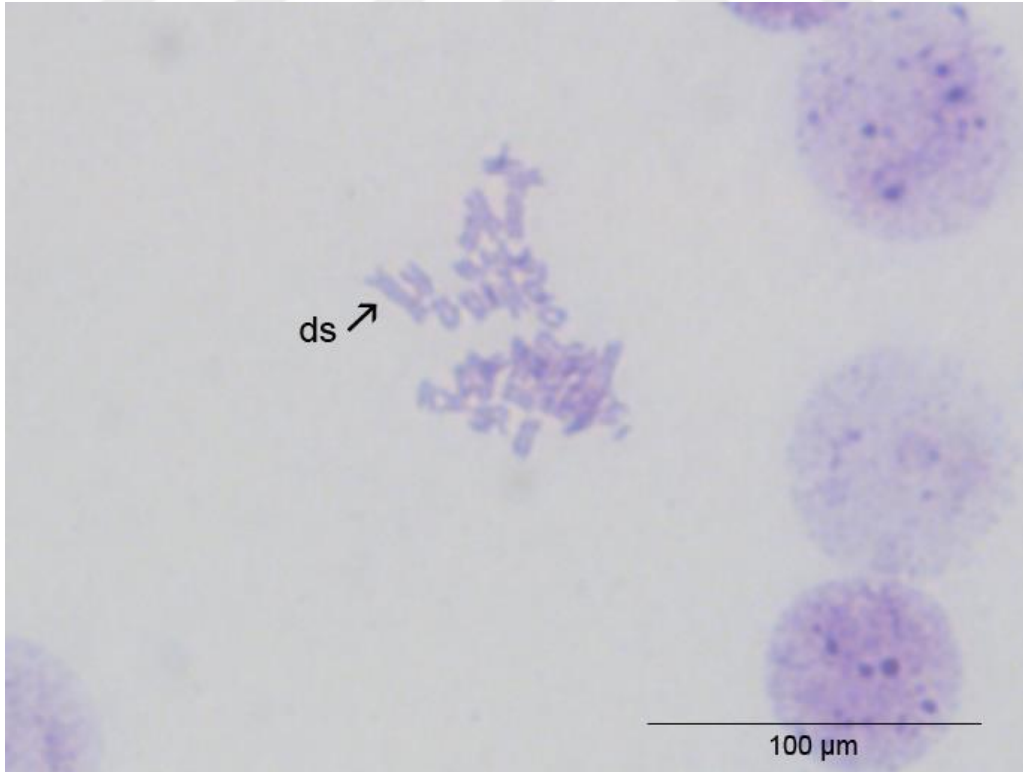
Şekil 4.2.3.1: Normal metafaz kromozomu yayılımı (40X).



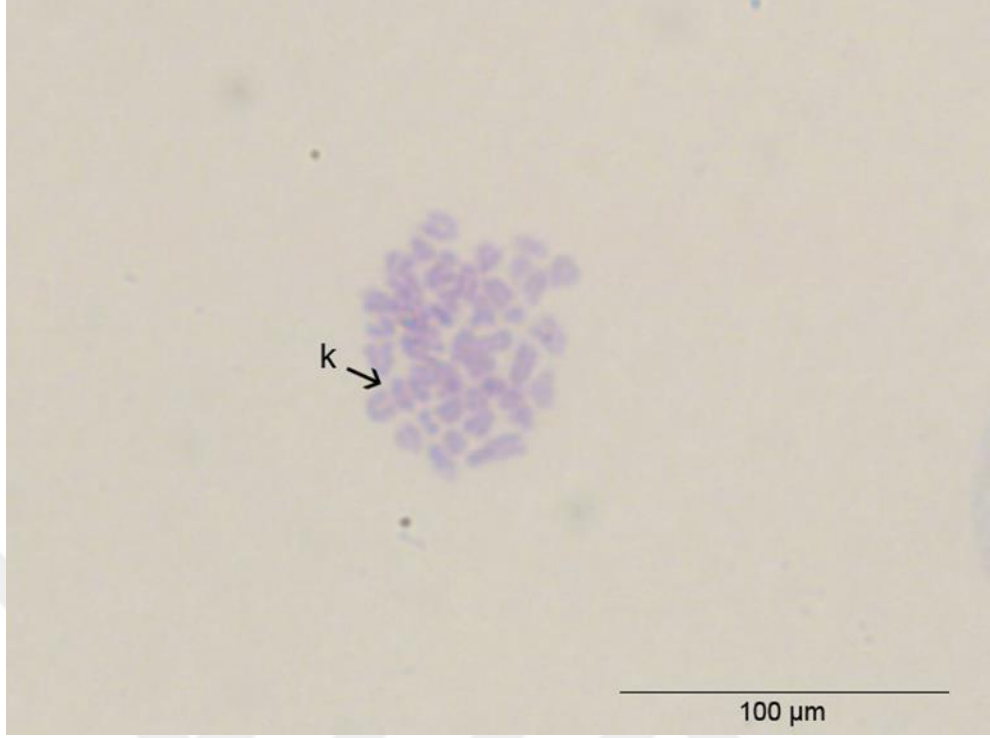
Şekil 4.2.3.2: Sentrik halka, delesyon ve gap bulunan metafaz hücresi (40X). .



Şekil 4.2.3.3: Sentrik füzyon bulunan metafaz hücresi (40X).



Şekil 4.2.3.4: Disentrik kromozom bulunan metafaz hücresi (40X).



