ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeycan KESKİN

AKRİLAMİDİN KANDA Na^+-K^+ ATPaz ENZİM AKTİVİTESİ VE GLUTATYON, HEMOGLOBİN, ALBUMİN DÜZEYLERİNE ETKİSİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKRİLAMİDİN KANDA Na^+ - K^+ ATPaz ENZİM AKTİVİTESİ VE GLUTATYON, HEMOGLOBİN, ALBUMİN DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Zeycan KESKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 09/02/2007 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

İmza……..	İmza……	İmza……..
Doç.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ	Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL	Doç.Dr.Elif ORUÇ
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof.Dr.Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarfından desteklenmiştir.

Proje No: FEF 2006 YL 38

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak göstermeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKRİLAMİDİN KANDA Na^+-K^+ ATPaz ENZİM AKTİVİTESİ VE GLUTATYON, HEMOGLOBİN, ALBUMİN DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Zeycan KESKİN
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Yıl 2007 , Sayfa 42
Jüri : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
Doç. Dr. Elif ORUÇ

Akrilamid poliakrilamid malzemelerin yapımında kullanılan bir kimyasaldır. Poliakrilamid içme ve atık suların iyileştirilmesinde, ayrıca kâğıt ve kozmetiklerde yapıştırıcı madde yapımında kullanılmaktadır. Akrilamid yüksek sıcaklıklarda hazırlanmış bazı gıdalarda gıdanın bünyesinde oluşmaktadır. Akrilamidin insanlarda ve laboratuvar hayvanlarında nörotoksik etkisi kanıtlanmıştır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (International Agency for Research into Cancer) gıdalardaki akrilamidi 'insanlar için potansiyel kanserojen maddeler' arasına almıştır.

Çalışmada toksik etkisinin olduğu bilinen akrilamid ile etkileştirilen kanlarda glutatyon (GSH), hemoglobin (Hb) ve albumin düzeyleri araştırılmıştır. Ayıca, bu çalışmada akrilamid ile etkileştirilen eritrosit zarında Na^+-K^+ ATPaz aktivite tayini yapılmıştır. Akrilamid ile muamele edilen kanlarda GSH, Hb ve albumin düzeylerinin düştüğü ve akrilamid ile etkileştirilen eritrosit zarında Na^+-K^+ ATPaz enziminin aktivitesinin azaldığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, Glutatyon, Hemoglobin , Albumin, Na^+-K^+ ATPaz

ABSTRACT

MY THESIS

INFLUENCE OF ACRYLAMIDE ON Na^+ - K^+ ATPase ACTIVITY AND GLUTATHION, HEMOGLOBIN, ALBUMIN CONTENT IN BLOOD

Zeycan KESKİN

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor: Assoc. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Year 2007, Page 42

Jury : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL

Assoc. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Assoc. Dr. Elif ORUÇ

Acrylamide is used as a chemical substance in polyacrylamide based materials. Polyacrylamide is used in improvment of drinking and waste water, as adhesive in paper and cosmetic industry. While some food are prepared at high temperatures, acrylamide is formed. It is known that acrylamide has neurotoxic effect on human and animal. Acrylamide has been defined as a cancerogenic substance by International Agency for Research into Cancer.

This study was carried out to investigate the effects of different doses of acrylamide on levels of glutathion (GSH), hemoglobin (Hb), albumin and Na^+-K^+ ATPase of erythrocyte membrane. It is found that when the bloods were treated with acrylamide GSH, Hb and albumin levels and Na^+-K^+ ATPase on the erythrocyte membrane were all decreased.

Key Words: Acrylamide, Glutathion, Hemoglobin, Albumin, Na^+-K^+ ATPase

TEŞEKKÜR

Bu çalışma sürecince beni yönlendiren, çalışmamı değerli kılan danışman hocam Doç.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda benden yardım ve desteklerini esirgemeyen hocalarım Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL'e, Yrd.Doç.Dr.Ramazan BİLGİN'e, Arş. Gör. Özlem ALPTEKİN'e ve Arş. Gör. Hasan KARADAĞ'a teşekkür ederim. Ayrıca hiçbir zaman benden sabrını ve desteğini esirgemeyen sevgili eşime, aileme ve kızıma da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VII
SİMGELER VE KISALTMALAR VIII
l.GİRİŞ 1
1.1. Akrilamid 1
1.2. Na^+-K^+ATPaz Enzimi 8
1.3. Glutatyon 10
1.4. Hemoglobin 12
1.5. Albumin 13
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 15
3.MATERYAL METOT 19
3.1. Materyal 19
3.2. Metot 19
3.2.1. İnsan Eritrositlerinin Hazırlanması 19
3.2.2. Eritrosit Zarlarının Hazırlanması 19
3.2.3. Eritrositlerin Akrilamid İle Etkileştirilmesi 20
3.2.4. Protein Tayini 20
3.2.5. İnorganik Fosfat Ölçümü 21
3.2.6. Na^+-K^+ ATPaz'ın Spesifik Aktivite Tayini 22
3.2.7. Redükte Glutatyon Tayini (GSH) 23
3.2.8. Hemoglobin Tayini 24
3.2.9. Albumin Tayini 25
4.BULGULAR VE TARTIŞMA 27
4.1. Bulgular 27
4.1.1. Standart Protein Eğrisinin Çiziminde Elde Edilen Bulgular 27

4.1.2. İnorganik Fosfat Eğrisinin Çizimi 28
4.1.3. Çeşitli Derişimlerde Akrilamid İçeren Kan Örneklerindeki Hemoglobin Düzeyleri 29
4.1.4. Çeşitli Derişimlerde Akrilamid İçeren Tam Kandaki GSH Düzeyleri 30
4.1.5. Çeşitli Derişimlerde Akrilamid İçeren Tam Kandaki Albumin Düzeyleri 32
4.1.6. Zar Elde Edilmesi ve **Zarın** Protein Tayini 33
4.1.7. Zarın Çeşitli Derişimlerdeki Akrilamid İle Etkileştirilmesi Sonucunda Na^+-K^+ ATPaz Enzim Aktivite Değerleri 34
4.2. Tartışma 35
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER 37
5.1. Sonuçlar 37
5.2. Öneriler 37
KAYNAKLAR 38
ÖZGEÇMİŞ 42

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. TÜBİTAK'ın Türkiye'deki akrilamid tespiti..... 5
Çizelge 1.2. Çeşitli gıdalardaki akrilamid seviyesi 5
Çizelge 4.1. Standart Protein Eğrisi için elde edilen bulgular 27
Çizelge 4.2. Fosfatın farklı derişimlerdeki çözeltilerinin 390 nm'de ölçülen absorbans değerleri..... 28
Çizelge 4.3. Çeşitli derişimlerde akrilamid eklenen kan örneklerinin içerdiği hemoglobin düzeyi 29
Çizelge 4.4. Çeşitli derişimlerde akrilamid eklenen kan örneklerinin içerdiği GSH düzeyi..... 31
Çizelge 4.5. Çeşitli derişimlerde akrilamid eklenen kan örneklerinin içerdiği albumin düzeyi 32
Çizelge 4.6. Zar örneğinin içerdiği protein miktarı 33
Çizelge 4.7. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren zar örneklerinde belirlenen Na^+-K^+ ATPaz aktivitesi 34

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Akrilamidin yapısı 1
Şekil 1.2. Akrilamidin oluşum mekanizması 2
Şekil 1.3. Akrilamidin tiyolat anyonlarıyla reaksiyonu 3
Şekil 1.4. Akrilamidin küçük reaktif moleküllerle reaksiyonu 3
Şekil 1.5. Millard Reaksiyonu 6
Şekil 1.6. Akrilamidin P450 (CYP2E1) enzimleri tarafından glisidamide dönüşmesi 7
Şekil 1.7. Akrilamidin metabolık yollarının CYP2EU GST ve EH enzimleri ile ilişkisi 8
Şekil 1.8. Na^-K^+ ATPaz enziminin yapısı 9
Şekil 1.9. Na^+-K^+ ATPaz enziminin etki şekli 9
Şekil 1.10. Glutatyon (y-glutamil sisteinil glisin) 10
Şekil 1.11. Hem'in yapısı 12
Şekil 4.1. Standart Protein Eğrisi 28
Şekil 4.2. İnorganik Fosfatın 390 nm'deki Standart Grafiği 29
Şekil 4.3. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren tam kandaki hemoglobin düzeyinde meydana gelen değişiklikler 30
Şekil 4.4. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren tam kandaki GSH düzeyinde meydana gelen değişiklikler 31
Şekil 4.5. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren tam kandaki albumin düzeyinde meydana gelen değişiklikler 33
Şekil 4.6. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren zar örneklerinin Na^+-K^+ATPaz aktivitesinde meydana gelen değişiklikler 35

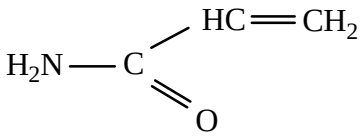
SİMGELER VE KISALTMALAR

ACR	Akrilamid
GSH	Glutatyon
Hb	Hemoglobin
ABS	Absorbans
Prot.	Protein
TCA	Tri Klor Asetik Asit
Inkb	İnkübasyon
C	Derişim
H2Ö2	Hidroj en Peroksit

1.GİRİŞ

2002 yılında İsveç Ulusal Gıda Merkezi tarafından yüksek sıcaklıkta işlem görmüş gıdalarda akrilamidin yüksek boyutlarda oluştuğunu ortaya koyan bir rapor yayınlanmıştır. İsveç'te başlayan bu araştırma 2002 yılında Birleşmiş Milletlerin gündemine taşınmış ve Birleşmiş Milletlere bağlı Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) çeşitli ülkelerle, çeşitli programlar organize etmiştir. Hollanda, İsviçre, Norveç, İngiltere ve ABD gibi ülkelerde pişirilmiş ve sıcakta işlem görmüş gıdaların pek çoğunda akrilamidin oluştuğunu ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır. Akrilamidin insanlarda ve laboratuvar hayvanlarında nörotoksik etkisi kanıtlanmıştır. Yine laboratuvar hayvanlarında kötü huylu tümör oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. İnsanlardaki kanser oluşumuyla henüz bir bağlantısı kanıtlanmasa da Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (International Agency for Research into Cancer) gıdalardaki akrilamidi 'insanlar için potansiyel kanserojen maddeler' arasına almıştır (Paulsson ve ark, 2002).

