



**PİNEALEKTOMİLİ RATLARIN BEYİN
DOKUSUNDA AKRİLAMİD İLE OLUŞTURULAN
NÖROTOKSİSİTE ÜZERİNE EKZOJEN
MELATONİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yasemin BİÇER

**2022
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ**

**PİNEALEKTOMİLİ RATLARIN BEYİN DOKUSUNDA AKRİLAMİD İLE
OLUŞTURULAN NÖROTOKSİSİTE ÜZERİNE EKZOJEN MELATONİNİN
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yasemin BİÇER

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ**

**KARABÜK
Haziran 2022**

Yasemin BİÇER tarafından hazırlanan “PİNEALEKTOMİLİ RATLARIN BEYİN DOKUSUNDA AKRİLAMİD İLE OLUŞTURULAN NÖROTOKSİSİTE ÜZERİNE EKZOJEN MELATONİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ

.....

Tez Danışmanı, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 10/06/2022

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Hafize UZUN (İAÜ)

.....

Üye : Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ (KBÜ)

.....

Üye : Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN (KBÜ)

.....

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Hasan SOLMAZ

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Yasemin BİÇER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PİNEALEKTOMİLİ RATLARIN BEYİN DOKUSUNDA AKRİLAMİD İLE OLUŞTURULAN NÖROTOKSİSİTE ÜZERİNE EKZOJEN MELATONİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yasemin BİÇER

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ

Haziran 2022, 99 sayfa

Akrilamid oda sıcaklığında, kokusuz, beyaz, katı kristal bir yapıya sahiptir. Suda çözünürlüğü yüksek olan, polar çözücülerde iyi çözünürken, polar olmayan çözücülerde ise çok az çözünen kimyasal bir maddedir. Doğada serbest olarak bulunmayıp kimyasal yollarla sentezlenir. Akrilamid, karbonhidrat açısından zengin gıdaların yüksek sıcaklıklarda veya diğer termal işlemlerde hazırlanması nedeniyle oluşan toksik bir kimyasal kanserojendir.

Akrilamid toksik kimyasal bir madde olması sebebiyle reproduktif sistemi etkilemekle birlikte ayrıca genotoksik, karsinojenik, ve nörotoksik etkileri bulunmaktadır. Akrilamidin özellikle nörotoksisite alanındaki araştırmaları büyük ilgi görmüştür.

Akrilamid insanlardada olduğu kadar ratlarda da nörolojik bozuklukların ciddiyeti ve semptomların ilerlemesinin doz hızı ve konsantrasyonuna bağlı olarak alınan doz miktarına göre nöropatiye sebep olduğu hatta artan dozlarda ölümcül olduğu görölmüştür.

Memelilerin pineal bezinden salgılanan ve çeşitli sirkadiyen ritimleri düzenleyen melatonin hormonunun, nöroprotektif etki, anti-amiloid etki, antilipidemik, antihipertansif ve antioksidan savunma gibi fizyolojik ve metabolik olaylarda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca serbest radikal süpürücü özelliğinin keşfinden sonra yapılan araştırmalar sonucu radikallerin detoksifikasyonunda işlev gördüğünde oluşan metabolitleri de radikal süpürücü özelliktedir.

Çalışmamızda, ratlara pinealektomi işlemi uygulanarak melatonin yoksunluğu oluşturuldu. Ardından pinealektomi ve Sham pinealektomi uygulanan ratlar, art arda 21 gün boyunca tek başına veya eksojen melatonin (10 mg/kg vücut ağırlığı, i.p.) varlığında akrilamide (25 mg/kg vücut ağırlığı, ağızdan) maruz bırakıldı. Böylelikle Wistar albino ratların beyin/beyincik dokusundaki oksidatif stres belirteçlerini ve serum melatonin düzeylerini ayrıca histopatolojik ve beyin/beyincik dokusunun immünohistokimyasal değerlendirmeleri göz önünde bulundurularak, akrilamid ile kombine edilmiş eksojen melatonin tedavisinin nörotoksisite üzerindeki olası etkilerini ve akrilamid kaynaklı nörotoksisitesinin olası rolünü değerlendirmeyi amaçladık. Bu amaçla altmış rat Sham ve pinealektomi olmak üzere iki ana gruba ayrıldıktan sonra bu iki ana grupta kendi içlerinde üçer gruba ayrıldı; (a) Sham (%0,5 'lik etanol çözeltisinden 21 gün boyunca i.p olarak uygulandı), (b) Sham+AKR grubu (deney süresince 25 mg/kg/gün akrilamid olacak şekilde 21 gün boyunca gavajla verildi), (c) Sham+AKR+MLT (deney süresince akrilamid 25 mg/kg/gün olacak şekilde 21 gün boyunca gavajla, melatonin ise 10 mg/kg/gün olacak şekilde 21 gün boyunca 0,5 ml hacminde i.p olarak uygulandı), (d) PINX grubu (Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra deney süresince 21 gün boyunca i.p olarak %0,5 'lik etanol çözeltisi uygulandı) (e) PINX + AKR grubu (Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra deney süresince 21 gün boyunca i.p olarak %0,5 'lik etanol çözeltisi, 21 gün boyunca 25 mg/kg/gün akrilamid olacak şekilde gavajla uygulandı), (f) PINX+AKR+MLT (Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra deney

süresince 21 gün boyunca i.p olarak %0,5 'lik etanol çözeltisi, 21 gün boyunca 25 mg/kg/gün akrilamid olacak şekilde gavajla, melatonin ise 21 gün boyunca 10 mg/kg/gün olacak şekilde uygulandı).

Çalışmamıza göre pinealektomize ratlarda akrilamide maruz kalma sırasında beyin oksidan/antioksidan durumu, inflamatuvar mediatörler ve apoptoz değişiklikleri, pinealektomize olmayan ratlardan daha fazlaydı. Ayrıca, akrilamid uygulamasından sonra pinealektomize ratların beyin dokusunda histopatolojik değişiklikler daha fazlaydı. Eksojen melatonin tedavisi, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdı ve beyin toplam antioksidan durumunu (TAS) iyileştirdi. Ayrıca melatonin, akrilamide maruz kalmış beyin dokularında lipid peroksidasyonunu, inflamatuvar yolları ve apoptozu baskılamıştır. Ek olarak, akrilamide maruz kalmış ratlara eksojen melatonin müdahalesi, nöronal dokuların yapısını önemli ölçüde onarmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma ilk kez eksojen melatonin tedavisinin antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak, lipid peroksidasyonunu ve inflamasyonu inhibe ederek ve akrilamid uygulamasından sonra pinealektomize ratların beyin dokusundaki histopatolojik değişiklikleri iyileştirerek oksidatif hasarı azaltabileceğini öne sürdü.

Anahtar Sözcükler : Pinealektomi, Melatonin, Nörotoksisite, Lipid Peroksidasyon, İnflamasyon, Akrilamid, Oksidatif Stres

Bilim Kodu : 1090

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF EXOGEN MELATONIN ON ACRYLAMIDE-INDUCED NEUROTOXICITY IN PINEALECTOMIZED RAT BRAIN

Yasemin BİÇER

**Karabük University
Institute of Graduate Programs
Department of Medical Biochemistry**

Thesis Advisor:

Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ

June 2022, 99 pages

Acrylamide is a chemical substance with high solubility in water, soluble well in polar solvents, and very slightly soluble in non-polar solvents. It is not found freely in nature and is synthesized by chemical means. Acrylamide is a toxic chemical carcinogen formed due to the preparation of carbohydrate-rich foods at high temperatures or other thermal processes.

Since acrylamide is a toxic chemical substance, it affects the reproductive system, but also has genotoxic, carcinogenic, and neurotoxic effects. Acrylamide's researches, especially in the field of neurotoxicity, have received great attention. It has been observed that acrylamide causes neuropathy in rats as well as in humans depending

on the dose rate and concentration of the severity of neurological disorders and the progression of symptoms, and even fatal at increasing doses.

The hormone melatonin, which is secreted from the pineal gland of mammals and regulates various circadian rhythms, plays an important role in physiological and metabolic events such as neuroprotective effect, anti-amyloid effect, antilipidemic, antihypertensive and antioxidant defense. In addition, as a result of the research carried out after the discovery of its free radical scavenging feature, its metabolites formed when it functions in the detoxification of radicals also have radical scavenging properties.

In our study, melatonin deprivation was created by applying pinealectomy to rats. Subsequently, rats undergoing pinealectomy and Sham pinealectomy were exposed to acrylamide (25 mg/kg body weight, orally) alone or in the presence of exogenous melatonin (10 mg/kg body weight, i.p.) for 21 consecutive days. Thus, we aimed to evaluate the possible effects of exogenous melatonin combined with acrylamide on neurotoxicity and the possible role of acrylamide-induced neurotoxicity, considering the oxidative stress markers and serum melatonin levels in the brain/cerebellum tissue of Wistar albino rats, as well as the histopathological and immunohistochemical evaluations of the brain/cerebellum tissue. For this purpose, after sixty rats were divided into two main groups as Sham and pinealectomy, they were divided into three groups in each of these two main groups; (a) Sham (0.5% ethanol solution administered i.p. for 21 days), (b) Sham+AKR group (25 mg/kg/day acrylamide was given by gavage for 21 days during the experiment), (c) Sham+AKR+MLT (acrylamide 25 mg/kg/day was administered by gavage for 21 days, melatonin 10 mg/kg/day was administered as ip for 21 days in 0.5 ml volume during the experiment), (d) PINX group (After the pineal gland was removed by pinealactomy, 0.5% ethanol solution was applied i.p for 21 days during the experiment) (e) PINX + AKR group (after the pineal gland was removed by pinealactomy, i.p for 21 days during the experiment) 0.5% ethanol solution was gavaged at 25 mg/kg/day acrylamide for 21 days), (f) PINX+AKR+MLT (After pineal gland removal by pinealactomy, 0% i.p. for 21 days during the experiment. A 5% ethanol solution was administered by gavage at 25 mg/kg/day acrylamide for 21 days, and melatonin at 10 mg/kg/day for 21 days).

According to our study, brain oxidant/antioxidant status, inflammatory mediators, and apoptosis changes during acrylamide exposure were higher in pinealectomized rats than in non-pinealectomized rats. In addition, histopathological changes were more common in the brain tissue of pinealectomized rats after acrylamide administration. Exogenous melatonin treatment increased the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and improved brain total antioxidant status (TAS). In addition, melatonin suppressed lipid peroxidation, inflammatory pathways and apoptosis in acrylamide-exposed brain tissues. In addition, exogenous melatonin intervention in acrylamide-exposed rats significantly restored the structure of neuronal tissues. In conclusion, this study suggested for the first time that exogenous melatonin treatment may reduce oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes, inhibiting lipid peroxidation and inflammation, and improving histopathological changes in the brain tissue of pinealectomized rats after acrylamide administration.

Key Words : Pinealectomy, Melatonin, Neurotoxicity, Lipid Peroxidation, Inflammation, Acrylamide, Oxidative Stress.

Science Code : 1090

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araőtırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıőmamı bilimsel temeller ışığında őekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Deneyimiz esnasında pinealektomi modeli oluşturulmasında Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Mehmet DEMİR, histoloji ve immünohistokimyasal incelemeleri yaparak tezimin tamamlanmasında yardımcı olan Muğla Sıtkı KOÇMAN Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Hülya ELBE' ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalıőmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (KBU BAP-21-YL-045) teşekkür ederim.

Sevgili annem Miyase BİÇER, babam őükrü BİÇER ve kardeőim Neslihan BİÇER'e manevi hiçbir yardımı esirgemedен yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	viii
TEŞEKKÜR	x
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
OMURGALILARDA SINIR SİSTEMİ VE BEYİN GELİŞİMİ.....	4
2.1. BEYİN VE GELİŞİMİ	6
2.2. NÖROTROFİK FAKTÖR.....	8
2.2.1. Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF).....	8
2.3. DOPAMİN	9
BÖLÜM 3	11
AKRİLAMİD	11
3.1. GIDALARDA AKRİLAMİD OLUŞUMU	12
3.1.1. Teori 1: Doğrudan Aminoasitlerden Akrilamid Oluşumu	13
3.1.2. Teori 2: Akrolein Ara Maddesine Dayalı Yollar	13
3.1.3. Teori 3:Akrilik Asit Ara Maddesine Dayalı Yollar	18
3.1.4. Teori 4: Maillard Reaksiyonu Sonucu Akrilamid Eldesi	19
3.2. AKRİLAMİDİN GIDALARDAKİ SINIR DEĞERLERİ.....	20
3.3. GIDALARDAKİ OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	22

	<u>Sayfa</u>
3.4. AKRİLAMİDİN TOKSİK ETKİLERİ.....	23
3.4.1. Akrlamidin Genotoksik ve Karsinojenik Etkileri	23
3.4.2. Akrlamidin Reprodüktif Sistem Üzerine Etkileri	23
3.4.3. Akrlamidin Nörotoksik Etkileri	24
BÖLÜM 4	26
MELATONİN	26
4.1. HORMON OLARAK MELATONİNİN SENTEZİ	28
BÖLÜM 5	33
SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR	33
5.1. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ.....	33
5.2. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	34
5.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	35
5.2.2. Nonenzimatik Antioksidanlar	37
BÖLÜM 6	40
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	40
6.1. GEREÇLER	40
6.1.1. Kimyasallar, Kullanılan Aletler ve Kitler	40
6.2. YÖNTEMLER	41
6.2.1. Akrlamid (AKR) ve Melatonin (MLT) Uygulanması.....	41
6.2.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	41
6.2.3. Deney Hayvanları Protokolü	41
6.2.3.1. Pinealektomi İşlemi	42
6.2.4. Deney Hayvanlarından Numune Alınması.....	43
6.2.5. Biyokimyasal Analizler	43
6.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması	43
6.2.5.2. Doku Oksidatif Hasar Düzeyinin Belirlenmesi.....	44
6.2.6. Beyin/Beyincik dokularında Dopamin Düzeylerinin Belirlenmesi	46
6.2.7. Beyin/Beyincik dokularında BDNF Düzeylerinin Belirlenmesi	46
6.2.8. Beyin/Beyincik dokularında TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi.....	46

	<u>Sayfa</u>
6.2.9. Serum Melatonin Düzeylerinin Belirlenmesi	46
6.2.10. Histopatolojik İnceleme.....	47
6.2.11. İmmünohistokimyasal İnceleme	47
6.2.12. İstatiksel Analiz.....	48
BÖLÜM 7	49
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	49
7.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR	49
7.1.1. Oksidatif Hasar Seviyeleri.....	49
7.1.1.1. Beyin/Beyincik Dokusu MDA ve GSH Seviyeleri	49
7.1.1.2. Beyin/Beyincik Dokusu SOD ve CAT Enzim Aktivite Seviyeleri .	52
7.1.1.3. Beyin/Beyincik Dokusu TAS, TOS ve OSI Seviyeleri	54
7.1.2. Beyin/Beyincik Dokusu TNF- α Seviyeleri	57
7.1.2. Beyin/Beyincik Dokusu BDNF ve Dopamin Seviyeleri.....	57
7.1.4. Serum Melatonin Seviyeleri	60
7.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	62
7.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	67
7.3.1. Kaspaz-3 İmmünoreaktivitesi.....	67
7.4. TARTIŞMA	68
KAYNAKLAR.....	75
EK AÇIKLAMALAR ETİK KURUL İZİNİ	97
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Notokord uzantısının gelişimi	5
Şekil 2.2. Notokord uzantısından ileride ağız ve anüs oluşumunun gösterimi.....	5
Şekil 2.3. Nöral plaktan notokord oluşumu.....	6
Şekil 2.4. Beynin kısımları.	7
Şekil 2.5. Beyin hemisferlerinde yer alan loblar	8
Şekil 2.6. Dopamin hormonu.....	9
Şekil 3.1. Akrilamidin açık formülü	11
Şekil 3.2. Gıdalarda akrilamidin oluşum yolları.....	13
Şekil 3.3. Alaninden akrilamid oluşumu	14
Şekil 3.4. Asparajin ve glutamin aminoasitinden akrilamid oluşumu	14
Şekil 3.5. Basamak 1: Asparajinlerin α -karbonunun bu reaksiyonda odak noktası olduğunu gösteren tepkime	15
Şekil 3.6. Basamak 2: α -amino grubunun akrilamid oluşumuna katılmadığını gösteren tepkime.....	15
Şekil 3.7. Basamak 3: Asparajindeki amino asit R grubunun pirolitik parçalardan bir araya getirilmek yerine bozulmadan kaldığını gösteren tepkime.....	15
Şekil 3.8. Metiyonin aminoasitinden Strecker bozunması ile akrilamid oluşumu ...	16
Şekil 3.9. Akrolein ve akrilamidin kimyasal yapısı	16
Şekil 3.10. Gliserolün dehidrasyonu ile oluşan akroleinden akrilamid oluşumu	17
Şekil 3.11. Monoglisierolün oksidasyonu ile akrolein oluşumu.....	17
Şekil 3.12. Nişasta'nın parçalanması ile akrolein eldesi	18
Şekil 3.13. Basit aldehyitlerin rekombinasyonu sonucu akrolein eldesi.....	18
Şekil 3.14. Akroleinden akrilamid oluşumu	19
Şekil 3.15. Alanin aminoasitinden akrilik asit oluşumu	19
Şekil 3.16. Akrilamidin Maillard reaksiyonu sonucu muhtemel oluşum aşamaları	20
Şekil 4.1. Epifiz bezi ve bezin konumu.....	26
Şekil 4.2. Melatonin hormonu sentezinin nöral kontrolü	27
Şekil 4.3. Serum melatonin düzeyinin aydınlık/karanlık döngüdeki konsantrasyonları	28
Şekil 4.4. Melatonin hormonunun açık formülü.....	29

Sayfa

Şekil 4.5. Melatonin hormonunun sentez basamakları	30
Şekil 4.6. Melatonin ve onun metabolitleri	31
Şekil 5.1. Başlıca ROT ve RNT'ler	34
Şekil 5.2. Başlıca antioksidanlar ve onların detoksifiye mekanizmaları	35
Şekil 7.1. Beyin/beyin dokusu MDA seviyeleri	50
Şekil 7.2. Beyin/beyin dokusu GSH seviyeleri	51
Şekil 7.3. Beyin ve beyincik dokusuna ait SOD enzim aktivite düzeyleri.....	52
Şekil 7.4. Beyin ve beyincik dokusuna ait CAT enzim aktivite düzeyleri.....	53
Şekil 7.5. Beyin ve beyincik dokusuna ait TAS seviyeleri	54
Şekil 7.6. Beyin ve beyincik dokusuna ait TOS seviyeleri	55
Şekil 7.7. Beyin ve beyincik dokusuna ait OSI seviyeleri	55
Şekil 7.8. Beyin ve beyincik dokusuna ait TNF- α seviyeleri.....	57
Şekil 7.9. Beyin ve beyincik dokusuna ait BDNF seviyeleri	59
Şekil 7.10. Beyin ve beyincik dokusuna ait dopamin seviyeleri	59
Şekil 7.11. Grupların serum melatonin seviyeleri	61
Şekil 7.12. Sham ve PINX gruplarına ait beyin ve beyincik dokuları histopatolojisi	64
Şekil 7.13. Sham+AKR ve PINX+AKR gruplarına ait beyin ve beyincik dokuları histopatolojisi	65
Şekil 7.14. Sham+AKR+MLT ve PINX+AKR+MLT gruplarına ait beyin ve beyincik dokuları histopatolojisi	66
Şekil 7.15. Kaspaz-3 immünoreaktivitesi	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. U.S. FDA'nın yaptığı çalışmadaki bazı gıdaların akrilamid içerikleri...21	
Çizelge 3.2. TÜBİTAK-MAM' ın çeşitli gıdalarda ölçtüğü akrilamid değerleri22	
Çizelge 5.1. Enzimatik antioksidanlar ve katalizlediği reaksiyonlar36	
Çizelge 5.2. Nonenzimatik antioksidanlar ve kimyasal yapıları.38	
Çizelge 7.1. Beyin/beyin dokusu MDA ve GSH seviyelerinin karşılaştırılması51	
Çizelge 7.2. Beyin/beyin dokusu SOD ve CAT enzim aktivitelerinin karşılaştırılması53	
Çizelge 7.3. Beyin/beyin dokusu TAS, TOS seviyeleri56	
Çizelge 7.4. Beyin/beyin dokusu OSI seviyesi56	
Çizelge 7.5. Beyin/beyin dokusu ait TNF α seviyeleri58	
Çizelge 7.6. Beyin ve beyincik dokusuna ait BDNF ve dopamin seviyeleri60	
Çizelge 7.7. Serum melatonin seviyeleri61	
Çizelge 7.8. Beyin/beyincik dokusu histopatolojik hasar skoru63	
Çizelge 7.9. Beyin dokusundaki Kaspaz-3 immünoreaktivitesi.....67	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

Na_2HPO_4	: disodyumdihidrojen fosfat
H_2O_2	: hidrojen peroksit
Na_2EDTA	: disodyum etilendiamin tetraasetik asit
H_3PO_4	: fosforik asit
O_2	: oksijen
O_2^-	: süperoksit radikali
HOCl	: hipokloröz asit
ONOO^-	: peroksinitrit radikali
$\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$: akrilamid
c3OHM	: siklik-3-hidroksimelatonin
$\text{OH}\cdot$: hidroksil radikali
$\text{NO}\cdot$: nitrik oksit radikali
$\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$: peroksil radikali

KISALTMALAR

- AKR : Akrilamid
MDA : Malondialdehit
TAS : Total Antioksidan Seviyesi
TOS : Total Oksidan Seviyesi
OSI : Oksidatif Stres İndeksi
GSH : Redükte Glutasyon
SOD : Süperoksit Dismutaz
CAT : Katalaz
TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü- α
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
GR : Glutasyon Redüktaz
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
GST : Glutasyon-S-Transferaz
DAG : Diaçilgliserol
DHAP : Dihidroksiaseton Fosfat
GP_x : Glutasyon Peroksidaz
PKC : Protein kinaz C
eNOS : İndüklenmiş Nitrik Oksit Sentaz
NO : Nitrik Oksit
RAAS : Renin-Anjiotensin-Aldosteron Sistemi
CVO : Sirkumventriküler Organ
SCN : Süprakiazmatik nucleus
MRGC: Melanopsin İçeren Retinal Ganglion Hücreler
RHT : Retinohipotalamik Yol
PVN : Paraventriküler Nükleus
IMCC : İntermediolateral Hücre Kolonu
SCG : Sempatik Servikal Ganglion
PG : Pineal Bez

Mel : Melatonin
AA-NAT: Arilalkilamin-N-asetiltransferaz
ASMT : Asetilserotonin-O-metiltransferaz
AFMK: N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin
AMK : N-asetil-metoksikinüramin
BDNF : Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
NGF : Sinir büyüme faktörü
Trk : Tropomiyozin ilgili kinaz
AFA : Arilamin Formamidaz
TBA : Tiyobarbitrik Asit
DTNB : Dithiobis-2 Nitrobenzoik Asit
BSA : Bovine Serum Albumin
SF : Serum Fizyolojik
i.p : İntroperitoneal
NTF : Nötral Tamponlanmış Formalin
NIOSH : Ulusal Sağlık ve Güvenlik Enstitüsü
EFSA : Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı
JIFSAN : Ortak Gıda Güvenliği ve Uygulamalı Beslenme Enstitüsü
FAO : Gıda ve Tarım Örgütü
BM : Birleşmiş Milletler
IARC : Uluslararası Kanseri Araştırma Merkezi
TBA : Tiyobarbitrik Asit
DTNB : Dithiobis-2 Nitrobenzoik Asit
BSA : Bovine Serum Albumin
SF : Serum Fizyolojik
i.p : İntroperitoneal
BUN : Kan Üre Azotu
NBT : Nitro Blue Tetrazolium
NTF : Nötral Tamponlanmış Formalin

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Akrilamid oda sıcaklığında, kokusuz, beyaz, katı kristal bir yapıya sahip olup suda çözünürlüğü yüksektir. Suda iyi çözünmesinin yanı sıra metanol, etanol vs. ortamlarda iyi çözünürken; hektan, heptan gibi ortamlar ise çözünürlük oranı düşer. Akrilamid normal şartlarda doğada kendiliğinden bulunmayıp kimyasal tepkimeler sonucu oluşan ve birçok alanda kullanılan bir kimyasaldır. Monomer ve polimer yapıda olmak üzere iki farklı şekilde bulunur. Monomer formu toksik özellik gösterirken poliakrilamid formu ise nontoksiktir. Monomer formunun omurgalılarda sinir sistemi üzerine zarar verir. Ayrıca karsinojenik, genotoksik ve nörotoksik etkileri de mevcuttur. Polimer formu ise kağıt ve tekstil ürünlerinde, atık su arıtma da, içme suyunun berraklaştırılmasında arıtıcı olarak, plastik üretimi gibi kullanım alanlarına ek olarak baraj temelleri ve tünel inşaatları için derz dolgu maddelerinin formülasyonunda kullanılır. Polimer formu aynı zamanda moleküler biyoloji alanında elektroforez jeli ve kromatografi de de kullanılır [1-3].

Stockholm Üniversitesi araştırmacılarının 2002 yılında yaptığı araştırma sonucunda gıdalarda ilk defa akrilamidin tespit edilip sağlık açısından etkilerinin ortaya konulması ile tüm dünyanın dikkatini çekmiştir. Nisan 2002 yılında yaptıkları basın açıklaması üzerine akrilamidin monomerik formunun karbonhidratça zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta (120 °C ve üzeri) kızartılması veya fırınlanması sonucu kanser oluşturma riskine sahip bir kimyasal madde olarak yüksek miktarda oluştuğunu duyurdular. Bunun üzerine Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi nörolojik ve kanserojenik etkiler gösterdiği için akrilamidi “insanlar açısından potansiyel kanserojen madde” kategorisinde 2A grubunda sınıflandırdılar [4, 5].

Akrilamidin ratlardaki nörotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar da ise hem periferik hem de merkezi sinir sistemleri üzerine etkileri ortaya konmuştur. Örneğin, arka bacak ayak açıklığı, ataksi, iskelet kası zayıflığı, aksonal dejenerasyon, zayıf bacaklar, duyu kaybı, azalmış refleksler ve periferik ekstremite uyuşması gibi semptomlar görülmektedir. Ek olarak, inhalasyon veya deri yoluyla uzun süreli akrilamid maruziyetinin daha şiddetli serebellar disfonksiyon ve nöropati semptomlarına neden olduğu da gösterilmiştir [1-4].

Serbest radikaller ile biyolojik sistemin reaktif ara ürünlerini detoksifiye etme veya oksidatif radikallerin neden olduğu hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak tanımlanır. Serbest radikalle, detoksifiye edilemediği takdirde hücrenin lipid, protein, karbonhidratlara saldırarak oksidatif hasarlar meydana getirirler. Hücreler meydana gelen bu oksidatif hasarı önlemek ve detoksifiye etmek için antioksidan savunma mekanizmalarını kullanırlar. Antioksidan savunma mekanizmaları da birincil ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Birincil antioksidanlar radikal türlerini temizleyebilen zincir kırıcı antioksidanlar, ikincil antioksidanlar ise singlet oksijen söndürücüler, radikal olmayan türler veren peroksit ayrıştırıcılar, metal şelatörler, oksidatif enzim inhibitörleri (örneğin lipooksijenaz) veya ultraviyole absorblayıcılarıdır. Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px)'ler enzimatik antioksidanlardır. Ayrıca bu antioksidanlara ek olarak, tioredoksinler (TRX'ler), peroksiredoksinler (PRX'ler) ve glutatyon transferaz (GST)' da yer alır. C vitamini (askorbik asit), E vitamini (α -tokoferol), β -karoten ve glutatyon (GSH) ise enzimatik olmayan antioksidanları oluşturur [5-9].

Pineal bez sagittal hat üzerinde yer alan, sağlam, çam kozalağı şeklinde, kırmızı-gri renkli, yaklaşık 5-9 mm uzunluğunda ve 1-5 mm genişliğinde olup ortalama 100-180 mg ağırlığındadır. Omurgalılarda sirkadiyen ritimden sorumludur. Sirkadiyen ritim yaklaşık 24 saatlik biyolojik ritimlerdir ve açlık/tokluk, endokrin sistem, uyku/uyanıklık durumu, immün sistem gibi fizyolojik olayları kapsar. Memelilerin pineal bezinden salgılanan ve çeşitli sirkadiyen ritimleri düzenleyen melatonin hormonunun, nöroprotektif etki, anti-amiloid etki, antilipidemik, antihipertansif ve

antioksidan savunma gibi fizyolojik ve metabolik olaylarda önemli rol oynamaktadır. Böylelikle serbest radikal süpürücü özelliğinin keşfinden sonra yapılan araştırmalar sonucu radikallerin detoksifikasyonunda işlev gördüğünde oluşan metabolitleri de radikal süpürücü özelliktedir [10-14].

Bu çalışmada ratlara pinealektomi işlemleri uygulanarak vücutlarında doğal olarak bulunan ve en güçlü antioksidan olan melatoninin endojen yoksunluğunda akrilamid tarafından oluşturulan nörotoksitenin beyin dokusu üzerindeki etkilerine karşın ekzojen melatoninin koruyuculuğunu inceledik. Bu sebeple pinealektomize edilmiş ratlara akrilamid ile oluşturulan nörotoksite üzerine ekzojen melatonin uygulaması sonrası beyin ve beyincik dokularında MDA, GSH, TAS, TOS, OSI, CAT ve SOD incelenerek doku oksidatif hasar düzeyleri analiz edildi. Bunlara ek olarak aynı dokularda TNF- α , BDNF ve Dopamin düzeyleri analiz edildi. Ratların serumlarında melatonin düzeyleri ölçüldü. Ayrıca apoptoz düzeyi immünohistokimyasal olarak Kaspaz-3 boyama ile ortaya konuldu. Beyin ve beyincik dokularında histopatolojik incelemeler ışık mikroskobu ile yapıldı.

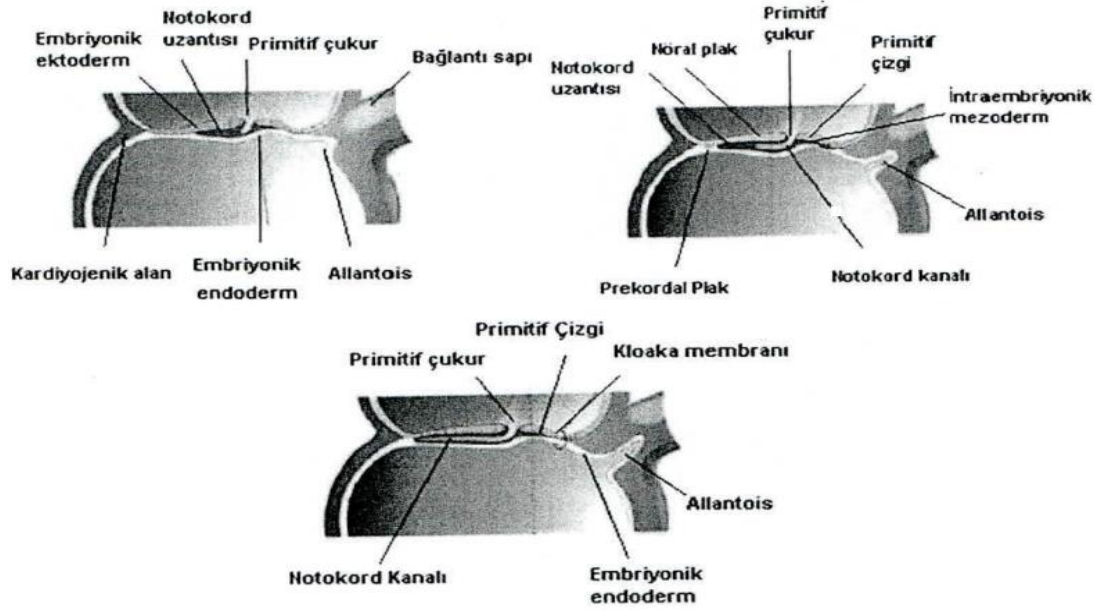
BÖLÜM 2

OMURGALILARDA SİNİR SİSTEMİ VE BEYİN GELİŞİMİ

Sinir sistemi kökenini nöral plaktan alarak notokord ve paraksiyal mezoderm üzerindeki ektoderm tabakasını nöral plağa farklılaşması için uyarır. Nöral katlantılar, nöral tüp ve nöral krista, nöral plaktan gelişen yapılarıdır. Nöral tüp santral sinir sistemine farklılaşırken; nöral krista ise posterior kök ganglionu, kranial sinirlerden V, VII, IX, X. sinirlerin duyu ganglionlarını, otonom ganglionları, Schwann hücrelerini, santral sinir sisteminin meningeal örtüleri olan piameter ve araknoidi oluşturur [15].

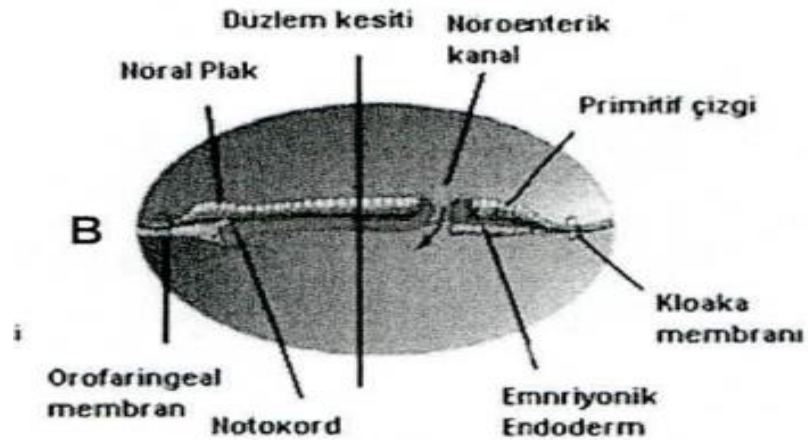
Nörolasyon süreci nöral plak ve nöral tüp oluşumuyla sonuçlanan hücresel ve yapısal farklılaşmayı içerir. Bu süreç gebeliğin üçüncü haftasında başlar ve dördüncü haftasında zirve yapar. Nöral katlantıların birleşmesi kranial ve kaudal yönde her iki uç içinde küçük bir açıklık kalıncaya kadar devam eder. Kranial açıklık 25. günde, kaudal açıklık ise 27. günde kapanır. Nöral kanaldan medulla spinalisin kanalis sentralisini oluştururken; nöral tüpün duvarları kalınlaşarak beyni ve medulla spinalisi oluşturur [16, 17].

