

Akrilamidin İn-vivo Genotoksisitesi Üzerine Fenolik Bileşiklerden Pelargonidin ve Gallik Asidin Etkileri

Pınar AKSU KILIÇLE^{a*}, Abdullah DOĞAN^b

^a Kafkas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 36100, Kars, Türkiye

^b Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 36100, Kars, Türkiye

Araştırma Makalesi
Research Article

Biyoloji
Biology

Geliş Tarihi/Received
09.05.2020

Kabul Tarihi/Accepted
25.06.2020

Öz: Akrilamid genotoksik etkili olup, muhtemel karsinojenler arasında sınıflandırılmıştır. Endüstride kullanım alanı olan akrilamid, ayrıca yüksek ısıda pişirilen karbonhidratça zengin gıdalarda bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, fare kemik iliği hücrelerinde akrilamidin genotoksisitesine karşı pelargonidin ve gallik asitin etkilerini ortaya çıkarmaktır. Akrilamidin genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla kromozomal aberasyon, mikronükleus ve mitotik indeks testleri kullanıldı. Araştırmada, akrilamidin genotoksisitesine karşı pelargonidin ve gallik asitin antigenotoksik etkileri aynı yöntemlerle çalışıldı. Araştırma sonucunda Akrilamidin *in vivo* klastojenik etkisinin olduğu saptandı. Akrilamidin bu spesifik etkisinin doza bağlı olduğu tespit edildi. Araştırmada, gallik asitin genotoksik ve sitotoksik etkili olmadığı belirlendi. Kromozomal aberasyon, mikronükleus ve mitotik indeks testlerinde gallik asitin, akrilamidin neden olduğu genotoksisite frekansında önemli derecede düşüşe neden olduğu gözlemlendi. Pelargonidin'in genotoksik ve sitotoksik etkileri bulunmadı. Bu araştırmada kullanılan kromozomal aberasyon, mikronükleus ve mitotik indeks testleri sonucuna göre, akrilamidin genotoksik ve sitotoksik, gallik asit ve pelargonidinin ise antigenotoksik etkili olduğu, ayrıca gallik asitin pelargonidinden daha güçlü antigenotoksik etki gösterdiği saptandı.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, Gallik asit, Pelargonidin, Kromozomal aberasyon, Mikronükleus, Mitotik indeks

Effects of Pelargonidine and Gallic Acid as Phenolic Compounds on *In-vivo* Genotoxicity of Acrylamide

Abstract: Acrylamide is genotoxic and is classified among possible carcinogens. Acrylamide, which has an area of use in the industry, is also found in carbohydrate-rich foods cooked at high temperatures. The aim of this study is to reveal the effects of pelargonidine and gallic acid against the genotoxic effect of acrylamide in mouse bone marrow cells. Chromosomal aberration, micronucleus and mitotic index tests were used to investigate the genotoxic effects of acrylamide. In addition, the antigenotoxic effect of pelargonidine and gallic acid against the genotoxicity of acrylamide was investigated by same methods. As a result of the research, it was determined that acrylamide had a clastogenic effect *in vivo*. These acrylamide-specific effects were dose-dependent. In this study, it was determined that gallic acid was not genotoxic and cytotoxic. In chromosomal aberration, micronucleus and

mitotic index tests, gallic acid caused a significant decrease in the frequency of genotoxicity caused by acrylamide. The genotoxic and cytotoxic effects of pelargonidine were not found. According to the results of chromosomal aberration, micronucleus, and mitotic index tests used in this study, acrylamide was found to have a genotoxic and cytotoxic effect, gallic acid and pelargonidine had an antigenotoxic effect, and gallic acid had a stronger antigenotoxic effect than pelargonidine.

Keywords: Acrylamide, Gallic acid, Pelargonidine, Chromosomal aberration, Micronucleus, Mitotic index

1. GİRİŞ

Gıdaların hazırlanması ve dayanıklı hale getirilmesi için çoğunlukla 90-200 °C arasında değişen ısının uygulandığı çeşitli işlemlere örneğin; pişirme, fırınlama, kızartma, kavurma vs. başvurulmaktadır. Isı başta olmak üzere uygulanan bu işlemler, gıdalarda toksik bileşiklerin oluşmasına yol açabilmektedir. Gıdalara ısı enerjisinin uygulanması sonucu oluşan bu toksik bileşiklerin en önemlileri ve en iyi bilinenleri arasında, heterosiklik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, N-alkil-N-nitrosamin bileşikleri ve akrilamid sayılabilir. Bu maddelerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinin bulunduğu araştırmalarla tespit edilmiştir (Claeys ve ark., 2005).

Akrilamid 1950'li yıllardan itibaren endüstri ve laboratuvarlarda kullanılan bir maddedir. Akrilamidin canlılara zarar verdiğinin tespit edilmesi, konunun çok boyutlu olarak ele alınmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Akrilamid çoğu besin maddesinde pişirilme esnasında oluşabilmektedir. Böyle besin maddelerinin tüketilmesiyle canlılara ulaşan akrilamid, çeşitli mekanizmalarla karsinojenik ve nörotoksik etkilere neden olmaktadır. Mutajenik etkileri de bulunan bu madde, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından olası kanserojenler grubu olan 2A kategorisinde değerlendirilmektedir (Iarc., 1997). Bu sınıflandırma, Akrilamidin hayvanlarda kansere neden olduğunun ispatlanmasına dayanmaktadır. Çok sayıda yapılan çalışmalarda akrilamidin hücrelerin makro molekülleriyle reaksiyona girdiği, hayvan hücreleri başta olmak üzere kromozomlarda anomaliler oluşturduğu, diğer bir değişle mutasyona neden olduğu gösterilebilmiştir (Okur ve Seydim., 2004). Bu maddenin gıdaların içinde bulunan aminoasit ve indirgen özellikteki glukoz gibi şekerlerden, maillard reaksiyonu ile meydana geldiği tespit edilmiştir (Mottram ve ark., 2004; Stadler ve ark., 2002).

Bitkilerde bulunan flavonoidlerin antiinflamatuvar, antimutajenik ve antialerjik özellikleri bilimsel araştırmalarla ortaya konmuştur (Hollman ve ark., 1996). Geleneksel halk hekimliğinde kullanılan bitkilerin bilimsel araştırmalarla önemleri anlaşılmış ve tedavide kullanılmaları gündeme gelmiştir. Bu durum günümüzde fitoterapi bilim dalının gelişmesine

neden olmuştur. Bu bilim dalı her geçen gün gelişmekte ve önemi giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verileri, gelişmekte olan ülkelerde toplumların % 80'inin bu terapi yöntemlerini kullandıklarını ve dünyada 3,3 milyar insanın tıbbi bitkilerden tedavi amacıyla faydalandığını ortaya koymuştur (Çelik ve Çelik., 2007).