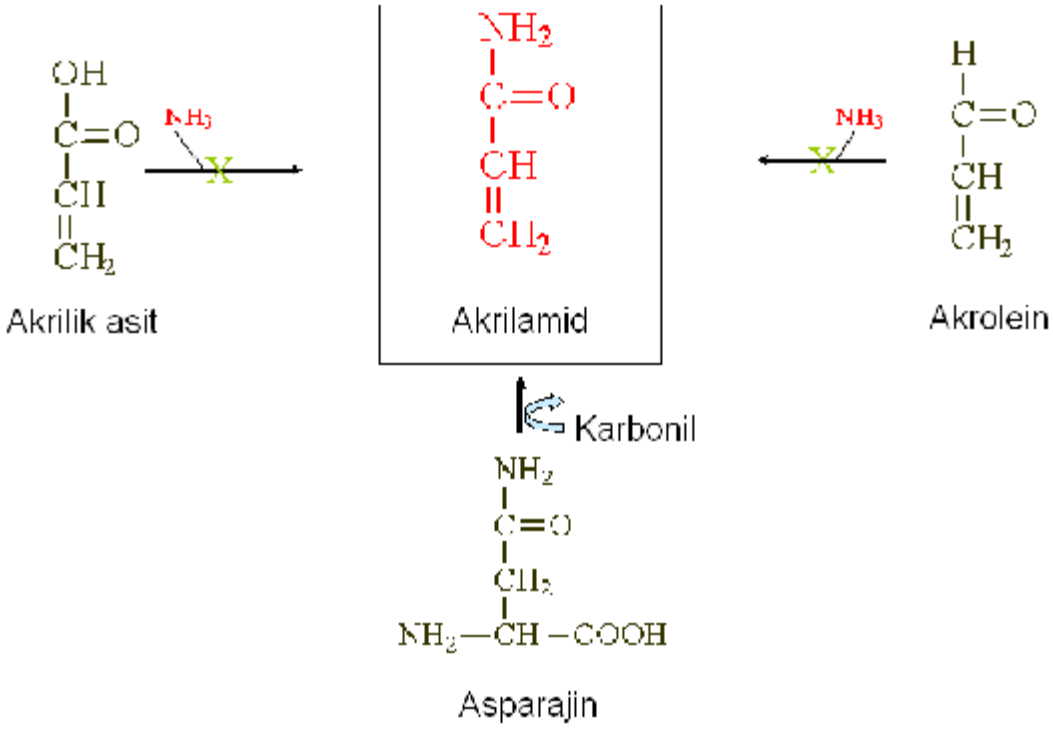
1.1.Akrilamid



Şekil 1.1. Akrilamidin yapısı

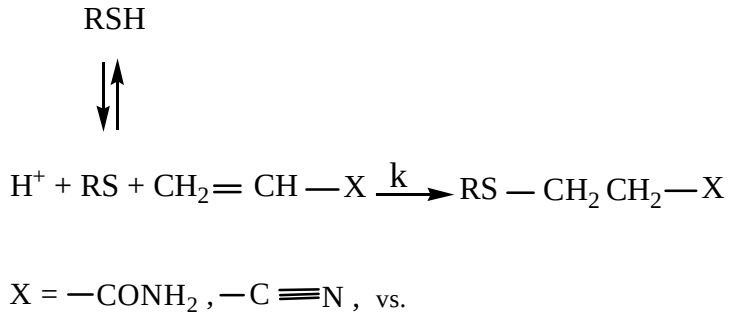
Akrilamid doymamış çift bağ içeren bir amiddir (Blasiak ve ark, 2004). 2-propenoamid, etilen karboksamid, akrilik asit amid, vinil amid, propenoik asit amid olarak da bilinmektedir. Sıvı halde iken beyaz bir kristal gibi görülür, kokusuzdur ve suda yüksek çözünürlüğe sahiptir. Erime sıcaklığı 84,5^{6}C, kaynama sıcaklığı (25 mm Hg) 125^{6}C'dir (atmosfer basıncında 192,6^{6}C) (Lingnert ve ark, 2002).

Akrolein (2-propenal,CH_2=CH-CHO) üç karbonlu aldehittir ve akrilamidin yapısını (CH_2=CH-C(O)-NH_2) anımsatmaktadır. Bu nedenle akrolein akrilamidin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Temel kimyasal transformasyonlar ile akrolein akrilamide dönüşebilir, ancak akrilamidin alternatif oluşum mekanizmalarında akrolein gerekli değildir. Örneğin, proteinler ve/veya aminoasitler hidroliz, dekarboksilasyon gibi transformasyonlardan sonra akrilamidin oluşmasına neden olabilmektedir (Lingnert ve ark, 2002).



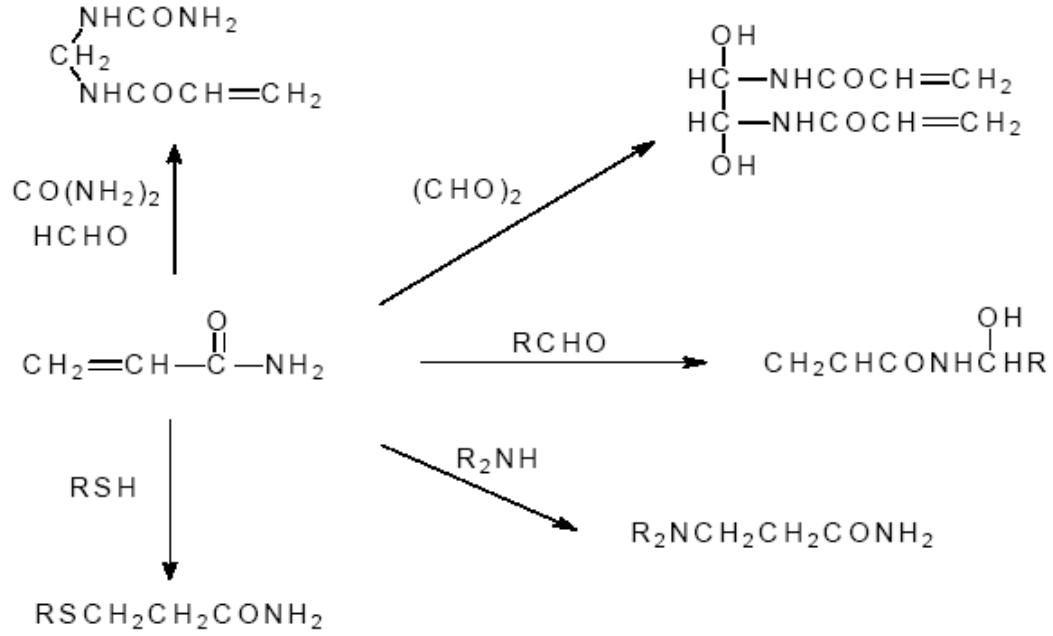
Şekil 1.2. Akrilamidin oluşum mekanizması

Akrilamid nükleofillerle özellikle tiyolat anyonlarıyla reaksiyona girebilir (Tong ve ark, 2004).



Şekil 1.3. Akrilamidin tiyolat anyonlarıyla reaksiyonu

Akrilamid üre ($CO(NH_2)_2$) ve formaldehit (HCHO) veya glioksal ($(CHO)_2$), aldehitler (RCHO), aminler (R_2NH), tiyoller (RSH) gibi küçük reaktif moleküllerle reaksiyona girebilmektedir (Lingnert ve ark, 2002).



Şekil 1.4. Akrilamidin küçük reaktif moleküllerle reaksiyonu

Akrilamid, poliakrilamid malzemeleri yapmak için kullanılan bir kimyasaldır. Poliakrilamid, içme ve atık sularının iyileştirilmesinde partikülleri ve diğer katışık maddeleri temizlemede ayrıca kâğıt ve kozmetiklerde yapıştırıcı madde yapımında

kullanılmaktadır. Poliakrilamidin içinde çok düşük düzeyde akrilamid vardır (Lingnert ve ark, 2002). İçme suyu kalitesi için, WHO'nun yönergesine göre, bir litre içme suyunda 0,5 µg akrilamid olarak bildirilmiştir. Avrupa Birliğinde bu rakam 0,1 µ g /1 litre sudur.