Orta çizgide yer alan notokord uzantısı denilen hücresel kordon, mezenşimal hücrelerin bir kısmının primitif düğüm ve çukurdan kraniale doğru göç etmesiyle meydana gelerek notokord kanalını oluşturur (Şekil 2.1) [17, 18].



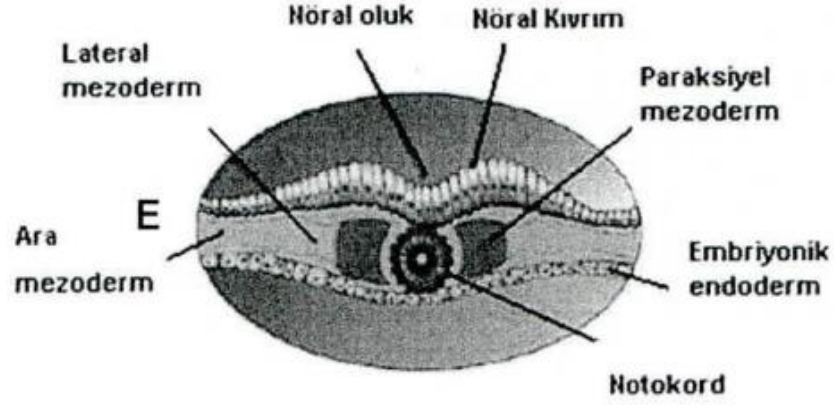
Şekil 2.1. Notokord uzantısının gelişimi [18].

Notokord uzantısı silindirik endodermal hücrelerin oluşturduğu yuvarlak bir alan olan prekordal plağa doğru ilerlerken ektoderm ve endoderm arasından kraniale uzanır. Prekordal plak ise üstündeki ektoderme sıkıca yapışık olmasından dolayı notokord uzantısının daha fazla ilerlemesine izin vermez. Böylelikle ileride ağız boşluğunun gelişeceği orofarengial membranı oluşturur. Primitif çizginin kaudalinde ise dairesel bir alan olan kloaka membranı bulunur ki buradan da ileri de anüs gelişir (Şekil 2.2) [17, 18].



Şekil 2.2. Notokord uzantısından ileride ağız ve anüs oluşumunun gösterimi [18].

Notokord denilen yapı (Şekil 2.3); hücresele bir çubuk olup, embriyonun primordiyal eksenini ve omur cisimlerinin oluşacağı yeri belirler. Embriyoya diklik verirken, kafa ve omurga kemiklerinin gelişimi için önemli rol oynar [17, 18].



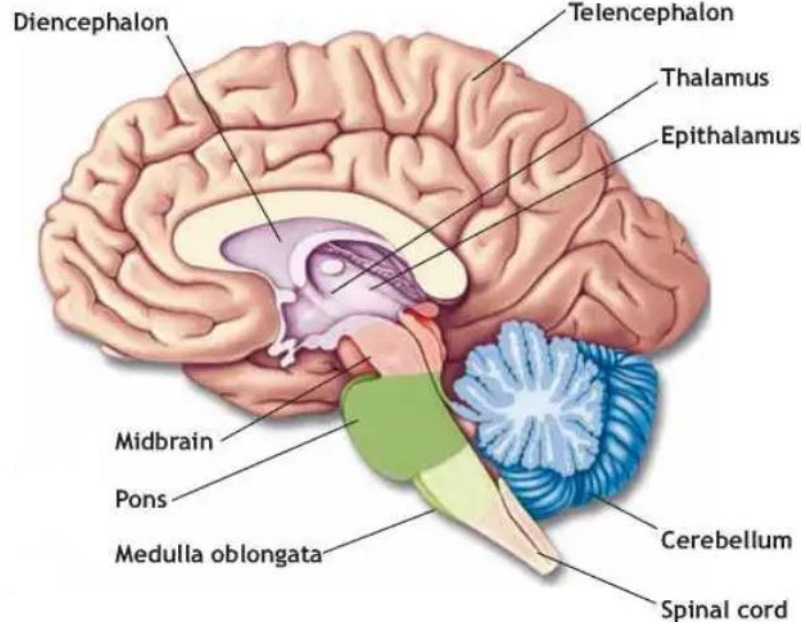
Şekil 2.3. Nöral plaktan notokord oluşumu [18].

2.1. BEYİN VE GELİŞİMİ

Nöral tüp, gebeliğin 3. haftasının sonunda oluşur. Bu, gebeliğin 18 ve 22. günleri arasında meydana gelen nöral plak oluşumu ile başlar. Gebeliğin 23. gününde, nöral plağın her iki tarafında nöral progenitor hücrelerle çevrili iki sırt oluşur. Sırtlar daha sonra yukarı doğru yükselir ve füzyon için hazırlanmak üzere kendi içlerine doğru kıvrılmaya başlar. Füzyondan hemen önce, nöral tüpün ön ucu üç ayrı keseye farklılaşır. Bu keselerin ilki ve en ön kısmı ön beyni oluşturan prosensefalondur. Sonraki, orta beyni oluşturan mezensefalondur. Üçüncü kese, arka beynin öncüsü olan rombensefalondur. 4. haftanın başlamasıyla ise prosensefalon, telesefalon ve diensefalon olmak üzere iki keseye ayrılır. 5. haftada ise rombensefalon da metensefalon ve miyelensefalon olmak üzere iki keseye ayrılır [19, 20].

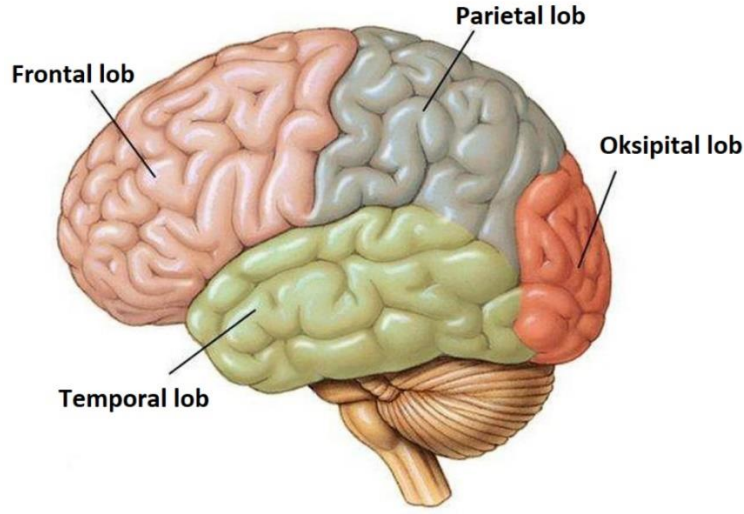
Postembriyonik dönemde erişkin beyninin ağırlığı kişiden kişiye değişebilmekle birlikte ağırlığı ortalama 1,2 kilogram olup %78 su, %10 yağ ve %8 de proteinden oluşmaktadır. Yapışkan, peltamsi, üç katlı zar ile örtülü, iki yarım küreden oluşan, girintili-çıkıntılı yapıya sahip bir organdır [21, 22]. Postembriyonik dönemde beyin

diencephalon, telencephalon, mesencephalon, pons, medulla oblongata ve cerebellum olmak üzere altı kısma ayrılır (Şekil 2.4) [23].



Şekil 2.4. Beynin kısımları [23].

Diencephalon, beyin hemisferleri tarafından örtülmüş olup. epitalamus, metalamus, hipotalamus, talamus ve subtalamus olmak üzere beş bölümden oluşur. Mesencephalon, beynin en küçük parçasıdır ve görme ve işitme refleks merkezlerini oluştururlar. Pons, V, VI, VII, VIII kranial sinir nükleuslarının ve tegmentum pontis'in inen-çıkan yolları içerir. Medulla oblongata, medulla spinalis ve pons arasında yer alırken ventralinde kortikospinal yolları, dorsalinde tuberculum gracile, tuberculum cuneatum ve fossa rhomboidea bulunur. Cerebellum, beynin ikinci büyük kısmıdır. İskelet kaslarının (istemsiz hareket eden) tonusunu kontrol eder. Telencephalon, beynin en geniş kısmı olup iki hemisferden oluşur. Bu iki hemisfer birbirine corpus callosum ile bağlanır. Hemisferlerde yer alan çukurluklar arasında sulcus denilen yarıklar yer alır ki bu sulcusa göre hemisferler frontal, parietal, oksipital ve temporal loblardan oluşur (Şekil 2.5) [24-26].



Şekil 2.5. Beyin hemisferlerinde yer alan loblar [23].

2.2. NÖROTROFİK FAKTÖR

Nörotrofinler, hücre gövdesinden uzak bir mesafede, nörotrofine duyarlı nöronların aksonları ile temas eden periferik dokular veya nöronlar tarafından sentezlenir. Nörotrofin ailesi, sinir sistemi gelişimini, farklılaşması ve işlevini etkileyen polipeptit büyüme faktörleri grubudur [27]. Nörotrofinler genel olarak ortak bir yapıya sahip olup, promotor bölgelerinde yer alan farklı domainler aracılığıyla spesifik reseptörlerine bağlanarak biyolojik yanıtlar oluştururlar [28, 29].

Nörotrofin ailesi üyeleri, sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin 3 (NT3), beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) ve NT4' dir. Bu faktörlerin reseptörlerine bağlanması tropomiyozin ilgili kinaz (TrkA, TrkC ve TrkB) yolunun uyarılmasına sebep olur. Nörotrofinler çeşitli sebeplerle azalma gösterdiklerinde beyinde etkili oldukları nöronların ölümüyle sonuçlanacak biyolojik olaylar zincirini tetiklediği bilinir [30-32].

2.2.1. Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF)

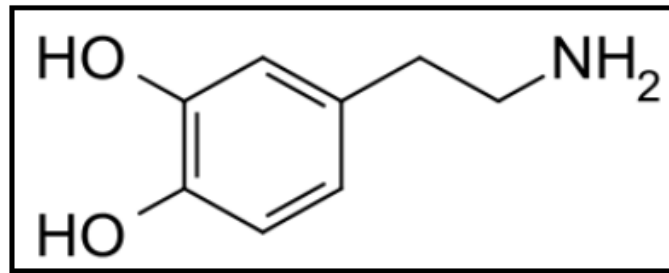
Beyin türevli nörotrofik faktör, sinir sisteminde yer alan nöronların yaşamasını, büyümesini ve fonksiyonlarını düzenler. Sinaptik plastisitede sağlarken, sinapsların akson ve dendrit dallanmalarını düzenleyen bir nörotrofindir [33].

BDNF temelde santral sinir sisteminde nöronların gelişmesine, yenilenmesine yardımcı olurken nörotransmitterlerin rol aldıkları önemli sinir yollarının yapısal olarak normal yapıda olmalarını ve işlevlerini sağlıklı bir şekilde sürdürmelerine katkı sağlamaktadır. Öğrenme ve hafızada mRNA ekspresyonunu artırırken, hücresel uyarılabilirliği artırarak davranış ve öğrenme ilgili fonksiyonları ve akabindeki sinaptik değişiklikleri etkilemektedir. Fizyolojik ve patolojik durumlarda BDNF miktarı değişmektedir [34-37].

BDNF'nin mRNA ve protein düzeyleri, hipokampus, serebellum, amigdala, striatum, neokorteks, hipotalamus, talamusta tespit edilmiştir. Ayrıca bulbus olfaktoriusta, adrenerjik beyin sapı çekirdeklerinde ve de medulla spinaliste BDNF mRNA'sı belirlenmiştir. Yine kalpte, böbrekte, akciğer ve mesane dokularında, dalakta ve düz kas hücrelerinde de tespit edilmiştir [38-40].

2.3. DOPAMİN

Dopamin (3-hidroksitiramin), santral sinir sistemindeki ana katekolamindir (Şekil 2.6). Tirozin amino asitinin bir metaboliti olup 1957 yılında İsveçli bilim adamı Arvid Carlsson tarafından yaklaşık 65 yıl önce keşfedilmiştir [41].



Şekil 2.6. Dopamin hormonu [41].

Memeli beyninde dört dopaminerjik yolak tanımlanmış olup bunlar nigrostriatal, mezolimbik, mezokortikal ve tuberoinfundibularlardır. Bu yollardaki yer alan dopaminerjik nöronlar santral sinir sistemi fonksiyonlarında önemli rol alan hareket, beslenme, dikkat, ödül, uyku, hafıza ve öğrenme gibi işlevleri vardır. Bunların yanı sıra dopaminin önemli fizyolojik süreçlerde de rol aldığı bilinmektedir. Bu fizyolojik süreçlere ise koku alma, bağışıklık sistemi, hormonal düzenleme, böbrek

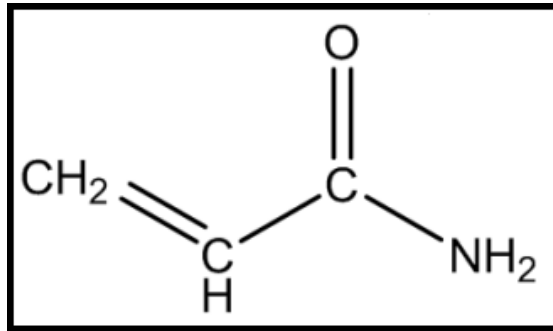
fonksiyonlarının düzenlenmesi ve kardiyovasküler düzenlemeyi örnek verebiliriz [42-44].

BÖLÜM 3

AKRİLAMİD

Akrilamid, 1893 yılında Christian Moureau tarafından kimyasal bir bileşik olarak bulunmuştur. Yapısında reaktif etilenik çift bağ ve amid grubu içerir. Tabiatda doğal olarak bulunmayıp kimyasal olarak sentezlenen toksik bir maddedir. [45].

Akrilamid oda sıcaklığında kokusuz, beyaz, katı, kristal bir yapıya sahiptir. Suda çözünürlüğü yüksektir (25 °C’ de 204 g/100 ml). Hem zayıf bazik hem de zayıf asidik özelliğe sahiptir. Akrilamid suda oldukça iyi çözünmesinin yanı sıra metanol, etanol ve aseton gibi ortamlarda iyi çözünürken; hekzan ve heptan gibi ortamlarda ise çözünürlük oranı düşer. Kapalı kimyasal formülü C₃H₅NO’ dur. Molekül ağırlığı 71.08 g/mol’ dür. 84,5 °C’de erirken, (25 mmHg) 125 °C’de kaynar. Atmosfer basıncında ise kaynama noktası 192,6 °C’ ye kadar çıkmaktadır. Akrilamidin açık formülü aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1) [46, 47].



Şekil 3.1. Akrilamidin açık formülü [46].

Akrilamid, monomer ve polimer yapıda üzere iki farklı şekilde bulunur. Monomer formu toksik özellik gösterirken, poliakrilamid formu ise nontoksiktir. Monomerik formu omurgalılarda sinir sistemine zarar verir. Ayrıca memeli hayvanlarda kanserojen ve mutajen etki gösterdiği belirtilmektedir. Monomer formunun

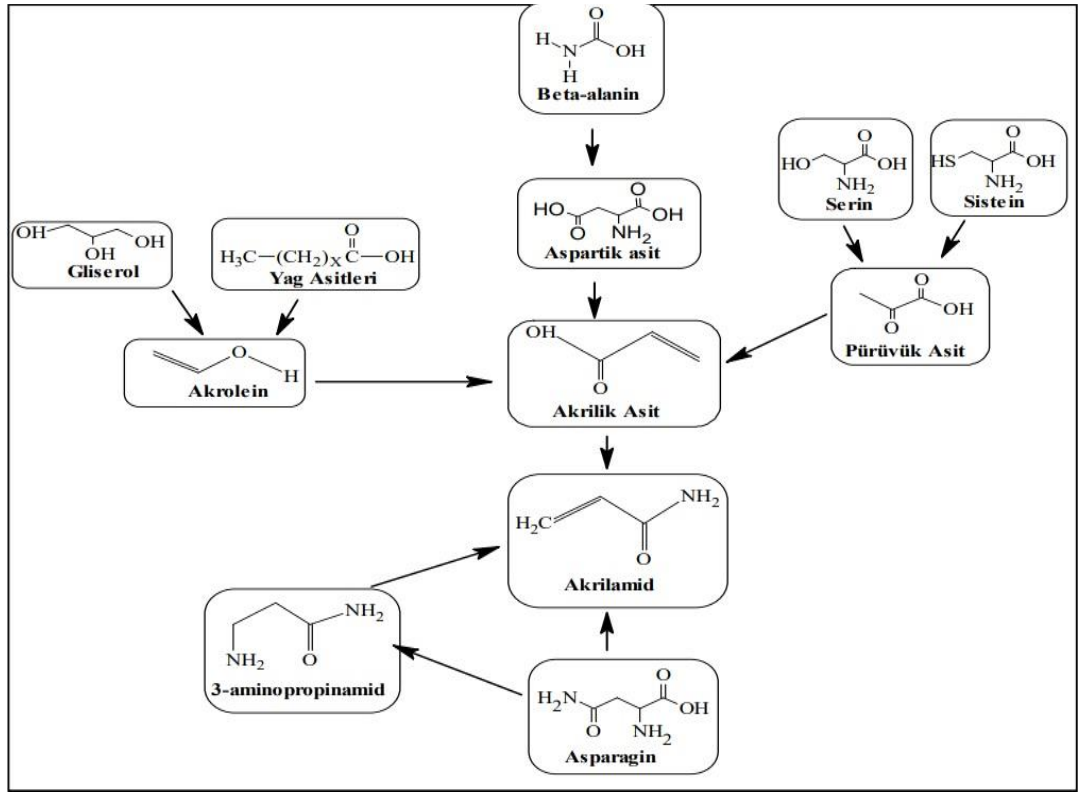
nörotoksik, karsinojenik, ve genotoksik etkileri vardır. Polimer (poliakrilamid) formu ise kağıt ve tekstil ürünlerinde, atık su arıtımında, içme suyunun berraklaştırılmasında pıhtılaştırıcı olarak, plastik üretimi gibi pek çok kullanım alanı bulurken, baraj temelleri ve tünel inşaatları için derz dolgu maddelerinin formülasyonunda da kullanılır. Poliakrilamid ayrıca moleküler biyoloji alanında araştırma laboratuvarlarında elektroforez jeli ve kromatografide kullanıldığı gibi proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında da kullanılmaktadır [48-51].

2002 yılında Tareke ve arkadaşlarını yaptıkları çalışma sonucunda gıda içeriklerinde akrilamidin varlığının bulunması ve zararlı etkilerinin sağlığı olumsuz yönde etkilediğini bulmaları sonucu tüm dünyanın dikkatini çekmişlerdir. İsveç Ulusal Gıda Komisyonu (NFA) ve Stockholm Üniversitesi'nin yürüttüğü araştırmalar sonucu Nisan 2002' de bir basın açıklaması yaparak akrilamidin monomerik formunun "karbonhidratça zengin" gıdaların yüksek sıcaklık (120 °C ve üzeri) uygulanarak kızartılması veya fırınlanması işlemleri sonucunda kansere sebep olma riskini içeren kimyasal bir madde olarak yüksek oranlarda oluştuğunu ortaklaşa duyurdular. İsveçli bilim adamlarının bu açıklamasının ardından dikkatlerin iyice akrilamide yönelmesiyle birlikte Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC) nörotoksik ve kanserojenik etkilere neden olduğu için akrilamidi "insanlar için potansiyel kanserojen madde" kapsamında 2A sınıfı olarak nitelendirmiştir. Akrilamidin bu kategoride yer almasının ardından Dünya Sağlık Örgütü (WHO) başta olmak üzere Birleşmiş Milletler (BM), Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Ortak Gıda Güvenliği ve Uygulamalı Beslenme Enstitüsü (JIFSAN) ve Ulusal Sağlık ve Güvenlik Enstitüsü (NIOSH) gibi kuruluşlar bu konuyu gündemlerine almışlardır. Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı (EFSA) Haziran 2015' te gıda içeriklerindeki akrilamidin belirli kanser türlerini geliştirme riskini tüm yaş gruplarında arttırdığını onaylamıştır [52-56].

3.1. GIDALARDA AKRİLAMİD OLUŞUMU

Akrilamid doğal olarak gıdalarda bulunmayıp yüksek sıcaklıklardaki ısı işlem sonucu oluşan toksik bir madde olup birden fazla mekanizma sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple de gıdalarda akrilamid oluşumunu açıklayan birden fazla teori mevcuttur. Akrilamid oluşumuna giden olası yollardan biri amonyağın akrolein veya akroleinin

oksidasyon ürünü olan akrilik asit ile reaksiyonudur. Akrolein ve akrilik asit basit şekerlerin enzimatik olmayan esmerleşmeye uğraması sonucu oluşabileceği gibi kızartma yağlarında serbest kalan triaçilgliserollerden de oluşabilir. Bir başka olası mekanizma ise alanin ve aspartik asit aminoasitlerinin ayrışması sonucu akrilik asitin oluşmasıyla akrilamid sentezlenebilir. Yine bir başka olası mekanizmalardan biri ise asparajin aminoasiti ile indirgen şekerlerin reaksiyona girmesi sonucu akrilamid oluşabilir [57, 58]. Şekil 3.2’ de gıdalarda akrilamidin oluşum tüm yolları verilmiştir [59].



Şekil 3.2. Gıdalarda akrilamidin oluşum yolları [59].

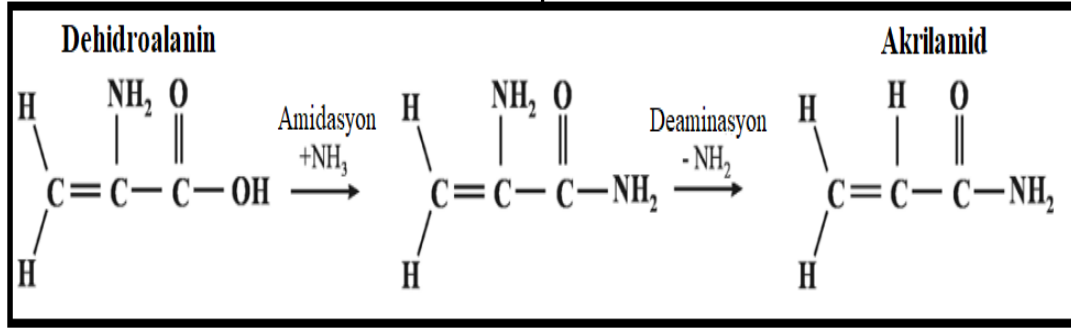
Gıdalarda akrilamidin oluşum mekanizmasını açıklamak için dört teori öne sürülmüştür. Bu teoriler ise aşağıda sırasıyla verilmiştir:

- Teori 1: Doğrudan aminoasitlerden akrilamid oluşumu
- Teori 2: Akrolein ara maddesine dayalı yollar
- Teori 3: Akrilik asit ara maddesine dayalı yollar
- Teori 4: Maillard reaksiyonu sonucu akrilamid eldesidir.

3.1.1. Teori 1: Doğrudan Aminoasitlerden Akrilamid Oluşumu

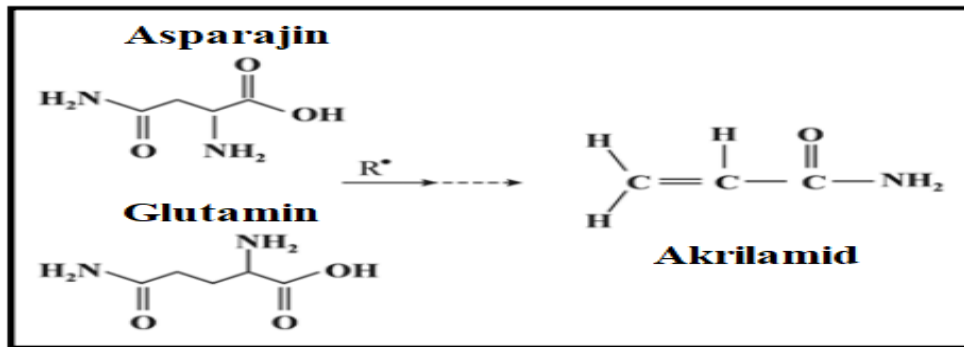
Akrilamid oluşumunda gerekli olan öncüllerden birisi amino asitler ve proteinlerin yapısında bulunan α -amino grubundaki azottur. Bu sebeple de alanin, asparajin, glutamin ve metiyonin amino asitlerine dayalı birkaç akrilamid mekanizması önerilmiştir.

Alanin aminoasitinden şekilde gösterildiği gibi doğrudan akrilamid sentezlenebilir (Şekil 3.3) [60].



Şekil 3.3. Alaninden akrilamid oluşumu [60].

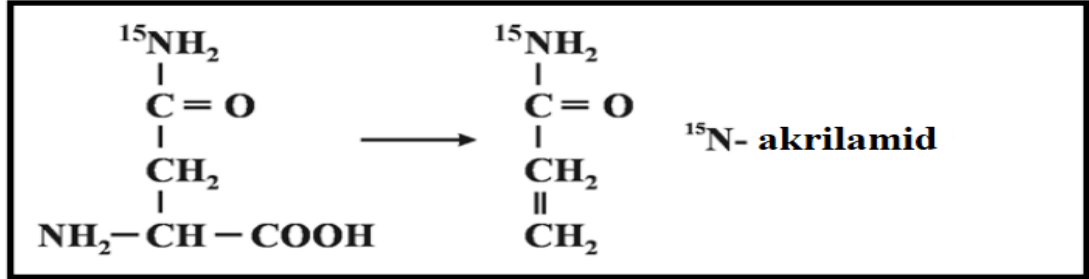
Asparajin ve glutamin aminoasitlerinden bir dizi reaksiyon sonucunda şekilde gösterildiği akrilamid oluşturulabilir (Şekil 3.4) [46, 60].



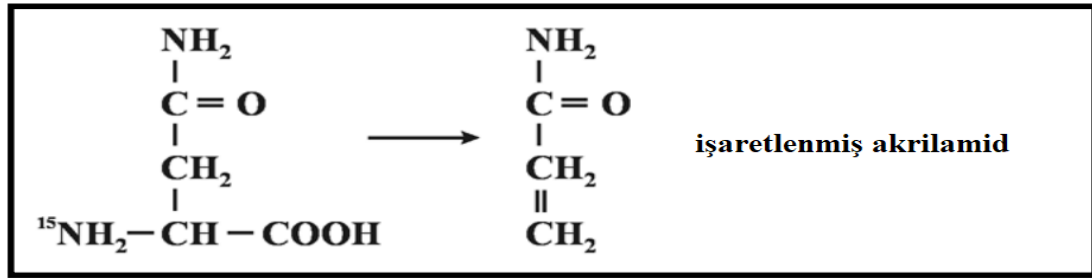
Şekil 3.4. Asparajin ve glutamin aminoasitinden akrilamid oluşumu [46, 60].

Sanders ve arkadaşları aşağıda gösterilen şekillerde yer alan kararlı izotoplar (^{13}C ve ^{15}N) ile reaksiyon yolunun haritalanması gösterilmiş olup asparajin aminoasitini

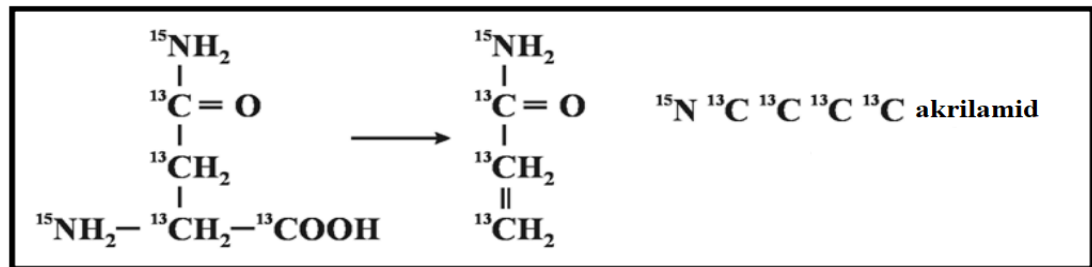
kullanarak gerçekleştirdikleri reaksiyonlarda, reaksiyon yollarını haritalamak için üç basamaklı bir doğrulama deneyi yapmışlardır (Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7) [61].



Şekil 3.5. Basamak 1: Asparajinlerin α -karbonunun bu reaksiyonda odak noktası olduğunu gösteren tepkime [61].

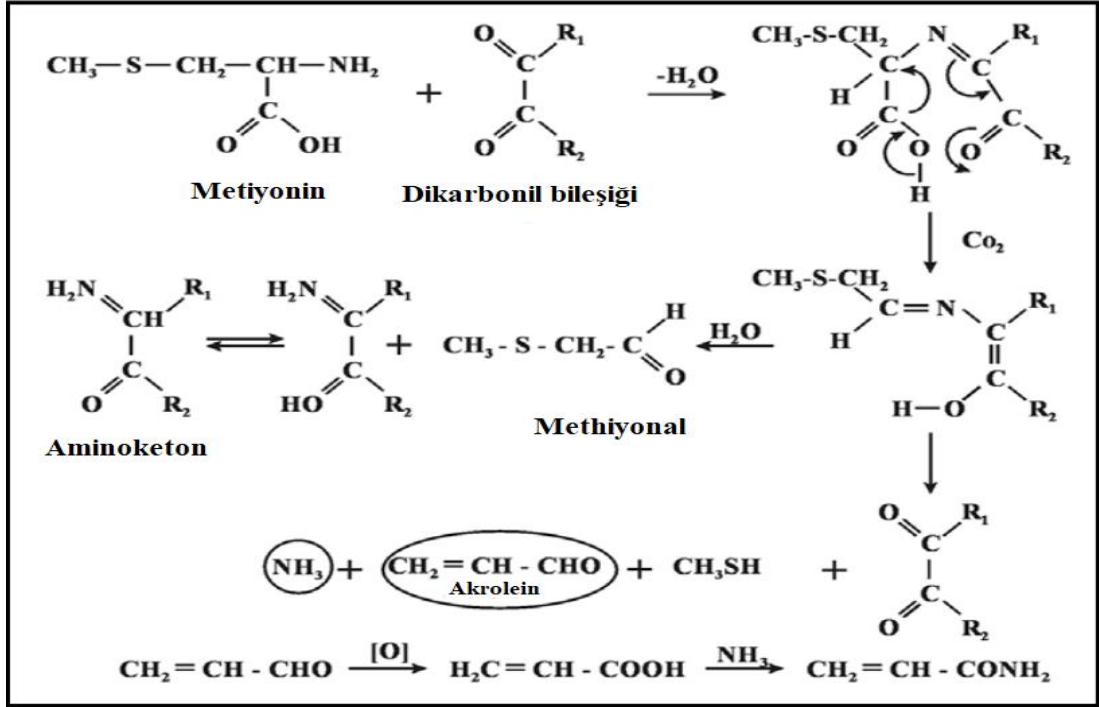


Şekil 3.6. Basamak 2: α -amino grubunun akrilamid oluşumuna katılmadığını gösteren tepkime [61].



Şekil 3.7. Basamak 3: Asparajindeki amino asit R grubunun pirolitik parçalardan bir araya getirilmek yerine bozulmadan kaldığını gösteren tepkime [61].

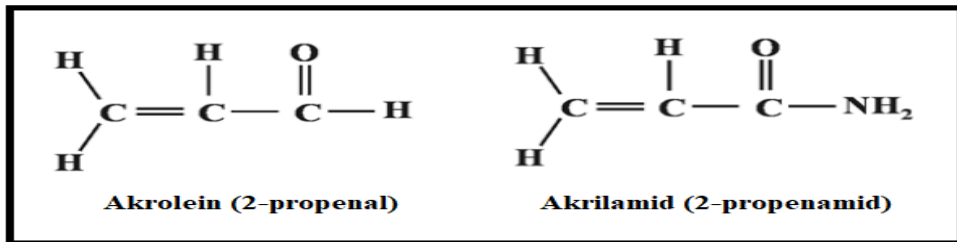
Metiyonin aminoasitinin Strecker bozunmasına uğraması sonucu Şekil 3.8’ te gösterildiği gibi de akrilamid sentzlenebilir [60, 62].



Şekil 3.8. Metiyonin aminoasitinden Strecker bozunması ile akrilamid oluşumu [62].

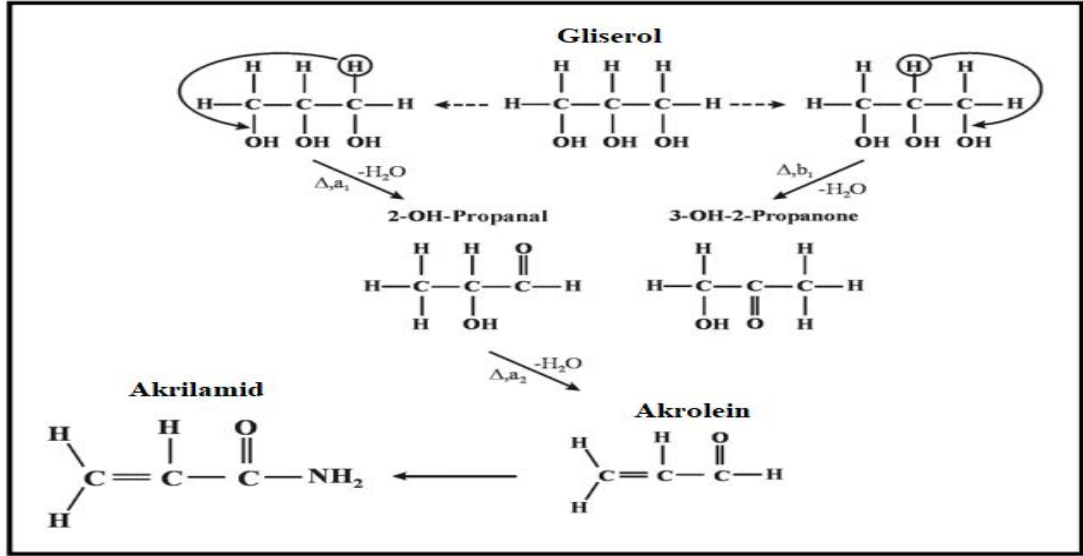
3.1.2. Teori 2: Akrolein ara maddesine dayalı yollar

Akrolein, akrilamidin öncü maddesi olup lipidlerin, aminositlerin ve proteinlerin bozunmasıyla meydana gelebilir. Akrolein ayrıca okside olarak akrilamidin diğer öncü maddesi olan akrilik aside de dönüşebilir. Şekil 3.9’ de gösterildiği gibi akrolein ve akrilamidin kimyasal yapıları birbirine çok benzemektedir [63, 64].