Kimyasal maddelerin mutasyona sebep olup olmadıklarının belirlenmesi, kısa sürede yapılabilen genotoksisite testleri ile mümkün olabilmektedir. Kimyasal bir maddenin genotoksik veya antigenotoksik olup olmadığının belirlenmesinde; kromozom aberasyonu (KA, chromosome aberration, CA), mikronükleus (MN) ve kardeş kromatid değişimi (KKD, sister chromatid Exchange, SCE) testleri kullanılmaktadır (Aksu ve ark., 2008; Anderson., 1988; Carrano ve Natarajan., 1988; Fenech ve Crott., 2002; Gül ve ark., 2007; Hagmar ve ark., 1994; Heddle ve ark., 1991; Tucker ve ark., 1993).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ısı işlemine tabi tutulmuş, sanayide üretilen, sigara ve besinlerin genotoksik ve mutajenik etkiye sahip olan akrilamid maddesini içerdiği tespit edilmiştir. Bilimsel araştırmalar ile akrilamidin, somatik ve cinsiyet hücreleri üzerinde genotoksik etkileri gösterilmiştir. Akrilamid gen ve kromozomlarda kalıtsal hasara neden olmaktadır. İnsanların günlük hayatında yaygın olarak karşılaşılabileceği ve çeşitli yollarla bünyesine alacağı akrilamidin olumsuz etkilerini azaltacak hatta minimize edecek maddelerin tespiti oldukça önemlidir. Bu nedenle akrilamidin *in vivo* ve *in vitro* olarak genotoksik etkilerini engelleyecek maddelerin keşfedilmesi üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmada kullanılan fenolik bileşiklerin bu tip etkilerinin saptanması, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ışık tutabileceği gibi, ilaç sanayisinde de kullanılmasının önünü açacağı düşünülmektedir. Etkilerinin ve dozlarının deney hayvanları üzerinde gösterilmesi bu açıdan çok önemlidir. Bu çalışma ile, fare kemik iliği hücrelerinde, Akrilamidin genotoksisitesi üzerine Pelargonidin ve Gallik asitin antigenotoksik etkilerinin olup olmadığının saptanması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Hayvan Materyali

Bu araştırmanın yapılması, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyle Yerele Etik Kurulu'nun 20.01.2010/ 07 sayılı yazıları ile uygun görüldü. Çalışmada ağırlıkları 20-30 g arasında değişen, 8 haftalık erkek, *Mus musculus* cinsi albino fareler kullanıldı. Çalışmada, mikronükleus sıklığı, mitotik aktivite ve kromozomal aberasyon analizinin belirlenmesi amacıyla toplam 136 adet fare kullanıldı. Fareler 121 °C'de otoklave edilebilen, polikarbon malzemedan yapılmış kafeslere 8'li gruplar halinde yerleştirildi. Farelerin beslenmesinde

normal fare yemi ve çeşme suyu kullanıldı. Yem ve sular ad libitum olarak verildi. Fareler, 20 ± 2 °C sıcaklık, % 50 bağıl neme sahip, sabah 8'den akşam 8'e kadar olan 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyotlu laboratuvar koşullarında barındırıldı. Uygulanacak maddelerin dozu farelerin günlük ağırlıklarına göre tespit edildi ve maddeler distile suda çözülerek intraperinonal yol ile farelere verildi.

2.2.Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada farelere uygulanan pelargonidin (CAS no: 134-04-3) Sigma Aldrich'ten, akrilamid (Sigma, CAS No: 79-06-1), Gallik asit (Sigma, CAS no: 149-91-7), Mitomycin C (Sigma, CAS No: 50-07-7) ve Kolşisin (Sigma cat. No. C9754) temin edilerek kullanıldı.

2.3.Metot

Kontrol A hariç bütün gruplara çözeltiler distile su dahil $50 \mu\text{l}/10 \text{ g}$ fare dozunda aşağıda planlandığı şekilde intra-peritoneal (i.p) yolla enjekte edildi.

Grup 1. (Kontrol grubu, n=16). Bu grup, negatif grup olarak tutuldu. İlk 8 fareye hiçbir madde verilmedi (Kontrol A). Diğer 8 fareye distile su i.p. yolla enjekte edildi (Kontrol B).

Grup 2. Pozitif Kontrol grubu (n=8). Bu grup pozitif deney grubu olarak tasarlandı. Farelere (i.p) yolla, 24 ve 48 saat önce 2 mg/kg dozda Mitomycin-C (MMC) enjekte edildi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 3. 25 mg/kg akrilamid grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 25 mg/kg dozdaki akrilamid i.p yolla enjekte edilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 4. 25 mg/kg akrilamid + 3 mg/kg pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 3 mg/kg dozda pelargonidin i.p yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 25 mg/kg dozda akrilamid verilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 5. 25 mg/kg akrilamid + 100 mg/kg aallik asit grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 100 mg/kg dozda gallik asit i.p yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 25 mg/kg dozda akrilamid verilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 6. 50 mg/kg akrilamid grubu (n=8) Bu gruptaki 8 fareye 50 mg/kg dozdaki akrilamid i.p yolla enjekte edilip, 24-48 saat beklendi (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verildi).

Grup 7. 50 mg/kg akrilamid + 3 mg/kg pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 3 mg/kg dozda pelargonidin i.p yolla verildi. Ayrıca 13. ve 14. günde

farelerin ağırlıklarına göre 50 mg/kg dozda akrilamid verilir, 24-48 saat beklenir (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verilir).

Grup 8. 50 mg/kg akrilamid + 100 mg/kg gallik asit grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 100 mg/kg dozda gallik asit i.p yolla verilir. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 50 mg/kg dozda akrilamid verilir, 24-48 saat beklenir (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verilir).

Grup 9. 100 mg/kg akrilamid grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 100 mg/kg dozdaki akrilamid i.p yolla enjekte edilip, 24-48 saat beklenir (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verilir).

Grup 10. 100 mg/kg akrilamid + 3mg/kg pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 3 mg/kg dozda pelargonidin i.p yolla verilir. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 100 mg/kg dozda akrilamid verilir 24-48 saatlik etkisine beklenir (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verilir).

Grup 11. 100 mg/kg akrilamid + 100 mg/kg gallik asit grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 100 mg/kg dozda gallik asit i.p yolla verilir. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 100 mg/kg dozda akrilamid verilir, 24-48 saat beklenir (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verilir).

Grup 12. 150 mg/kg akrilamid grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 150 mg/kg dozdaki akrilamid i.p yolla enjekte edilip, 24-48 saat beklenir (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verilir).

Grup 13. 150 mg/kg akrilamid + 3mg/kg pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 3 mg/kg dozda pelargonidin i.p yolla verilir. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 150 mg/kg dozda akrilamid verilir 24-48 saat beklenir (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verilir).

Grup 14. 150 mg/kg akrilamid + 100 mg/kg gallik asit grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük 100 mg/kg dozda gallik asit i.p yolla verilir. Ayrıca 13. ve 14. günde farelerin ağırlıklarına göre 150 mg/kg dozda akrilamid verilir 24-48 saat beklenir (4 hayvana 13. günün başlangıcında, diğer 4 hayvana da 14. günün başlangıcında verilir).

Grup 15. 100 mg/kg gallik asit grubu (n=8) Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük olarak 100 mg/kg dozda gallik asit i.p yolla verilir.

Grup 16. 3 mg/kg pelargonidin grubu (n=8). Bu gruptaki 8 fareye 14 gün boyunca, günlük olarak 3 mg/kg dozda pelargonidin i.p yolla verilir.