Akrilamid'in hayvanlarda kansere sebep olduğu ve belli dozlara çıkıldığında, insan ve hayvan sinir sisteminde zehirlenme etkisi yaptığı da bilinmektedir. Farelerdeki araştırmalar, akrilamidin pişirmeye bağlı olarak oluşan diğer bilinen belirli kanserojenlere benzer bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. İnsanlar için, gıdalardaki kanser oluşturan ajanların etkileri bilinmemektedir. Diyetteki akrilamid düzeylerinin diğer bilinen kansorejenlere nazaran daha yüksek oluşması olasıdır (Yang ve ark, 2005).

Halen, akrilamidin gıdalarda nasıl oluştuğuna dair bilgi ve anlayış çok azdır ve bilinen şu ki; yüksek sıcaklıklarda pişirilmiş veya işlem görmüş bazı gıdalarda oluşmaktadır ve yüksek sıcaklıkta bekleme süresi ile de artmaktadır. Gıdalarda akrilamidin oluştuğu sıcaklıklar tam olarak bilinmemektedir, ancak haşlama sıcaklığı olan 120**B**C'nin altındaki sıcaklıklarda hazırlanmış gıdalarda, bugüne kadar akrilamide rastlanmamıştır ve bugüne kadar akrilamid oluşumunun en büyük değerleri nişastalı (patates ve mısır gevreği, patates kızartma, tost edilmiş ekmek, bisküvi, kraker ve cipsi gibi) ürünlerde bulunmuştur.

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi laboratuvarında yapılan Türkiye'deki akrilamid taramalarında evde taze patatesin soyularak kızartılmasına oranla fast food ürünü olarak doğranıp dondurulmuş patateste çok daha yüksek miktarda akrilamid tespit edilmiştir.

Çizelge 1.1. TÜBİTAK'ın Türkiye'deki akrilamid tespiti

Gıda maddesi	**Akrilamid (µg/kg)**
Pirinç pilavı	Ölçülebilir değerin altında
Tahin helvası	Ölçülebilir değerin altında
Kebap, döner, ızgara	Ölçülebilir değerin altında
Çavdar ekmeği	Ölçülebilir değerin altında
Beyaz ekmek (kabukta)	40-160
Kızarmış ekmek (hazır)	200
Hazır çorbalar	40-60
Tulumba tatlısı	40-45
Bebe bisküvisi	400-600
Bisküvi	70-130
Kraker	70-200
Kahvaltılık gevrekler	80-350

Çizelge 1.2. Çeşitli gıdalardaki akrilamid seviyesi

Gıda maddesi	**Akrilamid (µg/kg)**
Kızarmış ekmek	90-1430
Sade kek	150-400
Zencefilli kek	1070-1410
Bisküviler	260-1450
Krakerler	180-420
Çeşitli fırıncılık ürünleri	230-3200
Kahvaltılık tahıllar	30-1400
Bebek bisküvileri	150-610
Patates kızartması	330-3700
Kahve	25

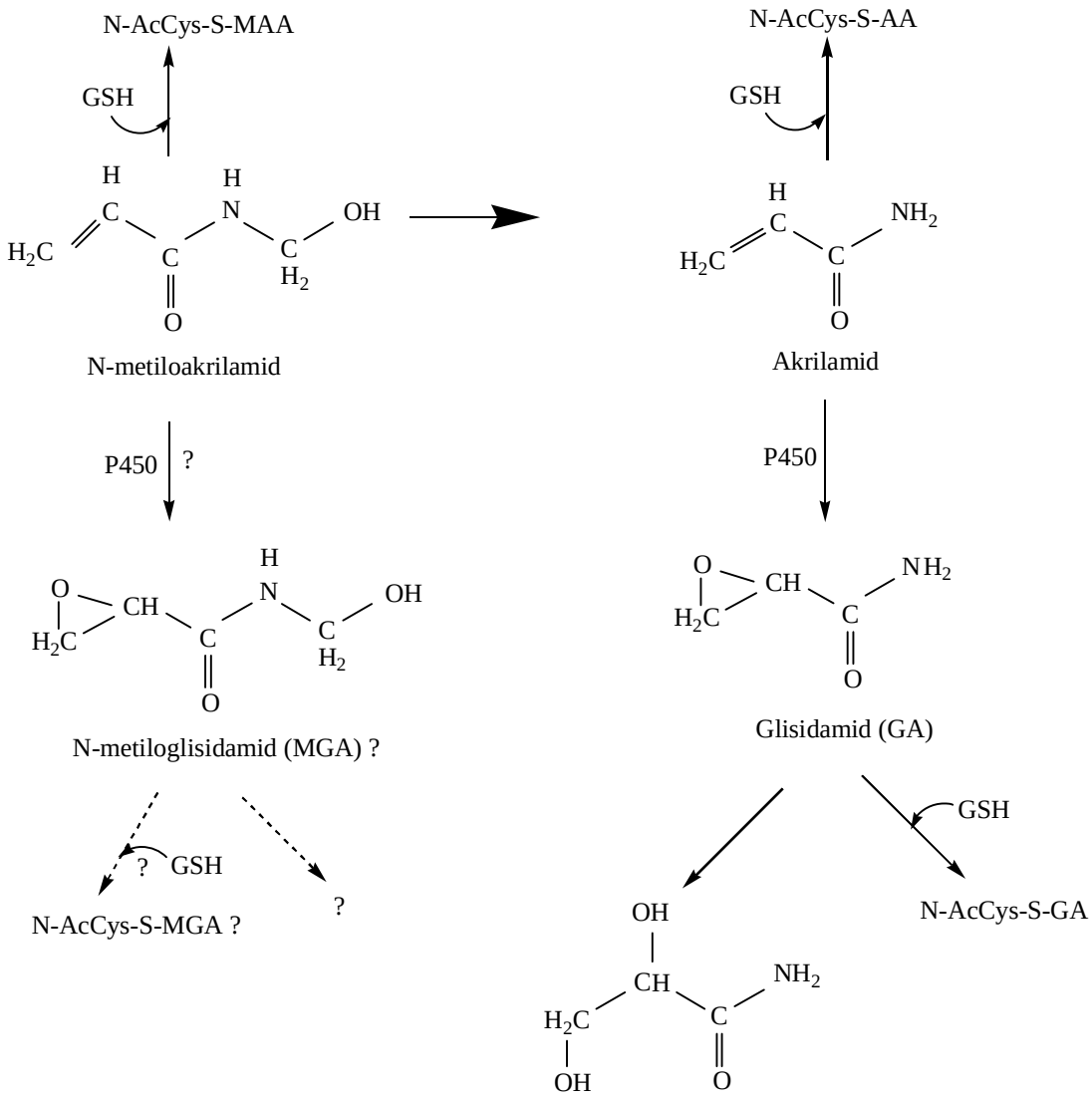
Şeker, yağ ve sütün yüksek sıcaklıkta pişirilmesinin gerek bisküvide gerekse muhallebi gibi diğer ürünlerle karamelize şekerlerde millard reaksiyonu oluşmaktadır ve bu sağlığı olumsuz yönde etkilemektedir. Millard reaksiyonu nedeniyle sütteki proteinler kullanılmaz hale gelmektedir. Bu karaciğerde toksik etki yapabilir (Becalski ve ark, 2003).



Şekil 1.5. Millard reaksiyonu

Proteinlerin yapı taşları olan 20 aminoasitten bir tanesi olan asparajin, akrilamid oluşumunda kilit rol oynar.

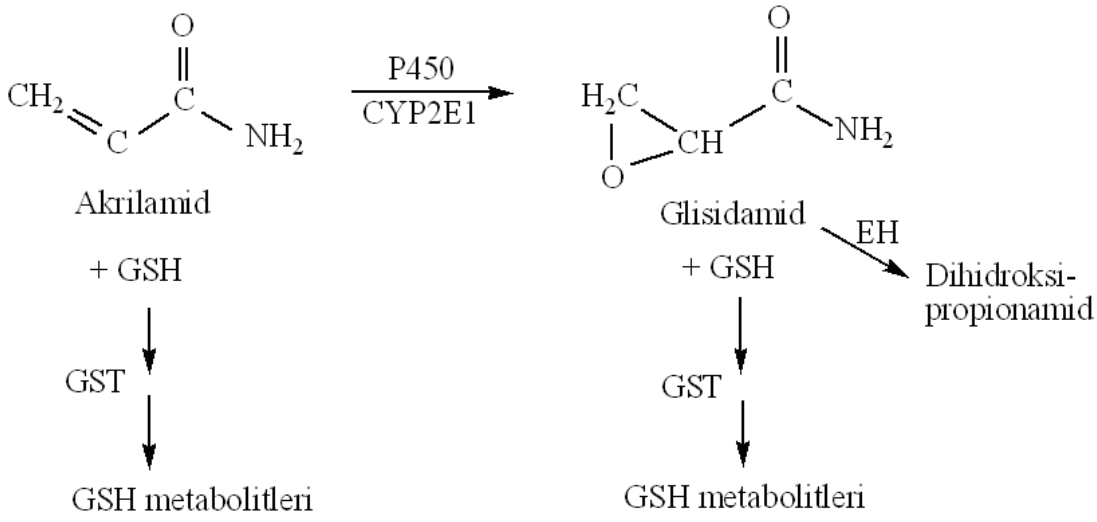
Akrilamid sitokrom P450 (CYP2E1) enzimleri tarafından glisidamide dönüşmektedir. Aşağıda akrilamid ve glisidamid için olası metabolik yollar gösterilmiştir (Paulsson ve ark, 2005).