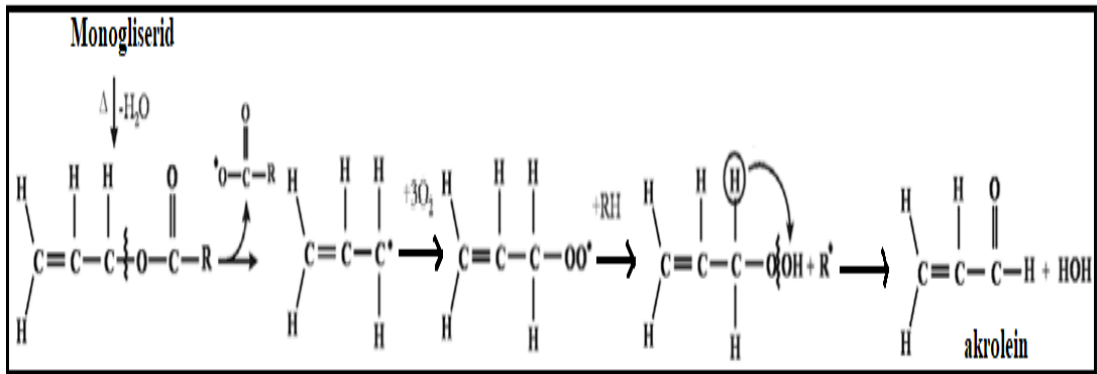


Şekil 3.9. Akrolein ve akrilamidin kimyasal yapısı [63].

Akrolein oluşumundaki potansiyel yollardan biri Şekil 3.10’ de gösterilen gliserol dehidrasyonu ve Şekil 3.11’ da gösterilen monogliseridin oksidasyonu sonucu gerçekleşen lipidlerin bozunması yoludur [60, 65].

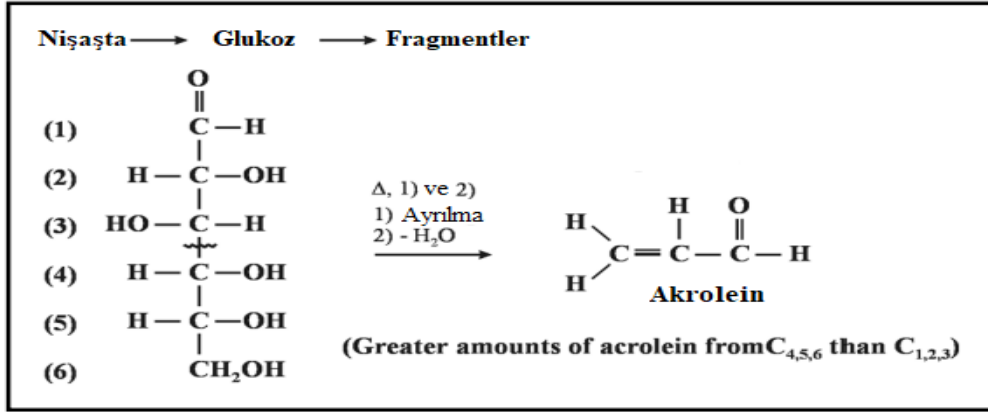


Şekil 3.10. Gliserolün dehidrasyonu ile oluşan akroleinden akrilamid oluşumu [60].

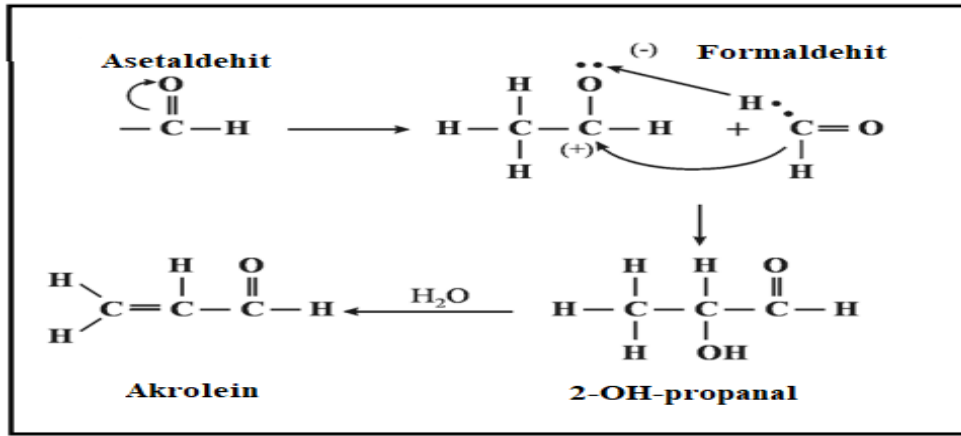


Şekil 3.11. Monoglisericidün oksidasyonu ile akrolein oluşumu [60].

Diğer bir potansiyel yol ise nişastanın parçalanması ve yağların, proteinlerin, karbonhidratların pirolizi ve oksidasyonu sonucu yan ürün olarak ortaya çıkan asetaldehit ve formaldehitten de akrolein elde edilebilir. Bu elde edilme yolları aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13) [60, 66].



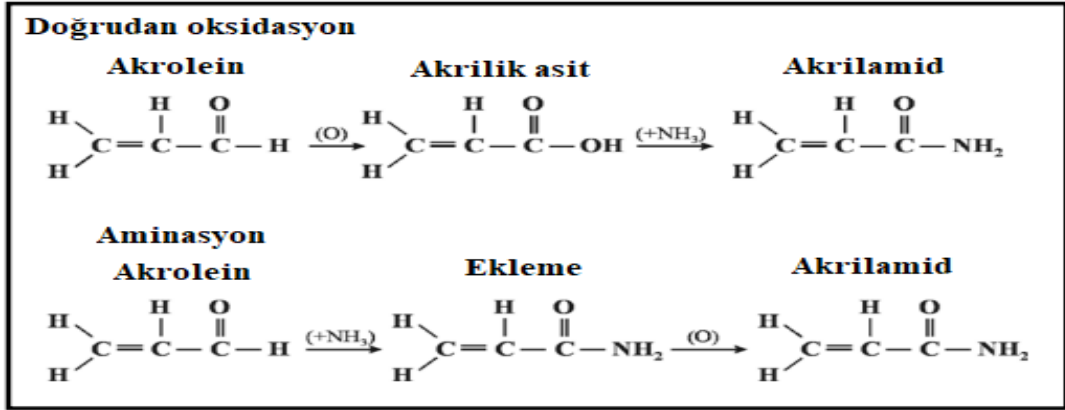
Şekil 3.12. Nişastanın parçalanması ile akrolein eldesi [60].



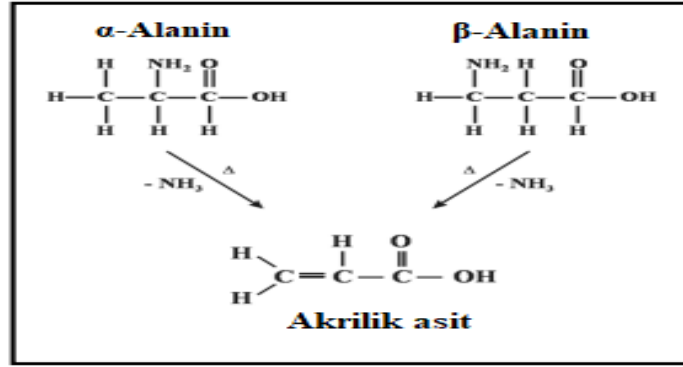
Şekil 3.13. Basit aldehitlerin rekombinasyonu sonucu akrolein eldesi [60].

3.1.3. Teori 3: Akrilik Asit Ara Maddesine Dayalı Yollar

Akroleinden akrilamid sentezi sırasında iki mekanizma önerilmiştir. Bunlardan biri Şekil 3.14’da gösterilen akroleinin akrilik asit ara maddesi yoluyla doğrudan oksidasyonu iken bir diğeri ise akroleinden akrilik asit oluşmaksızın aminasyon yoluyla akrilamid elde edilmesidir. Bununla birlikte Şekil 3.15’ de ki gibi doğrudan alanin aminoasitinden de akrilik asit oluşumu önerilmiştir [60, 67].



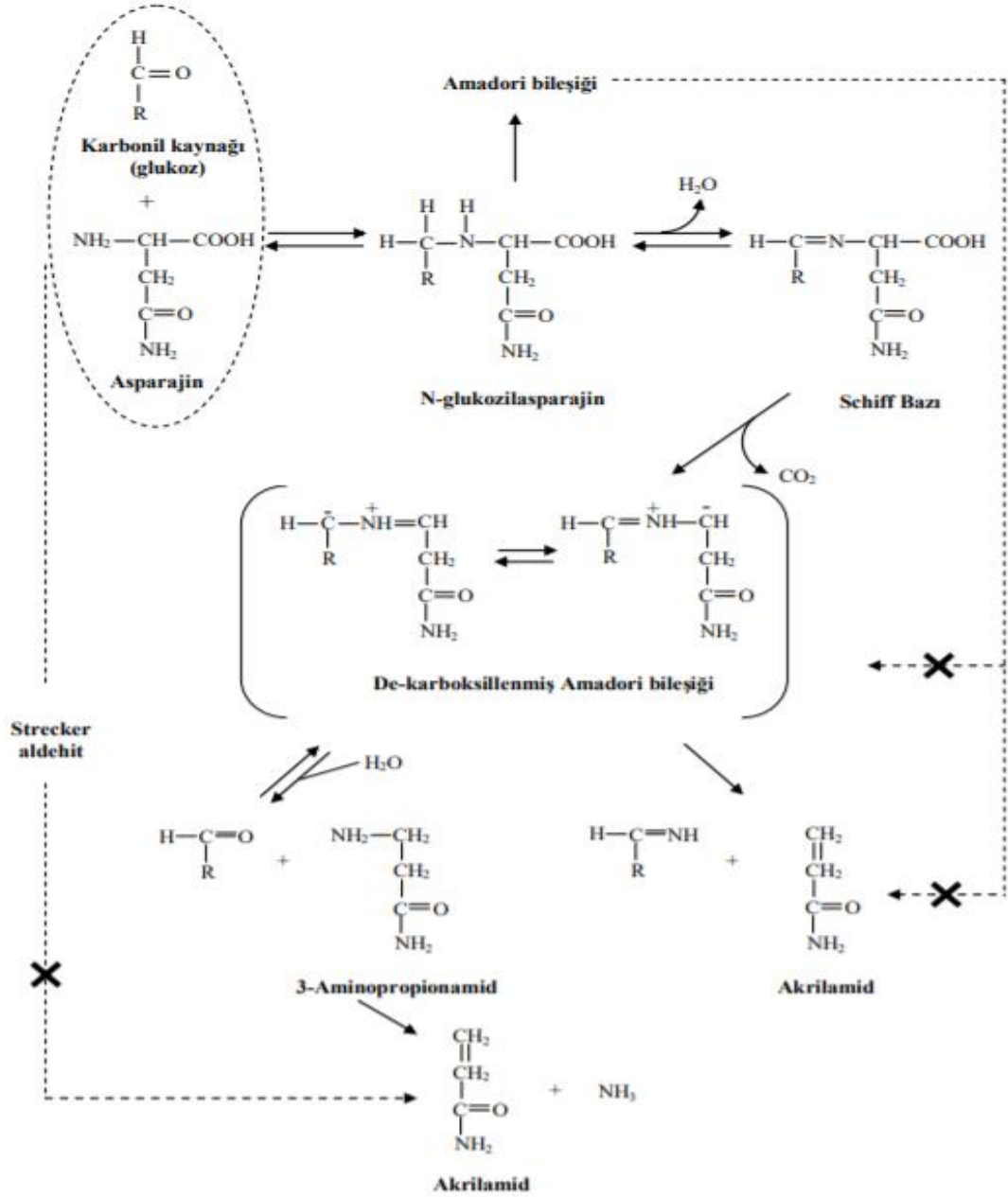
Şekil 3.14. Akroleinden akrilamid oluşumu [60].



Şekil 3.15. Alanin aminoasitinden akrilik asit oluşumu[60].

3.1.4. Teori 4: Maillard Reaksiyonu Sonucu Akrilamid Eldesi

Maillard reaksiyonu indirgen şekerlerin (glukoz, fruktoz gibi) karbonil grubu ile aminoasitlerin amino grubunun kondenzasyonu ile meydana gelir. Maillard reaksiyonu, ısı işlem sonrası kızartma, fırınlama gibi işlemler sonucu elde edilen cips, kahve, ekmek gibi ürünlerde renk, tat, aroma gibi karakteristik oluşumlar görülür. Ancak bu ısı işlemler sırasında sıcaklığın 120 °C ve üzerine çıkmaya başladıkça istenmeyen yan ürünlerde oluşmaktadır. Bu ürünlerden biri olan akrilamidin oluşumunda genel olarak kabul gören teori Maillard reaksiyonu olmakla birlikte akrilamid oluşumunda kilit rol oynayan majör aminoasit ise asparajindir. Akrilamidin Maillard reaksiyonu esnasında muhtemel oluşum aşamaları Şekil 3.16' de verilmiştir [68].



Şekil 3.16. Akrilamidin Maillard reaksiyonu sonucu muhtemel oluşum aşamaları [68].

3.2. AKRİLAMİDİN GIDALARDAKİ SINIR DEĞERLERİ

Akrilamid toksik bir madde olarak kabul edilir. Ancak bu etkileri açısından başlangıç konsantrasyonlarının tam olarak tanımlanamadığı kimyasal maddeler grubunda yer almaktadır. Çünkü bu şekilde başlangıç konsantrasyonlarının tam olarak bilinemediği kimyasalların çok az miktarları bile bir risk taşır ve maruz kalındığında zararsızdır demek doğru olmaz. Gıdalardaki akrilamid içeriği ile ilgili sınırlı veri bulunmaktadır.

Bazı gıdaların örneğin patates kızartması, kahve, mısır gevreği gibi akrilamid içeriği genel olarak belirlenmiştir. Çizelge 3.1’ de Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (U.S. FDA) bazı gıdaların akrilamid içerikleri ile ilgili yaptığı çalışmalardaki veriler verilmiştir [69].

Çizelge 3.1. U.S. FDA’nın yaptığı çalışmadaki bazı gıdaların akrilamid içerikleri [69].

Gıda/Ürünler	Ortalama	Minimum-Maksimum	Örnek Sayısı
Patates çipsi	1312	170-2287	38
Patates kızartması	537	<50-3500	39
Haşlanmış Patates	<30	-	-
Mısır çipsi	218	34-416	7
Patlamış mısır	500	365-715	3
Mısır Gevreği	122	35-478	7
Hamur ürünleri	36	<30-42	2
Fırınlanmış ürünler	112	<50-450	19
Makarna	<30	-	-
Bisküvi	198	<10-648	16
Bebe Bisküvisi	152	32-613	24
Diyabetik bisküvi	270	10-1695	125
Büsküvi/Kurabiye	300	<30-640	11
Tatlı Bisküvi	443	<68-1150	15
Tuzlu Bisküvi	179	13-224	2
Çocuk Bisküvisi	106	5-432	130
Ekmek	38	<10-85	22
Tost Ekmeği	164	41-474	5
Kraker	247	26-587	18
Kahvaltılık tahıllar	298	<30-1346	29
Sütlü ekmek	50	<30-162	41
Pide	<10	<10-16	6
Poğaç	120	<10-441	4
Balık ve deniz ürünleri	35	30-39	4
Kümes hayvanları	52	39-64	2
Adana kebab	127	49-250	4
Kuşbaşı	57	52-63	3
Et döner	65	-	3
Çözünür (instant) malt içecekleri	50	<50-70	3
Çikolata tozu	75	<50-100	2
Kakao	<10	-	3
Kahve tozu	200	170-230	3
Çikolata	75	37-100	5
Kavrulmuş Badem	260	207-313	2
Kavrulmuş Fındık	128	<10-421	5
Kavrulmuş Fıstık	66	<10-120	5
Kavrulmuş Leblebi	12	<10-33	4
Fındık ezmesi	53	<10-141	4
Fıstık ezmesi	54	45-63	2
Peksimet	300	<30-1900	5
Pekmez	95	<10-297	4
Tulumba	241	<10-701	5
Kadayıf	<10	<10-23	4
Kemalpaşa tatlısı	512	445-578	2
Tahin	69	<10-145	5
Helva	93	<10-229	7
Çilek reçeli	<10	-	1
Bira	<30	<30	1
Pilav	<10	-	4
Türk kahvesi	266	200-336	4
Kavrulmuş Kahve	221	79-975	3

Türkiye de akrilamidle ilgili çalışmalar kısıtlı olmakla birlikte TÜBİTAK-MAM araştırmacılarından Dr. Hülya ÖLMEZ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada taze soyularak evde yapılan patates kızartmalarının restoranlarda doğranıp dondurulmuş patatesle yapılanlara nazaran daha az miktarda akrilamid oluştuğunu göstermiştir. TÜBİTAK-MAM tarafından kahve, bisküvi, kraker, çikolata, kızarmış ekmek gibi

gıdalar üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucu akrilamid düzeyleri açısından elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 3.2) [70].

Çizelge 3.2. TÜBİTAK-MAM' ın çeşitli gıdalarda ölçtüğü akrilamid değerleri [70].

Çeşitli gıdalar	Akrilamid ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Pirinç pilavı	Ölçülebilir değerlerin altında
Tahin helvası	Ölçülebilir değerlerin altında
Kebap, döner, ızgara	Ölçülebilir değerlerin altında
Çavdar ekmeği	Ölçülebilir değerlerin altında
Beyaz ekmek (kabukta)	40-160
Kızarmış ekmek (hazır)	200
Hazır çorba	40-60
Tulumba tatlısı	40-45
Bebe bisküvisi	400-600
Bisküvi	70-130
Kraker	70-200
Kahvaltılık gevrekler	80-350

3.3. GIDALARDAKİ OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Akrilamid oluşumunu etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar arasında ısıtma süresi ve sıcaklığı, ortamın pH değeri, öncül madde konsantrasyonu ve bileşimi, su aktivitesi değeri gibi durumlardır [47, 71]. Akrilamid oluşumu da sıcaklık ve süreye bağlı olup ortam sıcaklığı 180 °C'ye ulaştığında en yüksek düzeye ulaştığı tespit edilmiştir. Bu yüzden ısıtma işlemi, sıcaklığı ve süresi gibi proses parametrelerinin kontrolü, akrilamid düzeyini azaltmada etkili olabilmektedir. Isıl işlem ve uygulamalarının yanı sıra doğru depolama yöntemleriyle de akrilamid oluşumu azaltılabilir. Örneğin, patateslerin 8-10 °C'nin altında saklanması genellikle patateslerdeki şeker seviyelerini artırır ve pişirme sonrasında potansiyel olarak daha yüksek akrilamid seviyelerine yol açar. Bu nedenle kızartılacak patateslerin bu sıcaklık altında depolanmaması gerekmektedir. Ayrıca patates dilimlerini suda veya sitrik asit solüsyonunda bekletmek, cipslerdeki akrilamid seviyelerini sırasıyla %40 veya %75'e

kadar azaltabilir. Alternatif diğer bir yol olarak kızartma öncesi patatesin haşlanması da akrilamid düzeylerini önemli ölçülerde azaltabilir [72-74].

3.4. AKRİLAMİDİN TOKSİK ETKİLERİ

3.4.1. Akrilamidin Genotoksik ve Karsinojenik Etkileri

Akrilamidin IARC tarafından “insanlar için olası bir kanserojen” olarak sınıflandırılmasının ardından 2011 yılında ABD Ulusal Toksikoloji ve Karsinojenler Raporunda, akrilamidi "insanlarda kanserojen olması makul bir şekilde tahmin edilmektedir" olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmalar, akrilamid ve glisidamitin DNA, hemoglobinin ve -SH gibi farklı fonksiyonel protein grupları ile kovalent eklentiler oluşturabildiğini, gen mutasyonunu ve kromozomal bozuklukları indüklediğini, kemirgenlerde malign ve benign neoplazm'ı artırdığını gösteren çalışmalar tarafından desteklenmektedir [75-78].

Akrilamid ve ana metaboliti glisidamitin genotoksitesisi ile ilgili Alzahrani tarafından fareler üzerinde yapılan bir çalışmada 10, 20 ve 30 mg/kg tek doz şeklinde ve 1-2 hafta boyunca tekrarlanan 10 mg/kg akrilamid dozu, fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus ve kromozom anormalliklerinde artış göstermiş olup kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde DNA hasarını da indüklediğini göstermiştir [79].

3.4.2. Akrilamidin Reprodüktif Sistem Üzerine Etkileri

Erkeklerde akrilamide maruz kalma sonucunda sperm sayısını ve sperm hareketliliğini azalttığı gösterilmiştir. Akrilamidin neden olduğu periferik nöropati de üreme kapasitesi üzerinde dolaylı bir etki yapmaktadır. Hayvanda periferik parapleji, kavrama kuvvetinin azalması ve penil stimülasyon disfonksiyonu nedeniyle binme ve çiftleşmede zorluk yaşanır. Ayrıca, nörotoksite erkek dayanıklılık seviyelerini azaltabilir ve bu da spermin rahme ulaşması için yeterince uzun süre çiftleşmemesine yol açar [80, 81]. Bu nedenle akrilamid dolaylı olarak periferik nöropatiyi indükler, böylece çiftleşmede ve dolayısıyla yavru üretiminde bir azalmaya neden olur. Akrilamid sadece üreme sorunlarının dolaylı bir tetikleyicisi değildir, aynı zamanda

sperm morfolojisi, hareketliliği ve üretiminin toksikolojik etkilerinde de doğrudan bir rol oynayabilir. Çalışmalar, erkek fareler akrilamide maruz kaldığında spermde kusurlar olduğunu göstermiştir. Akrilamid ve ana metaboliti glisidamitin kinesin benzeri motor proteinlerin normal işlevini engellemesi düşük sperm üretimine neden olur. Ayrıca kinesin benzeri motor proteinlerin spermin kuyruğunda bulunması sebebiyle bu proteinin akrilamid kaynaklı hasarı sonucu spermin motilitesinin düşmesine sebep olarak döllenme için yumurtaya ulaşamamasına böylelikle döllenme ve yavru üretiminde azalmaya neden olmaktadır [82-84].

3.4.3. Akrilamidin Nörotoksik Etkileri

Nörotoksisite, akrilamid maruziyetinin önemli bir sonucudur ve bu araştırma alanına büyük ilgi gösterilmiştir. Akrilamid, insanlarda olduğu kadar ratlarda da nörolojik bozuklukların ciddiyeti ve semptomların ilerlemesinin doz hızı ve konsantrasyonuna bağlı olması nedeniyle kümülatif nörotoksik bir madde olarak kabul edilir. Ratlarda yapılan toksisite çalışmalarında, 10 ila 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak akrilamidin tekrarlanan dozlarına maruz kalmanın çoğu laboratuvar hayvan türünde nöropatiye neden olduğu rapor edilmişken, 100 ila 200 mg/kg'lık tek dozlara maruz kalmanın yine çoğu hayvanda ölümcül olduğu da bildirilmiştir [85, 86].

Akrilamidin ratlardaki nörotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalarda hem periferik hem de merkezi sinir sistemleri üzerine etkileri ortaya konmuştur. Örneğin, arka bacak ayak açıklığı, ataksi, iskelet kası zayıflığı, aksonal dejenerasyon, zayıf bacaklar, duyu kaybı, azalmış refleksler ve periferik ekstremitte uyuşması gibi semptomlar görülmektedir [1-3]. Ek olarak, inhalasyon veya deri yoluyla uzun süreli akrilamid maruziyetinin daha şiddetli serebellar disfonksiyon ve nöropati semptomlarına neden olduğu da gösterilmiştir [4].

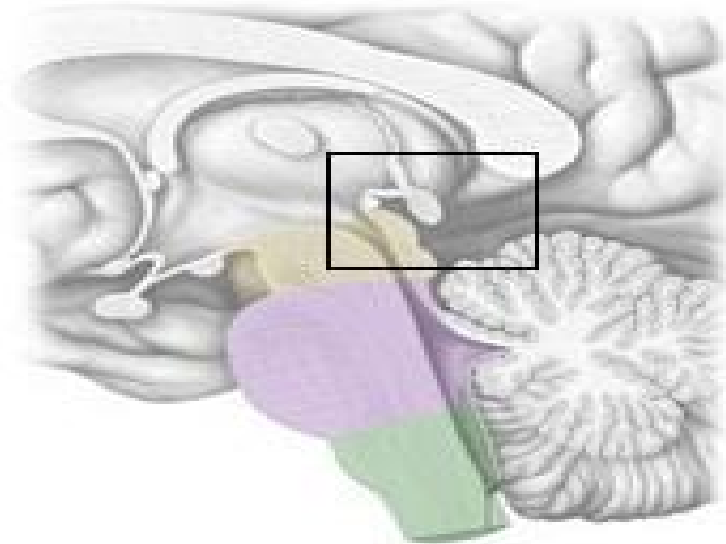
Akrilamide bağlı nöron hasarının, akrilamidin doğrudan etkisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan son çalışmalar, izole beyin sinaptozomlarının in vitro olarak akrilamide maruz bırakılmasının nörotransmitter salınımını azaltacağı iddiasını desteklemektedir. Akrilamidin elektrofilik doğasının, bir nöronun aksonundaki tiyol gruplarına, özellikle de nörotransmitterlerin ekzositozunu düzenleyen proteinlere

bağlanmasına izin vermektedir. Sonuç olarak bu eylem, akson terminallerinden nörotransmitter salınımını engeller, böylece hem merkezi hem de periferik sinir sistemini etkiler. Ekzositozu düzenleyen proteinler tipik olarak sistein bakımından zengindir ve bu nedenle akrilamidin eklentiler oluşturması için bir mekanizma sağlar. Ek olarak, çalışmalar bu proteinlerin uzun bir yarı ömre sahip olduğunu ve dolayısıyla aksonal dejenerasyon üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir [51, 87-89].

BÖLÜM 4

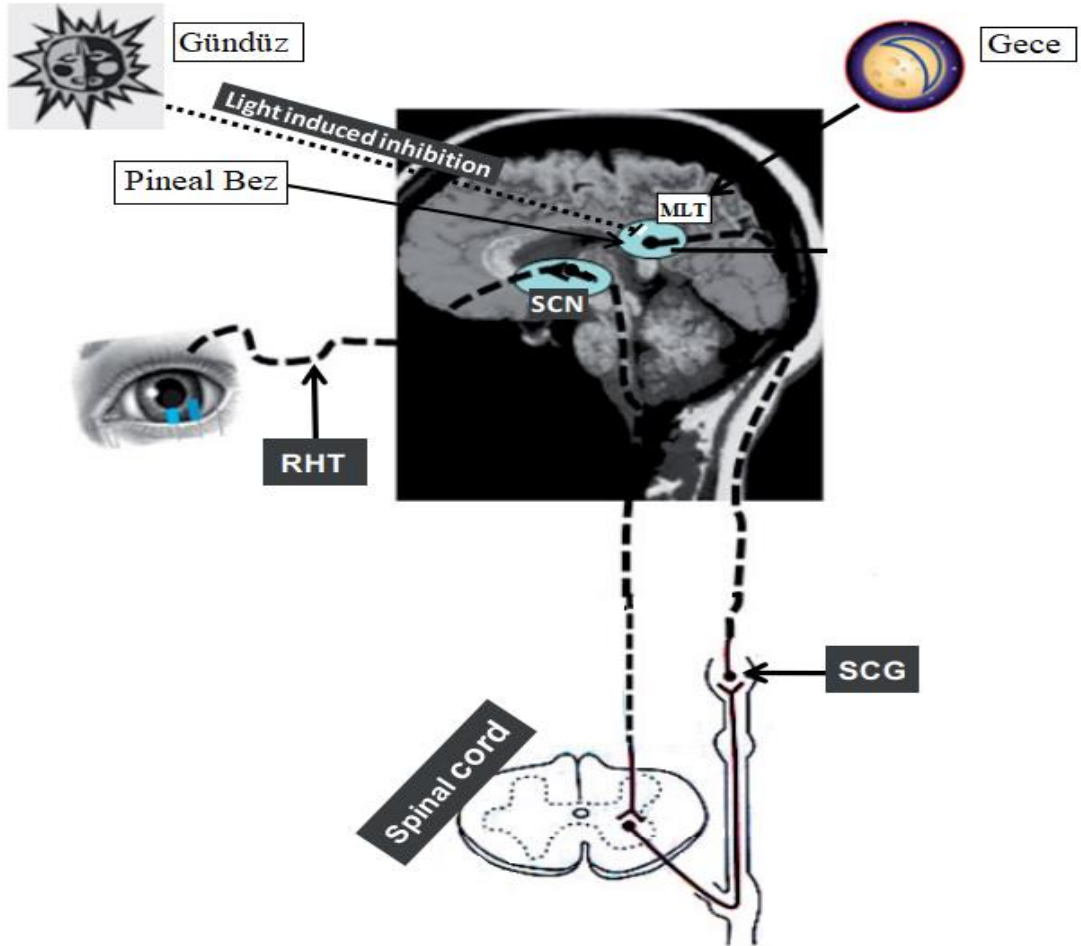
MELATONİN

Pineal bez ya da epifiz bezi, epitalamusun bir parçası olup üçüncü ventrikülün posterior kısmına doğrudan bağlıdır [90, 91]. Pineal bez sagittal hat üzerinde yer alan, sağlam, çam kozalağı şeklinde, kırmızı-gri renkli, yaklaşık 5-9 mm uzunluğunda ve 1-5 mm genişliğindedir. Ortalama 100-180 mg ağırlığındadır. Bezin damarlanması ise posterior koroidal arterler ve internal serebral venler tarafından sağlanır ve omurgalılarda sirkadiyen ritimden sorumludur [91-93]. Sirkadiyen ritim yaklaşık 24 saatlik biyolojik ritimlerdir ve önemli fizyolojik olayları düzenler. Açlık/tokluk, endokrin sistem, uyku/uyanıklık durumu, immün sistem, sindirim sistemi ve dolaşım sistemi gibi fizyolojik olayları kapsar [94]. Şekil 4.1.'de epifiz bezi ve bezin konumu gösterilmiştir [95].



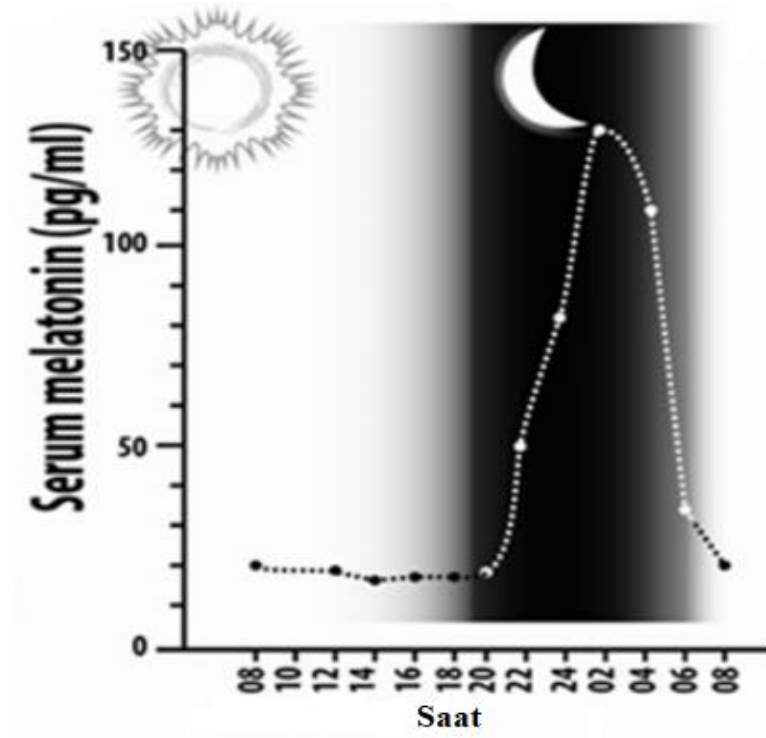
Şekil 4.1. Epifiz bezi ve bezin konumu [95].

Memelilerin pineal bezinden salgılanan ve çeşitli sirkadiyen ritimleri düzenleyen melatonin hormonunun sentezi, ortamdaki ışık bilgisinin retina hücreleri ile alınması ve retinohipotalamik yol aracılığıyla suprakiazmik nükleus ile retinada yer alan fotoreseptif ganglion hücrelerinde melanopsin pigmentlerinin yıkımının gerçekleştirilmesi ya da sentezinin aktivasyonu veya inhibisyonu için pineal beze aktarılması ile gerçekleştirilir. Bu aktarım sonucunda da çevresel aydınlık/karanlık döngülerine yanıt olarak sentezlenen melatonin hormonunun miktarı karanlıkla artarken ışıkla baskılanır [96, 97]. Şekil 4.2’ de melatonin sentezinin nöral kontrolünün şematize edilmiş hali gösterilmiştir [98].