2.3.1.Kromozomal İnceleme ve Mitotik İndeksin Tespiti

Bütün gruptaki farelere 15. günün başlangıcında, ötanaziden 2 saat önce 4 mg/kg dozunda kolşisin i.p olarak enjekte edildi. Hayvanlara eter ile anestezi uygulandı. Anestezi altındayken servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi uygulanıp, femur kemikleri çıkartıldı. Femur kemiklerinden biri kromozomal aberasyon ve mitotik indeksin tespitinde, diğeri ise mikronükleus testinde kullanıldı. Her iki femura ait kemik iliği enjektör yardımı ile santrifüj tüpüne aktarıldı (içerisinde 3 ml fotal dana serumu bulunan). Femur örneklerinden birine ait tüpler, 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Dipte kalan hücreler 20-30 dakika hipotonik çözeltide bekletildi. Santrifüj işleminden sonra carnoy fiksatifinde 3 kez fikse edilerek lamlara yayıldı. Mitotik aktivite ve kromozomal aberasyon için metafaz preparatları Preston'a göre laboratuvar ve çalışma koşullarımız göz önünde bulundurularak yapıldı (Preston ve ark., 1987). Yayma işleminden sonra lamlar kurutuldu ve %10'luk giemsa ile 10 dakika boyandı. Her hayvan örneğinden rastgele 1000 hücre sayıldı. Sayılan hücrelerin içerisinde metafaz safhasında olanların adetleri tespit edilerek, yüzdeleri belirlendi. Kromozomal aberasyonu tespit etmek için 100 metafaz incelendi.

2.3.2.Mikronükleus Testi

Femur kemiğindeki kemik iliği enjektör yardımı ile içerisinde 3 ml dana serumu bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı. İçerisinde kemik iliği numunesi bulunan tüpler 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı. Dipte kalan kısım lamlara yayıldı, kurutuldu ve metil alkolde 10 dakika fikse edildi. Kemik iliği preparatları ilk kez Schmid tarafından geliştirilip, laboratuvar ve çalışma koşullarımıza göre uyarlanan bir yöntem ile hazırlandı (Schmid., 1975). Fikse edilmiş preparatlar sırası ile % 0,25'lik, % 0,125'lik May Grunwald boyası ile 5 dakika, giemsa boyası ile 30 dakika boyandı. Her preparattan rastgele 1000 adet PCE (poli kromatik eritrosit) sayıldı. Bunların içerisinde MNPCE (mikronükleuslu polikromatik eritrosit)'lerin sayıları belirlenerek, yüzdeleri çıkartıldı.

2.4.İstatistik Analiz

Tüm istatistiksel analizler Windows 95 GraphPad Instat 3.05 (GraphPad Software, San Diego California USA) kullanılarak yapıldı. Kimyasallarla muameleli gruplar ve negatif kontroller arasında farklılığın tespiti için Dunnett t testi kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapıldı, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulundu ve regresyon doğrusu çizildi.

3. BULGULAR

3.1. Kontrol ve deney gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyon üzerindeki etkileri

Farelere intraperitoneal yolla akrilamid (AA), pelargonidin (PG), gallik asit (GA) ve (MMC) enjeksiyon yapıldıktan sonra, her doz grubundan elde edilen preparatlardan metafaz safhasında olan toplam 100 hücre 24 saatlik etki süresi için, 100 hücrede 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Bu 100 hücre içerisinde gözlemlenen yapısal kromozom sayıları belirlenerek Tablo 3.1 ve Resim 3.2’ de gösterilmiştir.

Akrilamidin uygulanan dozları (25-50-100-150 mg/kg), 24-48 saatlik muamele süresinde kromozomal aberasyon yüzdesini negatif kontrole göre artırdığı tespit edildi. Bu artışın pozitif kontrol grubundaki sayı kadar olmadığı gözlemlendi. Gözlenen yapısal kromozom anormallikleri kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, disentrik kromozom ve kardeş kromatid birleşimi şeklinde olduğu tespit edildi. Yapısal kromozom anormallikleri Akrilamidin doz artışına bağlı olarak arttığı görüldü.

Farelere uygulanan pelargonidin ve gallik asitin 24-48 saatlik muamele süresinde, negatif ve pozitif kontrole kıyaslandığında yapısal kromozom anormalliklerine neden olmadığı, diğer bir deyişle herhangi bir genotoksisitelerinin bulunmadığı saptandı.

Akrilamid ile birlikte uygulanan pelargonidin kromozomal aberasyon yüzdesini düşürmediği gözlemlendi. Fakat akrilamid ile birlikte uygulanan gallik asit 24-48 saatlik etki süresince, kromozomal aberasyon yüzdesini düşürdüğü tespit edildi. Kromozomal anomaliler Resim 3.1’de görülmektedir.

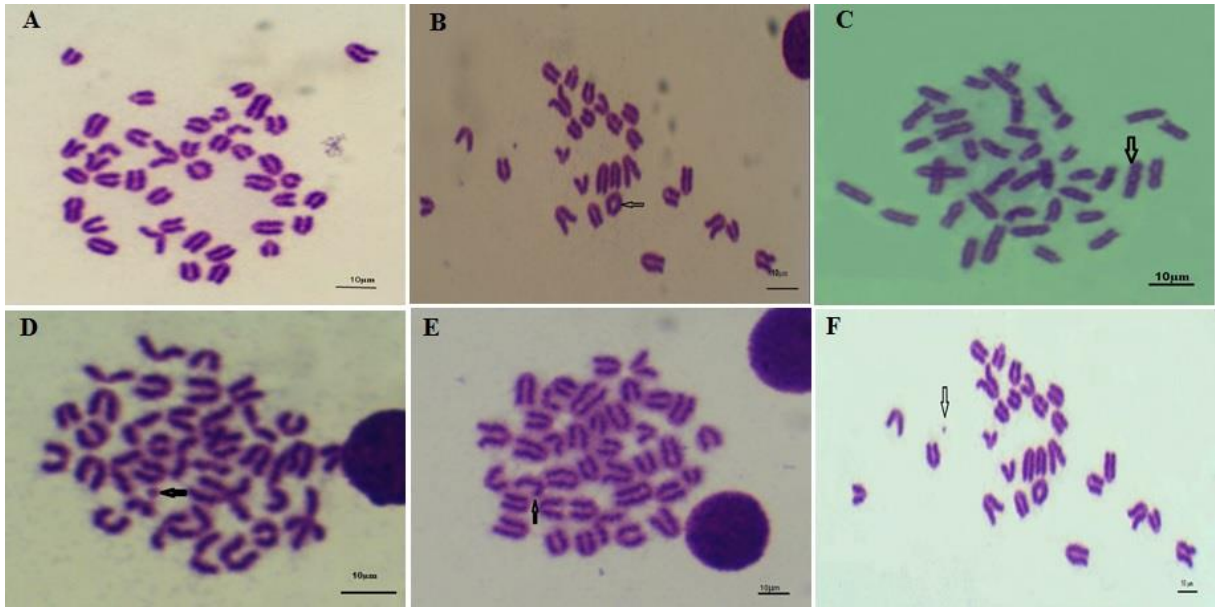
Tablo 3.1: Kontrol ve Deney Gruplarında 24-48 Saat Sonra Fare Kemik İliği Hücrelerinde Rastlanan Kromozom Anormallik Çeşitleri (sayılan 100 hücrede) ve Yüzde Toplamları

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Muamele Dozu (mg/kg)	KK	Kk	F	DSK	KKB	Toplam (%)	Toplam KA (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif A			-	-	1	-	2	3	3	3.07±0.04
Negatif B	24	-	-	-	-	-	-	-	1	1.01±0.00
	48	-	-	1	1	-	-	2		
MMC	24	2	6	10	6	8	28	58	68.5	68.4±0.14
	48	2	12	17	9	10	31	79		
	24	25	2	1	1	1	6	11	17	16.95±0.06*
	48	25	4	4	3	2	10	23		
	24	50	3	2	2	3	7	17	28.5	28.52±0.06*
	48	50	5	7	4	6	18	40		
	24	100	3	4	2	4	8	21	32.5	32.65±0.13*
	48	100	4	9	9	7	16	44		