Şekil 1.6. Akrilamidin P450 (CYP2E1) enzimleri tarafından glisidamide dönüşmesi

Akrilamidin metabolizması için en etkili yol GSH ile konjugasyonundan meydana gelmektedir. Glisamide epoksidasyonu diğer önemli metabolik yoldur. (Sumner ve ark, 1999). Meslekleri dolayısıyla akrilamide maruz kalan insanlarda akrilamid ve glisidamidin dozları 10:3 olarak tahmin edilmiştir (Bergmark ve ark, 1993). Glisidamid sonradan GSH konjugasyonundan veya epoksi hidrolaz (EH) tarafından katalize olan epoksit grubunun hidroliz edilmesiyle metabolize olmaktadır. Hem akrilamid ve glisidamidden GSH metabolitleri hem de

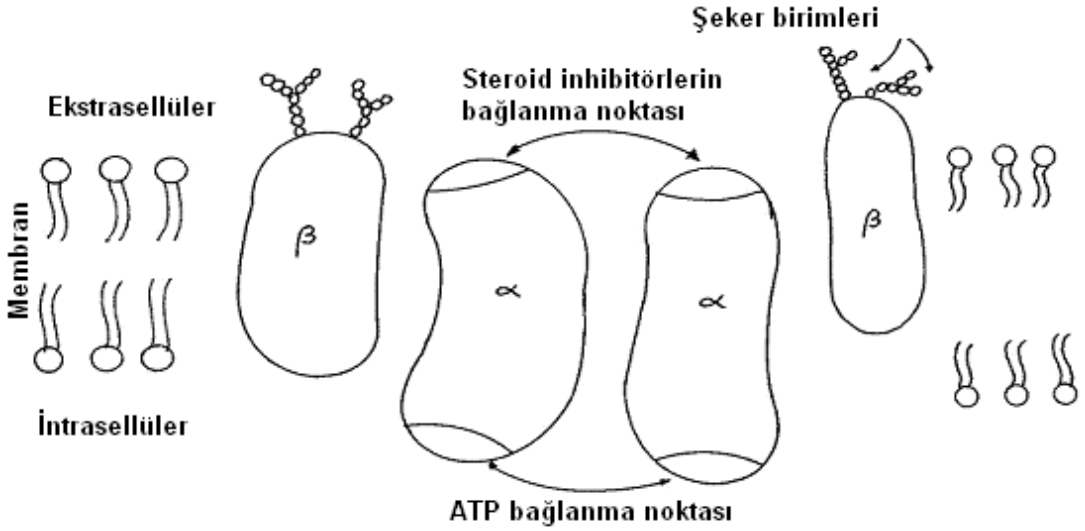
glisidamidden hidroliz ürünleri akrilamide maruz bırakılan kemirgen hayvanların idrarında bulunmuştur (Paulsson ve ark, 2002).



Şekil 1.7. Akrilamidin metabolik yollarının CYP2E1, GST ve EH enzimleri ile ilişkisi

1.2. Sodyum – Potasyum Adenozin 5' – Trifosfataz (Na^+-K^+ ATPaz) Enzimi

Na^+-K^+ ATPaz plazma zarında bulunan, sodyum ve potasyumun hücre zarı boyunca taşınmasını katalize eden bir enzimdir. Bütün memelilerin tüm hücrelerinde bulunur. Memeli hücrelerinin çoğu dış ortama göre düşük konsantrasyonda sodyum içerir. Bu iyonik gradyanı sağlayan ve sürdüren Na^+-K^+ ATPaz enzimidir. Na^+-K^+ ATPaz enzimi α ve β olmak üzere iki tip protein ünitesi içerir. α alt ünitesi sıklıkla katalitik alt ünite olarak değerlendirilir ve ekstrasellüler parçası üzerinde ouabain gibi glikozidler için bağlanma alanları içerir. Ayrıca proteinin intrasellüler olarak yerleşmiş parçası üzerinde ATP için bağlanma alanı vardır. β subunit bir glikoproteindir. Fakat rolü tam olarak bilinmemektedir (Rossier ve ark, 1987).



Şekil 1.8. Na^+-K^+ ATPaz enziminin yapısı

Na^+-K^+ ATPaz enziminin enzimatik döngüsü aşağıda gösterilmiştir (Robinson ve ark, 1974).

$$E_1 + ATP \xleftrightarrow{Mg^{+2},\ Na^+} E_1 \sim P_1 + ADP$$

$$E_1 \sim P \xrightarrow{Mg^{+2}} E_2 \sim P$$

$$E_2 \sim P + K^+ \longleftrightarrow K^+ - E_2 \sim P$$

$$K^+ - E_2 \sim P + H_2O \longrightarrow K^+ - E_2 + Pi$$

$$K^+ - E_2 \longleftrightarrow K^+ + E_2$$

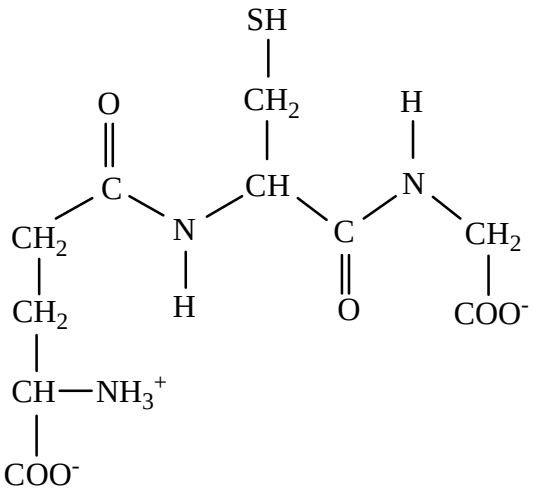
$$E_2 \longleftrightarrow E_1$$

Şekil 1.9. Na^+-K^+ ATPaz enziminin etki şekli

E_1 şekli ATP, magnezyum ve sodyum ile reaksiyona girme özelliğindedir. Diğer bir ifade ile bu kademede meydana gelen ATP ile fosforilasyon ancak magnezyum ve sodyum varlığında gerçekleşir. E – P kompleksi potasyum karşısında hidroliz olur.

Her ATP hidrolizinde 3 Na^+ hücre dışına 2 K^+ hücre içine girmektedir. Bu enzim vanadat (VO_3) ve kardiotonik steroidler tarafından inhibe edilmektedir. Kardiotonik steroidlerin etkisi enzimin potasyum kısmında gözlenir (Robinson ve ark, 1974).

1.3. Glutatyon (GSH)



Şekil 1.10. Glutatyon (γ-glutamil sisteinil glisin)

Akrilamid nükleofillerle özellikle tiyolat anyonlarıyla, α β doymamış amid, imid ve nitrillerle (örneğin akrilonitril, N-etil maleimid) reaksiyona girebilir. Tiyol grupları birçok biyolojik proteinlerin aktivite göstermesi için gereklidir, ayrıca önemli indirgeyici ajan ve hücresel antioksidantlardır. GSH başlıca tiyol reaktantıdır (Tong ve ark, 2004).

Glutatyon (γ-glutamil sisteinil glisin) N-terminal glutamatın α-peptidil olmayan bir bağ aracılığıyla sisteine bağlandığı bir atipik tripeptiddir. Glutatyon birçok enzim için gereklidir. Glutatyon ve glutatyon redüktaz enzimi, birçok protein ve polipeptid hormonların disülfit bağlarının oluşumuna iştirak ederler.

Glutatyon genelde GSH olarak kısaltılır. SH sisteinin sülfidril grubuna iştirak eder ve molekülün alışveriş yapan kısmıdır. Potansiyel olarak zehirli bazı elektrofilik ksenobiyotikler aşağıdaki reaksiyonlarda gösterildiği gibi nükleofilik GSH ile konjuge olurlar.

$$R+GSH \rightarrow R\text{-}S\text{-}G$$

Burada R toksik potansiyele sahip olan bir elekrofiliktir. Bu reaksiyonları katalize eden enzimlere glutatyon-S-transferazlar denilir ve bunlar karaciğer sitozolünde yüksek, diğer dokularda daha düşük miktarlarda bulunurlar.