Şekil 4.2.3.5: Kromozom kırığı bulunan metafaz hücresi (40X).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıdalara istenilen özellikleri kazandırmak ve raf ömrünü uzatmak gibi amaçlarla uygulanan işleme teknikleri, kendiliğinden ortaya çıkan toksik bileşiklerin oluşumuna yol açmaktadır (Arisseto, 2016). Kahve, et ürünleri ve konserve/kavanozlanmış gıdalar gibi yüksek sıcaklarda işlem görmüş gıda ürünleri, IARC tarafından “olası bir insan kanserojeni” olarak sınıflandırılan furan bileşenini içerebilmektedir (IARC, 1995). Kemirgenler ile yapılan *in vivo* çalışmalardan elde edilen veriler furan maruziyetinin hepatotoksisiteye, nefrotoksisiteye, immünotoksisiteye ve üreme toksisitesine yol açtığını göstermiştir (Yuan ve diğ., 2013; Cooke ve diğ., 2014; Alam ve diğ., 2017; El-Hakim ve diğ., 2018; Kaya ve diğ., 2019; Khalil ve diğ., 2020; Owumi ve diğ., 2020; Rehman ve diğ., 2020). Yiyecek ve içecekler yoluyla günlük olarak vücuda alınan furanın farklı organ ve dokular üzerindeki toksisitesi birçok çalışma ile aydınlatılırken, erkek üreme sistemi üzerindeki genotoksisitesine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Hazır gıda tüketimiyle birlikte erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya yönelik ilgi uluslararası literatür çevresinde giderek artmaktadır (Salas-Huetos ve diğ., 2017). Deney hayvanları ile yapılan birçok çalışma, furanın erkek üreme sistemi üzerindeki toksisitesini rapor etmiştir. Erkek sıçanlardaki üreme işlevi ve bütünlüğü üzerine yapılan çalışmalar, farklı furan dozlarının üreme toksisitesi belirteçlerinden olan plazma ve intratestiküler testosteron, LH ve FSH seviyelerinde düşüşe yol açtığını göstermiştir (Cooke ve diğ., 2014; El-Hakim ve diğ., 2018; Owumi ve diğ., 2020; Owumi ve diğ., 2022). Deri altı enjeksiyonu yoluyla yüksek dozlarda furan (10 ve 20 mg kg⁻¹ d⁻¹) uygulanan neonatal sıçanlarda azalan üreme kapasitesi, düşük testosteron seviyeleri ve testiküler histolojik bozukluklar nedeniyle azalan günlük sperm üretimi, sperm canlılığı ve niteliği ile ilişkilendirilmiştir (Rehman ve diğ., 2019; Rehman ve diğ., 2020). Yapılan *in vivo* çalışmalar furan maruziyetinin Sertoli, Leydig ve germ hücrelerindeki apoptoz sıklığını önemli derecede arttırdığını göstermiştir (Karacaoğlu ve diğ., 2010; Rehman ve diğ., 2019). Buna ek olarak, furan verilen erkek sıçanların Sertoli hücreleri ve interstisyel bağ dokusunda farklı boyutlarda çok sayıda vakuol gözlemlenmiştir (El-Akabawy ve El-Sherif, 2016). Yapılan bir *in vitro* çalışmanın deney sonuçlarına göre, furan maruziyeti sıçanların testis dokusunda total protein içeriği ve antioksidan enzim aktivite seviyelerinde önemli derecede bir düşüşe yol açması ve ROS ve lipid peroksidasyonu düzeylerinde de artışa sebep olması testisteki oksidatif stresin varlığına işaret etmiştir (Rehman

ve diğ., 2019). Furanın erkek üreme toksisitesinin değerlendirildiği pek çok araştırma olmasına karşın, Leydig hücresi üzerindeki toksisitesi hakkında sınırlı çalışma bulunmaktadır.

Furanın hücre canlılığı üzerine etkilerinin ortaya çıkarılmasına dair oldukça az sayıda *in vitro* çalışma bulunmaktadır. Yapılan *in vivo* bir çalışmada, erkek sıçanlara furan (8 mg/kg) ve kurşun (1, 10, 100 mg/kg) ayrı ayrı ya da birlikte olmak üzere 28 gün boyunca uygulanmıştır. Süre sonunda, furanın tek başına uygulandığı gruplarda sperm canlılığı %78'e düşerken, kurşun ile birlikte uygulanan gruplarda %60 seviyelerine düştüğü tespit edilmiştir (Owumi ve diğ., 2022). Barros ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı *in vitro* çalışmada, 0,72, 7,2, 72 ve 720 μ M konsantrasyonlardaki iki furan türevi (2-furan-akrilik asit ve 5-metil-2-furan-akrilik asit) B16F10 metastatik fare melanoma hücrelerine 48 saat süreyle uygulanmıştır. Kolorimetrik MTT testi verileri, furan türevlerinin melanoma hücre canlılığını azalttığını bildirmiştir. Jurkat hücreleriyle yapılan çalışmada, çeşitli konsantrasyonlardaki furan içeren sülfür bileşiklerinin (5-50 μ M) 24 saatlik maruziyetinin hücre canlılığı üzerinde inhibe edici bir etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Zhang ve diğ., 2015).

Yukarıda verilen çalışmalarda çeşitli konsantrasyonlardaki furan ve furan türevlerine maruziyet sonucunda hücre canlılığında anlamlı azalmalar meydana gelirken, benzer olarak TM3 Leydig hücreleri kültüre edilerek yapılan bu *in vitro* çalışmada, furanın 1500 μ M ve 3000 μ M konsantrasyonlarının hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmuştur.

LDH, organizmadaki bütün doku ve hücrelerde eksprese edilen ve pirüvatın laktata dönüşümünü katalizleyen sitozolik bir enzimdir. LDH enziminin sitoplazmik alandan hücre dışı alana sızması bozulan hücre membranı permeabilitesini, yani hücre membranı hasarını belirtmektedir (Chan ve diğ., 2013). Literatürdeki birkaç çalışma, furan maruziyetinin oksidatif strese neden olan yüksek ROS ve lipid peroksidasyon düzeylerini uyarmasıyla meydana gelen hücre membran hasarı ya da hücre ölümünün, membrandan sızan LDH miktarındaki artışa yol açtığını işaret etmektedir (Yuan ve diğ., 2013; Wang ve diğ., 2014; Baş ve diğ., 2016; Abd El-hakim ve diğ., 2018). Furan (8 mg/kg-1) uygulanan erkek farelerde meydana gelen karaciğer ve böbrek hasarını değerlendirmek için laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen bulgulara göre, furan uygulanan farelerin serumlarındaki LDH seviyesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış görülmüştür (Wang ve diğ., 2014). Bu çalışmalara paralel olarak başka bir çalışmada, diyabetik sıçanlara 28 gün boyunca gavaj yoluyla furan uygulanmasının ardından, elde edilen serum örneklerindeki LDH aktivite seviyelerinde kontrol

grubuna kıyasla anlamlı bir artış bulunmuştur (Baş ve diğ., 2015). El-Hakim ve diğerlerinin (2018) yaptığı çalışmada, 16 mg/kg furan sıçanlara oral yolla verilmiştir. Çalışma sonucunda, 30 gün sonunda testis dokusundaki laktat dehidrogenaz aktivite seviyesinde anlamlı bir artış saptanmıştır. Buna karşılık, furan (8 mg/kg) uygulanan sıçanların testis dokusu ve serumdaki LDH aktivite düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla düşüş gözlemlenmiştir (Owumi ve diğ., 2020; Owumi ve diğ., 2022). 16 mg/kg furana sekiz hafta boyunca maruz bırakılan sıçanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar ile hepatik enzim aktiviteleri analiz edilmiş ve laktat dehidrogenaz aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlenmiştir (Awad ve diğ., 2018).

