



**PİNEALEKTOMİLİ RATLARDA AKRİLAMİD
TARAFINDAN OLUŞTURULAN KARACİĞER
HASARI ÜZERİNE EKZOJEN MELATONİNİN
TERAPÖTİK ROLÜ: OKSİDATİF STRES,
İNFLAMASYON VE APOPTOZİS ÜZERİNE
ETKİLERİ**

**2023
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA**

İpek ÖZTÜRK

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

**PİNEALEKTOMİLİ RATLARDA AKRİLAMİD TARAFINDAN
OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARI ÜZERİNE EKZOJEN
MELATONİNİN TERAPÖTİK ROLÜ: OKSİDATİF STRES,
İNFLAMASYON VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ**

İpek ÖZTÜRK

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

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

**KARABÜK
Ocak 2023**

İpek ÖZTÜRK tarafından hazırlanan “PİNEALEKTOMİLİ RATLARDA AKRİLAMİD TARAFINDAN OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARI ÜZERİNE EKZOJEN MELATONİNİN TERAPÖTİK ROLÜ: OKSİDATİF STRES, İNFLAMASYON VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ” 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. 30/01/2023

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN (KBÜ)

.....

Üye : Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ (İNÜ)

.....

Üye : Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ (KBÜ)

.....

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

Prof. Dr. Müslüm KUZU

.....

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.”

İpek ÖZTÜRK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PİNEALEKTOMİLİ RATLARDA AKRİLAMİD TARAFINDAN OLUŞTURULAN KARACİĞER HASARI ÜZERİNE EKZOJEN MELATONİNİN TERAPÖTİK ROLÜ: OKSİDATİF STRES, İNFLAMASYON VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ

İpek ÖZTÜRK

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ

Ocak 2023, 117 sayfa

Akrilamid (AA), beyaz kristal yapıda, düşük molekül ağırlığında ve suda çözünürlüğü yüksek olan bir maddedir. Doğada kendiliğinden bulunmamakta olup yüksek reaktiviteye sahiptir. Çok fazla endüstriyel alanda (kağıt, kimya gibi) kullanımı olan AA ısıtma işlemleri sonucunda gıdalarda da oluşabilmektedir. Gıdalarda kızartma ve fırınlama gibi pişirme yöntemleriyle $\geq 120^{\circ}\text{C}$ 'de indirgeyici şekerler ve asparagin arasındaki Maillard reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır. AA, hayvanlarda ve insanlarda toksik etkiye neden olabilmektedir. AA'nın karsinogenik, nörotoksik, genotoksik olması ve hidrofilik yapısı nedeniyle tüm organ ve dokulara kolaylıkla ulaşabilmesi sağlık açısından büyük endişe yaratmaktadır. Bu nedenle AA bilim insanları tarafından büyük ilgiyle araştırılmaktadır.

Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan karaciğer üzerinde de AA'nın toksik etkisi bulunmaktadır. AA'nın karaciğerde detoksifikasyonu, oksidatif strese neden olup, reaktif oksijen ve nitrojen radikallerin artışı ile sonuçlanabilmektedir. Bu artış karaciğerde glutatyonun tükenmesine, antioksidan enzimlerin azalmasına, hücre zarının oksidasyonuna neden olmaktadır. Buna bağlı olarak karaciğerde bulunan tüm hücrelerde inflamasyon, iskemi, fibroz, nekroz, apoptoz veya malign oluşumu meydana gelebilmektedir.

Antioksidatif etkili ilaçların veya farmakolojik konsantrasyonlarda doğal olarak oluşan antioksidan takviyelerinin alınması oksidatif stresi değiştirmekte olup, bu takviyelerin çeşitli hastalıklarda morbiditeyi ve mortaliteyi azalttığı düşünülmektedir. İnsanlarda pineal bezden salgılanan melatonin (MLT) hormonu, endojen antioksidan olup ayrıca antiinflamatuvar, antikanser gibi birçok fonksiyonel özelliği de bulunmaktadır. MLT ve metabolitleri hem oluşan serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlamakta hem de radikal oluşumunu azaltabilmektedir. Bu nedenle de lipid oksidasyonuna karşı koruyucu rol oynamaktadır. Aynı zamanda prooksidan enzimlerin azalmasını ve antioksidan enzim düzeylerinde de artış sağlamaktadır.

Bu çalışmada amacımız hem pinealektomi işlemiyle MLT'den yoksun bırakılan ratlarda hemde pinealektomi yapılmayan ratlarda AA ile oksidatif stres, inflamasyona bağlı olarak karaciğer dokusundaki hepatotoksisiteye karşı MLT'nin tedavi edici etkisini biyokimyasal, histopatoloji ve immünohistokimyasal açıdan gözlemlemektir. Çalışmamızda, 60 adet erkek Wistar albino ratlar Sham ve PNX olmak üzere iki ana grup ve üçer alt grup olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Ratlara etanol ve MLT uygulaması intraperitoneal (i.p.) yolla, AA uygulaması ise oral olarak gavajla uygulanmıştır. Çalışmada 21 gün boyunca; 1.gruba (Sham grubu) %0,5'lik etanol çözeltisi, 2. gruba (Sham+AA) 25 mg/kg/gün AA, 3. gruba (Sham+AA+MLT) 25 mg/kg/gün AA ve 10 mg/kg/gün MLT 0,5 ml hacminde, 4. gruba (PNX grubu) pinealektomi işleminden sonra %0,5'lik etanol çözeltisi, 5. gruba (PNX+AA grubu) pinealektomi işleminden sonra %0,5'lik etanol çözeltisi ve 25 mg/kg/gün AA, 6. gruba (PNX+AA+MLT) pinealektomi işlemi sonrasında %0,5 etanol çözeltisi ve 10 mg/kg/gün MLT, 25 mg/kg/gün AA uygulandı.

Çalışmada hem Sham+AA hem de PNX+AA gruplarında Sham ve PNX gruplarına göre karaciğer dokusunda oksidan/antioksidan dengesinin oksidan lehine bozulmasına neden olarak total oksidan düzeyi (TOS) ve malondialdehit (MDA) düzeylerini arttırırken glutatyon (GSH), total antioksidan düzeyi (TAS), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerini azaltdı. PNX grubunda doğal antioksidan olan MLT yoksunluğuna bağlı olarak Sham grubuna göre TOS ve MDA düzeyleri daha fazla artarken, GSH, TAS, CAT ve SOD düzeyleri azaldı. Ekzojen MLT tedavisi sonucunda karaciğer dokusunda TOS ve MDA düzeyleri anlamlı derecede azalırken TAS ve GSH düzeyleri ile CAT, SOD aktivitelerinde artış gözlemlendi. AA uygulanan ratlarda karaciğer dokusunda inflamasyon artışı, nekroz oluşumu gözlemlendi, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) düzeylerinde anlamlı artış meydana geldi. MLT tedavisi sonrasında karaciğer dokusunda inflamasyonun azaldığı, apoptozun engellendiği ve hepatositlerde iyileşmelerin olduğu gözlemlendi. Çalışmamızın sonucu AA kaynaklı hepatotoksisite üzerinde MLT yoksunluğunda uygulanan ekzojen MLT'nin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiproliferatif etkisi sayesinde hepatositlerde oksidatif stresi, inflamasyonu, lipid peroksidasyonunu azaltabileceğini ve histopatolojik hasaları iyileştirebileceğini gösterdi.

Anahtar Sözcükler : Pinealektomi, Karaciğer Hasarı, Melatonin, Akrilamid, Oksidatif Stres, İnflamasyon, Apoptoz

Bilim Kodu : 1090

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

THERAPEUTIC ROLE OF EXOGENE MELATONIN ON ACRYLAMIDE-INDUCED LIVER DAMAGE IN RATS WITH PINEALECTOMY: EFFECTS ON OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND APOPTOSIS

İpek ÖZTÜRK

Karabük University

Institute of Graduate Programs

Department of Medical Biochemistry

Thesis Advisor:

Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ

January 2023, 117 pages

Acrylamide (AA) is a white crystal structure, low molecular weight and highly soluble in water. It does not occur spontaneously in nature and has high reactivity. AA, which is used in many industrial areas (such as paper, chemistry), can also occur in foods as a result of heat treatments. It is formed as a result of the Maillard reaction between reducing sugars and asparagine in foods with cooking methods such as frying and baking at $\geq 120^{\circ}\text{C}$. AA causes toxic effects in animals and humans. The fact that AA can easily reach all organs and tissues due to its carcinogenic, neurotoxic, genotoxic and hydrophilic structure creates a great concern in terms of health. For this reason, AA is being researched with great interest by scientists.

AA has a toxic effect on the liver, which plays a role in the detoxification of xenobiotics. Detoxification of AA in the liver may cause oxidative stress and result in an increase in reactive oxygen and nitrogen radicals. This increase causes depletion of glutathione in the liver, a decrease in antioxidant enzymes, and oxidation of the cell membrane. Accordingly, inflammation, ischemia, fibrosis, necrosis, apoptosis, or malignant formation may occur in all cells in the liver.

Taking antioxidative drugs or naturally occurring antioxidant supplements in pharmacological concentrations changes oxidative stress, and these supplements are thought to reduce morbidity and mortality in various diseases. The hormone melatonin (MLT) secreted from the pineal gland in humans is an endogenous antioxidant and also has many functional properties such as anti-inflammatory and anti-cancer. MLT and its metabolites can both eliminate free radicals and reduce radical formation. Therefore, it plays a protective role against lipid oxidation. At the same time, it provides a decrease in prooxidant enzymes and an increase in antioxidant enzyme levels.

In this study, our aim was to observe the therapeutic effect of MLT against hepatotoxicity in liver tissue due to AA and oxidative stress and inflammation in terms of biochemical, histopathology and immunohistochemistry, both in rats deprived of MLT by pinealectomy procedure and in rats without pinealectomy. In our study, 60 male Wistar albino rats were divided into 6 groups, two main groups as Sham and PNX, and three subgroups each. Ethanol and MLT were administered intraperitoneally, while AA was administered orally by gavage to rats. During the 21 days in the study; 1st group (Sham group) 0.5% ethanol solution, 2nd group (Sham+AA) 25 mg/kg/day AA, 3rd group (Sham+AA+MLT) 25 mg/kg/day AA and 10 mg/kg/day MLT, 0.5% ethanol solution after pinealectomy for group 4 (PNX group), 0.5% ethanol solution for group 5 (PNX+AA group) after pinealectomy, ethanol solution and 25 mg/kg/day AA, group 6 (PNX+AA+MLT) after pinealectomy 0.5% ethanol solution and 10 mg/kg/day MLT, 25 mg/kg by AA was applied.

In the study, both the Sham+AA and PNx+AA groups increased the total oxidant level (TOS) and malondialdehyde (MDA) levels by causing the oxidant/antioxidant balance to deteriorate in favor of the oxidant in the liver tissue compared to the Sham and PNx groups, while glutathione (GSH) and total antioxidant level (TAS) increased.), decreased catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) levels. In the PNx group, TOS and MDA levels increased more than in the Sham group due to MLT deprivation, which is a natural antioxidant, while GSH, TAS, CAT and SOD levels decreased. As a result of exogenous MLT treatment, TOS and MDA levels in liver tissue decreased significantly, while TAS and GSH levels and CAT, SOD activities increased. In rats treated with AA, increased inflammation and necrosis formation were observed in the liver tissue, and a significant increase in tumor necrosis factor alpha (TNF- α) levels occurred. After MLT treatment, it was observed that inflammation in the liver tissue decreased, apoptosis was prevented, and hepatocytes improved. The result of our study showed that exogenous MLT applied in MLT withdrawal on AA-induced hepatotoxicity can reduce oxidative stress, inflammation, lipid peroxidation and improve histopathological changes in hepatocytes thanks to its antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative effects.

Key Words : Pinealectomy, Liver Injury, Melatonin, Acrylamide, Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis

Science Code : 1090

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi 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 çalışmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (KBUBAP-21-YL-117) teşekkür ederim.

Sevgili annem Neriman ÖZTÜRK'e, babam Hacıkurt ÖZTÜRK'e, abim Ümit ÖZTÜRK'e, Mustafa Türkay ALTUNBAŞ'a ve Gökçe KARAARSLAN CANDAN'a manevi hiçbir yardımı esirgmeden yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	x
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
KARACİĞER	4
2.1. KARACİĞER ENZİMLERİ.....	6
2.2. KARACİĞER HASARI	7
BÖLÜM 3	9
AKRİLAMİD.....	9
3.1. AKRİLAMİD METABOLİZMASI.....	11
3.2. AKRİLAMİD OLUŞUM MEKANİZMALARI	13
3.2.1. Maillard Reaksiyonu ile Akrilamid Oluşumu	14
3.2.2. Alternatif Yollar Üzerinden Akrilamid Oluşumu.....	15
3.3. AKRİLAMİDİN OLUŞTUĞU GIDALAR	17
3.4. GIDALARDA AKRİLAMİD OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER	22
3.4.1. İndirgeyici Şekerler	23
3.4.2. Aminoasitler	23
3.4.3. Gıdanın pH'sı	24

	<u>Sayfa</u>
3.4.4. Gıdanın Nemi.....	24
3.4.5. Gıdalara Uygulanan Sıcaklık ve İşlem Süresi	24
3.5. AKRİLAMİDİN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ	25
3.6. AKRİLAMİD OLUŞUMUNU AZALTMA STRATEJİLERİ	27
BÖLÜM 4	30
OKSİDATİF STRES.....	30
4.1. OKSİDATİF STRESİN KARACİĞERE ETKİSİ	33
4.2. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	34
4.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	35
4.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	36
BÖLÜM 5	39
MELATONİN	39
5.1. MELATONİNİN ANTİOKSİDAN ETKİSİ.....	45
5.2. MELATONİNİN KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİ.....	47
BÖLÜM 6	49
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	49
6.1. GEREÇLER	49
6.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler, Aletler ve Yöntemler	49
6.2. YÖNTEMLER	49
6.2.1. Akrilamid ve Melatonin Uygulaması	49
6.2.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı	50
6.2.3 Rat Gruplarının Oluşturulması	50
6.2.3.1. Pinealektomi İşlemi	51
6.2.4. Ratlardan Numune Alınması	51
6.2.5. Biyokimyasal Analizler	52
6.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması	52
6.2.5.2. Karaciğer Dokusu Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi	52
6.2.6. Serum AST, ALT, ALP Analizi	55
6.2.7. Serum Lipid Düzeylerinin Analizi.....	55

	<u>Sayfa</u>
6.2.8. Karaciğer Dokusunda TNF- α Analizi.....	56
6.2.9. Histopatolojik Analiz.....	56
6.2.10. İmmünohistokimyasal Analiz.....	57
6.2.11. İstatistiksel Analiz	57
BÖLÜM 7	58
BULGULAR VE TARTIŞMA	58
7.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR	58
7.1.1. Karaciğer Dokusu Oksidan/Antioksidan Düzeylerinin Karşılaştırılması	58
7.1.1.1. Karaciğer Dokusu MDA ve GSH Seviyeleri	58
7.1.1.2. Karaciğer Dokusu SOD ve CAT Aktivite Seviyeleri	60
7.1.1.3. Karaciğer Dokusu TAS, TOS ve OSİ Seviyeleri.....	62
7.1.1.4. Karaciğer Dokusu TNF- α Düzeyleri.....	66
7.1.2. Serum Biyokimya Parametreleri	68
7.1.2.1. Serum AST, ALT ve ALP Seviyeleri	68
7.1.2.2. Serum Total Kolesterol, TG, VLDL ve HDL Seviyeleri.....	70
7.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	71
7.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	75
7.4. TARTIŞMA.....	77
KAYNAKLAR	86
EK AÇIKLAMALAR ETİK KURUL İZİNİ.....	115
ÖZGEÇMİŞ	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Karaciğerin kanlanması.....	5
Şekil 2.2. Karaciğer hücreleri ve görevleri.....	6
Şekil 3.1. Akrilamidin molekül yapısı.....	9
Şekil 3.2. Akrilamidin kullanım alanları ve kaynakları	10
Şekil 3.3. Akrilamid metabolizması	12
Şekil 3.4. Akrilamid oluşum mekanizmaları.....	14
Şekil 3.5. Maillard reaksiyonu ile akrilamid oluşum mekanizması..	15
Şekil 3.6. HMF' den akrilamid oluşumu	16
Şekil 3.7. Gliserolden akrolein oluşumu	16
Şekil 3.8. Akrolein ve akrilik asitten akrilamid oluşumu.....	17
Şekil 3.9. Akrilamid oluşumunu etkileyen faktörler	22
Şekil 3.10. Akrilamid sistein eklentisinin oluşumu.....	26
Şekil 3.11. Akrilamidin karaciğer üzerine etkisi	27
Şekil 4.1. Oksidan oluşumuna neden olan endojen kaynaklar.....	31
Şekil 4.2. Mitokondride süperoksit anyon radikalının üretimi	32
Şekil 4.3. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları	33
Şekil 4.4. Antioksidan enzimlerin reaktif oksijen türleri üzerindeki etkileri	35
Şekil 5.1. Melatoninin yapısı.....	39
Şekil 5.2. Melatonin sentezi	40
Şekil 5.3. Pineal bezden melatonin sentezinin kontrolü.....	41
Şekil 5.4. Melatoninin fonksiyonları	43
Şekil 5.5. Melatoninin hücre zarındaki koruyucu etkisi.....	46
Şekil 5.6. Karaciğer hasarında melatoninin etkisi.....	48
Şekil 7.1. Ortalama doku MDA ve GSH düzeyleri	59
Şekil 7.2. Ortalama doku SOD aktivite düzeyleri	61
Şekil 7.3. Ortalama CAT aktivite düzeyleri	63
Şekil 7.4. Ortalama TAS değerleri	64
Şekil 7.5. Ortalama TOS değerleri	65
Şekil 7.6. Ortalama OSI değerleri	66
Şekil 7.7. Ortalama TNF- α düzeyleri.....	68

Şekil 7.8. Serum ALT, AST ve ALP düzeyleri.....	70
Şekil 7.9. Sham gruplarının karaciğer histopatolojisi	73
Şekil 7.10 PNX gruplarının karaciğer histopatolojisi	74
Şekil 7.11 Karaciğer dokusunda vena sentralis çevresindeki Ki67 immünreaktivitesi	76
Şekil 7.12 Karaciğer parankiminde Ki67 immünreaktivitesi.....	76
Şekil 7. 13 Karaciğer dokusunda vena sentralis çevresindeki NF-κB immünreaktivitesi	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 7.1. Ortalama karaciğer doku MDA ve GSH düzeyleri.....	58
Çizelge 7.2. Ortalama karaciğer doku SOD ve CAT aktiviteleri.....	60
Çizelge 7.3. Ortalama karaciğer doku TAS, TOS düzeyleri.....	63
Çizelge 7.4. Ortalama OSI değeri	63
Çizelge 7.5. Ortalama karaciğer doku TNF- α düzeyleri.....	67
Çizelge 7.6. Ortalama serum AST, ALT, ve ALP düzeyleri	69
Çizelge 7.7. Ortalama serum Total Kolesterol, TG, VLDL, HDL düzeyleri.....	71
Çizelge 7.8. Ortalama histopatolojik hasar skoru	72
Çizelge 7.9. Ki67 ve NF- κ B immünreaktivitesi için ortalama H-skoru	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

$C_{13}H_{16}N_2O_2$: melatonin
C_3H_5OH	: akrilamid
$CaCl_2$: kalsiyum klorür
H_3PO_4	: fosforik asit
H_2O_2	: hidrojen peroksit
HNO	: nitroksil
$HOO\cdot$: hidroperoksil radikali
N_2O_3	: dinitrojentrioksit
Na_2HPO_4	: disodyumhidrojenfosfat
NH_3	: amonyak
NO	: nitrik oksit
NO_2	: nitrit
NO_3	: nitrat
O_2	: oksijen
O_3	: ozon
$O_2^{\cdot-}$: süperoksit anyon radikali
$OH\cdot$: hidroksil radikali
OH^-	: hidroksil anyonu
1O_2	: singlet oksijen
$ONOO^-$: peroksinitrit
$OOCCl_3\cdot$: triklorometilperoksi radikali
$ROO\cdot$: peroksit radikali

KISALTMALAR

AA	: Akrlamid
AAMA	: N-asetil-S-(2-karbamoiletıl)-sistein
AA-NAT	: Arılalkilamin N-asetiltransferaz
AFMK	: N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AMK	: N-asetil-5-metoksikinuramin
AST	: Aspartat Aminotransferaz
CAT	: Katalaz
c3OHM	: 3-hidroksimelatonin
Da	: Dalton
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
GA	: Glisidamit
GGT	: Gama-Glutamil Transpeptidaz
GAMA	: N-asetil-S-(2-karbamoil-2-hidroksietil)-sistein
GPx	: Glutatyon Peroksidaz
GR	: Glutatyon Redüktaz
GSH	: Redükte Glutatyon
GSSG	: Oksitlenmiş Glutatyon
GST	: Glutatyon-S-Transferaz
Hb	: Hemoglobin
HCC	: Hepatosellüler karsinom
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HMF	: 5-hidroksimetilfurfural
IκB-α	: İnhibitör Kappa B
i.p	: İntraperitoneal
JECFA	: Katkı Maddeleri ve Kontaminantları Uzman Komitesi
kDa	: Kilodalton
MDA	: Malondialdehit
mM	: Milimolar
MLT	: Melatonin

mV	: Milivolt
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
PNX	: Pinealektomi
ppm	: Milyonda bir
ppb	: Milyarda bir
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SE	: Standart Hata
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
TBA	: Tiyobarbutirik Asit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
TG	: Trigliserit
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
TOS	: Total Oksidan Seviyesi
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
μg	: Mikrogram
μmol	: Mikromol

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Karaciğer, farklı fonksiyonel ve anatomik yapıları içermekte olup, karbonhidrat, protein, lipit metabolizmasının düzenlenmesi; albümin, pıhtılaşma faktörleri gibi proteinlerin ve enzimlerin sentezlenmesini sağlamaktadır [1]. Karaciğer metabolik homeostazın korunmasında hayati bir organ olarak görülmekte olup ksenobiyotik maddelerin sistemik dolaşıma girmeden önce maruz kaldığı ilk organ olarak da kabul edilmektedir. Ksenobiyotiklerin metabolizması, dağılımı ve atılımından da sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle, karaciğer hücreleri önemli miktarda ksenobiyotiklere maruz kalmakta ve bu maruziyet sonucu oluşan karaciğer hasarı (hepatoksisite) büyük bir endişe meydana getirmektedir [2].

Gıda güvenliği, temel olarak gıda kaynaklı patojenler veya çevresel-kimyasal kalıntılar, işlenmiş gıdaların hijyenik olarak pişirilmesi ve sunulması, gıda alerjileri ve intoleransı göz önüne alındığında önemli kabul edilmektedir [3]. Bununla birlikte, yemek pişirme işlemleri sırasında bazı tehlikeler oluşabilmekte ve sağlık için risk oluşturabilmektedir [4]. İstenmeyen ısı kaynaklı kirleticilerden biri olan AA, Maillard reaksiyonları sırasında 120 °C'nin üzerinde amino asitlerin (esas olarak asparagin) ve indirgeyici şekerlerin karbonil grubu (örneğin glikoz ve fruktoz) arasındaki reaksiyonu sonucu oluşan bir maddedir [5]. Toksik formu monomer hali iken, AA'nın polimer formu da su arıtmada, kağıt, madencilik, şeker işleme ve suda çözünür maddelerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [6]. AA, yüksek sıcaklıkta hazırlanan ekmek ve patates ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada tespit edilmiş olup uzun yıllardır kanserojen madde olarak nitelendirilmektedir. Oral olarak alınan ve dolaşıma katılan AA, DNA, nöronlar, hemoglobin ve enzimlerle reaksiyona girebilmektedir. Bu reaksiyonlar sonucunda AA'nın, sinir sisteminde, üreme sisteminde, karaciğer ve böbreklerde birikimi artmaktadır [7].

Oksidatif stres, DNA, lipidler ve proteinler gibi tüm biyolojik makromoleküllere zarar veren serbest radikaller dahil reaktif oksijen türlerinin artmasıyla ilişkili bir süreç olarak değerlendirilmektedir [8]. Reaktif oksijen türleri (ROT), normal oksijen metabolizması sırasında üretilen oldukça reaktif radikallerdir. Bununla birlikte, aşırı ROT üretimi, hücrel bileşenlerde oksidatif hasara neden olmaktadır [9]. Karaciğer, ROT üretimi ile sonuçlanan çok aktif bir oksidatif metabolizmaya sahiptir. Oksidan hasarının karaciğer hastalıklarının indüklenmesinde önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir [10]. AA'ya maruziyet, karaciğerde oksidatif strese neden olabilmekte ve lipidlerin metabolizmasını (kolesterol metabolizması, sfingolipid metabolizması, gliserofosfolipid metabolizması ve yağ asidi β -oksidasyon metabolizması dahil) etkileyebilmektedir [11]. AA ve metaboliti glisidamit (GA) tehlikeli kanserojen maddeler olduğundan karaciğer gibi çeşitli organlar için tehlike yarattığı bilinmektedir [12]. Oksidatif stres veya mitokondriyal hasar ile alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, ilaca bağlı steatohepatit, viral hepatit, biliyer siroz hepatoselüler karsinom, iskemi/reperfüzyon hasarı ve transplant reddi gibi karaciğer hastalıkları arasında bir bağlantı olduğu bildirilmiştir [13].

MLT, serotoninin metoksi türevi olan N-asetil-5-metoksitriptamin'in sığır epifiz dokusunda izolasyonuyla Lerner ve arkadaşları tarafından 1958'de tanımlanmıştır. Yeni keşfedilen molekül, amfibilerin melanositlerindeki melanin (mela) agregasyonu üzerindeki etkileri ve serotoninenden (tonin) türetilmesi nedeniyle MLT olarak adlandırılmıştır [14]. MLT, birçok organizmanın işlevinde ve hayatta kalmasında önemli rol oynayan doğal bir hormondur [15]. MLT insanlar, bitkiler, hayvanlar, bakteriler, diğer tek hücreli mikroorganizmalar dahil olmak üzere birçok canlı türünde bulunmaktadır [16]. MLT'nin biyolojik rolleri geniş çapta araştırılmış olması nedeni ile, terapötik etkileri ve sağlık yararları da geniş bir aralığı kapsamaktadır. MLT, insan fizyolojik ritmini düzenlemekte, jetlag ve uykusuzluk gibi ilgili rahatsızlıkları hafifletmekte, serbest radikal türlerini temizlemekte, bağışıklık sistemini güçlendirmekte, yaşlanma karşıtı ve iltihap önleyici etkiler gösterebilmekte

ve antikanser aktiviteleri gerçekleştirebilmektedir [17]. MLT, doğrudan serbest radikalleri süpürürken dolaylı olarak da antioksidan enzimlerin artmasını, prooksidan enzimlerin azalmasını sağlamaktadır [18]. Bir MLT molekülü, serbest radikal süpürme yoluyla sekiz veya daha fazla reaktif oksijen türünü temizleyebilmektedir [19]. Son zamanlarda MLT'nin özellikle serbest radikallerin bolca üretildiği bir organel olan mitokondride yüksek konsantrasyonlarda olduğu bildirilmiştir. MLT'nin mitokondri ile yakın ilişkisi, hastalıkların başlangıcının ertelenmesinde, yaşam kalitesinin iyileştirilmesinde veya yaşam ömrünün uzatılmasında MLT'yi önemli bir hale getirmektedir [20].

Karaciğer, dolaşımdaki MLT'nin, idrarla atılan ürünlere metabolize edilebildiği tek organdır. MLT'nin hepatositlerde yüksek afiniteye sahip bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. MLT hepatositlerin proliferasyonunu inhibe ederek hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır [21]. MLT tedavisinin, karaciğerdeki doku ve hücrel lezyonları azaltabildiği, lipidperoksidasyonu ve DNA hasarını inhibe ettiği ve nitrit oksit (NO) düzeylerini azalttığı düşünülmektedir [22].

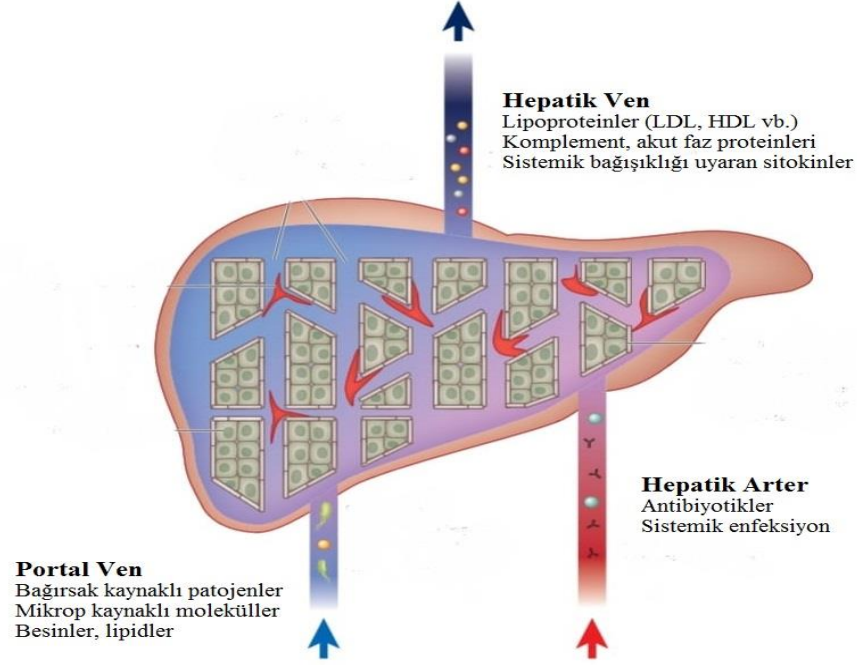
Mevcut araştırmamızın birincil amacı, MLT'nin, pinealektomi uygulanmış ratların karaciğer dokularında oksidatif stresi, inflamasyonu ve kanseri inhibe ederek AA'nın neden olduğu hepatotoksositeye karşı terapötik rolünü gözlemlemektir. Bu nedenle, pinealektomi uygulanmış ratların karaciğer dokularında oksidatif stres ve inflamasyon belirteçleri biyokimyasal olarak analiz edildi. Ayrıca, proinflamatuvar sitokinlerin çoğunun salınımını düzenlediği için baskın öneme sahip olan nükleer faktör kapp B (NF-κB) ve proliferasyon belirteci olan Ki67, immünohistokimyasal olarak değerlendirildi ve karaciğer dokuları ışık mikroskobu ile incelendi.

BÖLÜM 2

KARACİĞER

Karaciğer yapısal ve işlevsel olarak heterojen bir organdır ve karmaşıklığı bakımından beyinden sonra ikinci organ olarak kabul edilmektedir. Yetişkin bir insanda karaciğer, yaklaşık 1,5 kg ağırlıkta olup vücudun en büyük iç organını oluşturmaktadır. Karaciğer, amino asitlerin, karbonhidratların, safra asitlerinin, kolesterolün, proteinlerin, lipitlerin, vitaminlerin, safranın metabolizması gibi birçok hayati fonksiyonda rol oynamaktadır [23]. İskelet kası ve yağ dokusu dahil olmak üzere çeşitli dokular için metabolik olarak önemli olan karaciğer, vücut enerji metabolizmasının yönetilmesini sağlamaktadır [24]. Karaciğerdeki metabolik olayların gerçekleştiği bölümler, çeşitli enzimlerin dağılımına, hepatositlerin fonksiyonel adaptasyonuna, farklı fizyolojik ve patolojik koşullara göre değişmektedir [25].

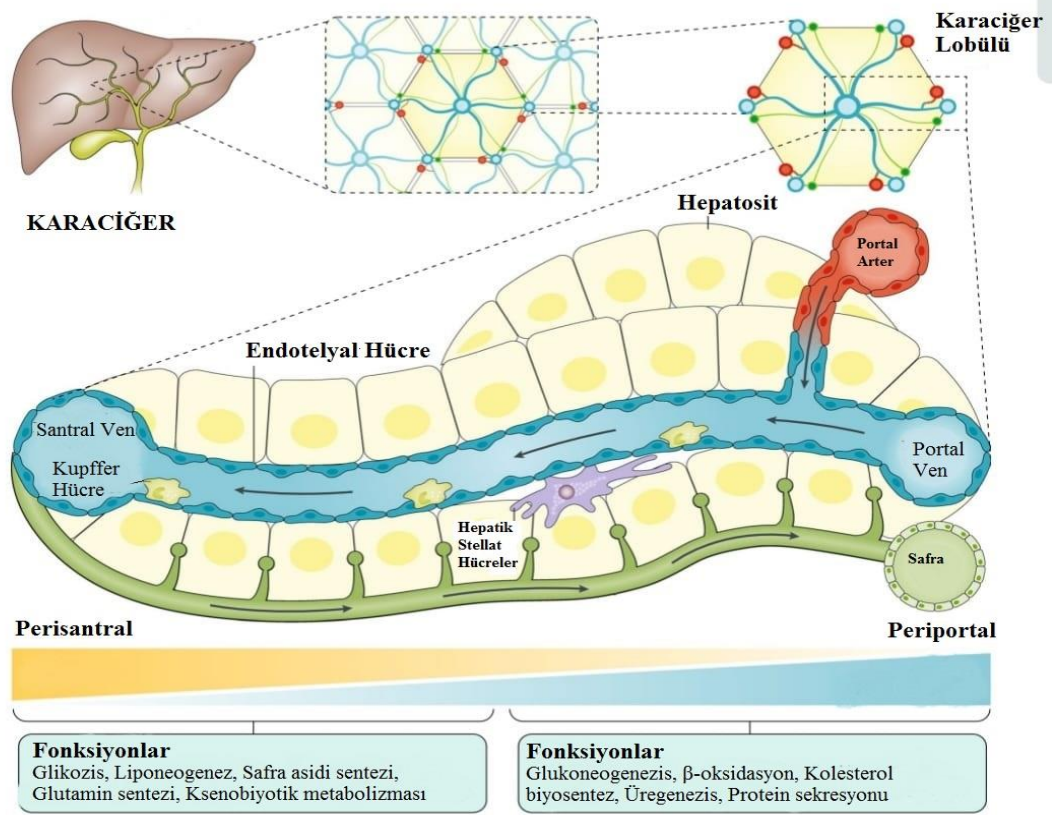
Karaciğere kan getiren iki damar yolu bulunmaktadır: %75-80`inden sorumlu olan portal ven iken %20-25`inden sorumlu olan hepatik arterdir. Portal ven, miks kanı ve sindirim sisteminden emilen besinleri hepatik sinüzoidlere taşımaktadır. Hepatik arter ise, intrahepatik safra kanalları gibi parankimal olmayan yapılara dağıtılan oksijenli kanı karaciğere taşımaktadır. Hepatik sinüzoidler intralobüler venlere boşalmakta olup bunlar birleşerek sublobüler venler meydana gelmekte ve sonunda birleşerek inferior vena kavaya akan hepatik ven oluşmaktadır (Şekil 2.1) [26,27].



Şekil 2 .1. Karaciğerin kanlanması [27].

Karaciğer periportal bölgede, yağ asidi β -oksidasyonu, amino asit katabolizması ve ürejeniz dahil olmak üzere oksidatif enerji metabolizması, glukoneogenez, kolesterol metabolizması gerçekleşirken; perisantral bölgede, glikoliz, glikozdan glikojen sentezi, liponeogenez, ketogenez, glutamin oluşumu ve konjugasyon reaksiyonları dahil olmak üzere ksenobiyotik metabolizması gerçekleşmektedir. Toplam karaciğer hacminin yaklaşık %20'sini oluşturan parankimal olmayan hücreler, Kupffer hücrelerinden (yerleşik karaciğer makrofajları), stellat (yağ depolayan veya Ito) hücrelerden, endotelial hücrelerden ve çukur hücrelerden (büyük granüler lenfositler) oluşmaktadır (Şekil 2.2) [25, 28]. Kupffer hücreleri ağırlıklı olarak, gelen patojen yüklü kan için ilk temas noktası olan karaciğer asinusunun periportal bölgesinde bulunmaktadır. Kupffer, büyük bir fagositik kapasite ile birlikte yüksek lizozomal enzim aktivitesine sahiptir [29]. Aktif Kupffer hücrelerinden oksijen radikalleri, TNF- α , interlökinler ve prostaglandinler dahil olmak üzere çeşitli toksik maddeler salınmaktadır. Ayrıca oksidanlar, TNF- α ve interlökinler gibi kritik sitokinlerin ekspresyonunun artıran redoks duyarlı

transkripsiyon faktörü NF- κ B'yi aktive etmede önemli rol oynamaktadır [30]. TNF- α 'nın hepatik ekspresyonu, birçok akut ve kronik karaciğer hastalığında ve hepatotoksik kimyasallara maruziyle artış gösterebilmektedir. Özellikle fulminan karaciğer yetmezliği, viral hepatit, alkol kullanımı, metabolik hastalık, otoimmünite ve biliyer obstrüksiyonunda artış meydana gelmektedir [31].



Şekil 2.2. Karaciğer hücreleri ve görevleri [28].

2.1. KARACİĞER ENZİMLERİ

Karaciğer enzimlerini, hepatositlerde sentezlenen alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST); safra kanalı epitel hücrelerinde sentezlenen gama-glutamil transpeptidaz (GGT), alkalin fosfataz (ALP) oluşturmaktadır [32].

Karaciğer enzimleri, karaciğer fonksiyon kan testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ALT ve AST düzeylerinin yükselmesi karaciğer hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [33]. Serumdaki ALT ve AST düzeylerinin karaciğerden daha az olduğu bilinmektedir. Karaciğer hasarı durumunda serum ALT ve AST düzeylerinde artış meydana gelmektedir [34]. Karaciğerde aminotransferaz enzimlerinin yükselme nedenleri arasında alkol, ilaç, gıda takviye ürünleri, besin pişirme sırasında oluşan kimyasal birleşikler, viral hepatit, otoimmün hastalıklar, iskemik hepatit, çölyak hastalığı, hipotiroidizm, Addison hastalıkları gibi etkenler yer almaktadır [35]. ALP yüksekliği ise kolestatik hastalıklarda ortaya çıkmakta olup safra akışının hem intrahepatik hem de ekstrahepatik obstrüksiyonu sonucunda oluşmaktadır. Ayrıca granülomatöz, infiltratif karaciğer hastalıklarında, karaciğer metastazında da ALP düzeylerinde artış meydana gelmektedir [36].