GSH glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonda toksik potansiyeli olan hidrojen peroksitin dekompozisyonuna katılır. Enzimlerin çok önemli grupları olan SH gruplarının redüklenmiş durumda kalmalarına yardım eden önemli bir intraselüler redüktördür. GSH redükleyici bir ajan olarak etkili olduğundan SH okside olur ve glutatyonun diğer bir molekülüyle bir disülfit bağı oluşturur.

$$GSH + GSH \leftrightarrow G\text{-}S\text{-}S\text{-}G$$

G-S-S-G ürünü okside glutatyondur. Gerektiğinde G-S-S-G'de NADPH'ı kullanan bir reaksiyon ile glutatyon redüktaz tarafından GSH'a redüklenebilir.

$$G\text{-}S\text{-}S\text{-}G + NADPH + H^{+} \rightarrow 2GSH + NADP$$

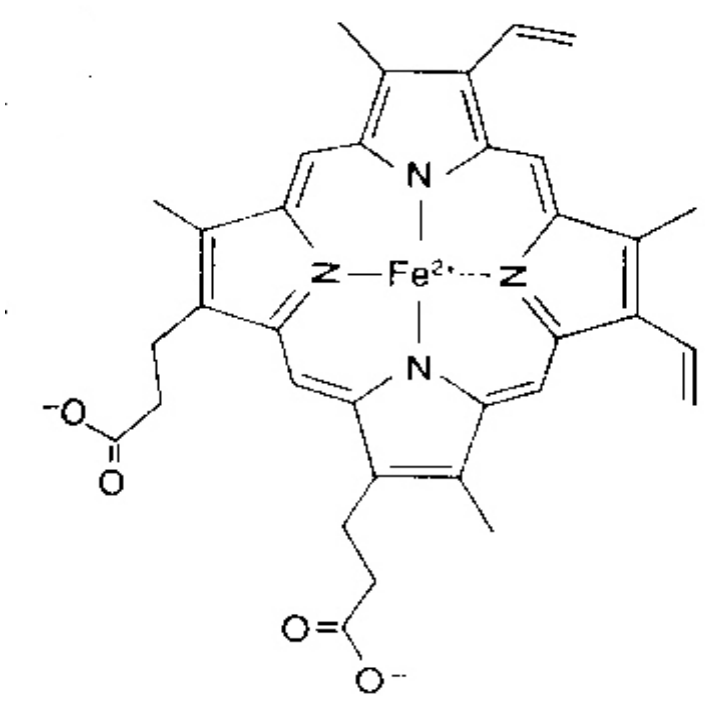
Bu reaksiyon bilhassa kırmızı kan hücrelerinde önemlidir. Bu hücrelerde G6P dehidrogenaz aktivitesi düşüklüğünde olduğu gibi NADPH düzeyleri düşük ise o zaman yukarıdaki reaksiyon ile redüklenmiş GSH yeterli miktarlarda rejenere olmaz. GSH'nin indirgenmiş düzeyleri peroksitlerin kırmızı kan hücrelerinde birikmesine yol açar ve bunların kırmızı hücre membran lipitleri üzerine olan oksidatif etkilerinden dolayı hemoliz meydana gelebilir. Böbreklerde bazı aminoasitlerin membranlardan naklinde bir taşıyıcı olarak GSH'yı kapsayan bir metabolik döngü ortaya konmuştur. Bu döngünün ilk reaksiyonu şöyledir:

$$Aminoasid + GSH \rightarrow \gamma\ Glutamil\ aminoasid + Sisteinilglisin$$

Bu reaksiyon bazı aminoasidlerin plazma membranından transferlerine yardım eder. Ardından aminoasid GSH ile yeniden sisteinilglisinden sentezlenmektedir. Yukarıdaki reaksiyonu katalize eden enzim γ Glutamil-transferaz (GGT)'dır.

1.4. Hemoglobin

Hemoglobin prostetik grup olarak "hem" adında bir siklik tetrahidropirol'e sahiptir ve bu grup, bu proteinlerin kırmızı renginden sorumludur. Tetrapiroller, düzeysel bir halkada, dört α-metilen köprüleri ile birbirine bağlanmış 4 pirol molekülünden meydana gelirler. "Hem"de pirol halkasının β karbonlarına, metil (M), vinil (V) ve propiyonat (Pr) grupları bağlı olup bunlar M, V, M, V, M, Pr, Pr, M olarak sıralanmışlardır. Bu düzeysel halkanın ortasında ferro demir (Fe^{+2}) atomu vardır.



Şekil 1.11. Hem'in yapısı

Ferröz demir protoporfirin molekülünde yer alan dört pirol halkasının azot atomları ile dört valanslı bir koordinasyon kompleksi meydana getirir. Ferröz ve ferrik haldeki demirin altı valanslı bir koordinasyon kompleksi yapma eğilimleri vardır. Bu yüzden hem, iki koordinasyon grubu ile daha birleşme yeteneğindedir. Hemoglobinde, koordinasyon kompleksi yapma yeteneğinde olan ve pirol halkalarının azotları ile birleşmede arta kalan demirin iki valansından birisi

polipeptid zincirlerinde yer alan histidin moleküllerinin imidozol halkasındaki azot atomlarından birisi ile birleşmiş haldedir. Serbest kalan valansı ile de demir O_2 veya başka bir grup ile (HCN, CO gibi) bağ teşkil edebilir.

Omurgalı eritrositlerinde bulunan hemoglobinin iki temel işlevi vardır: (1) O_2'nin solunum organlarından periferal dokulara taşınması ve (2) CO_2 ve protonların atılımı için periferal dokulardan solunum organına taşınmasıdır.

Hemoglobinler her tetramerine 4 oksijen molekülü bağlar (her "hem" alt birimine bir oksijen molekülü). Hemoglobine O_2'nin bağlanması aynı tetramer üzerinde başka O_2 atomlarının bulunup bulunmamasına bağlıdır. Eğer O_2 zaten varsa ardı sıra başka O_2 atomlarının bağlanması daha kolay olacaktır. Böylece hemoglobin kooperatif bağlanma kinetikleri gösterir ve bu özellik hemoglobinin solunum organında maksimal miktarda O_2'i bağlamasını ve periferal dokulara da bu maksimal miktardaki O_2'i, hakim olan pO_2'de ulaştırmasını sağlar (Murray ve ark, 1991).

1.5. Albumin

Albumin insan plazmasının ana proteinidir ve kanda çok bulunan tiollerden biridir (Bergmark ve ark, 1993).

Albumin total plazma proteinin %60 kadarını kapsar. Albuminin %40 kadarı plazmada, geri kalanın %60'ı ekstrasellüler sıvıda mevcuttur. Karaciğerde günde 12g kadar albumin üretilir, bu miktar karaciğerde sentezlenen total proteinin %25'ini, salgılanan tüm proteinin de yarısını oluşturur. Albumin bir preprotein olarak sentezlenir. Olgun insan albumini 585 aminoasidlik bir polipeptit zincirinden ibarettir ve 17 disülfit köprüsü içermektedir. Proteazların uygulanması ile albumin farklı fonksiyonlara sahip 3 bölgeye bölünebilir. Nispeten düşük moleküler ağırlığı ve yüksek konsantrasyonundan ötürü albuminin insan plazmasındaki ozmatik basıncın %75-80'inden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Albuminin önemli olan diğer bir işlevi muhtelif ligantları bağlamasıdır. Bunlar serbest yağ asitleri (FFA), kalsiyum, bazı steroid hormonlar, bilurubin ve plazma triptofanın bir kısmını kapsamaktadır. İlave olarak albumin plazma bakırının

yaklaşık %10'unu bağlar, kalanı seruloplazmine bağlıdır. Sulfonamidler, penisilin G, dikumarol ve aspirin dahil muhtelif ilaçlar da albumine bağlı bulunurlar.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Srivastava ve ark. (1983), karaciğer ve beyine çeşitli oranlarda akrilamid ve stiren uygulayarak lipid peroksidasyonu, glutatyon düzeyi ve glutatyon-S-transferaz aktivitesini bulmak amacıyla çalışma yapmışlardır. Karaciğerde akrilamid ve stirenin lipit peroksidasyonunun artmasına ve glutatyon miktarının ve glutation-S-transferaz aktivitesinin azalmasına neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Beyinde ise sadece akrilamid varlığında glutatyon miktarının düştüğünü fark etmişlerdir. Lipit peroksidasyonun ise glutatyon miktarı bittiği zaman meydana geldiğini görmüşlerdir. İn vitro koşullarda akrilamid ve stirenin lipit peroksidasyonuna etkisi olmadığını, akrilamid veya stirene maruz bırakılan karaciğerde glutatyon'un azalması sonucu olarak lipit peroksidasyonunun arttığını gözlemlemişlerdir.

Dixit ve ark. (1984), sıçan eritrositlerinde glutatyon ve akrilamidin etkileşimi konusunda çalışmışlardır. Sıçanlara 7, 14 ve 21. günlerde düzenli olarak akrilamid uygulamışlar ve zamanla glutatyon miktarının düştüğünü görmüşlerdir. Akrilamid ve 1-kloro 2,4-dinitrobenzen gibi substratlar kullanarak karaciğer, böbrek, beyin eritrositlerinde glutatyon-S-transferaz aktivitesini araştırmışlardır. Eritrosite akrilamid eklenmesiyle glutatyon peroksidaz aktivitesinin in vitro koşullarda inhibe olduğunu görmüşlerdir.

Patel ve ark. (1993), akroleinin atardamar hücreleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bunun için çeşitli dozlardaki akroleini plazma membranı ile muamele etmişlerdir. Sonuçta serbest laktat dehidrogenaz (LDH) miktarı artmış ve GSH ile protein sülfidril (P-SH) miktarı düşmüş fakat oksitlenmiş glutatyon miktarı değişmemiştir. Akrolein konsantrasyonu arttırıldıkça serbest LDH miktarı artmış ve GSH miktarı azalmıştır. Çünkü akrolein konsantrasyonu arttırıldıkça P-SH indirgenmiştir. Akrolein aynı zamanda plazma membranının Na^+-K^+ ATPaz miktarının önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur. Bu deneylerde akroleinin GSH ve protein sentezinde kullanılan amino asitlerin azalmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır. Plazma membranındaki P-SH azalması Na^+ /K^+ ATPaz'ın inaktive olduğunu göstermektedir.

Odland ve ark. (1994), N1E 115 hücrelerinde nöron dejenerasyonuna neden olan akrilamidin mekanizmasını açıklamak için çalışmışlardır. Sitotoksik etkiye

neden olmayan fakat nöron dejenerasyonunun giderek artmasına neden olan akrilamid konsantrasyonlarını seçmişlerdir. GST aktivitesinin yükselmesi ile beraber en yüksek akrilamid konsantrasyonunda test yapmışlardır. GSH miktarının azalması ve plazma membranının korunmasına karşın lipit peroksidasyon miktarının yükselmediğini gözlemlemişlerdir.