Yukarıda verilmiş olan *in vivo* çalışmaları destekleyen bu çalışmada ise, 1500 ve 3000 µM konsantrasyonlarında furan uygulanan TM3 Leydig hücrelerindeki laktat dehidrogenaz enzim aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış bulunmuştur.

Bugüne kadar furanın genotoksik mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar tartışmalıdır. Bununla birlikte, furan klastojenitesinin, yüksek derecede reaktif metaboliti olan BDA tarafından DNA eklentileri oluşturması, DNA-DNA ya da DNA-protein çapraz bağlarını kurması ve bunun da, DNA replikasyonunu durdurarak DNA çift zincir kırıklarının oluşumuna yol açmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bakhiya ve Appel, 2010). Araştırmacılar, furan genotoksitesinin dolaylı bir mekanizma ile gerçekleşebileceğini öne sürmüşlerdir. Furanın sitotoksik dozlarının mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu uyarması sonucu, DNA kırıkları oluşturan endonukleazları aktive etmesi bu fikri desteklemektedir (Mugford ve diğ., 1997). DNA çift sarmal kırıklarının onarımında meydana gelen hatalar ise hücre ölümüne veya kromozomal aberasyonlara, kromatid değişimlerine veya mutasyonlara sahip hücrelerin oluşumuna yol açabilmektedir (Newsheen ve diğ., 2012). Literatürde furanın DNA hasarına etkisinin ortaya çıkarılmasına dair yapılan birtakım *in vivo* ve *in vitro* testlerin negatif sonuç verdiğine dair çalışmalar mevcuttur (National Toxicology Program (NTP), 1993; Wilson ve diğ., 1992; Durlig ve diğ., 2007; Kellert ve diğ., 2008; Leopardi ve diğ., 2010). Bununla birlikte, furanın insan, fare ve sıçanlara ait çeşitli hücre tiplerinde gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* DNA zincir kırıklarını tespit eden komet testi, anafaz sırasında oluşan hatalardan dolayı ayrılan kromozomları veya kromozom fragmetlerini içeren nuklear cisimcikleri gösteren mikronukleus testi ve kromozom anormalliklerini tanımlayan kromozom aberasyonu testi gibi genotoksikite testlerinde pozitif sonuçlar verdiğine

dair de çalışmalar yer almaktadır (NTP, 1993; Cordelli ve diğ., 2010; Leopardi ve diğ., 2010; McDaniel ve diğ., 2011; Ding ve diğ., 2012; Neuwirth ve diğ., 2012; Jeffrey ve diğ., 2012; Pandir, 2015; Russo ve diğ., 2021).

İnsan lenfosit ve sperm hücreleriyle yapılan *in vitro* çalışmada, furanın 100, 300 ve 600 μ M konsantrasyonlarının komet parametrelerinde oluşturacağı değişimler gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, lenfosit hücrelerine uygulanan 300 ve 600 μ M furan, kuyruk %DNA'sında artış meydana getirirken, sperm hücrelerinde sadece furanın 600 μ M konsantrasyonu kuyruk %DNA içeriğinde artışa neden olmuştur (Pandir, 2015). Başka bir çalışmada, hindi yumurtalarına 0,22-20 μ mol furan enjekte edilmiş ve hindi fetüslerinin hepatositleri izole edilerek proteinaz K'lı (PK) ve PK'sız alkali komet testi uygulanmıştır. PK uygulanmayan komet testinde, furan maruziyetinin hücrelerin komet kuyruğundaki %DNA miktarını azalttığı görülmüş ve bu azalmanın furanın DNA-protein çapraz bağlarını arttırmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Hasarlı DNA'nın elektroforetik göçünü kolaylaştırmak için PK uygulanarak yapılan komet testi sonucuna göre, furan maruziyeti karaciğer hücrelerindeki DNA zincir kırıklarını uyarmış ve komet kuyruklarındaki %DNA içeriğini arttırmıştır (Jeffrey ve diğ., 2012). Başka bir çalışmada ise, sıçanlara gavaj yoluyla verilen 2, 4, 8, 12 ve 16 mg/kg furan dozlarının, sıçan karaciğer dokusundaki komet kuyruk %DNA içeriğinde doza bağlı artışa neden olduğu bulunmuştur. Karaciğer dokusunda yapılan komet testinden elde edilen veriler, kanser biyotahlil dozlarındaki furan maruziyetinin sıçan karaciğer dokusundaki DNA tek/çift zincir kırıklarını ve pürin/pirimidinlerin oksidasyonunu uyardığını göstermiştir (Ding ve diğ., 2012). Leopardi ve diğerlerinin yaptığı çalışmada (2010), oral yolla 2, 4, 8, 15 mg/kg furan verilen farelerin splenositlerinde komet kuyruk uzunluğu ve %DNA içeriği parametrelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark bulunamamıştır. Diğer bir *in vivo* çalışmada, 0,1 ve 2,0 mg/kg furan dozları F344 sıçanlarına gavaj yoluyla 28 gün boyunca verilmiştir. Maruziyetten sonraki 14 günlük iyileşme periyodunun sonunda yapılan komet testi, sıçanların karaciğerinde komet kuyruk momentleri ve yoğunluğu parametrelerinde artış meydana geldiğini bildirmiştir (Neuwirth ve diğ., 2012). McDaniel ve diğerlerinin (2011) sıçanlar ile gerçekleştirdikleri bir diğer çalışmada ise, 8 hafta boyunca furanın yüksek dozlarının (12 ve 16 mg/kg) uygulandığı sıçanların komet kuyruk %DNA içeriğinde artış meydana geldiği bildirilmiştir. Erkek B6C3F1 farelerine furanın (15, 100 ve 250 mg/kg) oral yoldan verilmesinin ardından, hayvanlarda meydana gelen DNA tek/çift zincir kırıklarının ve DNA çapraz bağlarının tespiti için komet testleri yapılmıştır. Alkali komet testi sonuçlarına