Şekil 4.2. Melatonin hormonu sentezinin nöral kontrolü. RHT, retinohipotalamik yol; SCN, suprakiazmik nükleus; SCG, sempatik servikal ganglion; MLT, melatonin [98].

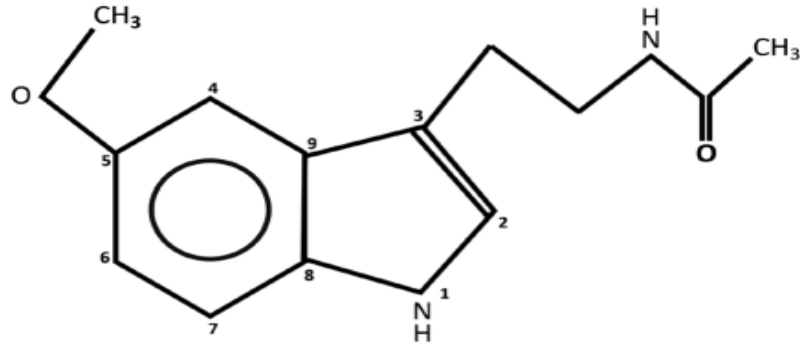
Memelilerde melatonin hormonunun salgılanması gün batımı ile başlar ve özellikle gece saat 02.00-04.00 saatleri arasında pik yapar. Gece serum konsantrasyonları 80-120 pg/ml'dir. Saat 04.00'ten sonra ise melatonin hormonunun serum konsantrasyonu giderek azalmaya başlar ve gündüz saatlerinde de azalmaya devam ederek 10-20 pg/ml arasında seyrederek. Bu durum melatonin hormonunun yaklaşık %80'inin gece sentezlendiğini göstermektedir [99-101]. Şekil 4.3'te serum melatonin hormonunun düzeyinin aydınlık/karanlık döngüdeki konsantrasyonları gösterilmiştir [99].



Şekil 4.3. Serum melatonin düzeyinin aydınlık/karanlık döngüdeki konsantrasyonları [99].

4.1. HORMON OLARAK MELATONİNİN SENTEZİ

Melatonin hormonu ya da diğer adıyla N-asetil-5-metoksitriptamin, Aaron Lerner tarafından 1958 yılında sığır epifiz bezinden izole edilerek tanımlanmıştır. Melatonin hormonunun açık formülü Şekil 4.4'te gösterilmiştir [98, 100].

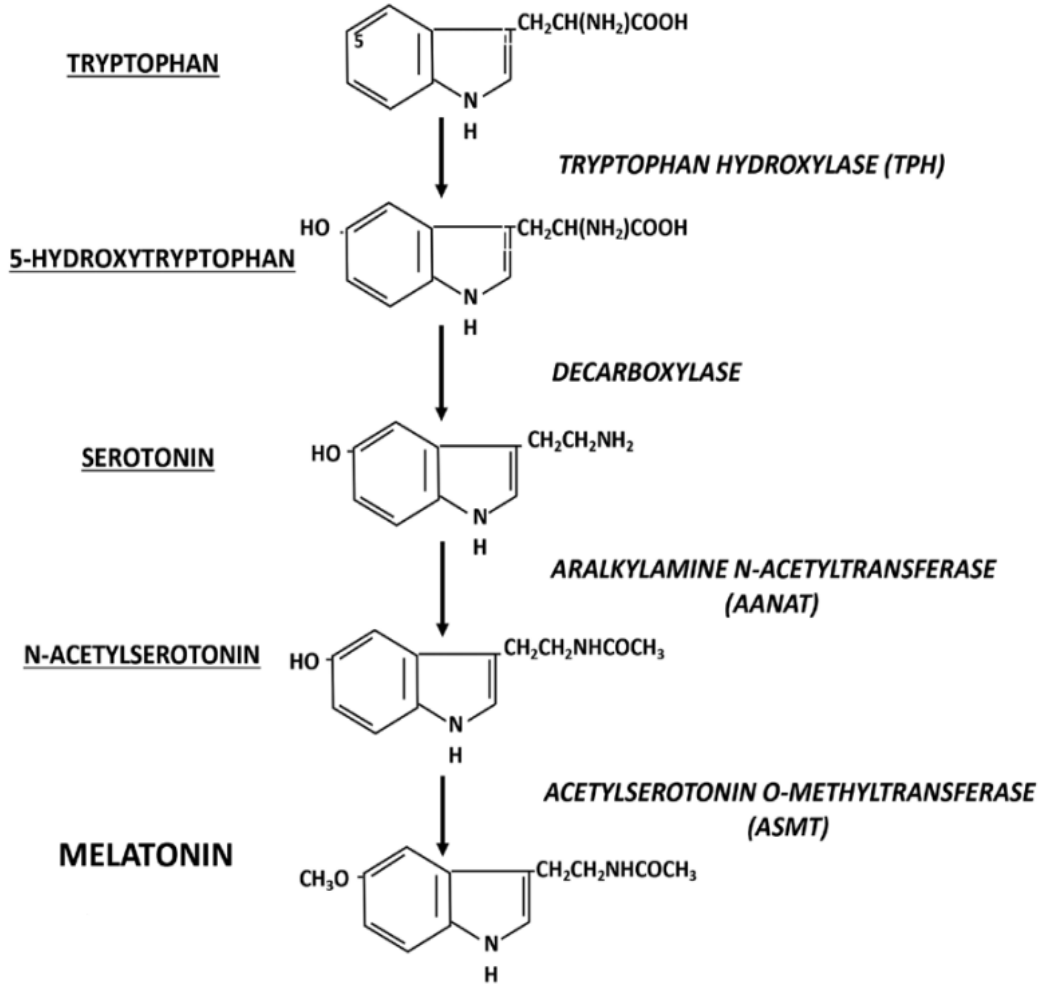


Şekil 4.4. Melatonin hormonunun açık formülü [98].

Melatonin hormonu, epifiz bezinden sentezlenip salgılanmasına rağmen; ekstrapineal dokulardan da salgılanmaktadır. Bu ekstrapineal dokulara deri, lens, siliyer cisim, gastrointestinal sistem, testis, yumurtalık, rahim, kemik iliği, plasenta, kırmızı kan hücreleri, trombositler, lenfositler, astrositler örnek verilebilir [102].

Epifiz bezinin bolca vaskülarize yapısı ve üçüncü ventrikül duvarına dorsal ve posterior olarak bağlanması sebebiyle melatonin hormonunu gece boyunca beyin omurilik sıvısı ve vasküler sisteme salınır. Melatonin hormonu pinealositler tarafından sentezlenirken depolanmayıp sentez sonrası hemen salınır. Böylelikle dolaşımında sistemine verildikten sonra dokulara, tükürük, idrar, semen, amniyon sıvısı, süt vs. çeşitli vücut sıvılarına salınır [103-105].

Melatonin hormonu esansiyel bir aminoasit olan triptofandan sentezlenir. Sentez, triptofanın triptofan hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofana hidroksilasyonu ile başlar. Ardından 5-hidroksitriptofanın kan-beyin bariyerini geçmesi ile aromatik L-aminoasit dekarboksilaz enzimi olan 5-triptofan dekarboksilaz tarafından dekarboksilasyonla serotonine dönüşür. Melatonin hormonu direk serotoninden sentezlenmez. Ara bir basamak daha vardır. Bu ara basamakta ise serotonin, N-asetil transferaz veya arilalkilamin-N-transferaz (AANAT) enziminin asetilasyonu ile (AANAT, aynı zamanda hız sınırlayıcı basamak enzimidir) N-asetilserotinine dönüşür. Son basamak olarak N-asetilserotininin asetilserotonin-O-metiltransferaz (ASMT enzimin diğer adı hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT)) enzimi ile metilasyonu sonucunda melatonin hormonu sentezlenir. Tüm bu sentez basamakları Şekil 4.5'te gösterilmiştir [106-108].

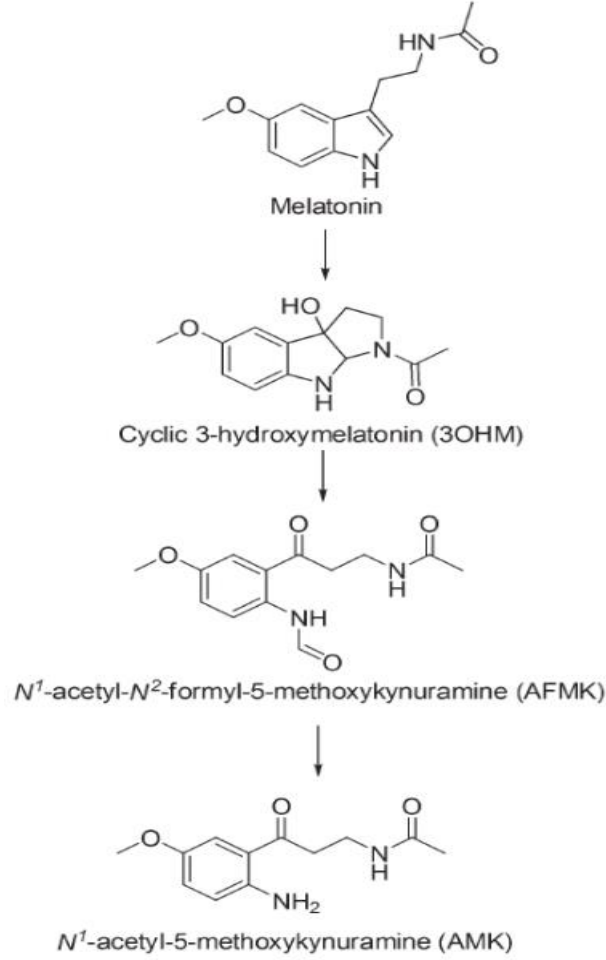


Şekil 4.5. Melatonin hormonunun sentez basamakları [107].

Melatonin hormonu, nöroprotektif etki, anti-amiloid etki, antilipidemik, antihipertansif ve antioksidan savunma gibi fizyolojik ve metabolik olaylarda önemli rol oynamaktadır [109, 110]. Melatonin hormonunun serbest radikal süpürücü aktivitesi ise yaklaşık 28 yıldır bilinmekte olup [111], bu durum in vivo ve in vitro yürütülen çalışmalarla moleküler düzeyin yanı sıra hem hüresel hem de doku düzeyindeki oksidatif hasarı engellediğine dair birçok çalışma mevcuttur [112-117].

Melatonin hormonunun serbest radikal süpürücü özelliğinin keşfinden sonra yapılan araştırmalar sonucu radikallerin detoksifikasyonunda işlev gördüğünde oluşan metabolitleri de radikal süpürücü özelliktedir [118, 119]. Böylelikle Şekil 4.6'da gösterilen melatonin hormonunun antioksidan kaskadı tanımlanmıştır. Bu antioksidan

kaskat içerisinde yer alan birinci, ikinci ve üçüncü nesil metabolitler ise sırasıyla şunlardır: siklik-3-hidroksimelatonin (c3OHM), N¹-asetil-N²-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) ve N-asetil-metoksikinüramin (AMK)'dir [120].



Şekil 4.6. Melatonin ve onun metabolitleri [120].

Melatonin hormonunun doğada bulunan en güçlü antioksidan özelliğine sahip olmasını bu antioksidan kaskat sağlar. Bu antioksidan kaskat sayesinde tek bir oksitleyici molekülü detoksifiye eden klasik bir serbest radikal temizleyicinin aksine melatonin hormonu on ROT/reaktif azot türleri (RNT) ürünlerine kadar nötralize edebilme yeteneğine sahiptir [121, 122].

Melatonin ve onun metabolitleri olan c3OHM, AFMK ve AMK oksidatif stresle mücadelede birden fazla yolu kullanmaktadır. Bu yollardan bazıları aşağıdaki gibidir:

- Oksidasyon sonucu oluşan süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrik oksit (NO^{\cdot}), peroksil ($CCl_3O_2^{\cdot}$) gibi ROT/RNT' nin detoksifikasyonunda rol oynar [123, 124].
- SOD, GSH-Px, glutatyon redüktaz (GR), nitrik oksit sentaz (NOS), glutamil sistein ligaz, lipoksijenaz, hem-oksijenaz, katalaz gibi hücrenin redoks durumunu etkileyen enzimlerin sentezlenmesini uyarır veya inhibe eder. Örneğin glutamil sistein ligaz, önemli bir hücre içi antioksidan olan GSH ve GSH-Px' i indüklerken, prooksidatif enzimler olan NO^{\cdot} ve lipoksijenazı inhibe eder [125-127].
- Ayrıca melatonin hormonu ve metabolitlerinin güçlü antioksidan özelliklerinin sayesinde fizyolojik ve metabolik olaylarda da ortaya çıkan oksidatif hasarı en aza indirmede önemli rol oynar. Örneğin melatonin hormonu iç mitokondriyal zarda elektron taşıma zincirindeki elektron sızıntısını sınırlamaya çalışması ile daha az oksijen molekülünün $O_2^{\cdot-}$ radikaline indirgenmesine yardımcı olmaya çalışmaktadır. Bu durum radikal kaçınma olarak adlandırılmaktadır [125, 128, 129].

BÖLÜM 5

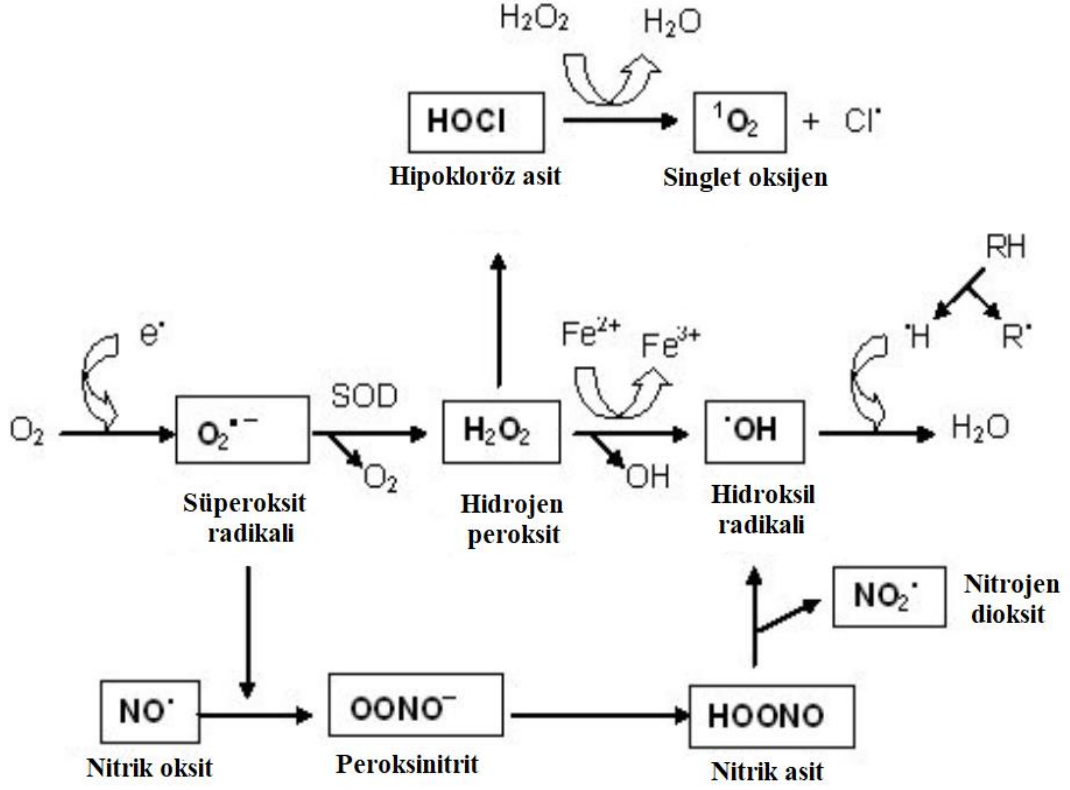
SERBEST RADİKALLER VE ANTIOKSİDANLAR

5.1. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Oksijen, aerobik yaşam süreçleri için hayati öneme sahiptir [130]. Temel haldeki oksijen molekülünün dış kabuğunda iki tane eşleşmemiş elektron bulunur. Bu iki eşleşmemiş elektron da aynı yönde dönüşe sahip olduğundan kimyasal bir bağda çok reaktif değildir. Öte yandan, eşleşmemiş iki elektronundan biri uyarılır ve dönüş yönünü değiştirirse, ortaya çıkan tür (singlet oksijen olarak bilinir) güçlü bir oksidan haline gelir. Çünkü zıt dönüşlere sahip iki elektron diğer elektron çiftleriyle hızla reaksiyona girer. Böylelikle reaktif oksijen türleri meydana gelir [131, 132].

Oksidatif stres, ile antioksidanların reaktif ara ürünleri detoksifiye etme veya serbest radikallerin neden olduğu hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Reaktif oksijen türleri olarak da adlandırılan oksidanlar, aerobik organizmalar tarafından kullanılan oksijen molekülünden üretilir ki bunlara endojen oksidanlar denir. Endojen oksidanların yanı sıra hava kirleticileri, sigara dumanı, ağır metal iyonları ve iyonlaştırıcı ultraviole ışınlar vb. ekzojen oksidanlar da hücrelerin redoks (indirgeyici ve yükseltgeyici düzenleme) durumunu etkiler. Hücrelerin ve organların normal işleyiş sürecinde redoks durumu kritik öneme sahiptir. Düşük veya orta seviyelerde serbest radikaller, hücresel tepkiler ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde faydalı etkiler gösterirken; yüksek konsantrasyonlarda ise karbonhidratlar, lipidler, proteinler gibi hücre yapılarına zarar verirler [133-136]. ROT' ların yanı sıra bir dizi nitrojen bazlı reaktif türler olan RNT de mevcuttur ve en önemlileri de nitrik oksit ve peroksinitrittir. Vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesi, angiogenez, tromboz, vasküler tonus gibi birçok biyolojik süreçte yer alır [137].

Şekil 5.1'de moleküler oksijenden meydana gelen başlıca ROT ve RNT'ler gösterilmiştir [138].



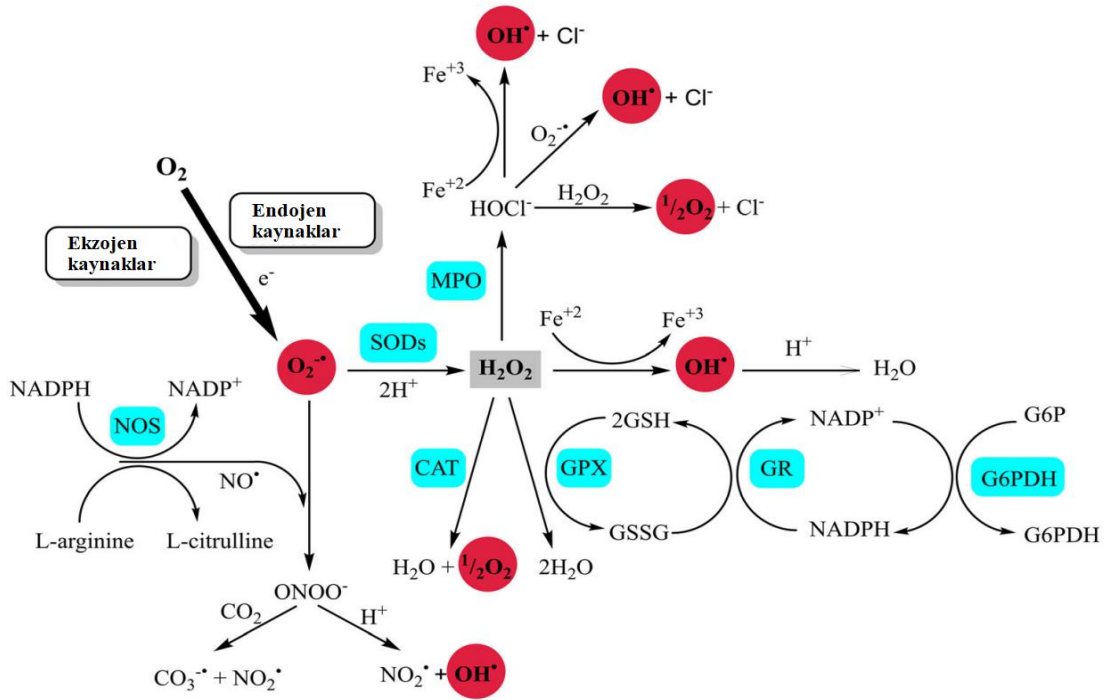
Şekil 5.1. Başlıca ROT ve RNT'ler [138].

Oksidatif stres, kanser, nörodejenerasyona sebep olarak Parkinson, Alzheimer gibi rahatsızlıklara katkıda bulunur. Ayrıca ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi/perfüzyon, diyabet, katarakt, idiyopatik pulmoner fibroz, ve astım gibi birçok patolojik duruma katkıda bulunur [139, 140].

5.2. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Hücreler oksidasyon sonucu meydana gelen oksidatif hasarları önlemek ve detoksifiye etmek için antioksidan savunma mekanizmalarını kullanırlar. Antioksidan savunma mekanizmaları birincil ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Birincil antioksidanlar radikal türleri temizleyebilen zincir kırıcı antioksidanlarken, ikincil antioksidanlar ise singlet oksijen söndürücüler, radikal olmayan türler veren peroksit ayrıştırıcılar, metal şelatörler, oksidatif enzim inhibitörleri (örneğin lipooksijenaz)

veya ultraviole absorblayıcılardır. İkincil antioksidanlar birkaç olası mekanizmayı izleyerek birincil antioksidanlarla kombinasyon halinde; asidik bir ortam oluşturarak birincil antioksidanları stabilize ederek, hidrojen bağıışı ile birincil antioksidanları yenileyerek, prooksidatif geçiş metali katyonlarını şelatlayarak veya moleküler oksijeni söndürerek sinerjik bir etki gösterebilirler [141, 142]. Başlıca antioksidanlar ve detoksifikasyon mekanizmaları aşağıda verilmiştir (Şekil 5.2) [143].



Şekil 5.2. Başlıca antioksidanlar ve detoksifiye mekanizmaları [143].

Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılır.

5.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar sınıfında SOD, CAT ve GSH-Px yer alır. Bu ana enzimlere ek olarak, tioredoksinler (TRX'ler), peroksiredoksinler (PRX'ler) ve glutatyon transferaz (GST) yer alır [144]. Çizelge 5.1'te enzimatik antioksidanlar ve katalizlediği reaksiyonlar verilmiştir [145].

Çizelge 5.1. Enzimatik antioksidanlar ve katalizlediği reaksiyonlar [145].

ANTIÖKSİDAN ADI	KISALTMASI	KATALİZLEDİĞİ REAKSİYON
Süperoksit dismutaz	SOD	$M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$ $M^{n+}\text{-SOD} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$
Katalaz	CAT	$2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$ $H_2O_2 + Fe(III)\text{-E} \rightarrow H_2O + O = Fe(IV)\text{-E}(.)$ $H_2O_2 + O = Fe(IV)\text{-E}(.) \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-E} + O_2$
Glutatyon peroksidaz	GTPx	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Tioredoksin	TRX	Adenozin monofosfat + sülfid + tioredoksin disülfid = 5'-adeninil sülfat + tioredoksin adenozin 3',5'-bifosfat + sülfid + tioredoksin disülfid = 3'-fosfoadeninil sülfat + tioredoksin
Peroksiredoksin	PRX	$2 R'\text{-SH} + ROOH = R'\text{-S-S-R}' + H_2O + ROH$
Glutatyon transferaz	GST	$RX + GSH = HX + R\text{-S-GSH}$

Süperoksit dismutaz, ilk detoksifikasyon enzimi olup reaktif oksijen türlerine karşı birinci basamak olarak yer alan güçlü bir antioksidandır. O_2^- radikalini, H_2O_2 ve O_2 'ne katalize eder ve daha az zararlı hale getirir. SOD bir metalloenzimdir ve bu nedenle aktivitesi için demir (Fe), çinko (Zn) bakır (Cu) ve manganez (Mn) den biri olan metal iyonlarına ihtiyacı vardır. Fe-SOD, prokaryotlarda ve bazı bitkilerin kloroplastlarında yaygın olarak bulunurken; Mn-SOD, prokaryotlarda ve ökaryotların mitokondrilerinde ve Cu/Zn-SOD ise ökaryotlarda baskındır ve temel olarak sitozolde bulunur [146, 147].

Katalaz, aerobik canlıların dokularında var olan yaygın bir antioksidan enzimdir. CAT, kofaktör olarak Fe veya Mn kullanır. H_2O_2 'i H_2O ve O_2 'e indirgenmesini sağlar ve sonuç olarak SOD tarafından başlatılan detoksifikasyon süreci tamamlanır. CAT enzimi peroksizomlarda bulunur ve ayrıca birinci basamak bir antioksidan savunma enzimidir. Metanol, etanol, formik asit veya peroksidaz aktivitesi olan fenoller gibi hidrojen donörleri ile verimli bir şekilde reaksiyona girer. CAT aktivitesi iki adımda gerçekleşir. Birinci adımda bir molekül H_2O_2 , hem bir oksiferril türüne okside eder. Demirden bir oksidasyon eşdeğeri ve porfirin halkasından bir oksidasyon eşdeğeri çıkarıldığında bir porfirin katyon radikali üretilir. İkinci adımda ise ikinci H_2O_2 molekülü, birer adet O_2 ve iki adet H_2O üreterek, dinlenme halindeki enzime yeniden

dönüştürmek için bir indirgeyici madde ödevi görür. H_2O_2 , düşük miktarlarda hücre proliferasyonu, apoptoz, karbonhidrat metabolizması, mitokondriyal fonksiyon, trombosit aktivasyonu gibi bazı fizyolojik süreçleri düzenleme eğiliminde iken yüksek konsantrasyonlarda ise hücreler için çok zararlıdır [148-151].

GSH-Px, H_2O_2 moleküllerini H_2O 'ya parçalayan önemli bir hücre içi enzimdir. Genel olarak aktivasyonu için selenyum olarak bilinen bir mikro besin kofaktörüne bağlıdır. Dolayısıyla GSH-Px 'e genellikle selenosistein peroksidaz denir. Enzim, lipid peroksidasyon sürecini inhibe etmede daha önemli olup hücreleri oksidatif strese korur [146, 152]. Morón ve Cortázar'a göre, insanda en az sekiz GSH-Px enzimi vardır ve gastrointestinal sistem, böbrek sperm gibi çeşitli yerlerde bulunurlar. İçlerinde en önemlisi fosfolipid hidroperoksidlerini parçalayan tek GSH-Px4'tür [153, 154].

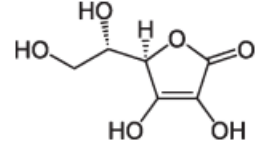
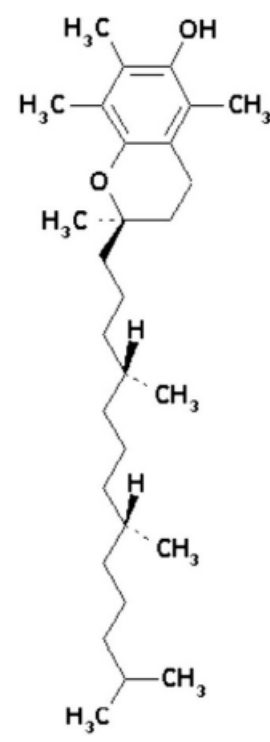
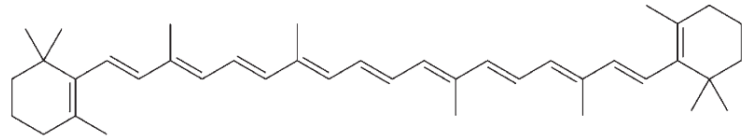
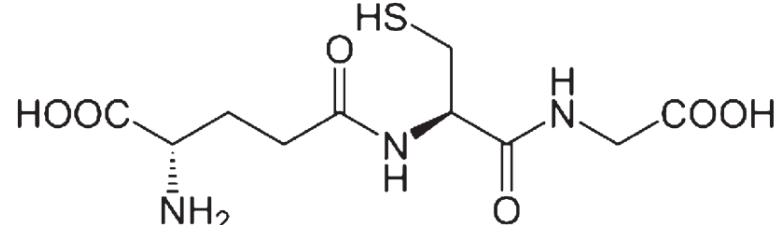
Ayrıca H_2O_2 'yi detoksifiye etmek için TRX1 ve TRX2, tioredoksin redüktazlar (TRR'ler) ve PRX gibi birkaç tiyol içeren enzimle yakından ilişkilidir. İnsan hücrelerinde hem sitozolde hem de mitokondride bulunan TRX ve TRR tanımlanmıştır. Akciğerde TRX ve TRR'ler bronşiyal ve alveolar epitelde ve makrofajlarda eksprese edilir [155-157].

Bir başka enzimatik antioksidan ailesinden olan GST'ler ise aldehitler, epoksidler ve hidroperoksidler gibi ikincil metabolitleri inaktive eder. Üç ana GST ailesi tanımlanmış olup eikosanoid ve glutatyon metabolizmasında rol oynar Bu ailenin üyeleri ise sitozolik GST, mitokondriyal GST ve membranla ilişkili mikrozomal GST'dir [158, 159].

5.2.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

Nonenzimatik antioksidanlar, Askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), β -karoten(A vitamini), glutatyon transferaz (GSH) gibi antioksidanlardan oluşur [144]. Çizelge 5.2.'te enzimatik olmayan antioksidanlar ve kimyasal yapıları verilmiştir [145].

Çizelge 5.2. Nonenzimatik antioksidanlar ve kimyasal yapıları [145].

Antioksidan Adı	Kimyasal Adı	Yapısı
Vitamin C	Askorbik asit	
Vitamin E	α -Tokoferol	
β -karoten		
Glutatyon		

Vitamin C (askorbat, askorbik asit), askorbat peroksidaz için bir substrat, OH• radikali için elektron donörü, iyi bir radikal süpürücü, antioksidanı indirgeyen ve elektronlarını ROT'a bağışlayan suda çözünür özelliğe sahip bir enzimatik olmayan antioksidandır.

Askorbat, askorbat-glutasyon döngüsü yoluyla H_2O_2 'i ortadan kaldırır [160]. Vitamin C, membranlardaki ve lipoproteinlerdeki α -tokoferol radikallerinden α -tokoferolün yeniden üretilmesi için Vitamin E ile çalışır. Ayrıca hücre içi glutasyon seviyelerini yükselterek oksidasyona karşı proteinlerin tiyol grubunun korunmasında önemli rol oynar [161].

Vitamin E (α -tokoferol), yağda çözüldüğü ve hücre membranının hidrofobik bölgesinde yer alır ve oksijen türlerinin neden olduğu membran hasarlarına karşı başlıca antioksidandır. Lipid peroksidasyonu sırasında üretilen peroksil radikaline elektron verir. Kanser hücrelerinin apoptozunu tetikler ve serbest radikal oluşumlarını engeller [162].

β -karoten, Vitamin A'nın öncü maddesidir ve bitkilerde bulunan bir pigmenttir. β - karoten öncelikle $OH\cdot$ $O_2\cdot-$ ve peroksil ($ROO\cdot$) radikalleri ile reaksiyona girer. Karoten ve çeşitleri, antioksidan etkilerini düşük oksijen konsantrasyonlarında gösterirler, ancak daha yüksek oksijen konsantrasyonlarında ise pro-oksidan etkilere sahip olabilir [163].

GSH, tüm hücre kısımlarında yüksek oranda bulunur ve başlıca çözüdür antioksidandır. GSH/Okside glutasyon (GSSG) oranı, oksidatif stresin önemli bir belirleyicisidir. GSH, antioksidan etkilerini çeşitli şekillerde gösterir. GSH-Px'in etkisi ile H_2O_2 ve lipid peroksitleri detoksifiye eder. GSH, elektronunu H_2O ve O_2 'ye indirgemek için H_2O_2 'e bağlıdır. GSSG, elektron donörü olarak NAD(P)H kullanır. Ardından GR tarafından tekrar GSH'ye indirgenir. GSH-Px'ler membran zarlarının lipid peroksidasyonundan korunmasında önemlidir. GSH, protonları zarda yer alan lipidlere bağlıdır ve antioksidan özellik gösterir. GSH, GSH-Px ve transferaz gibi çeşitli antioksidan enzimler için bir kofaktördür. Ayrıca C ve E vitamininin aktif formlarına geri dönüştürülmesinde rolü vardır [164].

BÖLÜM 6

GEREÇ VE YÖNTEMLER

6.1. GEREÇLER

6.1.1 Kimyasallar, Kullanılan Aletler ve Kitler

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar; disodyumhidrojen fosfat (Na_2HPO_4), tiyobarbutirik asit (TBA), fosforik asit, n-butanol, 5,5' dithiobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB), hidrojen peroksit (H_2O_2), disodium etilendiamin tetraasetik asit (Na_2EDTA), potasyum sodyum tartarat, bakır (II) sülfat, sodyum hidroksit, ksantin oksidaz, bakır (II) klorür, bovine serum albumin (BSA), krosin, ksantin, sodyum karbonat, Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS), TGF- β kiti kullanıldı.

Çalışmada kullanılan aletler; manyetik karıştırıcı (Termal N11150M), otomatik pipetler (Brand), hassas terazi (RADWAG AS 220.R2), vorteks (Velp Scientifica), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R), mikrosantrifüj (Nüve NF 048), spektrofotometre (Thermo Fisher Multiskan Go 1510), UV/VIS Spektrofotometre (PG Instruments), pH metre (Adwa 1000), homejenizatör (Hangzhou Bioprep-24), sallayıcı su banyosu (Nüve ST 30), mikroplaka yıkayıcı (Thermo Fisher Wellwash 888).

6.2. YÖNTEMLER

6.2.1. Akrilamid (AKR) ve Melatonin (MLT) Uygulaması

Akrilamid serum fizyolojik içerisinde çözüldükten sonra 25 mg/kg olarak gavajla verildi [165].