Awad ve ark. (1998), akrilamidin sıçan hepatositlerindeki toksik etkisini araştırmışlardır. Hepatositleri ayrıştırmışlar, akrilamidin farklı konsantrasyonlarıyla muamele etmişler ve iki saat beklemişlerdir. 1mM akrilamid ile muamele edildiğinde GSH miktarı 60 dakikada düşerken 10 mM akrilamid ile muamele edildiğinde 30 dakikada düştüğünü gözlemişlerdir.

Meng ve ark. (2001), tavşan kaslarındaki kreatin kinaza akrilamidin etkisi ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. İn vitro koşullarda akrilamid tarafından kreatin kinazın inhibe olmasının nedenini araştırmışlardır. Akrilamidin 0 ile 1 M konsantrasyonu arasında kreatin kinazı inhibe ettiğini ve akrilamidin protein tiollerini tükettiğini gözlemlemişlerdir. İnaktivasyon ve tiol tüketiminin zamana ve akrilamid derişimine bağlı olduğunu ve akrilamid tarafından inaktive olan kreatin kinazın ditiothreitol'ün (DTT) eklenmesi ile reaktivasyonunun sağlanmadığını gözlemlemişlerdir. Fakat, DTT'nin akrilamid ile muamelesinden sonra DTT tiol grupları bloke edilen 5,5'-dithiobis- (2- nitrobenzoik asit) aracılığıyla kreatin kinazın reaktivasyonunu sağlayabildiğini bulmuşlardır. Sonuçta akrilamid tarafından kreatin kinazın inaktive olmasında tiol alkilasyonunun önemli bir olay olduğunu belirlemişlerdir.

Paulsson ve ark. (2002), fare ve sıçanlarda akrilamid ve N-methilolakrilamid'in nörotoksik ve kanserojenik etkilerini araştırmışlardır. Akrilamid (AA) ve N-methilolakrilamid'in (MAA) hayvanlarda nörotoksik ve kanserojenik olduğunu ve MAA'nın AA'dan daha az etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. İki akrilamidin üç farklı dozunu erkek CBA farelere vermiş ve erkek Sprague-Dawley sıçanlarını iki akrilamidin belli bir dozuyla muamele etmişlerdir. Akrilamidlerin farelerde daha hızlı metabolize olduğunu bulmuşlardır. Farede iki akrilamidin doza bağlı olarak hem hemoglobin düzeyinde hem de periferal eritrositlerin mikronükleus frekansında artışa neden olduğunu ve akrilamid ile muameleden sonra sıçan kemik iliği eritrositlerindeki mikronükleus frekansında bir artış olmadığını gözlemişlerdir.

Tong ve ark. (2004), serum albümin ve glutatyon ile akrilamidin reaksiyonunu incelemişlerdir. Glutatyon ve insan serum albumini ile akrilamidin reaksiyonunu tespit etmek için çalışmış ve aşırı akrilamid varlığında onların tiol gruplarının nasıl zarar gördüğünü belirlemişlerdir. Bu sonuçları akrilamidin sağlık açısından ne kadar risk taşıdığını belirlemek amacıyla kullanmışlardır.

Yang ve ark. (2005), sıçan testislerine akrilamidin toksik etkisini araştırmışlardır. Akrilamidin sperm kalitesini etkilediğini ve sperm konsantrasyonunu azalttığını görmüşlerdir.Akrilamidin histopatolojik doku bozukluğuna neden olduğunu bulmuşlardır. Akrilamidin toksik etkisi nedeniyle Leyding hücresinin öldüğünü, sperm noksanlıklarının ve çeşitli histopatolojik anormalliklerin meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

Baum ve ark. (2005), V79 hücrelerinde ve insan kanında akrilamid ve glisidamidin genotoksik etkisini araştırmışlardır. Burada N-metil-N´-nitro-N-nitroso-guanidin (MNNG) ile hprt mutajenik testini kullanarak V79 hücrelerinde akrilamid ve glisidamid'in mutajenik etkisini karşılaştırmışlardır. Akrilamidin 600 μM konsantrasyonda mutajenik veya genotoksik etkiye neden olmadığını görmüşlerdir.Glisidamidin ise 300-3000 μM konsantrasyonda ve 4h bekleme süresinden sonra DNA'ya zarar verdiğini gözlemişlerdir.

Durling ve ark. (2005), akrilamid ve üç heterosiklik amin arasındaki genotoksik etkinin karşılaştırılması konusunda araştırma yapmışlardır. Üç yaygın HCAs, 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b) pridin(PhIP), 2-amino-3,8-dimetilimidazo(4,5-f) quinoksalin(MeIQx) ve 2-amino-3-metilimidazo(4,5-f) quinolin (IQ)'in frekansını belirlemişlerdir. Erkek Balb/C faresinin karın zarına PhIP MeIQx veya IQ'yu farklı dozlarda enjekte etmişlerdir. İn vitro koşullarda insan lifoblastoid hücresinde IQ ve MeIQx'in genotoksik gücünün PhIP'nin genotoksik gücüne eşit veya daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Akrilamidin insanlar için taşıdığı riskin heterosiklik aminlerden 100-1000 kat daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır.

Besaratinia ve ark. (2005), DNA ve akrilamidin mutajenik özellikleri hakkında çalışmalar yapmışlardır. DNA ile akrilamidin direkt ve indirekt etkileşimini incelemişler ve bunun için alkilleştirilmiş DNA kullanmışlardır. Sitokrom P4502E1 tarafından akrilamidin epoksidasyonu yoluyla üretilen DNA'yı glisidamid üzerine

yerleştirmişlerdir. Bu çalışma ile akrilamidin biyolojik özellikleri hakkında çeşitli sonuçlara varmışlardır.

3.MATERYAL ve METOD

3.1.Materyal

Araştırmada kullanılan kan örnekleri Ç.Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'nden temin edilmiştir.

Araştırmada kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler şunlardır:

Kimyasallar, sodyum klorür, potasyum klorür, tris hidroklorik asit, etilen di-amin tetra asetik asit, akrilamid, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, sodyum potasyum tartarat, Folin- Ciocalteu, sığır albümini, magnezyum klorür, adenozin trifosfat, ouabain, lubrol, amonyum molibdat, glasiyel metafosforik asit, disodyum etilen diamin tetraasetik asit, sodyum hidrojen fosfat, potasyum siyanür, sodyum hidrojen karbonat, sodyum sülfat, dietil eter.

Araç ve gereçler, UV spektrofotometresi, otomatik mikro pipet, analitik terazi, santrifüj, PH metre, inkübatör.

3.2.Metod

3.2.1.İnsan Eritrositlerinin Hazırlanması

Heparinleşmiş tam kan 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Plazma ve lökositler uzaklaştırılmış ve eritrositler fizyolojik tuz çözeltisi (% 0,9'luk NaCl) ile üç kez yıkandıktan sonra aynı çözeltiyle %40 (v/v) oranlı hücre süspansiyonları hazırlanmıştır.

3.2.2.Eritrosit Zarlarının Hazırlanması

Eritrosit zarlarının hazırlanmasında Hanahan ve Echolm (1974) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Tam kan örnekleri santrifüj edilip plazma kısmı atılmıştır. Bir hacim hücre çökeleği, 130 mM KCl ve 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) içeren çözelti konularak 5000 rpm'de 3 kez santrifüj edilip beyaz kan hücreleri eritrositlerden uzaklaştırılmıştır. Eritrosit çökeleği hacminin 5 katı olacak şekilde 1

mM EDTA ve 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) içeren çözelti ile karıştırılıp 18000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek eritrosit hücrelerinin hemoliz olması sağlanmıştır. Bu işleme beyaz renkte zar elde edinceye kadar devam edilmiştir. Zar örnekleri 1 mM EDTA ve 10 mM Tris-HCl içeren tampon çözelti ile seyreltilerek son derişimi 1 mg zar proteini / mL olacak şekilde zar proteinleri hazırlanmıştır.

3.2.3.Eritrositlerin Akrilamid İle Etkileştirilmesi

pH'ı 7 olan 0,1M fosfat tamponu ile %40'lık orana getirilmiş olan kan örnekleri çeşitli derişimlerde (0,25-0,5-1-5 mM) akrilamid içerecek şekilde akrilamid ile etkileştirilmiştir. Örnekler 37**B**C'de 15 dk su banyosunda bekletildikten sonra 1mL %5'lik TCA ile reaksiyon durdurulmuştur.