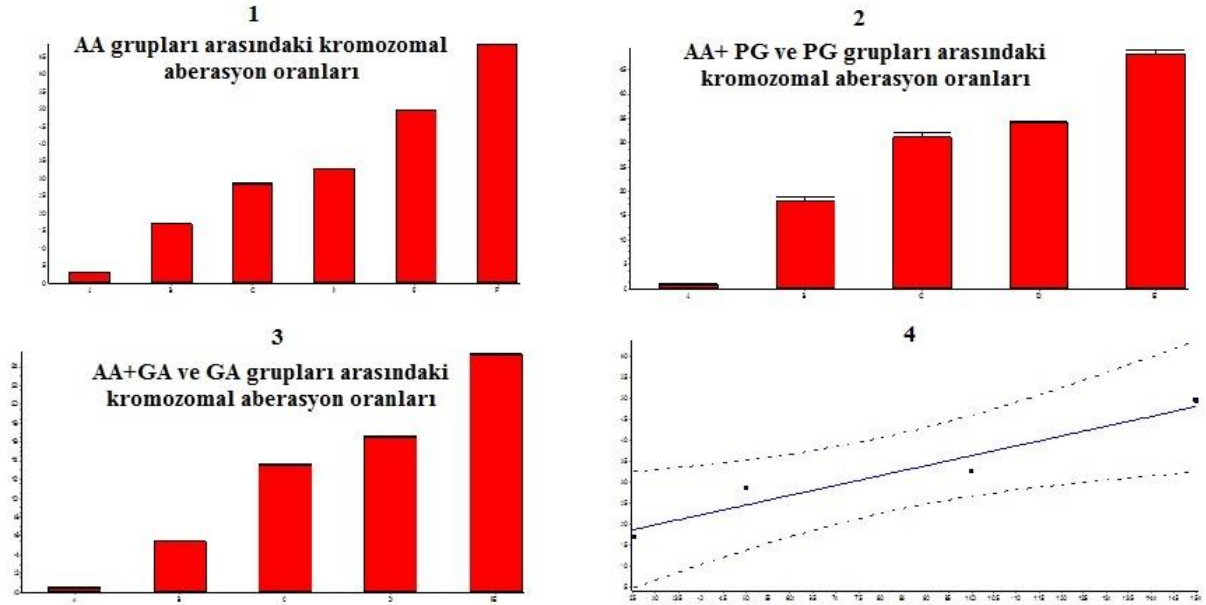
AA	24	150	5	10	3	7	7	32	49.5	49.57±0.04*
	48	150	7	10	7	18	25	67		
AA+PG	24	25AA+3PG	2	2	1	1	6	12	18	18±0.40*
	48	25 AA+3PG	4	5	2	2	11	24		
	24	50AA +3PG	2	1	3	5	7	18	31	31.25±0.47*
	48	50 AA+3PG	6	7	5	7	19	44		
	24	100 AA+3PG	3	3	3	5	8	22	34.5	34.17±0.11*
	48	100 AA+3PG	8	9	7	8	15	47		
	24	150 AA+3PG	5	6	5	6	10	32	49	48.25±0.47*
	48	150 AA+3PG	8	6	13	9	30	66		
AA+GA	24	25 AA+100GA	2	1	-	-	3	6	5.5	5.4±0.04*
	48	25 AA+100GA	1	1	-	-	3	5		
	24	50 AA+100GA	1	1	1	1	3	7	13.5	13.57±0.04*
	48	50 AA+100GA	2	1	1	4	12	20		
	24	100 AA+100GA	2	1	1	2	3	9	16.5	16.5±0.07*
	48	100 AA+100GA	5	3	3	3	10	24		
	24	150 AA+100GA	2	2	1	6	10	21	25.5	25.32±0.08*
	48	150 AA+100GA	2	1	2	3	22	30		
PG	24	3	-	-	-	-	-	-	0.5	0.82±0.16
	48	3	-	-	-	-	1	1		
GA	24	100	-	-	-	-	-	-	0.5	0.42±0.04
	48	100	-	-	-	-	-	1		

KK: Kromozom kırığı, **Kk:**Kromatid kırığı, **F:** Fragment, **DSK:** Disetrik kromozom

KKB: Kardeş kromatid birleşmesi, * : p< 0.01 kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.



Resim 3.1. **A:**Fareye ait normal metafaz örneği, **B:** Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatid birleşmesi, **C:** Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde disetrik kromozom, **D:** Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde kromozom kırığı, **E:** Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde kromatid kırığı, **F:** Muamele görmüş fare kemik iliği hücrelerinde fragment (x1000)



Resim 3.2: 1:Akrilamidin değişik dozları (25-50-100-150 mg/kg) ve kontrol gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde, kromozom aberasyon oranları (A: N.Kontrol, B: 25AA, C: 50AA, D: 100AA, E: 150AA, F: MMC). 2:AA+ PG ve PG grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, kromozom aberasyon oranları (A: Pelargonidin, B:25AA+P, C:50AA+P, D:100AA+P, E: 150AA+P). 3: AA+GA ve GA grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, kromozom aberasyon oranları (A: Gallik Asit, B: 25AA+GA, C:50AA+GA, D:100AA+GA, E: 150AA+GA). 4:Akrilamidin farklı konsantrasyonları ile kromozomal aberasyon arasındaki regresyon ($r= 0,96$) çizelgesi

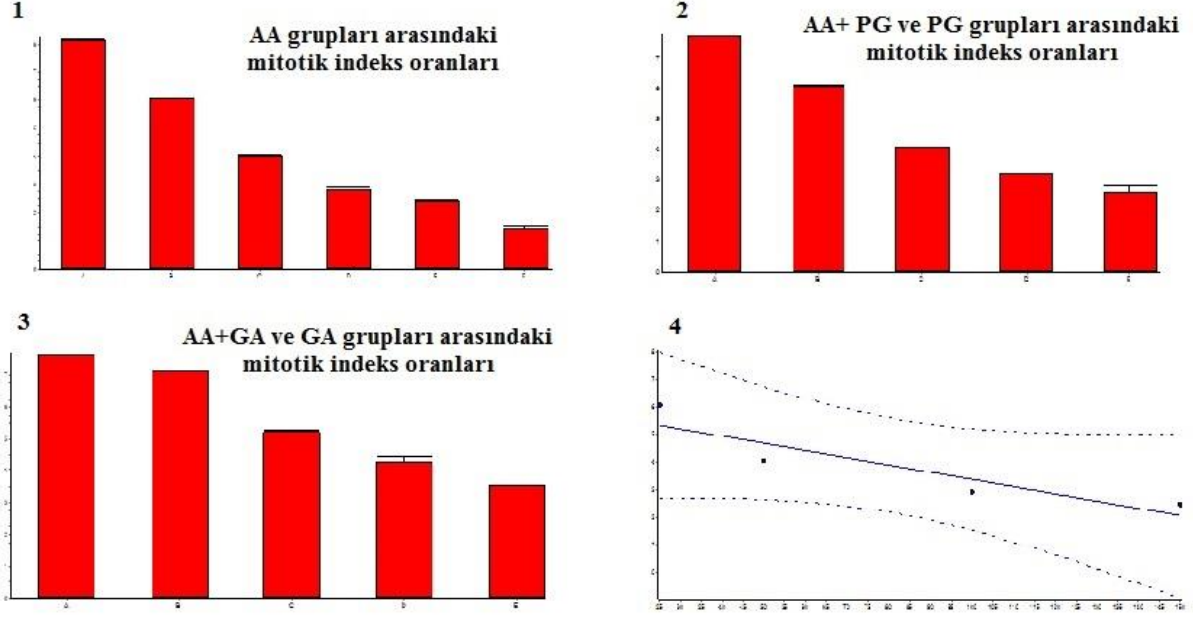
3.2. Kontrol ve Deney Gruplarının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik Aktivite Oranları