Melatonin 10 mg/kg olacak şekilde %0,5 'lik etanol çözeltisinde çözüldükten sonra intraperitoneal enjeksiyon (i.p) yoluyla uygulandı [166].

6.2.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Çalışmamızda, 225-250 gram arasında ağırlıkları değişen 60 adet erkek Wistar albino türü rat Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (ZBEÜN-DEHAM) biriminden temin edildi ve Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı (Protokol No:2020-21-03/09) alınarak başlandı. Tüm uygulamalar bu protokole uygun olarak yapıldı. İçme suları günlük olarak değiştirildi. Kafes temizliği gün aşırı olmak üzere yapıldı. Ratlar ortam sıcaklığın 21°C, ortam neminin %55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri) ve 12 saat karanlık uygulanan odalarda bakıldı. Çalışma süresince standart pellet yemle ad libitum olarak beslendi.

6.2.3. Deney Hayvanları Protokolü

Deney için alınacak 60 adet rat randomize olarak her grupta 30 adet rat olacak şekilde öncelikle Sham ve Pinealektomi (PINX) olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Sham grubu için ayrılan ratlara pinealektomi dışındaki tüm cerrahi işlemler yapıldıktan sonra kendi içinde 3 alt gruba (Sham, Sham AKR ve Sham AKR+MLT) ayrıldı. PINX grubu ise cerrahi işlemle pineal bezi çıkarıldıktan sonra kendi içinde 3 alt gruba (PINX, PINX+AKR ve PINX+AKR+MLT) ayrıldı. Bu gruplar ve gruplara uygulanan kimyasallar aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır: Bu gruplar:

Grup 1: Sham grubu; Deney süresince ilk günden itibaren i.p şeklinde 0,5 ml günlük doz halinde %0,5 'lik etanol çözeltisinden 21 gün boyunca uygulandı.

Grup 2: Sham + AKR grubu; Deney süresince akrilamid 25 mg/kg/gün doz halinde 21 gün boyunca gavajla uygulandı [165].

Grup 3: Sham + AKR + MLT grubu; Deney süresince akrilamid 25 mg/kg/gün doz halinde 21 gün boyunca gavajla, melatonin ise 10 mg/kg/gün doz halinde 21 gün boyunca 0,5 ml hacminde i.p şeklinde uygulandı [165, 166].

Grup 4: PINX grubu; Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra deney süresince ilk günden itibaren i.p olarak 0,5 ml günlük olacak şekilde şekilde %0,5 'lik etanol çözeltisinden 21 gün boyunca uygulandı [167].

Grup 5: PINX + AKR grubu; Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra deney süresince akrilamid 25 mg/kg/gün doz halinde 21 gün boyunca gavajla uygulandı [165, 167].

Grup 6: PINX + AKR + MLT grubu; Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra deney süresince akrilamid 25 mg/kg/gün doz halinde 21 gün boyunca gavajla, melatonin ise 10 mg/kg/gün doz halinde 21 gün boyunca 0,5 ml hacminde i.p şeklinde uygulandı [165-167].

6.2.3.1. Pinealektomi İşlemi

Çalışmanın başlangıcında PINX için ayrılan ratlara ketamin ve ksilazin (sırasıyla 80 ve 8 mg/kg) anestezisi ile mikro freze matkap (Proxxon MİCROMOT 50/E, Almanya) yardımıyla 3 mm çapında bir delik açılarak kraniyotomi işlemi gerçekleştirildi. Cerrahi işlem Demir vd. yöntemine göre yapıldı [168] [167]. İşlemi sonrası hayvanlara ağrı kesici olarak 1 mg/kg i.p enjeksiyonu ile novalgine uygulaması yapıldı.

6.2.4. Deneş Hayvanlarından Numune Alınması

Deneş sonunda deneklere i.p şekilde 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer), 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı) ile anestezi sonrası laparotomi işleml ile abdominal venden tüplere kan alınarak hayvanlar dekapite edildi. Beyin ve beyincik dokuları steril bir şekilde kafatasından bütün olarak çıkarıldı. Sonrasında serum fizyolojik içerisinde yıkanarak doku üstündeki kanın uzaklaştırılması sağlandı. Ardından beyin ve beyincik dokusunu simetrik şekilde ayırdıktan sonra bir parçasını % 10'luk formol solusyonu içine koyarak histoloji açısından çalışmak için ayrıldı. Diğer yarısı ise alüminyum folyoya sarılarak çalışma gününe kadar -80 C° dolabında saklandı. Tüplere alınan kan numuneleri gerekli süre oda ısısında bekletildikten sonra 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek serum numuneleri elde edildi. Sonrasında melatonin seviyelerini ölçmek üzere uygun tüplere alınarak çalışma zamanına kadar -80 C° dolabında bekletildi.

6.2.5. Biyokimyasal Analizler

6.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması

Çalışma günü beyin ve beyincik dokuları -80 C° dolabından alınarak MDA, GSH, SOD, CAT, TAS, TOS, OSI analizleri ve protein miktarlarını belirlemek için tartıldı. Fosfat tampon (pH:7.5) çözeltisinde %10'luk homojenatlar elde edildi ve numuneler 12.000 rpm'de 1-2 dakika süreyle homojenizatör ile homojenize edildi. Beyin ve beyincik dokusuna ait MDA düzeyleri homojenatlarda belirlendi. Sonrasında homojenatlar +4 °C'de 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar, GSH, SOD, CAT, TAS, TOS, OSI ve protein seviyelerini belirlemek için kullanıldı.

6.2.5.2. Doku Oksidatif Hasar Düzeyinin Belirlenmesi

Beyin/ Beyincik Dokularında MDA Analizi

Beyin ve beyincik dokularına ait homojenatta Ohkawa vd. [169] tarif ettiği yönteme göre MDA analizi yapıldı. Numuneler, %1'lik fosforik asit (H_3PO_4) ve %0.6'lık tiyobarbitürik asit ile cam tüp içerisinde vortekslendikten sonra 45 dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplere n-bütanol eklendikten sonra santrifüj işlemi sonucu n-bütanol fazında ayrılan pembe renk, gruplara göre mikrolaka kuyucuklarına yerleştirilerek ELİSA cihazında 535 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Elde edilen veriler MDA seviyesinin hesaplaması için kullanıldı. Kör olarak n-bütanol ve standart olarak tetrametoksipropan kullanıldı. Sonuçlar nanomol/g yaş doku birimine göre hesaplandı.

Beyin/ Beyincik Dokularında GSH Analizi

Beyin ve beyincik dokularına ait süpernatantta Ellman'ın [170] tarif ettiği yönteme göre GSH analizi yapıldı. Süpernatantlar deproteinize edildikten sonra ependorflar içerisinde 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona sokularak sarı-yeşil renk oluşması için inkübasyona bırakıldıktan sonra oluşan renkli ürün gruplarına göre mikrolaka kuyucuklarının içinde ELİSA cihazında 410 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Elde edilen veriler GSH seviyesinin hesaplaması için kullanıldı. Kör olarak distile su ve standart olarak 5mM/L'lik stok GSH çözeltisinden hazırlanan farklı dilüsyonlar kullanıldı. Sonuçlar nanomol/g yaş doku birimine göre hesaplandı.

Beyin/ Beyincik Dokularında SOD Enziminde Aktivite Analizi

Beyin ve beyincik dokularına ait süpernatantında Sun vd. [171] yöntemine göre SOD enziminin aktivite analizi yapıldı. Deney sürecinde ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu sonucu oluşan süperoksit radikalleri ortamdaki NBT'yi indirgeyerek mavi renkli formazan oluşmasına neden oldu. Doku SOD enziminin aktivite analizi mavi renkli

formazanın 560 nm'de ELİSA cihazında ölçülerek yapıldı. Sonuçlar U/g protein olarak birimine göre hesaplandı.

Beyin/ Beyincik Dokularında CAT Enziminde Aktivite Analizi

Beyin ve beyincik dokularına ait süpernatantta Aebi vd. [172] yöntemine göre CAT enziminin aktivite analizi yapıldı. Deney ortamında süpernatant ile H₂O₂ içeren fosfat tamponu (pH: 7.5 mM) karıştırıldı. Süpernatandaki CAT aktivitesi ile H₂O₂, H₂O ve O₂' e parçalanır. Deney süresinde H₂O₂'lerin yıkımlanması sonucu 240 nm'de absorbans azalmasına neden olur. CAT enziminin aktivite analizini hesaplamak için absorbanstaki azalma 1 dakika takip edildi. Sonuçlar K/g protein birimine göre hesaplandı.

Beyin/ Beyincik Dokularında Protein Miktarı Analizi

Beyin ve beyincik dokularına ait süpernatantta Lowry vd. [173] yöntemine göre protein analizleri yapıldı. Oluşan mavi renk 540 nm dalga boyunda ELİSA cihazında ölçülerek protein içeriği hesaplandı. Sonuçlar mg/ml birimine göre hesaplandı.

Beyin/ Beyincik Dokularında TOS Analizi

Beyin ve beyincik dokularına ait süpernatantta Erel'in [174] yöntemine göre TOS düzeyleri ölçüldü ve gerekli kit prosedürüne göre çalışıldı. Oluşan renkli bileşikler 660 nm dalga boyunda ELİSA cihazı ile ölçüm yapılarak beyin ve beyincik dokularının TOS seviyeleri hesaplandı. Standart olarak 20 µmol/L'lik H₂O₂ solusyonu kullanıldı. Sonuçlar µmol H₂O₂ equiv /L birimine göre hesaplandı.

Beyin/ Beyincik Dokularında TAS Analizi

Beyin ve beyincik dokularına ait süpernatantta Erel'in [175] metoduna bağlı kalınarak TAS düzeyleri ölçüldü ve gerekli kit prosedürüne göre çalışıldı. Kit talimatlarına göre mikropalakalara konan örneklerin herbirine reaktif 1 eklenerek 660 nm'de birinci okuma ardından reaktif 2 eklenerek ikinci okuma yapıldı. Yapılan okumalar sonucu absorbansların arasındaki farklar beyin ve beyincik dokularının TAS seviyeleri

hesaplandı. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı. Sonuçlar mmol Trolox Equiv/L birimine göre hesaplandı.

Beyin/ Beyincik Dokularında OSI Analizi

Beyin ve beyincik dokularına ait süpernatantta Erel'in metoduna [176] göre OSI ölçümü hesaplandı. OSI, TOS'un TAS'a bölünmesine eşittir: $OSI \text{ (Arbitrary Unit)} = \frac{TOS \text{ (}\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eqv/l)}}{[TAS \text{ (mmol Trolox eqv/l)} \times 10]}$. Sonuçlar Arbitrary Unit (AU) birimine göre hesaplandı.

6.2.6. Beyin/ Beyincik Dokularında Dopamin Düzeylerinin Belirlenmesi

Beyin ve beyincik dokularına ait süpernatant dopamin düzeyleri Bioassay Technology Laboratory'den temin edilen Rat Dopamin ELISA kiti ile ölçüldü. Veriler ng/L birimine göre hesaplandı.

6.2.7. Beyin/ Beyincik Dokularında BDNF Düzeylerinin Belirlenmesi

Beyin ve beyincik süpernatantında BDNF seviyeleri Bioassay Technology Laboratory'den temin edilen Rat BDNF ELISA kiti ile ölçüldü. Veriler ng/ml birimine göre hesaplandı.

6.2.8. Beyin/ Beyincik Dokularında TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi

Beyin ve beyincik süpernatantında TNF- α seviyeleri Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan Rat TNF- α ELISA kiti ile ölçüldü. Veriler ng/L birimine göre hesaplandı.

6.2.9. Serum Melatonin Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışma günü serum örnekleri dondurucudan çıkarıldı ve oda ısısına gelmesi beklendi. Serum melatonin düzeylerini Bioassay Technology Laboratory'den satın alınan Rat Melatonin ELISA kiti ile ölçüldü. Veriler ng/L birimine göre hesaplandı.

6.2.10. Histopatolojik İnceleme

Çalışmanın bitim günü ratlar ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edildi. Çıkarılan beyin ve beyincikler fikse olması için %10'luk nötral tamponlanmış formaline (NTF) (104003, Formaldehyde solution %37, Merck, ABD) konuldu. Organlar daha sonra 3-4 mm'lik daha küçük parçalara ayrılıp, plastik doku takip kasetlerine konularak NTF'de 48 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin bitmesini takiben parçalar 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Organların trimleri gerçekleştirildikten sonra 2x45 dakika %70, % 80, %95 ve %96'lık artan alkol serilerinden geçirildi (Etanol, 1.00971.2500, Merck, ABD). Şeffaflaştırma 2x30 dakika ksilol (108661, Merck, USA) ile gerçekleştirildi. Ardından 2x30 dakika parafin (Surgipath EM-400, Leica, GER) içerisinde bekletildi. Doku takibi için Leica TP 1020 (Leica, GER) doku takibi cihazı kullanıldı (GER). Gömme işlemi sonrası bloklar soğumaya bırakıldı. Parafin bloklardan ışık mikroskopik incelemeler için Leica FINESSE ME+ (Leica, GER) mikrotomu ile 5 µm'lik kesitler alındı. Hazırlanan lamlar dokunun lama adezyonunu artırmak için 37°C'lik etüvde 2 saat bekletildi. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi uygulandı. Beyin ve beyincik hasarı histopatolojik değişikliklerin derecesi ve yaygınlığına göre semikantitatif olarak 10 farklı alanda incelendi. Beyin kesitleri, inflamasyon, nöronal dejenerasyon, perinöronal ve perivasküler ödem açısından; beyincik kesitleri ise inflamasyon, Purkinje hücresi dejenerasyonu ve Purkinje hücre kaybı açısından değerlendirildi. Beyin ve beyincik dokuları hasarın şiddetine göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (ağır) olarak skorlandı. Maksimum hasar skoru 9 idi. Preparatlar Nikon Eclipse 80i ışık mikroskobu ve Nikon görüntü analiz sistemi ile incelenerek skorlandı ve fotoğrafları çekildi.

6.2.11. İmmünohistokimyasal İnceleme

Kesitler deparafinizasyon aşaması için sırasıyla 60°C etüvde ve 60°C sıcaklıktaki ksilol içerisinde 1 saat bekletildi. Ardından anti-kaspaz 3 antikoru ile aşağıdaki IHC boyama protokolü uygulandı. Preparatlar entallen ile kapatılarak Nikon Eclipse 80i digital kamera takılı ışık mikroskobu (Nikon, JAP) ile fotoğraflandı.

IHC değerlendirme: Tüm gruplar için, her X20 büyütme alanında en az 100 hücre işaretlendi. Kesitlerde, boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin kriter olarak alındığı semikantitatif bir yöntemle skorlama yapıldı. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. Her kesit için immünohistokimyasal boyanma skorlaması, H-Skoru adı verilen ve (I x PC), (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) formülüyle hesaplanan bir skorlama algoritması kullanılarak yapıldı.

6.2.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (SPSS for Windows version 14.0) istatistiksel yazılım programı ile yapıldı. Tüm sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi. Tüm gruplardaki ölçülebilir değişkenlerin Shapiro Wilk normallik testine göre normal dağılım göstermediği saptandı ($p > 0.05$). Bu nedenle istatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanılırken, grupların ikili karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BÖLÜM 7

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

7.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR

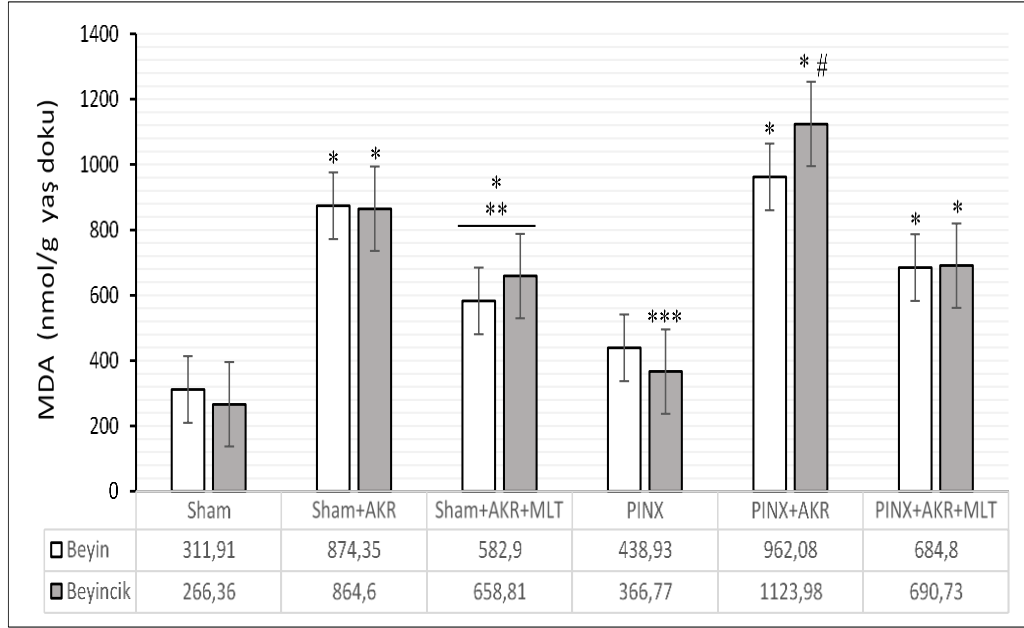
7.1.1 Oksidatif Hasar Seviyeleri

Pinealektomi ve akrilamid uygulanmış ratlarda melatonin tedavisi ile beyin ve beyincik dokularında oksidan-antioksidan seviyelerini ortaya koymak için doku MDA, GSH, TAS, TOS ve OSİ seviyeleri ile SOD ve CAT enzimlerinin aktivite analizi çalışılmıştır.

7.1.1.1. Beyin/Beyincik Dokusu MDA ve GSH Seviyeleri

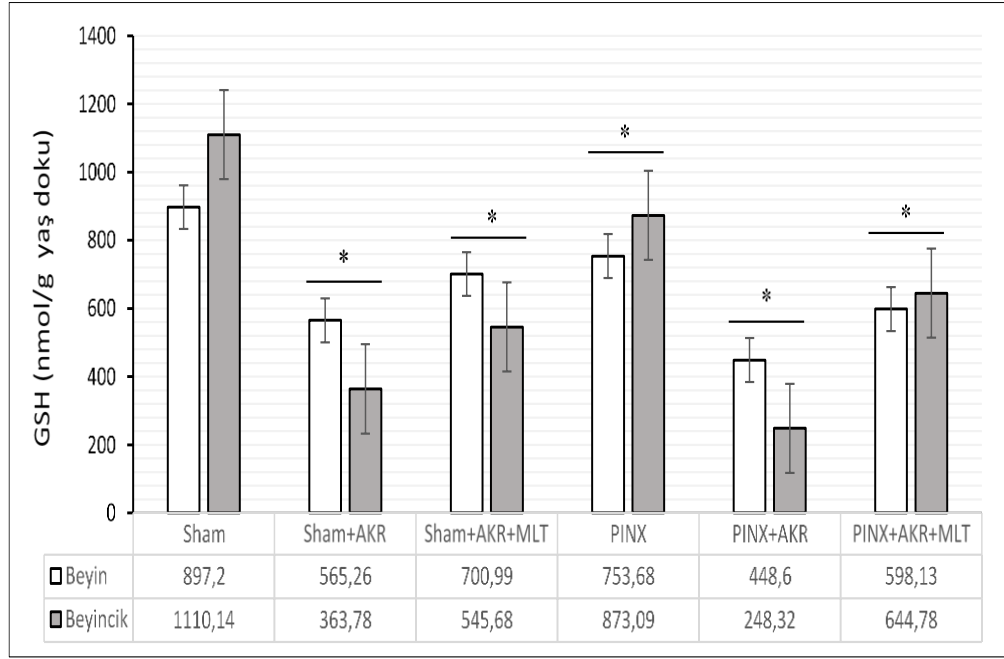
Ratlara akrilamid uygulaması sonucu hem beyin hemde beyincik dokularında Sham grubuna göre MDA seviyelerinde ciddi artışa neden olurken ($p < 0.001$) (Şekil 7.1), GSH seviyelerinde ise ciddi düşümlere ($p < 0.001$) (Şekil 7.2) neden olmuştur. İlave olarak akrilamid ile birlikte melatonin tedavisi yapılan Sham+AKR+MLT grubunda, tedavi yapılmayan Sham+AKR grubuna göre MDA ve GSH seviyelerinde ciddi iyileşmeler ($p < 0.01$) olduğu gözlemlenmiştir.

Pinealektomi işlemiyle birlikte beyin ve beyincikte melatonin yoksunluğuna bağlı olarak beyin ve beyincik GSH seviyelerinde Sham grubuna göre ciddi düşümler ($p < 0.001$) oluşmasına neden olurken MDA seviyesinde beyincikte anlamlı artışlar ($p < 0.005$) oluşurken beyinde anlamlı olmayan artışa neden olmuştur.



Şekil 7.1. Beyin/beyin dokusu MDA seviyeleri (nmol/g yaş doku).

Pinealektomi sonrası akrilamid uygulaması yapıldığında pinealektomi grubuna göre MDA seviyesi beyin ve beyincikte ciddi artışa neden ($p < 0.001$) olurken GSH seviyelerinde ise ciddi düşümlere neden olmuştur. Diğer yandan PINX+AKR grubuna ait beyin ve beyincik GSH seviyelerinin Sham+AKR grubuna göre ciddi düşüme ($p < 0.001$) neden olurken beyincik MDA seviyelerinde ciddi artış ($p < 0.05$) olduğu gözlenmiştir. Ancak pinealektomi sonrası akrilamid ile birlikte melatonin tedavisi yapıldığında PINX+AKR+MLT grubuna ait beyin ve beyincik dokularının MDA seviyelerinin tedavi yapılmayan PINX+AKR grubuna göre ciddi düşüşler ($p < 0.001$), GSH seviyelerinde ise ciddi iyileşmeler ($p < 0.001$) gözlemlenmiştir.



Şekil 7.2. Beyin/beyin dokusu GSH seviyeleri (nmol/g yaş doku).

Beyin ve beyincik dokusuna ait MDA ve GSH seviyelerinin karşılaştırıldığı çizelge aşağıda sunulmuştur (Çizelge 7.1).

Çizelge 7.1. Beyin/beyin dokusu MDA ve GSH seviyelerinin karşılaştırılması.

Gruplar	Beyin MDA (nmol/g yaş doku)	Beyin GSH (nmol/g yaş doku)	Beyincik MDA (nmol/g yaş doku)	Beyincik GSH (nmol/g yaş doku)
Sham	311.91±29.37	897.20±18.10	266.36±17.33	1110.14±22.74
Sham+AKR	874.35±69.62 ^a	565.26±7.65 ^a	864.60±57.80 ^a	363.78±7.40 ^a
Sham+AKR+MLT	582.90±46.41 ^{a,b}	700.99±13.93 ^{a,b}	658.81±25.03 ^{a,b}	545.68±11.11 ^{a,b}
PINX	438.93±46.97	753.68±10.20 ^a	366.77±21.02 ^g	873.09±17.78 ^a
PINX+AKR	962.08±59.62 ^c	448.60±9.05 ^{c,e}	1123.98±75.14 ^{c,h}	248.32±8.68 ^{c,e}
PINX+AKR+MLT	684.80±25.25 ^{c,d}	598.13±12.07 ^{c,d,f}	690.73±34.08 ^{c,d}	644.78±22.65 ^{c,d,f}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^ap< 0.001 vs grup 1

^bp< 0.01 vs grup 2

^cp< 0.001 vs grup 4

^dp< 0.001 vs grup 5

^ep< 0.001 vs grup 2

^fp< 0.001 vs grup 3

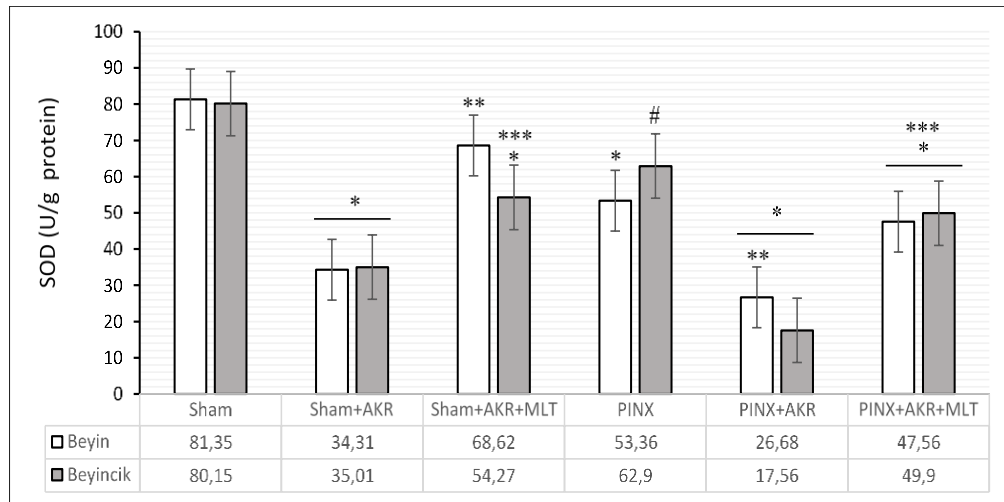
^gp< 0.005 vs grup 1

^hp< 0.05 vs grup 2

7.1.1.2. Beyin/Beyincik Dokusu SOD ve CAT Enzim Aktivite Seviyeleri

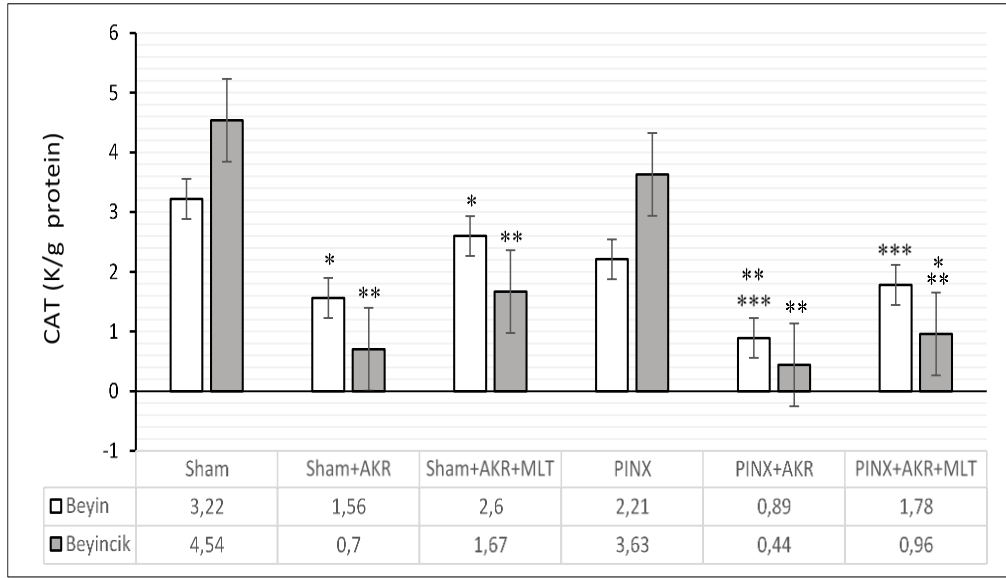
Ratlara akrilamid uygulaması Sham grubuna göre beyin ve beyincik SOD aktivitelerinde ($p<0.001$) (Şekil 7.3); beyin ($p<0.05$) ve beyincik ($p<0.001$) (Şekil 7.4). CAT aktivitelerinde ciddi düşüslere neden olmuştur. Diğer yandan akrilamid ile birlikte melatonin tedavisi yapılan Sham+AKR+MLT grubunda, tedavi yapılmayan Sham+AKR grubuna göre beyin ($p<0.001$) ile beyincik SOD ($p<0.005$) aktivitelerinde ve beyin ($p<0.05$) ile beyincik ($p<0.001$) CAT aktivitelerinde ciddi iyileşmeler olmuştur.

Pinealektomi işlemi beyin ($p<0.001$) ile beyincik ($p<0.05$) SOD aktivitelerinde Sham grubuna göre ciddi düşüslere neden olurken, CAT aktivitelerinde anlamlı olmayan düşüsler oluşturmuştur Pinealektomi ile melatonin yoksunluğu oluşturularak akrilamid uygulanması yapılan PINX+AKR grubunda, PINX grubuna göre beyin ile beyincik SOD aktivitelerinde ($p<0.001$) ve beyin ($p<0.005$) ile beyincik ($p<0.001$) CAT aktivitelerinde düşüslere neden olmuştur.



Şekil 7.3. Beyin ve beyincik dokusuna ait SOD enzim aktivite seviyeleri (U/g protein).

Ancak pinealektomi işlemi sonrası akrilamid ile birlikte melatonin tedavisi yapılan PINX+AKR+MLT grubunda tedavi yapılmayan pinealektomili PINX+AKR grubuna kıyasla beyin ile beyincik SOD enzim aktivitelerinde ($p<0.001$) ve beyin ($p<0.005$) ile beyincik ($p<0.001$) CAT enzim aktivitelerinde ciddi iyileşmeler olduğu gözlenmiştir



Şekil 7.4. Beyin ve beyincik dokusuna ait CAT enzim aktivite seviyeleri (U/g protein).

Beyin ve beyincik dokusuna ait SOD ve CAT enzim aktivitelevlerinin karşılaştırıldığı çizelge aşağıda sunulmuştur (Çizelge 7).

Çizelge 7.2. Beyin/beyin dokusu SOD ve CAT enzim aktivitelevlerinin karşılaştırılması.

Gruplar	Beyin SOD (U/g protein)	Beyin CAT (K/g protein)	Beyincik SOD (U/g protein)	Beyincik CAT (K/g protein)
Sham	81.35±2.89	3.22±0.44	80.15±5.46	4.54±0.49
Sham+AKR	34.31±2.30 ^a	1.56±0.11 ^h	35.01±2.46 ^a	0.70±0.07 ^a
Sham+AKR+MLT	68.62±4.61 ^{b,c}	2.60±0.39 ^d	54.27±4.05 ^{a,k}	1.67±0.21 ^{a,c}
PINX	53.36±3.90 ^a	2.21±0.31	62.90±2.54 ^b	3.63±0.39
PINX+AKR	26.68±1.99 ^{d,e}	0.89±0.09 ^{c,i}	17.56±6.12 ^{c,e}	0.44±0.02 ^{c,e}
PINX+AKR+MLT	47.56±3.54 ^{f,g}	1.78±0.18 ^j	49.90±3.27 ^{i,f}	0.96±0.12 ^{e,f,m}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^ap< 0.001 vs grup 1

^bp< 0.05 vs grup 1

^cp< 0.001 vs grup 2

^dp< 0.05 vs grup 2

^ep< 0.001 vs grup 4

^fp< 0.001 vs grup 5

^gp< 0.005 vs grup 3

^hp< 0.05 vs grup 1

ⁱp< 0.005 vs grup 4

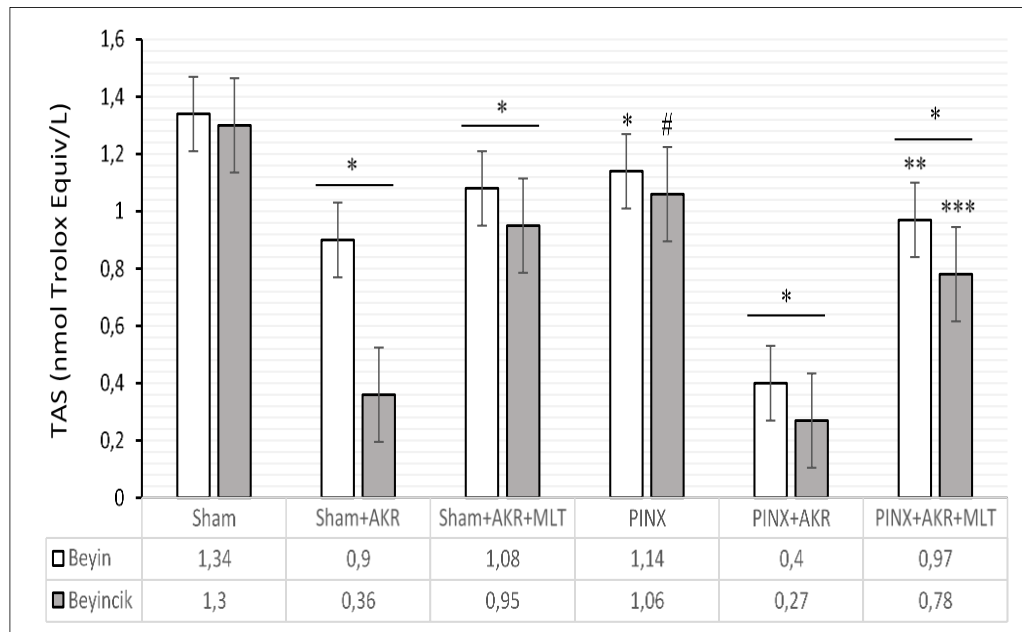
^jp< 0.005 vs grup 5

^kp< 0.005 vs grup 2

^mp< 0.05 vs grup 3

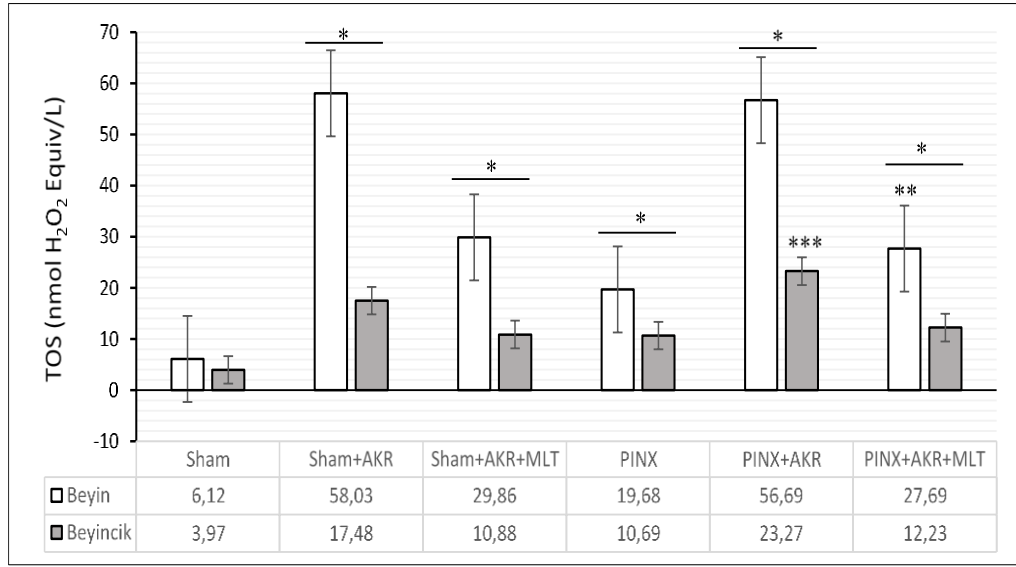
7.1.1.3. Beyin/Beyincik Dokusu TAS, TOS ve OSI Seviyeleri

Ratlara akrilamid uygulaması Sham grubuna göre beyin ve beyincik dokularında TAS seviyelerinde ciddi düşümlere ($p<0.001$) (Şekil 7.5), TOS ($p<0.001$) (Şekil 7.6) ve OSI ($p<0.001$) (Şekil 7.7) seviyelerinde ise ciddi artışlara ($p<0.001$) neden olmuştur. Ayrıca akrilamid ile birlikte melatonin tedavisi yapılan Sham+AKR+MLT grubunda, tedavi yapılmayan Sham+AKR grubuna kıyasla beyin ve beyincik dokularında ciddi iyileşmeler yaparak TAS seviyelerinin artışına ($p<0.001$), TOS ve OSI seviyelerinin ise düşüşüne ($p<0.001$) neden olmuştur. Diğer yandan ratlara pinealektomi yapılarak melatonin yoksunluğu oluşturulması Sham grubuna göre beyin ($p<0.001$) ile beyincik TAS seviyelerinde ($p<0.01$) ciddi düşümler, beyin ile beyincik TOS ve OSI seviyelerinde ciddi artışlar ($p<0.001$) gözlenmesine neden olmuştur.