2.2. KARACİĞER HASARI

Karaciğerin kronik patolojik süreçlerinde, viral enfeksiyon, alkolik karaciğer hastalığı, alkolsüz steatohepatit ve otoimmün hastalıklar yer almaktadır. Altta yatan karaciğer hasarının tipine bağlı olarak, immün reaksiyonları tetikleyen çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Karaciğerde kronik immün reaksiyonlar karaciğer fibrozuna yol açmaktadır [37]. Karaciğer fibrozu ciddi bir sağlık sorunudur. Tedavi edilmezse ilerlemiş karaciğer sirozuna ve hepatosellüler karsinoma neden olabilmektedir. Fibrojenez, miyofibroblast aktivasyonu ve proliferasyonu ile başlamaktadır. Karaciğer fibrozu, ilerleyici olmadığı ve siroza yol açmadığı sürece geri dönüşümlü bir süreçtir. Fibrotik yanıtı neden olan ajanın uzaklaştırılması, karaciğer ileri siroz evresinde olmadığı sürece fibrozisin gerilemesine yardımcı olmaktadır [38]. Kronik inflamasyonun devam etmesi ve ilerleyici fibroz ise sirozla sonuçlanmaktadır. Bu son aşamaya ilerleme tipik olarak değişken olup yavaş ilerlemektedir [39].

Akut ve kronik karaciğer bozukluklarının çoğuna eşlik eden hepatik inflamasyon, çeşitli stres koşullarına yanıt olarak ortaya çıkan karmaşık bir süreçtir. Diğer organların çoğunda olduğu gibi, hepatositleri hasardan korumak, doku hasarının onarımını desteklemek için hepatik inflamasyon devreye girmektedir. Çok yoğun veya çözülemeyen (yani kronik hale gelen) inflamatuvar tepkiler, neredeyse değişmez bir şekilde büyük bir hepatosit kaybıyla, karaciğer parankiminde geri dönüşü olmayan bir hasara neden olmaktadır [40].

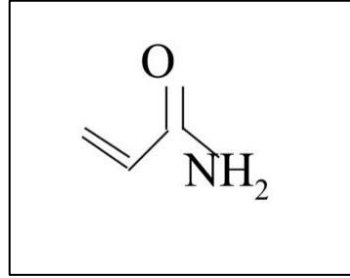
Karaciğer, ksenobiyotiklere maruz kalmakta olup, biyotransformasyonları için yüksek kapasiteye sahiptir. Sitokrom P450 enzimleri, terapötik ajanlar da dahil olmak üzere çeşitli yabancı bileşiklerin metabolizmasında birincil rol oynamaktadır. Ksenobiyotiklere bağlı karaciğer hasarı, serum transaminazlarda hafif yükselme, nadir de olsa potansiyel olarak yaşamı tehdit eden ve karaciğer nakli gerektirebilen durumlara neden olabilmektedir [41].

AA metabolizması karaciğerde meydana geldiğinden AA'nın karaciğer dokusu üzerinde toksit etkileri bulunmaktadır [42]. de Conti vd tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada AA'ya maruz kalan ratlarda karaciğer dokularında DNA eklentilerini uyardığı gözlemlenmiştir [43]. Erdemli vd çalışmasında 20 gün boyunca 5 mg/kg/gün AA maruz bırakılan hamile ratların karaciğerinde antioksidan/oksidan dengesinin oksidan lehinde olduğu ve oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir [44]. AA, ayrıca hepatositlerde nekroza, kanamalara, parankim dilatasyonuna ve belirgin bir inflamasyona neden olmaktadır [45].

BÖLÜM 3

AKRİLAMİD

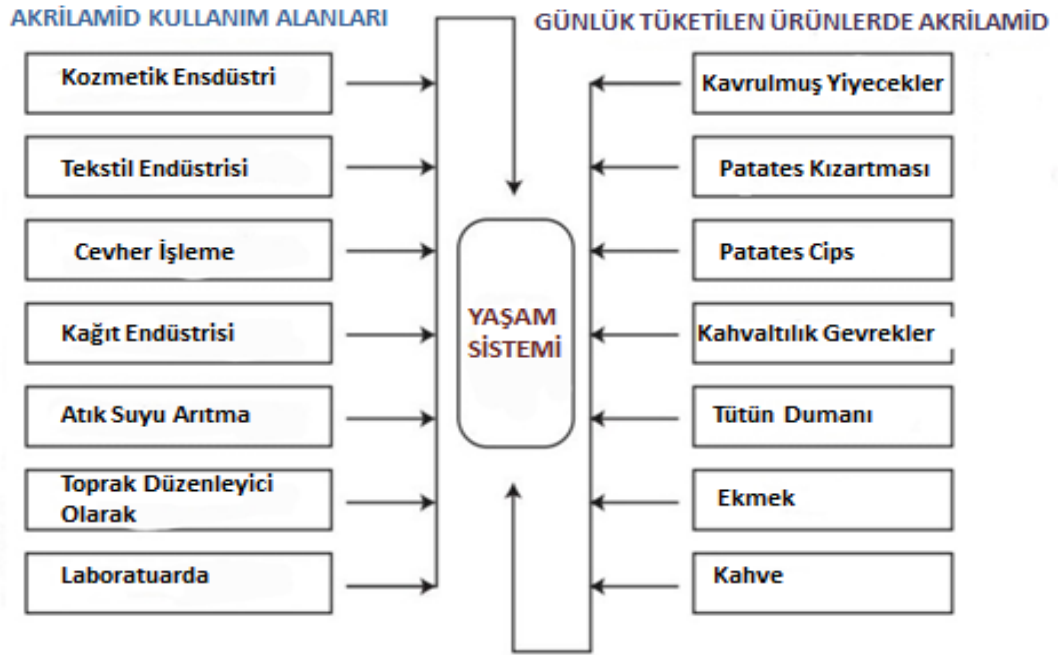
AA (2-propenamid), C_3H_5ON moleküler formülü olan, beyaz kristal yapıda ve suda yüksek çözünürlüğe sahip kokusuz bir madde olup düşük molekül kütlesine (71 Da) sahiptir (Şekil 3.1) [46, 47]. AA'nın yüksek reaktivitesi içerdiği çift bağ ve amid grubu ile ilişkilidir. Bu sebeple hidrojen bağları oluşturabilmekte ve hem amid hem de vinil gruplarıyla reaksiyon verebilmektedir. Ayrıca yüksek sıcaklık ve UV radyasyonu etkisiyle de polimerize olabilmektedir [48].



Şekil 3.1. Akrilamidin molekül yapısı [47].

AA monomer ve polimer yapıda bulunmaktadır. Monomer formu toksik olup kanserojen ve mutajen etki göstermektedir. Hatta omurgalı sinir sistemi üzerinde ciddi olumsuz etkisi bulunmaktadır. Polimer formu (poliakrilamid), içme suyunun arıtılması, endüstriyel atıkların temizlenmesi, kağıt ve kağıt hamuru işleme, gıda paketlenme endüstrisi, petrol endüstrileri, boya ve gıda endüstrileri, kozmetik ve eczacılık dahil olmak üzere çok çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır [49]. AA, tütün dumanında da bulunmaktadır ve bu nedenle hem sigara içenler hem de içmeyenler için maruziyet kaynağı haline gelmektedir [50]. Endüstriyel kullanımları nedeniyle, birçok insan işyerinde deriden emilim veya soluma yoluyla AA'ya maruz kalabilmektedir [51].

İsveç Ulusal Gıda İdaresi, bazı gıdalarda uzun süreli ısı işlemlerinin önemli miktarda gıda kaynaklı AA üretebileceğini duyurması 2002'de gerçekleşmiştir [52]. Bu tarihten itibaren çeşitli ülkelerde yapılan araştırmalar, patates kızartması, kahve, patates cipsi ve kurabiye gibi gıdalarda yüksek AA seviyeleri olduğunu göstermektedir (Şekil 3.2) [53, 54]. AA çiğ gıdalarda bulunmamaktadır [55]. AA'nın pişirme, kızartma, kavurma, fırınlama sırasında ortaya çıktığı ve zararsız gıda bileşenleri olarak bilinen doğal öncülerden kaynaklandığı bilinmektedir. Ana reaksiyon, ısıyla indirgeyici karbonhidratların asparagin ile Maillard reaksiyonu meydana getirmesiyle oluşmaktadır [56].



Şekil 3.2. Akrilamid kullanım alanları ve kaynakları [54].

AA'nın, gıdalarda bulunması genel nüfus ve bilim insanları arasında endişe yaratmaktadır [53]. AA'nın, sitokrom P-450 CYP2E1 kataliziyle genotoksik olduğu kanıtlanmış olan GA'ya dönüşümüyle genotoksisiteye neden olabileceği düşünülmektedir [57]. Bu bileşik, farklı kanser türlerinin gelişimi ile ilişkili

olmasından dolayı Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) bir halk sağlığı sorunu olarak tanımlanmaktadır [58].

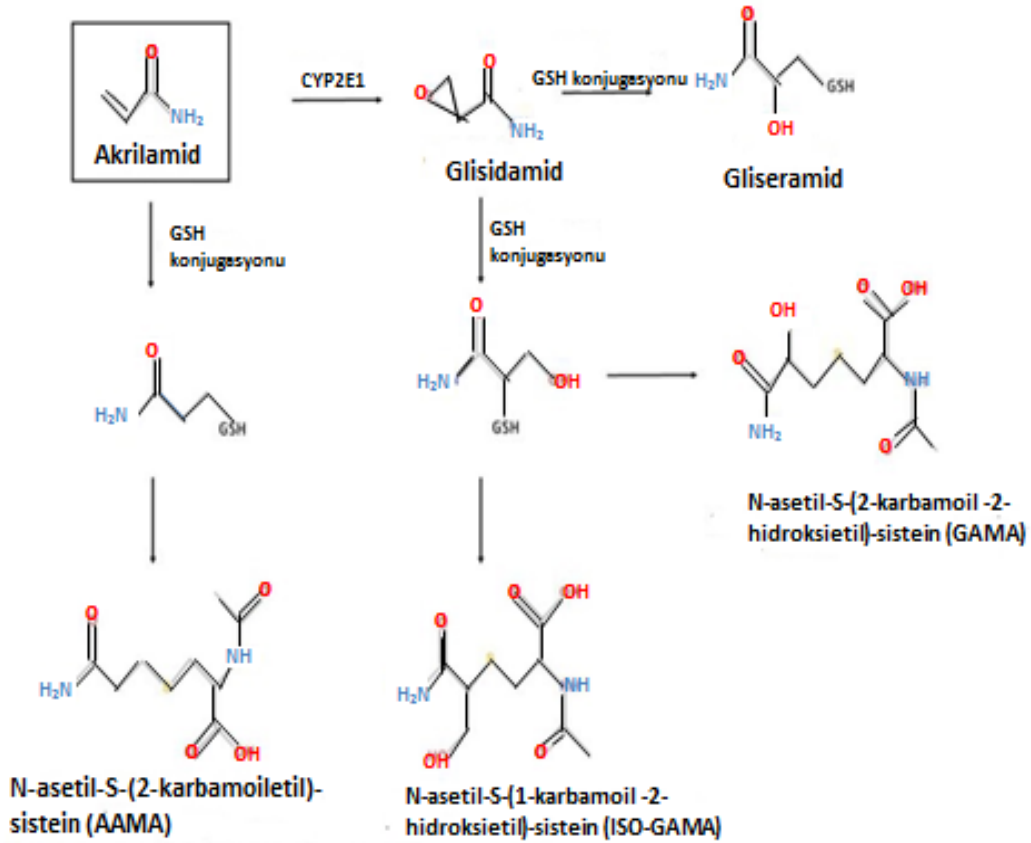
AA potansiyel kanserojenliği göz önünde bulundurulduğunda uzun süre maruz kalmanın etkilerinin neler olduğunu değerlendirmek çok önemlidir [59]. AA, gıdalarda oluşum mekanizması, gıdalardaki miktarının azaltılma yolları, gıdalardaki analiz yöntemleri ve tüketicilerin farklı yaş gruplarındaki maruziyetleri ile ilgili çok sayıda çalışma kapsamlı bir şekilde incelenmekte ve bilimsel bakış açıları ve teoriler açısından değerlendirilmektedir [60]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), AA'nın güvenilir bir alt alım düzeyine sahip olmadığını belirtmektedir. Aynı zamanda düşük dozlara maruz kalma durumunda AA'nın zararlı etkilerinin klinik olarak belirgin olmayabileceği, ancak morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerinin görülebileceği bir sessiz semptom döneminin olabileceği bildirilmektedir [61].

3.1. AKRİLAMİDİN METABOLİZMASI

Gıda yoluyla alınan AA'nın, ratlarda gastrointestinal sistem tarafından hızlı ve tam olarak emildiği ve periferik dokulara dağıldığı bilinmektedir [62]. İnsan vücudunda, ratlarda ve kemirgenlerde AA, glutatyon-S-transferaz (GST) tarafından katalize edilen GSH ile doğrudan konjugasyonla ya da sitokrom P-450 CYP2E1 aracılığıyla GA oluşumu ve ardından GSH ile konjugasyonla enzimatik olarak metabolize edilmektedir [63,64]. GSH ile reaksiyon sonucunda AA ve türevleri toksik özelliklerini kaybeder ve organizmadan daha kolay atılmaktadır [48].

AA toksisitelerine, epoksit metaboliti olan GA da aracılık etmektedir. GA, ağırlıklı olarak sitokrom P-450CYP2E1 tarafından oluşturulmaktadır. GA, mutajenite ve karsinojitenin ana nedeni gibi görünen AA'dan daha yüksek afinite ile DNA eklentileri oluşturmaktadır [65]. Alınan bir AA dozunun en az %6'sı GA dönüştürülmektedir [66]. AA ve GA kısa bir yarı ömre sahip olduğu bilimektedir. Emilen AA'nın çoğu, merkapturik asit türevlerine dönüştürüldükten sonra idrar

yoluyla elimine edilmektedir. AA ve GA'nın GSH konjugatları sırasıyla merkapturik asit türevleri olan N-asetil-S-(2-karbamoiletıl)-sistein (AAMA) ve N-asetil-S-(2-karbamoil-2-hidroksietıl)-sisteine (GAMA) dönüştürülür. Bu nedenle idrar AAMA ve GAMA seviyeleri, AA maruziyetinin yaygın olarak kabul edilen biyobelirteçleri haline gelmiştir (Şekil 3.3) [67-69]. AA günlük dozunun yaklaşık %50'si idrarla organizmadan uzaklaştırılmaktadır [48].



Şekil 3.3. Akrilamid metabolizması [68,69].

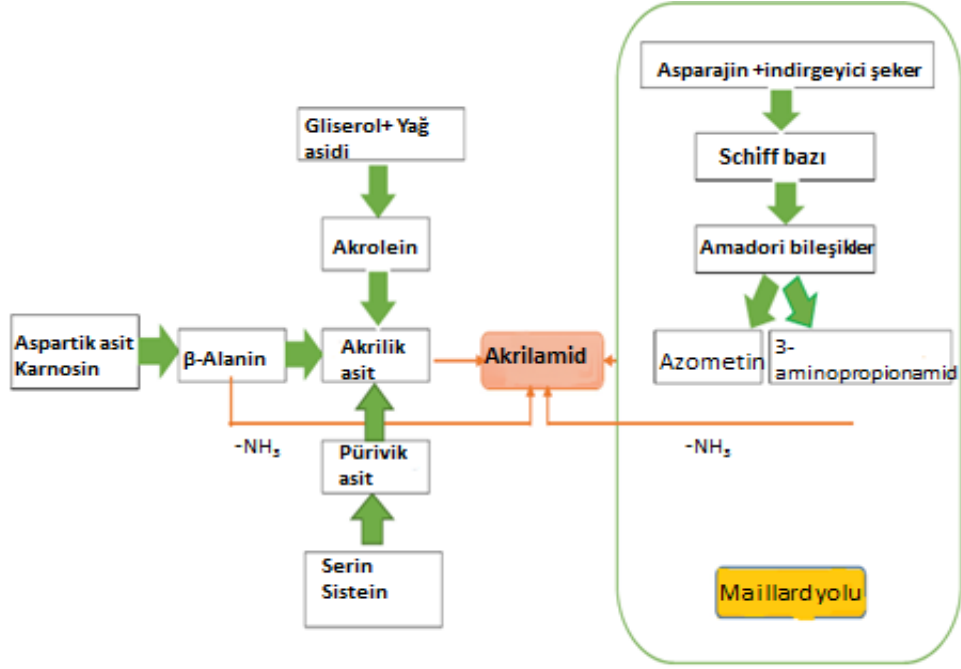
AA, hemoglobinin (Hb) N-terminal valini dahil olmak üzere yapısal ve çözünür plazma proteinlerinin merkapto veya amino grupları gibi nükleofilik merkezlerine eklenmektedir. Oluşan Hb eklentileri, hayvan/insan eritrositlerinin yaklaşık 3-4 aylık ömrü boyunca biriktiklerinden, uzun süreli maruziyeti yansıtan biyobelirteçler olarak

görülmektedir [70]. AA'nın gıda kontaminantındaki önemi, kızarmış yemle beslenen ratlarda hemoglobin eklenti seviyesinde meydana gelen büyük bir artış sonucunda anlaşılmıştır [56]. 50–100 µg/kg dozlarda gıdalarla/suyla AA alımı, maruziyete bağlı olarak eritrositlerde AA-Hb eklentilerinin birikimiyle sonuçlanmaktadır. Düşük dozlarda AA alımı, karaciğerde önemli GA oluşumu göstermesine rağmen, Hb-GA eklentilerinde artış gözlenmemektedir. Bu durum, alınan AA doz seviyelerine kadar (50-100 µg/kg), karaciğerde metabolik olarak oluşan herhangi bir GA'nın glutatyon ile temizlenebileceğini ortaya çıkarmıştır [70].

Çalışmalar yenidoğan kanında AA-Hb eklentilerinin varlığını gösterdiğinden, AA'nın plasenta bariyerini geçebildiği tespit edilmiştir [71]. Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir keşif çalışmasında AA'nın, emziren annelerde kan-anne sütü bariyerini geçebildiği de doğrulanmıştır. Anne sütünün 18,8 µg/L'ye kadar AA içerebileceği saptanmıştır. Bu nedenle hamile kadınların AA içeriği yüksek gıda ürünlerini tüketmemeleri önerilmektedir [72,73].

3.2. AKRİLAMİD OLUŞUM MEKANİZMALARI

AA'nın oluşum mekanizmaları arasında: serbest aminoasitler ve indirgeyici şekerler arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu, asparaginin dekarboksilasyonu ve deaminasyonu, amonyak ve akrolein veya akrilik asit arasındaki reaksiyon (lipid bozulması), 5-hidroksimetilfurfural (HMF) ve serbest asparagin reaksiyonları bulunmaktadır (Şekil 3.4) [74,75]. Gıdalarda AA oluşumu için çok sayıda mekanizma rapor edilmiş olup, Maillard reaksiyonu en sık karşılaşılan mekanizma olarak öne sürülmektedir [76].

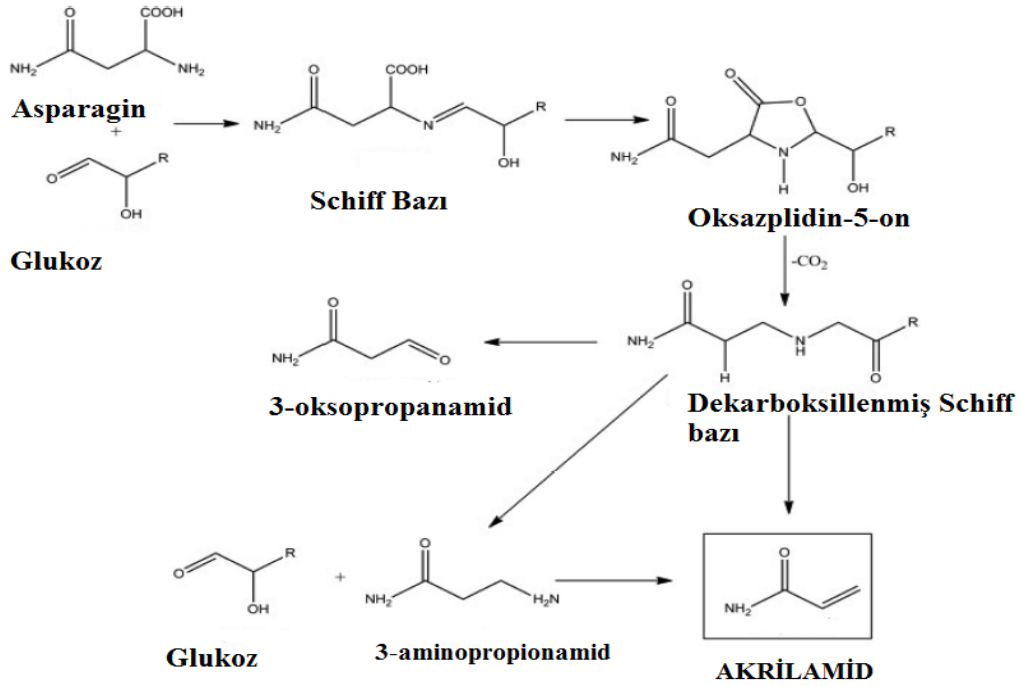


Şekil 3.4. Akrikamid oluşum mekanizmaları [75].

3.2.1. Maillard Reaksiyonu ile Akrikamid Oluşumu

Maillard reaksiyonu ilk olarak 1912'de bir Fransız kimyager Louis Camille Maillard tarafından tanımlanmış olup, bugün anlaşıldığı şekilde reaksiyondaki adımlar ilk olarak Amerikalı kimyager John Hodge tarafından "Hodge Scheme" olarak ileri sürülmüştür [77]. Maillard reaksiyonu tek bir reaksiyon olmamakla birlikte, gıdanın ısıl işleme sırasında meydana gelen karmaşık bir reaksiyon dizisidir. Bu enzimatik olmayan reaksiyon sırasında, indirgeyici şekerler (glukoz ve fruktoz), amino asitlerle, özellikle de asparaginle, genellikle Amadori düzenlemesiyle N-glikozit üretmek için yoğunlaşmakta, melanoidin üretmek için farklı adımlardan geçmektedir [78]. Şeker-protein konjugatından suyun çıkarılmasıyla bir Schiff bazı oluşmakta, bu da oksazolidin-5-on oluşumuyla daha fazla dekarboksilatlanmaktadır. Dekarboksilatlanmış ürün, 3-aminopropionamid veya 3-oksopropanamid oluşturmak üzere hidrolizden sonra veya imin eliminasyonu yoluyla AA'ya ayrılmaktadır (Şekil

3.5) [79-81]. Maillard reaksiyonunda, 1 mol asparagin başına 368 µmol AA oluşmaktadır [73].

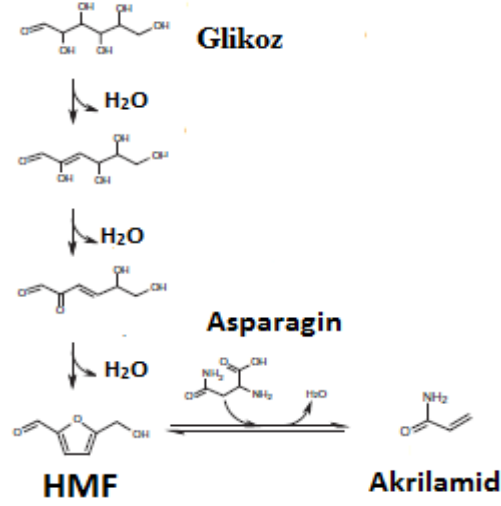


Şekil 3.5. Maillard reaksiyonu ile akrilamid oluşum mekanizması [81].

3.2.2. Alternatif Yollar Üzerinden Akrilamid Oluşumu

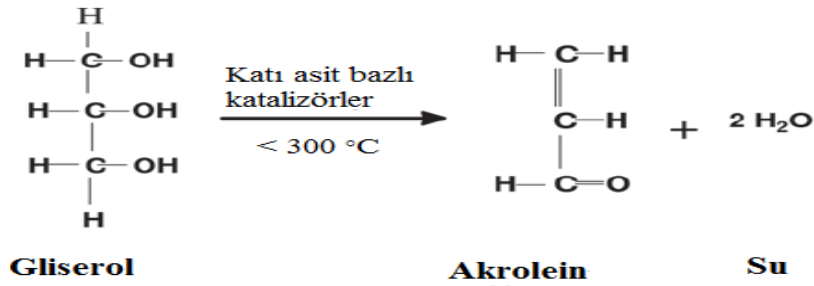
AA oluşumunda rol oynayan karbonil birleşikler arasında hidroksikarboniller, dikarboniller ve lipid oksidasyonu ile oluşan alkadienaller bulunmaktadır. Sakkarozun kavurma sırasında glukoza parçalanması ve çok reaktif bir fruktofuranosil katyonu, dikarbonil bileşik olan HMF oluşumuna neden olmaktadır. HMF ile asparagin reaksiyonu sonucunda ise AA oluşumu meydana gelmektedir (Şekil 3.6) [82]. Ayrıca fruktofuranosil katyonunun asparagin ile reaksiyonu sonucunda da AA oluşmaktadır [83]. HMF taze, işlenmemiş gıdalarda bulunmamakta olup ancak yüksek sıcaklıklarda ısıtıldığında Maillard reaksiyonunda bir ara ürün olarak oluşmaktadır. Glukozun HMF oluşumu üzerindeki etkisi,

sakkarozun etkisinden çok daha yüksektir [84]. HMF'nin sadece Maillard reaksiyonları tarafından değil, aynı zamanda karamelizasyon degradasyonu sırasında da oluşabilmektedir [85].



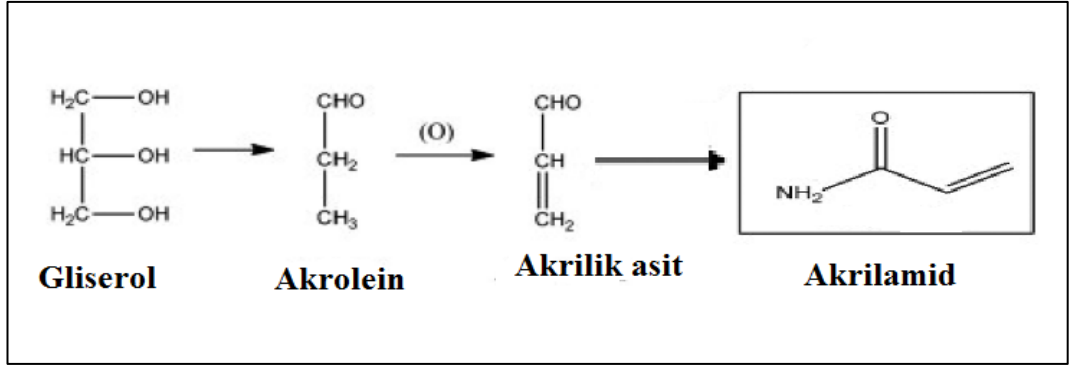
Şekil 3.6. HMF`den akrilamid oluşumu [82].

Yağ, dumanlanma noktasının üzerindeki sıcaklıklarda ısıtıldığında önce gliserol ve yağ asitlerine hidrolize edilmektedir. Daha sonra suyun gliserolden bir heterolitik asit katalizli karbonyum iyonuyla ve ardından oksidasyon ile elimine edilmesiyle akrolein oluşmaktadır. Ayrıca akrolein oksitlenmesiyle akrilik asit meydana gelmektedir (Şekil 3.7) [86].



Şekil 3.7. Gliserolden akrolein oluşumu [86].

Akrilik asit, aspartik asit, L-alanin ve L-arginin gibi bazı amino asitlerin termal ayrışmasından veya dolaylı olarak piruvik asit oluşumu yoluyla serin ve sisteinden de oluşabilmektedir. Akrolein ve akrilik asit, halihazırda mevcut olan veya amino asitlerin ve proteinlerin termolizi sırasında oluşan amonyak (NH₃) ile reaksiyona girerek AA oluşturabilmektedir (Şekil 3.8) [81,87]. Ayrıca et ürünlerindeki karnosinden, akrilik asit ve devamında da AA veya türevlerini oluşturabilmektedir. Serin ve sistein gibi amino asitler, piruvik asit yoluyla termal olarak laktik aside dönüştürülebilmekte ve amonyak varlığında laktamit ve AA üretilmektedir [88].



Şekil 3.8. Akrolein ve akrilik asitten akrilamid oluşumu [81].

3.3. AKRİLAMİDİN OLUŞTUĞU GIDALAR

AA alımına en fazla katkı sağlayan besinler, ulusal beslenme biçimlerine ve besin hazırlama yöntemlerine bağlı olarak ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte, birçok ülkede ekmek, tahıl bazlı gıdalar, kahve ve patates ürünleri AA alımına en fazla katkıda bulunan besinleri oluşturmaktadır [49]. Bu ürünler, diğer gıdalara kıyasla çok daha yüksek seviyelerde AA içerdiklerinden veya genel popülasyon için normal beslenmenin bir parçası olduğundan, yüksek tüketim oranları AA maruziyet değerlendirmesi açısından önemli görülmektedir [89]. AA'nın çok çeşitli gıdalarda değişken düzeylerde bulunması ve bu gıdaların alımındaki farklılıklar sonucu kalınan maruziyetin doğru bir şekilde belirlenmesinde zorluklar yaşanmaktadır [90]. Avrupa Birliği Komisyon Yönetmeliği 2017/2158 raporuna

göre, gıdalardaki (işlenmiş tahıl ürünleri, kahve ikameleri vb.) ortalama AA içeriği 40-4000 µg/kg olarak bildirilmiştir [91].

Protein ve karbonhidrat içerikli yüksek ısıl işlem gören gıdalarda, orta (5–50 µg/kg) ve daha yüksek (yaklaşık 150–4000 µg/kg) AA miktarları tespit edilmiştir [92]. Patatesler hem asparagin hem de glukoz ve fruktoz gibi indirgeyici şekerler açısından yüksek olduğundan ve kızartma işlemi uygulandığından patates cipsleri AA oluşumu için optimum koşulları sağlamaktadır [93]. Patates cipsi (318 ppb), öğütülmüş kahve (205 ppm), kraker, atıştırmalık (169 ppb) ve unlu mamuller (34 ppb) gibi fırınlanmış ve derin yağda kızartılmış gıdalarda önemli AA seviyeleri belirlenmiştir [65]. Mesias vd'nin 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada, ilkokul çocuklarının okul kantinlerinde tükettikleri patates kızartmasına bağlı olarak maruz kaldıkları AA düzeyi, 6-9 yaş arası öğrencileri (ortalama vücut ağırlığı 30 kg) için 0,03-0,07 µg/kg canlı ağırlık/gün; 10-11 yaş öğrenciler (ortalama vücut ağırlığı 45 kg) için ise 0,02-0,05 µg/kg canlı ağırlık/gün olduğunu gözlenmişlerdir [94]. Lim vd tarafından yapılan çalışmada ise AA, patates cipslerinde 0,4-14,3 µg/kg aralığında ve patates kızartmasında 77,7-496,0 µg/kg gibi yüksek konsantrasyonlarda olduğu gözlemlenmiştir [95]. Ölmez vd tarafından Türkiye pazarından temin edilen 311 gıdanın AA içeriğinin incelendiği bir çalışmada, en yüksek AA seviyesi, 2336 mg/kg patates cipsinde olmak üzere, kahvaltılık gevreklerinde 121 mg/kg, bisküvilerde 198 mg/kg, krakerlerde 247 mg/kg, kavrulmuş fındıkta 128 mg/kg, kavrulmuş bademde 260 mg/kg, kavrulmuş mısırdaki 194 mg/kg, türk kahvesinde 266 mg/kg, tulumba tatlısında 241 mg/kg, kemalpaşa tatlısında 512 mg/kg ortalama AA tespit edilmiştir [89]. Şenyuva vd tarafından Ankara yerel süpermarketlerindeki 120 gıda örneğinin incelendiği çalışmada, ortalama AA seviyelerine göre besin grupları, kraker (1072 ng/g) > patates cipsi (433 ng/g) > bisküvi (389 ng/g) > kek (204 ng/g) > bebek mamaları (149 ng/g) > mısır cipsleri (132 ng/g) > kurabiyeler (126 ng/g) > kahvaltılık tahıllar (112 ng/g) > ekmekler (108 ng/g) > ızgara sebzeler (107 ng/g) > gofretler (106 ng/g) > çikolatalar (57 ng/g) olarak belirlenmiştir [96].

Avrupa Birliği Komisyon Yönetmeliğinde kavrulmuş kahve için maksimum AA limiti 400 µg/kg olarak belirlenmiştir [91]. Lim vd tarafından yapılan çalışmada, kavrulmuş kahvedeki AA konsantrasyonu ortalama 10.6 µg/kg arasında olduğu tespit edilmiştir [95]. Kavurma işlemi başlangıcında AA seviyesini hızla yükseltmektedir. Daha sonra kavurma işleminin sonlarına doğru fiziksel ve kimyasal kayıplardan dolayı çok hızlı bir şekilde düşmeye başlamaktadır [97]. Bu nedenle, hafif kavrulmuş kahve çekirdeklerinin, koyu kavrulmuş kahve çekirdeklerine kıyasla nispeten yüksek miktarda AA içerebileceği belirtilmektedir [98]. Başaran vd'nin 2019 yılında yaptıkları çalışmada, ortalama AA içeriği 200 ml porsiyondaki hazır kahvelerde, 3'ü bir arada kahve türlerinde 9,6 µg, fındık aromalı 3'ü bir arada hazır kahve türlerinde 8,0 µg, 2'si 1 arada kahve türlerinde 9,1 µg, Mocha kahve türlerinde 13,3 µg, latte kahve türlerinde 6,8 µg; demlenmiş kahvelerden ise americano kahve türlerinde 3,9 µg, filtre kahvede 3,3 µg, espresso 0,8 µg AA içerdiği gözlemlenmiştir [99]. Akgün vd tarafından 36 kahve numunesindeki AA miktarının analiz edildiği çalışmada, Türk kahvesinin 131-283 µg/kg, dibek kahvesinin 31-169 µg/kg ve menengiç kahvesinin 154,7-323,4 µg/kg AA içerdiği tespit edilmiştir [100]. Endeshaw vd tarafından yapılan çalışmada sokak satıcılarındaki toz ve demlenmiş kahvelerin AA miktarları sırasıyla 346 µg/kg ve 25 µg/L; endüstriyel işlenmiş kahvedeki AA miktarı ise 906 µg/kg ve 89 µg/L olduğu gözlenmiştir. Toz ve demlenmiş kahvelerin AA içerikleri arasında, sokak satıcıları ile endüstriyel olarak işlenmiş kahveler arasındaki farkın kavurma ve demleme koşullarına bağlı olduğu düşünölmektedir [101].

Ortalama kakao bazlı gıda AA içerikleri EFSA'da 104 ng/g ve Kanada'da 310-555 ng/g olarak belirlenmiştir [58,102]. Jeong vd çalışmasında çikolatalardaki AA seviyeleri sırasıyla, bitter çikolata (54,9 ng/g, >%30 kakao) > sütlü çikolata (15,9 ng/g, %20 kakao) > çikolata (8,6 ng/g, kakao içeriği > %7) > beyaz çikolata (3,5 ng/g) içerdiği gözlenmiş olup, AA içeriğini katı kakao kütesinin belirlediğini tespit edilmiştir [103].

EFSA`ya göre ekmek için ortalama AA konsantrasyonu 23 µg/kg olarak belirlenmiştir [58]. Andačić vd tarafından ekmek ve unlu mamullerden 100 ürün içerisindeki AA düzeyinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmada, en düşük ortalama AA içeriği buğday bazlı ekmek ve unlu mamüllerde (51 µg/kg) olmak üzere; mısır bazlı grupta 56 µg/kg, çavdar bazlı grupta 133 µg/kg olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki AA içeriğindeki farklılıklar, tahıl veya hamurdaki farklı miktarda serbest asparaginden kaynaklı olduğu düşünülmüştür [49]. AA, ekmeklerin dış kısmında yoğun olarak bulunmakta olup buğday ekmeğinde, AA içeriğinin %99'undan fazlası kabukta tespit edilmiştir [104]. Boyacı Gündüz vd tarafından Türkiyede 22 ekmekteki AA miktarlarının tespiti için yapılan çalışmada, en yüksek AA tam buğday ekmeğinde (479 µg/kg) olmak üzere sırasıyla; çavdar ekmeğinde 432 µg/kg, kepek ekmeğinde 307 µg/kg, taş fırın buğday ekmeğinde 171 µg/kg, beyaz buğday ekmeğinde ise 121 µg/kg tespit edilmiştir [105].

Hai vd tarafından 304 ürünün AA düzeyinin tespit edilmesi amacıyla yapılan çalışmada 35 ürünün AA seviyesinin ≥ 500 µg/kg olduğu gözlenmiştir. Özellikle yağda kızartılan patates cipsi, kızarmış patates, kızarmış erişte, pirinç krakeri ve kızarmış kek gibi gıdalarda, 25-1782 µg/kg arasında yüksek AA konsantrasyonlarına sahipken; kurutulmuş patates, kurutulmuş muz, kurutulmuş sebzelerde, sadece ürünleri kurutmak için fırın ısısı kullanıldığından düşük AA seviyesi gözlemlenmiştir. Bununla birlikte düşük şekerli veya düşük nişastalı sebzeler (havuç, bamya), AA oluşumunu azaltma yeteneğine sahip Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ ve Na^+ gibi çok sayıda metal katyon içerdiğinden bu gıdalardaki düzeyler dikkate değer bulunmamıştır [106].