2.4.Protein Tayini

Protein tayini Lowry ve ark. (1951) tarafından önerilen metodla yapılmıştır. Protein tayini için aşağıda bildirilen A , B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

1. Çözelti A: Bu çözelti 2 g Na_2CO_3 , 0.1 M NaOH çözeltisinde çözülerek ve aynı çözelti ile son hacim 100 mL'ye seyreltilerek hazırlanır.
2. Çözelti B: 0.5 g $CuSO_4.5H_2O$, % 1'lik Na-K Tartarat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanır.
3. Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanır. (Kullanılacağı an hazırlanmasına dikkat edilir.)
4. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:3 oranında seyreltilerek hazırlanır.
5. Standart Protein Çözeltisi: 1 mL'sinde 10 mg sığır albümini olacak şekilde %0.9'luk NaCl çözeltisiyle hazırlanır.
6. Standart Protein Eğrisinin Çizimi: Standart protein çözeltisinden 2,5 mL alınıp %0,9'luk NaCl çözeltisiyle 50 mL'ye seyreltilmiştir. 6 adet deney tüpü alınarak tüpe sırasıyla 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.50, 1.00 olacak şekilde seyreltilmiş protein (1 mg/mL) çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 1 mL'ye tamamlanıp, her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dk oda sıcaklığında

bekletildikten sonra her tüpe 1:3 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0.5 mL eklenmiştir. 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunup bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri sığır albumini yerine hazırlanan örnekler kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.5.İnorganik Fosfat Ölçümü

İnkübasyon ortamına eklenen ATP'den açığa çıkan inorganik fosfat Atkinson ve ark.'nın (1973) önerdiği yönteme göre yapılmıştır. Yöntem ATP'den açığa çıkan inorganik fosfatın Cirrasol ALN-WP (Lubrol) ve fosfo molibdat ile teşkil ettiği kompleksin 390 nm dalga boyunda absorbans vermesi ilkesine dayanmaktadır.

İnorganik Fosfat Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler:

Cirrasol ALN-WP (Lubrol): %5 konsantrasyonda su banyosu ısıtılarak hazırlanır. Misel agregasyonuna bağlı bulanıklığın giderilmesi için kullanılmadan önce 37 **B** C'de su banyosunda bekletilir.

Molibdik Asit Çözeltisi: %2 molibdik asit çözeltisi 1,8 M H_2SO_4 çözeltisi içinde hazırlanır.

Ana Çözelti: İnorganik fosfat tayini için aşağıdaki karışım kullanılır.

%5 lubrol	10 hacim
Molibdik asit çözeltisi	25 hacim
Saf su	65 hacim

Standart İnorganik Fosfat Çözeltisinin Hazırlanması: Standart stok çözeltisi 0,2 M potasyum hidrojen fosfattan 1-2 μmol konsantrasyonlarında hazırlanır. Stok standart çözeltisine %1 kloroform koruyucu olarak ilave edilir.

İşlem: 1mL örnek üzerine 2 mL çözeltiler kısmında açıklanan ana ayıraç eklenmiş ve karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Absorbans değerleri 390 nm'de köre karşı okunmuştur. Sonuçlar standart K_2HP_4 eğrisinden değerlendirilmiştir.

3.2.5.Na^+-K^+ ATPaz'ın Spesifik Aktivite Tayini

Prensip: Sodyum-Potasyum Adenozin Trifosfataz aktivitesi inkübasyon sırasında ortama ilave edilen 3 mM disodyum adenozin trifosfat (ATP)'den açığa çıkan inorganik fosfatın ölçülmesi prensibine dayanarak ölçülür (Reading ve ark, 1980).

Yöntem: Aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmış olan tüp içerikleri 5 dk su banyosunda tutulmuştur.

Na^+-K^+ ATPaz için inkübasyon ortamındaki son iyon derişimleri:

İnkübasyon ortamı = 100 mM NaCl 3mM ATP

20 mM KCl 1mM Ouabain

4 mM $MgCl_2$

40 mM Tris HCl

	Örnek 1 (Total-ATPaz)	Örnek 2 (Mg-ATPaz)	Ör Kör	ATP Kör
-Ouabain inkb ort	870µL		870µL	870µL
+Ouabain inkb ort		870µL		
Örnek hmj	30µL	30µL	-	30µL
dH_2O	-	-	30µL	100µL
ATP	100µL	100µL	100µL	-

Tüplere inkübasyon ortamından sonra örnek homojenatı eklenerek 5 dk 37^0C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından ATP eklenerek reaksiyon başlatılmış, 30 dk 37^0C'de gerçekleşen inkübasyon sonrasında, reaksiyon 500 µL soğuk saf su ile durdurulmuştur. Atkinson ve ark (1973) kullandığı yönteme dayanarak tüplerde açığa çıkan inorganik fosfat miktarı, son hacmi 1.5 mL olan tüplere 3 mL lubrol (%5 polioksietilen 10-lauril eter)-molibdat (%2 amonyum molibdat) karışımı (100 mL için 10 mL %5'lik polioksietilen 10-lauril eter + 25 mL %2'lik amonyum molibdat + 65 mL dH_2O) konduktan sonra 10 dk oda sıcaklığında bekletilerek 390nm dalga boyunda açığa çıkan sarı renkli kompleksin absorbansının okunmasıyla ölçülmüştür.

Enzim aktivitesi µmol Pi/mg prot/saat olarak ifade edilmiştir. (Na^+-K^+ ATPaz aktivitesi Total-ATPaz aktivitesinden Mg-ATPaz aktivitesinin çıkarılmasıyla hesaplanır.)

3.2.6.Redükte Glutatyon Tayini

Prensip: Hemen hemen eritrositlerin bütün nonprotein sülfidril grupları indirgenmiş glutatyon şeklinde bulunur. 5, 5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoik asit] (DTNB), sülfidril bileşikleri tarafından redükte edilmiş bir disülfit bileşiğidir. Oldukça sarı renkli anyon oluşturur. GSH madde miktarı bu sarı bileşiğin 412 nm dalga boyunda optik dansitesi saptanarak değerlendirilir.

Ayıraçlar:

1. Çöktürücü Çözelti

Glasiyel metafosforik asit 1.67g
Disodyum EDTA 0.20g
NaCl 30.0g
Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

2. 0.3 M Na_2HPO_4

Na_2HPO_4 42.59g
Saf su ile 100mL'ye tamamlanır.

3. DTNB Çözeltisi

DTNB 20.0mg
%1'lik sodyum sitrat ile 100 mL'ye tamamlanır.

Yöntem:

	Kör(mL)	**Örnek(mL)**
Hemolizat	-	2
Saf Su	2	-
Çöktürücü	3	3

5 dk bekletilerek, örnek filtre kağıdından süzülmüştür.

Süzüntü	2	2
0.3 M Na_2HPO_4	8	8

412 nm'de köre karşı okunmuştur. (OD_1). Tüplere:

%0.02 DTNB	1	1

İlave edilmiş ve 412 nm'de köre karşı okunmuştur.(OD_2)

Hesaplama:

Glutatyon derişimi mmol/g protein biriminden hesaplanır.

$C / 1000 = (OD_2-OD_1)/13600 \times E_1 \times 5/2 \times 1/2$

$C(mmol/mg\ protein) = (OD_2-OD_1) \times 0.092 / Protein(g/mL)$

13600: GSH ile DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyon katsayısı

E_1 : Eni 6 nm'den büyük olan bant kullanılırsa hem ışık yolu hem de bant genişliği farklarını düzelten bir türev ekstrinksiyon katsayısı kullanılır. Bizim kullandığımız 2 nm'dir. Hesaplamalarda E_1 kullanılmamıştır.

C : mmol glutatyon

OD_1 : DTNB ilave edilmeden önce 412 nm dalga boyunda ölçülecek optik dansite

OD_2 : DTNB ilave edildikten sonra 412 nm dalga boyunda ölçülecek optik dansite

1000: mmol'e dönüşüm katsayısı

3.2.7.Hemoglobin Tayini

Prensip: Drapkin çözeltisinde bulunan ferrisiyanür hemoglobindeki +2 değerlikli demiri +3 değere yükseltgeyerek hemoglobini methemoglobine

dönüştürür. Bu ise potasyum siyanür ile birleşerek stabil olan siyanomethemoglobini oluşturur. Siyanomethemoglobinin 540 nm dalga boyunda verdiği optik dansite ölçülerek hemoglobin (Hb) miktarı saptanır (Kampen, 1961).

Ayıraçlar:

1. Drapkin Çözeltisi

$K_3Fe(CN)_6$ 189mg

KCN 52mg

$NaHCO_3$ 1g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Yöntem : Çözeltiler tüplere aşağıdaki gibi koyulmuştur.

	Kör	**Örnek**
Hemolizat(mL)	-	100
Drapkin Çözeltisi(mL)	5	5

15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda optik dansite okunarak hemoglobin değerlendirme cetvelinden değerlendirmesi yapılmıştır.

3.2.8.Albumin Tayini

Prensip: Bir santrifüj tüpüne 0.5 mL sulandırılmış serum koyulmuştur. Üzerine 7.5 mL %23'lük sodyum sülfat ilave edilerek iyice çalkalanmıştır. 3 mL dietil eter konan tüpün ağzı kapatılıp, iyice çalkalanmış ve 15 dk santrifüj edilmiştir. Eter tabakasının altında kalan berrak kısımda albumin bulunur. Bu berrak kısımla eter tabakasının altında yüzer şekilde çöktürülmüş beyaz globulin halkası göze çarpar. Böylece sodyum sülfat kullanılarak serumdaki globulinler çöktürülmüş olur. Bir pipetin ağzı kapatılarak eter tabakasından dikkatlice geçirilmiş ve beyaz globulin tabakasını mümkün olduğunca kırmadan alttaki berrak sıvıyı bulandırmadan sıvı pipete geçirilmiştir. Bu, albumin miktar tayini için bundan sonraki basamaklarda kullanılmıştır (Gornall ve ark, 1949).