Farelere intraperitoneal yolla AA, PG, GA ve MMC enjeksiyon yapıldıktan sonra, her doz grubundan elde edilen preparatlardan rasgele toplam 1000 hücre 24 saatlik etki süresi için, 1000 hücre de 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Bu 1000 hücre içerisinde gözlemlenen metafaz sayıları belirlenerek Tablo 3.2 ve Resim 3.3 'te gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Kontrol ve Deney Gruplarında 24-48 Saat Sonra Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik Aktivite Oranları

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Top.Hüc	Metafaz hücre sayısı	Metafaz hüç. oranı ortalaması (%)	Toplam Metafaz oranı (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif Kontrol A	24	1000	80	8	8.1	8.1±0.04
	48	1000	82	8.2		
Negatif Kontrol B	24	1000	83	8.3	8.4	8.37±0.08
	48	1000	85	8.5		
P.Kontrol (MMC) 2mg/kg	24	1000	16	1.6	1.5	1.42±0,04
	48	1000	14	1.4		
PG 3mg/kg	24	1000	78	7.8	7.75	7.73±0.01
	48	1000	77	7.7		
GA 100mg/kg	24	1000	77	7.7	7.65	7.64±0.00
	48	1000	76	7.6		
25mg/kg AA	24	1000	60	6	6.05	6.04±0,00*
	48	1000	61	6.1		
50mg/kgAA	24	1000	40	4	4.05	4.02±0.01*
	48	1000	41	4.1		
100mg/kgAA	24	1000	30	3	2.9	2.77±0.06*
	48	1000	28	2.8		
150mg/kgAA	24	1000	26	2.6	2.45	2.44±0.00*
	48	1000	23	2.3		
25mg/kg AA+3mg/kgPG	24	1000	61	6.1	6.15	6.13±0.00*
	48	1000	62	6.2		
50mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	41	4.1	4.05	4.07±0.00*
	48	1000	40	4		
100mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	33	3.3	3.25	3.25±0.00*
	48	1000	32	3.2		
150mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	23	2.3	2.4	2.6±0.10*
	48	1000	25	2.5		
25mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	72	7.2	7.15	7.12±0.00*
	48	1000	71	7.1		
50mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	52	5.2	5.25	5.23±0.01*
	48	1000	53	5.3		
100mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	42	4.2	4.5	4.3±0.09*
	48	1000	48	4.8		
150mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	36	3.6	3.55	3.52±0.01*
	48	1000	35	3.5		

* p< 0.01 kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.



Resim 3.3: 1:Akrilamidin değişik dozları (25-50-100-150 mg/kg) ve kontrol gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde, mitotik indeks oranları (A:N.Kontrol, B:25AA, C:50AA, D: 100AA, E: 150AA, F:MMC). 2:AA+ PG ve PG grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mitotik indeks oranları (A: Pelargonidin, B:25AA+PG, C:50AA+PG, D:100AA+PG, E:150AA+PG). 3:AA+GA ve GA grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mitotik indeks oranları (A: Gallik Asit, B:25AA+GA, C:50AA+GA, D:100AA+GA, E:150AA+GA). 4:Akrilamidin farklı konsantrasyonları ile mitotik indeks arasındaki regresyon ($r = - 0,91$) çizelgesi

3.3. Kontrol ve deney gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus sıklığı üzerindeki etkileri

Farelere intraperitoneal yolla AA, PG, GA ve MMC enjeksiyon yapıldıktan sonra, her doz grubundan elde edilen preparatlardan rastgele toplam 1000 PCE (polikromatik eritrosit) 24 saatlik etki süresi için, 1000 PCE (polikromatik eritrosit) 48 saatlik etki süresi için sayıldı. Bu 1000 PCE içerisinde gözlemlenen MNPCE sayıları tespit edilerek Tablo 3.3 ve Resim 3.5' te gösterilmiştir.

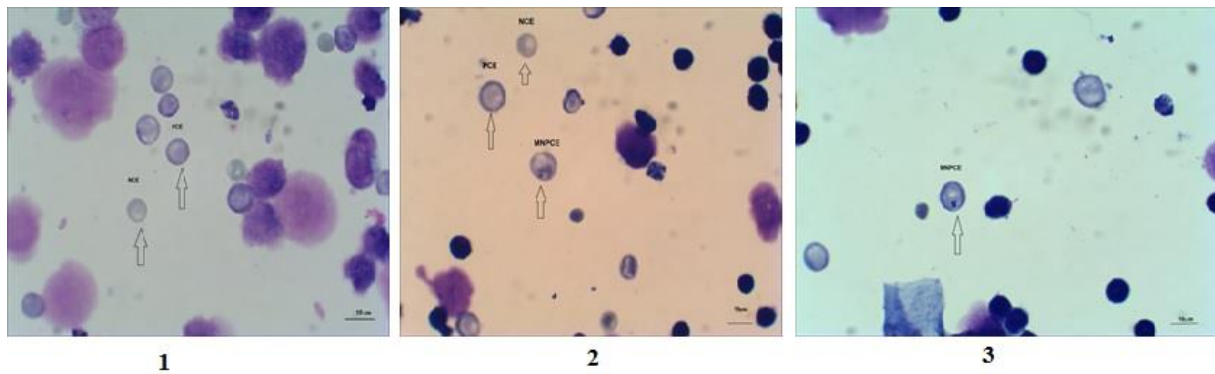
Tablo 3.3: Kontrol ve Deney Gruplarının Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mikronükleus Sıklığı

Gruplar	Muamele Süresi (Saat)	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE oranı %	Toplam MNPCE oranı (24-48 saat) (%)	±SEM(%)
Negatif kontrol A	24	1000	30	3	3	3.2±0.10
	48	1000	30	3		
Negatif Kontrol B	24	1000	34	3.4	3.3	3.45±0.06
	48	1000	32	3.2		
P.Kontrol (MMC) 2mg/kg	24	1000	251	25.1	26.1	26.47±0.13
	48	1000	271	27.1		
PG 3mg/kg	24	1000	32	3.2	3.2	3.45±0.11
	48	1000	32	3.2		
GA 100mg/kg	24	1000	31	3.1	3.1	3.27±0.08
	48	1000	31	3.1		
25mg/kg AA	24	1000	40	4	4	4.25±0.10*
	48	1000	40	4		
50mg/kgAA	24	1000	58	5.8	5.9	5.67±0.08*
	48	1000	60	6		
100mg/kgAA	24	1000	100	10	10.05	10.06±0.00*
	48	1000	101	10.1		
150mg/kgAA	24	1000	178	17.8	17.75	17.76±0.00*
	48	1000	177	17.7		
25mg/kg AA+3mg/kgPG	24	1000	40	4	4.05	4.06±0.00*
	48	1000	41	4.1		
50mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	59	5.9	5.8	5.67±0.19*
	48	1000	57	5.7		
100mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	102	10.2	10.1	10.35±0.11*
	48	1000	100	10		
150mg/kgAA+3mg/kgPG	24	1000	175	17.5	17.5	17.67±0.08*
	48	1000	175	17.5		
25mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	38	3.8	3.8	3.65±0.18
	48	1000	38	3.8		
50mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	42	4.2	4.15	4.16±0.00*
	48	1000	41	4.1		
100mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	95	9.5	9.45	9.50±0.02*
	48	1000	94	9.4		
150mg/kgAA+100mg/kgGA	24	1000	160	16	16.2	16.37±0.08*
	48	1000	164	16.4		