Jeong vd tarafından 16 adet karabiberdeki AA düzeyinin araştırıldığı çalışmada, biberin taneli ve toz halindeki formu arasında bir fark görülmezken, AA içeriğinin biber rengine göre farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Beyaz biber (61,8 ng/g), örneklerinin AA içerikleri, karabiber (397 ng/g) örneklerine göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Karabiber, olgunlaşmamış meyvelerin ısıtılmasıyla üretilmektedir.

Beyaz biber ise olgun meyvelerden hazırlanmakta ve perikarpı çıkarılmaktadır. Perikarp varlığı, siyah ve beyaz biberler arasında AA içeriğinin farklı olmasına neden olduğu düşünülmüştür [103].

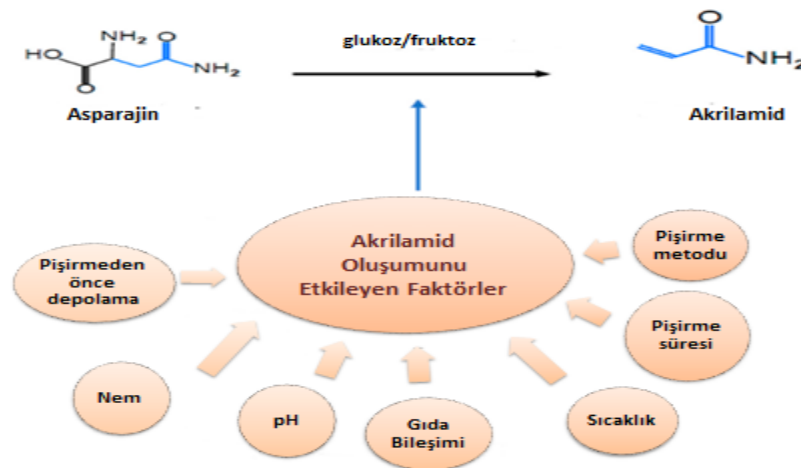
Branciarı vd tarafından yapılan çalışmada, 25 günlük okul kantininin yemek menüsünün, en yüksek ortalama AA konsantrasyonu patates gıda kategorisinde (841-843 µg/kg) olup, bunu unlu mamuller (244-244 µg/kg), et (222-227 µg/kg) ve yumurta ürünlerinin (151-161 µg/kg) takip ettiği gözlenmiştir. 3-5 yaş arası çocuklar en yüksek AA alımına sahipken (2,91-3,25 mg/kg vücut ağırlığı/gün), bunu 6-11 yaşındakiler (2,03-2,28 mg/kg vücut ağırlığı/gün) ve 11-13 yaşındakilerin (1,55-1,78 mg/kg vücut ağırlığı/gün) takip ettiği gösterilmiştir [107]. Gıdaların AA alımına katkıları, gıdalardaki AA düzeylerinin değişkenliği ve farklı ülkelerdeki diyetlerin farklı yapısı nedeniyle ülkeden ülkeye önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir [108]. Çocuklar ve ergenlerin, AA içeren gıdaları (örneğin patates cipsi, patates kızartması ve kurabiye) daha fazla tüketmeleri nedeniyle AA maruziyetleri yetişkinlerden daha yüksek olmaktadır [109]. Günlük AA alımı, ortalama 70 kg vücut ağırlığına sahip yetişkinler için 14 -70 µg/gün, çocuklar için ise 70- 280 µg/gün arasında olduğu düşünülmektedir [66]. EFSA tarafından AA maruziyetinin, tüm yaş gruplarında ortalama 0,4 -1,9 µg/kg vücut ağırlığı/gün ve obez bireylerde 0,6-3,4 µg/kg vücut ağırlığı/gün olduğunu düşünülmektedir [58]. Gıda Katkı Maddeleri ve Kontaminantları Uzman Komitesi (JECFA), ortalama AA maruziyetini, yetişkinler için 0,2-1,0 µg/kg vücut ağırlığı/gün ve yüksek miktarda tüketiciler için (obez bireyler) 0,6-1,8 µg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlemektedir [110].

Matthys vd tarafından ergenlerden 7 günlük besin tüketim kaydı alınarak yapılan bir çalışmada diyetle ortalama AA alımının 0,51 µg/kg vücut ağırlığı/gün olduğu belirlenmiştir [111]. Nematollahi vd tarafından farklı yaş gruplarında Tahran pazarındaki sıcaklıkla etkileşime girmiş 7 gıda üzerinde yapılan çalışmada, tüm yaş gruplarında sırasıyla en yüksek ve en düşük AA alım oranları (g/gün) ekmek ve kahvede bulunmuştur. Kahve, günlük tüketim oranı en düşük olması nedeniyle en

yüksek AA miktarını göstermesine rağmen, tüm yaş gruplarında sadece %1-2'lik pay oranına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ekmek ise düşük miktarda AA içermesine rağmen, yüksek miktarda tüketildiği için tüm yaş gruplarında (%50'den fazla) en önemli AA kaynağı olarak görülmektedir [112-113]. Bebekler de AA'ya en çok maruz kalan grubu oluşturmaktadır [114]. Abt vd tarafından 2011-2015 ve 2002-2006 yılları arasındaki gıdalardaki AA maruziyet miktarlarının karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada; bebek mamalarında (kavanozlu meyveler, kavanozlu sebzeler, kavanozlu karışımlar, diş çıkaran bisküviler, krakerler, puflar, peksimet) ortalama AA konsantrasyonu, 2002–2006 için 36,9 µg/kg, 2011-2015 için 165,1 µg/kg tespit edilmiştir. En yüksek ortalama konsantrasyonlar, bebek krakerlerinde (826,9 µg/kg) ve diş çıkarma bisküvilerinde (414,5 µg/kg) olduğu gözlemlenmiştir [115].

3.4. GIDALARDA AKRİLAMİD OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

AA oluşumunu, sıcaklık, işleme süresi, pH, nem içeriği, reaktan konsantrasyonları ve reaktanların türü, ürünün depolanma koşulları etkilemektedir (Şekil 3.9) [116,117].



Şekil 3.9. Akrilamid oluşumunu etkileyen faktörler [117].

3.4.1. İndirgeyici Şekerler

Glukoz, fruktoz ve sakkaroz gibi mono veya disakkaritlerin varlığı AA oluşumunu doğrudan etkilemektedir. Şekerlerin reaktivitesi zincir uzunluklarına göre farklılık göstermekte olup daha kısa karbon zincirlerine sahip şekerler, yüksek AA oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle, Maillard reaksiyonunda pentozlar, heksoz ve disakkaritlerden daha reaktif olmaktadır. Ayrıca aldo şekerler, keto şekerlerinden daha reaktiftir [118]. Gökmen vd tarafından kurabiyelerdeki şekerlerin AA'ya etkisini inceleyen çalışmada, kurabiye yapımı sırasında sakkaroz yerine glukoz kullanıldığında AA miktarında ciddi bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Sakkaroz miktarının 10 g'dan 35 g'a çıkarılması ise pişirme sırasında oluşan AA miktarını neredeyse iki katına kadar çıkmasına neden olmuştur [119]. Summa vd çalışmasında hamur tariflerinde sakkaroz yerine fruktoz kullanıldığında AA konsantrasyonunun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [120]. Bertuzzi vd tarafından farklı kahve çekirdekleri üzerinde yapılan bir çalışmada, Arabica yeşil kahve çekirdeklerinin Robusta'dan daha fazla fruktoz ve glukoz içermesinden dolayı 10 dakika kavurma işleminden sonra Arabica kahve çekirdeğinde daha yüksek AA düzeyi tespit edilmiştir [121].

3.4.2. Aminoasitler

Asparagin aminoasidi, AA'nın ana öncüsü olarak kabul edilmekte olup AA oluşumunu etkileyen en önemli hız sınırlayıcı faktör olarak kabul edilmektedir [108]. Fredriksson vd tarafından yapılan bir çalışmada; tam tahıllı buğday ununun 0,5 g/kg, tam tahıllı çavdar ununun 1,1 g/kg, buğday ununun 0,2 g/kg ve buğday tohumunun 4,9 g/kg asparagin içerdiği tespit edilmiştir [122]. Türlerin ortalama serbest asparagin içeriği azalan sırayla şu şekildedir: çavdar > kabuksuz yulaf > mısır > kabuksuz arpa > makarnalık buğday > ekmeklik buğday [123-124]. Žilić vd tarafından 2020 yılında farklı türde tahıllardan yapılan bisküvilerin karşılaştırıldığı çalışmada, en yüksek serbest asparagin içeriğine sahip undan hazırlanan bisküvilerin en yüksek AA

içeriğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum tahıl unundaki serbest asparaginin, bisküvilerde pişirme sırasında AA oluşumundaki ana faktörlerden biri olduğunu göstermektedir [125]. Mesias vd`nin 2019 yılında İspanya pazarındaki 80 ticari bisküvideki AA düzeyi ile ilgili yapılan çalışmada ise en yüksek AA içeriği çavdar bazlı numunelerde (2144 µg/kg) bulunurken, bunu teff (1559 µg/kg) ve yulaf (1424 µg/kg) bazlı bisküviler takip etmiştir. Buna karşılık pirinç, mısır ve buğday bazlı bisküvilerde en düşük seviyelerde AA saptanmıştır [126].

3.4.3. Gıdanın pH'sı

Besinlerdeki pH'nın düşürülmesi, AA oluşumuna yol açan Schiff bazı oluşumunu durdurmaktadır [127]. Bu nedenle düşürülen pH seviyeleri, azalan AA oluşumunun eşlik ettiği Maillard reaksiyonlarıyla sonuçlanmaktadır [128].

3.4.4. Gıdanın Nemi

Gıdalarda bulunan toplam su miktarı, gıdalardaki AA içeriğini büyük ölçüde etkilemektedir. AA'nın su aktivitesi 0,4-0,8 arasında olan gıdalarda olduğu bulunmuştur. Su aktivitesi <0,4 olduğunda, AA oluşumu azalmaktadır [129]. Anese vd tarafından yapılan bir çalışmada, kurabiyedeki su aktivitesi 0,83 iken AA'nın %32 azaldığı, su aktivitesi 0,12'de ise %12 azaldığı tespit edilmiştir [130].

3.4.5. Gıdalara Uygulanan Sıcaklık ve İşlem Süresi

Farklı sıcaklıklara maruz bırakılan yüksek karbonhidratlı gıdaların AA içeriğinin farklı olduğu gözlemlenmiş olup, işlem süresi ve sıcaklığın artışıyla AA içeriğinin de arttığı bildirilmiştir [131]. Matthäus vd`nin çalışmasında, 150-175 °C arasındaki sıcaklıklarda AA miktarı nispeten düşük iken, sıcaklık 180-190 °C'ye ulaştığında ciddi bir artış olduğu gözlemlenmiştir [132]. İşlem süresi boyunca AA artmaya devam edip maksimum düzeye ulaştıktan sonra reaksiyona katılan öncüllerin tükenmesine bağlı olarak AA oluşum hızı kademeli olarak azalmaktadır [133].

3.5. AKRİLAMİDİN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ

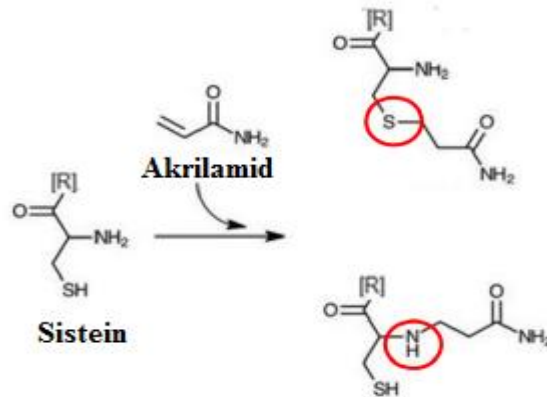
AA, hidrofilik bir molekül olup vücuttaki her organ ve dokuya ulaşabilmektedir. AA, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından "insanlar için muhtemel kanserojen" (grup 2A) bir madde olarak sınıflandırılmıştır. Bu bilimsel görüşü takiben, kızarmış patates, unlu mamüller ve kahve ürünleri gibi çok çeşitli pişmiş gıdalarda izin verilen AA seviyelerine ilişkin dünya çapındaki mevzuatlar giderek daha kısıtlayıcı hale getirilmiştir [87]. Günde 1-2 mg/kg vücut ağırlığında AA maruziyetinin ratlarda kanser insidansını arttırdığı gözlemlenmiştir [114].

AA'nın toksik etkileri arasında, genotoksik metabolitlerin oluşumu, oksidatif stres, nöral sinyallerin etkilenmesi, merkezi sinir sisteminde ultrastrüktürel ve histolojik kusurlarda yer almaktadır. Bu maddeye mesleki ve tesadüfi yollarla uzun süre maruz kalmak insanların merkezi ve periferik sinir sistemlerinde nöral tahribat gibi bazı hasarlara neden olabilmektedir. İş yeri kaynaklı AA maruziyetinin, ataksi, yürüme anormallikleri, iskelet kası zayıflığı, cilt anormallikleri, el ve ayaklarda uyuşmaya neden olabileceği belirtilmektedir. Hatta bazı toksikolojik araştırmalar, AA buharlarının gözleri ve cildi tahriş ettiğini ve beyin omurilik sisteminde felce neden olduğunu ileri sürmektedir [134]. Kimya fabrikalarında yapılan bir çalışmada kişisel solunum bölgelerinden toplanan hava örneklerinde 5-984 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ arasında AA tespit edilmiştir. Numune alınan işçilerde AA-Hb eklenti seviyeleri 15-1884 pmol/g arasında değişirken, GA eklentileri 9-1376 pmol/g arasında olduğu gözlemlenmiştir [135]. AA kaynaklı nörotoksisite için tolere edilebilir alım miktarı 40 mg/kg/gün iken kanser için tolere edilebilir AA ve GA alım miktarı sırasıyla 2,6 ve 16 mg/kg/gün olduğu düşünülmektedir [136].

AA'de maruz bırakılan kemirgenlerde, AA'nın hayvanlar üzerinde toksisiteye neden olduğu gözlemlenmiştir. Bir toksisite çalışmasında, 10-50 mg/kg vücut ağırlığı/gün AA'ya tekrarlanan dozlarda maruziyetin birçok laboratuvar hayvan türünde nöropatiye sebep olduğu rapor edilmişken, 100-200 mg/kg'lık tek doz maruziyetin

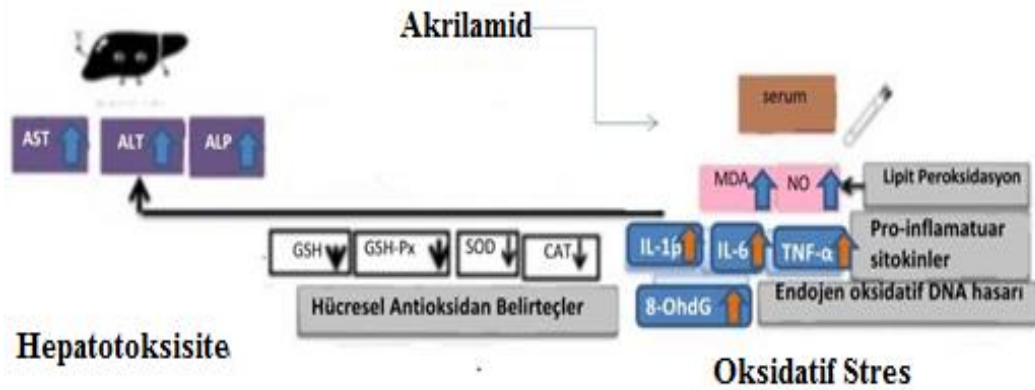
birçok türde ölümcül olduğu rapor edilmiştir [78]. AA, ratlarda apoptozu indüklemekte ve mitokondride işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Ayrıca AA verilen ratlarda ise arka bacak felci, vücut ağırlığı artışında azalma ve retikülositoz gibi toksik etkilerin meydana geldiği belirtilmektedir [137].

Gestasyonel dönemde AA maruz kalan farelerde de AA'nın, plasental gelişimi inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Ayrıca AA'nın, plasental gelişim genlerinin ekspresyonunu da değiştirmiş olduğu saptanmıştır [138]. AA, toksik etkilerini makromoleküllerin nükleofilik kalıntıları, özellikle sistein kalıntıları (DNA ve hücre proteinler dahil) ile etkileşime girerek göstermektedir. Bu nedenle AA, hücre bölünmesi sırasında iğ ipliklerinin oluşumundan sorumlu olan kinesin proteinlerine de müdahale ederek hücre proliferasyonunu inhibe edebilmektedir (Şekil 3.10) [139]. Ayrıca AA, lizin, histidin ve proteinlerin N-terminal aminleri ile de reaksiyona girebilmektedir. AA ve GA, N-7 konumunda guanin ile en güçlü eklentileri oluşturmaktadır. Alzahrani tarafından fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, 10, 20 ve 30 mg/kg'lık doz AA 1 ve 2 hafta boyunca verildiğinde, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde DNA hasarını indüklediğini ve farelerin kemik iliği hücrelerinde kromozom anormalliklerine neden olduğu gözlemlenmiştir [140].



Şekil 3.10. Akrilamid sistein eklentisinin oluşumu [139].

Karaciğer, kimyasallar, ilaçlar, alkol ve gıda katkı maddeleri gibi vücuda alınan ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan organdır. Karaciğerde detoksifikasyona uğrayan bileşenlerden biride toksik etkisi bulunan AA'dır. Bu bileşenin karaciğerde detoksifikasyonu, glutasyon kaynağının tükenmesine, antioksidan enzimlerin azalmasına ve genellikle karaciğer ve diğer organlarda oksidatif strese neden olmaktadır. AA'nın neden olduğu oksidatif stres ve inflamasyon, hepatik hücre zarlarına zarar vermektedir (Şekil 3.9) [141]. AA takviyesiyle karaciğerde oluşan SOD ve peroksidaz aktivitesindeki azalma, enzimlerin MDA ile çapraz bağlanarak inaktive olmasıyla gerçekleşmektedir. Bu nedenle lipid peroksidasyon seviyesini gösteren MDA aynı zamanda hepatosellüler hasarın da derecesini yansıtmaktadır [142].



Şekil 3.11. Akrilamidin karaciğer üzerine etkisi [141].

3.6. AKRİLAMİD OLUŞUMUNU AZALTMA STRATEJİLERİ

Avrupa Birliği Komisyonu tarafından, gıdalarda AA varlığı ile ilgili 20 Kasım 2017 tarihli ve 2017/2158 sayılı Komisyon Yönetmeliği kabul edilmiş olup, yönetmelik 11 Nisan 2018 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Yönetmelik, gıda güvenliğinin sağlanması ve gıda ürünlerinde AA düzeyinin düşürülmesi amacıyla, azaltıcı önlemler şeklinde

yasal düzenlemeler getirmekte ve AA seviyelerinin gözden geçirilmesi için referans seviyeleri içermektedir. Seçilen gıda maddelerinde AA varlığı için referans seviyeleri ($\mu\text{g}/\text{kg}$), patates kızartması (tüetime hazır) için 500; taze patates ve patates hamurundan patates cipsleri ve patates bazlı krakerler için 750; gevrek ekmek için 350; hazır (çözünür) kahve için 850 olarak belirlenmiştir [91].

Bazı tek ve çift değerli katyonların (örneğin Na^+ veya Ca^{+2}) gıdalarda AA oluşumunu etkili bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Örneğin, CaCl_2 çözeltisine batırılan patateslerde, duysal özellikleri olumsuz etkilenmeden kızartıldığında patateslerde oluşan AA miktarının %95 azaldığı rapor edilmiştir. Bu iyonlar asparagin ile etkileşerek Schiff bazının oluşumu engellemekte ve AA oluşumunu azaltmaktadır [119]. Patates cipsi için önerilen hafifletme önlemleri arasında, şeker oluşumunu azaltmak için pişirmeden önce patateslerin sıcaklık kontrolünün yapılması, daha düşük şeker konsantrasyonlu patateslerin seçilmesi, patates hamurlarına asparaginaz eklenmesi, kızartma sıcaklıklarının düşürülmesi yer almaktadır [143]. Depolama sırasında filizlenmenin önlenmesi ve filizlenmiş malzemenin besin zincirinden dışlanması önemli görülmektedir. Filizlenmenin oluşumu solunumla nişastanın bir kısmının şekere dönüştüğünü göstermektedir [144].

Asparaginaz kullanımının, tahıl bazlı ürünler için üreticiler tarafından benimsenen etkili uygulamalardan biri olduğu belirtilmiş olup, buğday krakerlerinde %85'lik azalmalar rapor edilmiştir. Vıncı vd'ye göre asparaginaz enziminin kullanımı, asparaginin, aspartik asit ve amonyağa hidrolizini katalize ettiği için AA oluşumunun azaltılmasında etkili bir strateji olarak görülmektedir [145]. Yine Morales vd yaptığı çalışmada olduğu gibi gıdalara ısıl işlem öncesinde amino asit eklenmesi, Maillard reaksiyonunda asparagin ile rekabet ederek veya AA oluşumundan sonra AA ile reaksiyona girerek AA oluşumunu azaltmada bir diğer yol olarak da görülmektedir [146].

Laktik asit bakterileri, AA'yı bağlayarak onu bir karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Laktik asit bakterileri sayesinde ekşi ekmek hamurunda uzun süreli fermantasyonla ekmekteki AA içeriğinin azaltılabileceği gösterilmiştir [66]. Buna göre, %2-4 *Lactobacillus plantarum* içeren ekmeklerde, AA içeriğinin %16,6-27,4 oranında azaldığı saptanmıştır [147]. Akıllıoğlu vd tarafından yapılan çalışmada, %2 maya içeren grupta, %1 maya içeren gruba göre AA bozunmasının daha hızlı gerçekleştiği tespit edilmiştir [148].

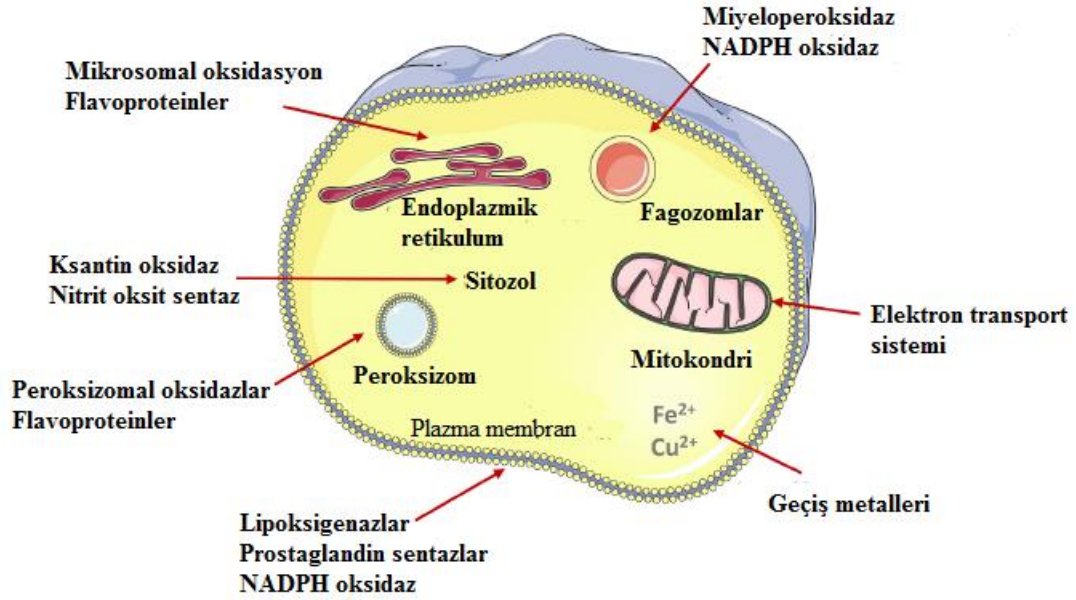
BÖLÜM 4

OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres ilk olarak İngiltere'de Harmna tarafından yaşlanma üzerine yapılan çalışmada keşfedilmiş olup, daha sonra 1985'te Almanya'da Sies tarafından kavramsal olarak tanımlanmıştır. Oksidatif stres, bir sistemdeki serbest radikallerin ve aktif ara ürünlerinin nötralize edilememesi veya ortadan kaldırılamaması sonucunda meydana gelmektedir. Oksidan-antioksidan dengesinin, oksidan lehine olması sonucunda ortaya çıkmaktadır [149,150].

ROT, genellikle oksidatif strese neden olabilecek bileşenleri belirtmek için kullanılan terim olup, normal hücrel metabolizmanın bir sonucu olarak canlı organizmalar tarafından üretilmekte ve fizyolojik hücre süreçlerinde de yer almaktadır [151]. ROT üretimi, sinyal iletim yollarında, patojen mikroorganizmalara karşı savunmada, büyümenin veya ölümün teşvik edilmesinde, gen ekspresyonu gibi hücrel fonksiyonlarda sorumlu olan aerobik yaşamın doğal bir parçası olarak kabul edilmektedir. ROT düzeylerindeki artış ve oksidatif stres, hücre ölümlerine neden olan nekroz ve apoptozun uyarılmasına neden olarak hücre ve doku hasarına yol açmaktadır. Oksidatif reaksiyonlar, kardiyovasküler hastalıklar, akciğer hastalıkları, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere yaşlanma ve birçok hastalık sürecine eşlik etmektedir [152].

ROT'un başlıca endojen kaynaklarını, mitokondri, peroksizom, endoplazmik retikulum ve lizozom gibi hücrel organeller ile enzimler [nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, miyeloperoksidaz, ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz] oluşturmaktadır (Şekil 4.1). ROT oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklar arasında ise kemoterapötikler, çevresel toksinler, ultraviyole ışını, radyasyon, pişirme sırasında oluşan maddeler yer almaktadır [153].

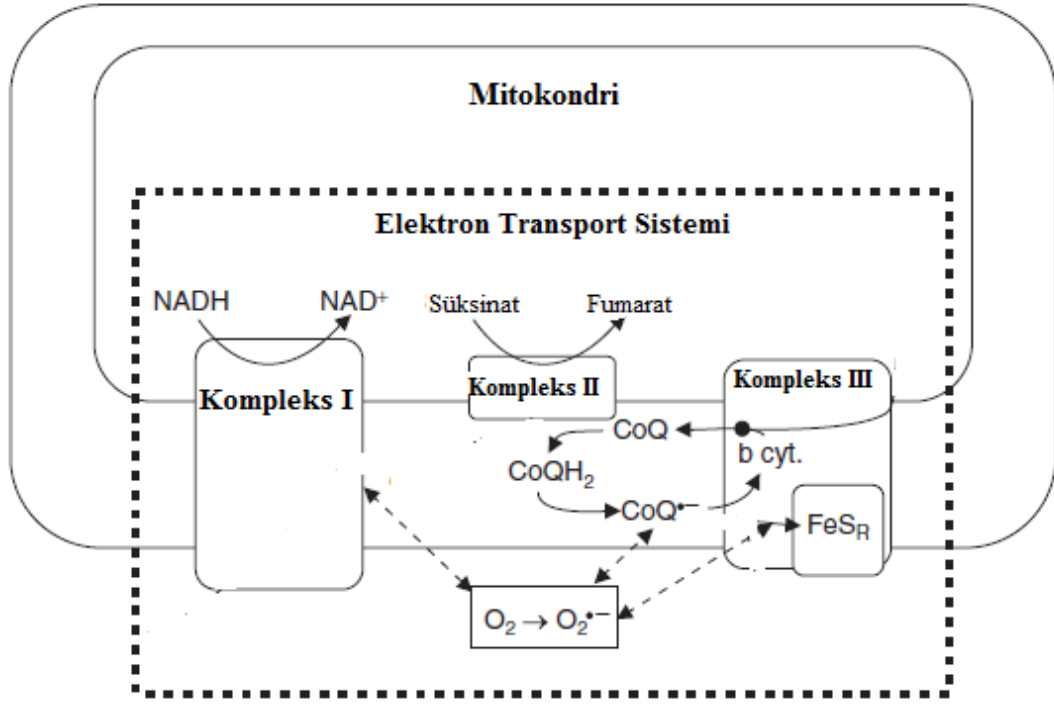


Şekil 4.1. Oksidan oluşumuna neden olan endojen kaynaklar [153].

ROT'un keşfinden beri özellikle oksijen merkezli radikallerin hem patolojik hem de fizyolojik süreçlere etkisi araştırılmaktadır. Serbest radikaller birçok elementten üretilmekte olup, biyolojik sistemde en önemlileri oksijen ve nitrojen içerenler olarak kabul edilmektedir. ROT, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen (1O_2) oluşturmaktadır; reaktif nitrojen türlerini (RNT), nitrik oksit radikali (NO^{\cdot}), dinitrojen trioksit (N_2O_3), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrit (NO_2), nitrat (NO_3) ve nitroksil (HNO) oluşturmaktadır [154]. Özellikle radikal olmayan H_2O_2 , 1O_2 , O_3 ve $ONOO^-$, kimyasal açıdan daha az reaktif olup, makromoleküller ve hücre metabolitlerle reaksiyona girerek kolayca radikal hale gelebilmektedir [155].

Fizyolojik koşullar altında, en yaygın serbest oksijen radikali $O_2^{\cdot-}$ olup ana kaynağının mitokondri olduğu bilinmektedir. Elektronların solunum zinciri transferi boyunca tamamen verimli olmaması, elektronların sızmasına neden olmakta ve moleküler oksijen (O_2), özellikle kompleks I ve III'de $O_2^{\cdot-}$ 'ye dönüşmesine neden

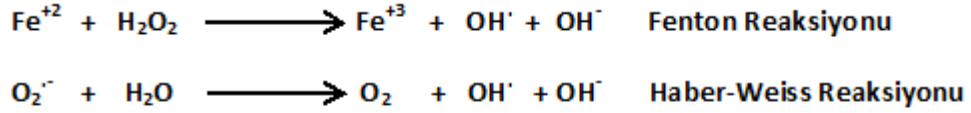
olmaktadır (Şekil 4.2) [156]. Organeller içerisinde veya dışında $O_2^{\cdot-}$ üretilebilmektedir. Normal metabolik süreçler sırasında insan vücudunda yılda 2 kg'dan fazla $O_2^{\cdot-}$ üretimi meydana gelmektedir [155].



Şekil 4.2. Mitokondride süperoksit anion radikalinin üretimi [156].

O_2 'nin suya indirgenmesiyle $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 oluşabilmektedir. Ana toksisiteden sorumlu olan radikal ise H_2O_2 'den geçiş metalleri aracılığıyla (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu) oluşan OH^{\cdot} olarak görülmektedir (Şekil 4.3) [157]. Fenton reaksiyonlarına katılan indirgenmiş serbest Fe^{2+} ve Cu^{1+} metalleri, Fe^{3+} ve Cu^{2+} 'ya oksitlenerek OH^{\cdot} radikalinin yanı sıra hidroksil anyonunun (OH^-) üretilmesine sebep olabilmektedir. Bu formlar (OH^{\cdot} , OH^-) daha sonra bir indirgeme reaksiyonu yoluyla hidroperoksil radikalleri (HOO^{\cdot}) ve protonlar oluşturmak üzere H_2O_2 'yi oksitleyebilmekte ve böylece döngüsel bir şekilde yeni peroksidasyon reaksiyonları meydana gelebilmektedir [155]. OH^{\cdot} , bir kez oluştuğunda hücre içi/hücre dışı

serbestçe hareket edebildiğinden hücre altı zarları geçebilmekte ve bu nedenle DNA'ya ulaşabilmektedir. O_2^- , $ONOO^-$ oluşturmak için NO ile reaksiyona girebilmektedir [158]. Özellikle OH^\cdot ve $ONOO^-$ membran lipidleri, yapısal proteinler, enzimler ve nükleik asitler dahil olmak üzere makromolekülleri doğrudan oksitleyerek anormal hücre fonksiyonuna ve ölümüne yol açmaktadır. Bununla birlikte bu oksidanlar, ekzojen küçük moleküller tarafından etkili bir şekilde temizlenememektedir [159].



Şekil 4.3. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları [157].

ROT'u doğru bir şekilde ölçmek, kararsız yapısından ve yarı ömürlerinin nispeten kısa olmasından kaynaklı zor olmaktadır. Örneğin, O_2^- 'nin yarı ömrü 10^{-6} - 10^{-9} saniye iken OH^\cdot 10^{-9} saniye olduğu bilinmektedir. Bu nedenle oksidatif stresin belirlenmesinde başlıca biyobelirteçler kullanılmaktadır: 3-nitrotirozin, 4-hidroksi-nonenal ve MDA gibi lipid oksidasyon ürünleri; F2-izoprostanlar ve 8-oksoguanin gibi DNA/RNA oksidasyon ürünleri bulunmaktadır [160]. MDA, lipid oksidasyonu için yaygın olarak kullanılan bir oksidatif stres biyobelirteçidir. Oksitlenmiş lipid birikiminin, endotelde değişiklikler ve kronik inflamasyon sonucunda oluşabileceği bilinmektedir. Bu nedenle bir hepatosit membran oksidasyonunda, MDA'da artış gözlenmektedir [161,162].

4.1. OKSİDATİF STRESİN KARACİĞERE ETKİSİ

Oksidatif stres, karaciğer patolojisinde ve çeşitli karaciğer hastalıklarında önemli faktör olarak kabul edilmektedir. Karaciğer, metabolik süreçleri nedeniyle ROT saldırısının hedefi olarak görülmektedir. Sağlıklı beslenme ile genellikle oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge korunsa da hepatosit fonksiyonlar, diyetteki

yabancı ekzojen kimyasallar, toksinler, bitkisel ürünler ve tıbbi ilaçların metabolize edilmesi sonucunda olumsuz etkilenebilmektedir. Bu tür bileşikler, normal hücre biyokimyasını destabilize etmekte olup, ROT ve serbest radikallerin üretimini arttırmaktadır [163,164]. ROT ve RNT nedeniyle gelişen oksidatif stres, hepatositler, Kupffer hücreleri, hepatik stellat ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere karaciğerde bulunan tüm hücrelerde inflamasyon, iskemi, fibroz, nekroz, apoptoz veya malign transformasyonu indükleyerek zarar verebilmektedir. Bunun yanısıra hepatositlerde, hepatik stellat hücrelerde daha fazla mitokondri bulunduğundan çok sayıda kararsız ROT üretilebilmektedir. Ayrıca karaciğer enzimleri olan diamin oksidaz, aldehit dehidrojenaz, ve sitokrom P450 enzim sistemi de oksidasyona neden olabilmektedir [165].

TNF- α gibi çeşitli sitokinler, oksidatif stresle indüklenen Kupffer hücrelerinde üretilebilmekte, bu da inflamasyonu ve apoptozu arttırabilmektedir. Kupffer hücre aktivasyonu, plazma membranında NADPH oksidaz seviyesinin artışına bağlı olarak meydana gelmektedir [166]. Aynı zamanda nitrik oksit sentazın indüklenmesiyle ROT ve NO arasında da reaksiyon meydana gelmektedir. NO, nitrotirozin gibi, karaciğer nekrozuna yol açabilen nitrojen içeren reaktif ara ürünler oluşturmakta olup, bu ara ürünler mitokondri fonksiyonunu inhibe etmekte ve hücrel pirimidin nükleotitlerini tüketerek DNA zincirinin kırılmasına neden olmaktadır. Artan serbest radikal oluşumu ve DNA hasarı da karaciğer kanserine neden olabilmektedir [167]. Ayrıca alkolsüz veya alkolik steatohepatit ve viral hepatit gibi çeşitli karaciğer hastalıklarında da, hepatosit hasarı artıran nedenin oksidatif stres ve serbest radikaller olduğu düşünülmektedir [164].

4.2. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

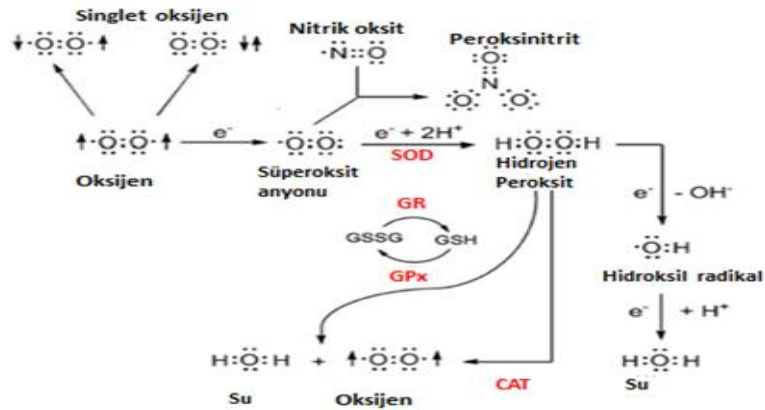
ROT birikimi, birçok hücrel sinyal yolunu etkileyerek, hücrelerde fonksiyon bozukluğuna ve ardından çeşitli patolojik durumun gelişmesine neden olabilmektedir [168]. Antioksidanlar ise ROT`a bağlı oksidatif stresi azaltarak patolojik durumların

gelişimini engellemektedir. Vücutta enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere hücre içi veya hücre dışında görevli antioksidanlar bulunmaktadır [169]. Antioksidanların serbest radikalleri yok etme yetenekleri ne kadar güçlü olursa, serbest radikallerin vücuda verdiği zarar o kadar az olmaktadır [149].

Antioksidanlar, dokuların korunmasını üç düzeyde sağlanmaktadır: ilk olarak serbest radikal oluşumunu katalize eden enzimlerin inhibitörleriyle oluşumunu engellemek; ikinci olarak oluşan serbest radikalleri, radikal ve toksik olmayan ürünlere dönüştürerek ortadan kaldırmak; son olarak da oksidatif olarak modifiye edilmiş proteinler, lipitler ve DNA bazlarında onarımı gerçekleştirmek [170].

4.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

İnsan vücudu, serbest radikallere karşı etkili bir antioksidan mekanizmaya sahiptir. Aerobik metabolizmanın neden olduğu oksidatif strese karşı süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) ile birlikte bir dizi antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır (Şekil 4.4). Bu enzimler, spesifik organlarda bulunmakta olup, bakır, çinko, manganez, demir ve selenyum gibi metallerin katalizörlüğünde işlev göstermektedir [171,172].