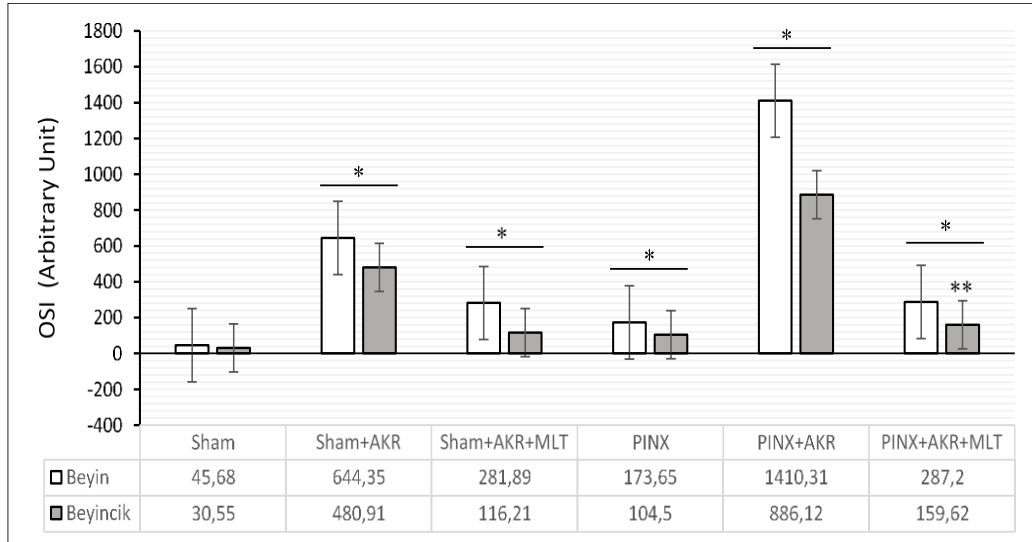
Şekil 7.5. Beyin ve beyincik dokusuna ait TAS seviyeleri (U/g protein).

Pinealektomili ratlara akrilamid uygulanan PINX+AKR grubunun, akrilamid uygulanmayan PINX grubuna kıyasla beyin ve beyincik dokularındaki TAS seviyelerinde ciddi düşüme ($p<0.001$), TOS ve OSI düzeylerinde ise ciddi artışa ($p<0.001$) neden olmuştur.



Şekil 7.6. Beyin ve beyincik dokusuna ait TOS seviyeleri (U/g protein).

Ancak pinealektomili ratlara akrilamid ile birlikte melatonin verilen PINX+AKR+MLT grubu, melatonin tedavisi yapılmayan PINX+AKR grubuna kıyasla beyin ve beyincikteki TAS, TOS ve OSI seviyelerinde ciddi iyileşmeler olmuştur ($p < 0.001$).



Şekil 7.7. Beyin ve beyincik dokusuna ait OSI seviyeleri (Arbitrary Unit).

Beyin ve beyincik dokusuna ait TAS ve TOS ve OSI seviyeleri aşağıdaki çizelgede sunulmuştur (Çizelge 7.3, Çizelge 7.4).

Çizelge 7.3. Beyin/beyin dokusu TAS, TOS seviyeleri.

Gruplar	Beyin TAS (nmol Trolox Equiv/L)	Beyin TOS (μ mol H ₂ O ₂ Equiv/L)	Beyincik TAS (nmol Trolox Equiv/L)	Beyincik TOS (μ mol H ₂ O ₂ Equiv/L)
Sham	1.34±0.02	6.12±0.62	1.30±0.01	3.97±0.39
Sham+AKR	0.90±0.01 ^a	58.03±3.17 ^a	0.36±0.00 ^a	17.48±0.90 ^a
Sham+AKR+MLT	1.08±0.04 ^{a,b}	29.86±1.15 ^{a,b}	0.95±0.06 ^{a,b}	10.88±0.91 ^{a,b}
PINX	1.14±0.03 ^a	19.68±0.78 ^a	1.06±0.06 ^g	10.69±0.65 ^a
PINX+AKR	0.40±0.01 ^{c,b}	56.69±2.64 ^c	0.27±0.01 ^c	23.27±2.17 ^{c,h}
PINX+AKR+MLT	0.97±0.04 ^{d,e,f}	27.69±2.17 ^e	0.78±0.04 ^{e,f}	12.23±0.63 ^e

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^a p< 0.001 vs grup 1

^b p< 0.001 vs grup 2

^c p< 0.001 vs grup 4

^d p< 0.05 vs grup 4

^e p< 0.001 vs grup 5

^f p< 0.005 vs grup 4

^g p< 0.01 vs grup 1

^h p< 0.05 vs grup 2

Çizelge 7.4. Beyin/beyin dokusu OSI seviyesi.

Gruplar	Beyin OSI (Arbitrary Unit)	Beyincik OSI (Arbitrary Unit)
Sham	45.68±4.96	30.35±2.84
Sham+AKR	644.35±31.59 ^a	480.91±29.59 ^a
Sham+AKR+MLT	281.89±18.98 ^{a,b}	116.21±10.87 ^{a,b}
PINX	173.65±8.03 ^a	104.50±9.21 ^a
PINX+AKR	1410.31±60.11 ^{b,c}	886.12±119.62 ^{b,c}
PINX+AKR+MLT	287.20±22.57 ^{c,d}	159.62±9.93 ^{c,d,e}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^a p< 0.001 vs grup 1

^b p< 0.001 vs grup 2

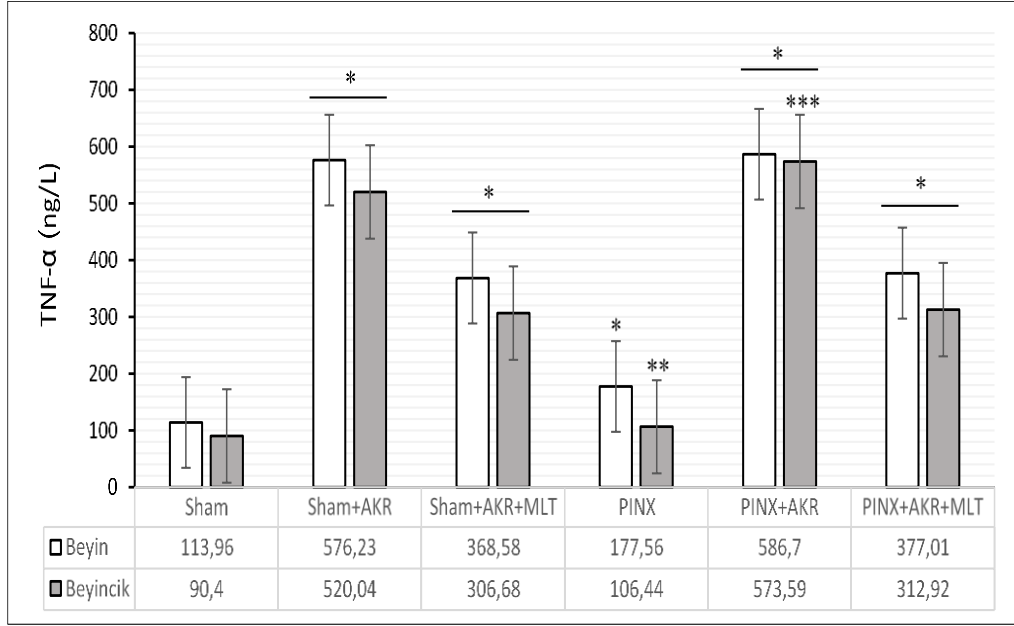
^c p< 0.001 vs grup 4

^d p< 0.001 vs grup 5

^e p<0.005 vs grup 3

7.1.2. Beyin/Beyincik Dokusu TNF- α Seviyeleri

Ratlara akrilamid uygulaması beyin ve beyincik dokusunda Sham grubuna göre TNF- α seviyelerinde ciddi artışa ($p < 0.001$) (Şekil 7.8) neden olmuştur.



Şekil 7.8. Beyin ve beyincik dokusuna ait TNF- α seviyeleri (ng/L).

Akrilamid uygulamasının melatoninle birlikte yapıldığı Sham+AKR+MLT grubunda ise beyin ve beyincikteki TNF α seviyelerinde ciddi gerilemeler gözlenmesine neden olmuştur ($p < 0.001$).

Ratlara pinealektomi işlemi ile melatonin yoksunluğu oluşturulan PINX grubunda, Sham grubuna göre beyin ($p < 0.001$) ve beyincikte ($p < 0.005$) TNF α seviyelerinde artış gözlenmesine neden olmuştur. Diğer yandan pinealektomi işlemi sonrası akrilamid uygulanması PINX+AKR grubunda, pinealektomi yapılan PINX grubuna kıyasla beyin ve beyincikteki TNF α seviyelerinde ciddi artışlar oluşmasına ($p < 0.001$) neden olmuştur. Ancak pinealektomi sonrası akrilamid ile birlikte melatonin tedavisi yapılan PINX+AKR+MLT grubu, tedavi yapılmayan PINX+AKR grubuna kıyasla beyin ve beyincik TNF α seviyelerinde ciddi düzelmeler olduğu gözlenmiştir ($p < 0.001$).

Beyin ve beyincik dokusuna ait TNF α seviyeleri aşağıdaki çizelgede (Çizelge 7.5) sunulmuştur.

Çizelge 7.5. Beyin/beyin dokusu ait TNF α seviyeleri.

Gruplar	Beyin TNF- α (ng/L)	Beyincik TNF- α (ng/L)
Sham	113.96 \pm 6.34	90.40 \pm 3.97
Sham+AKR	576.23 \pm 14.93 ^a	520.04 \pm 14.38 ^a
Sham+AKR+MLT	368.58 \pm 17.25 ^{a,b}	306.68 \pm 10.04 ^{a,b}
PINX	177.56 \pm 10.96 ^a	106.44 \pm 3.54 ^c
PINX+AKR	586.70 \pm 12.73 ^c	573.59 \pm 20.93 ^{c,f}
PINX+AKR+MLT	377.01 \pm 10.46 ^{c,d}	312.92 \pm 18.03 ^{c,d}

Veriler aritmetik ortalama \pm SE olarak ifade edildi (n=10).

^a p< 0.001 vs grup 1

^b p< 0.001 vs grup 2

^c p< 0.001 vs grup 4

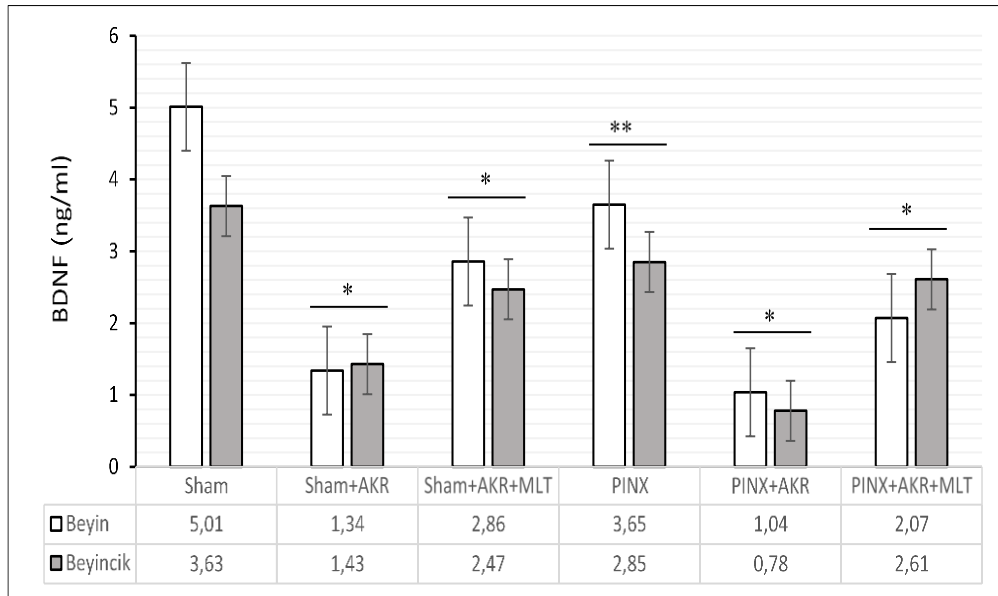
^d p< 0.001 vs grup 5

^e p<0.005 vs grup 1

^f p< 0.05 vs grup 2

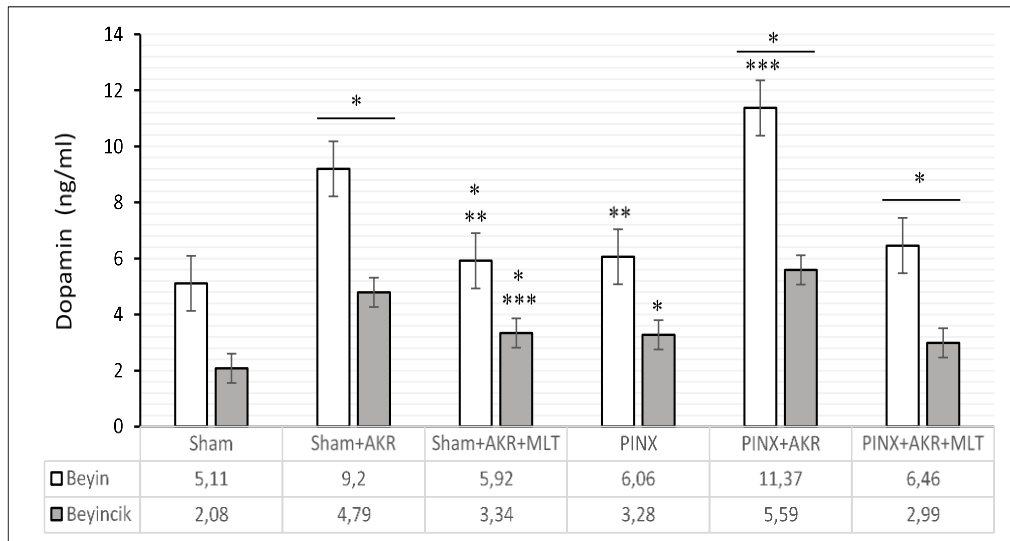
7.1.3. Beyin/Beyincik Dokusu BDNF ve Dopamin Seviyeleri

Ratlara akrilamid uygulaması yapılan Sham+AKR grubu, Sham grubuna göre beyin ve beyincik dokuları BDNF seviyelerinde ciddi düşüşlere (p<0.001) (Şekil 7.9) neden olurken, dopamin seviyelerinde ise ciddi artışlara (p<0.001) (Şekil 7.10) neden olmuştur. Ancak akrilamid uygulaması ile birlikte melatonin tedavisi yapılan Sham+AKR+MLT grubu, melatonin tedavisi yapılmayan Sham +AKR grubuna kıyasla beyin ve beyincik BDNF seviyelerinde artış oluşmasına neden olurken (p<0.001), dopamin seviyelerinde beyin (p<0.001) ve beyincikte (p<0.005) ciddi düşüşler oluşmasına neden olmuştur.



Şekil 7.9. Beyin ve beyincik dokusuna ait BDNF seviyeleri (ng/ml).

Ratlara pinealektomi yapılarak melatonin yoksunluğu oluşturulan PINX grubu, Sham grubuna göre beyin ve beyincik dokularında BDNF seviyelerinde ciddi düşüşe ($p < 0.05$) neden olurken, dopamin seviyeleri beyin ($p < 0.05$) ve beyincik ($p < 0.001$) dokularında artış gözlenmesine neden olmuştur.



Şekil 7.10. Beyin ve beyincik dokusuna ait dopamin seviyeleri (ng/ml).

Diğer yandan pinealektomi sonrası ratlara akrilamid uygulanan PINX+AKR grubu, akrilamid verilmeyen pinealektomi işlemi uygulanan PINX grubuna kıyasla beyin ve

beyincik dokularında BDNF seviyelerinde ciddi düşüşler ($p<0.001$) gözlenmesine, dopamin seviyelerinde ise ciddi artış gözlenmesine ($p<0.001$) neden olmuştur. Ancak pinealektomi işlemi uygulanan ve akrilamid yanında melatonin takviyesi yapılan PINX+AKR+MLT gruba, tedavi yapılmayan PINX+AKR grubuna kıyasla beyin ve beyincik dokularında BDNF ve dopamin düzeylerinde ciddi iyileşmeler gözlenmiştir ($p<0.001$).

Beyin ve beyincik dokusuna ait BDNF ve dopamin seviyeleri aşağıdaki çizelgede sunulmuştur (Çizelge 7.6).

Çizelge 7.6. Beyin ve beyincik dokusuna ait BDNF ve dopamin seviyeleri.

Gruplar	Beyin BDNF (ng/ml)	Beyin Dopamin (ng/ml)	Beyincik BDNF (ng/ml)	Beyincik Dopamin (ng/ml)
Sham	5.01±0.40	5.11±0.25	3.63±0.25	2.08±0.21
Sham+AKR	1.34±0.11 ^a	9.20±0.44 ^a	1.43±0.11 ^a	4.79±0.37 ^a
Sham+AKR+MLT	2.86±0.29 ^{a,b}	5.92±0.21 ^{b,c}	2.47±0.14 ^{a,b}	3.34±0.10 ^{a,f}
PINX	3.65±0.17 ^c	6.06±0.29 ^c	2.85±0.15 ^c	3.28±0.16 ^a
PINX+AKR	1.04±0.08 ^d	11.37±0.44 ^{d,f}	0.78±0.07 ^d	5.59±0.44 ^d
PINX+AKR+MLT	2.07±0.24 ^{d,e}	6.46±0.35 ^e	2.61±0.15 ^{e,b}	2.99±0.16 ^e

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^ap< 0.001 vs grup 1

^bp< 0.001 vs grup 2

^cp< 0.05 vs grup 1

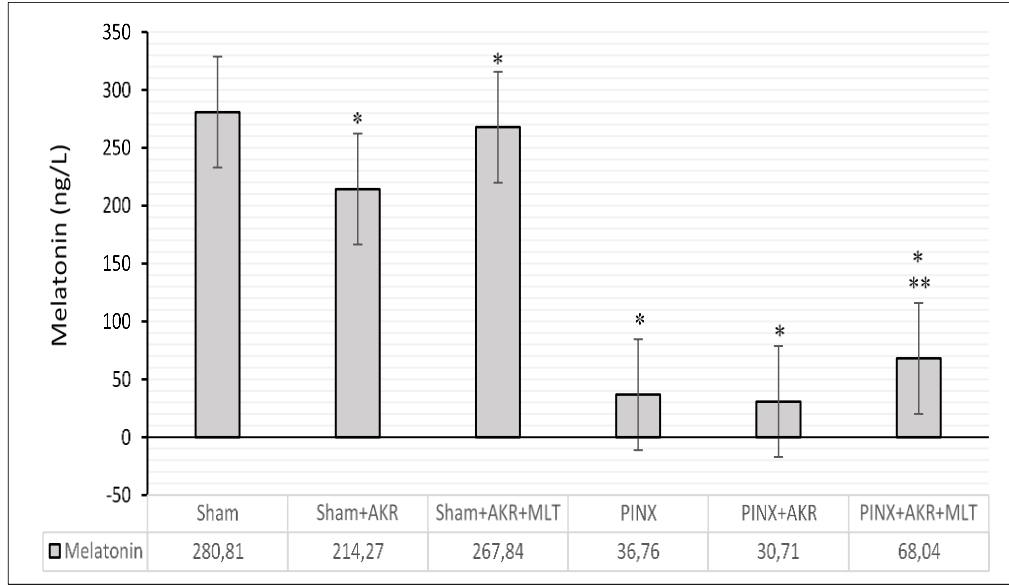
^dp< 0.001 vs grup 4

^ep<0.001 vs grup 5

^fp< 0.005 vs grup 2

7.1.4. Serum Melatonin Seviyeleri

Pinealektomi işlemi yapılan PINX gruplarında melatonin ($p<0.001$) (Şekil 7.11) seviyelerinin Sham gruplarına kıyasla ciddi oranda azalarak melatonin yoksunluğu olduğu gözlenmiştir. Pinealektomi sonrası melatonin uygulanan PINX+AKR+MLT grubu, melatonin uygulanmayan pinealektomi işlemi uygulanan PINX gruplarına kıyasla anlamlı artış ($p<0.005$) oluşturmuştur.



Şekil 7.11. Grupların serum melatonin seviyeleri (ng/L).

Serum melatonin seviyeleri aşağıdaki çizelgede sunulmuştur (Çizelge 7.7).

Çizelge 7.7. Serum melatonin seviyeleri.

Gruplar	Melatonin (ng/L)
Sham	280.81±10.44
Sham+AKR	214.27±11.35 ^a
Sham+AKR+MLT	267.84±14.19 ^b
PINX	36.76±6.56 ^a
PINX+AKR	30.71±4.90 ^c
PINX+AKR+MLT	68.04±5.68 ^{d,e,f}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^a p< 0.001 vs grup 1

^b p< 0.005 vs grup 2

^c p< 0.001 vs grup 2

^d p< 0.005 vs grup 4

^e p<0.001 vs grup 5

^f p< 0.001 vs grup 3

7.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Sham grubuna ait beyin ve beyincik dokuları normal histolojik görünümdeydi. PINX grubunda hafif derecede hasar mevcuttu (Şekil 7.12). Sham ve PINX gruplarının hasar skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0.005$, $p<0.001$, sırasıyla beyin ve beyincik için). Sham+AKR grubu ve PINX+AKR grubuna ait beyin dokularında; koroid pleksusta ve diğer alanlarda konjesyon, perivasküler ödem, inflamasyon, nöronal dejenerasyon ve perinöronal ödem tespit edildi. Beyincikte ise; dejenere Purkinje hücresi, Purkinje hücre kaybı ve inflamasyon alanları tespit edildi (Şekil 7.13). Sham+AKR grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru beyin için 1.70 ± 0.21 ve beyincik için 1.40 ± 0.16 idi. PINX+AKR grubunda ise hasarın şiddeti hem beyinde hem de beyincikte artmıştı. Beyin dokusunda yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu dikkat çekiciydi. PINX+AKR grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru beyin için 5.30 ± 0.30 ve beyincik için 3.00 ± 0.33 idi. Sham+AKR+MLT grubu ve PINX+AKR+MLT grubunda histopatolojik değişikliklerin hem beyin dokusunda hem de beyincikte belirgin olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 7.14). Sham+AKR grubu ve Sham+AKR+MLT grubu karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p<0.001$, $p<0.005$, sırasıyla beyin ve beyincik için). PINX+AKR grubu ve PINX+AKR+MLT grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.001$, $p<0.005$, sırasıyla beyin ve beyincik için). Her grup ve organ için ortalama histopatolojik hasar skoru aşağıdaki tabloda verildi (Çizelge 7.8).

Çizelge 7.8. Beyin/beyincik dokusu histopatolojik hasar skoru.

Gruplar	Beyin Hasar Skoru	Beyincik Hasar Skoru
Sham	0.30±0.15	0.10±0.10
Sham+AKR	3.40±0.30 ^a	2.60±0.22 ^a
Sham+AKR+MLT	1.70±0.21 ^{a,b}	1.40±0.16 ^{a,f}
PINX	1.30±0.15 ^c	1.40±0.16 ^a
PINX+AKR	5.30±0.30 ^{b,d}	3.00±0.33 ^d
PINX+AKR+MLT	2.30±0.26 ^{d,e}	1.60±0.16 ^g

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^ap< 0.001 vs grup 1

^bp< 0.001 vs grup 2

^cp< 0.005 vs grup 1

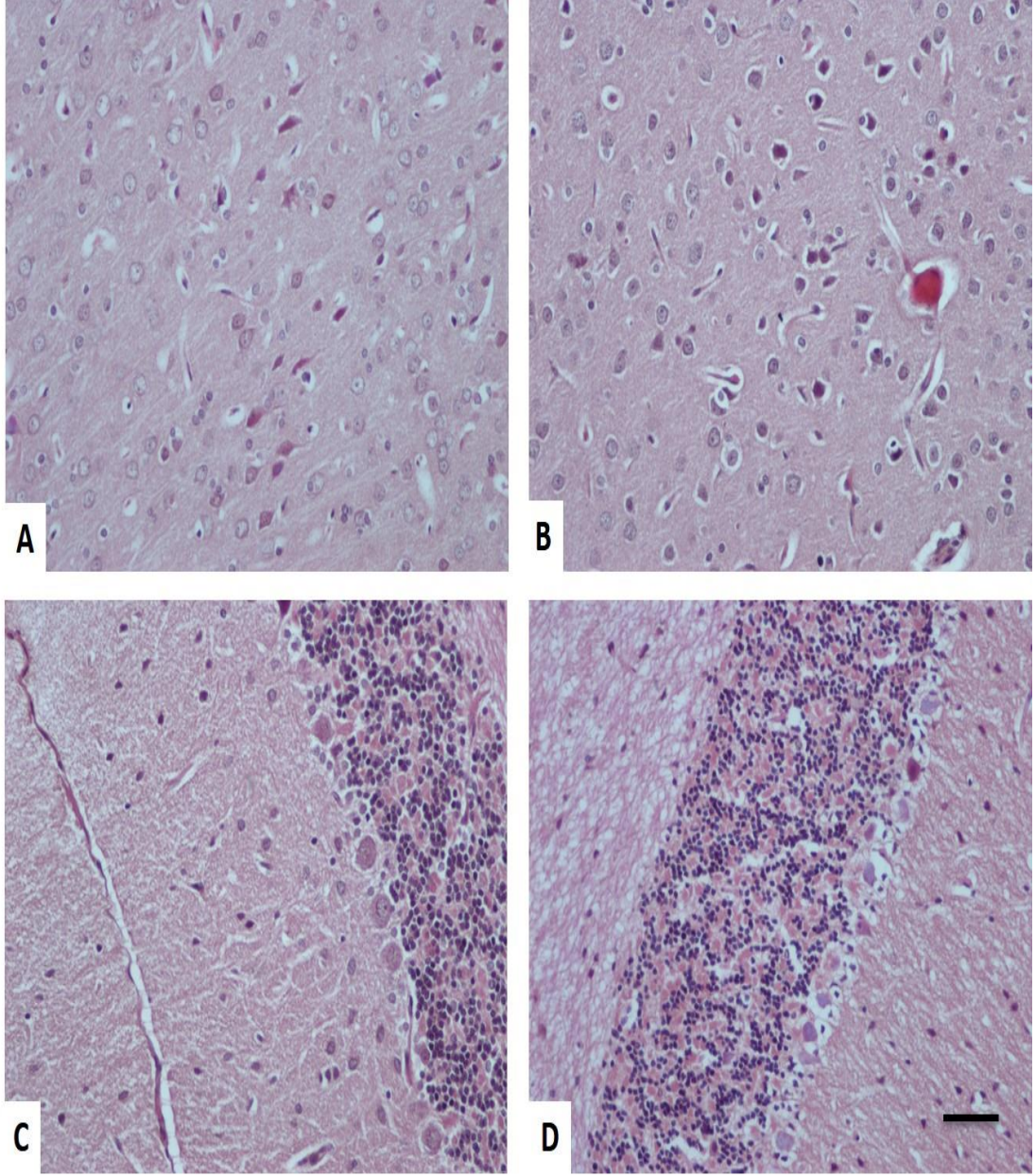
^dp< 0.001 vs grup 4

^ep< 0.001 vs grup 5

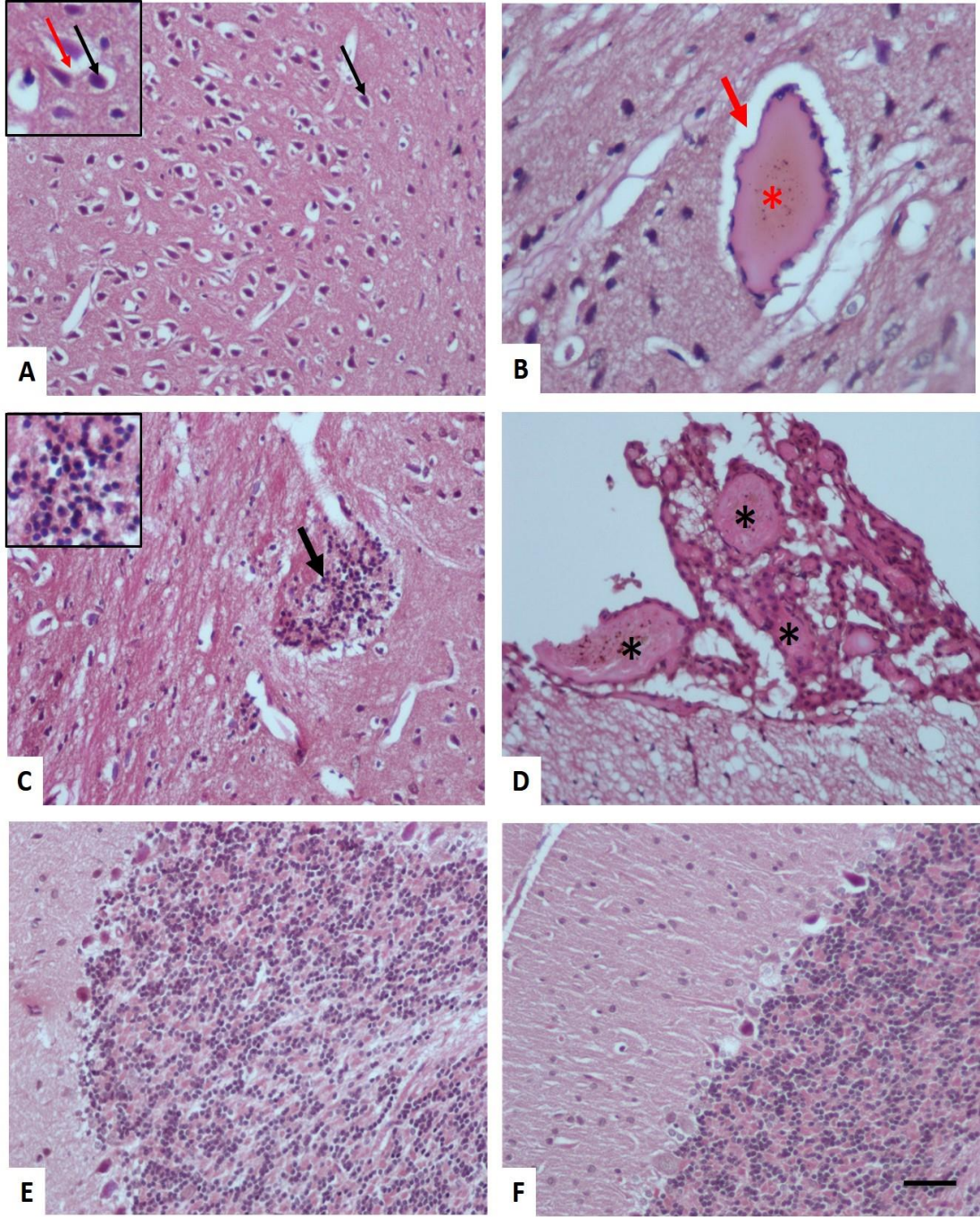
^fp< 0.005 vs grup 2

^gp< 0.005 vs grup 5

Sham grubuna ait beyin ve beyincik dokuları normal histolojik görünümdeydi.