PCE: Polikromatik eritrosit, MNPCE: Mikronükleuslu polikromatik eritrosit

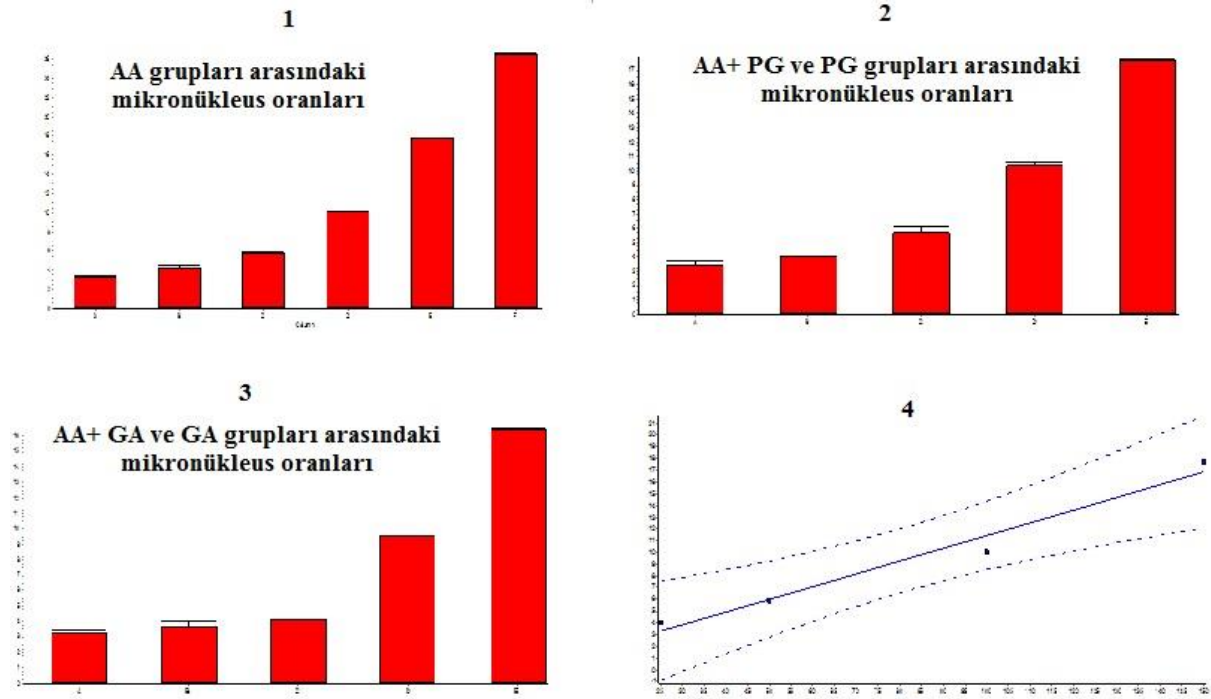
* $p < 0.01$ kontrolle karşılaştırıldığında fark önemli.

Aşağıdaki resimlerde PCE, NCE ve MNPCE'ler gösterilmiştir (Resim 3.4).



Resim 3.4: 1: Muamele görmemiş fare kemik iliğinde mikronükleuslu olmayan PCE ve NCE'ler (x1000). 2: Deney grubu farelerin kemik iliğinde MNPCE ve normal PCE ve

NCE'ler (x1000). 3: Deney grubu farelerin kemik iliği hücrelerinde 3 mikronükleuslu PCE (x1000).



Resim 3.5: 1:Akrilamidin değişik dozları (25-50-100-150 mg/kg) ve kontrol gruplarının fare kemik iliği hücrelerinde, mikronükleus oranları (A:Nkontrol, B:25AA, C:50AA, D:100AA, E: 150AA, F:MMC. 2:AA+ PG ve PG grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mikronükleus oranları (A: Pelargonidin, B:25AA+PG, C:50AA+PG, D:100AA+PG, E: 150AA+PG). 3:AA+GA ve GA grupları arasında fare kemik iliği hücrelerinde, mikro nükleus oranları (A: Gallik Asit, B:25AA+GA, C:50AA+GA, D:100AA+GA, E:150AA+GA). 4:Akrilamidin farklı konsantrasyonları ile mikro nükleus arasındaki regresyon (r=0,98) çizelgesi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hayvanlar üzerinde yapılan birçok çalışmada akrilamidin karsinojen ve mutajen etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Akrilamid insanlar için ise muhtemel karsinojen ve mutajen olarak tanımlanmaktadır (Besaratina ve Pfeifer., 2005).

İsveç'te yapılan araştırmalarda, diğer faktörler de dikkate alındığında akrilamid alınımının bir günde 100 µg'a kadar çıkabileceği tespit edilmiştir. Gıdalar dışında da insanların akrilamide maruz kalabileceği bilinmektedir. Örneğin, ambalaj materyalinde ve kozmetik ürünlerinde de düşük miktarlarda akrilamid bulunmaktadır. Bir sigaranın 1-2 µg

akrilamid oluşturduğu dikkate alındığında, sigaranın bu açıdan daha fazla önem arz ettiği söylenebilir (Burdurlu ve Karadeniz., 2006; Von Mühlendahl ve Otto., 2003).

Akrilamidin gıdalarda bulunuşu ve birçok yolla bu maddeye maruz kalma riskinin saptanması, insanların akrilamide olan ilgilerini arttırmış olup, bu maddenin zararlı etkileri ile bu zararlara karşı alınabilecek önlemler üzerine ilgiyi arttırmış ve bu konuda çalışmaların hızlanmasına neden olmuştur. Bu maddenin zararlı etkilerinin ortaya konulması amacıyla *in vivo* ve *invitro* deneylerin yapılması önem kazanmıştır.

Polifenollerin serbest radikal yakalayıcı bileşikler olduğu ve bu bileşiklerin antioksidan özellik gösterdikleri bildirilmektedir (Delazar ve ark., 2005; Hollman ve ark., 1996; Kukic ve ark., 2006). Bu durum çok sayıda araştırmayla gösterilmiştir. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkiye sahip oldukları bildirilmiş ve daha önce yapılan çalışmalar çeşitli araştırmacılar tarafından desteklenmiştir (Háznagy-Radnai ve ark., 2006; Matkowski ve Piotrowska., 2006). Bu araştırma sonucuna göre akrilamidin kromozomlarda oluşturduğu hasarı fenolik bileşikler engelleyebilmektedir. Bu durumun ortaya çıkmasında serbest radikalleri engelleyici etkileri veya diğer mekanizmalar bir rol oynayabilir. Serbest radikal yakalayıcı maddelerin antioksidan enzimlerin sentezini artırdıkları, DNA iplikleri arasında çapraz bağ oluşumunu engellemek suretiyle mutasyon oluşumunu bloke ettikleri, DNA'nın tamir mekanizmasını uyardıkları ve sitokrom P-450 gibi birçok enzimin sentezini düzenledikleri bildirilmektedir (Bianchini ve Vainio., 2001; Sowjanya ve ark., 2009; Khanum ve ark., 2004).