Şekil 4.4. Antioksidan enzimlerin reaktif oksijen türleri üzerindeki etkileri [172].

Memelilerde, amino asit dizilişine, substrat spesifikliğine ve hücre lokalizasyonuna göre sitozolde GPx1, gastrointestinal sistemde GPx2, plazmada GPx3, fosfolipid hidroperoksitte GPx4, epididimalde GPx5, koku alma epitelinde GPx6 ve endoplazmik retikulumda GPx7 ve GPx8 olmak üzere 8 tane GPx enzimi bulunmaktadır. Substrat olarak GSH kullanan GPx, H₂O₂'yi suya dönüştürmekte ve reaksiyon, oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ile sonuçlanmaktadır. GPx, aktif merkezde bir selenyum içermekte ve enzim ağırlıklı olarak hücrenin sitoplazmasında bulunmaktadır [173]. Enzim, H₂O₂'yi düşük konsantrasyonlarda etkin bir şekilde metabolize etmekte olup, optimal aktivite için yüksek konsantrasyonlarda GSH'a ihtiyaç duymaktadır. Bu reaksiyonda pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH elektron vericisi olarak kullanılmaktadır. ROT artışıyla beraber hücrelerde, glukoz metabolizmasında pentoz fosfat yolundaki glukoz-6-fosfat dehidrojenaz aktive edilerek NADP⁺'nin NADPH indirgenmesi sağlanmaktadır [174].

SOD, insan organizmasındaki en önemli antioksidan enzimlerden biridir ve oksidatif strese karşı ön savunma hattını oluşturmaktadır. SOD, O₂^{•-}den H₂O₂ oluşturarak ROT'u nötralize etmektedir [159]. SOD1, Fe içermekte olup prokaryotlarda ve bazı bitilerin kloroplastlarında bulunmaktadır. SOD2 Mn içermekte olup sadece mitokondriyal matrikste lokalizedir. SOD3 ise Cu ve Zn içermekte olup, sitoplazmada lokalize halde bulunmaktadır [175].

CAT, H₂O₂'yi OH⁻ oluşmaması için oksijen ve suya dönüştürmektedir. Enzim 4 tane hem grubu içermekte olup, karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmakta olup hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan yaygın bir enzimdir [171].

4.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar endojen ve ekzojen olarak sınıflandırılmaktadır. Endojen antioksidanlar ökaryotik hücreler tarafından sentezlenebilirken ekzojen antioksidanlar besinler yoluyla alınmaktadır [158]. Enzimatik olmayan başlıca

endojen antioksidanlar, glutatyon, albümin ve melatonin iken; ekzojen antioksidanlar ise vitaminler (askorbik asit, α - tokoferol, β -karoten), çinko, selenyum, flavonoidler, fenolik asitlerdir. Özellikle ekzojen antioksidanlardan α -tokoferol, askorbik asit, karotenoidler gibi diyetle alınan antioksidanların, antioksidan mekanizmanın güçlenmesinde etkili oldukları bilinmektedir [176].

Yağda çözünen α -tokoferol oksidan kaynaklı hücre zarı hasarında temel savunmayı oluşturmaktadır. α -tokoferol, lipit peroksidasyonu sırasında üretilen peroksil radikale elektron vererek inaktive olmasını sağlamaktadır. Böylece α -tokoferol membrandaki uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerin bütünlüğünün korunmasına yardımcı olmaktadır. Karotenoidler bitkilerde bulunan pigmentleri oluşturmaktadır ve β -karoten, ROO \cdot , OH \cdot ve O $_2^{\cdot-}$ radikalleri ile reaksiyona girebilmektedir [151]. Suda çözünen askorbik asit ise öncelikle serbest oksijen radikallerini yakalayıp antioksidan kapasiteyi arttırmaktadır. Plazma düzeyinin yaşla birlikte düştüğü bilinmektedir. Askorbik asit, hücrelerin içinde ROT ile reaksiyona giren α -tokoferolün tekrar aktif forma dönüşmesini sağlamaktadır. Ayrıca askorbik asit güçlü bir oksidan olan bakırı da bağlayabilmektedir [156].

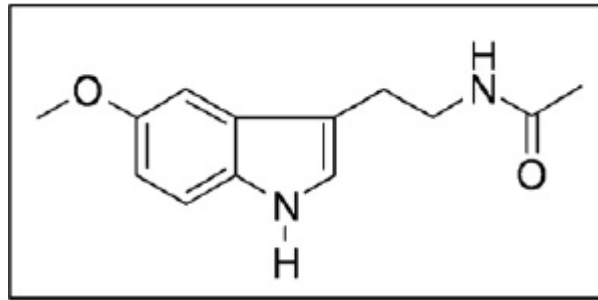
GSH, memeli hücrelerinde enzimatik olmayan ana endojen antioksidan olarak kabul edilmektedir. Glutatyon, peroksitleri temizlemek, kritik hücresel süreçleri modüle etmek (hücre proliferasyonu, apoptoz, mikrotübüler ile ilgili süreçler ve immünolojik fonksiyon), -SH gruplarının oksidasyonunu önlemek gibi birçok hayati fonksiyonları yerine getirmektedir. Yüksek hücre içi glutatyon konsantrasyonu (genellikle 5-10 mM), yüksek miktarda oluşan serbest radikalleri absorbe etmek için etkili bir redoks tamponu gibi görev yapmaktadır [177,178]. Albümin ise Fenton reaksiyonunun katalizörü olan demir ve bakırı bağlayarak serbest radikal üretimini engellemektedir. Ayrıca albüminin methionine ve sistein aminoasitlerinden dolayı serbest sülfhidril grubu içermesi, OH \cdot temizlenmesine yardımcı olmaktadır. MLT çok etkili bir OH \cdot tutucusu olup 1O_2 , ONOO $^-$ ve NO gibi bazı ROT ve RNT'leri detoksifiye etme yeteneğine sahiptir. Ayrıca bazı antioksidan enzimlerin düzenleyicisi olarak görev

yapmakta ve mitokondriyal aktivite sırasında artan ROT seviyelerinin oluşmasını engellemektedir [179].

BÖLÜM 5

MELATONİN

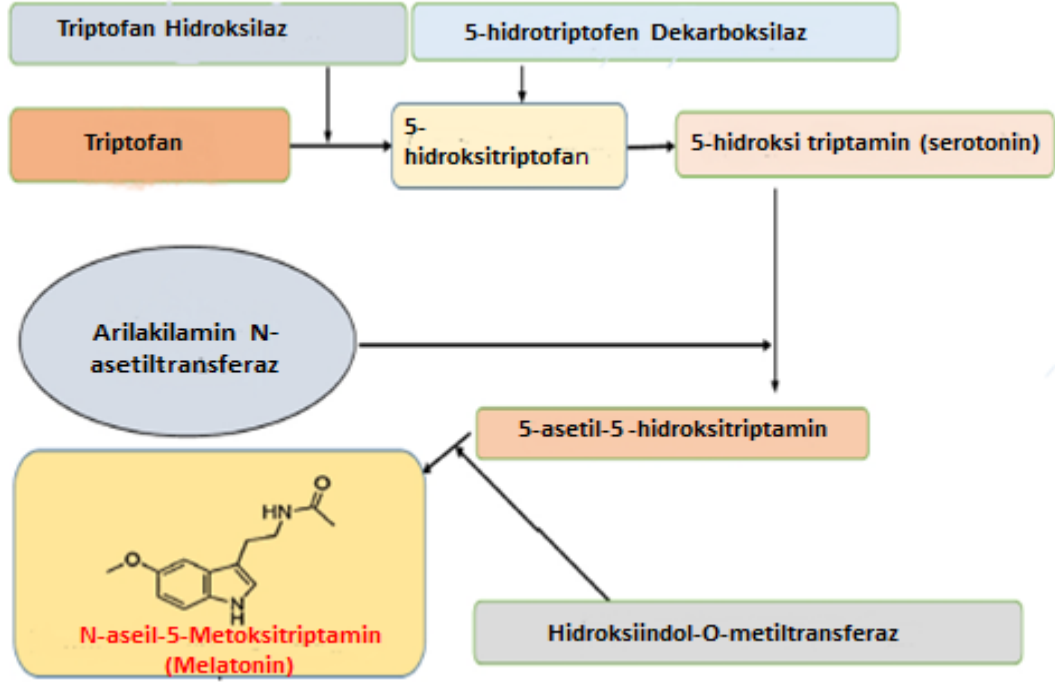
Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) (MLT), memeli sirkadiyen ritimlerinde rol oynayan endojen bir hormondur (Şekil 5.1). MLT'nin, moleküler ağırlığı 232,28 g/mol ve yoğunluğu 1,175 g/cm³tür. Erime noktası 116,5-118 °C arasında değişmekte olup kaynama noktası 512,8 °C olduğu bilinmektedir. Kimyasal açıdan MLT, C₁₃H₁₆N₂O₂ kimyasal formülüyle ifade edilmektedir. Moleküle amfifilik özelliği sağlayan 3-amid ve 5-alkoksil grupları, MLT'nin biyolojik zarlardan kolay geçmesini sağlamaktadır [180]. Epifiz bezi tarafından üretilmesinin yanı sıra cilt, retina, beyincik, böbrekler, karaciğer, pankreas ve yumurtalıklar dahil olmak üzere diğer birçok organda da bulunmaktadır. Epifiz bezinden farklı olarak bu organların çoğu MLT'yi sirkadiyen bir şekilde sentezleyememekte ve kana önemli miktarda katkı sağlamamaktadır. Bu organlarda MLT, hücre içi olayları düzenlemek için bulunmaktadır [181].



Şekil 5.1. Melatoninin yapısı [180].

İnsanlarda epifiz bezi, beyin merkezinde, üçüncü ventrikülün arkasında yer almakta olup, hem indolaminleri (çoğunlukla MLT) hem de peptitleri (arginin, vazotosin gibi) baskın olarak üreten pinealositler ve nöroglial hücrelerden oluşmaktadır. Epifizde MLT suprakiazmatik çekirdekten gelen sirkadiyen bir sinyal tarafından kontrol edilmekte olup triptofandan üretilmektedir [182]. Biyosentezinde, triptofan

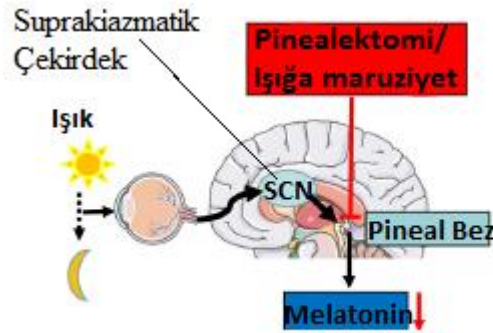
önce triptofan 5-hidroksilaz tarafından 5-hidroksitriptofana, daha sonra dekarboksilasyon ile 5-hidroksi triptamin (serotonin) dönüştürülmektedir. Serotoninden MLT sentezi, büyük ölçüde epifiz bezinde bulunan iki enzim (arilalkilamin N-asetiltransferaz ve hidroksiindol-O-metiltransferaz) tarafından katalize edilmektedir (Şekil 5.2) [183].



Şekil 5.2. Melatonin sentezi [183].

Memeli epifizinde hız sınırlayıcı enzim olan arilalkilamin N-asetiltransferaz (AA-NAT), suprakiazmatik çekirdeğin kontrolü altında bulunmaktadır [184]. Ortamda bulunan ışık, retina ganglion hücrelerinin bir alt kümesi tarafından algılanmaktadır. Bu hücreler, ortam ışığı bilgisini merkezi sinir sistemindeki suprakiazmatik çekirdeğe göndermektedir. Bu çekirdek, 24 saatlik gündüz/gece döngüsünün ve epifiz bezinden MLT salgılanması gibi diğer işlevlerin düzenlenmesinden sorumlu olmaktadır. Suprakiazmatik çekirdekler ve epifiz bezi arasında doğrudan bir

anatomik yol bulunmakta olup, az sayıda ekzojen faktörün MLT konsantrasyonunu etkilediği bilinmektedir (Şekil 5.3) [185]. MLT'nin birincil fizyolojik işlevi, günlük ışık ve karanlık döngüsü ile ilgili bilgileri vücut fizyolojisine iletmektir. Günün karanlık fazında sentezlenmekte ve salgılanmaktadır. Bu durumu MLT sentezi için gerekli olan enzimlerden hidroksiindol O-metiltransferaz aktivitesinin gece, gündüzdense daha yüksek olması da desteklemektedir [186]. MLT'nin kandaki seviyesi saat 22:00'dan sonra yükselmeye başlamakta olup saat 03:00 civarında zirve yapmakta ve saat 09:00'da gündüz seviyelerine dönmektedir. Serum konsantrasyonları 80-120 pg/ml arasında değişmektedir. Günün aydınlık döneminde serum düzeylerinin düşük (10-20 pg/ml) olduğu bilinmektedir [187].



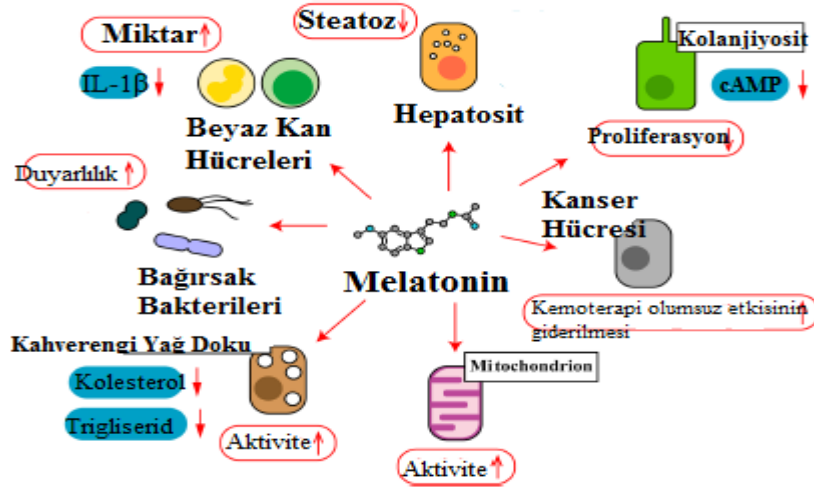
Şekil 5.3. Pineal bezden melatonin sentezinin kontrolü [185].

MLT epifiz bezinde, daha sonra salgılanmak üzere depolanmamaktadır. MLT pinealositlerden, bez içindeki zengin kapiller yatağa ve daha sonra doğrudan üçüncü ventrikülden beyin omurilik sıvısına hızla yayılmaktadır. Serumdaki yarı ömrünün 30-50 dakika olduğu saptanmıştır. Sentezlendikten sonra safra, tükürük, meni, yumurtalık foliküler sıvısı ve amniyotik sıvı gibi diğer vücut sıvılarına ulaşmaktadır [188]. Lipidlerdeki geniş çözünürlüğü nedeniyle, periferik dolaşımdan diğer sıvılara veya hücrelere kolayca geçebilmektedir. Serumda, %70'i albüminlere bağlanmakta olup %30'u ise çevre dokulara yayılmaktadır. Kana salınan MLT'nin yaklaşık %90'ı

karaciğerde sitokrom P450 enzimleri tarafından enzimatik olarak 6-OH- melatonine dönüştürülmektedir [189]. MLT'nin bir kısmı safraya salınırken geri kalanı sülfirik asit ve glukuronik asit ile konjuge edildikten sonra idrarla atılmaktadır. İnsanlarda 600 ml/gün safrayla yaklaşık 51 ng MLT safra kanalıyla bağırsağa geçebilmektedir [190]. İdrarla ise MLT, 6-sülfatoksimeletonin şeklinde atılmakta olup, dolaşımdaki MLT sadece yaklaşık %1'i herhangi bir değişiklik olmadan idrarla atılabilmektedir [191].

Doğumdan 3-4 gün sonra annelerin, anne sütünde MLT tespit edilmiştir. Gündüzleri anne sütünde saptanabilir MLT bulunmazken, geceleri anne sütünde, serumundan üç kat daha yüksek MLT bulunmuştur. Sütteki MLT, yenidoğanın sağlığı için önemli olabilmektedir [182]. Zamanında doğan bebeklerde MLT ritmi belirgin olmamakta ve ancak doğumdan sonraki dokuzuncu ve on ikinci haftalar arasında gelişmektedir. Yaşamın ilk yılının sonunda, dolaşımdaki MLT seviyelerine bağlı gündüz-gece farkı belirginleşmekte ve çocukluk dönemi boyunca MLT ritmi devam etmektedir. Ergenlik döneminde ise, gece MLT değerlerindeki düşüşe bağlı olarak gündüz-gece MLT düzeylerinin oranında önemli bir azalma olmaktadır. 45-65 yaş arasında, hem kadınlarda hem de erkeklerde gece MLT seviyeleri kademeli olarak düşmektedir. Böylece yaşlılarda gündüz ve gece MLT seviyeleri eşdeğer olmaktadır [192].

MLT'nin fonksiyonları çok çeşitli olup antioksidan savunma, kan basıncı, vücut ısısı, kortizol ritmi, üreme ve bağışıklık fonksiyonunun doğrudan ve dolaylı modülasyonları, mitokondri aktivitesinin artırılması, yağ dokusu aktivitelerinin düzenlenmesi, bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi, karaciğer dokusunda steatoz oluşumunun azaltılması yer almaktadır (Şekil 5.4) [193,194]. Ekzojen MLT'nin, yaşlanmaya bağlı bozukluklar, nörodejeneratif bozukluklar, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıklarda antiinflamatuvar etkisi sayesinde koruyucu olduğu bilinmektedir. Ayrıca akut cerrahi koşullarda, MLT kullanımı kaygıyı azaltmakta olup ameliyat öncesi ve sonrasında analjeziyi de artırmaktadır [195, 196].



Şekil 5.4. Melatoninin fonksiyonları [194].

MLT, kanser hücrelerinin sirkadiyen biyolojisinde klinik düzeyde etkileri bulunmaktadır. Günün geç saatlerine kadar yapay mavi ışığa uzun süre maruz kalmak MLT sentezinde bozukluklara yol açabilmekte ve bu da meme, kolorektal, karaciğer ve akciğer kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişme riskini artırabilmektedir [197]. Ayrıca MLT'nin, radyasyon ve kemoterapi ile oluşan istenmeyen semptomların iyileştirilmesinde de yardımcı olabileceği düşünülmektedir [198].

Gıdalar yoluyla alınan ekzojen MLT, uyku kalitesini arttırmakta ve uykunun başlatılmasını sağlamaktadır. Uykusuzluk, jetlag, gece vardiyasında çalışma bozukluğu, gecikmiş uyku fazı sendromu ve uyku-uyanıklık ritminde yaşa bağlı bozukluklar gibi birçok uyku bozukluğunda MLT başarılı bir tedavi olarak kullanılmaktadır [179]. Gece vardiyasında çalışan kişilere MLT uygulandıktan sonra, uyku süresinde değişiklik olmaksızın uyku sırasında kişilerin bildirdiği uyanmalarda azalma olduğunu gözlemlenmiştir [199]. EFSA tarafından MLT'nin uykuya dalma süresini azalttığı ve bu nedenle yatmadan önce 1 mg MLT tüketilmesi gerektiği bildirilmiştir [190].

MLT birçok ülkede besin takviyesi olarak ticarileştirilmiştir. Bu takviyelerin düşük yan etkileri olduğu veya hiç yan etkileri olmadığı bildirilmektedir. Son 30 yılda 3 milyondan fazla Amerikalı yetişkinin (%1.3) MLT kullandığı bildirilmiş olup, özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde doktor reçetesine ihtiyaç duymadan bir diyet takviyesi olarak alımının arttığı gözlemlenmiştir. Norveç gibi MLT'nin reçetesiz temin edilemediği diğer ülkelerde ise, 2004-2011 yıllarında hem yetişkinlere hem de çocuklara reçete edilenlerin sayısında önemli bir artış olduğu bildirilmiştir [200]. Sağlıklı deneklerde ağızdan 20-100 mg/gün MLT kullanımının, herhangi bir fizyolojik veya biyokimyasal olarak önemli bir yan etkiye sahip olmadığı gözlemlenmiştir [201]. Terapötik konsantrasyonlara ulaşmak için ekzojen MLT yüksek dozlarda uygulanabilmektedir [193]. Yatmadan 2-4 saat önce oral verilen 0,3 mg MLT'nin, gece normal konsantrasyonda plazma MLT sağladığı bildirilmiştir. Ek olarak, 80 mg MLT'in oral alımdan 180 dakika sonra, plazma MLT konsantrasyonunun 0,4 saat ve eliminasyon yarı ömrünün 0,8 saat arttığı gözlemlenmiştir [190]. MLT, hamilelik boyunca yüksek dozlarda (günde 200 mg/kg) verildiğinde bile toksisite oluşturmadığından güvenli bir molekül olarak kabul edilmektedir [185]. Bununla birlikte, ratlarda 800 mg/kg'lık bir dozda bile, MLT'nin herhangi bir ölçülebilir toksik yan etkiye neden olmadığı gözlemlenmiştir [202].

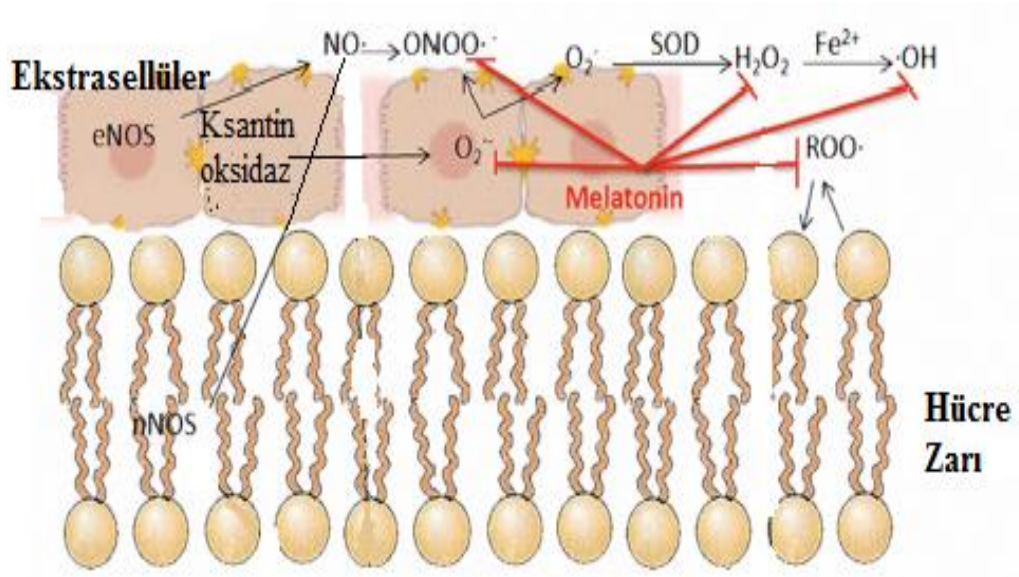
Menopoz dönemindeki kadınlarda sirkadiyen sistemdeki bozulmalar, fizyolojik ve fiziksel değişikliklere yol açmaktadır. Menopoz sonrası kadınlarda oral olarak verilen 1 mg MLT'nin, glukoz toleransını ve insülin duyarlılığını azalttığı gözlemlenmiştir. Tip 2 diyabetikli ratlarda uzun süreli MLT tedavisinin, hiperinsülinemi, hipertrigliseridemi, hiperleptinemiye azalttığı saptanmıştır [203]. Ayrıca günlük 3 mg MLT tüketiminin aşırı kilolu ve obez bireylerde bel çevresini önemli ölçüde azaltabildiği, kahverengi yağ doku aktivitesini değiştirerek vücut ağırlığını ve vücut yağ kütlelerini etkilediği bildirilmiştir [204].

5.1. MELATONİNİN ANTIOKSİDAN ETKİSİ

MLT bir indol heterosiklo ve 5-metoksi grubu ile 3-amid grubu olmak üzere iki yan zincir içermektedir. Yüksek elektrotaktiviteye sahip, elektronca zengin indol kısmı, MLT'nin güçlü serbest radikal süpürme kapasitesini belirlemektedir. MLT'nin ROT süpürme yeteneği diğer antioksidanlardan daha etkili görülmektedir [205,206]. MLT, hem oluşan serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlamak hem de radikal oluşumunu azaltabilmektedir. Oksidasyon potansiyeli yaklaşık +570 mV'dir. Böylece bu oksidasyon potansiyelinde MLT, kendisinden çok daha yüksek oksidasyon potansiyeline sahip ROT'a bir elektron verebilmektedir [207]. MLT, OH·, ONOO·, ¹O₂, NO, O₂⁻, H₂O₂ dahil olmak üzere çeşitli serbest radikalleri hücre zarından kolayca geçerek detoksifiye etmekte ve hücre içi makromolekülleri koruyabilmektedir [208].

MLT serbest radikallerle etkileşiminden sorumlu birkaç mekanizma öne sürülmektedir: (a) bir elektron transfer reaksiyonu, O₂⁻ ile reaksiyona giren MLT'nin kation oluşmasına dayanmaktadır; (b) MLT'nin hidrojen atomu transferi ile NH grubu varlığında gerçekleşmektedir; (c) radikal ekleme reaksiyonunda MLT, iki OH· radikalini deaktif edebilmektedir; (d) MLT'de yer değiştirme reaksiyonu, C atomlarında meydana gelmekte olup, indol halkasının 2, 3 veya 7. konumdaki C atomları kolayca OH· ile reaksiyon verebilmektedir; (e) nitrozasyon reaksiyonunda MLT, NO ile reaksiyonu sonucunda N-nitrosomelatonin üretilebilmektedir [209]. MLT, pro-oksidatif enzim olan nitrik oksit sentazı da baskılamaktadır. Araştırmacılar, MLT'nin peroksil radikal süpürücü yeteneğinin α-tokoferol, C vitamini ve indirgenmiş glutatyonundan daha iyi olduğunu ve OH· kaynaklı oksidatif DNA hasarının inhibisyonunda, ksantorenik asit, resveratrol, vitamin C ve α-lipoik asitten daha güçlü olduğunu bildirmiştir. MLT'nin, DNA hasar belirtici 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin oluşumunu askorbik asit veya α-tokoferolden 60-70 kat daha etkili bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir. MLT ayrıca hücre membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır [210]. MLT hücre

zarı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakasının dış yüzeyine yapışmakta ve serbest radikallerle zardan önce temas ederek onları detoksifiye etmektedir. Böylece MLT, çekirdek, organeller ve hücre zarının serbest radikal hasarına karşı etkili bir şekilde korunmasını sağlamaktadır (Şekil 5.5) [211].



Şekil 5.5. Melatoninin hücre zarındaki koruyucu etkisi [211].

MLT reaktif türleri (oksijen/nitrojen) detoksifiye ettiğinde oluşan metabolitlerinin bazıları da etkili antioksidan özelliğine sahip olmaktadır. MLT oksidasyonunun bir ürünü olan N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin (AFMK) ve N-asetil-5-metoksikinuramin (AMK) serbest radikallerin temizlenmesinde rol oynamaktadır. MLT ve metabolitleri tarafından ardışık süpürme etkisi, serbest radikal süpürme kaskadı olarak adlandırılmakta ve bu nedenle MLT diğer antioksidan moleküllerden ayrılmaktadır [212]. Dolayısıyla MLT'nin birinci, ikinci ve üçüncü nesil metabolitlerinin hepsi iyi bir radikal süpürücü olduğu bildirilmiştir. AFMK, lipid peroksidasyonunu ve oksidatif DNA hasarını azaltmakta ve H₂O₂ neden olduğu nöron hücre hasarını önlemektedir. AFMK ve MLT, O₂^{·-} benzer etkiye temizlemektedir [213]. AMK, AFMK'nin deformilasyonu ile oluşmaktadır. AMK'nın güçlü bir ¹O₂ ve NO temizleyici olduğu, AFMK'nin ise bu açıdan oldukça etkisiz

olduğu bildirilmiştir. Ayrıca AMK, OH[·] ile MLT'den daha hızlı reaksiyona girdiği, MLT'nin ise AMK'ye göre trikolorometilperoksi radikali (OOCCl₃[·]) ile daha hızlı reaksiyona girdiği tespit edilmiştir. Genel olarak radikal süpürme faaliyetleri sırasıyla şu şekildedir: AFMK > MLT > AMK [209]. MLT'nin bir diğer metaboliti olan siklik 3-hidroksimelatonin (c3OHM), OH[·] ve HOO[·] temizlenmesinde rol oynamaktadır. c3OHM, MLT'den daha hızlı bir şekilde peroksit radikali (ROO[·]) ile etkileşime girebilmektedir [214].

MLT'nin oksidatif hasarı giderme kapasitesiyle ilgili olarak bir başka fonksiyonu ise ağır metalleri bağlama yeteneğidir. MLT, OH[·] oluşturmak için Fenton reaksiyonuna katılan Fe⁺³ ve Fe⁺²'yi bağlayabilmektedir [215]. Aynı şekilde MLT ve metabolitleri, Cu⁺²'yi bağlayarak inhibe etmektedir. MLT, AFMK ve c3OHM ayrıca Haber-Weiss reaksiyonunun ilk adımını tamamen önleyebilmekte ve Fenton reaksiyonu yoluyla OH[·] üretimini durdurabilmektedir [180].

MLT antioksidan enzimlerin transkripsiyonunu da modüle etmektedir. MLT ve metabolitlerinin seviyeleri, insan serumundaki redoks durumunu belirlemektedir. Hüresel redoks durumundaki değişiklikler, NF-κB gibi bazı kritik transkripsiyon faktörlerin aktivitelerine aracılık etmekte ve antioksidatif enzimlerin gen ekspresyonunu düzenlemektedir. MLT, GPx, GR, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimleri ve GSH sentezini uyarırken pro-oksidan enzimleri de inhibe etmektedir [216, 217]. Ayrıca MLT, iç mitokondriyal zardaki elektron taşıma zincirinin etkinliğini arttırmakta ve mikrozomal membranı stabilize etmektedir [218].

5.2. MELATONİNİN KARACİĞER ÜZERİNE ETKİSİ

Kronik karaciğer hastalıkları, önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Karaciğerdeki ksenobiyotiklerin metabolizması sonucu oluşan metabolitler, karaciğer dokusunun makromolekülleri ile kovalent olarak birleşerek yağ asitlerinin birikmesine, proteinlerin ve DNA'nın zarar görmesine ve ROT

oluşumuna yol açabilmekte ve bunun sonucunda dejenerasyon, nekroz, fibroz ve inflamasyon oluşabilmektedir [219].

Hepatositler, hücre dışı zararlı uyarıcılara maruz kaldığında, transkripsiyonel inhibitörlerin NF-κB sinyal yolu aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisi ortadan kalkmakta ve NF-κB sinyal yolunun aktivasyonu ile TNF-α indüklenmektedir. MLT, hepatosit hasarında, NF-κB sinyal yolunun aktivitesini azaltarak, inflamatuvar yanıtı hafifletmektedir [220]. Ayrıca MLT tedavisinden sonra, plazma AST, ALT düzeylerinin ve karaciğer hasar skorunun önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmektedir [221].

Çeşitli karaciğer yaralanmalarında kullanılan MLT dozlarının, 100 mcg/kg ile 100 mg/kg'a kadar büyük farklılıklar göstermesine rağmen, her durumda, MLT'nin hepatoprotektif etkileri olduğu bildirilmektedir (Şekil 5.6.) [222]. Oleshchuk vd çalışmasında toksik hepatitli ratlara uygulanan MLT tedavisiyle; karaciğerin fonksiyonel durumunun iyileştiği, hepatositlerde mitokondriyal solunum aktivasyonunun sağlandığı, nekrotik belirtilerin ve inflamasyonun azaldığı, apoptozun engellendiği, oksidatif belirtilerin azaldığı ve antioksidan sistem dengesinin sağlandığı gözlemlenmiştir. MLT'nin mitokondriyal solunum zincirinde kompleks I ve IV aktivitelerini artırdığı da bilinmektedir [223].



Şekil 5.6. Karaciğer hasarında melatonin etkisi [222].

BÖLÜM 6

GEREÇ VE YÖNTEMLER

6.1. GEREÇLER

6.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler, Aletler ve Yöntemler

Tez çalışmasında kimyasal maddeler olarak, disodyumhidrojen fosfat (Na_2HPO_4), tiyobarbutirik asit (TBA), fosforik asit, n-butanol, 5,5' dithiobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB), hidrojen peroksit, disodium etilendiamin tetraasetik asit (Na_2EDTA), potasyum sodyum tartarat, bakır (II) sülfat, sodyum hidroksit, ksantin oksidaz, bakır (II) klorür, bovine serum albümin (BSA), krosin, ksantin, sodyum karbonat, TAS ve TOS; kit olarak TNF- α kullanıldı.

Çalışma sırasında kullanılan aletler: manyetik karıştırıcı (Termal N11150M), 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), homojenizatör (Hangzhou Bioprep-24), sallayıcı su banyosu (Nüve ST 30), mikroplaka yıkayıcı (Thermo Fisher Wellwash 888), Nikon Eclipse 80i ışık mikroskobu, Nikon görüntü analiz sistemi.

6.2. YÖNTEMLER

6.2.1. Akrilamid ve Melatonin Uygulaması

AA, 25 mg/kg olacak şekilde serum fizyolojikte çözüldükten sonra gavajla ratlara verildi [224].

MLT uygulaması, %0,5'lik etanol çözeltilisinde çözüldükten sonra 10 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal (i.p) enjeksiyonla gerçekleştirildi [225].

6.2.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Bu çalışmada, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (ZBEÜN-DEHAM) biriminden 225-250 gram arasında 60 adet erkek Wistar albino türü rat sağlandı. Çalışmamız, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı (Protokal No: 2021-21-02/09) ile tüm deneysel prosedürler Hayvan Etik Kurulu Yönergelerine uygun olarak yürütüldü. Deneysel süreç boyunca tüm ratlar, standart pellet yemle ad libitum olarak beslendi ve sıcaklık kontrollü odada (21°C), 12 saat aydınlık (saat 08:00-20:00 arası) ve 12 saat karanlık döngüsünde tutuldu.

6.2.3. Rat Gruplarının Oluşturulması

Deney için 60 adet rat temin edilerek, her grupta 10 adet rat olacak şekilde rastgele dağılımları yapılarak ilk önce ratlar iki ana gruba ve ana gruplar da üçer gruba ayrılarak toplam altı grup oluşturuldu. Tüm gruplarda deneysel süreçler aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

Grup 1: Sham grubu; Bu gruba pinealektomi dışındaki tüm cerrahi işlemler yapıldı. Bu gruba, %0,5'lik etanol çözeltilisi i.p şeklinde günlük 0,5 ml olacak şekilde 21 gün boyunca verildi

Grup 2: Sham+AA grubu; Bu gruba 21 gün boyunca, 25 mg/kg/gün AA gavaj ile verildi [224].

Grup 3: Sham + AA + MLT grubu; Bu gruba 21 gün boyunca, 25 mg/kg/gün AA verilirken, MLT ise 10 mg/kg/gün olarak 21 gün boyunca 0,5 ml hacminde i.p şeklinde verildi [224, 225].

Grup 4: PNx grubu; Bu grupta pinealektomi yapılarak epifiz bezi çıkarıldı. Bu gruptaki ratlara 21 gün boyunca %0,5'lik etanol, günlük 0,5 ml olacak şekilde i.p olarak verildi.

Grup 5: PNx +AA grubu: Bu grupta pinealektomi yapılarak epifiz bezi çıkarıldı. Deneyde 21 gün boyunca 25 mg/kg/gün AA gavaj halinde verildi [224, 226].

Grup 6: PNx + AA+ MLT grubu: Bu grupta, pinealektomi işlemiyle pineal bezi çıkarıldıktan sonra ratlara, 21 gün boyunca hem gavaj şeklinde 25 mg/kg /gün AA; hem de i.p. olarak 10 mg/kg/gün dozunda MLT günlük 0,5 ml hacminde verildi [224-226].

6.2.3.1. Pinealektomi İşlemi

Pinealektomi (PNx) uygulanan ratlarda kraniyotomi Demir vd. yöntemine uygun olarak, önce ksilazin (8 mg/kg) ve ketamin (80 mg/kg) anestezi verilip daha sonra mikro freze matkap (Proxxon MİCROMOT 50/E, Almanya) ile 3 mm çapında delik açılarak yapıldı [226, 227]. Ameliyat sonrasında ratların ağrılarını azaltmak için 1 mg/kg i.p şeklinde novalgine verildi.

6.2.4. Ratlardan Numune Alınması

Çalışma sonunda tüm gruplara 10 mg/kg ksilazin (Rompun-Bayer), 90 mg/kg ketamine (Ketalor-Eczacıbaşı) i.p. olarak anestezi yapıldıktan sonra ratların abdominal veninden kan alınarak tüplere konuldu ve ratlar dekapite edildi. Tüm ratlardan karaciğer dokusu steril olarak tek parça halinde çıkarıldı. Doku üstünde

bulunan kan, serum fizyolojik ile temizlendi. Karaciğer dokusu ikiye bölünerek parçalardan biri histolojik olarak incelenmek için %10'luk formol solüsyona konuldu. Diğer doku parçası ise alüminyum folyo içerisinde çalışma gününe kadar -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Tüp içerisine alınan taze kanlarda AST, ALT, ALP ve lipid düzeylerinin analizi gerçekleştirildi.

6.2.5. Biyokimyasal Analizler

6.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması

Çalışma günü -80 °C'deki karaciğer dokuları çıkarıldı ve ilk olarak tartma işlemi gerçekleştirildi. Çalışmada karaciğer dokusunda MDA, GSH, SOD, CAT, TAS, TOS, OSI ve protein miktarı parametrelerine bakıldı. Fosfat tamponu (pH:7.5) ile %10'luk homojenat oluşumu sağlanarak, numuneler homojenizatör yardımıyla 12000 rpm'de 1-2 dakika boyunca homojenizasyonu sağlandı. Elde edilen homojenatlardan karaciğer dokusundaki MDA düzeyi saptandı. Homojenatlar, 30 dakika boyunca 5000 rpm'de ve 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatantlar ise GSH, SOD, CAT, TAS, TOS, OSI ve protein miktar tayininde kullanıldı. Tüplere alınan taze kanlarda, 10 dakika 3500 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen serumlar otoanalizörde AST, ALT, ALP, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), trigliserid (TG) ve Total Kolesterol düzeyleri tespit edildi.