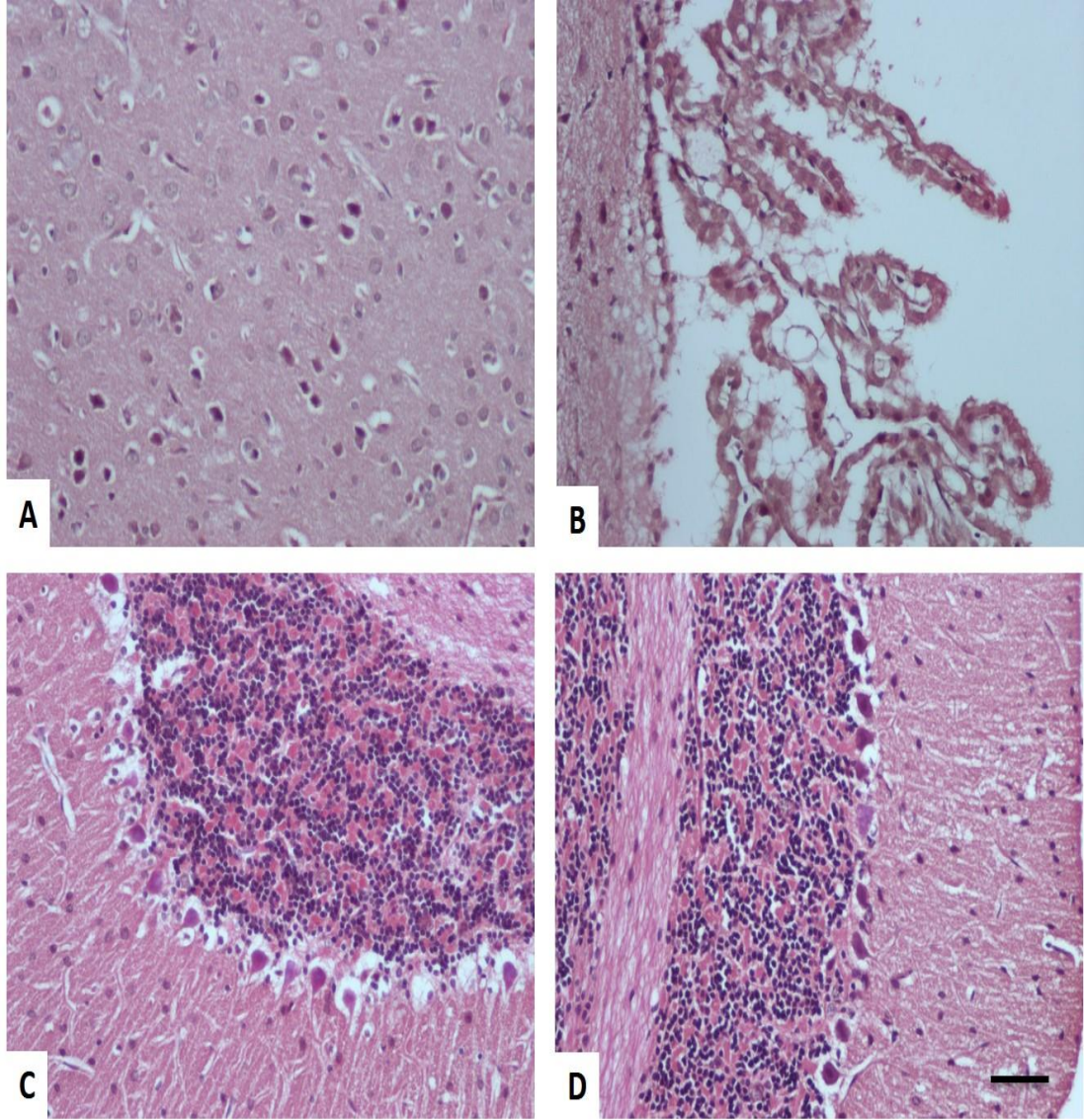
Şekil 7.12. Sham ve PINX gruplarına ait beyin ve beyincik dokuları histopatolojisi. **A.** Sham grubu (beyin), **B.** Sham grubu (beyincik). PINX grubunda hafif hasar mevcuttu. **C.** PINX grubu (beyin), **D.** PINX grubu (beyincik). H-E; X20. Bar: 20 μ m.



Şekil 7.13. Sham+AKR ve PINX+AKR gruplarına ait beyin ve beyincik dokuları histopatolojisi **A.** Sham+AKR grubu (beyin), **B.** Sham+AKR grubu (beyin), **C.** PINX+AKR grubu (beyin), **D.** PINX+AKR grubu (beyin), **E.** Sham+AKR grubu (beyincik), **F.** PINX+AKR grubu (beyincik). H-E; X20. Bar: 20 µm.

Sham +AKR ve PINX+AKR gruplarına ait beyin dokusunda koroid plexusta (siyah asterisk) ve diğer alanlarda konjesyon (kırmızı asterisk), yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu (siyah kalın ok), nöronal dejenerasyonu (siyah ince ok), perinöronal

(kırmızı ince ok) ve perivasküler ödem (kırmızı kalın ok) içeren hasarlı alanlar bulunmaktaydı. PINX+AKR grubundaki hasar daha şiddetliydi. Sham+AKR ve PINX+AKR gruplarına ait beyincikte dokusunda dejenere Purkinje hücresi (siyah kalın ok), Purkinje hücre kaybı ve inflamasyon alanları tespit edildi. PINX+AKR grubundaki hasar daha şiddetliydi.



Şekil 7.14. Sham+AKR+MLT ve PINX+AKR+MLT gruplarına ait beyin ve beyincik dokuları histopatolojisi **A.** Sham+AKR+MLT grubu (beyin), **B.** PINX+AKR+MLT grubu (beyin), **C.** Sham+AKR+MLT grubu (beyincik), **D.** PINX+AKR+MLT grubu (beyincik). H-E; X20. Bar: 20 µm.

Akrilamid kaynaklı beyin ve beyincik hasarında melatoninin etkisiyle histopatolojik değişikliklerde belirgin azalma gözlemlendi.

7.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

7.3.1 Kaspaz-3 İmmünoreaktivitesi

Sham ve PINX grupları ile karşılaştırıldığında, akrilamid uygulanan hasar gruplarında ait beyin dokularındaki kaspaz-3 ifadesinin artmış olduğu tespit edildi. PINX grubunda kaspaz-3 ifadesi hafif şiddetteyken, Sham+AKR ve PINX+AKR gruplarında ise ifadenin yüksek şiddette olduğu görüldü (Şekil 7.15). Melatonin ile kaspaz-3 ifadesinin şiddetinde azalma tespit edildi. Kaspaz-3 immün boyamasına ait H-skoru aşağıdaki tabloda gösterildi (Çizelge 7.9).

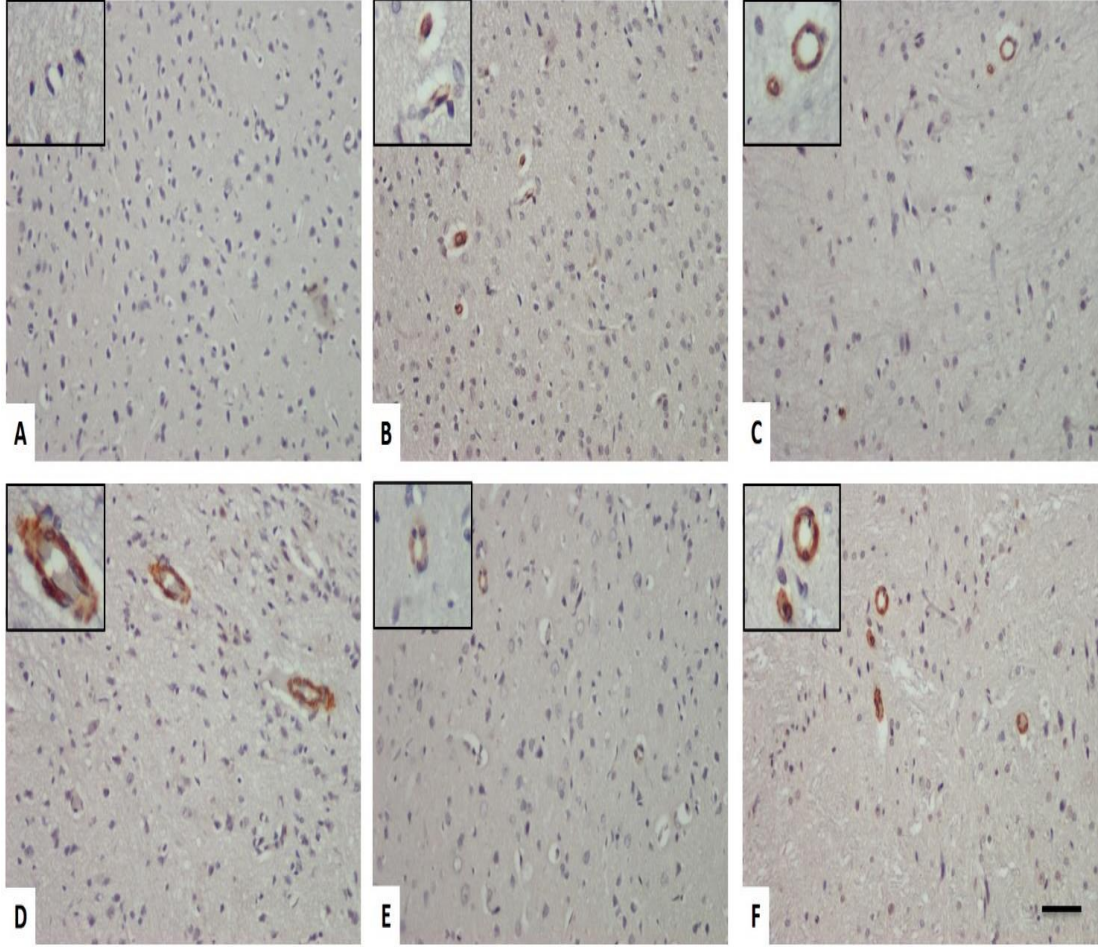
Çizelge 7.9 Beyin dokusundaki Kaspaz-3 immünoreaktivitesi.

Gruplar	H-Skoru
Sham	124.00±6.35
Sham+AKR	212.50±7.64 ^a
Sham+AKR+MLT	154.50±7.39 ^{b,c}
PINX	154.50±9.32
PINX+AKR	293.00±10.41 ^{c,d}
PINX+AKR+MLT	208.00±16.63 ^{e,f,g}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^a p< 0.001 vs grup 1 ^b p< 0.005 vs grup 1 ^c p< 0.001 vs grup 2 ^d p< 0.001 vs grup 4

^e p< 0.001 vs grup 3 ^f p< 0.01 vs grup 4 ^g p< 0.001 vs grup 5



Şekil 7.15. Kaspaz-3 immünoreaktivitesi **A.** SHAM grubu, **B.** PINX grubu, **C.** SHAM+AKR grubu, **D.** PINX+AKR grubu, **E.** SHAM+AKR +MLT grubu, **F.** PINX+AKR+MLT grubu. Anti-kaspaz-3; X20. Bar: 20 µm.

Sham grubuna ait beyin dokusunda az yoğunlukta boyanma vardı. PINX grubunda ise boyanma hafif şiddetdeydi. Sham+AKR ve Sham+AKR +PINX gruplarında en şiddetli boyanma mevcuttu. Bu gruplara melatonin uygulanması ile Kaspaz-3 ile boyanma yoğunluğunun azaldığı tespit edildi.

7.4. TARTIŞMA

Suda çözüldüğü bilinen ve toksik bir kimyasal olan akrilamid, özellikle Batı tarzı atıştırmalıklar gibi karbonhidrat açısından zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta pişirilmesi sonucu oluşur [177]. Gastrointestinal sistemden, güçlü bir geçirgen olması sebebiyle, kolayca emilebilir ve dolaşım sistemi aracılığıyla tüm vücuda yayılabilir. İnsanların yaşamları boyunca karbonhidratça zengin gıdaların yüksek ısıda

kızartılması ya da fırınlanması sonucu oluşan küçük miktarlardaki akrilamide kronik olarak maruz kalmaları sonucu toksik etkileri beyin dahil birçok dokuda gözlenmektedir [178]. Bu nedenle, son zamanlarda yapılan çalışmalar, akrilamidin toksik etki mekanizmalarını ortaya çıkarmak ve dokuları onun hasarlarına karşı korumak için yeni terapötik ajanların denendiğini göstermiştir [179]. Bizim çalışmamız bildiğimiz kadarıyla ilk kez yapılmış olup pinealektomi ile vücudun en güçlü antioksidanı olan melatonin hormonunun sentezini yok ederek oksidan saldırılara açık hale getirilen ratlara akrilamid uygulaması sonucu beyin-beyincik dokularındaki nörotoksik etkisi sonucu bozulan oksidan-antioksidan durumu, immünohistokimyası, histopatolojisi ve serum melatonin düzeyi üzerine ekzojen melatoninin tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bulgularımızda ise akrilamidin (25 mg/kg/gün canlı ağırlık) nörotoksitesinin, artan oksidatif stres endeksleri ile kanıtlandığını ve pinealektomiyi takiben beyin ve beyincik dokularının endojen antioksidan statusunun azalmasının, mikromorfolojik değişikliklerinin yanı sıra inflamasyonu ve Kaspaz-3 immünlokalizasyonunu artırdığını ortaya koydu.

Süperoksit, peroksitler ve hidroksil radikalleri gibi ROS'lar oksidatif metabolizma sırasında oluşarak DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna, protein modifikasyonuna ve diğer etkilere aracılık ederek oksidatif hasara neden olur [180]. SOD, CAT gibi enzimatik antioksidanlar ve GSH, melatonin gibi enzimatik olmayan antioksidanlar vücudun antioksidan savunma sistemleri olup normal fizyolojik şartlar altında aktive ederek ROS kaynaklarının hızlıca süpürülmesi ile dokuları oksidatif strese karşı korumakla sorumludurlar [181].

Akrilamid gibi çok sayıda toksik kimyasalın metabolizması sırasında ROS üretimi aşırı derecede artar ve oksidan/antioksidan dengesi oksidanlar lehine bozulur [182]. Beyin dokusunun daha yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri içermesi, daha düşük oranda antioksidan savunma ve nispeten yüksek oksijen tüketim oranı ile daha az rejenerasyon kapasitesi içermesinin yanı sıra, diğer dokulara göre ROS kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı çok daha duyarlı olmasına neden olur [183]. Önceki çalışmalar, aşırı ROS üretiminin akrilamid ile bağlantılı olduğunu ve beyin dokusunda nörodejenerasyon yoluyla fonksiyonel bozukluğa yol açtığını göstermiştir [184, 185]. Ayrıca akrilamid metabolizması sırasında aşırı GSH tüketimi oksidan ve antioksidan

arasındaki dengeyi bozar [186]. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak, bizim çalışmamız bildiğimiz kadarıyla alanında ilk kez yapılmış olup pinealektomiyi takiben endojen melatonin yokluğunda akrilamid uygulaması ile antioksidan enzimlerin aktivitelelerini azaltarak ve lipid peroksidasyonunu pinealektomi yapılmayan ratlara göre daha fazla artırarak oksidatif stresi indüklediğini göstermiştir.

Melatonin hormonunun, serbest radikalleri ya doğrudan nötralize ederek ya da SOD ve GPx dahil olmak üzere antioksidan enzimleri artırarak antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir [187]. Doku antioksidanlarının tüketimi ise hücre içi oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına neden olarak oksidatif hasara neden olmaktadır. El Helaly vd. akrilamidin karaciğer, böbrek ve beyin dokularında oksidatif stresi artırdığı ve -SH gruplarına bağlanarak antioksidan enzim aktivitelelerini azaltarak doku DNA'sında hasara yol açtığını bildirmişlerdir [188]. Ayrıca Jiang vd. MDA'nın aşırı üretiminin ve SOD, CAT ve GPx dahil olmak üzere antioksidan enzimlerin azalmış aktivitesi akrilamidin toksik yan etkileri ile ilişkili olduğunu bildirmiştir [189]. Ayrıca Gür vd. akrilamid uygulaması ile MDA içeriğinde bir artma, GSH içeriğinde ve SOD, CAT ve GPx aktivitelelerinde azalma gözlemlemiştir [190]. Bizim çalışmamızda, pinealektomi sonrası akrilamid ile eş zamanlı olarak ekzojen melatonin ile tedavi edilen ratlarda beyin dokusunun antioksidan kapasitesinde bir iyileşme olduğu ve lipid peroksidasyonunun azaldığını görüldü. İlginç bir şekilde, sonuçlarımız akrilamide maruz bırakılan sham pinealektomize ratların tedavisinin, akrilamide maruz kalan pinealektomize ratların tedavisinden daha fazla iyileşme olasılığının olduğunu gösterdi. Böylelikle akrilamide maruz kalan beyin dokusunda bozulan oksidan/antioksidan dengesinin yeniden sağlanmasında melatoninin önemli bir rolü olduğu görüldü.

Akrilamide maruz kalmanın ardından hafıza, öğrenme, bilişsel işlevlerin olduğu bazı beyin bölgelerinde ve periferik sinirde nörodejenerasyon gözlemlendi. Bir başka araştırmada ise araştırmacılar, hayvanlara iki farklı dozda akrilamid (50 ve 21 mg/kg/gün) uygulayarak tüm beyin bölgelerinde ki nörodejenerasyonu ve ataksi, kas parezi gibi nörolojik disfonksiyonları gözlemlediler [191]. Erdemli vd. yaptığı bir çalışmada ise gebe ratlara akrilamid uygulamasının ardından fetal beyinde nöronal hasarın tetiklediğini ve BDNF düzeylelerini azalttığını bildirmişleridir [192].

Akrilamid tarafından indüklenen nörotoksisite mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, şu üç mekanizma kabul edilmiş görünmektedir: (1) kinesinin hızlı aksonal taşınmasının bloke edilmesi; (2) nörotransmitterlerin miktarındaki bozukluklar; (3) nörotransmitterlerin doğrudan bloke edilmesi [193]. Çalışmamızda bu hipotezleri doğrulamak için, akrilamid uygulamasını takiben sham pinealektomize ve pinealektomize ratların beyin ve beyincik dokularında dopamin ve BDNF seviyelerindeki değişiklikleri gözlemlemeye çalıştık. Çalışmamızdaki verilerimiz 21 gün boyunca 25 mg/kg/gün dozda akrilamid uygulamasının sham pinealektomize ratlarda ve özellikle pinealektomize ratlarda BDNF seviyesinde önemli bir azalmaya ve dopamin seviyesinde ise belirgin bir yükselmeye neden olduğuna işaret etti. Diğer taraftan, pinealektomize ratlarda ve özellikle sham pinealektomize ratlarda dopamin ve BDNF düzeylerindeki bozuklukların akrilamidle birlikte ekzojen melatoninin uygulanmasıyla düzeldiğini gözlemledik. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak, Pan vd. akrilamide maruz kalmanın dopaminergic nöronlarda dopamin seviyelerinde bir yükselmeye, dopamin alımında değişikliğe ve akrilamid metabolizması ile ilişkili gen ekspresyonunda azalmaya neden olduğunu bildirmiştir [194]. Ayrıca Zargar vd. akrilamide maruz kalan ratların beyinde serotonin azalmasını doğruladı ve dopamin, interferon- γ ve 8 hidroksiguanozinde de artışlar gözlemledi [195].

Alternatif bir moleküler mekanizma olarak, nörodejeneratif bozuklukların etiolojilerinden biri de santral sinir sistemindeki inflamatuvar süreçlerle bağlantılıdır [196, 197]. Nükleer transkripsiyon faktörü (NF- κ B), inflamatuvar süreçlerden sorumlu olan TNF- α ve IL-1 β dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin ve mediatörlerin salınmasına neden olarak inflamasyonun patogenezinde kritik bir rol oynar [198]. Yakovleva vd.'nin yaptığı çalışma ile de oksidatif stres tarafından uyarılan NF- κ B'nin santral sinir sistemindeki nöroinflamasyonda temel bir rolü olduğunu bildirmiştir [199]. Bir başka çalışma da ise akrilamidin NF- κ B'yi uyardığı ve proinflamatuvar sitokin seviyelerinde yükselme nedeniyle nöroinflamasyona yol açtığı bulunmuştur [200]. Benzer şekilde, bizim çalışmamız akrilamide maruz kalmanın beyin ve beyincik dokularında TNF- α seviyelerinde bir yükselmeye neden olduğunu ve böylece nöroinflamasyona yol açtığını göstermiştir. NF- κ B aktivasyonu, nöroinflamasyona yol açan önemli bir faktör olduğundan, yeni terapötik ajanların kullanımının, inflamatuvar mediatörleri azaltmak için sinyal yollarını baskılayarak inflamatuvar ajanlara karşı

önemli avantajlar sağlayabileceği iyi bilinmektedir. Bir başka çalışma ise melatoninin, NF-κB yolunu baskılayarak TNF-α ve IL-1β'yi azalttığı böylece beyni sisplatin kaynaklı nörotoksisiteye karşı koruduğunu göstermiştir [201]. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da melatonin, akrilamid kaynaklı NF-κB aktivasyonunu inhibe ederek iltihabı baskıladığını ve beyin dokularında TNF-α salınımını azalttığı gözlemlendi.

Akrilamid kaynaklı nörotoksisite, santral sinir sistemindeki apoptoz ile ilişkilidir [171]. Normal olarak, Bax'ın Bcl-2 proteini tarafından inhibisyonu, membran potansiyelini artırır, böylece apoptotik süreçleri baskılar [202]. Ratlarda akrilamid kaynaklı nörotoksisitede Kaspaz-3' ün aktivasyonu, apoptotik sürecin başlamasına katkıda bulunur [203]. Özellikle olumsuz durumlarda sitokrom c salınımına neden olarak ve Bax ve p38α MAPK'yı artırarak ve Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak Kaspaz-3 aktive olur ve böylece apoptotik sürecin başlamasına yol açar [204]. Chen vd. yaptığı çalışmada akrilamide maruz kalmanın Bax/Bcl-2 oranının yükselmesine, sitokrom c salınımına ve apoptotik süreçlerin aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir [205]. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda, pinealektomize ve sham pinealektomize ratların beyin dokularında Kaspaz-3 ekspresyonunun yoğunluğu akrilamide maruz kaldıktan sonra ilk kez incelenmiş olup Kaspaz-3 ekspresyonunun PINX+AKR grubunda Sham +AKR grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İlginç bir şekilde, gözlemlerimiz, melatonin tedavisinin, apoptotik yolları baskılayarak akrilamide maruz kalma sırasında artan Kaspaz-3 aktivasyonunu tersine çevirdiğini ortaya koydu. Sonuçlarımızla uyumlu olarak, Motallebzadeh vd. yaptığı çalışma da melatonin tedavisinin ratların beyin sapında radyasyona bağlı apoptoz ile artan Kaspaz-3 ekspresyonunda önemli bir azalma sağlayabildiğini bildirdi [206]. Ayrıca Li vd. yaptığı çalışma da subaraknoid kanamayı takiben melatonin tedavisi ile yüksek Kaspaz-3 seviyesinin azaldığını kanıtladı [207].

Ek olarak, akrilamid tarafından indüklenen başka bir nörotoksisite mekanizması ise akrilamide subakut maruziyetten sonra sinaptik veziküllerdeki proteinlere verilen hasarın neden olduğu veziküler disfonksiyondur. LoPachin vd. yaptığı çalışmada akrilamidin, striatal sinaptik veziküllere dopamin alımını inhibe ettiğini, dopaminin depolanmasını kesintiye uğrattığını ve yetersiz bir presinaptik salıverilmesine neden olduğunu kanıtladılar [208]. Dopamin dahil katekolaminler, yeniden alım, veziküler

geri alım, ekstranöronal yeniden alım veya monoamin oksidaz gibi enzimatik bozunma ile elimine edilir. Akrilamide maruz kalmanın neden olduğu dopamin metabolizması bozukluğunun beyin dokusunda dopamin seviyelerinde artışa yol açabileceği düşünülmüştür. Öte yandan melatonin, dopamin taşıyıcısını (DAT) hücre içinde olgunlaşmamış glikosile edilmemiş formunda depolayarak santral sinir sisteminde dopamin alımı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [209]. Bununla birlikte Leeboonngam vd. yaptığı bir çalışmada uzun süreli melatonin uygulamasının, Parkinson hastalığında DAT' in aşağı regülasyonunu ve çoğunlukla antioksidan etkisiyle ilişkili olarak amfetamin kaynaklı hipokampal hasarı engellediğini göstermiştir [210, 211]. Literatürle uyumlu olarak, çalışmamızın sonuçları 21 günlük melatonin tedavisinin antioksidan özelliklerinden dolayı akrilamidin neden olduğu yüksek dopamin seviyelerini azalttığını gösterdi.

Biyokimyasal bulgularla uyumlu olarak çalışmamızdaki histopatolojik değerlendirmelerimiz akrilamide maruz kalmanın santral sinir sisteminde nörotoksositeye neden olduğunu ortaya koydu. Akrilamid uygulaması, Sham+AKR ve PINX+AKR gruplarındaki ratların koroid pleksusunda ve serebellumunun diğer alanlarında, tıkanıklık, perivasküler ödem, inflamasyon, nöronal dejenerasyon ve perinöronal ödem gibi değişiklikler gözlenmiştir. Ek olarak ratların beyinlerinde Purkinje hücrelerinin dejenerasyonu, Purkinje hücrelerinin kaybı ve inflamasyon gözlemlenmiş olup bizim çalışmamız ile Goudarzi vd.' nin [212] 2019 yılında yaptığı çalışma ile de tutarlı olduğu görülmüştür. Çalışmamızla birlikte pinealektomize ratlara akrilamid uygulaması ilk kez çalışıldı ve diğer gruplara kıyasla beyin ve beyincikte daha fazla nöronal hasar tespit edildi. Buna karşılık akrilamid uygulanmış ratlara ekzojen melatonin müdahalesi, nöronal dokuların yapısını önemli ölçüde onardı. Çalışmamızın sonuçları Edres vd.'nin [213] 2021 yılında yaptığı çalışma ile uyumlu olup akrilamid kaynaklı nörotoksosite de melatonin tedavisinin ile akrilamid hasarının azaldığını göstermiştir.

Sonuç olarak, bu bulgular melatoninin, antioksidan enzimlerin seviyesini artırarak ve oksidanların seviyesini azaltarak akrilamid kaynaklı beyin oksidatif hasarını iyileştirebildiğini göstermiştir. Ayrıca melatonin, inflamatuvar yolları düzenlemiş ve inflamatuvar mediatörlerin salınımını engelleyerek anti-inflamatuvar etkiler

göstermiştir. Benzer şekilde dopamin ve BDNF seviyelerindeki değişiklikler, dopaminerjik nöronlarda dopamin seviyeleri ve dopamin alımındaki değişiklik düzenlenerek modüle edildi. Ayrıca melatonin, akrilamide maruz kalmayı takiben Kaspaz-3 aktivasyonunu baskılayarak anti-apoptotik etki göstermiştir. Bununla birlikte, endojen melatoninin yokluğunda ekzojen melatoninin moleküler mekanizmasını kanıtlamak için daha fazla araştırma ve klinik çalışma gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Pruser, K. N. and Flynn, N. E., “Acrylamide in health and disease”, *Frontiers in Bioscience*, 3: 41-51 (2011).
2. Costa, L. G., Deng, H., Calleman, C. J., and Bergmark, E., “Evaluation of the neurotoxicity of glycidamide, an epoxide metabolite of acrylamide: behavioral, neurochemical and morphological studies”, *Toxicology*, 98 (1-3):151-161 (1995).
3. Parzefall, W., “Minireview on the toxicity of dietary acrylamide”, *Food and Chemical Toxicology*, 46 (4):1360-1364 (2008).
4. Coleman, P. D. And Yao, P. J., “Synaptic slaughter in Alzheimer’s disease”, *Neurobiology of Aging*, 24 (8): 1023-1027 (2003).
5. Betteridge, D. J., “What is oxidative stress?”, *Metabolism*, 49 (2): 3-8 (2000).
6. Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M. and Mazur, M., “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer”, *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1): 1-40 (2006).
7. Marnett, L. J., “Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424 (1-2): 83-95 (1999).
8. Tessutti, L. S., Macedo, D. V., Kubota, L. T. And Alves, A. A., “Measuring the antioxidant capacity of blood plasma using potentiometry”, *Analytical Biochemistry*, 441 (2): 109-114 (2013).
9. Cova, E., Bongioanni, P., Cereda, C., Metelli, M. R., Salvaneschi, L., Bernuzzi, S. And Ceroni, M., “Time course of oxidant markers and antioxidant defenses in subgroups of amyotrophic lateral sclerosis patients”, *Neurochemistry International*, 56 (5): 687-693 (2010).
10. Erlich, S. S. and Apuzzo, M. L., The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance”, *Journal of Neurosurgery*, 63 (3): 321-341 (1985).

11. Macchi, M. M. and Bruce, J. N., "Human pineal physiology and functional significance of melatonin", *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25 (3-4):177-195 (2004).
12. Nichols, D. E., "N, N-dimethyltryptamine and the pineal gland: Separating fact from myth", *Journal of Psychopharmacology*, 32 (1):30-36 (2018).
13. Wehr, T. A., Aeschbach, D. and Duncan Jr, W. C., "Evidence for a biological dawn and dusk in the human circadian timing system", *The Journal of Physiology*, 535 (3): 937 (2001).
14. He, H., Dong, W. and Huang, F., "Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic role of melatonin in Alzheimer disease", *Current Neuropharmacology*, 8 (3): 211-217 (2010).
15. Takakuwa, T., Koike, T., Muranaka, T., Uwabe, C. and Yamada, S., "Formation of the circle of Willis during human embryonic development", *Congenital Anomalies*, 56 (5): 233-236 (2016).
16. Wu, C., Honarmand, A. R., Schnell, S., Kuhn, R., Schoeneman, S. E., Ansari, S. A. and Shaibani, A., "Age-related changes of normal cerebral and cardiac blood flow in children and adults aged 7 months to 61 years", *Journal of the American Heart Association*, 5 (1): 2657 (2016).
17. Corallo, D., Trapani, V. and Bonaldo, P., "The notochord: structure and functions", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72 (16): 2989-3008 (2015).
18. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. and Shiota, K., "Color Atlas of Clinical Embryology" *Saunders*, USA, 100 (2000).
19. Budday, S., Steinmann III, P. and Kuhl, E., "Physical biology of human brain development", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9: 257 (2015).
20. Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E. and Knoblich, J. A., "Cerebral organoids model human brain development and microcephaly", *Nature*, 501 (7467): 373-379 (2013).
21. Sousa, D. A., "How the brain learns: A classroom teacher's guide", **Corwin Press**. New York, 200-230 (2001).

22. Yapıcı, M., “Beyin temelli öğrenme açısından öğretmen ve ders”, *Üniversite ve Toplum* (2): (2008).
23. Fix, J. D., “Neuroanatomy 4th ed.”, **Lippincott Williams & Wilkins**, West Virginia, 250 (2002).
24. Taner, D., Atasever, A. ve Durgun, B., “Fonksiyonel Nöroanatomi 7. Baskı” **ODTÜ Geliştirme Vakfı**, Ankara, 70-80 (2008).
25. Goldberg, S. and Netzer, S., “Clinical Neuroanatomy Made Ridiculously Simple 4th ed.”, MedMaster, USA, 35-45 (1979).
26. Dere, F., “Nöroanatomi: fonksiyonel nöroloji atlası ve ders kitabı c. 3”, **Nobel Tıp Kitabevi**, Ankara, 60-70 (2000).
27. Hamburger, V. and Levi-Montalcini, R., “Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions”, *Journal of Experimental Zoology*, 111 (3): 457-501 (1949).
28. Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., and Persson, H., “Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene” *Neuron*, 10 (3): 475-489 (1993).
29. Binder, D. K. and Scharfman, H. E., “Brain-derived neurotrophic factor”, *Growth Factors*, 22 (3): 123 (2004).
30. Lentz, S. I., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J. and Snider, W. D., “Neurotrophins support the development of diverse sensory axon morphologies”, *Journal of Neuroscience*, 19 (3): 1038-1048 (1999).
31. McAllister, A. K., Katz, L. C. and Lo, D. C., “Neurotrophins and synaptic plasticity”, *Annual Review of Neuroscience*, 22 (1): 295-318 (1999).
32. Goldberg, J. L., Espinosa, J. S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G. T. and Barres, B. A., “Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity”, *Neuron*, 33 (5): 689-702 (2002).

33. Ozawa, T., Yamada, K. and Ichitani, Y., "Hippocampal BDNF treatment facilitates consolidation of spatial memory in spontaneous place recognition in rats", *Behavioural Brain Research*, 263: 210-216 (2014).
34. Castren, E., Thoenen, H. and Lindholm, D., "Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus", *Neuroscience*, 64 (1):71-80 (1995).
35. Howells, D. W., Porritt, M., Wong, J. Y. F., Batchelor, P. E., Kalnins, R., Hughes, A. J. and Donnan, G. A., "Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra", *Experimental Neurology*, 166 (1): 127-135 (2000).
36. Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F. and Young, L. T., "Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication", *Biological Psychiatry*, 50 (4): 260-265(2001).
37. Bramham, C. R., Southard, T., Sarvey, J. M., Herkenham, M. and Brady, L. S., "Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication", *Journal of Comparative Neurology*, 368 (3):371-382 (1996).
38. Dugich-Djordjevic, M. M., Peterson, C., Isono, F., Ohsawa, F., Widmer, H. R., Denton, T. L. and Hefti, F., "Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain", *European Journal of Neuroscience*, 7 (9):1831-1839 (1995).
39. Huntley, G. W., Benson, D. L., Jones, E. G. and Isackson, P. J., "Developmental expression of brain derived neurotrophic factor mRNA by neurons of fetal and adult monkey prefrontal cortex", *Developmental Brain Research*, 70 (1): 53-63 (1992).
40. Nawa, H., Carnahan, J. And Gall, C., "BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels", *European Journal of Neuroscience*, 7 (7):1527-1535 (1995).
41. Carlsson, A., Lindqvist, M. and Magnusson, T. O. R., "3, 4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists", *Nature*, 180 (4596):1200-1200 (1957).