göre, furan uygulanan grupların komet kuyruklarında bulunan DNA yüzdesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak artış meydana gelmiştir. Bu artış, furanın neden olduğu DNA lezyonlarının onarımı sırasında meydana gelen DNA zincir kırıklarının varlığını göstermektedir. Bununla birlikte, modifiye edilmiş komet testi sonuçlarına göre en yüksek doz furan maruziyeti hücrelerin komet kuyruk %DNA içeriğinde düşüşe sebep olmuş ve bu sonuç, furanın akut *in vivo* maruziyetinin DNA çapraz bağlanmaları uyardığını göstermiştir (Cordelli ve diğ., 2010).

Komet testi ile furanın TM3 Leydig hücreleri üzerindeki genotoksitesinin değerlendirildiği bu çalışmamızda, elde edilen komet verileri furan maruziyetinin hücrelerdeki komet kuyruk uzunluğu, kuyruk %DNA içeriği ve Olive kuyruk momenti parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiğini göstermiş ve çeşitli hücre tipleriyle (Pandir, 2015; Mugford ve Kedderis, 1996) yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlara benzer olarak DNA tek ve çift zincir kırıklarının oluşumunu uyardığını bildirmiştir.

Russo ve diğerlerinin yaptığı çalışmanın (2021) subkronik oral toksisite deneyinde kullanılan furan dozlarına (8-30 mg/kg/v) maruz bırakılan farelerin dalak lenfositlerinde mikronukleus oluşumu araştırılmış ve mikronukleuslu binukleat hücre sıklığında (1,45-3,3 kat) istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur (Russo ve diğ., 2021). Furanın (2, 4, 8, 15 mg/kg) 4 hafta boyunca oral olarak uygulandığı farelerden izole edilen splenositlerde oluşan mikronukleus frekansında artış görülürken, nuklear bölünme indeksinde istatistiksel olarak herhangi bir anlam bulunamamıştır (Leopardi ve diğ., 2010). Başka bir çalışmada ise, 8 hafta süreyle furana (2, 8, 12, 16 mg/kg) maruz bırakılan sıçanlarda ve furan (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 g/L) uygulanan L5178Y tk(+/-) fare lenfoma hücrelerinde yapılan mikronukleus testlerinin negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Kellert ve diğ., (2008); McDaniel ve diğ., 2011).

Yapılan bu çalışmada, 1500 ve 3000 μ M furan konsantrasyonuna maruz bırakılan deney gruplarında meydana gelen mikronukleus frekansındaki anlamlı artış, mikronukleus testi pozitif sonuç veren furan çalışmaları ile paralellik göstermektedir (Leopardi ve diğ., 2010; Russo ve diğ., 2021). Bununla birlikte, furanın 1500 ve 3000 μ M konsantrasyonlarının nuklear bölünme indeksinde neden olduğu istatistiksel olarak anlamlı düşüş, hücre canlılığı seviyelerinde meydana getirdiği düşüşü desteklemektedir.

DNA çapraz bağlanmaların onarımında kusura sahip Falcon anemisi hastalarından elde edilen lenfoblastoid hücre soylarına (LFA55-/-) uygulanan en yüksek furan konsantrasyonu (10 mM), S9 metabolizması varlığında hücrelerdeki total kromozomal aberasyon yüzdesini istatistiksel olarak arttırmıştır. Elde edilen bu sonuç, furanın DNA'ya reaktif olmadığını, ancak kromozomal aberasyonu, klastojenik ara ürünü olan BDA'ya metabolik dönüşümü ile dolaylı yoldan uyardığını düşündürmüştür (Russo ve diğ., 2021). CHO hamster ovaryum hücre soyuna 100, 160, 300, 500 ve 1000 µg/ml furan maruziyeti sonucunda, kromozomal aberasyona sahip hücre yüzdelinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış rapor edilmiştir (NTP, 1993). Neuwirth ve diğerlerinin (2012) yaptığı *in vivo* çalışmada, furanın F344 sıçanlarına farklı doz (0,1 ve 2,0 mg/kg) ve sürelerdeki (5, 28, 28+14 gün) maruziyeti sonucu yapılan genotoksisite testleri ile etki mekanizması değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, furan uygulanan sıçan periferik kan ve kemik iliği hücrelerinde herhangi bir DNA hasarı tespit edilmezken, splenositlerdeki % kromozomal aberasyon insidansında istatistiksel olarak önemli bir artış meydana gelmiştir.

Yapılan kromozomal aberasyon testi verilerine göre, furanın TM3 Leydig hücrelerindeki yapısal kromozom/kromatid anormalliklerinin oluşumunu negatif kontrole kıyasla konsantrasyona bağlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, literatürdeki CHO ve lenfoblastoid hücre hattıyla yapılan *in vitro* araştırmaların sonuçları ile örtüşmektedir (Stitch ve diğ., 1981; NTP, 1993; Russo ve diğ., 2021).