6.2.5.2. Karaciğer Dokusu Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi

Karaciğer Dokusunda MDA Analizi

Karaciğer dokusundaki MDA analizi, Ohkawa vd [228] yöntemine göre gerçekleştirildi. MDA tayini için homojenattan tüp içerisine alınan numuneler, %1'lik fosforik asit (H_3PO_4) ve % 0,6'lık tiyobarbitürik asit ile reaksiyona

girebilmesi için 45 dakika süresince 95 °C sıcaklıkta sıcak su banyosu içerisinde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tüplere n-bütanol eklendikten sonra santrifüj gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrasında tüplerde n-bütanol fazında oluşan pembe renkli ürün, gruplara uygun olarak mikrolaka kuyucuklarına yerleştirilerek ELİSA cihazında 535 nm dalga boyunda analizi gerçekleştirildi. Çalışmada n-bütanol kör olarak kullanılırken, tetrametoksipropanın standart olarak kullanımıyla da sonuçlar belirlendi. MDA analiz sonucu nanomol/g yaş doku olarak belirlenmiştir.

Karaciğer Dokusunda GSH Analizi

Karaciğer dokularından elde edilen süpernatantlarda GSH analizi, Ellman'ın [229] yöntemine göre gerçekleştirildi. Deproteinize edilen süpernatantların, DTNB ile reaksiyonu sonucunda sarı-yeşil renk oluşumu sağlandı. Reaksiyon sonucunda oluşan madde, gruplara uygun olarak mikrolak kuyucuklarına yerleştirilerek ELİSA cihazında 410 nm dalga boyunda analizi gerçekleştirildi. Distile su, kör olarak mikrolaka kuyucuklarına eklenirken, standart olarak 5 mM/L stok GSH çözeltisinden farklı dilüsyonlardaki GSH çözeltisi kullanılarak sonuçlar belirlendi. GSH analiz sonucu, nanomol/g yaş doku olarak belirlenmiştir.

Karaciğer Dokusunda SOD Enziminin Aktivite Analizi

Karaciğer dokularından elde edilen süpernatantlarda SOD enzim analizi Sun vd [230] yöntemine göre gerçekleştirildi. Analiz sırasında ksantin-ksantin oksidaz ile oluşan süperoksit radikali, NBT (nitro blue tetrazolium) ile reaksiyonu sonucunda mavi renkli formazanın meydana gelmesini sağladı. Formazan, deney gruplarına uygun olarak mikrolaka kuyucuklarına eklenerek ELİSA cihazında 560 nm dalga boyunda analizi gerçekleştirildi. Kör olarak distike su kullanılırken, hazırlanan köre göre de enzim aktivitesi kullanıldı. SOD enzim analiz sonucu, U/g protein olarak belirlenmiştir.

Karaciğer Dokusunda CAT Enziminin Aktivite Analizi

Karaciğer dokularından elde edilen süpernatantlarda CAT enzim analizi Aebi vd [231] yöntemi ile gerçekleştirildi. İlk olarak içerisinde H_2O_2 bulunan fosfat tamponu (Ph:7,5 mM), numunelere eklendi. Numulere bulunan katalaz enzimi H_2O_2 'nin su ve oksijene dönüşmesini sağladı. Bu dönüşüm 240 nm'de absorbans azalmasını sağladı. Absorbanstaki bu azalma spektrofotometrede 1 dakika süresince 240 nm'de ölçüldü. Enzim aktivitelerinin birimi, K/g protein olarak belirlendi.

Karaciğer Dokusu Protein Analizi

Karaciğer dokularından elde edilen süpernatantlarda protein miktarlarının ölçümü Lowry vd [232] yöntemi ile gerçekleştirildi. Sonuçlar ELİSA'da 540 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Protein miktarının birimi, mg/ml olarak belirlendi.

Karaciğer Dokusu TOS Analizi

Karaciğer dokusu süpernatantlarındaki TOS analizi, Erel'in [233] yöntemi ile ticari kit (Rel Assay Diagnostics) prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Kit prosedürüne göre reaktifler ve süpernatantlar grup sırasına dikkat edilerek mikroluka kuyucuklarına konularak renkli bileşik oluşumu gözlemlendi. Oluşan bileşik ile TOS düzeyinin ölçümü, ELİSA cihazı kullanılarak 660 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Analizde standart olarak H_2O_2 solusyonu 20 μ mol/L olarak mikroluka kuyucuğa eklendi. TOS miktarının birimi, equiv/L olarak belirlendi.

Karaciğer Dokusu TAS Analizi

Karaciğer dokusu süpernatantlarındaki TAS analizi, Erel'in [234] yöntemi ile ticari kit (Rel Assay Diagnostics) prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. İlk olarak mikroluklara gruplara uygun şekilde eklenen numunelerin üzerine reaktif 1 ilave

edilerek 660 nm'de ilk okuma ve daha sonrada reaktif 2 eklenerek ikinci okuma gerçekleştirildi. İki okuma arasındaki absorbans farkından karaciğer dokusundaki TAS düzeyi belirlendi. Analizde E vitamininin suda çözünür analogu olan Trolox, kalibratör olarak kullanıldı. TAS miktarının birimi, equiv/L olarak belirlendi.

Karaciğer Dokusu OSI Analizi

Karaciğer dokusuna ait süpernatantta Erel'in [234] yöntemi ile gerçekleştirildi. OSI analizi, TOS/TAS ile ölçüldü: $OSI \text{ (Arbitrary Unit)} = \frac{TOS \text{ (}\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eqv/l)}}{[(TAS \text{ (mmol Trolox eqv/l)} \times 100)]}$. OSI analiz miktarı, Arbitrary Unit (AU) olarak belirlendi.

6.2.6. Serum AST, ALT, ALP Analizi

Karaciğer dokusunda AST düzeyleri (Architect/Aeroset Aspartate Aminotransferase Reagent Kit), ALT düzeylerini (Architect/Aeroset Alanine Aminotransferase Reagent Kit) ve ALP seviyelerini (Architect/Aeroset Alkaline Phosphatase Reagent Kit) tespit etmek amacıyla kitler kullanıldı. Düzeyler enzimatik-kolorimetrik metod ve otoanalizör (Architect C8000) aracılığıyla tespit edildi. Sonuçlar U/L olarak belirlendi.

6.2.7. Serum Lipid Düzeylerinin Analizi

Karaciğer dokusunda VLDL, HDL, Total Kolesterol, TG düzeyleri için Architect C1600 otoanalizör kit (Abbott, Abbott Park, Illinois, USA) kullanıldı. Sonuçlar mg/dl olarak belirlendi.

6.2.8. Karaciğer Dokusunda TNF- α Analizi

Karaciğer dokusundan elde edilen süpernatantlarda TNF- α düzeyi, Bioassay Technology Laboratory'den temin edilen Rat TNF- α ELISA kiti kullanılarak belirlendi. TNF- α analiz sonuçlarının birimi, ng/L olarak belirlendi.

6.2.9. Histopatolojik Analiz

Ratlara, 21. günden sonra ketamin/ksilazin anestezisiyle sakrifiye yapıldı. İşlem sonucunda elde edilen karaciğer dokusu fikse olması için %10'luk nötral tamponlanmış formalin (NTF) (104003, Formaldehyde solution %37, Merck, ABD) içerisinde bekletildi. Bekleme sonunda karaciğer, 3-4 mm'lik küçük doku parçalarına ayrılıp plastik doku takip kasetlerine eklenerek formalinde 24 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işeminin hemen ardından doku parçalarına akan çeşme suyu altında 24 saat boyunca yıkama işlemi yapıldı. Doku parçalarının trimleri gerçekleştirildikten sonra 2x45 dakika %70, %80, %95 ve %96'lık yükselen alkol serilerine maruz bırakıldı (Etanol, 1.00971.2500, Merck, ABD). Şeffaflama işlemi, 2x30 dakika ksilol (108661, Merck, ABD) ile gerçekleştirildi. İşlem sonrasında 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. Işık mikroskopik ve immunohistokimyasal yöntemlerde kullanmak için parafin bloklardan Leica FINESSE ME+ (Leica, GER) mikrotomu ile 5 μ m'lik kesitler jelatin kaplı lamlara alındı. Hazırlanan lamlar dokunun lama adezyonunu arttırmak için 37°C'lik etüvde 2 saat bekletildi. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi kullanıldı. Karaciğer hasarı, histopatolojik değişikliklerin derecesi ve yaygınlığına göre semikantitatif olarak belirlendi. Bu şekilde kesitler, hepatositlerd vakuolizasyon, vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu yönünden 10 farklı alanda değerlendirildi. Karaciğer doku hasarının şiddetin göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (ağır) şeklinde skorlandı. Maksimum hasar

skoru 12 olarak kabul edildi. Preparatlar Nikon Eclipse 80i ışık mikroskobu ve Nikon görüntü analiz sistemi ile incelenerek skorlandı ve fotoğrafları çekildi.

6.2.10. İmmünohistokimyasal Analiz

Kesitler deparafinizasyon aşaması için sırasıyla 60 °C etüvde ve 60 °C sıcaklıktaki ksilol içerisinde 1 saat bekletildi. Ardından anti-Ki67 (Bioss, bs-23105R) ve anti-NF- κ B (NovusBio, NB100-2176) antikoları ile IHC boyama protokolü uygulandı. Preparatlar entallen ile kapatılarak Nikon Eclipse 80i digital kamera takılı ışık mikroskobu 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), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. Her kesit için immünohistokimyasal boyanma skorlaması, H-skoru olarak adlandırılan ve (I x PC), (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) formülüyle hesaplanan bir skorlama algoritması kullanılarak yapıldı.

6.2.11. 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

BULGULAR VE TARTIŞMA

7.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR

7.1.1. Karaciğer Dokusu Oksidan/Antioksidan Düzeylerinin Karşılaştırılması

Pinealektomi yapılan deney hayvanlarına AA uygulaması ve MLT tedavisi yapılması sonrası karaciğer dokusu oksidan/antioksidan düzeylerini ortaya koymak için ratların karaciğer dokusunda MDA, GSH, TAS, TOS ve OSİ seviyeleri ile SOD ve CAT aktivite düzeyleri ölçülmüştür.

7.1.1.1. Karaciğer Dokusu MDA ve GSH Seviyeleri

Ratların karaciğer dokusuna ait MDA ve GSH düzeyleri Çizelge 7.1’de sunulmuştur.

Çizelge 7.1.Ortalama karaciğer doku MDA ve GSH düzeyleri (nmol/g yaş doku).

GRUPLAR	MDA (nmol/g yaş doku)	GSH (nmol/g yaş doku)
Grup 1: Sham	361,16±24,16 ^{a,b}	1017,65±80,19 ^{c,d}
Grup 2: Sham + AA	1044,52±64,22 ^a	324,98±23,89 ^a
Grup 3: Sham + AA + MLT	556,80±27,87	768,73±52,92
Grup 4: PNX	575,44±39,50 ^a	759,84±57,76 ^a
Grup 5: PNX + AA	1117,45±55,28 ^a	258,98±2,85 ^a
Grup 6: PNX + AA + MLT	658,34±47,48	646,23±30,28

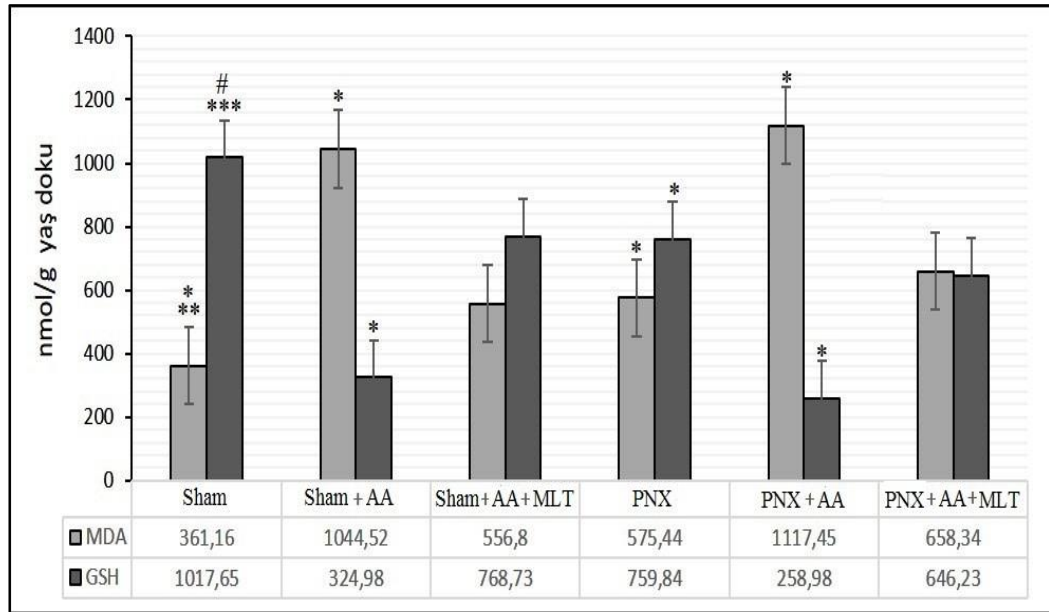
Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^ap< 0,001 grup 1 vs grup 2, 3; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.

^bp< 0,005 grup 1 vs grup 4.

^cp< 0,001 grup 1 vs grup 2. ^dp< 0,05 grup 1 vs grup 3, 4.

Sham için ayrılan ratlara AA uygulaması (Sham+AA) karaciğer dokusu oksidan/antioksidan dengesinin, oksidanlar lehine bozulmasına neden olmuş ve doku MDA seviyelerinde Sham grubuna kıyasla anlamlı yükselişlere ($p < 0,001$), GSH düzeylerinde ise önemli düşüşlere ($p < 0,001$) neden olmuştur. Ayrıca AA uygulanan bu ratlara MLT tedavisi yapılması (Sham+AA+MLT), MLT tedavisi yapılmayan AA grubuna (Sham+AA) kıyasla karaciğer dokusu oksidan/antioksidan dengenin antioksidanlar lehine düzelmesini sağlayarak MDA ve GSH seviyelerinde ciddi geri dönüşler ($p < 0,001$) oluşmasına sebep olmuştur (Şekil 7.1). Diğer yandan ratların pinealektomi işlemine tabi tutulması (PNX) hayvanlarda en güçlü antioksidan olan MLT yoksunluğuna sebep olarak karaciğerde oksidan/antioksidan dengede bozukluk oluşmasına neden olmuş ve Sham grubuna göre karaciğer MDA seviyelerinde ($p < 0,005$) artışlar, GSH seviyelerinde ise ciddi düşüşler ($p < 0,05$) gözlenmiştir.



Şekil 7.1. Ortalama doku MDA ve GSH düzeyleri (nmol/g yaş doku).

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

* $p < 0,001$ grup 1 vs grup 2, 3; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.

** $p < 0,005$ grup 1 vs grup 4.

*** $p < 0,001$ grup 1 vs grup 2. # $p < 0,05$ grup 1 vs grup 3, 4.

Pinealektomi yapılmış ratlara AA uygulanması (PNX+AA), AA uygulanmayan pinealektomi grubuna (PNX) göre MLT yoksunluğundan dolayı antioksidan savunma sisteminin zayıflamasına bağlı olarak karaciğer MDA seviyesinde ciddi artışa neden ($p < 0.001$) olurken GSH seviyelerinde ise ciddi düşümlere ($p < 0.001$) neden olmuştur. Öte yandan Pinealektomi işlemi sonrası AA verilen hayvanlara MLT tedavisi yapılması (PNX+AA+MLT), MLT tedavisi uygulanmadan AA verilen pinealektomili hayvanlara kıyasla (PNX+AA) karaciğer MDA seviyelerinde dikkat çekici bir azalma ($p < 0,001$), GSH seviyelerin de ise anlamlı artışlar ($p < 0,001$) oluşturmuştur.

7.1.1.2. Karaciğer Dokusu SOD ve CAT Aktivite Seviyeleri

Ratların karaciğer dokusuna ait SOD ve CAT aktivite seviyeleri Çizelge 7.2’de sunulmuştur.

Çizelge 7.2. Ortalama karaciğer doku SOD ve CAT aktiviteleri.

GRUPLAR	SOD (U/g protein)	CAT (K/g protein)
Grup 1: Sham	177,74±14,45 ^a	107,36±9,07 ^{c,d}
Grup 2: Sham + AA	52,86±2,35 ^a	43,53±4,21 ^a
Grup 3: Sham + AA + MLT	99,47±2,62	76,62±3,59
Grup 4: PNX	107,02±9,45 ^{a,b}	82,02±6,78 ^{a,b}
Grup 5: PNX + AA	33,88±2,45 ^a	29,22±1,57 ^e
Grup 6: PNX + AA + MLT	69,63±3,29	50,33±4,22

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

^a $p < 0,001$ grup 1 vs grup 2, 3, 4; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.

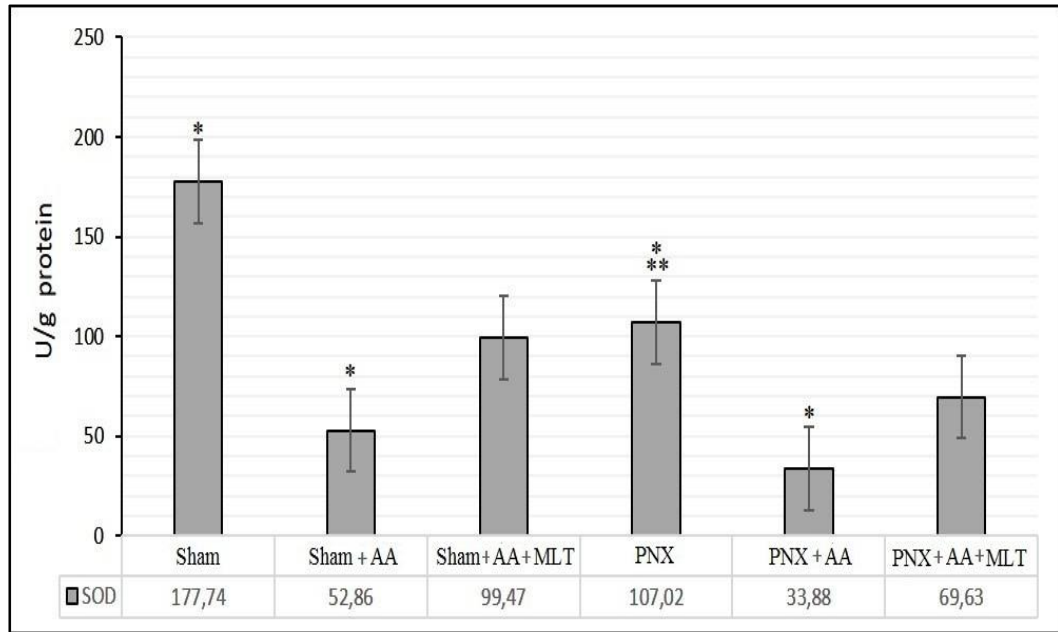
^b $p < 0,005$ grup 4 vs grup 6.

^c $p < 0,001$ grup 1 vs grup 2.

^d $p < 0,01$ grup 1 vs grup 3.

^e $p < 0,005$ grup 5 vs grup 6.

Sham grubu ratlara AA uygulaması (Sham+AA), karaciğer dokusu oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulmasına neden olarak AA uygulanmayan Sham grubuna kıyasla karaciğerin enzimatik antioksidan savunma sisteminde görevli enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerinde ciddi bir düşüş ($p < 0,001$) gözlenmesine neden olmuştur. İlave olarak AA uygulanan bu hayvanların MLT tedavisi (Sham+AA+MLT) sonrası MLT tedavisi yapılmayan gruba göre (Sham+AA), SOD ($p < 0,001$) (Şekil 7.2) ve CAT ($p < 0,01$) (Şekil 7.3) aktivitelerinde iyileşme ortaya koymuştur. Ayrıca hayvanların pinealektomi altına alınması (PNX), Sham grubuna kıyasla MLT yoksunluğunda bu enzimatik antioksidanların (SOD ve CAT) aktivitelerinde anlamlı düşüşler ($p < 0,001$) oluşturmuştur.



Şekil 7.2. Ortalama doku SOD aktivite düzeyleri (U/g protein).

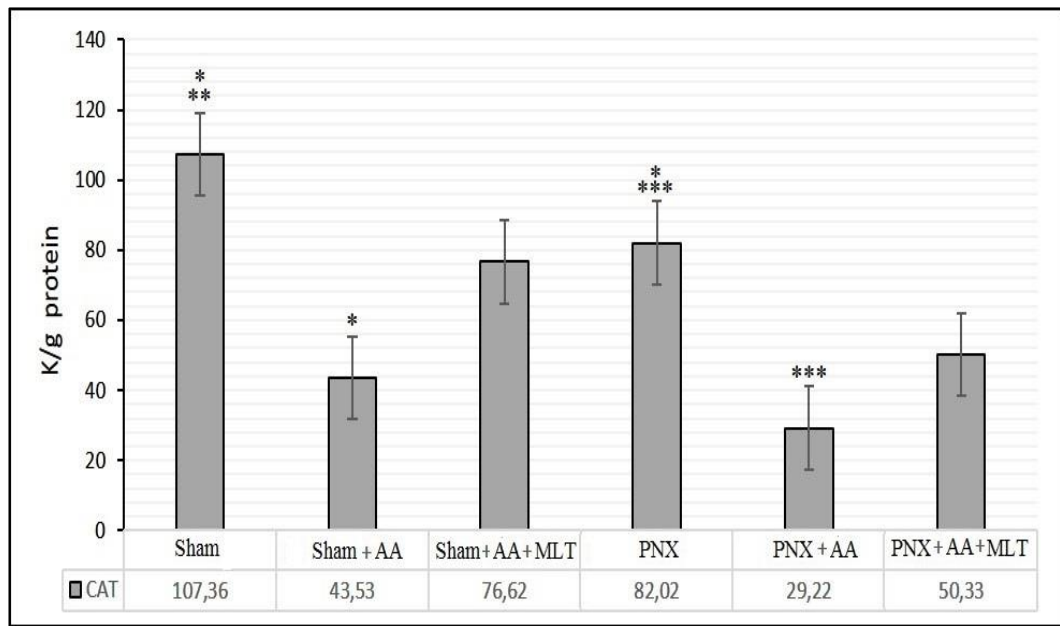
Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

* $p < 0,001$ grup 1 vs grup 2, 3, 4; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.

** $p < 0,005$ grup 4 vs grup 6.

Pinealektomi yapılan ratlara AA uygulanması (PNX+AA) AA uygulanmayan pinealektomi grubuna (PNX) göre MLT yoksunluğundan dolayı karaciğer dokusunun antioksidan savunma sisteminin zayıflamasına bağlı olarak karaciğer

antioksidan enzimleri olan SOD ve CAT aktivitelerinin de ciddi düşümlere ($p < 0,001$) yol açmıştır. Diğer yandan pinealektomi işlemi sonrası AA verilen hayvanlara MLT tedavisi yapılması (PNX+AA+MLT), MLT tedavisi uygulanmadan AA verilen pinealektomili hayvanlara kıyasla (PNX+AA) karaciğer dokusu SOD ($p < 0,001$) ve CAT ($p < 0,05$) aktivitelerinde ciddi iyileşme sağlamıştır.



Şekil 7. 3. Ortalama CAT aktivite düzeyleri (K/g protein).

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

* $p < 0,001$ grup 1 vs grup 2; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5

** $p < 0,01$ grup 1 vs grup 3 *** $p < 0,005$ grup 4 vs grup 6; grup 5 vs grup 6

7.1.1.3. Karaciğer Dokusu TAS, TOS ve OSİ Seviyeleri

Ratların karaciğer dokusuna ait TAS ve TOS seviyeleri Çizelge 7.3.'te, OSİ düzeyleri ise Çizelge 7.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 7.3.Ortalama karaciğer doku TAS, TOS düzeyleri

GRUPLAR	TAS (nmol Trolox Equiv/L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)
Grup 1: Sham	2,17 \pm 0,05 ^a	55,15 \pm 2,69 ^{b,c}
Grup 2: Sham+ AA	1,08 \pm 0,10 ^a	112,66 \pm 6,23 ^a
Grup 3: Sham+ AA+ MLT	1,81 \pm 0,02	62,37 \pm 3,14
Grup 4: PNX	1,63 \pm 0,07 ^a	70,36 \pm 3,83 ^a
Grup 5: PNX + AA	0,73 \pm 0,08 ^a	132,38 \pm 7,75 ^a
Grup 6: PNX + AA + MLT	1,52 \pm 0,05	76,73 \pm 3,36

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

^ap< 0,001 grup 1 vs grup 2, 3, 4; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.

^bp< 0,001 grup 1 vs grup 2. ^cp< 0,005 grup 1 vs grup 4.

Çizelge 7.4.Ortalama OSI değeri (Arbitrary Unit).

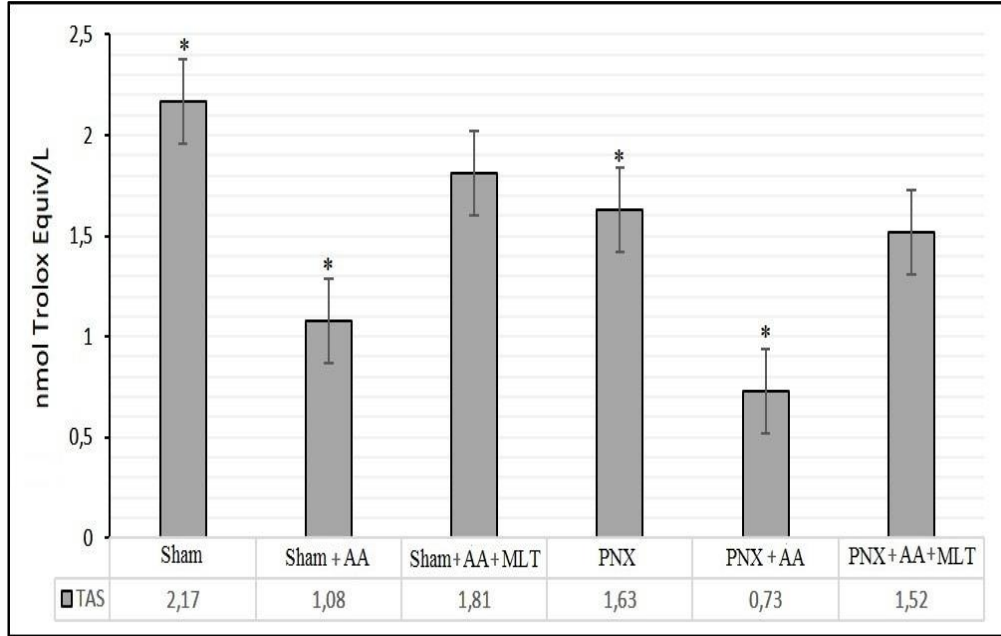
GRUPLAR	OSI (Arbitrary Unit)
Grup 1: Sham	2544,08 \pm 133,04 ^{a,b}
Grup 2: Sham + AA	12709,65 \pm 3104,63 ^a
Grup 3: Sham + AA + MLT	3446,64 \pm 185,05
Grup 4: PNX	4364,42 \pm 295,83 ^a
Grup 5: PNX + AA	22829,43 \pm 4863,98 ^a
Grup 6: PNX + AA + MLT	5115,92 \pm 335,78

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

^ap< 0,001 grup 1 vs grup 2, 4; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.

^bp< 0,005 grup 1 vs grup 3.

Sham grubu ratlara AA uygulaması (Sham+AA) karaciğer dokusu oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulmasına neden olmuş ve AA uygulanmayan Sham grubuna kıyasla karaciğerin TAS düzeylerinde ciddi bir azalma (p< 0,001) (Şekil 7.4), TOS (Şekil 7.5) ve OSİ (Şekil 7.6) düzeylerinde ise ciddi bir artış (p< 0,001) olduğu gözlenmiştir.

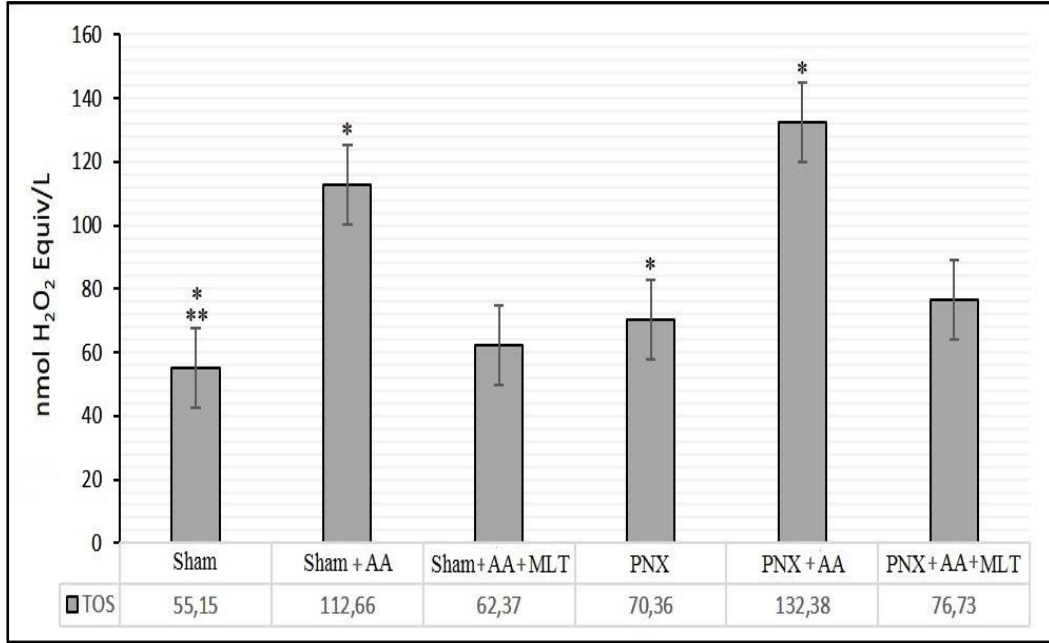


Şekil 7.4. Ortalama TAS değerleri (nmol Trolox Equiv/L).

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

* p< 0,001 grup 1 vs grup 2, 3, 4; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.

İlave olarak AA uygulanan bu hayvanların MLT tedavisi (Sham+AA+MLT) sonrası MLT tedavisi yapılmayan gruba göre (Sham+AA) karaciğer dokusu oksidan/antioksidan dengenin antioksidanlar lehine düzelmesini sağlamış ve doku TAS düzeyini artırırken, TOS ve OSİ değerlerinde ise azalma ($p < 0,001$) oluşturmuştur. Öte yandan, hayvanlara pinealektomi uygulanması (PNX), Sham grubuna kıyasla MLT yoksunluğunda karaciğer dokusunun antioksidan dengesinin bozulmasına neden olmuş ve TAS seviyelerinde azalma ($p < 0,001$) oluştururken, TOS ($p < 0,05$) ve OSİ ($p < 0,001$) seviyelerinde ise artış ortaya çıkarmıştır.



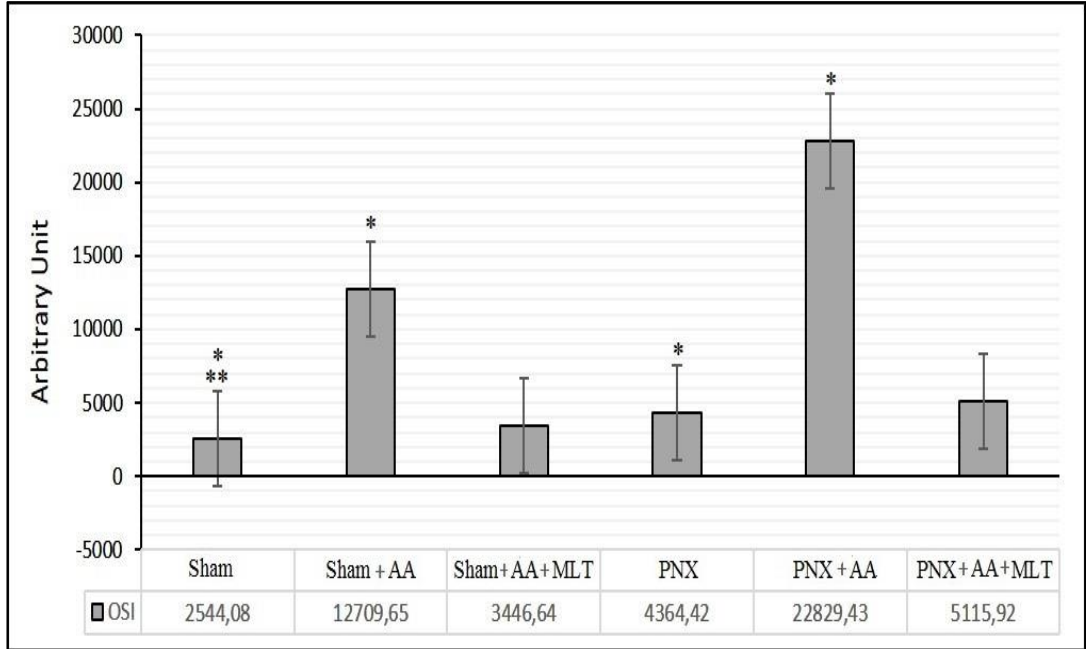
Şekil 7.5.Ortalama TOS değerleri (nmol H₂O₂ Equiv/L).

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

* p< 0,001 grup 1 vs grup 2; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.

** p< 0,001 grup 1 vs grup 4.

Pinealektomi yapılan ratlara AA uygulanması (PNX+AA) AA uygulanmayan pinealektomi grubuna (PNX) göre MLT yoksunluğundan dolayı karaciğer dokusunun antioksidan savunma sisteminin zayıflamasına bağlı olarak karaciğer TAS düzeyinde ciddi azalmalar, TOS ve OSİ değerlerinde ise anlamlı artışlar (p< 0,001) oluşturmuştur. Ancak pinealektomi işlemi sonrası AA verilen hayvanlara MLT tedavisi yapılması (PNX+AA+MLT), MLT tedavisi uygulanmadan AA verilen pinealektomili hayvanlara kıyasla (PNX+AA) karaciğer dokusu oksidan/antioksidan dengesini antioksidanlar lehine düzelterek TAS, TOS ve OSİ değerlerinde ciddi iyileşmeler (p< 0,001) sağlamıştır.



Şekil 7.6. Ortalama OSI değerleri (Arbitrary Unit).

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

* p< 0,001 grup 1 vs grup 2, 4; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6

** p< 0,005 grup 1 vs grup 3.

7.1.1.4. Karaciğer Dokusu TNF- α Düzeyleri

Pinealektomi yapılan deney hayvanlarına AA uygulaması ve MLT tedavisi yapılması sonrası karaciğer dokusu inflamasyon düzeyini ortaya koymak için ratların karaciğer dokusunda TNF- α seviyeleri ölçülmüştür. Ratların karaciğer dokusuna ait TNF- α seviyeleri Çizelge 7.5'te sunulmuştur.

Çizelge 7.5.Ortalama karaciğer doku TNF- α düzeyleri (ng/L).

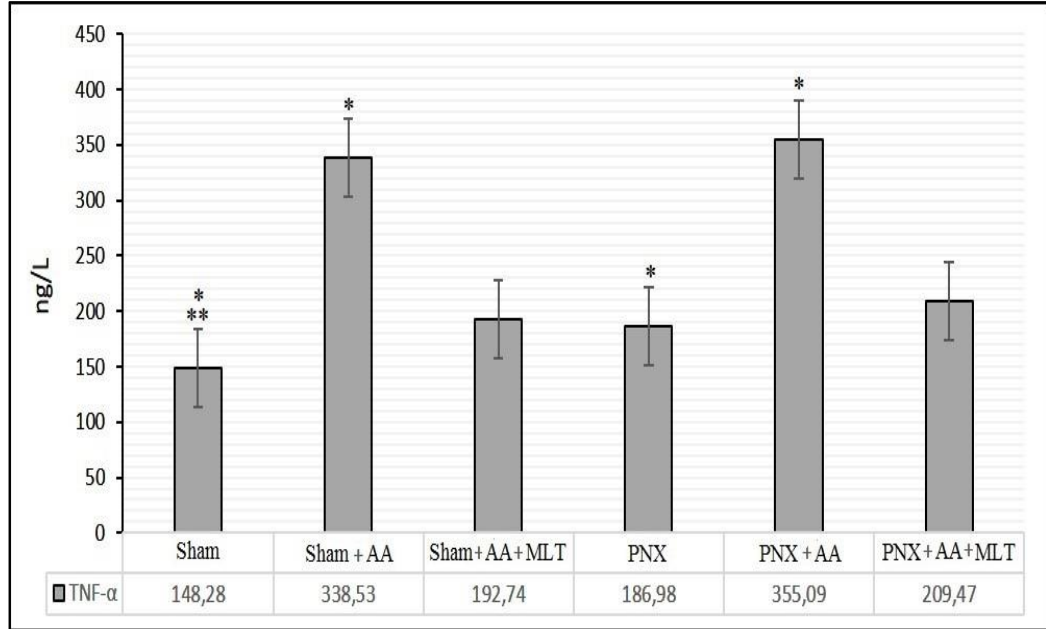
GRUPLAR	TNF- α (ng/L)
Grup 1: Sham	148,28 \pm 4,02 ^{a,b}
Grup 2: Sham + AA	338,53 \pm 19,46 ^a
Grup 3: Sham + AA + MLT	192,74 \pm 12,19
Grup 4: PNX	186,98 \pm 9,94 ^a
Grup 5: PNX + AA	355,09 \pm 24,81 ^a
Grup 6: PNX + AA + MLT	209,47 \pm 10,18

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

^ap< 0,001 grup 1 vs grup 2, 3; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.

^bp< 0,005 grup 1 vs grup 4.