42. Montagu, K. A., "Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals", *Nature*, 180 (4579), 244-245 (1957).
43. Beaulieu, J. M. and Gainetdinov, R. R., "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors", *Pharmacological Reviews*, 63 (1): 182-217 (2011).
44. Andén, N. E., Carlsson, A., Dahlström, A., Fuxe, K., Hillarp, N. Å. and Larsson, K., "Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons", *Life Sciences*, 3 (6): 523-530 (1964).
45. Murkovic, M., "Acrylamide in Austrian foods", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61 (1-2):161-167 (2004).
46. Friedman, M., "Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (16): 4504-4526 (2003).
47. Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R. H. and Whitmore, T., "A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (5): 323-347 (2004).
48. Smith, E. A., Prues, S. L. and Oehme, F. W., "Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light, and pH", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35 (2):121-135 (1996).
49. Sharp, D., "Acrylamide in food", *The Lancet*, 361 (9355): 361-362 (2003).
50. Lasekan, O. and Abbas, K., "Investigation of the roasting conditions with minimal acrylamide generation in tropical almond (*Terminalia catappa*) nuts by response surface methodology", *Food Chemistry*, 125 (2):713-718 (2011).
51. LoPachin, R. M., Schwarcz, A. I., Gaughan, C. L., Mansukhani, S., and Das, S., "In vivo and in vitro effects of acrylamide on synaptosomal neurotransmitter uptake and release", *Neurotoxicology*, 25 (3): 349-363 (2004).
52. Swedish, N. F. A., "Information about acrylamide in food", *Swedish National Food Administration*, 4: 24. (2002).

53. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., and Törnqvist, M., “Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (17): 4998-5006 (2002).
54. International Agency for Research on Cancer. (1994). Some industrial chemicals. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 60.
55. Mesias, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F. and Morales, F. J., “Acrylamide content in French fries prepared in households: A pilot study in Spanish homes”, *Food Chemistry*, 260: 44-52 (2018).
56. Mesías, M., Holgado, F., Márquez-Ruiz, G. and Morales, F. J., “Impact of the characteristics of fresh potatoes available in-retail on exposure to acrylamide: Case study for French fries”, *Food Control*, 73: 1407-1414 (2017).
57. Rosen, J. D., *Acrylamide in food: Is it a real threat to public health*. Am Cncl on Science, Health. . (2002).
58. Riha III, W. E., Izzo, H. V., Zhang, J. and Ho, C. T., “Nonenzymatic deamidation of food proteins”, *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36 (3): 225-255 (1996).
59. Nizamlioğlu, N. M. and Sebahattin, N. A. S., “Gıdalarda akrilamid oluşum mekanizmaları, gıdaların akrilamid içeriği ve sağlık üzerine etkileri”, *Akademik Gıda*, 17 (2): 232-242 (2019).
60. Lindsay, R., Generalized potential origins of acrylamide in foods. In *Workshop on Food Research Institute (FRI) Acrylamide Project*. Chicago, O’Hare Hilton-June (Vol. 4, p. 2002). (2002).
61. Sanders, R. A., Zyzak, D. V., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., & Ewald, D. K. (2002, September). An LC/MS acrylamide method and it’s use in investigating the role of asparagine. In *Presentation at the annual AOAC international meeting, Los Angeles, CA* (pp. 22-26).
62. Mottram, D. S., Wedzicha, B. L. and Dodson, A. T., “Acrylamide is formed in the Maillard reaction”, *Nature*, 419 (6906): 448-449 (2002).
63. Lingnert, H., Grivas, S., Jägerstad, M., Skog, K., Törnqvist, M. and Åman, P., “Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods”, *Scandinavian Journal of Nutrition*, 46 (4): 159-172 (2002).

64. Capuano, E., Oliviero, T., Açar, Ö. Ç., Gökmen, V. and Fogliano, V., “Lipid oxidation promotes acrylamide formation in fat-rich model systems”, *Food Research International*, 43 (4): 1021-1026 (2010).
65. Becalski, A., Lau, B. P. Y., Lewis, D. and Seaman, S., (2002, September). Acrylamide in foods: occurrence and sources. In *Abstracts* (pp. 22-26). Gaithersburg, MD: AOAC.
66. LoPachin, R. M., “The role of fast axonal transport in acrylamide pathophysiology: mechanism or epiphenomenon?”, *Neurotoxicology*, 23 (2): 253-257 (2002).
67. Becalski, A., Lau, B. P. Y., Lewis, D. and Seaman, S. W., “Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 802-808 (2003).
68. Zhang, Y., Ren, Y. And Zhang, Y., “New research developments on acrylamide: analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation recipes”, *Chemical Reviews*, 109v(9): 4375-4397 (2009).
69. Erdemli, M. E. (2011). *Subkronik akrilamid toksisitesi oluşturulan ratlarda kayısının, kalın bağırsak dokusu glutatyon S-transferaz-Pi (GST) gen ekspresyonu, glutatyon peroksidaz (GSH-PX), redükte glutatyon (GSH) ve malondialdehid (MDA) düzeylerine etkisinin araştırılması* (Master's thesis, İnönü Üniversitesi).
70. Ölmez, H., Tuncay, F., Özcan, N. and Demirel, S., “A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (7): 564-568 (2008).
71. Stadler, R. H. and Scholz, G., “Acrylamide: an update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control”, *Nutrition Reviews*, 62 (12): 449-467 (2004).
72. Pedreschi, F., Moyano, P., Kaack, K. and Granby, K., “Color changes and acrylamide formation in fried potato slices”, *Food Research International*, 38 (1): 1-9 (2005).
73. Hendriksen, H. V., Kornbrust, B. A., Østergaard, P. R. and Stringer, M. A., “Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (10): 4168-4176 (2009).

74. Palazoğlu, T. K. and Gökmen, V., “Reduction of acrylamide level in French fries by employing a temperature program during frying”, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (15): 6162-6166 (2008).
75. Casado, F. J., Sánchez, A. H. and Montaña, A., “Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives”, *Food Chemistry*, 119 (1): 161-166 (2010).
76. Kalita, D., Holm, D. G. and Jayanty, S. S., “Role of polyphenols in acrylamide formation in the fried products of potato tubers with colored flesh”, *Food Research International*, 54 (1): 753-759 (2013).
77. Pelucchi, C., La Vecchia, C., Bosetti, C., Boyle, P. and Boffetta, P., “Exposure to acrylamide and human cancer—a review and meta-analysis of epidemiologic studies”, *Annals of Oncology*, 22 (7): 1487-1499 (2011).
78. Salazar, R., Arámbula-Villa, G., Hidalgo, F. J. and Zamora, R., “Mitigating effect of piquin pepper (*Capsicum annum* L. var. *Aviculare*) oleoresin on acrylamide formation in potato and tortilla chips”, *LWT-Food Science and Technology*, 48 (2): 261-267 (2012).
79. Alzahrani, H. A. S., “Protective effect of l-carnitine against acrylamide-induced DNA damage in somatic and germ cells of mice”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18 (1): 29-36 (2011).
80. Tyl, R. W. and Friedman, M. A., “Effects of acrylamide on rodent reproductive performance”, *Reproductive Toxicology*, 17 (1): 1-13 (2003).
81. Tyl, R. W., Marr, M. C., Myers, C. B., Ross, W. P. and Friedman, M. A., “Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats”, *Reproductive Toxicology*, 14 (2):147-157 (2000).
82. Sickles, D. W., Sperry, A. O., Testino, A. and Friedman, M., “Acrylamide effects on kinesin-related proteins of the mitotic/meiotic spindle”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222 (1): 111-121 (2007).
83. Sickles, D. W., Brady, S. T., Testino, A., Friedman, M. A. and Wrenn, R. W., “Direct effect of the neurotoxicant acrylamide on kinesin-based microtubule motility”, *Journal of Neuroscience Research*, 46 (1): 7-17 (1996).
84. Favor, J. And Shelby, M. D., “Transmitted mutational events induced in mouse germ cells following acrylamide or glycidamide exposure”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580 (1-2): 21-30 (2005).

85. Miller, M. S. and Spencer, P. S., "The mechanisms of acrylamide axonopathy", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 25 (1): 643-666 (1985).
86. World Health Organization. (2020). Acrylamide levels in food should be reduced because of public health concern says UN expert committee. WHO Media centre.
87. Crofton, K. M., Padilla, S., Tilson, H. A., Anthony, D. C., Raymer, J. H. and MacPhail, R. C., "The impact of dose rate on the neurotoxicity of acrylamide: the interaction of administered dose, target tissue concentrations, tissue damage, and functional effects", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 139 (1): 163-176 (1996).
88. LoPachin, R. M., Ross, J. F. and Lehning, E. J., "Nerve terminals as the primary site of acrylamide action: a hypothesis", *Neurotoxicology*, 23 (1): 43-59 (2002).
89. LoPachin, R. M., Barber, D. S., Geohagen, B. C., Gavin, T., He, D. and Das, S., "Structure-toxicity analysis of type-2 alkenes: in vitro neurotoxicity", *Toxicological Sciences*, 95 (1): 136-146 (2007).
90. Storey, E. (2002). Color Atlas of Neuroscience: Neuroanatomy and Neurophysiology. Ben Greenstein and Adam Greenstein. Stuttgart, Germany: Thieme, 2000, 438 pp., DM49. 90. *International Psychogeriatrics*, 14(3), 323-324.
91. Erlich, S. S. and Apuzzo, M. L., "The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance", *Journal of Neurosurgery*, 63 (3): 321-341 (1985).
92. Macchi, M. M. and Bruce, J. N., "Human pineal physiology and functional significance of melatonin", *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25 (3-4): 177-195 (2004).
93. Nichols, D. E., "N, N-dimethyltryptamine and the pineal gland: Separating fact from myth", *Journal of Psychopharmacology*, 32 (1): 30-36 (2018).
94. Wehr, T. A., Aeschbach, D. and Duncan Jr, W. C., "Evidence for a biological dawn and dusk in the human circadian timing system", *The Journal of Physiology*, 53 (3): 937 (2001).

95. Kehr, P. (2010). Anne M. Gilroy, Brian R. MacPherson, Lawrence M. Ross, Markus Voll, Karl Wesker: Atlas of anatomy.
96. Moore MD, R. Y., "Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications", *Annual Review of Medicine*, 48 (1): 253-266 (1997).
97. dos Santos Lucena, V. R., de Araujo, R. M. P., de Medeiros, D. L. N., Silva, M. F. A. and Neto, S. D., "Efeitos da melatonina como tratamento complementar de úlceras gastroduodenais: Uma revisão integrativa", *Research, Society and Development*, 10 (6): (2021).
98. Amaral, F. G. D. and Cipolla-Neto, J., "A brief review about melatonin, a pineal hormone", *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 62: 472-479 (2018).
99. Bojkowski, C. J., Aldhous, M. E., English, J., Franey, C., Poulton, A. L., Skene, D. and Arendt, J., "Suppression of nocturnal plasma melatonin and 6-sulphatoxymelatonin by bright and dim light in man", *Hormone and Metabolic Research*, 19 (09), 437-440. (1987).
100. Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H. and Mori, W.," Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1", *Journal of The American Chemical Society*, 80 (10): 2587-2587 (1958).
101. Arendt, J., Wetterberg, L., Heyden, T., Sizonenko, P. C. and Paunier, L., "Radioimmunoassay of melatonin: human serum and cerebrospinal fluid", *Hormone Research in Paediatrics*, 8 (2): 65-75 (1977).
102. Tan, D. X., Xu, B., Zhou, X. and Reiter, R. J., "Pineal calcification, melatonin production, aging, associated health consequences and rejuvenation of the pineal gland", *Molecules*, 23 (2): 301 (2018).
103. Pardridge, W. M. And Mietus, L. J., "Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier", *Journal Neurochem*, 34 (6): 1761-3 (1980).
104. Reiter, R. J., "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions", *Endocrine Reviews*, 12 (2): 151-180 (1991).
105. Korf, H. W., Korl, B., Schachenmayr, W., Chader, G. J. and Wiggert, B., "Immunocytochemical demonstration of interphotoreceptor retinoid-

- binding protein in cerebellar medulloblastoma”, *Acta Neuropathologica*, 83 (5): 482-487 (1992).
106. Ferreira, S. G., Peliciari-Garcia, R. A., Takahashi-Hyodo, S. A., Rodrigues, A. C., Amaral, F. G., Berra, C. M. and Cipolla-Neto, J., “Effects of melatonin on DNA damage induced by cyclophosphamide in rats”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46: 278-286 (2013).
107. Klein David, C., “Arylalkylamine N-Acetyltransferase: the Timezyme”, *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (7): 4233-4237 (2007).
108. Ostrin, L. A., “Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure”, *Clinical and Experimental Optometry*, 102 (2): 99-108 (2019).
109. He, H., Dong, W. and Huang, F., “Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic role of melatonin in Alzheimer disease”, *Current Neuropharmacology*, 8 (3): 211-217 (2010).
110. Rosales-Corral, S. A., Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Manchester, L. C., Fuentes-Broto, L. and Reiter, R. J., “Alzheimer’s disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin”, *Journal of Pineal Research*, 52 (2): 167-202 (2012).
111. Tan, D. X., “Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger”, *Journal of Endocrine*, 1: 57-60 (1993).
112. Marshall, K. A., Reiter, R. J., Poeggeler, B., Aruoma, O. I. and Halliwell, B. (1996). Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(3), 307-315.
113. Sewerynek, E., Melchiorri, D., Ortiz, G. G., Poeggeler, B. and Reiter, R. J., “Melatonin reduces H₂O₂-induced lipid peroxidation in homogenates of different rat brain regions”, *Journal of Pineal Research*, 19 (1): 51-56 (1995).
114. Pierrefiche, G., Topall, G., Courboin, G., Henriët, I. and Laborit, H., “Antioxidant activity of melatonin in mice”, *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 80 (2): 211-223 (1993).

115. Melchiorri, D., Reiter, R. J., Attia, A. M., Hara, M., Burgos, A. and Nistico, G., "Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats", *Life Sciences*, 56 (2): 83-89 (1994).
116. Sewerynek, E., Melchiorri, D., Chen, L. and Reiter, R. J., "Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro", *Free Radical Biology and Medicine*, 19 (6): 903-909 (1995).
117. Reiter, R. J. and Meltz, M. L., "Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage", *Mutation Research Letters*, 346 (1), 23-31 (1995).
118. Galano, A., Tan, D. X. and Reiter, R. J., "On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK", *Journal of Pineal Research*, 54 (3): 245-257 (2013).
119. Reiter, R. J., Tan, D. X. and Galano, A., "Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity", *Frontiers in Physiology*, 5: 377 (2014).
120. Galano, A., Medina, M. E., Tan, D. X. and Reiter, R. J., "Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis", *Journal of Pineal Research*, 58 (1): 107-116 (2015).
121. Arnao, M. B. and Hernández-Ruiz, J., "Growth conditions determine different melatonin levels in *Lupinus albus* L." *Journal of Pineal Research*, 55 (2): 149-155. (2013).
122. Ressmeyer, A. R., Mayo, J. C., Zelosko, V., Sáinz, R. M., Tan, D. X., Poeggeler, B. and Hardeland, R., "Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction", *Redox Report*, 8 (4): 205-213 (2003).
123. Galano, A., "On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13 (15): 7178-7188 (2011).
124. Harasimowicz, J., Marques, K. L., Silva, A. F., Costa, R. C., Prior, J. A., Rodrigues, S. S. M. and Santos, J. L., "Chemiluminometric evaluation of

- melatonin and selected melatonin precursors' interaction with reactive oxygen and nitrogen species", *Analytical Biochemistry*, 420 (1): 1-6 (2012).
125. Rodríguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V. and Reiter, R. J., "Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin", *Journal of Pineal Research*, 36 (1): 1-9 (2004).
126. Fischer, T. W., Kleszczyński, K., Hardkop, L. H., Kruse, N. and Zillikens, D., "Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin", *Journal of Pineal Research*, 54 (3): 303-312 (2013).
127. Pablos, M. I., Reiter, R. J., Ortiz, G. G., Guerrero, J. M., Agapito, M. T., Chuang, J. I. and Sewerynek, E., "Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light", *Neurochemistry international*, 32 (1): 69-75 (1998).
128. Hardeland, R., "Antioxidative protection by melatonin", *Endocrine*, 27 (2): 119-130 (2005).
129. Mauriz, J. L., Collado, P. S., Veneroso, C., Reiter, R. J. and González-Gallego, J., "A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives", *Journal of pineal research*, 54 (1): 1-14 (2013).
130. Fridovich, I., "Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893 (1): 13-18 (1999).
131. Turrens, J. F., "Mitochondrial formation of reactive oxygen species", *The Journal of Physiology*, 552 (2): 335-344 (2003).
132. Nordberg, J. and Arnér, E. S., "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system", *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (11): 1287-1312 (2001).
133. Betteridge, D. J., "What is oxidative stress?", *Metabolism*, 49 (2): 3-8. (2000).

134. Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M. and Mazur, M., "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1): 1-40 (2006).
135. Marnett, L. J., "Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424 (1-2): 83-95 (1999).
136. Wang, M., Dhingra, K., Hittelman, W. N., Liehr, J. G., De Andrade, M. and Li, D., "Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues", *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 5 (9): 705-710 (1996).
137. Metodiewa, D. and Koška, C., "Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto (neuro) toxic events and neurologic disorders. An overview", *Neurotoxicity Research*, 1 (3): 197-233 (1999).
138. Ďuračková, Z. and Gvozdjáčková, A., "Oxidants, antioxidants and oxidative stress", *In Mitochondrial Medicine*, 3: 19-54 (2008).
139. López-Alarcón, C. and Denicola, A., "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays", *Analytica Chimica Acta*, 763: 1-10 (2013).
140. Toda, S., "Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas", *Chinese Medicine*, 2 (1): 29 (2011).
141. Tessutti, L. S., Macedo, D. V., Kubota, L. T. and Alves, A. A., "Measuring the antioxidant capacity of blood plasma using potentiometry", *Analytical Biochemistry*, 441 (2): 109-114 (2013).
142. Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G. and Serban, A. I., "Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209:112891. (2021).
143. Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J. and Filip, M. "Oxidative stress in neurodegenerative diseases", *Molecular Neurobiology*, 53 (6): 4094-4125 (2016).
144. Cova, E., Bongioanni, P., Cereda, C., Metelli, M. R., Salvaneschi, L., Bernuzzi, S. and Ceroni, M., "Time course of oxidant markers and antioxidant

- defenses in subgroups of amyotrophic lateral sclerosis patients”, *Neurochemistry International*, 56 (5): 687-693 (2010).
145. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. And Kalayci, O., “Oxidative stress and antioxidant defense”, *World Allergy Organization Journal*, 5 (1): 9-19 (2012).
146. Gill, S. S. and Tuteja, N., “Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12): 909-930 (2010).
147. Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K. and Kim, W., “Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms”, *Australian Journal of Crop Science*, 5 (6): 709-725 (2011).
148. Marklund, S. L., “Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species”, *Biochemical Journal*, 222 (3): 649-655 (1984).
149. Chelikani, P., Fita, I. and Loewen, P. C., “Diversity of structures and properties among catalases”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61 (2): 192-208 (2004).
150. Dröge, W., “Free radicals in the physiological control of cell function”, *Physiological reviews*. (2002).
151. Ercal, N., Gurer-Orhan, H. and Aykin-Burns, N., “Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage”, *Current topics in Medicinal Chemistry*, 1 (6): 529-539. (2001).
152. Góth, L., Rass, P. and Páy, A., “Catalase enzyme mutations and their association with diseases”, *Molecular Diagnosis*, 8 (3): 141-149 (2004).
153. Chu, F. F., Doroshov, J. A. and Esworthy, R. S., “Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI”, *Journal of Biological Chemistry*, 268 (4): 2571-2576 (1993).
154. Arthur, J. R., “The glutathione peroxidases”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57 (13): 1825-1835 (2001).

155. Abdel-aleem, S., El-Merzabani, M. M., Sayed-Ahmed, M., Taylor, D. A. and Lowe, J. E., "Acute and chronic effects of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29 (2): 789-797. (1997).
156. VL, K., "Lehtonen S. Kaarteenaho-Wiik R. Lakari E. Paakko P. Kang SW. Rhee SG. Soini Y. Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis", *Thorax*, 57: 157-164 (2002).
157. Dubuisson, M., Vander Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R. and Knoops, B., "Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase", *FEBS Letters*, 571 (1-3): 161-165 (2004).
158. Ladner, J. E., Parsons, J. F., Rife, C. L., Gilliland, G. L. and Armstrong, R. N., "Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1", *Biochemistry*, 43 (2): 352-361. (2004).
159. Robinson, A., Huttley, G. A., Booth, H. S. and Board, P. G., "Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases", *Biochemical journal*, 379 (3): 541-552 (2004).
160. Wheeler, G. L., Jones, M. A. and Smirnoff, N., "The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants", *Nature*, 393 (6683): 365-369 (1998).
161. Kojo, S., "Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress", *Current Medicinal Chemistry*, 11 (8): 1041-1064 (2004).
162. White, E., Shannon, J. S. and Patterson, R. E., "Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer", *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 6 (10):769-774 (1997).
163. El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G. and Young, A. J., "Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430 (1): 37-48 (2004).
164. Lu, S. C. "Glutathione synthesis", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830 (5): 3143-3153 (2013).

165. Gedik, S., Erdemli, M. E., Gul, M., Yigitcan, B., Bag, H. G., Aksungur, Z. and Altinoz, E., "Hepatoprotective effects of crocin on biochemical and histopathological alterations following acrylamide-induced liver injury in Wistar rats", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95: 764-770 (2017).
166. Czechowska, G., Celinski, K., Korolczuk, A., Wojcicka, G., Dudka, J., Bojarska, A., and Reiter, R. J., "Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats", *Journal Physiol Pharmacol*, 66 (4): 567-79 (2015).
167. Demir, M., Yilmaz, U., Colak, C., Cigremis, Y., Ozyalin, F., Tekedereli, I. and Sandal, S., "The effects of lack of melatonin in experimental rat model of Alzheimer's Disease: relationship with FEZ1 gene expression", *Medicine*, 6 (2): 217-23 (2017).
168. Chamorro, V., Pandolfi, R., Moreno, L., Barreira, B., Martínez-Ramas, A., Morales-Cano, D. and Perez-Vizcaino, F., "Effects of quercetin in a rat model of hemorrhagic traumatic shock and reperfusion", *Molecules*, 21 (12): 1739 (2016).
169. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Analytical Biochemistry*, 95 (2): 351-358 (1979).
170. Ellman, G. L. "Tissue sulfhydryl groups", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82 (1): 70-77 (1959).
171. Sun, Y. I., Oberley, L. W. and Li, Y., "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase", *Clinical Chemistry*, 34 (3): 497-500 (1988).
172. Aebi, H., "Catalase", *In Methods of Enzymatic Analysis*, Academic 9: 673-684 (1974).
173. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L. and Randall, R., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1): 265-275 (1951).
174. Erel, O., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status", *Clinical Biochemistry*, 38 (12), 1103-1111 (2005).

175. Erel, O., "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation", *Clinical Biochemistry*, 37 (4), 277-285.(2004).
176. Erel, O., "A novel automated direct measurement method for total oxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation", *Clinical Biochemistry*, 37 (4), 277-285.(2004).
177. Yang, Y., Zhang, L., Jiang, G., Lei, A., Yu, Q., Xie, J. and Chen, Y., "Evaluation of the protective effects of Ganoderma atrum polysaccharide on acrylamide-induced injury in small intestine tissue of rats", *Food & Function*, 10 (9): 5863-5872 (2019).
178. Tian, S. M., Ma, Y. X., Shi, J., Lou, T. Y., Liu, S. S. and Li, G. Y., "Acrylamide neurotoxicity on the cerebrum of weaning rats", *Neural Regeneration Research*, 10 (6): 38 (2015).
179. Farouk, S. M., Gad, F. A., Almeer, R., Abdel-Daim, M. M. and Emam, M. A., "Exploring the possible neuroprotective and antioxidant potency of lycopene against acrylamide-induced neurotoxicity in rats' brain", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138:111458 (2021).
180. Abdel-Daim, M. M., Abo El-Ela, F. I., Alshahrani, F. K., Bin-Jumah, M., Al-Zharani, M., Almutairi, B. and Alkahtani, S., "Protective effects of thymoquinone against acrylamide-induced liver, kidney and brain oxidative damage in rats", *Environmental Science and Pollution Research*, 27 (30): 37709-37717 (2020).
181. AlKahtane, A. A., Ghanem, E., Bungau, S. G., Alarifi, S., Ali, D., AlBasher, G. and Abdel-Daim, M. M., "Carnosic acid alleviates chlorpyrifos-induced oxidative stress and inflammation in mice cerebral and ocular tissues", *Environmental Science and Pollution Research*, 27 (11): 11663-11670 (2020).
182. Gedik, S., Erdemli, M. E., Gul, M., Yigitcan, B., Gozukara Bag, H., Aksungur, Z., & Altinoz, E., "Investigation of the protective effects of crocin on acrylamide induced small and large intestine damage in rats", *Biotechnic & Histochemistry*, 93 (4): 267-276 (2018).
183. Celik, H., Kucukler, S., Ozdemir, S., Comakli, S., Gur, C., Kandemir, F. M. and Yardim, A., "Lycopene protects against central and peripheral neuropathy by inhibiting oxaliplatin-induced ATF-6 pathway, apoptosis,

- inflammation and oxidative stress in brains and sciatic tissues of rats”, *Neurotoxicology*, 80: 29-40 (2020).
184. Batoryna, M., Lis, M. and Formicki, G., “Acrylamide-induced disturbance of the redox balance in the chick embryonic brain”, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52 (8): 600-606 (2017).
185. Rahangadale, S., Kurkure, N., Prajapati, B., Hedao, V. and Bhandarkar, A. G., “Neuroprotective effect of vitamin e supplementation in wistar rat treated with acrylamide”, *Toxicology International*, 19 (1): 1 (2012).
186. Abdel-Daim, M. M., Abd Eldaim, M. A. and Hassan, A. G., “Trigonella foenum-graecum ameliorates acrylamide-induced toxicity in rats: Roles of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and DNA damage”, *Biochemistry and Cell Biology*, 93 (3): 192-198 (2015).
187. Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N. and Fougerou, C., “Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits”, *Current Neuropharmacology*, 15 (3): 434-443 (2017).
188. Elhelaly, A. E., AlBasher, G., Alfarraj, S., Almeer, R., Bahbah, E. I., Fouda, M. and Abdel-Daim, M. M., “Protective effects of hesperidin and diosmin against acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative damage in rats”, *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (34), 35151-35162 (2019).
189. Jiang, G., Lei, A., Chen, Y., Yu, Q., Xie, J., Yang, Y. And Su, D., “The protective effects of the Ganoderma atrum polysaccharide against acrylamide-induced inflammation and oxidative damage in rats”, *Food & Function*, 12 (1): 397-407 (2021).
190. Gur, C., Kandemir, F. M., Darendelioglu, E., Caglayan, C., Kucukler, S., Kandemir, O. and Ileriturk, M., “Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: an investigation into different signal pathways”, *Environmental Science and Pollution Research*, 28 (36): 49808-49819 (2021).
191. LoPachin, R. M., Balaban, C. D. and Ross, J. F., “Acrylamide axonopathy revisited”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 188 (3): 135-153 (2003).

192. Erdemli, M. E., Turkoz, Y., Altinoz, E., Elibol, E. and Dogan, Z., "Investigation of the effects of acrylamide applied during pregnancy on fetal brain development in rats and protective role of the vitamin E", *Human & Experimental Toxicology*, 35 (12): 1337-1344 (2016).
193. Erkekoglu, P. and Baydar, T., "Acrylamide neurotoxicity", *Nutritional Neuroscience*, 17 (2): 49-57 (2014).
194. Pan, X., Guo, X., Xiong, F., Cheng, G., Lu, Q. and Yan, H., "Acrylamide increases dopamine levels by affecting dopamine transport and metabolism related genes in the striatal dopaminergic system", *Toxicology Letters*, 236 (1): 60-68 (2015).
195. Zargar, S., Siddiqi, N. J., Ansar, S., Alsulaimani, M. S. and El Ansary, A. K., "Therapeutic role of quercetin on oxidative damage induced by acrylamide in rat brain", *Pharmaceutical Biology*, 54 (9): 1763-1767 (2016).
196. Kabir, M. T., Uddin, M., Zaman, S., Rahman, M., Behl, T., Ahmad, A. and Ashraf, G. M., "Exploring the Anti-Neuroinflammatory Potential of Steroid and Terpenoid-Derived Phytochemicals to Combat Alzheimer's Disease", *Current Pharmaceutical Design*, 27 (22): 2635-2647 (2021).
197. Kabir, M. T., Uddin, M., Zaman, S., Rahman, M., Behl, T., Ahmad, A. and Ashraf, G. M., "Exploring the Anti-Neuroinflammatory Potential of Steroid and Terpenoid-Derived Phytochemicals to Combat Alzheimer's Disease", *Current Pharmaceutical Design*, 27 (22): 2635-2647 (2021).
198. Ileriturk, M., Benzer, F., Aksu, E. H., Yildirim, S., Kandemir, F. M., Dogan, T. and Genc, A., "Chrysin protects against testicular toxicity caused by lead acetate in rats with its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties", *Journal of Food Biochemistry*, 45 (2): (2021).
199. Yakovleva, T., Bazov, I., Watanabe, H., Hauser, K. F. and Bakalkin, G., "Transcriptional control of maladaptive and protective responses in alcoholics: a role of the NF- κ B system", *Brain, Behavior, and Immunity*, 25: 29-38 (2011).
200. Pan, X., Wu, X., Yan, D., Peng, C., Rao, C. and Yan, H., "Acrylamide-induced oxidative stress and inflammatory response are alleviated by N-acetylcysteine in PC12 cells: Involvement of the crosstalk between Nrf2 and NF- κ B pathways regulated by MAPKs", *Toxicology Letters*, 288:55-64 (2018).

201. Zakria, M., Ahmad, N., Al Kury, L. T., Alattar, A., Uddin, Z., Siraj, S. and Shah, F. A., "Melatonin rescues the mice brain against cisplatin-induced neurodegeneration, an insight into antioxidant and anti-inflammatory effects", *Neurotoxicology*, 87:1-10. (2021).
202. Aksu, E. H., Özkaraca, M., Kandemir, F. M., Ömür, A. D., Eldutar, E., Küçükler, S. and Çomaklı, S., "Mitigation of paracetamol-induced reproductive damage by chrysin in male rats via reducing oxidative stress", *Andrologia*, 48 (10): 1145-1154 (2016).
203. Tabeshpour, J., Mehri, S., Abnous, K. and Hosseinzadeh, H., "Neuroprotective effects of thymoquinone in acrylamide-induced peripheral nervous system toxicity through MAPKinase and apoptosis pathways in rat", *Neurochemical Research*, 44 (5), 1101-1112 (2019).
204. Tabeshpour, J., Mehri, S., Abnous, K. and Hosseinzadeh, H., "Role of oxidative stress, MAPKinase and apoptosis pathways in the protective effects of thymoquinone against acrylamide-induced central nervous system toxicity in rat", *Neurochemical Research*, 45 (2): 254-267 (2020).
205. Chen, J. H., Yang, C. H., Wang, Y. S., Lee, J. G., Cheng, C. H. And Chou, C. C., "Acrylamide-induced mitochondria collapse and apoptosis in human astrocytoma cells", *Food and Chemical Toxicology*, 51: 446-452 (2013).
206. Motallebzadeh, E., Tameh, A. A., Zavareh, S. A. T., Farhood, B., Aliasgharzede, A. and Mohseni, M., "Neuroprotective effect of melatonin on radiation-induced oxidative stress and apoptosis in the brainstem of rats", *Journal of Cellular Physiology*, 235 (11): 8791-8798 (2020).
207. Li, S., Yang, S., Sun, B. and Hang, C., "Melatonin attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage by the JAK-STAT signaling pathway", *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12 (3): 909 (2019).
208. LoPachin, R. M., Barber, D. S., He, D. and Das, S., "Acrylamide inhibits dopamine uptake in rat striatal synaptic vesicles", *Toxicological Sciences*, 89 (1), 224-234 (2006).
209. Erdozain, A. M., De Gois, S., Bernard, V., Gorgievski, V., Pietrancosta, N., Dumas, S. and Giros, B., "Structural and functional characterization of the interaction of Snapin with the dopamine transporter: differential modulation

- of psychostimulant actions”, *Neuropsychopharmacology*, 43 (5): 1041-1051 (2018).
210. Leeboonngam, T., Pramong, R., Sae-ung, K., Govitrapong, P. and Phansuwan-Pujito, P., “Neuroprotective effects of melatonin on amphetamine-induced dopaminergic fiber degeneration in the hippocampus of postnatal rats”, *Journal of Pineal Research*, 64 (3): e12456 (2018).
211. Lin, C. H., Huang, J. Y., Ching, C. H. and Chuang, J. I., “Melatonin reduces the neuronal loss, downregulation of dopamine transporter, and upregulation of D2 receptor in rotenone-induced parkinsonian rats”, *Journal of Pineal Research*, 44 (2), 205 (2008).
212. Goudarzi, M., Mombeini, M. A., Fatemi, I., Aminzadeh, A., Kalantari, H., Nesari, A. and Mehrzadi, S., “Neuroprotective effects of Ellagic acid against acrylamide-induced neurotoxicity in rats”, *Neurological Research*, 41 (5): 419-428 (2019).
213. Edres, H. A., Taha, N. M., Lebda, M. A. and Elfeky, M. S., “The potential neuroprotective effect of allicin and melatonin in acrylamide-induced brain damage in rats”, *Environmental Science and Pollution Research*, 28 (41):58768-58780 (2021).

EK AÇIKLAMALAR A.

ETİK KURUL İZİNİ



T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 01/04/2021
TOPLANTI NO : 2021/04

- 4- Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2021-06-01/04 Protokol no'lu "Pinealektomili Ratların Beyin Dokusunda Akrilamid ile Oluşturulan Nörotoksite Üzerine Ekzojen Melatoninin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Kırıkkale’de doğdu; ilk ve orta öğrenimini Diyarbakır ve Ankara’da tamamladı. Ankara Alparslan Lisesinden 2004 yılında mezun oldu. 2010 yılında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2013 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Entomoloji Ana Bilim Dalında ilk yüksek lisansını tamamladı. 2022 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans programını tamamladı.