Gerçekleştirilen bu çalışma, furanın test edilen tüm konsantrasyonlarının TM3 Leydig hücrelerindeki DNA tek ve çift zincir kırıklarını, yapısal kromozomal aberasyonlarını ve mikronukleus oluşumunu arttırdığı ve dolayısıyla, genotoksik etki gösterdiğini tespit etmiştir. Buna ek olarak, furanın LDH aktivite seviyesindeki artışla birlikte, hücre canlılığı ve nukleer bölünme indeksindeki düşüşü uyarması TM3 Leydig hücrelerindeki sitotoksitesine işaret etmektedir. Bu sonuçlar, furanın klastojenik ajan olarak rol oynayıp DNA hasarını uyardığını ve DNA hasarı kaynaklı sitotoksitesine (hücre ölümü ve/veya hücre bölünmesi inhibisyonu) yol açtığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Hakim, Y.M., Mohamed, W.A., El-Metwally, A.E., 2018, Spirulina platensis attenuates furan reprotoxicity by regulating oxidative stress, inflammation, and apoptosis in testis of rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 161, 25-33.
- Aidoo, A., Morris, S.M., Casciano, D.A., 1997, Development and utilization of the rat lymphocyte hprt mutation assay, *Mutation research/reviews in mutation research*, 387 (2), 69-88.
- Alam, R.T., Zeid, E.H.A., Imam, T.S., 2017, Protective role of quercetin against hematotoxic and immunotoxic effects of furan in rats, *Environmental science and pollution research*, 24 (4), 3780-3789.
- Alizadeh, M., Barati, M., Saleh-Ghadimi, S., Roshanravan, N., Zeinalian, R., Jabbari, M., 2018, Industrial furan and its biological effects on the body systems, *Journal of food biochemistry*, 42 (5), e12597.
- Alves, M.G., Rato, L., Carvalho, R.A., Moreira, P.I., Socorro, S., Oliveira, P.F., 2013, Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis, *Cellular and molecular life sciences*, 70 (5), 777-793.
- Araldi, R.P., de Melo, T.C., Mendes, T.B., de Sá Júnior, P.L., Nozima, B.H.N., Ito, E.T., Carvalho, E.R., de Souza, E.B., de Cassia Stocco, R., 2015, Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review, *Biomedicine and pharmacotherapy*, 72, 74-82.
- Arisseto, A.P., 2016, Furan in processed foods, In food hygiene and toxicology in ready-to-eat foods, *academic press.*, 383-396
- Awad, A., Khalil, S. R., Farag, M. R., Nassan, M. A., 2018, Differential susceptibility of kidneys and livers to proliferative processes and transcriptional level of the genes encoding desmin, vimentin, connexin 43, and nestin in rats exposed to furan, *Ecotoxicology and environmental safety*, 162, 235–244.
- Bakhiya, N., Appel, K. E., 2010, Toxicity and carcinogenicity of furan in human diet, *Archives of toxicology*, 84 (7), 563-578.
- Baş, H., Pandır, D., Kalender, S., 2016, Furan-induced hepatotoxic and hematologic changes in diabetic rats: the protective role of lycopene, *Archives of industrial hygiene and toxicology*, 67 (3), 194–203.
- Barros, M.R., Menezes, TM., da Silva, L.P., Pires, D.S., Princival, J.L., Seabra, G., Neves, J.L., 2019, Furan inhibitory activity against tyrosinase and impact on B16F10 cell toxicity, *International journal of biological macromolecules*, 136, 1034-1041.
- Batool, Z., Xu, D., Zhang, X., Li, X., Li, Y., Chen, Z., Li, B., Li, L., 2021, A review on furan: Formation, analysis, occurrence, carcinogenicity, genotoxicity and reduction methods, *Critical reviews in food science and nutrition*, 61 (3), 395-406.

- Beattie, M.C., Adekola, L., Papadopoulos, V., Chen, H., Zirkin, B.R., 2015, Leydig cell aging and hypogonadism, *Experimental gerontology*, 68, 87–91.
- Bolger, P.M., Tao, S.S.H., Dinovi, M., 2009, Hazards of dietary furan. Process-Induced Food Toxicants. *Occurrence, Formation, Mitigation, and health risks*, 117-133.
- Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H., Hagmar, L., 2004, Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective, *Cytogenetic and genome research*, 104 (1-4), 376-382.
- Chan, F.K.M., Moriwaki, K., De Rosa, M.J., 2013, Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity, *Immune homeostasis*, Humana press, Totowa, NJ, 65-70.
- Chen, L.J., Hecht, S.S., Peterson, L.A., 1995, Identification of cis-2-butene-1,4-dial as a microsomal metabolite of furan, *Chemical research in toxicology*, 8, 903–906.
- Chen, T., Mally, A., Ozden, S., Chipman, J. K., 2010, Low doses of the carcinogen furan alter cell cycle and apoptosis gene expression in rat liver independent of DNA methylation., *Environmental health perspectives*, 118 (11), 1597-1602.
- Chojnacka, K., Zarzycka, M., Mruk, D.D., 2016, Biology of the sertoli cell in the fetal, pubertal, and adult mammalian testis, *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*, 225–251.
- Choudhuri, S., Kaur, T., Jain, S., Sharma, C., Asthana, S., 2021, A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer, *Chemico-biological interactions*, 345, 109531.
- Choy, W. N., 1996, Principles of genetic toxicology, *Drug and chemical toxicology*, 19 (3), 149-160.
- Condurso, C., Cincotta, F., Verzera, A., 2018, Determination of furan and furan derivatives in baby food, *Food Chemistry*, 250, 155-161.
- Cooke, G. M., Taylor, M., Bourque, C., Curran, I., Gurofsky, S., Gill, S., 2014, Effects of furan on male rat reproduction parameters in a 90-day gavage study, *Reproductive toxicology*, 46, 85-90.
- Cordelli, E., Leopardi, P., Villani, P., Marcon, F., Macrì, C., Caiola, S., Siniscalchi, E., Conti, L., Eleuteri, P., Malchiodi-Albedi, F., Crebelli, R., 2010, Toxic and genotoxic effects of oral administration of furan in mouse liver, *Mutagenesis*, 25 (3), 305-314.
- Crews, C., Castle, L., 2007, A review of the occurrence, formation and analysis of furan in heat-processed foods, *Trends in food science and technology*, 18 (7), 365-372.
- de Conti, A., Kobets, T., Tryndyak, V., Burnett, S.D., Han, T., Fuscoe, J.C., Beland, F.A., Doerge, D.R., Pogribny, I.P., 2015, Persistence of furan-induced epigenetic aberrations in the livers of F344 rats, *Toxicological Sciences*, 144, 217–226.