Sham grubu ratlara AA uygulanması karaciğer dokusunda inflamasyona neden olmuş ve sham grubuna göre TNF α seviyelerinde ciddi artışa (p<0,001) neden olmuştur (Şekil 7.7). AA uygulanan bu hayvanların MLT tedavisi (Sham+AA+MLT) sonrası tedavi yapılmayan gruba göre (Sham+AA) karaciğer dokusunda inflamasyonu baskılayarak TNF- α düzeylerinde ciddi bir azalma (p<0,001) oluşturmuştur. İlave olarak, hayvanlara pinealektomi uygulaması (PNX) Sham grubuna kıyasla TNF- α düzeylerinde artışa (p<0,05) neden olmuştur. Pinealektomi yapılan ratlara AA uygulanması (PNX+AA), AA uygulanmayan pinealektomi grubuna (PNX) göre MLT yoksunluğundan dolayı karaciğer dokusunda inflamasyondaki artışa bağlı olarak inflamasyon belirteçlerinden TNF- α düzeylerinde ciddi artış (p<0,001) oluşturmuştur. Diğer yandan pinealektomi işlemi sonrası AA verilen hayvanlara MLT tedavisi yapılması (PNX+AA+MLT), MLT tedavisi uygulanmadan AA verilen pinealektomili hayvanlara kıyasla (PNX+AA) karaciğer dokusunda TNF- α düzeylerinde ciddi geri dönüşler (p<0,001) elde edilmiştir.



Şekil 7.7.Ortalama TNF- α düzeyleri (ng/L).

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

* p< 0,001 grup 1 vs grup 2, 3; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6

** p< 0,005 grup 1 vs grup 4

7.1.2. Serum Biyokimya Parametreleri

Ratlardan alınan kan numunelerinden elde edilen serum örneklerinde karaciğer fonksiyon testleri olan AST, ALT ve ALP seviyeleri ile kan yağları olan serum Total Kolesterol, TG, VLDL ve HDL değerleri ölçülmüştür.

7.1.2.1. Serum AST, ALT ve ALP Seviyeleri

Ratların serum numunelerine ait karaciğer fonksiyon testleri olan AST, ALT ve ALP değerleri Çizelge 7.6'da sunulmuştur.

Çizelge 7.6.Ortalama serum AST, ALT, ve ALP düzeyleri (U/L).

GRUPLAR	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)
Grup 1: Sham	42,50±1,31 ^a	109,00±6,09 ^{a,c}	124,40±5,94 ^{a,c}
Grup 2: Sham +AA	58,70±2,80 ^b	202,40±21,81 ^c	238,70±18,63 ^c
Grup 3: Sham + AA + MLT	46,10±1,87	110,80±2,79	121,10±9,91
Grup 4: PNX	43,20±1,58 ^a	137,70±6,44 ^a	185,00±8,35 ^d
Grup 5: PNX + AA	60,20±3,01 ^b	234,70±18,48 ^c	240,70±15,69 ^c
Grup 6: PNX + AA + MLT	48,70±2,08	129,40±3,342	142,80±9,07

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

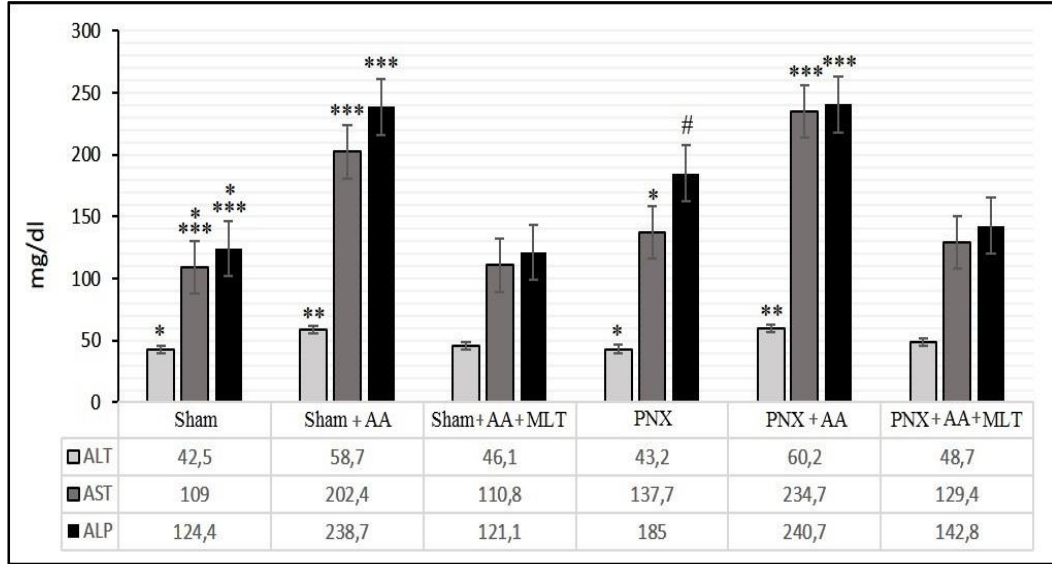
^ap< 0,001 grup 1 vs grup 2; grup 4 vs grup 5

^bp< 0,005 grup 2 vs grup 3; grup 5 vs grup 6

^cp< 0,001 grup 1 vs grup 4; grup 2 vs grup 3; grup 5 vs grup 6

^dp< 0,005 grup 4 vs grup 5, 6

Sham grubu ratlara AA uygulaması karaciğer dokusunda hasara neden olmuş ve AA uygulanmayan Sham grubuna göre serum AST, ALT ve ALP düzeylerinde ciddi artış (p< 0,001) oluşturmuştur (Şekil 7.8). AA uygulanan bu hayvanların MLT tedavisi (Sham+AA+MLT) sonrası MLT tedavisi yapılmayan gruba göre (Sham+AA) karaciğer dokusundaki AA kaynaklı hasar baskılanmış ve serum AST ile ALP (p<0,001) ve ALT (p<0,05) düzeylerinde ciddi düşüşler oluşturmuştur. İlave olarak hayvanlarda pinealektomi uygulaması (PNX) Sham grubuna kıyasla AST ve ALP düzeylerinde artışa neden olurken (p<0,001) ALT düzeylerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır.



Şekil 7.8. Serum ALT, AST ve ALP düzeyleri (mg/dl).

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

* p< 0,001 grup 1 vs grup 2; grup 4 vs grup 5

** p< 0,005 grup 2 vs grup 3; grup 5 vs grup 6

*** p< 0,001 grup 1 vs grup 4; grup 2 vs grup 3; grup 5 vs grup 6

p< 0,005 grup 4 vs grup 5, 6

Ayrıca, pinealektomi yapılan ratlara AA uygulanması (PNX+AA) AA uygulanmayan pinealektomi grubuna (PNX) göre MLT yoksunluğundan dolayı karaciğer dokusunda AA kaynaklı oluşan hasara bağlı olarak ALT ile AST (p<0.001) ve ALP (p<0.05) seviyelerinde ciddi artış oluşturmuştur. Ancak pinealektomi işlemi sonrası AA verilen hayvanlara MLT tedavisi yapılması (PNX+AA+MLT), MLT tedavisi uygulanmadan AA verilen pinealektomili hayvanlara kıyasla (PNX+AA) karaciğer dokusunda ortaya çıkan hasarın MLT tarafından azaltılmasına bağlı olarak serum ALT (p<0.05) seviyesi ile AST ve ALP (p<0.001) seviyelerinde ciddi düşüş olduğu gözlenmiştir.

7.1.2.2. Serum Total Kolesterol, TG, VLDL ve HDL Seviyeleri

Ratların serum numunelerine ait kan yağları olan Total Kolesterol, TG, VLDL ve HDL değerleri Çizelge 7.7’de sunulmuştur.

Çizelge 7.7.Ortalama serum Total Kolesterol, TG, VLDL, HDL düzeyleri (mg/dl)

GRUPLAR	Total Kolesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)	VLDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
Grup 1: Sham	44.20±2.03	70.10±8.15	14.02±1.63	24.91±1.34
Grup 2: Sham + AA	42.60±1.68	66.00±5.75	13.20±1.15	25.99±0.80
Grup 3: Sham + AA+ MLT	43.00±1.34	56.70±5.75	11.34±1.15	26.61±1.00
Grup 4: PNX	44.90±1.24 ^a	83.60±4.84 ^a	16.72±0.96 ^a	28.29±0.66 ^b
Grup 5: PNX + AA	47.30±2.79 ^a	66.40±6.51	13.28±1.30	32.68±1.91 ^a
Grup 6: PINX + AA+ MLT	35.80±4.22	62.00±5.21	12.40±1.04	27.00±1.99

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

^ap< 0,05 grup 4 vs grup 6; grup 5 vs grup 6.

^bp< 0,05 grup 4 vs grup 5.

Sham grubu ratlara AA uygulamasının, AA uygulanmayan Sham grubuna kıyasla kan yağları üzerinde anlamlı değişikliklere sebep olmadığı tespit edilmiştir. Ancak pinealektomize edilen ratlara AA uygulaması sonrası MLT tedavisi yapılması (PNX+AA+MLT), MLT tedavisi yapılmadan AA verilen pinealektomili ratlara göre (PNX+AA) Total Kolesterol ve HDL düzeylerinde düşüğe (p< 0,05) neden olmuştur. Diğer yandan bu gruplar arasında TG ve VLDL düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

7.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Sham grubuna ait karaciğer dokuları normal histolojik görünümdeydi (Şekil 7.9.A). PNX grubunda hafif derecede hasar mevcuttu (Şekil 7.10. A). Sham ve PNX grupları karşılaştırıldığında; hasar skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı (p< 0,001). Sham+AA grubu ve PNX+AA grubuna ait karaciğer dokularında; vasküler konjesyon, hepatositlerde vakuolizasyon, sinüzoidal dilatasyon ve

inflatuvar hücre infiltrasyonu tespit edildi. Nekroza giden hepatositler bulundu (Şekil 7.9.B, C; Şekil 7.10.B, C). Sham+AA grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru $2,90\pm 0,23$ idi. PNX+AA grubunda da benzer bulgular mevcuttu ancak hasarının şiddeti arttı.

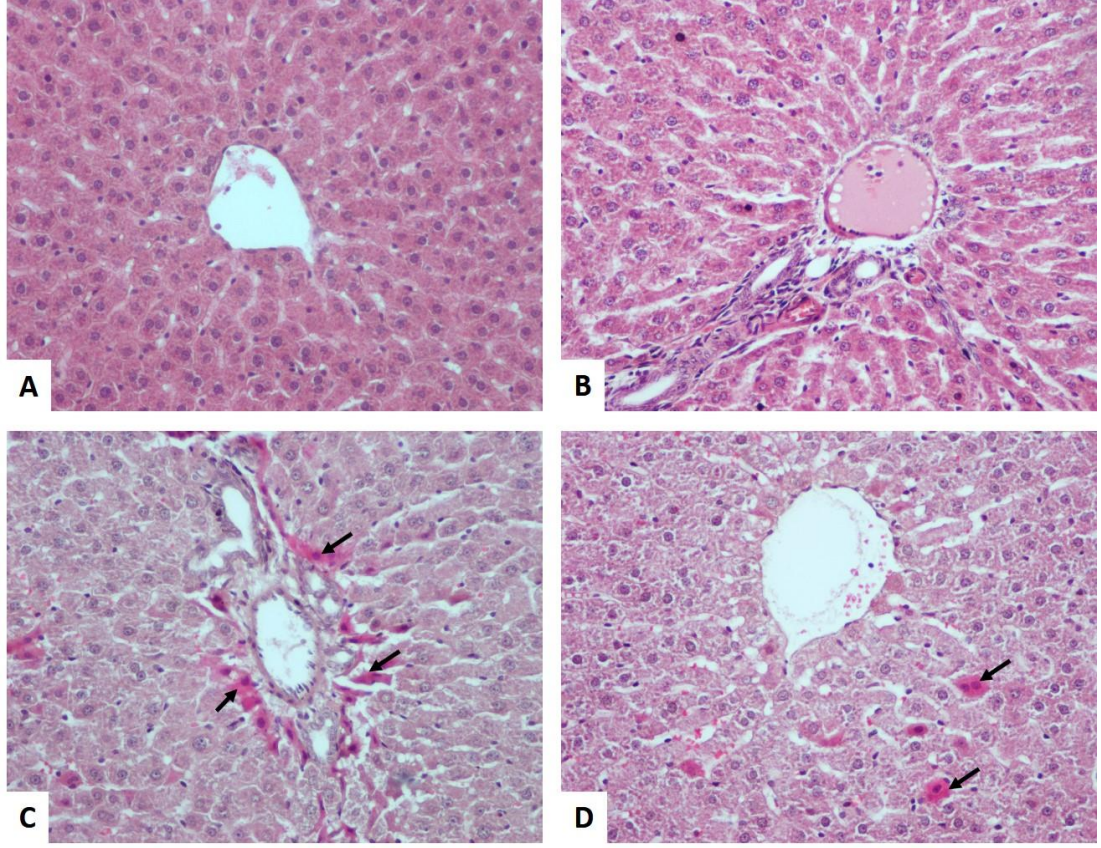
Portal alanda yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu dikkat çekiciydi. Kondense/piknotik nukleusa sahip hepatositler yaygın olarak görüldü. PNX+AA grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru $4,20\pm 0,55$ idi. Sham+AA+MLT grubu ve PNX+AA+MLT grubunda histopatolojik değişikliklerin MLT uygulaması ile belirgin olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 7.9.D, Şekil 7.10.D). Sham+AA grubu ve Sham+AA+MLT grubu karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardı ($p<0,001$). PNX+AA grubu ve PNX+AA+MLT grubu karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,001$). Tüm gruplara ait ortalama histopatolojik hasar skoru Çizelge 7.8.' de verildi.

Çizelge 7.8. Ortalama histopatolojik hasar skoru.

Gruplar	Hasar Skoru
Grup 1: Sham	$0,10\pm 0,10^a$
Grup 2: Sham + AA	$2,90\pm 0,23^a$
Grup 3: Sham + AA + MLT	$1,50\pm 0,16$
Grup 4: PNX	$1,40\pm 0,16^a$
Grup 5: PNX + AA	$4,20\pm 0,55^a$
Grup 6: PNX + AA + MLT	$1,80\pm 0,20$

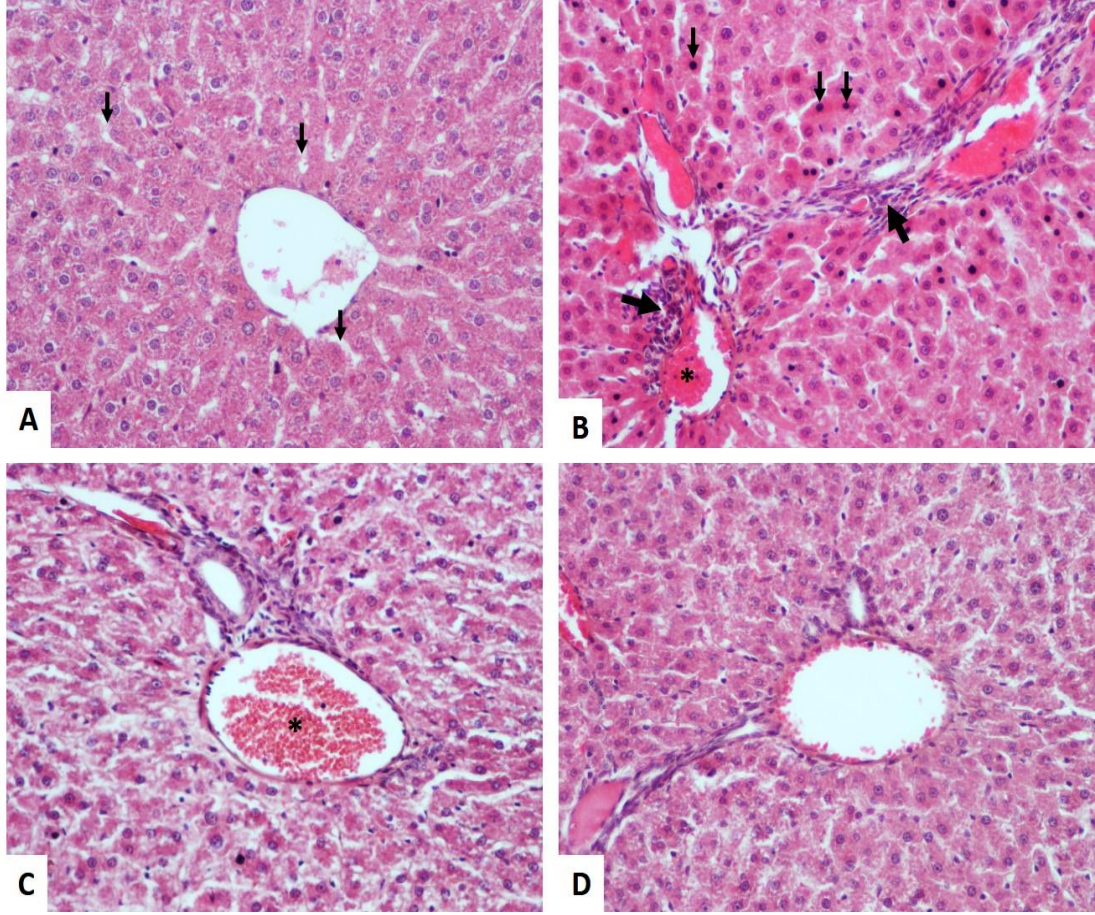
Veriler aritmetik ortalama \pm SE olarak ifade edildi (n=10).

^a $p<0,001$ grup 1 vs grup 2, 3, 4; grup 2 vs grup 3; grup 4 vs grup 5; grup 5 vs grup 6.



Şekil 7.9. Sham gruplarının karaciğer histopatolojisi. **A.** Sham grubu, **B.** Sham+AA grubu, **C.** Sham+AA grubu, **D.** Sham+AA+MLT grubu. H-E; X20.

Sham grubuna ait karaciğer dokusu normal histolojik görünümdeydi. Sham+AA grubunda; vasküler konjesyon, hepatositlerde vakuolizasyon, sinüzoidal dilatasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu tespit edildi. Bazı alanlarda nekroza giden hepatositler bulunmaktaydı. Sham+AA+MLT grubunda histopatolojik değişikliklerin MLT uygulaması ile belirgin olarak azaldığı görüldü.



Şekil 7.10. PNX gruplarının karaciğer histopatolojisi. **A.** PNX grubu, **B.** PNX+AA grubu, **C.** PNX+AA grubu, **D.** PNX+AA+MLT grubu. H-E; X20.

PNX grubuna ait karaciğer dokusunda hafif derecede hasar mevcuttu. PNX+AA grubunda; vasküler konjesyon (asteriks), hepatositlerde vakuolizasyon, sinüzoidal dilatasyon (A-ince ok) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun (kalın ok) şiddeti Sham+AA grubuna göre artmıştı. Portal alanda yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu dikkat çekiciydi. Kondense/piknotik nukleusa sahip hepatositler bulunmaktaydı (B-ince ok). PNX+AA+MLT grubunda histopatolojik değişikliklerin MLT uygulaması ile belirgin olarak azaldığı görüldü.

7.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Sham ve PNX grupları ile karşılaştırıldığında, AA uygulanan gruplarda Ki67 ve NF- κ B ifadesinin artmış olduğu tespit edildi. PNX grubunda Ki67 ve NF- κ B ifadesi hafif şiddetteyken, Sham+AA ve PNX+AA gruplarında ise yüksek şiddette olduğu görüldü. MLT ile Ki67 ve NF- κ B ifadesinin şiddetinde azalma tespit edildi (Şekil 7.11; Şekil 7.12; Şekil 7.13). İmmün boyamalara ait H-skoru Çizelge 7.9` da gösterildi.

Çizelge 7.9. Ki67 ve NF- κ B immünreaktivitesi için ortalama H-Skoru.

Gruplar	Ki67 H-Skoru	NF- κ B H-Skoru
Grup 1: Sham	207,70 \pm 4,17 ^{a,b}	174,60 \pm 11,95 ^{a,d}
Grup 2: Sham + AA	230,40 \pm 3,44 ^b	256,50 \pm 4,34 ^d
Grup 3: Sham + AA + MLT	215,80 \pm 1,13	233,50 \pm 2,36 ^e
Grup 4: PNX	212,50 \pm 2,32 ^c	238,40 \pm 6,69 ^f
Grup 5: PNX + AA	235,10 \pm 8,69	262,60 \pm 5,83
Grup 6: PNX + AA + MLT	217,80 \pm 2,04	259,10 \pm 4,64

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

^ap< 0,001 grup 1 vs grup 2

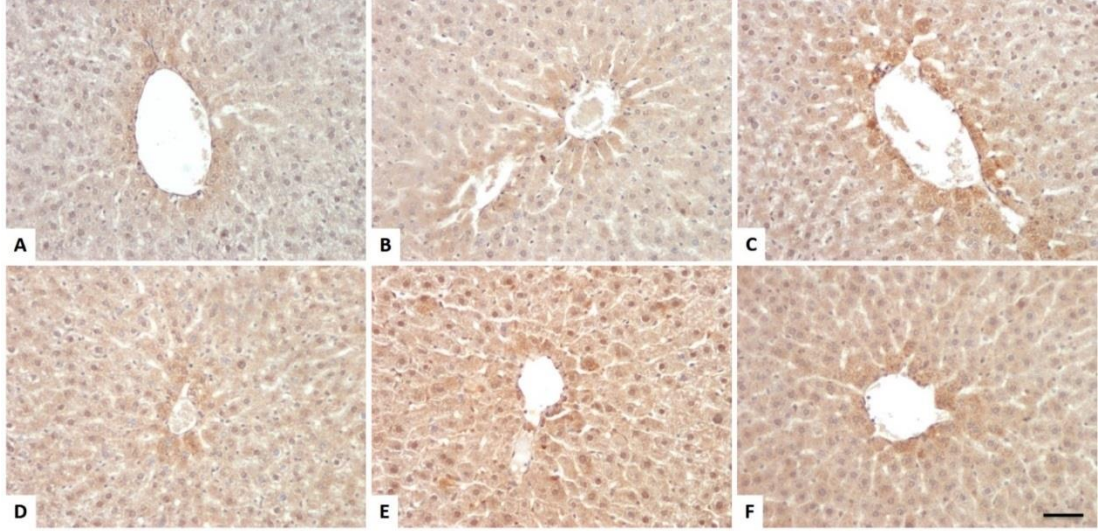
^bp< 0,005 grup 1 vs grup 3; grup 2 vs grup 3

^cp< 0,01 grup 4 vs grup 5

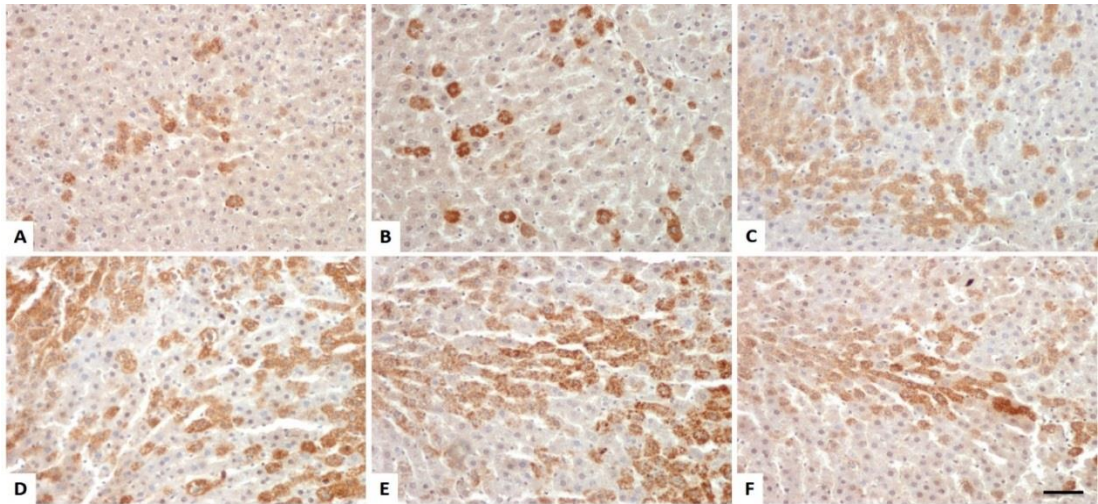
^dp< 0,001 grup 1 vs grup 3, 4; grup 2 vs grup 3

^ep< 0,005 grup 3 vs grup 6

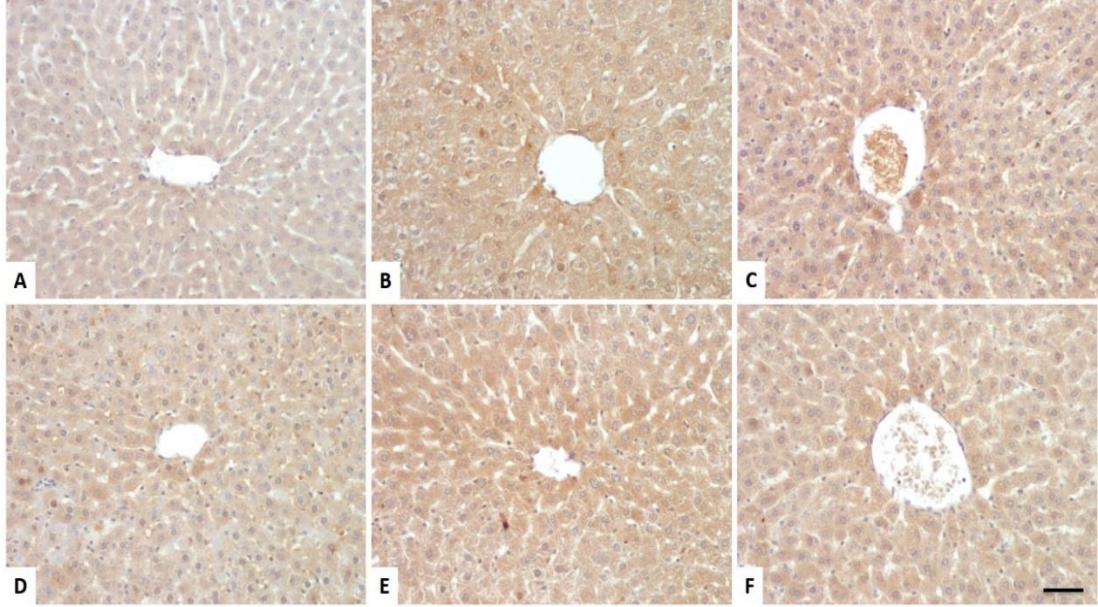
^fp< 0,05 grup 4 vs grup 5, 6



Şekil 7.11. Karaciğer dokusunda vena sentralis çevresindeki Ki67 immünreaktivitesi. **A.** Sham grubu, **B.** PNX grubu, **C.** Sham+AA grubu, **D.** PNX+AA grubu, **E.** Sham+AA+MLT grubu, **F.** PNX+AA+MLT grubu. Anti-Ki67; X20. Bar: 20 µm.



Şekil 7.12. Karaciğer parankiminde Ki67 immünreaktivitesi. **A.** Sham grubu, **B.** PNX grubu, **C.** Sham+AA grubu, **D.** PNX+AA grubu, **E.** Sham+AA+MLT grubu, **F.** PNX+AA+MLT grubu. Anti-Ki67; X20. Bar: 20 µm.



Şekil 7.13. Karaciğer dokusunda vena sentralis çevresindeki NF- κ B immünreaktivitesi. **A.** Sham grubu, **B.** PNX grubu, **C.** Sham+AA grubu, **D.** PNX+AA grubu, **E.** Sham+AA+MLT grubu, **F.** PNX+AA+MLT grubu. Anti-NF- κ B; X20. Bar: 20 μ m.

7.4. TARTIŞMA

Bu çalışmada MLT'nin pinealektomi uygulanmış ratlarda AA ile indüklenen hepatotoksisite üzerindeki potansiyel koruyucu etkileri araştırıldı. Mevcut çalışmanın verileri, AA uygulamasının ratların karaciğer dokusunda oksidatif strese, iltihaplanmaya ve kansere neden olduğunu ve pinealektomize ratların AA'nın zararlı sonuçlarına Sham ratlarından daha duyarlı olduğunu ortaya çıkardı. 21 günlük ekzojen MLT tedavisi, hem pinealektomize hem de Sham ratlarında AA'nın neden olduğu hepatotoksisiteyi tersine çevirebileceğini gösterdi.

Düşük moleküler ağırlıklı bir nörotoksin olan AA, su ve atık su arıtımı, tekstil, kağıt ve kozmetik gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmakta ve ayrıca özellikle fırınlanmış ve yağda kızartılmış gıdalar olmak üzere ısıtma işlemi sırasında Maillard reaksiyonu ile oluşmaktadır. Bu nedenle insanlar yaşamları boyunca içme suyu,

kozmetikler ve yiyecekler, özellikle batı tarzı atıştırma kalıplar gibi çeşitli kaynaklardan AA'ya maruz kalabilmektedir. Başlangıçta, AA'ya maruz kalmanın zararlı sonuçları, bu kimyasala mesleki olarak maruz kalan sanayi işçilerinde gözlenen bu toksisite nedeniyle özellikle nörotoksisite üzerinde odaklanmıştır. AA'nın neden olduğu nörotoksisite, AA'ya maruz kalmanın en bilinen zararlı sonucudur ve insanlarda ve hayvanlarda kilo kaybı, iskelet kası zayıflığı ve ataksi dahil olmak üzere çeşitli değişikliklere neden olabilmektedir. Bununla birlikte karaciğer, neredeyse tüm ksenobiyotiklerin metabolizmasındaki merkezi rolü nedeniyle toksinler için birincil hedef olarak görülmektedir. Neredeyse tüm ksenobiyotikler, hepatositlerde detoksifikasyon için biyokimyasal reaksiyonlar yoluyla metabolize edilmekte ve suda çözünür metabolitler olarak safra veya idrarla atılmaktadır. AA ve metaboliti GA toksik ve kanserojen kimyasallardandır. Şimdiye kadar, AA'nın neden olduğu toksisitenin altında yatan mekanizmayı araştırmak için çok sayıda deneysel hayvan ve laboratuvar çalışması yapılmış olup, ancak henüz tam olarak kanıtlanamamıştır. Bu arada, AA hepatositlerde CYP 450 enzimleri tarafından epoksidasyon yoluyla reaktif GA oluşturmak üzere metabolize olmakta veya AA ve GA enzimatik olmayan veya enzimatik GST reaksiyonları ile GSH ile konjugatlar oluşturmak üzere metabolize edilebilmektedir [235,236]. AA'ya maruz kalan hepatositlerde artan CYP2E1 aktivitesi, aşırı ROT ve lipid peroksit oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca GSH oluşumu konjugatlar GSH'nin tükenmesine yol açmakta ve bu durum hücrenin redoks sürecini bozarak hücre fonksiyonunun hasar görmesine ve ölümüne sebep olmaktadır [237]. Ayrıca, AA'ya kronik maruz kalma CYP2E1 yoluyla metabolizma edilmesi sonucunda reaktif GA artışına neden olmaktadır [238]. Hücre GSH'sinin tükenmesinin sonucu, hücresel redoks dengesinin bozulmasına neden olmakta ve bu durum oksidatif doku hasarıyla sonuçlanmaktadır. Ek olarak, reaktif GA'nın DNA'ya bağlanarak AA'nın genotoksitesinde yer aldığı düşünülmektedir [239]. Son araştırmalar, AA'nın neden olduğu toksisitenin, yüksek DNA oksidatif hasarı ve dokuların enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerini bozarak karaciğer, böbrek ve beyinde doku hasarına ve apoptoza yol açtığını ortaya koymuştur [240,241]. Ayrıca, önceki raporlar yeni terapötik ajanların AA kaynaklı

toksisiteyi azaltabileceğini veya önleyebileceğini kanıtlamaktadır. Burada, mevcut çalışma, literatür taramamıza göre ilk kez, pinealektomi uygulanmış ratlarda AA kaynaklı hepatotoksisiteye karşı ekzojen MLT uygulamasının genel olumlu etkilerini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, AA'nın (25 mg/kg vücut ağırlığı) hepatotoksitesinin, artmış oksidatif stres, bozulmuş antioksidan savunma sistemi, artmış inflamasyon, indüklenmiş proliferasyon ve ayrıca doku yapısındaki değişiklikler ile kanıtlandığını ve bu değişikliklerin pinealektomi prosedüründen sonra daha şiddetli olduğunu göstermiştir. Son kanıtlar, AA'nın, yüksek ROT'un eşlik ettiği antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki bozulmaya neden olabileceğini ve oksidatif hasara yol açabileceğini doğrulamıştır [242]. Donmez vd`nin 2020 yılındaki çalışmasında 21 gün boyunca 40 mg/kg/gün AA takviyesi alan ratlarda karaciğer dokusunda AA'nın TAS düzeylerini azalttığı, TOS ve OSI düzeylerini arttırdığı gözlemlenmiştir [243]. Antioksidanlar ve oksidatif stres arasındaki bozulma, NF-κB, TNF-α ve IL-1β dahil olmak üzere artmış inflamatuvar indekslere de yol açmaktadır [244].

Dokular vücudu oksidanların zararlı etkilerine karşı korumak için kararlı durum koşullarında onları temizlemede çok önemli bir role sahip olan SOD ve CAT gibi enzimatik ve GSH ve MLT gibi enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerini içermektedir [245]. Aşırı ROT üretimi, AA gibi ksenobiyotiklerin metabolizması dahil olmak üzere oksidatif koşullar altında lipid membranların oksidasyonu ve DNA hasarı yoluyla oksidatif hasara neden olabilmektedir [246]. Önceki kanıtlar, AA'nın serbest radikaller üretmeye yol açtığını ve antioksidan savunmaları çökerterek kanserojenez ve oksidatif strese yol açtığını doğrulamaktadır [247]. Önceki bulgularla uyumlu olarak, ilk kez verilerimiz AA kaynaklı hepatotoksitenin hem Sham hem de pinealektomi uygulanmış ratlarda gözlemlendiğini ortaya koydu; bununla birlikte, AA'nın zararlı etkileri, pinealektomi prosedüründen sonra epifiz bezinden MLT salınımının olmaması durumunda daha belirgindi, bu da ratların karaciğer dokusunda antioksidan savunma sisteminin zayıflamasına ve lipid peroksidasyonunun artmasına neden oldu. Dolayısıyla doku oksidan/antioksidan

dengelesinin oksidanlar yönünde bozulması oksidatif hasara neden olur. Mevcut araştırma ile tutarlı olarak, Kandemir vd, on gün boyunca 38,27 mg/kg AA uygulamasının, MDA'da kayda değer bir şekilde artış gösterdiğini ve ayrıca oksidatif stresi artırarak hepatorenal toksisiteye neden olduğunu ortaya çıkarmışlardır [248]. Ek olarak, bu araştırmacılar AA tedavisinin, SOD, CAT ve GPx enzimlerinin aktivitelerinin ve GSH düzeylerinin azalması gibi antioksidan kapasitenin tükenmesine eşlik ettiğini bildirmektedir. Hamdy vd çalışmasında da 2 ay boyunca 5 mg/kg/gün AA takviyesi verilen gruplarda kontrol grubuna göre MDA, SOD, CAT düzeylerinde anlamlı artış, GSH düzeyinde anlamlı derecede azalma gözlemlenmiştir [249]. Son zamanlarda, Uthra vd çalışması, 38,27 mg/kg dozda 10 gün süreyle AA tedavisinin, karaciğer, böbrek ve beyinde artmış lipid peroksidasyonu, azalmış GSH ve antioksidan enzimler açısından oksidatif stresi indüklediğini doğrulamaktadır [250]. Ayrıca Jiang vd [241] ve Gur vd [251], AA'nın neden olduğu doku toksisitesinin artan lipid peroksidasyonu ve doku antioksidan kapasitesindeki bozukluklar tarafından belirlendiğini bildiren çeşitli yakın tarihli çalışmaların sonuçlarıyla tutarlıdır. Yapılan çalışmada gösterildiği gibi, SOD ve CAT aktivitelerinde, karaciğer dokularının GSH ve TAS seviyelerinde bir düşüş ve MDA ve TOS seviyelerinde önemli bir artış saptandı. Bu arada literatür taramamıza göre, ilk kez bu çalışma, karaciğerin antioksidan durumunda AA'nın neden olduğu bu bozuklukların, pinealektomili ratlarda Sham ratlarına göre daha belirgin olduğunu gösterdi. Gerçekten de MLT, serbest radikalleri temizleyerek ve SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerini artırarak ve lipid peroksidasyonunu azaltarak antioksidan özellikler sağlamaktadır [186]. MLT, kan-beyin bariyeri gibi tüm fizyolojik engelleri geçebilmekte ve tüm vücut sıvılarına ve hücrelere kolayca dağılabilmektedir, bu durum MLT'nin bir antioksidan olarak gücünü arttırmaktadır [252,253]. Ayrıca bu çalışmada AA ve MLT'nin kombine tedavisinin karaciğer dokularının SOD ve CAT aktivitelerinde, GSH ve TAS düzeylerinde iyileşmeye ve MDA ve TOS düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, ilk kez, bu çalışmanın bulguları, ekzojen MLT tedavisi ile karaciğerin antioksidan kapasitesindeki artışın, AA'ya maruz bırakılan Sham ratlarında, AA'ya maruz

bırakılan PNX ratlarına göre daha anlamlı olduğunu gösterdi. Bu çalışmada da görüldüğü gibi endojen MLT varlığında ve yokluğunda AA maruziyeti sonrası karaciğerin antioksidan durumunun düzenlenmesinde ekzojen MLT tedavisinin bozulmuş oksidan/antioksidan denge açısından hayati bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. MLT uygulamasının AA ile indüklenen hepatotoksisiteye karşı güçlü bir farmakolojik ajan olduğu düşünülmektedir [254].