Mutajenik ya da klastojenik etkiye sahip olan genotoksik ajanlarda doz-cevap ilişkisi arasında doğrusal bir bağlantı söz konusudur. Böyle mutajenik ajanlardan biri de akrilamiddir. Bu çalışmada akrilamidin dozunun artışıyla birlikte genotoksik etkide de bir artma görülmüştür. Akrilamidin genotoksik etkisi bu çalışmanın dışında çok sayıda gerçekleştirilen diğer mikronükleus çalışmaları ile de ortaya konmuştur (Paulsson ve ark., 2002; Cao ve ark., 1993). Akrilamidin mutajenik etkilerinin gösterilmesinde diğer testlerden de yararlanılmıştır. İnsan lenfosit kültürü kromozomal aberasyon, mikronükleus testi, Ames testi, SCE testi gibi diğer test sistemlerinde akrilamidin açık bir şekilde klastojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Abramsson-Zetterberg., 2003).

Mei ve ark. fare lenfoma hücrelerinde glisidamid (GA) ve akrilamidin genotoksik etkilerini çalışmışlardır. Hücreleri 2-18 mM AA ve 0,125-4 mM GA ile muamele etmişler ve kromozomal aberasyon gibi çeşitli genotoksisite testleri ile sonuçları değerlendirmişlerdir. Akrilamidin metaboliti olan glisidamid ve akrilamid arasında genotoksisite karşılaştırması

yapmışlardır. Sonuçlarına göre, fare lenfoma hücrelerinde glisidamid, akrilamide göre daha mutajenik olduğunu tespit etmişlerdir (Mei ve ark., 2008).

Adler ve ark. 50-150 mg/kg dozundaki akrilamidin i.p olarak verilen farelerin, kemik iliği hücrelerindeki mikronükleus sıklığında uygulanan doza bağlı olarak artma gözlemiş ve 100 mg/kg akrilamid uygulamasından 24 saat sonra da en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer bulgular gözlenmiştir (Adler ve ark., 2002).

Titenko-Holland ve ark. 50 mg/kg dozundaki akrilamidi i.p. olarak farelere beş gün boyunca uygulamışlar. Akrilamidin morfolojik olarak normal ve anormal embriyolardaki mikronükleus içeren hücrelerin sıklığını negatif ve pozitif kontrolle kıyasladıklarında 10-20 kat artışa sebep olduğunu tespit etmişlerdir (Titenko-Holland ve ark., 1998).

Dobrzynska ve ark. X ışını ve akrilamidi birlikte kullanarak mutajenik etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada fare kemik iliği mikronükleus testi kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, akrilamidin X ışını ile birlikte uygulanmasının fare kemik iliği polikromatik eritrositlerinde mikronükleus oluşumunu önemli derecede arttırdığını tespit etmişlerdir (Dobrzynska ve ark., 1990).

Paulsson ve ark. yaptıkları çalışmalarında, 100 mg/kg akrilamidi fare ve Sprague Dawley cinsi sıçanlara i.p. olarak uyguladıktan sonra farelerin dolaşım kanında, sıçanların da kemik iliğinde mikronükleus oluşum sıklığını incelemişlerdir. Araştırma sonucunda farelerde mikronükleus sıklığında artış gözlerken, sıçanların kemik iliğinde akrilamidin mikronükleus sıklığını etkilemediğini tespit etmişlerdir (Paulsson ve ark., 2002).

Abramsson-Zetterberg uygulanan akrilamidin bir seri düşük dozunun fare periferel kanında mikronükleus testi ile etkisini incelemiş ve deneylerde kontrole kıyasla uygulanan tüm dozlarda mikronükleuslu eritrositlerin sıklığında belirgin bir artış gözlemiştir (Abramsson-Zetterberg., 2003).

Yang ve ark. farelere gavaj yolu ile uyguladıkları akrilamidin dolaşım kanında 72.5, 100 ve 145 mg/kg dozlarında mikronükleus sıklığında artış gözlemişlerdir. Bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca sıçan testilerine akrilamidin toksik etkisini araştırmışlardır. Akrilamidin sperm kalitesini etkilediğini ve sperm konsantrasyonunu azalttığını görmüşlerdir. Akrilamidin histopatolojik doku bozukluğuna neden olduğunu bulmuşlardır. Akrilamidin toksik etkisi nedeniyle leydig hücresinin öldüğünü, sperm noksanlıklarının ve çeşitli histopatolojik anormalliklerin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir (Yang ve ark., 2005).

Roy ve ark. streptozotocin ile diabetes oluşturulan ratlarda hiperglisemi ve oksidatif hasara karşı pelargonidinin etkisini incelemişlerdir. Ratlara i.p yolla 3mg/kg dozda

pelargonidin verip oksidatif stres ve hiperglisemi yönünden araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda pelargonidin enjekte edilen ratlarda oksidatif stresin azaldığını ve hipergliseminin önlendiğini rapor etmişlerdir (Roy ve ark., 2008).

Yener ve Dikmenli, Sprague Dawley cinsi erkek ratlara akrilamidin 125-150-175 mg/kg tek oral doz olarak uygulamışlardır. Uygulamadan 48 saat sonra kemik iliği örneklerinde MNPCE oranlarına bakmışlardır. Ratlara gavaj yolu ile tek doz olarak verilen akrilamidin kemik iliği hücrelerinde MNPCE sayısını artırdığını rapor etmişlerdir (Yener ve Dikmenli., 2009).

Padma ve ark. lindan'ın neden olduğu hepatik ve renal toksisiteye karşı gallik asidin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Karaciğer hasarı SGOT, SGPT ve ALP gibi hepatik serumun marker enzimleri ve histopatolojik gözlemlerle değerlendirilmiştir. Böbreklerdeki hasar histopatolojik incelemelerle ve kreatin ve üre gibi serum markerlarıyla gözlenmiştir. Lindan ile uygulama, lipid peroksidasyon seviyesini arttırmıştır. Lindan uygulamasıyla birlikte karaciğer ve böbrek dokularında da histolojik değişiklikler gözlenmiştir. Gallik asitin aynı anda uygulanması, lindanın neden olduğu karaciğer ve böbrekteki değişiklikleri, LPO'da, serumun marker enzim aktivitesindeki düşme ve antioksidan seviyelerinde önemli ölçüdeki artışla önlemiştir. Bu sonuçlar, gallik asitin rat karaciğer ve böbreğindeki lindanın neden olduğu oksidatif hasar üzerine koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir (Padma ve ark., 2011).

Alzahrani, farelerin vücut ve eşey hücrelerinde akrilamidin meydana getirdiği DNA hasarına karşı L-karnitinin koruyucu etkisini araştırmıştır. Fare kemik iliği hücrelerinde, mikronükleus, kromozomal aberasyonuna ve sperm morfolojisi parametreleri incelenmiştir. Fareleri üç gruba ayırarak, oral yolla 10, 20 ve 30 mg/kg akrilamidi uygulamış ve 24 saat sonra fare kemik iliği numunesi olarak kromozomal aberasyon ve mikronükleus oranlarını rapor etmiştir. Diğer taraftan iki L-karnitin grubu oluşturarak 1-2 hafta boyunca oral olarak 100-200 mg/kg 'lık L-karnitin uygulaması yapmıştır. Bu süreler sonunda 10 mg/kg akrilamid uygulamış ve mikronükleus, kromozomal aberasyon ve sperm anomalisi parametrelerine bakmıştır. Araştırmacı yalnızca 10, 20 ve 30 mg/kg akrilamid uyguladığı fare kemik iliği hücrelerinde doza bağlı olarak hem mikronükleus hemde kromozomal aberasyonlarda artış saptamıştır. Diğer taraftan L-karnitin verilmiş gruplarda, akrilamid verilen ve kontrol gruplarına göre mikronükleus ve kromozomal aberasyon oranlarında bir azalma meydana geldiğini gözlemiştir. Ayrıca akrilamid verilen gruplarda, morfolojik olarak sperm anomalisi artarken, L-karnitin ile birlikte uygulanan akrilamid gruplarında sperm anomalilerinde azalma kaydedilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ışığı altında,

akrilamidin mutajenitesine karşı L-karnitinin koruyucu etkisinin olduğunu anlaşılmaktadır (Alzahrani., 2011).