- de Conti, A., Kobets, T., Escudero-Lourdes, C., Montgomery, B., Tryndyak, V., Beland, F.A., Doerge, D. R., Pogribny, I. P., 2014, Dose and time-dependent epigenetic changes in the livers of Fisher 344 rats exposed to furan, *Toxicological sciences*, 139, 371–380.
- Ding, W., Petibone, D.M., Latendresse, J.R., Pearce, M.G., Muskhelishvili, L., White, G.A., Chang, C.W., Mittelstaedt, R.A., Shaddock, J.G., McDaniel, L.P., Doerge, D.R., Morris, S.M., Bishop, M.E., Manjanatha, M.G., Aidoo, A., Heflich, R.H., 2012, *In vivo* genotoxicity of furan in F344 rats at cancer bioassay doses, *Toxicology and applied pharmacology*, 261 (2), 164-171.
- Durling, L. 2008, The effect on chromosomal stability of some dietary constituents, *Doctoral dissertation*, Acta Universitatis Upsaliensis.
- Durling, L.J., Svensson, K., Abramsson-Zetterberg, L., 2007, Furan is not genotoxic in the micronucleus assay *in vivo* or *in vitro*, *Toxicology letters*, 169 (1), 43-50.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2011, Update on furan levels in food from monitoring years 2004-2010 and exposure assessment, *EFSA journal*, 9, 2347.
- El-Akabawy, G., El-Sherif, N.M., 2016, Protective role of garlic oil against oxidative damage induced by furan exposure from weaning through adulthood in adult rat testis, *Acta histochemica*, 118 (5), 456-463.
- Fawcett, D.W., 1966, The cell: Its organelles and inclusions, *The American journal of the medical sciences*, 252 (4), 499.
- Fenech, M., 2007, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature protocols*, 2 (5), 1084-1104.
- Food and Drug Administration, 2004, FDA to investigate potential health effects of furan in food, *A newsletter for the members of the National Center for Food Safety and Technology (NCFST)*, 14:1.
- Garcia-Canton, C., Anadón, A., Meredith, C., 2012, γ H2AX as a novel endpoint to detect DNA damage: applications for the assessment of the *in vitro* genotoxicity of cigarette smoke, *Toxicology in vitro*, 26 (7), 1075-1086.
- Ge, R., Chen, G., Hardy, M.P., 2009, The Role of the Leydig Cell in Spermatogenic Function, *Molecular mechanisms in spermatogenesis*, 255–269.
- Grey, T.C., Shrimpton, D.H., 1967, Volatile components in the breast muscles of chickens of different ages, *British poultry science*, 8 (1), 35-41.
- Gunasekaran, V., Raj, G. V., Chand, P., 2015, A comprehensive review on clinical applications of comet assay, *Journal of clinical and diagnostic research*, 9 (3), GE01.
- Gurung, P., Yetiskul, E., Jialal, I., 2021, Physiology, male reproductive system, *Stat-pearls publishing*.

- Haider, S.G., 2004, Cell biology of Leydig cells in the testis, *International review of cytology*, 233, 181–241.
- Hedger, M.P., de Kretser, D.M., 2000, Leydig cell function and its regulation, *The genetic basis of male infertility*, 69-110.
- Heppner, C.W., Schlatter, J.R., 2007, Data requirements for risk assessment of furan in food, *Food additives and contaminants*, 24, 114-121.
- Hickling, K.C., Hitchcock, J.M., Oreffo, V., Mally, A., Hammond, T.G., Evans, J.G., Chipman, J.K., 2010, Evidence of oxidative stress and associated DNA damage, increased proliferative drive, and altered gene expression in rat liver produced by the cholangiocarcinogenic agent furan, *Toxicologic pathology*, 38(2), 230–243.
- Hickling, K.C., Hitchcock, J.M., Oreffo, V., Mally, A., Hammond, T.G., Evans, J.G., Chipman, J.K., 2010, Evidence of oxidative stress and associated DNA damage, increased proliferative drive, and altered gene expression in rat liver produced by the cholangiocarcinogenic agent furan, *Toxicologic pathology*, 38 (2), 230-243.
- Hoeijmakers, J.H., 2009, DNA damage, aging, and cancer, *New england journal of medicine*, 361 (15), 1475-1485.
- IARC, 1995, Furan. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 63, 393-407.
- Jain, A.K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Pandey, A.K., 2018, Chromosomal aberrations, Mutagenicity: Assays and Applications, *Academic press*, 69-92.
- Jan, C.H.R.Z., Hošíková, B., Svobodova, L., Očadlíková, D., Kolářová, H., Dvořáková, M., Kejlová, K., Malina, L., Jírová, G., Vlková, A., Mannerström, M., 2020, Comparison of methods used for evaluation of mutagenicity/genotoxicity of model chemicals-parabens, *Physiological research*, 69(Suppl 4), S661.
- Jeffrey, A.M., Brunnemann, K.D., Duan, J.D., Schlatter, J., Williams, G.M., 2012, Furan induction of DNA cross-linking and strand breaks in turkey fetal liver in comparison to 1, 3-propanediol, *Food and chemical toxicology*, 50 (3-4), 675-678.
- Jestoi, M., Järvinen, T., Järvenpää, E., Tapanainen, H., Virtanen, S., Peltonen, K., 2009, Furan in the baby-food samples purchased from the Finnish markets–Determination with SPME–GC–MS, *Food chemistry*, 117 (3), 522-528.
- Jestoi, M., Järvinen, T., Järvenpää, E., Tapanainen, H., Virtanen, S., Peltonen, K., 2009, Furan in the baby-food samples purchased from the Finnish markets–Determination with SPME–GC–MS, *Food Chemistry*, 117 (3), 522-528.
- Johnson, G.E., 2012, Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods, *Genetic toxicology*, Springer, New York, 55-67.
- Johnson, L.R., Byrne, J.H., 2003, Essential medical physiology, 3rd ed, *Elsevier academic press*;