Kandaki aminotransferaz enzim aktivitelerindeki artışlar karaciğer hasarını düşündürmektedir, bu nedenle artmış ALT, AST ve ALP seviyeleri hepatoselüler hasarı göstermek için kullanılmaktadır. AA metabolizması sırasında aşırı ROT üretiminin meydana geldiği ve bu radikallerin hepatositlerin hücre zarlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerine saldırarak hücre zarı hasarına neden olduğu bilinmektedir. Böylece AST, ALT ve ALP gibi hepatoselüler enzimler, hücre bütünlüğünün bozulması nedeniyle kana sızar ve bu enzimlerin plazma seviyeleri aşırı derecede yükselmektedir [255]. Mevcut araştırmada, AA alan grupta (Sham+AA ve PNX+AA) kontrol grupları (Sham ve PNX) ile karşılaştırıldığında ALT, AST ve ALP seviyelerinde önemli bir artış gösterdi. Ayrıca, AA indüksiyonu ile bu enzimlerin plazma seviyelerindeki artışın, PNX grubu ratlarda Sham ratlarına göre daha anlamlı olduğunu ilk kez ortaya çıkardık. Elhelaly vd. çalışmasında 14 gün boyunca ağızdan 20 mg/kg/gün AA verilen ratlarda karaciğer fonksiyon testlerinin (AST, ALT, ALP) önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir [240]. Mevcut veriler, MLT'nin hücre zarının bütünlüğünü koruduğunu ve radikalleri temizleyerek ve karaciğerin antioksidan durumunu iyileştirerek plazma ALT, AST ve ALP seviyelerini düşürdüğünü kanıtladı. Mevcut veriler, MLT'nin hücre zarının bütünlüğünü geri kazandırdığını ve radikalleri temizleyerek ve karaciğerin antioksidan durumunu iyileştirerek plazma ALT, AST ve ALP düzeylerini düşürdüğünü kanıtladı. Bu çalışma ile uyumlu olarak, Gedik vd [224] ve Kandemir vd [248], AA uygulamasının yüksek plazma ALT, AST ve ALP seviyelerine neden olduğunu bildirmiştir; bununla birlikte, AA kaynaklı hepatotoksisiteye karşı krosin ve morin takviyesi, AA'ya maruz kalan ratlara kıyasla bu enzimlerin seviyelerini

önemli ölçüde azaltmaktadır. Lebda vd çalışmasında tiyoasetamid takviyesiyle hepatik siroz oluşturulan ratlarda, 5 mg/kg MLT tedavisi uygulandığında MLT'nin antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri sayesinde, serum ALT ve AST düzeylerinde önemli bir azalma gösterdiğini ve karaciğer fonksiyonlarını da iyileştirdiğini bildirdi [256]. Ayrıca Rezayat vd tarafından 7 farklı çalışmanın incelendiği meta-analizde, alkolsüz steatohepatitli hastalara MLT uygulanması sonrasında AST, ALT ve ALP düzeylerinde önemli ölçüde düşüş olduğu gözlemlenmiştir [257].

Antiinflamatuvar ve proinflamatuvar mediatörler arasındaki bozukluklar, artmış inflamasyona yol açmakta olup bu duruma bazı proteinler aracılık edebilmektedir [258]. NF- κ B, çeşitli inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu düzenlemede bir transkripsiyon faktörü olarak hayati bir rol oynamakta olup oksidatif stress ve sitokinler tarafından uyarılabilmektedir [244]. Ayrıca NF- κ B tarafından düzenlenen genler, hücrede ROT üretimini düzenlemek gibi temel bir işleve sahiptir [259,260]. Fizyolojik koşullar altında, NF- κ B sitoplazmada inhibitor kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$) tarafından tutulmakta ve aktifleşmesi engellenmektedir. Ancak $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ 'nın fosforilasyonu, NF- κ B sinyal yolunu aktifleştirmekte ve NF- κ B'nin alt birimi olan p65 çekirdeğe geçmektedir. Çekirdeğe geçen p65, NF- κ B ile ilgili gen bölgesine bağlanmakta ve ekspresyon seviyesinin artmasını sağlamaktadır [261]. Bununla birlikte, MLT takviyesinin NF- κ B (p65 alt birimi) ekspresyonunu azalttığı western blot ve immünohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca MLT tedavisi $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ 'nın fosforilasyonunu engellemektedir. Önceki çalışmalar, NF- κ B'nin inflamasyona neden olduğunu ve bu duruma karşı MLT'nin koruyucu etkisinin bulunduğunu bildirilmiştir [262-265]. NF- κ B'nin uyarılması, TNF- α ve IL-1 β dahil olmak üzere birçok inflamatuvar sitokin salınmasına yol açabilmektedir [266]. TNF- α , çeşitli toksisitelere aracılık yanıtı olarak yükselen en güçlü ve tehlikeli immünojenik belirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir [267]. AA'nın NF- κ B sinyal yolunu indüklediği ve TNF- α IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerinde önemli bir artışa neden olduğu bildirilmektedir [268]. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak, sonuçlarımız AA'nın indüklediği hepatik inflamasyonun hem Sham hem de

pinealektomi uygulanmış ratlarda NF- κ B ve proinflamatuvar sitokin düzeylerinde artış olduğunu kanıtladı; bununla birlikte, pinealektomili ratlarda endojen MLT'nin NF- κ B sinyal yolu üzerindeki modölatör etkilerinin olmaması nedeniyle AA'nın inflamatuvar etkileri, pinealektomize ratlarda daha belirgindi. NF- κ B ekspresyonundaki ve TNF- α seviyelerindeki bu değişiklikler, AA'ya maruz kalan rat karaciğerinde NF- κ B'nin aktivasyonuna ve proinflamatuvar sitokinlerdeki önemli artışa bağlıdır. Tersine, MLT'nin p-NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β ekspresyonunu azaltarak antiinflamatuvar etkiler gösterdiği iyi bilinmektedir [269]. Song vd çalışmasında, TNF- α ile muamele edilerek mitokondriyal stress yaratılan farelerde MLT tedavisinden sonra mitokondriyal ROT üretiminin azaldığı, mitokondriyal antioksidan seviyelerinin arttığı, mitokondriyal apoptozun bloke edildiği ve inflamasyon aracılı hepatik hasarın azaldığı bildirilmiştir [270]. Melatoninin, NF- κ B aktivasyonu sonucu proinflamatuvar sitokinlerin üretimi yoluyla hepatik inflamasyona neden olan AA üzerindeki antiinflamatuvar etkilerini analiz etmek için, NF- κ B'yi immünohistokimyasal olarak ve TNF- α seviyelerini ratlara spesifik ELİSA kitleri ile değerlendirdik. Literatür taramasına göre bu araştırma, pinealektomi uygulanmış ratlarda AA'nın neden olduğu hepatik inflamasyona karşı ekzojen MLT'nin düzenleyici etkilerini gösteren türünün ilk örneğidir. Bu çalışma, ekzojen MLT tedavisinin, Sham ve PNX ratlarda inflamasyonla ilişkili parametreleri azaltarak AA yoluyla tetiklenen hepatik inflamasyonu baskıladığını ortaya çıkardı. Ayrıca MLT takviyesi yoluyla inflamasyonun iyileştirilmesi Sham+AA ratlarda PNX+AA ratlara göre daha anlamlıydı. Gerçekten de, MLT'nin AA toksisitesinin neden olduğu hepatik hasar üzerindeki koruyucu etkilerini, inflamasyonun baskılanmasına nispeten atfedebileceğini doğruladık. Mevcut çalışma ile uyumlu olarak, morin [248], ellagik asit [271] allisin [272] ve krosinin [224] AA kaynaklı hepatotoksisiteye karşı inflamatuvar ilişkili proteinleri azaltarak, TNF- α IL-1 β ve IL-6 dahil olmak üzere inflamatuvar sitokin düzeylerini önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir. Li vd çalışmasında ratlarda 10 mg MLT takviyesinin NF- κ B yolunun inhibisyonunu sağladığı ve hemorajik şok olan ratlara göre karaciğer hasarının derecesinin,

hepatosit apoptoz oranının, TNF- α , IL-6 seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı, hepatik iskemik hasarın hafiflediği gözlemlenmiştir [273].

Hepatosellüler karsinom (HCC), kronik karaciğer iltihabı ve ardından fibroz veya sirozun ilerlemesi nedeniyle gelişmektedir. Çeşitli risk faktörleri HCC gelişimine katkıda bulunabilmekte ve histopatolojik olarak farklı preneoplastik lezyonlar/değişiklikler tarafından belirlenebilmektedir. Karaciğer lezyonları, kronik hepatoselüler hasar, inflamasyon, hepatositlerin dejenerasyonu/rejenerasyonu, nekroz ve minör hücresel displazi ile ilişkilidir. AA'nın ayrıca klastojenik ve mutajenik özelliklere sahip olduğu da bildirilmiştir [274]. Hamdy vd tarafından 2 ay boyunca 5 mg/kg/gün AA uygulanan ratların karaciğer histopatolojisinin, hepatositlerde vakuoller, portal ve periferik boşluklarda genişlemiş masif lenfosit infiltrasyonla uyumlu olduğu bildirilmiştir [249]. Jiang vd, AA'ya maruz kalan HepG2 hücrelerinin çekirdeklerinin, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8 OHdG) ile güçlü bir şekilde boyandığını gösterdiğini ve Comet analizi ile doza bağlı bir şekilde hücrelerde DNA hasarı sergilediğini bildirdi [275]. Ayrıca CYP2E1 aracılı AA'nın GA'ya dönüşümünün HepG2 hücrelerinde DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir. Tümör oluşumunun en belirgin özelliklerinden biri, hücre proliferasyonu ile apoptoz arasındaki dengenin bozulmasıdır ve bu da sonuçta tümör oluşumuna yol açabilmektedir. Ki-67'nin hücre döngüsü fazlarında, özellikle hepatoselüler karsinomlarda daha yüksek aktivite ile ilişkili olan G0 fazında ifade edilen karaciğerin hücre proliferasyonu ve karsinojenitesi için istisnai belirteçlerden biri olduğu bildirilmiştir [276]. Bu bağlamda Ki-67, tümör oluşumuna ve gelişimine neden olabilmektedir. AA kaynaklı hepatoselüler proliferasyon üzerinde apoptozun düzenlenmesi yoluyla MLT'nin anti-tümör etkilerini göstermek için, Ki-67 ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak analiz ettik. Son kanıtlar, MLT'nin hücre tipine bağlı olarak pro-oksidan özellikler gösterdiğini bildirmiştir. Bu bağlamda MLT, kanser hücreleri için pro-apoptotik olabileceği gibi normal hücreler için doza bağımlı bir şekilde anti-apoptotik olabilir [277]. Literatürle uyumlu olarak, ekzojen MLT takviyesinin Sham ve PNX ratlarında Ki-67 ekspresyonunu azaltarak

AA kaynaklı hepatoselüler proliferasyona karşı anti-tümör etkiler gösterdiğini gözlemledik.

AA'nın hepatotoksitesi hakkında daha fazla bilgi vermek için, bu çalışma AA'nın hepatoselüler hücrelerde vakuolizasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve nekrotik piknoz gibi belirgin histolojik değişikliklere neden olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar Kandemir vd [248] çalışmasıyla uyumludur; ancak, pinealektomize ratlarda AA ile tetiklenen hepatotoksite ilk kez çalışıldı ve yaralanmanın şiddeti, PNX+AA'da Sham+AA'ya göre daha yoğun olduğunu gözlemlendi. Öte yandan, AA'nın indüklediği hepatotoksitede ekzojen MLT uygulaması, karaciğer dokularını önemli ölçüde geri kazandırdı. Mevcut çalışma ile uyumlu olarak, Mousa vd [278] çalışması, AA kaynaklı hepatotoksitede MLT uygulaması ile karaciğer hasarının normale döndüğünü bildirdi. Yang vd. çalışmasında kadminyum ile oluşturulan karaciğer hasarının MLT uygulamasından sonra normal hücre morfoloji, daha az kanama ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu dahil olmak üzere karaciğer dokusunun patolojik değişikliklerini iyileştirdiğini gözlemlenmiştir [279].

Sonuç olarak, bu çalışma ekzojen MLT'nin fizyolojik melatonin yokluğunda AA kaynaklı hepatotoksiteyi azaltabileceğini kanıtlamaktadır. MLT'nin koruyucu etkisi, hasarlı hepatositler üzerindeki antioksidan, antiinflamatuvar ve antiproliferatif özellikleriyle açıklanabilir. Yaşın ilerlemesine bağlı olarak melatonin salgılanmasındaki azalma, antioksidan savunmanın azalmasına ve dolayısıyla bireyin oksidatif strese maruziyetini arttırmaktadır. Bu nedenle ileri yaş grubunun oksidatif stres ve hasarına karşı melatonin takviyesi kullanması gerekmektedir. Bununla birlikte, ekzojen MLT'nin oksidatif stres, inflamatuvar yanıt ve proliferasyon üzerindeki etki mekanizmalarını ve AA'nın neden olduğu hepatotoksiteyi takiben endojen MLT ile ilişkisini ortaya koymak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Savaş N., "Karaciğer fonksiyon testi bozukluğuna yaklaşım", *Turkish Family Physician*, 5(3): 1-7 (2014).
2. Armstrong, L. E. and Guo, G. L., "Understanding environmental contaminants' direct effects on non-alcoholic fatty liver disease progression", *Current Environmental Health Reports*, 6(3): 95-104 (2019).
3. Cornelisse-Vermaat, J. R., Pfaff, S., Voordouw, J., Chryssochoidis, G., Theodoridis, G., Woestman, L. and Frewer, L. J., "The information needs and labelling preferences of food allergic consumers: the views of stakeholders regarding information scenarios", *Trends in Food Science & Technology*, 19: 669-676 (2008).
4. Riboldi, B. P., Vinhas, A. M. and Moreira, J. D., "Risks of dietary acrylamide exposure: a systematic review", *Food Chemistry*, 157: 310-322 (2014).
5. Schouten, M. A., Tappi, S., Angeloni, S., Cortese, M., Caprioli, G., Vittori, S. and Romani, S., "Acrylamide formation and antioxidant activity in coffee during roasting-A systematic study", *Food Chemistry*, 343: 128514 (2021).
6. Liu, R., Sobue, T., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ishihara, J., Kotemori, A., Zha, L., Ikeda, S., Sawada, N., Iwasaki, M. and Tsugane, S., "Dietary acrylamide intake and risk of esophageal, gastric, and colorectal cancer: the Japan public health center-based prospective study", *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 28(9): 1461-1468 (2019).
7. Belhadj Benziane, A., Dilmi Bouras, A., Mezaini, A., Belhadri, A. and Benali, M., "Effect of oral exposure to acrylamide on biochemical and hematologic parameters in Wistar rats", *Drug and Chemical Toxicology*, 42(2): 157-166 (2019).
8. Sagan, D., Stpniak, J., Gesing, A., Lewinski, A. and Karbownik-Lewinska, M., "Melatonin reverses the enhanced oxidative damage to membrane lipids and improves skin biophysical characteristics in former-smokers- a study in postmenopausal women", *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(4): 659-666 (2017).
9. Jiang, Y., Shen, M., Chen, Y., Wei, Y., Tao, J. and Liu, H., "Melatonin represses mitophagy to protect mouse granulosa cells from oxidative damage", *Biomolecules*, 11:968 (2021).

10. González, M. A, del Carmen Contini, M., Millen, N. and Mahieu, S. T., "Role of melatonin in the oxidative damage prevention at different times of hepatic reeneration", *Cell Biochemistry and Function*, 30(8): 701-708 (2012).
11. Liu, Y., Wang, R., Zheng, K., Xin, Y, Jia, S. and Zhao, X., "Metabonomics analysis of liver in rats administered with chronic low-dose acrylamide", *Xenobiotica*, 50(8): 894-905 (2020).
12. Bin-Jumah, M. N., AL-Huqail, A. A., Abdelnaeim, N., Kamel, M., Fouda, M. M. A, Abdulmeaty, M. M. A., Saadeldin, I. M. and Abdel-Daim, M. M., "Potential protective effects of Spirulina platensis on liver, kidney, and brain acrylamide toxicity in rats", *Environmental Science and Pollution Research*, 28(21): 26653-26663 (2021).
13. Er, R., Aydın, B., Şekeroğlu, V. ve Şekeroğlu, Z. A., "Protective effect of argan oil on mitochondrial function and oxidative stress against acrylamide-induced liver and kidney injury in rats", *Biomarkers*, 25(6): 458-467 (2020).
14. Reiter, R. J., Tan, D. X. and Fuentes-Broto, L., "Melatonin: a multitasking molecule", *Progress in Brain Research*, 181: 127-151 (2010).
15. ElSayed, A. I., Rafudeen, M. S., Gomaa, A. M. and Hasanuzzaman, M., "Exoge-nous melatonin enhances the reactive oxygen species metabolism, antioxidant defense-related gene expression, and photosynthetic capacity of Phaseolus vulgaris L. to confer salt stress tolerance", *Physiologia Plantarum*, 173(4): 1369-1381 (2021).
16. Elmahallawy, E. K., Mohamed, Y., Abdo, W. and Yanai, T., "Melatonin and mesenchymal stem as a key for functional integrity for liver cancer treatment", *International Journal of Molecular Sciences*, 21:4521 (2020).
17. Meng, X., Li, Y., Li S., Zhou, Y., Gan, R. Y., Xu, D. P. and Li, H. B., "Dietary sources and bioactivities of melatonin", *Nutrients*, 9: 367 (2017).
18. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D. and Abete, P., "Oxidative stress, aging, and diseases" *Clinical Interventions in Aging*, 13:757-772 (2018).
19. Yan, F., Wei, H., Ding, Y., Li, W., Liu, Z., Chen, L., Tang, S., Ding, C., Jiang, Y. and Li, G., "Melatonin regulates antioxidant strategy in response to continuous salt stress in rice seedlings", *Plant Physiology and Biochemistry*, 165: 239-250 (2021).

20. Reiter, R. J., Tan, D X., Rosales-Corral, S., Galano, A., Zhou, X. J. and Xu, B., "Mitochondria: central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions", *Molecules*, 23(2): 509 (2018).
21. Mortezaee, K. and Khanlarkhani, N., "Melatonin application in targeting oxidative-induced liver injuries: a review", *Journal of Cellular Physiology*, 233(5): 4015-4032 (2018).
22. Colares, J. R., Hartmann, R. M., Schemitt, E. G., Fonseca, S. R. B., BRASIL, M. S., Picada, J. N., Dias, A. S., Bueno, A. F., Marroni, C. A. and Marroni, N. P., "Melatonin prevents oxidative stress, inflammatory activity, and DNA damage in cirrhotic rats", *World Journal Gastroenterol*, 28(3): 348-364 (2022).
23. Malarkey, D. E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G. and Maronpot, R. R., "New insights into functional aspects of liver morphology", *Toxicologic Pathology*, 33: 27-34 (2005).
24. Rui, L., "Energy metabolism in the liver", *Comprehensive Physiology*, 4(1): 177 (2014).
25. Oinonen, T. and Lindros, K. O., "Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation", *Biochemical Journal*, 329: 17-35 (1998).
26. Wallace, K., Burt, A. D. and Wright, M. C., "Liver fibrosis", *Biochemical Journal*, 411: 1-18 (2008).
27. Kubes, P. and Jenne, C., "Immune responses in the liver", *Annual Review of Immunology*, 36: 247-277 (2018).
28. Ben-Moshe, S. and Itzkovitz, S., "Spatial heterogeneity in the mammalian liver", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(7): 395-410 (2019).
29. Bilzer, M. and Roggel, F., "Role of kupffer cells in host defense and liver disease", *Liver International*, 26: 1175-1186 (2006).
30. Wheeler, M D., Kono, H., Yin, M., Nakagami, M., Uesugl, T., Arteel, G. E., Gäbele, E., Rusyn, I., Yamashina, S., Froh, M., Adachi, Y., Imuro, Y., Bradford, B. U., Smutney, O. M., Connor, H. D., Mason, R. P., Goyert, S. M., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Samulski, R. J. and Thurman, R. G., "The role of kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease", *Free Radical Biology & Medicine*, 31(12): 1544-1549 (2001).

31. Simeonova, P. P., Gallucci, R. M., Hulderman, T., Wilson, R., Kommineni, C., Rao, M. and Luster, M. I., "The role of tumor necrosis factor- α in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177: 112-120 (2001).
32. Ersoy, O., "Karaciğer enzim yüksekliğinin değerlendirilmesi", *Ankara Medical Journal*, 12(3): 129-135 (2012).
33. Kim, H. R. and Han, M. A., "Association between serum liver enzymes and metabolic syndrome in Korean adults", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15: 1658 (2018).
34. Sonsuz, A., "Karaciğer fonksiyon bozukluklarına klinik yaklaşım", *Sempozyum Dizisi*, 58: 69-78 (2007).
35. Malakouti, M., Kataria, A., Ali, S. K. and Schenker, S., "Elevated liver enzymes in asymptomatic patients- what should I do?", *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 5: 394-403 (2017).
36. Thapa, B. R. and Walia, A., "Liver function tests and their interpretation", *The Indian Journal of Pediatrics*, 74(7): 663-671 (2007).
37. Koyama, Y. and Brenner, D. A., "Liver inflammation and fibrosis", *The Journal of Clinical Investigation*, 127(1): 55-64 (2017).
38. Aydın M. M. and Akçalı, K. C., "Liver fibrosis", *Turkish Journal of Gastroenterology*, 29: 14-21 (2018).
39. Hernandez-Gea, V. and Friedman, S. L., "Pathogenesis of liver fibrosis", *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6: 425-456 (2011).
40. Brenner, C., Galluzzi, L., Kepp, O. and Kroemer, G., "Decoding cell death signals in liver inflammation", *Journal of Hepatology*, 59(3): 583-594 (2013).
41. Park, K., Williams, D. P., Naisbitt, D. J., Kitteringham, N. R. and Pirmohamed, M., "Investigation of toxic metabolites during drug development", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207: 425-434 (2005).
42. Al-Hajm, A. Y. S. and Ozgun, E., "Effects of acrylamide on protein degradation pathways in human liver-derived cells and the efficacy of N-acetylcysteine and curcumin", *Drug and Chemical Toxicology*, 1-8 (2020).
43. de Conti, A., Tryndyak, V., VonTungeln, L. S., Churchwell, M. I., Beland, F. A. and Antunes, A. M. M., "Genotoxic and epigenotoxic alterations in the lung

- and liver of mice induced by acrylamide: a 28 day drinking water study", *Chemical Research in Toxicology*, 32: 869-877 (2019).
44. Erdemli, M. E., Altinoz, E., Aksungur, Z., Turkoz, Y., Dogan, Z. ve Gozukara Bag, H., "Biochemical investigation of the toxic effects of acrylamide administration during pregnancy on the liver of mother fetus and the protective role of vitamin E", *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 30(7): 844-848 (2017).
 45. Imen, G., Elwej, A., Chaabene, M., Boudawara, O., Marrakchi, R., Jamoussi, K., Boudawara, T. S. and Zeghal, N., "Effects of acrylamide graded doses on metallothioneins I and II induction and DNA fragmentation: biochemical and hismorphological and histomorphological chenges in the liver of adult rats", *Toxicology and Industrial Health*, 33(8): 611-622 (2017).
 46. Marconi, O., Bravi E, E., Perretti, G., Martini, R., Montanari, L. and Fantozzi, P., "Acrylamide risk in food products: the shortbread case study", *Analytical Methods*, 2(11): 1686-1691 (2010).
 47. Matoso, V., Bargi-Souza, P., Ivanski, F., Romano, M. A. and Romano, R. M., "Acrylamide: a review about its toxic effects in the light of developmental origin of health and disease (DOHaD) concept", *Food Chemistry*, 283: 422-430 (2019).
 48. Semla, M., Martiniaková, M., Omelka, R. and Formickı, G., "Acrylamide: a common food toxin related to physiological functions and health", *Physiological Research*, 66:205-217 (2017).
 49. Andačić, I. M., Tot, A., Ivešić, M., Krivohlavek, A., Thirumdas, R., Barba, F. J., Sabolović, M. B., Kljusurić, J. G. and Brnčić, S. R., "Exposure of the Groatian adult population to acrylamide through bread and bakery products", *Food Chemistry*, 322: 126771 (2020).
 50. Mojska, H.,Gielecińska, I. and Cendrowski, A., "Acrylamide content in cigarette mainstream smoke and estimation of exposure to acrylamide from tobacco smoke in Poland" *Annals of Agricultural Environmental Medicine*, 23(3): 456-461 (2016).
 51. Kim, H., Lee, S. G. and Rhie, J., "Dermal and neural toxicity caused by acrylamide exposure in two Korean grouting workers: a case report", *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 29(1): 1-6 (2017).
 52. Arisseto, A. P., Toledo, M. C., Govaert, Y., Loco, J. V., Fraselle, S., Weverbergh, E. and Degroodt, j. M., "Determination of acrylamide levels in

- selected foods in Brazil", *Food Additives & Contaminants*, 24(3): 236-241 (2007).
53. Hogervorst, J. G., Schouten, L. J., Konings, E. J., Goldbohm, A. and Van Den Brandt, P. A., "A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and Breast Cancer", *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 16(11): 2304-2313 (2007).
 54. Dasarı, S., Ganjayı, M. S. and Meriga, B., "Glutathione S-transferase is a good biomarker in acrylamide induced neurotoxicity and genotoxicity", *Interdisciplinary Toxicology*, 11(2): 115-121 (2018).
 55. Halford, N. G., Curtis, T. Y., Muttucumaru, N., Postles, J., Elmore, J. S. and Mottram, D. S., "The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue", *Journal of Experimental Botany*, 63(8): 2841-2851 (2012).
 56. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. and Tärnqvist, M., "Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (17): 4998-5006 (2002).
 57. Kito, K., Ishihara, J., Yamamoto, J., Hosoda, T., Kotemori, A., Takachi, R., Nakamura, K., Tanaka, J., Yamaji, T., Shimazu, T., Ishii, Y., Sawada, N., Iwasaki, M., Iso, H., Sobue, T. and Tsugane, S., "Variations in the estimated intake of acrylamide from food in the Japanese population", *Nutrition Journal*, 19(1):1-9 (2020).
 58. EFSA., "Scientific opinion on acrylamide in food", *EFSA Journal*, 13(6): 4104 (2015).
 59. Kito, K., Ishihara, J., Kotemori, A., Zha, L., Liu, R., Sawada, N., Iwasaki, M., Sobue, T. and Tsugane, S., "Dietary acrylamide intake and the risk of pancreatic cancer: the Japan public health center-based prospective study", *Nutrients*, 12: 3584 (2020).
 60. Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z., Zhang, Y. and Ren, Y., "An improved method validation for rapid determination of acrylamide in food by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1142: 194-198 (2007)
 61. Adewale, O. O., Brimson, J. M., Odunola, O. A., Gbadegesin, M. A., Owumi, S. E., Isidoro, C. and Tencomnao, T., "The potential for plant derivatives against acrylamide neurotoxicity", *Phytotherapy Research*, 29: 978-985 (2015).

62. Fennell, T. R. and Friedman, M. A., "Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents", *Chemistry and Safety of Acrylamid in Food*, 561:109-116 (2005).
63. Kwolek-Mirek, M., Zadrag-Tecza, R., Bednarska, S. and Bartosz, G., "Yeast *Saccharomyces cerevisiae* devoid of Cu,Zn-superoxide dismutase as a cellular model to study acrylamide toxicity" *Toxicology in Vitro*,25: 573-579 (2011).
64. Paulsson, B., Rannug, A, Henderson, A. P., Golding, B. T., Törnqvist, M. and Warholm, M., "In vitro studies of the influence of glutathione transferases and epoxide hydrolase on the detoxification of acrylamide and glycidamide in blood", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1-2): 53-59 (2005).
65. Kim, T. H., Shin, S., Kim, K. B., Seo, W. S., Shin, J. C. Choi, J. H., Weon, K., Joo, S. H., Jeong, S. W. and Shin, B. S., "Determinatio of acryamide and glycisamide in various biological matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study", *Talanta*,131: 46-54 (2015).
66. Koszucka, A., Nowak, A., Nowak, I. and Motyl, I., "Acrylamide in human diet its metabolism, toxicity, inactivation and the associated European Union legal regulations in food industry", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,60(10): 1677-1692 (2020).
67. Hsu, C. H., Hou, C. Y., Lu, P. C., Chang-Chien, G. P., Lin, S. and Tain, Y. L., "Association between acylamide metabolites and cardiovascular risk in children with early stages of chronic kidney disease", " *Iternational Journal of Molecular Sciences*, 21(16): 5855 (2020).
68. Koszucka, A. and Nowak, A., "Thermal processing food-related toxicants: a review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(22): 3579-3596 (2019).
69. Kopp, E. K. and Dekant,W., "Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235: 135-142 (2009).
70. Eisenbrand, G., "Revisiting the evidence for genotoxicity of acrylamide (AA), key to risk assessment of dietary AA exposure", *Archives of Toxicology*, 94: 2939-2950 (2020).
71. Schettge, T., Küttig, B., Horig, M., Beckmann, M. W., Weiss, T., Drexler, H. and Angerer, J., "Tras-placental exposure of neonates to acrylamide-a pilot

- study”, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 77(3): 213-216 (2004).
72. Sörgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Haue, M., Skott, A. and Landersdorfer, C., "Acrylamide: increased concentrations in homemade foods and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans", *Chemotherapy*, 48: 267-274 (2002).
 73. Bušová, M., Bencko, V., Kromerová, K., Nadjo, I. and Babjaková, J., "Occurrence of acrylamide in selected food products", *Central European Journal of Public Health*, 28(4): 320-324 (2020).
 74. Schouten, M. A., Tappi, S. and Romani, S., "Acrylamide in coffee: formation and possible mitigation strategies – a review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(22): 3807-3821 (2020).
 75. Mollakhalili-Meybodi, N., Khorshidian, N., Nematollahi, A. and Arab, M., "Acrylamide in bread: a review on formation, health risk assessment, and determination by analytical techniques", *Environmental Science and Pollution Research*, 28: 15627-15645 (2021).
 76. Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B.L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P. and Villagran, M. D., "Acrylamide formation mechanism in heated foods", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4782-4787 (2003).
 77. Raffan, S., Oddy, J. and Halford, N. G., "The sulphur response in wheat grain and its implications for acrylamide formation and food safety", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11): 3876 (2020).
 78. Rifai, L. and Saleh, F. A., "A review of acrylamide in food: occurrence, toxicity, and mitigation strategies", *International Journal of Toxicology*, 39(2): 93-102 (2020).
 79. Maan, A. A., Anjum, M. A., Khan, M. K. I., Nazir, A., Saeed, F., Afzaal, M. and Aadil, R. M., "Acrylamide formation and different mitigation strategies during food processing- a review", *Food Reviews International*, 1-18 (2020).
 80. Michalak, J., Czarnowska-Kujawska, M., Klepacka, J. and Gujska, E., "Effect of microwave heating on the acrylamide formation in foods", *Molecules*, 25: 4140 (2020).
 81. Rayappa, M. K., Viswanathan, P. A., Rattu, G. and Krishna, P. M., "Nanomaterials enabled and bio/chemical analytical sensors for acrylamide

- detection in thermally processed foods: advances and outlook", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(16): 4578-4603 (2021).
82. Gökmen, V., Kocadağlı, T., Göncüoğlu, N. and Ataç Mogol, B., "Model studies on the role of 5-hydroxymethyl-2-furfural in acrylamide formation from asparagine", *Food Chemistry*, 132: 168-174 (2012).
 83. Hamzalıoğlu, A. ve Gökmen, V., "5-Hydroxymethylfurfural accumulation plays a critical role on acrylamide formation in coffee during roasting as confirmed by multiresponse kinetic modelling", *Food Chemistry*, 318:126467 (2020).
 84. Gökmen, V., Çetinkaya Açar, Ö., Köksel, H. ve Acar, J., "Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies", *Food Chemistry*, 104(3): 1136-1142 (2007).
 85. Jozinovi'c, A., Šarkanj, B., Ačkar, Đ., Balentić, J. P., Šubarić, D., Cvetković, T., Ranilović, J., Guberac, S. and Babić, J., "Simultaneous determination of acrylamide and hydroxymethylfurfural in extruded products by LC-MS/MS method", *Molecules*, 24(10): 1971 (2019).
 86. Das, A. B. and Srivastav, P. P., "Acrylamide in snack foods", *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(3): 163-169 (2012).
 87. Schouten, M. A., Tappi, S. and Romani, S., "Acrylamide in coffee: formation and possible mitigation strategies – a review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(22):3807-3821 (2020).
 88. Yaylayan, V. and Stadler, R. H., "Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective", *Journal of AOAC International*, 88(1): 262-267 (2005).
 89. Ölmez, H., Tuncay, F., Özcan, N. ve Demirel, S., "A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market", *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 564-568 (2008).
 90. Doerge, D. R., Young, J. F., Chen, J. J., Dinovi, M. J. and Henry, S. S., "Using dietary exposure and physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in human risk extrapolations for acrylamide toxicity", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 6031-6038 (2008).
 91. European Commission, "Commission Regulation (EU) 2017/2158 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food", *Official Journal of the European Union*, 304:24-44 (2017).

92. Khoshnam, F., Zargar, B., Pourreza, N. and Parham, H., "Acetone extraction and HPLC determination of acrylamide in potato chips", *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7(4): 853-858 (2010).
93. Ayvaz, H. and Rodriguez-Saona, L. E., "Application of handheld and portable spectrometers for screening acrylamide content in commercial potato chips", *Food Chemistry*, 174: 154-162 (2015).
94. Mesias, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F. and Morales, F. J., "Acrylamide in French fries prepared at primary school canteens", *Food & Function*, 11(2): 1489-1497 (2020).
95. Lim, H.H. and Shin, H. S., "A new derivatization approach with D-cysteine for the sensitive and simple analysis of acrylamide in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1361: 117-124 (2014).
96. Şenyuva, H. Z. ve Gökmen, V., "Survey of acrylamide in Turkish foods by an in-house validated LC-MS method", *Food Additives and Contaminants*, 22(3): 204-209 (2005).
97. Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R. H., Gondé, P., Eijck, P., Lalljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Müller, D., Tallmadge, D., O'Brien, J., Thomson, S., Silvan, D. and Whitmore, T., "A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 323-347 (2004).
98. Guenther, H., Anklam, E., Wenzl, T. and Stadler, R. H., "Acrylamide in coffee: review of progress in analysis, formation and level reduction", *Food Additives and Contaminants*, 24(S1): 60-70 (2007).
99. Başaran, B., Aydın, F. ve Kaban, G., "The determination of acrylamide content in brewed coffee samples marketed in Turkey", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(2): 280-287 (2020).
100. Akgün, B. ve Arıcı, M., "Evaluation of acrylamide and selected parameters in some Turkish coffee brands from the Turkish market", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36 (4): 548-560 (2019).
101. Endeshaw, H. and Belay, A., "Optimization of the roasting conditions to lower acrylamide content and improve the nutrient composition and antioxidant properties of Coffea arabica", *Plos One*, 15(8): e0237265 (2020).

102. Health Canada, "Health Canada's revised exposure assessment of acrylamide in food", *Bureau of Chemical Safety Food Directorate Health Products and Food Branch*, (2012).
103. Jeong, H., Hwang, S. and Kwon, H., "Survey for acrylamide in processed foods from Korean market and individual exposure estimation using a non-parametric probabilistic model", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(6): 916-930 (2020).
104. Mustafa, A., "Acrylamide in bread: precursors, formation and reduction", Doctoral Thesis, *Swedish University of Agricultural Sciences Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences*, Uppsala, (2008).
105. Boyacı Güdüz, C. P. ve Cengiz, M. F., "Acrylamide contents of commonly consumed bread types in Turkey", *International Journal of Food Properties*, 18: 833-841 (2015).
106. Hai Y. D., Tran-Lam, T.T., Nguyen, T. Q., Vu, N. D., Ma, K. H. and Le, G. T., "Acrylamide in Daily food in the metropolitan area of Hanoi, Vietnam" *Food Additives & Contaminants: Part B*, 12(3): 159-166 (2019).
107. Branciarri, R., Roila, R., Ranucci, D., Altissimi, M. S., Mercuri, M. L. and Haouet, N. M., "Estimation of acrylamide exposure in Italian schoolchildren consuming a canteen menu: health concern in three age groups", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 71(1): 122-131 (2019).
108. Seal, C. J., de Mu, A., Eisenbrand, G., Haverkort, A. J., Franke, K., Laljie, S. P. D., Mykkänen, H., Reimerdes, E., Scholz, G., Somoza, V., Tuijtelaars, S., van Bocker, M., van Klaveren, J., Wilcockson, S. J. and Wilms, L., "Risk-benefit considerations of mitigation measures on acrylamide content of foods- a case study on potatoes, cereals and coffee", *British Journal of Nutrition*, 99(S2): S1-S46 (2008).
109. Hilbig, A., Freidank, N., Kersting, M., Wilhelm, M. and Wittsiepe, J., "Estimation of the dietary intake of acrylamide by German infants, children and adolescents as calculated from dietary records and available data on acrylamide levels in food groups", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207: 463-471 (2004).
110. Food Agricultural Organization/World Health Organizations, "Safety evaluation of certain contaminants in food", Acrylamide, *Seventy-second Meeting of the Joint JECFA, Rome*, 1-151 (2011).