Sonuç olarak, değişik dozlarda akrilamid uygulanan farelerin, kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyon sayısı ve mikronükleus oluşumunda artış, mitotik indekste ise düşüş yaptığı ve akrilamidin özellikle yüksek dozlarda DNA kırıklarına sebep olduğu söylenebilir. Çalışmada uygulanan pelargonidin dozlarının akrilamidin genotoksisitesini fazla önlemediği, gallik asit uygulanan dozların ise genotoksisiteyi önlediği ve bu nedenle gallik asitin akrilamidin oluşturduğu genotoksisiteyi azaltmada kullanılabileceği ileri sürülebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Doktora Tez Projesi olarak desteklenmiştir (Doktora tezinin bir bölümüdür) (Proje Numarası: 2010-VF-47). Bu çalışmada bana yardımını esirgemeyerek, laboratuvar imkânları sağlayan, sayın Prof. Dr. Süleyman GÜL'e ve maddi destek sağlayan KAÜ BAP'a teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Abramsson-Zetterberg L. (2003). The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Journal of Mutation Research*, 535, 215-222.
- Adler I. D., Schmid T. E., Baumgartner A. (2002). Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the presented data base. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 504, 173-182.
- Aksu P, Gül S, Ozkan O, Nur G, Kaya Ö.T.(2008). Evaluation of the Acute Toxicity and Genotoxicity of NaOCl on Blackbrow Bleak (*Acanthalburnus microlepis*, De Filippi 1863). *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(3), 298-302.
- Alzahrani H.A.S. (2011). Protective effect of l-carnitine against acrylamide-induced DNA damage in somatic and germ cells of mice. *Journal of Biological Sciences*, 18 (1), 29-36.
- Anderson D. (1988). Human biomonitoring. *Journal Mutation Research*, 204, 353-541.
- Besaratinia A., Pfeifer GP. (2005). DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Journal Mutation Research*, 580, 31-40.
- Bianchini F., Vainio H. (2001). Allium vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer. *Environmental Health Perspectives*, 109 (9), 893-902.
- Burdurlu H.S., Karadeniz F. (2006). Gıdalarda akrilamid oluşumu ve önemi. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*. 24-26 Mayıs, Bolu.
- Cao J., Beisker W., Nüsse M., Adler I.D. (1993). Flow cytometric detection of micronuclei induced by chemicals in poly- and normochromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *Mutagenesis*, 8 (6), 533-541.

- Carrano A.V., Natarajan A.T. (1988). Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. *Journal Mutation Research*, 204, 379-406.
- Claeys W.L., Vleeschouwer K.D., Hendrickx M.E.(2005). Quantifying the formation of carcinogens during food processing acrylamide. *Journal of Food Science and Technology*, 16, 181-193.
- Çelik E., Çelik G.Y. (2007). Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5 (2), 1-6.
- Delazar A., Çelik S., Göktürk R.S., Ünal O., Nahar L., Sarker S.D. (2005). Two acylated flavonoid glycosides from stachys bombycina, and their free radical scavenging activity. *Journal of Pharmazie*, 60 (11), 878-880.
- Dobrzyńska M., Lenarczyk M., Gajewski A.K. (1990). Induction of dominant lethal mutations by combines X-ray-acrylamide treatment in male mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 232 (2), 209-215.
- Fenech M., Crott W.J. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Journal Mutation Research*, 504, 131-136.
- Gul S, Nur G, Kaya O.T, Kamber U, Gurgegin B.(2007). Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Orthias angorae* (Steindachner, 1897) exposed to malathion. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16 (5), 472-476.
- Hagmar L., Brogger A., Hansteen I.L., Heim S., Högstedt B., Knudaen L., Lambert B., Linnainmaa K., Mitelman F., Nordenson I., Reuterwall C., Salomaa S., Skerfving S., Sorsa M. (1994). Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Journal of Cancer Research*, 54, 2919-2922.
- Háznagy-Radnai E., Czıgıe S., Zupkó I., Falkay G., and Máthe I. (2006). Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six stachys species. *Fitoterapia*, 77 (8), 521-524.
- Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparys P., Mac Gregor J.T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Journal of Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18, 277-291.
- Hollman P.C.H., Hertog M.G.L., Katan M.B. (1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Journal Food Chemistry*, 57, 43-46.
- IARC (1997). (International Agency for Research on Cancer) : IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 60: Some Industrial Chemicals, Geneva, Switzerland. 389-433.
- Khanum F., Anilakumar KR., Viswanathan KR. (2004). Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (6), 479-488.
- Kukić J., Petrović S., Niketic M. (2006). Antioxidant activity of four endemic stachys taxa. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (4), 725-729.
- LoPachin RM., Canady RA. (2004). Acrylamide toxicities and food safety: Session IV Summary and Research Needs. *NeuroToxicology*, 25, 507-509.
- Matkowski A., Piotrowska M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77, 346-353.

- Mei N., Hu J., Churchwell M.I., Guo L., Moore M.M., Doerge D.R., Chen T. (2008). Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 628-636.
- Mottram D.S., Wedzicha B.L., Dodson A.T. (2002). Acrylamide is formed in the maillard reaction. *Nature*, 419, 448-449.
- Okur Ö.D., Seydim Z.G. (2004). Gıdalarda ısıtma işlemi sonucunda oluşan kanserojen ve mutajen maddeler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8 (3), 80-85.
- Padma V.V., Sowmya P., Arun Felix T., Baskaran R., Poornima P. (2011). Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (4): 991-998.
- Paulsson B., Grawe J., Törnqvist, M. (2002). Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 516 (1-2), 101-111.
- Preston R.J., Dean B.J., Galloway S., Holden H., McFee A. F., Shelby M. (1987). Mammalian in vivo cytogenetic assays Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Journal Mutation Research*. 189, 157-165.
- Roy M., Sen S., Chakraborti A.S. (2008). Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: Implication for glycation-induced hemoglobin modification. *Journal of Life Sciences*, 82, (21-22), 1102-1110.
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Journal Mutation Research*, 31, 9-15.
- Sowjanya B.L., Devi K.R., Madhavi D. (2009). Modulatory effects of garlic extract against the cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocytes in vitro. *Journal of Environmental Biology*, 30 (5), 663-666.
- Stadler R.H., Blank I., Varga N., Robert F., Hau J., Guy, P.A., Robert M.C., Riediker S. (2002). Acrylamide from maillard reaction products. *Nature*, 419, 449-450.
- Titenko-Holland N., Ahlborn T., Lowe X., Shang N., Smith M.T., Wyrobek A.J. (1998). Micronuclei and developmental abnormalities in 4-day Mouse embryos after paternal treatment with acrylamide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31, 206-217.
- Tucker J.D., Auletta A., Cimino M.C., Dearfield K.L., Jacobsonkram D., Tice R.R., Carrano A.V. (1993). Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. *Journal Mutation Research*, 297, 101-180.
- Von Mühlendahl K.E., Otto M. (2003). Acrylamide: more than just another food toxicant. *Journal of Pediatrics*, 162, 447-448.
- Yang H.J., Lee S.H., Jin Y., Choi J.H., Han C.H., Lee M.H. (2005). Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *Journal of Veterinary Science*, 6 (2), 103-109.
- Yener Y., Dikmenli M. (2009). Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (8), 2120-2123.