- Kadıoğlu, A., Çayan, S., Semerci, B., Orhan, İ., Aşçı, R., Yaman, M. Ö., ... & Kendirci, M. (2004). Erkek reproduktif sistem hastalıkları ve tedavisi, Kendirci M, Miroğlu C. *Varikosel patofizyolojisi*, Türk Androloji Derneği Yayınları, 427-46.
- Karacaoğlu, E., Selmanoğlu, G., 2010, Effects of heat-induced food contaminant furan on reproductive system of male rats from weaning through postpuberty, *Food and chemical toxicology*, 48 (5), 1293-1301.
- Kaya, E., Yılmaz, S., Ceribasi, S., 2019, Protective role of propolis on low and high dose furan-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Journal of Veterinary Research*, 63 (3), 423-431.
- Kedderis, G.L., 1999, Biochemical toxicology of furan, *CIIT Activities*.
- Kellert, M., Wagner, S., Lutz, U., Lutz, W. K., 2008, Biomarkers of furan exposure by metabolic profiling of rat urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and principal component analysis, *Chemical research in toxicology*, 21 (3), 761-768.
- Khalil, S.R., Salem, H.F.A., Metwally, M.M.M., Emad, R.M., Elbohi, K.M., Ali, S.A, 2020, Protective effect of *Spirulina platensis* against physiological, ultrastructural and cell proliferation damage induced by furan in kidney and liver of rat, *Ecotoxicology and environmental safety*, 192, 110256.
- Kızılay, F., Altay, B., 2019, Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları, *Androloji bülteni*, 21 (4), 177-184.
- Kierszenbaum, A.L., 2006, Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, Ankara, Palme Yayıncılık, 531-64.
- Kramer, P.J., 1998, Genetic toxicology, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 50 (4), 395-405.
- Leopardi, P., Cordelli, E., Villani, P., Cremona, T.P., Conti, L., De Luca, G., Crebelli, R., 2010, Assessment of *in vivo* genotoxicity of the rodent carcinogen furan: evaluation of DNA damage and induction of micronuclei in mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 25 (1), 57-62.
- Lešková, E., Kubíková, J., Kováčiková, E., Košická, M., Porubská, J., Holčíková, K., 2006, Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models, *Journal of Food Composition and analysis*, 19 (4), 252-276.
- Lialiaris, T.S., 2013, Sister Chromatid exchange, *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd ed.; Maloy, S., Hughes, K., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 454-457.
- Loveland, K.L., Klein, B., Pueschl, D., Indumathy, S., Bergmann, M., Loveland, B.E., Hedger, M.P., Schuppe, H.C., 2017, Cytokines in male fertility and reproductive pathologies: immunoregulation and beyond, *Frontiers in endocrinology*, 8, 307.
- Maga J.A., 1979, Furans in foods, Critical reviews in food science and nutrition, 355-399.

- Mariotti, M.S., Granby, K., Rozowski, J., Pedreschi, F., 2013, Furan: a critical heat induced dietary contaminant, *Food and function*, 4 (7), 1001-1015.
- Mawhinney, M., Mariotti, A., 2013, Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system, *Periodontology 2000*, 61 (1), 232-251.
- McDaniel, L.P., Ding, W., Dobrovolsky, V.N., Shaddock Jr, J.G., Mittelstaedt, R.A., Doerge, D.R., Heflich, R.H., 2012, Genotoxicity of furan in Big Blue rats, *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 742 (1-2), 72-78.
- Mogol, B.A., Gökmen, V., 2016, Thermal process contaminants: Acrylamide, chloropropanols and furan, *Current opinion in food science*, 7, 86–92.
- Mugford, C.A., Carfagna, M.A., Kedderis, G.L., 1997, Furan-Mediated Uncoupling of Hepatic Oxidative Phosphorylation in Fischer-344 Rats: An Early Event in Cell Death, *Toxicology and applied pharmacology*, 144 (1), 1–11.
- Mugford, C.A., Kedderis, G.L., 1996, Furan-mediated DNA double strand breaks in isolated rat hepatocytes, *Fundamental and applied toxicology*, 30, 128.
- Nakata, H., 2019, Morphology of mouse seminiferous tubules, *Anatomical science international*, 94 (1), 1-10.
- National Toxicology Program, 1993, Toxicology and carcinogenesis studies of furan (CAS No. 110-00-9) in F344 rats and B6C3F1 mice (gavage studies), *National Toxicology Program technical report series*, 402, 1-286.
- Nenoi, M., 2015, Evolution of ionizing radiation research, Gamma Radiation as a Recycling Tool for Waste Materials Used in Concrete
- Neuwirth, C., Mosesso, P., Pepe, G., Fiore, M., Malfatti, M., Turteltaub, K., Dekant, W., Mally, A., 2012, Furan carcinogenicity: DNA binding and genotoxicity of furan in rats *in vivo*, *Molecular nutrition and food research*, 56 (9), 1363-1374.
- Nowsheen, S., Yang, E., 2012, The intersection between DNA damage response and cell death pathways, *Experimental oncology*.
- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan A.T, Martínez-López, W., Folle, G.A., Drets, M. E., 2002, Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution, *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 504 (1-2), 17-36.
- Owumi, S.E., Adedara, I.A., Farombi, E.O., Oyelere, A.K., 2020, Protocatechuic acid modulates reproductive dysfunction linked to furan exposure in rats, *Toxicology*, 442, 152556.
- Owumi, S.E., Arunsi, U.O., Otunla, M.T., Oluwasuji, I.O., 2022, Exposure to lead and dietary furan intake aggravates hypothalamus-pituitary-testicular axis toxicity in chronic experimental rats, *Journal of biomedical research*, 1-15.