111. Matthys, C., Bilau, M., Govaert, Y., Moons, E., De Henauw, S. and Willems, J. L., "Risk assessment of dietary acrylamide intake in Flemish adolescents", *Food and Chemical Toxicology*, 43: 271-278 (2005).
112. Nematollahi, A., Kamankesh, M., Hosseini, H., Ghasemi, J., Hosseini-Esfahani, F., Mohammadi, A. and Mousavi Khaneghah, A., "Acrylamide content of collected food products from Tehran's market: a risk assessment study", *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 30558-30570 (2020).
113. Cieşlik, I., Cieşlik, E., Topolska, K. and Surma, M., "Dietary acrylamide exposure from traditional food products in Lesser Poland and associated risk assessment", *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 27(2): 225-230 (2020).
114. Buşov, M., Bencko, V., Laktiov, K. V., Holcatov, I. and Vargov, M., "Risk of exposure to acrylamide", *Central European Journal of Public Health*, 28: 43-46 (2020).
115. Abt, E., Robin, L. P., McGrath, S., Srinivasan, J., DiNovi, M., Adachi, Y. and Chirtel, S., "Acrylamide levels and dietary exposure from foods in the United States, an update based on 2011-2015 data", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(10): 1475-1490 (2019).
116. Alpozen, E. ve ren, A., "Determination of acrylamide levels of 'İzmir gevreği' and effects of cooking parameters on acrylamide formation", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(30): 7212-7218 (2013).
117. Timmermann, C. A. G, Molek, S. S., Kadawathagedara, M., Bjerregaard, A. A., Tornqvist, M., Brantseter, A. L. and Pedersen, M., "A review of dietary intake of acrylamide in humans", *Toxics*, 9:155 (2021).
118. Perera, D. N., Hewavitharana, G. G. and Navaratne, S. B., "Comprehensive study on the acrylamide content of high thermally processed foods", *Biomed Research International*, 2021 (2021).
119. Gokmen V. ve şenyuva, H. Z., "Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction", *Food Chemistry*, 103(1): 196-203 (2007).
120. Summa, C., Wenzl, T., Brohee, M., De La Calle, B. and Anklam, E., "Investigation of the correlation of the acrylamide content and the antioxidant activity of model cookies", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3): 853-859 (2006).

121. Bertuzzi, T., Martinelli, E., Mulazzi, A. and Rastelli, S., “Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagie and low molecular weight sugars”, *Food Chemistry*, 303: 125372 (2020).
122. Fredriksson, H., Tallving, J., Rosén, J. and Åman, P., “Fermentation reduces free asparagine in dough and acrylamide content in bread”, *Cereal Chemistry*, 81(5): 650-653 (2004).
123. Žilić, S., Dodig, D., Basić, Z., Vančetović, J., Titan, P., Đurić, N. and Tolimir, N., “The potential of cereals for acrylamide formation in the food: A comparison of species and genotypes for free asparagine and sugars content”, *Food Additives and Contaminants, Part A*, 34: 705-713 (2017).
124. Curtis, Y. T., Powers, J. S., Wanga, R. and Halford, G. N., “Effects of variety, year of cultivation and sulphur supply on the accumulation of free asparagine in the grain of commercial wheat varieties”, *Food Chemistry*, 239: 304-313 (2018).
125. Žilić, S., Gürsul Akdağ, I., Dodig, D., Filipovic, M. and Gökmen, V., “Acrylamide formation in biscuits made of different wholegrain flours depending on their free asparagine content and baking conditions”, *Food Research International*, 132: 109109 (2020).
126. Mesias, M., Morales, F. J. and Delgado-Andrade, C., “Acrylamide in biscuits commercialised in Spain. A view of the Spanish market from 2007 to 2019”, *Food & Function*, 10(10): 6624-6632 (2019).
127. Mestdagh, F., Maertens, J., Cucu, T., Delporte, K., Van Peteghem, C. and De Meulenaer, B., “Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms”, *Food Chemistry*, 107(1): 26-31 (2008).
128. Krishnakumar, T. and Visvabathan, R., “Acrylamide in food products: a review”, *Journal of Food Processing & Technology*, 5(7): 1000344 (2014).
129. Gökmen, V. and Palazoğlu, T. K., “Acrylamide formation in foods during thermal processing with a focus on frying”, *Food and Bioprocess Technology*, 1: 35-42 (2008).
130. Anese, M., Suman, M. and Nicoli, M. C., “Acrylamide removal from heated foods”, *Food Chemistry*, 119: 791-794 (2010).

131. Pan, M., Liu, K., Yang, J., Hong, L., Xie, X. and Wang, S., "Review of research into the determination of acrylamide in foods", **Foods**, 9(4): 524 (2020).
132. Matthäus, B., Haase, N. U. and Vosmann, K., "Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes", **European Journal of Lipid Science and Technology**, 106: 793-801 (2004).
133. Esposito, F., Fasano, E., De Vivo, A., Velotto, S., Sarghini, F. and Cirillo, T., "Processing effects on acrylamide content in roasted coffee production", **Food Chemistry**, 319: 126550 (2020).
134. Pennisi, M., Malaguarnera, G., Puglisi, V., Vinciguerra, L., Vacante, M. and Malaguarnera, M., "Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers", **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 10: 3843-3854 (2013).
135. Moorman, W. J., Reutman, S. S., Shaw, P. B., Blade, L. M., Marlow, D., Vesper, H., Clark, J. C. and Schrader, S. M., "Occupational exposure to acrylamide in closed system production plants: air levels and biomonitoring", **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 75: 100-111 (2012).
136. Tardiff, R. G., Gargas, M. L., Kirman, C. R., Carson, M. L. and Sweeney, L. M., "Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans", **Food and Chemical Toxicology**, 48: 658-667 (2010).
137. Horibata, K., Ukai, A. and Hanma, M., "Evaluation of mutagenicity of acrylamide using RBC pig-a PICRET assays by single peroral dose in rats", **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 811: 54-59 (2016).
138. Yu, D., Xie, X., Qiao, B., Ge, W., Gong, L., Luo, D., Zhang, D., Li, Y., Yang, B. and Kuang, H., "Gestational exposure to acrylamide inhibits mouse placental development in vivo", **Journal of Hazardous Materials**, 367: 160-170 (2019).
139. Lindeman, B., Johansson, Y., Andreassen, M., Husøy, T., Dirven, H., Hofer, T., Knutsen, H. K., Caspersen, I. H., Vejrup, K., Paulsen, R. E., Alexander, J., Forsby, A. and Myhre, O., "Does the food processing contaminants acrylamide cause developmental neurotoxicity? A review and identification of knowledge gaps", **Reproductive Toxicology**, 101: 93-114 (2021).
140. 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: 29-36 (2011).

141. Abdel-Daim, M M., Abo El-Ela, F I., Alshahrani, F. K., Bin-Jumah, M., Al-Zharani, M., Almutairi, B., Alyousif, M. S., Bungau, S., Aleya, L. 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).
142. Allam, A. A., El-Ghareeb, A. W., Abdul-Hamid, M., Bakery, A. E., ad, M. and Sabri, M., "Effect of prenatal and perinatal acrylamide on the biochemical and morphological changes in liver of developing albino rat", *Archives of Toxicology*, 84(2): 129-141 (2010).
143. Eicher, A., Biedermann, M., Suter, G., Felder, F., Biedermann-Brem, S., Stalder, U. and McCombie, G., "Exposure to acrylamide from home-cooked food: fried potatoes (rösti) in Switzerland as an example", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(12): 2061-2069 (2020).
144. Viklund, G. Å., Olsson, K. M., Sjöholm, I. M. and Skog, K. I., "Variety and storage conditions affect the precursor content and amount of acrylamide in potato crisps", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 305-312 (2008).
145. Medeiros Vinci, R., Mestdagh, F., Van Poucke, C., Kerkaert, B., De Muer, N., Denon, Q., Van Peteghem, C. and De Meulenaer, B., "Implementation of acrylamide mitigation strategies on industrial production of French fries: challenges and pitfalls", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 898-906 (2011).
146. Morales, F., Capua, E. and Fogliano, V., "Mitigation strategies to reduce acrylamide formation in fried potato products", *Annals of the New York Academy of Science*, 1126(1): 89-100 (2008).
147. Taher, I. B. and Hassouna, M., "Reduction of acrylamide formation in bread by lactic acid bacteria and Nigella sativa oil", *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, 3: 653-658 (2016).
148. Akilloğlu, H. G. and Gökmen, V., "Mitigation of acrylamide and hydroxymethyl furfural in instant coffee by yeast fermentation", *Food Research International*, 61: 252-256 (2014).
149. Qi, J. H. and Dong, F. X., "The relevant targets of anti-oxidative stress: a review", *Journal of Drug Targeting*, 29(7): 677-686 (2021).

150. Liang, B., Zhu, Y. C., Lu, J. and Gu, N., "Effects of traditional chinese medication-based bioactive compounds on cellular and molecular mechanisms of oxidative stress", *oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (2021).
151. Birben, E., Şahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O., "Oxidative stress and antioxidant defense", *World Allergy Organization Journal*, 5(1): 9-19 (2012).
152. Hwang, I., Tang, D. and Paik, J., "Oxidative stress sensing and response in neural stem cell fate", *Free Radical Biology and Medicine*, 169: 71-83 (2021).
153. Ensminger, D. C., Salvador-Pascual, A., Arango, B. G., Allen, K. N. and Vázquez-Medina, J. P., "Fasting ameliorates oxidative stress: a review of physiological strategies across life history events in wild vertebrates", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 256: 110929 (2021).
154. Chiaradia, E., Tancini, B., Emiliani, C., Deo, F., Pellegrino, R. M., Tognoloni, A., Urbanelli, L. and Buratta, S., "Extracellular vesicles under oxidative stress conditions: biological properties and physiological roles", *Cells*, 10(7): 1763 (2021).
155. Curpan, A. S., Luca, A. C. and Ciobica, A., "Potential novel therapies for neurodevelopmental diseases targeting oxidative stress", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (2021).
156. Finaud, J., Lac, G. and Filaire, E., "Oxidative stress", *Sports Medicine*, 36(4): 327-358 (2006).
157. Phaniendra, A., Babu Jestadi, D. and Periyasamy, L., "Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1): 11-26 (2015).
158. Valaei, K., Taherkhani, S., Arazi, H. and Suzuki, K., "Cardiac oxidative stress and the therapeutic approaches to the intake of antioxidant supplements and physical activity", *Nutrients*, 13(10): 3483 (2021).
159. Forman, H. J. and Zhang, H., "Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy" *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(9): 689-709 (2021).
160. Zhao, M. J., Yuan, S., Zi, H., Gu, J. M., Fang, C. and Zeng, X. T., "Oxidative stress links aging-associated cardiovascular diseases and prostatic diseases", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (2021).

161. Murray, M., Selby-Pham, S., Colton, B. L., Bennett, L., Williamson, G. and Dordevic, A. L., "Does timing of phytonutrient intake influence the suppression of postprandial oxidative stress? A systematic literature review" *Redox Biology*, 46: 102123 (2021).
162. Mohiti, S., Zarezadeh, M., Naeini, F., Tutunchi, H., Ostadrahimi, A., Ghoreishi, Z. and Mamaghani, M. E., "Spirulina supplementation and oxidative stress and pro-inflammatory biomarkers: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48(8): 1059-1069 (2021).
163. Hajam, Y. a., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheih, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S. and Reshi, M. S., "Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives", *Cells*, 11(3): 552 (2022).
164. Mehdi, M. M., Solanki, P. and Singh, P., "Oxidative stress, antioxidants, hormesis and calorie restriction: the current perspective in the biology of aging", *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 95: 104413 (2021).
165. Zhu, R., Wang, Y., Zhang, L. and Guo, Q., "Oxidative stress and liver disease", *Hepatology Research*, 42(8): 741-749 (2012).
166. Ghorbel, I., Maktouf, S., Kallel, C., Chaabouni, S. E., Boudawara, T. and Zeghal, N., "Disruption of erythrocyte antioxidant defense system, hematological parameters, induction of pro-inflammatory cytokines and DNA damage in liver of co-exposed rats to aluminium and acrylamide", *Chemico-Biological Interactions*, 236: 31-40 (2015).
167. Ramos-Tovar, E. and Muriel, P., "Free radicals, antioxidants, nuclear factor-E2-related factor-2 and Liver damage", *Journal of Applied Toxicology*, 40(1): 151-168 (2020).
168. Begum, R., Howlader, S., Mamun-Or-Rashid, A. N. M., Rafiquzzaman, S. M., Ashraf, G. M., Albadrani, G. M., Sayed, A. A., Peluso, H., Abdel-Daim, M. M. and Uddin, M. S., "Antioxidant and signal-modulating effects of Brown seaweed-derived compounds against oxidative stress-associated pathology", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (2021).
169. Davidovic, L. M., Laketic, D., Cumic, J., Jordanova, E. and Pantic, I., "Application of artificial intelligence for detection of chemico-biological interactions associated with oxidative stress and DNA damage", *Chemico-Biological Interactions*, 345: 109533 (2021).

170. Ďuračková, Z., "Some current insights into oxidative stress" *Physiological Research*, 59: 459-469 (2010).
171. Oztopuz, O., Turkon, H., Buyuk, B., Coskun, O., Sehitoglu, M. H., Ovall, M. A. and Uzun, M., "Melatonin ameliorates sodium valproate-induced hepatotoxicity in rats" *Molecular Biology Reports*, 47(1): 317-325 (2020).
172. Reiter, R. J., Rosales-Corral, S., Tan, D. X., Jou, M. J., Galano, A. and Xu, B., "Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(21): 3863-3881 (2017).
173. Tian, R., Geng, Y., Yang, Y., Seim, I. and Yang, G., "Oxidative stress drives divergent evolution of the glutathione peroxidase (GPX) gene family in mammals", *Integrative Zoology*, 16(5): 696-711 (2021).
174. Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T. and Tew, K. D., "Oxidative stress in cancer", *Cancer Cell*, 38(2): 167-197 (2020).
175. Fujii, J., Homma, T., Kobayashi, S., Warang, P., Madkaikar, M. and Mukherjee, M. B., "Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood", *Free Radical Research*, 55(8): 781-799 (2021).
176. Wang, Y., Zhang, S., Ma, Y., Xiang, A., Sun, H., Song, J., Yang, W., Li, X. and Xu, H., "Melatonin protected against myocardial infarction injury in rats through a Sirt6-dependent antioxidant pathway" *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 31(3): 277-284 (2022).
177. Nishimura, Y., Kanda, Y., Sone, H. and Aoyama, H., "Oxidative stress as a common key event in developmental neurotoxicity", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (2021).
178. Mates, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J. and Marquez, J., "Sulphur-containing non enzymatic antioxidants: therapeutic tools against cancer", *Frontiers in Bioscience-Scholar*, 4(2): 722-748 (2012).
179. Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M. and Zujko, M. E., "Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body", *Advances in Medical Sciences*, 63: 68-78 (2018).
180. Mannino, G., Pernici, C, Serio, G., Centile, C. and Berteà, C. M., "Melatonin and phytemelatonin: chemistry, biosynthesis, metabolism, distribution and bioactivity in plants and animals-an overview", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18): 9996 (2021).

181. Galano, A., Guzmán-López, E. G. and Reiter, R. J., "Potentiating the benefits of melatonin through chemical functionalization: possible impact on multifactorial neurodegenerative disorders", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21): 11584 (2021).
182. Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D. X. and Reiter, R. J., "Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(16): 2997-3025 (2014).
183. Bhattacharya, S., Patel, K. K., Dehari, D., Agrawal, A. K. and Singh, S., "Melatonin and its ubiquitous anticancer effects", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 462(1): 133-155 (2019).
184. Chen, L., Zhou, T., Wu, N., O'Brien, A., Venter, J., Ceci, L., Kyritsi, K., Onori, P., Gaudio, E., Sybenga, A., Xie, L., Wu, C., Fabris, L., Invernizzi, P., Zawieja, D., Liangpunsakul, S., Meng, F., Francis, H., Alpini, G., Huang, Q. and Glaser, S., "Pinealectomy or light exposure exacerbates biliary damage and liver fibrosis in cholestatic rats through decreased melatonin synthesis", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Basis of Disease*, 1865(6): 1525-1539 (2019).
185. Fuentes-Broto, I., Perdices, L., Segura, F., Orduna-Hospital, E., Insa-Sánchez-Cano, A. I., Cuenca, N. and Pinilla, I., "Effects of Daily melatonin supplementation on visual loss, circadian rhythms, and hepatic oxidative damage in a rodent model of retinitis pigmentosa", *Antioxidants*, 10:1853 (2021).
186. Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C. and Sainz, R. M., "Melatonin and reproduction revisited", *Biology of Reproduction*, 81: 445-456 (2009).
187. Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N. and Fougere, C., "Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits", *Current Neuropharmacology*, 15: 434-443 (2017).
188. Reiter, R. J., "Melatonin: clinical relevance", *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(2): 273-285 (2003).
189. Carpentieri, A., De Barboza, G. D., Areco, V., López, M. P. and De Talamoni, N. T., "New perspectives in melatonin uses", *Pharmacological Research*, 65: 437-444 (2012).
190. Ashrafzadeh, M., Najafi, M., Kavyiani, N., Mohammadinejad, R., Farkhondeh, T. and Samarghandian, S., "Anti-inflammatory activity of melatonin: a focus

- on the role of NLRP3 inflammasome", *Inflammation*, 44(4): 1207-1222 (2021).
191. Marhuenda, J., Villaño, D., Arcusa, R. and Zafrilla, P., "Melatonin in wine and beer: beneficial effects", *Molecules*, 26: 343 (2021).
 192. Reiter, R J., "Melatonin and human reproduction", *Annals of Medicine*, 30(1): 103-108 (1998).
 193. Hardeland, R., "Melatonin, its metabolites and their interference with reactive nitrogen compounds", *Molecules*, 26: 4105 (2021).
 194. Sato, K., Meng, F., Francis, H., Wu, N., Chen, L., Kennedy, L., Zhou, T., Franchitto, A., Onori, P., Gaudio, E., Glaser, S. and Alpini, G., "Melatonin and circadian rhythms in liver diseases: functional roles and potential therapies", *Journal Pineal Research*, 68(3): e12639 (2020).
 195. Hardeland, R., "Melatonin and microglia", *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 8296 (2021).
 196. Markus, R. P., Sousa, K. S., da Silveira Cruz-Machado, S., Fernandes, P. A. and Ferreira, Z. S., "Possible role of pineal and extra-pineal melatonin in surveillance, immunity, and first-line defense", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22): 12143 (2021).
 197. Nikolaev, G., Robeva, R. and Konakchieva, R., "Membrane melatonin receptors activated cell signaling in physiology and disease", *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 471 (2022).
 198. Ezzati, M., Velaei, K. and Kheirjou, R., "Melatonin and its mechanism of action in the female reproductive system and related malignancies", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(8): 3177-3190 (2021).
 199. Marqueze, E. C., Nogueira, L. F., Vetter, C., Skene, D. J., Cipolla-Neto, J. and Moreno, C. R., "Exogenous melatonin decreases circadian misalignment and body weight among early types", *Journal of Pineal Research*, 71(2): e12750 (2021).
 200. Schrire, Z. M., Phillips, C. L., Chapman, J. L., Duffy, S. L., Wong, G., D'Rozario, A. L., Comas, M., Raisin, I., Saini, B., Gordon, C. J., McKinnon, A. C., Naismith, S. L., Marshall, N. S., Grunstein, R. R. and Hoyos, C. M., "Safety of higher doses of melatonin in adults: a systematic review and meta-analysis", *Journal of Pineal Research*, 72(2): e12782 (2022).

201. Fatemeh, G., Sajjad, M., Niloufar, R., Neda, S., Leila, S. and Khadijeh, M., "Effect of melatonin supplementation on sleep quality: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials", *Journal of Neurology*, 1-12 (2021).
202. Abreu, K. O., Cipolla-Neto, J. and Cardoso, J. H. L., "Effects of melatonin on diabetic neuropathy and retinopathy", *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1): 1-14 (2022).
203. Anisimov, V. N., Popovich, I. G., Zabezhinski, M. A., Anisimov, S. V., Vesnushkin, G. M. and Vinogradova, I. A., "Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen", *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Bioenergetic*, 1757: 573-589 (2006).
204. Mohammadi, S., Rastmanesh, R., Jahangir, F., Amiri, Z., Djafarian, K., Mohsenpour, M. A., Hassanipour, S. and Ghaffarian-Bahraman, A., "Melatonin supplementation and anthropometric indices: a randomized double-blind controlled clinical trial", *BioMed Research International*, (2021).
205. Reiter, R. J., Sharma, R., Simko, F., Dominguez-Rodriguez, A., Tesarik, J., Neel, R. L., Slominski, A. T., Kleszczynski, K., Martin-Gimenez, V. M., Manucha, W. and Cardinali, D. P., "Melatonin: highlighting its use as a potential treatment for SARS-CoV-2 infection", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79:143 (2022).
206. Karadağ Sarı, E. Ç. and Savacı, N., "The effects of melatonin on the healing of burn wounds in pinealectomized rats", *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 27(4): 395-401 (2021).
207. Tan, D. X. and Hardeland, R., "The reserve/maximum capacity of melatonin's synthetic function for the potential dimorphism of melatonin production and its biological significance in mammals", *Molecules*, 26: 7302 (2021).
208. Kolodziejczyk, I., Kaźmierczak, A. and Posmyk, M. M., "Melatonin application modifies antioxidant defense and induces endoreplication in maize seeds exposed to chilling stress", *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 8628 (2021).
209. Kruk, J., Aboul-Enein, B. H. and Duchnik, E., "Exercise-induced oxidative stress and melatonin supplementation: current evidence", *The Journal of Physiological Sciences*, 71(1): 1-19 (2021).

210. Johns, J. R. and Platts, J. A., "Theoretical insight into the antioxidant properties of melatonin and derivatives", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12: 7820-7827 (2014).
211. Esteban-Zubero, E., García-Gil, F. A., López-Pingarrón, L., Alatorre-Jiménez, M. A., Ramírez, J. M., Tan, D. X., García, J. J. and Reiter, R. J., "Melatonin role preventing steatohepatitis and improving liver transplantation results", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(15): 2911-2927 (2016).
212. Reina, M. and Martínez, A., "A new free radical scavenging cascade involving melatonin and three of its metabolites (3OHM, AFMK and AMK)", *Computational and Theoretical Chemistry*, 1123: 111-118 (2018).
213. Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J. and Reiter, R. J., "One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?", *Journal of Pineal Research*, 42: 28-42 (2007).
214. Manchester, L. C., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Andersen, L. P. H., Zhou, Z., Galano, A., Vriend, J., Tan, D. X. and Reiter, R. J., "Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable", *Journal of Pineal Research*, 59: 403-419 (2015).
215. Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M. and Qin, L., "Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers", *Journal of Pineal Research*, 61: 253-278 (2016).
216. Hajam, Y. A. and Rai, S., "Melatonin and insulin modulates the cellular biochemistry, histoarchitecture and receptor expression during hepatic injury in diabetic rats", *Life Sciences*, 239: 117046 (2019).
217. Imran, M., Khan, M. A., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, M., Yun, B. W., Khan, A. L. and Lee, I. J., "Melatonin ameliorates thermotolerance in soybean seedling through balancing redox homeostasis and modulating antioxidant defense, phytohormones and polyamines biosynthesis", *Molecules*, 26: 5116 (2021).
218. Martínez Soriano, B., Remes, A., Pola, G., Gonzalo, A., Gasós, P. P., Navarro, A. C., Martínez-Beamonte, R., Osada, J. and García, J. J., "Effect of melatonin as an antioxidant drug to reverse hepatic steatosis: experimental model", *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, (2020).
219. Bonomini, F., Borsani, E., Favero, G., Rodella, L. F. and Rezzani, R., "Dietary melatonin supplementation could be a promising preventing/therapeutic approach for a variety of liver diseases", *Nutrients*, 10:1135 (2018).

220. Gao, Y., Li, Z. T., Jin, L., Lin, J., Fan, Z. L., Zeng, Z. and Huang, H. F., "Melatonin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting NF- κ B signaling pathway", *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 20(6): 551-560 (2021).
221. Novais, A. A., Chuffa, L. G. D. A., Zuccari, D. A. P. D.C. and Reiter, R. J., "Exosomes and melatonin: where their destinies intersect", *Frontiers in Immunology*, 12: 692022 (2021).
222. Zhang, J. J., Meng, X., Li, Y., Zhou, Y, Xu, D. P., Li, S. and Li, H. B., "Effects of melatonin on liver injuries and diseases", *International Journal of Molecular Sciences*, 18:673 (2017).
223. Oleshchuk, O., Ivankiv, Y., Falfushynska, H., Mudra, A. and Lisnychuk, N., "Hepatoprotective effect of melatonin in toxic liver injury in rats", *Medicina*, 55:304 (2019).
224. Gedik, S., Erdemli, M. E., Gul, M., Yigitcan, B., Bag, H. G., Aksungur, Z. and Altınöz, E., "Hepatoprotective effects of crocin on biochemical and histopathological alternations following acrylamide-induced liver injury in Wistar rats", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95: 764- 770 (2017).
225. 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 of Physiology and Pharmacology*, 66(4): 567-579 (2015).
226. Demir, M., Yilmaz, U., Colak, C., Cigremis, Y., Ozyalin, F., Tekedereli, I., Kilineli, A. and Sandal, S., "The effects of lack of melatonin in experimental rat model of Alzheimer's Disease: relationship with FEZ1 gene expression", *Medicine Science*, 6(2): 217-223 (2017).
227. Chamorro, V., Pandolfi, R., Moreno, L., Barreira, B., Martínez-Ramas, A., Morales-Cano, D., Ruiz-Cabello, J., Lorente, J. A., Duarte, J., Cogolludo, Á., Alvarez-Sala, J. L. and Perez-Vizcaino, F., "Effects of quercetin in a rat model of hemorrhagic traumatic shock and reperfusion", *Molecules*, 21(12): 1739 (2016).
228. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358 (1979).
229. Ellman, G. L., "Tissue sulfhydryl groups", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77 (1959).

230. Sun, Y., Oberley, L. W. and Li, Y., "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase", *Clinical Chemistry*, 34(3): 497-500 (1988).
231. Aebi, H., "Catalase", *In Methods of Enzymatic Analysis*, Academic 9: 673-684 (1974).
232. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., "Protein measurement with the folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275 (1951).
233. Erel, O., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status", *Clinical Biochemistry*, 38: 1103-1111 (2005).
234. Erel, O., "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation", *Clinical Biochemistry*, 37: 277-285 (2004).
235. Luo, Y. S., Long, T. Y., Chiang, S. Y. and Wu, K. Y., "Characterization of primary glutathione conjugates with acrylamide and glycidamide: Toxicokinetic studies in Sprague Dawley rats treated with acrylamide", *Chemico-Biological Interactions*, 350:109701 (2021).
236. Kopańska, M., Lukác, N., Kapusta, E. and Formicki, G., "Acrylamide influence on activity of acetylcholinesterase, thiol groups, and malondialdehyde content in brain of swiss mice", *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 29(10): 472-478 (2015).
237. Ge, W., Wang, T., Zhao, Y., Yang, Y., Sun, Q., Yang, X., Gao, Y., Xu, X. and Zhang, J., "Period1 mediates rhythmic metabolism of toxins by interacting with CYP2E1", *Cell Death & Disease*, 12(1): 1-13 (2021).
238. Sumner, S.C., Williams, C. C., Snyder, R. W., Krol, W. L., Asgharian, B. and Fennell, T. R., "Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure", *Toxicological Sciences*, 75(2): 260-270 (2003).
239. Ghanayem, B.I., Wang, H. and Sumner, S., "Using cytochrome P-450 gene knock-out mice to study chemical metabolism, toxicity, and carcinogenicity", *Toxicologic Pathology*, 28(6): 839-850 (2000).
240. Elhelaly, A. E., AlBasher, G., Alfarraj, S., Almeer, R., Bahbah, E. I., Fouda, M. M. A., Bungău, S. G., Aleya, L. and Abdel-Daim, M. M., "Protective effects of hesperidin and diosmin aains acrylamide-induced liver, kidney, and brain

- oxidative damage in rats", *Environmental Science and Pollution Research*, 26(34): 35151-35162 (2019).
241. Jiang, G., Lei, A., Chen, Y., Yu, Q., Xie, J., Yang, Y., Yuan, T. 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).
242. Hong, Z., Minghua, W., Bo, N., Chaoyue, Y., Haiyan, Y., Haiqing, Y., Chunyu, X., Yan, Z. and Yuan, Y., "Rosmarinic acid attenuates acrylamide induced apoptosis of BRL-3A cells by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress", *Food and Chemical Toxicology*, 151:112156 (2021).
243. Donmez, D. B., Kacar, S., Bagci, R. and Sahinturk, V., "Protective effect of carnosic acid on acrylamide-induced liver toxicity in rats: mechanistic approach over Nrf2-Keap1 pathway", *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34(9): e22524 (2020).
244. Acaroz, U., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Gurler, Z., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Arslan, H. O., Varol, N. and Zhu, K., "The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats", *Food and Chemical Toxicology*, 118: 745-752 (2018).
245. Haida, Z. and Hakiman, M., "A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities", *Food Science & Nutrition*, 7(5): 1555-1563 (2019).
246. Sun, R., Liu, M., Xu, K., Pu, Y., Huang, J., Liu, J., Zhang, J., Yin, L. and Pu, Y., "Ferroptosis is involved in the benzene-induced hematotoxicity in mice via iron metabolism, oxidative stress and NRF2 signaling pathway", *Chemico-Biological Interactions*, 110004 (2022).
247. Wu, B., Chai, X., He, A., Huang, Z., Chen, S., Rao, P., Ke, L. and Xiang, L., "Inhibition of acrylamide toxicity in vivo by arginine-glucose maillard reaction products", *Food and Chemical Toxicology*, 154: 112315 (2021).
248. Kandemir, F. M., Yıldırım, S., Kucukler, S., Caglayan, C., Darendelioğlu, E. and Dortbudak, M. B., "Protective effects of morin against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity: a multi-biomarker approach" *Food and Chemical Toxicology*, 138: 111190 (2020).
249. Hamdy, S. M., El-Khayat, Z., Farrag, A. R., Sayed, O. N., El-Sayed, M. M. and Massoud, D., "Hepatoprotective effect of raspberry ketone and white tea

- against acrylamide-induced toxicity in rats", *Drug and Chemical Toxicology*, 45(2): 722-730 (2022).
250. Uthra, C., Reshi, N. S., Jaswal, A., Yadav, D., Shrivastava, S., Sinha, N. and Shukla, S., "Protective efficacy of rutin against acrylamide-induced oxidative stress, biochemical alterations and histopathological lesions in rats", *Toxicology Research*, 11(1): 215-225 (2022).
 251. 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).
 252. Huo, X., Wang, C., Yu, Z., Peng, Y., Wang, S., Feng, S., Zhang, S., Tian, X., Sun, C., Liu, K., Deng, S. and Ma, X., "Human transporters, PEPT 1/2, facilitate melatonin transportation into mitochondria of cancer cells: an implication of the therapeutic potential", *Journal of Pineal Research*, 62(4): e12390 (2017).
 253. Öz, E. and İlhan, M. N., "Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 286: 11-15 (2006).
 254. Coşkun Akçay, N., Ömeroğlu, S., Akarca Dizakar, S. Ö., Kavutçu, M., Türkoğlu, İ., Eşmekaya, M. A. and Peker, T. V., "The effects of melatonin on possible damage that will occur on adipocytokines and liver tissue by coadministration of fructose and bisphenol a (BPA)", *Environmental Science and Pollution Research*, 27(14): 16231-16245 (2020).
 255. Foroutanfar, A., Mehri, S., Kamyar, M., Tandisehpanah, Z. and Hosseinzadeh, H., "Protective effect of punicalagin, the main polyphenol compound of pomegranate, against acrylamide-induced neurotoxicity and hepatotoxicity in rats", *Phytotherapy Research*, 34(12): 3262-3272 (2020).
 256. Lebda, M. A., Sadek, K. M., Abouzed, T. K., Tohamy, H. G. and El-Sayed, Y. S., "Melatonin mitigates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via antioxidant activity and modulation of proinflammatory cytokines and fibrogenic genes", *Life Sciences*, 192: 136-143 (2018).
 257. Rezayat, A. A., Nour, M. ., Bondarsahebi, Y., Hozhabrossadati, S. A., Amirkhanlou, F., Rezayat, S. A., Kiani, M. and Imani, B., "The effects of melatonin therapy on the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis on clinical trial studies", *European Journal of Pharmacology*, 905: 174154 (2021).

258. He, Y., Tan, D., Mi, Y., Zhou, Q. and Ji, S., "Epigallocatechin-3-gallate attenuates cerebral cortex damage and promotes brain regeneration in acrylamide-treated rats", *Food & Function*, 8(6): 2275-2282 (2017).
259. Mohiuddin, M. and Kasahara, K., "The emerging role of oxidative stress in complications of COVID-19 and potential therapeutic approach to diminish oxidative stress", *Respiratory Medicine*, 187:106605 (2021).
260. Buelna-Chontal, M. and Zazueta, C., "Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: a double and sword?", *Cellular Signalling*, 25(12): 2548-2557 (2013).
261. Karin, M., Yamamoto, Y. and Wang, Q. M., "The IKK NF- κ B system: a treasure trove for drug development", *Nature Reviews Drug Discovery*, 3: 17-26 (2004).
262. Jung, K. H., Hong, S. W., Zheng, H. M., Lee, D. H. and Hong, S. S., "Melatonin down regulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappa B during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model", *Journal of Pineal Research*, 47: 173-1183 (2009).
263. Jung, K. H., Hong, S. W., Zheng, H. M., Lee, S. Y. and Hong, S. S., "Melatonin ameliorates cerulein-induced pancreatitis by the modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappa B in rats", *Journal of Pineal Research*, 48: 239-250 (2010).
264. Li, Z., Nickkholgh, A., Yi, X., Bruns, H., Gross, M. L., Hoffmann, K., Mohr, E., Zorn, M. and Büchler, M. W., "Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF- κ B and apoptosis after experimental kidney transplantation", *Journal of Pineal Research*, 46: 365-372 (2009).
265. Tripathi, D. and Jena, G., "Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF- κ B during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat", *Journal of Pineal Research*, 48: 324-331 (2010).
266. Temel, Y., Kucukler, S., Yildirim, S., Calayan, C. and Kandemir, F. M., "Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis", *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(3): 325-337 (2020).
267. Fadda, L. M., Ali, H. M., Mohamed, A. M. and Hagar, H., "Prophylactic administration of carnosine and melatonin abates the incidence of apoptosis, inflammation, and DNA damage induced by titanium dioxide nanoparticles in

- rat livers", *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16): 19142-19150 (2020).
268. Alturfan, A. A., Tozan-Beceran, A., Şehirli, A. Ö., Demiralp, E., Şener, G. and Omurtag, . Z., "Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats", *Molecular Biology Reports*, 39(4): 4589-4596 (2012).
 269. Zakria, M., Ahmad, N., Al Kury, L. T., Alattar, A., Uddin, Z., Siraj, S., Ullah, S., Alshaman, R., Khan, M. I. 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).
 270. Song, J., Lu, C., Zhao, W. and Shao, X., "Melatonin attenuates TNF- α -mediated hepatocytes damage via inhibiting mitochondrial stress and activating the Akt-Sirt3 signaling pathway", *Journal of Cellular Physiology*, 234(11): 20969-20979 (2019).
 271. Karimi, M. Y., Fatemi, I., Kalantari, H., Mombeini, M. A., Mehrzadi, S. and Goudarzi, M., "Ellagic acid prevents oxidative stress, inflammation, and histopathological alterations in acrylamide-induced hepatotoxicity in wistar rats", 17(6): 651-662 (2020).
 272. Nan, B., Yang, C., Li, L., Ye, H., Yan, H., Wang, M. and Yuan, Y., "Allicin alleviated acrylamide-induced NLRP3 inflammasome activation via oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in Kupffer cells and SD rats liver", *Food and Chemical Toxicology*, 148: 111937 (2021).
 273. Li, H. W., Ying, P., Cai, Q. Q., Yang, Z. H. and Wu, X. L., "Exogenous melatonin alleviates hemorrhagic shock-induced hepatic ischemic injury in rats by inhibiting the NF- κ B/I κ B α signaling pathway", *Molecular Medicine Reports*, 23: 341 (2021).
 274. Puppel, N., Tjaden, Z., Fueller, F. and Marko, D., "DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1-2): 71-80 (2005).
 275. Jiang, L., Cao, J., An, Y., Yeng, C., Qu, S., Jiang, L. and Zhong, L., "Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells" *Toxicology in Vitro*, 21(8): 1486-1492 (2007).
 276. Li, Y., Chen, J., Weng, S., Sun, H., Yan, C., Xu, X., Ye, R. and Hong, J., "Small hepatocellular carcinoma: using MRI to predict histological grade and Ki-67 expression" *Clinical Radiology*, 74(8): 653 e1-653 e9 (2019).

277. Zhang, H.M. and Zhang Y., "Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions", *Journal of Pineal Research*, 57(2): 131-146 (2014).
278. Mousa, H. R., Morsi, A. A. and Shawky, L. M., "The possible hepatoprotection promoted by melatonin and alpha-tocopherol in acrylamide-induced liver injury in male albino rats: a histological and immunohistochemical study", *Egyptian Journal of Histology*, (2022).
279. Yang, Z., He, Y., Wang, H. and Zhang, Q., "Protective effect of melatonin against chronic cadmium-induced hepatotoxicity by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228: 112947 (2021).

EK AÇIKLAMALAR A.
ETİK KURUL İZİNİ



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



TOPLANTI TARİHİ : 02/09/2021
TOPLANTI NO : 2021/07

- 3- 01/04/2021 tarih ve 2021/04 sayılı toplantıda uygun bulunan Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2021-06-01/04 Protokol no'lu "Pinealektomili Ratların Beyin Dokusunda Akrilamid ile Oluşturulan Nörotoksisite Üzerine Eksojen Melatoninin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" konulu çalışma da hayvanlardan alınan dokulardan sıçan karaciğer dokusu ile 2021-21-02/09 Protokol no'lu "Pinealektomili Ratlarda Akrilamid Tarafından Oluşturulan Karaciğer Hasarı Üzerine Eksojen Melatoninin Terapötik Rolü: Oksidatif Stres, İnflamasyon ve Apoptosis Üzerine Etkileri (Therapeutic Role of Exogenous Melatonin on Acrylamide-Induces Liver Damage in Pinealectomy Rats : Effects on Oxidative Stress, Inflammation and Apopitosis" konulu yeni bir çalışma yapma talebinin uygunluğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

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

ÖZGEÇMİŞ

İlköğretim ve orta öğrenimi Amasya`da okudu. 2012 yılında Amasya Macit Zeren Fen Lisesinden mezun oldu. 2017 yılında Ankara Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi-Beslenme ve Diyetetik Bölümünden mezun oldu. 2023 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans programını tamamladı.