- Pandir, D., 2015, Assessment of the DNA damage in human sperm and lymphocytes exposed to the carcinogen food contaminant furan with comet assay, *Brazilian archives of biology and technology*, 58, 773-780.
- Parry, J.M., Parry, E.M., Johnson, G., Quick, E., Waters, E.M., 2005, The detection of genotoxic activity and the quantitative and qualitative assessment of the consequences of exposures, *Experimental and toxicologic pathology*, 57, 205-212.
- Pérez, C.V., Theas, M.S., Jacobo, P.V., Jarazo-Dietrich, S., Guazzone, V.A., Lustig, L., 2013, Dual role of immune cells in the testis: Protective or pathogenic for germ cells?, *Spermatogenesis*, 3 (1), e23870.
- Peterson, L.A., 2012, Reactive Metabolites in the Biotransformation of Molecules Containing a Furan Ring, *Chemical Research in Toxicology*, 26 (1), 6–25.
- Registre, M., Proudlock, R., 2016, The *in vitro* chromosome aberration test, *Genetic toxicology testing*, Academic press, 207-267.
- Rehman, H., Jahan, S., Ullah, I., Thörnqvist, P. O., Jabbar, M., Shoaib, M., Aman, F., John, N., 2020, Effects of endocrine disruptor furan on reproductive physiology of Sprague Dawley rats: an F1 Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study (EOGRTS), *Human and experimental toxicology*, 39 (8), 1079-1094.
- Rehman, H., Ullah, I., David, M., Ullah, A., Jahan, S., 2019, Neonatal exposure to furan alters the development of reproductive systems in adult male Sprague Dawley rats, *Food and chemical toxicology*, 130, 231-241.
- Ren, N., Atyah, M., Chen, W.Y., Zhou, C.H., 2017, The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications, *Journal of translational medicine*, 15 (1), 1-13.
- Russo, M.T., De Luca, G., Palma, N., Leopardi, P., Degan, P., Cinelli, S., Pepe, G., Mosesso, P., Di Carlo, E., Sorrentino, C., Musiani, P., Crebelli, R., Bignami, M., Dogliotti, E. 2021, Oxidative stress, mutations and chromosomal aberrations induced by *in vitro* and *in vivo* exposure to furan, *International journal of molecular sciences*, 22 (18), 9687.
- Salas-Huetos, A., Bulló, M., Salas-Salvadó, J., 2017, Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies, *Human reproduction update*, 23 (4), 371–389.
- Senyuva H.Z., Gokmen V., 2007, Potential of furan formation in hazelnuts during heat treatment, *Food additives and contaminants*, Supplement 1, 24 (S1), 136-142.
- Seok, Y.J., Her, J.Y., Kim, Y.G., Kim, M.Y., Jeong, S.Y., Kim, M.K., Lee, J.Y., Yoon, H.J., Lee, K.G., 2015, Furan in thermally processed foods-a review, *Toxicological research*, 31 (3), 241-253.
- Shan, L., Hardy, M., 1992, Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells, *Endocrinology*, 131, 1107- 1114.

- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental cell research*, 175 (1), 184-191.
- Speit, G., 2002, Appropriate *in vitro* test conditions for genotoxicity testing of fibers, *Inhalation toxicology*, 14 (1), 79-90.
- Stich, H.F., Rosin, M.P., Wu, C.H., Powrie, W.D., 1981, Clastogenicity of furans found in food, *Cancer letters*, 13 (2), 89-95.
- Şekeroğlu, V., ŞEKEROĞLU, Z.A., 2011, Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronukleus testi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68 (4), 241-252.
- ŞEKEROĞLU, Z.A., Şekeroğlu, V., 2011, Genetik toksisite testleri, *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4 (3), 221-229.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Sasaki, Y. F., 2000, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and molecular mutagenesis*, 35 (3): 206-221.
- Trainer T.D., 1995, Testes and Excretory Duct System, *Histology for Pathologists*, Mills S.E. (ed.), Chapter 37, Raven Press, Philadelphia.
- Tryndyak, V., de Conti, A., Doerge, D.R., Olson, G.R., Beland, F.A., Pogribny, I.P., 2017, Furan-induced transcriptomic and gene-specific DNA methylation changes in the livers of Fischer 344 rats in a 2-year carcinogenicity study, *Archives of toxicology*, 91 (3), 1233-1243.
- Turkez, H., Arslan, M. E., Ozdemir, O., 2017, Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade, *Expert opinion on drug metabolism and toxicology*, 13 (10), 1089-1098.
- IARC, 1995, Furan. *IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans*, 63, 393-407.
- Uçar, S., Pandir, D., 2017, Furan induced ovarian damage in non-diabetic and diabetic rats and cellular protective role of lycopene, *Archives of gynecology and obstetrics*, 296 (5), 1027-1037.
- Vranova, J., Ciesarova, Z., 2009, Furan in food-a review, *Czech journal of food sciences*, 27 (1), 1-10.
- Wang, E., Chen, F., Hu, X., Yuan, Y., 2014, Protective effects of apigenin against furan-induced toxicity in mice, *Food and function*, 5 (8), 1804-1812.
- Watters, G.P., Smart, D.J., Harvey, J.S., Austin, C.A., 2009, H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint, *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 679 (1-2), 50-58.

- Wilson III, D.M., Thompson, L.H., 2007, Molecular mechanisms of sister-chromatid Exchange, *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 616 (1-2), 11-23.
- Wilson, D.M., Goldsworthy, T.L., Popp, J.A., Butterworth, B.E., 1992, Evaluation of genotoxicity, pathological lesions, and cell proliferation in livers of rats and mice treated with furan, *Environmental and molecular mutagenesis*, 19 (3), 209-222.
- Wojcik, A., Obe, G., 2007, Sister-chromatid exchanges, Chromosomal alterations, *Springer*, Berlin, Heidelberg, 271-283.
- Yuan, Y., Wu, S.J., Liu, X., Zhang, L.L., 2013, Antioxidant effect of salidroside and its protective effect against furan-induced hepatocyte damage in mice, *Food and function*, 4 (5), 763.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., Ünal, F., 2014, Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri, *Gıda/The Journal of FOOD*, 39 (3), 179-186.
- Zeiger, E., 1998, Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 28 (2), 85-95.
- Zhang, G.L., Liang, Y., Zhu, J.Y., Jia, Q., Gan, W.Q., Sun, L.M., Hou, H.M., 2015, Oxidative stress-mediated antiproliferative effects of furan-containing sulfur flavors in human leukemia Jurkat cells, *Food chemistry*, 180, 1-8.
- Zirkin, B.R., Papadopoulos, V., 2018, Leydig cells: formation, function, and regulation, *Biology of reproduction*, 99 (1), 101-111.

ÖZGEÇMİŞ

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

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2020

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

Makale ve Bildiriler	
Orta Yılmaz B., Yılmaz B., Aydın Y., Plant polyphenols in the regulation of ion channels during aging and induced diseases, Plant Bioactives as Natural Panacea Against Age-Induced Diseases, Pandey Kanti Bhooshan, Suttajit Maitree, Editör, Elsevier, Amsterdam, ss.235-252, (2022).	
Orta Yılmaz B., Yılmaz, B., Evaluation of the antioxidant defense system parameters in furan- induced toxicity in Leydig cells, International Conference on Natural Sciences and Technology, Prizren, Kosova, 26-30 Ağustos 2019, ss.1	
Yılmaz, B., Orta Yılmaz, B., Evaluation of the genotoxic profile of furan in Leydig cells, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, Ankara, Turkey, 14- 16 Aralık 2022, sf. 5.	