Yöntem : Üç adet deney tüpü alınır ve aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

	Kör	Albumin	Total Protein
Arık Su	1mL	-	-
Albumin Süzüntüsü	-	1mL	-
Serum (1/20 seyreltilmiş)	-	-	1mL

Sıvı, serum fizyolojik (%0,9'luk NaCl) ile 1/20 oranında seyreltilip daha sonra protein tayini yapılmış ve 750 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri standart protein eğrisinden değerlendirilerek albumin miktarı tespit edilmiştir.

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

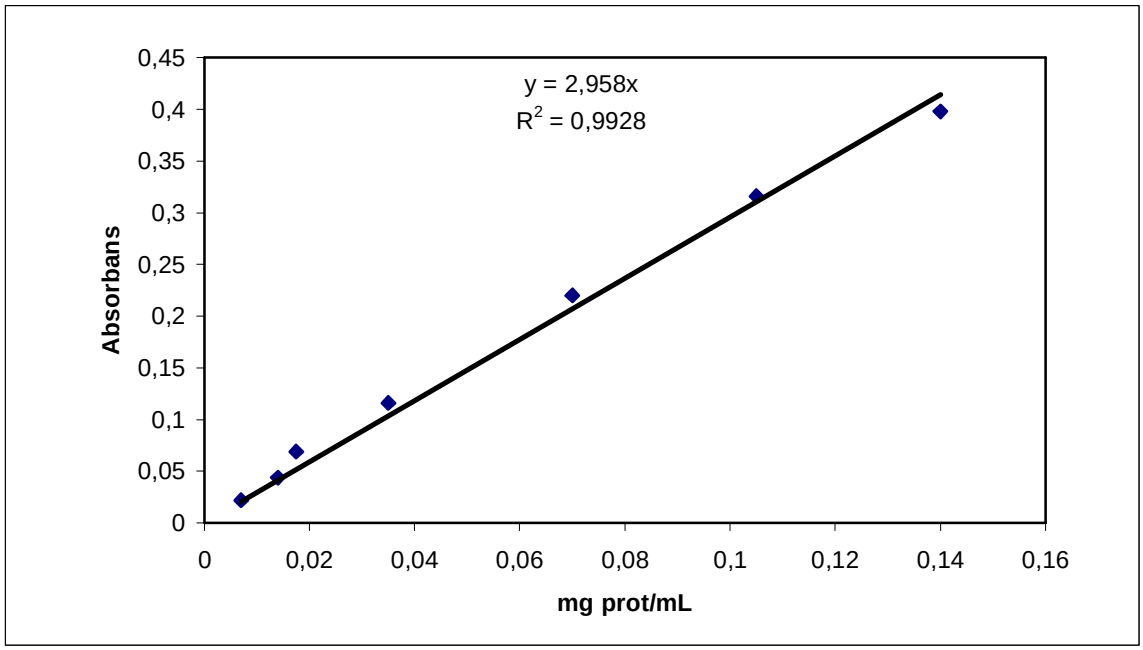
4.1.Bulgular

4.1.1.Standart Protein Eğrisinin Çiziminde Elde Edilen Bulgular

Bölüm 3.2.4'de açıklandığı gibi hazırlanan sığır albumini kullanılarak yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar değerlendirilerek standart protein eğrisi çizilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu verilere göre çizilen standart protein eğrisi ise Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Standart Protein Eğrisi İçin Elde Edilen Bulgular

Protein Derişim (mg/mL)	Absorbans
0,007	0,022
0,014	0,044
0,0175	0,069
0,035	0,116
0,07	0,220
0,105	0,316
0,14	0,398



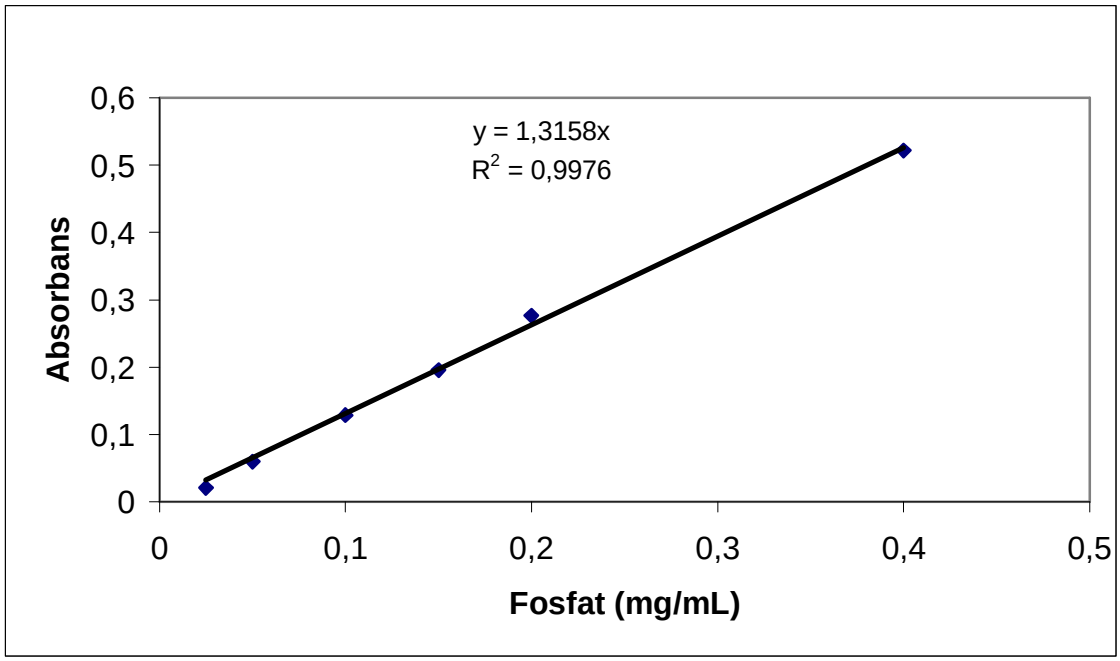
Şekil 4.1. Standart Protein Eğrisi

4.1.2. İnorganik Fosfat Eğrisinin Çizimi

Hazırlanan standart fosfat çözeltileri kullanılarak yapılan deneylerde bilinen fosfat derişimleri için 390 nm'deki ölçülen absorbans değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu verilere göre çizilen inorganik fosfat eğrisi ise Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Fosfatın Farklı Derişimlerdeki Çözeltilerinin 390 nm'deki Ölçülen Absorbans Değerleri

Fosfat (mg/mL)	Absorbans
0,025	0,021
0,05	0,060
0,1	0,129
0,15	0,196
0,2	0,277
0,4	0,522



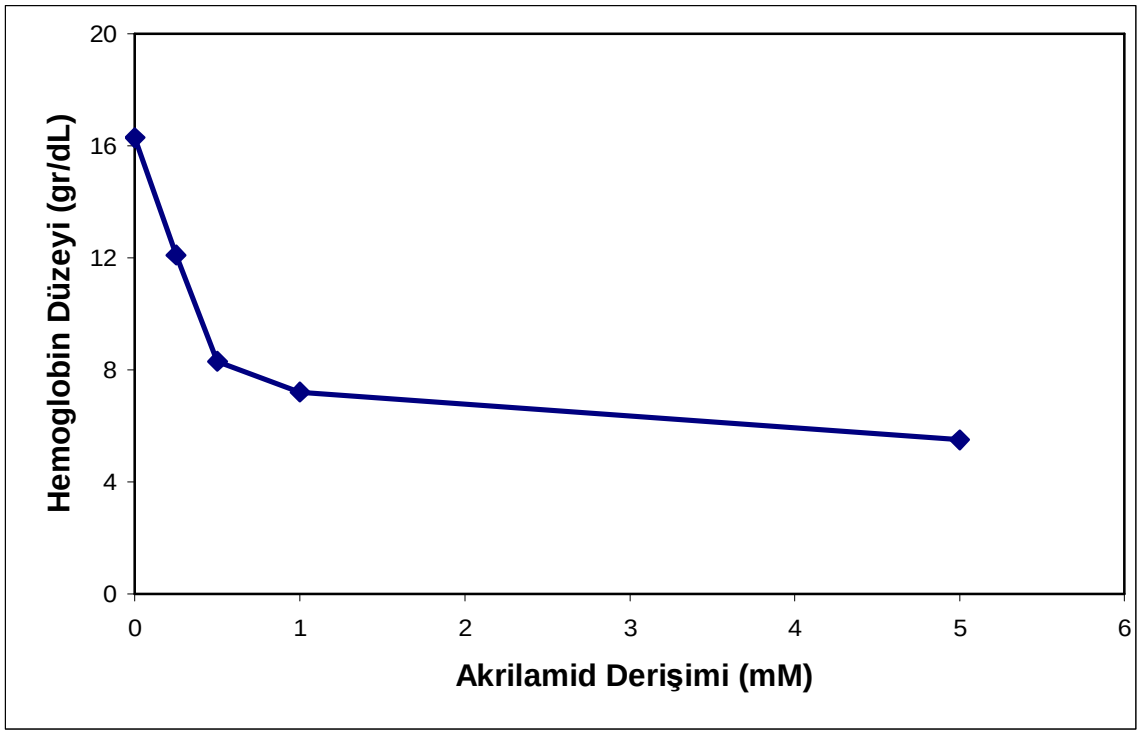
Şekil 4.2. İnorganik Fosfatın 390 nm'deki Standart Grafiği

4.1.3. Çeşitli Derişimlerde Akrilamid İçeren Kan Örneklerindeki Hemoglobin Düzeyleri

Çeşitli derişimlerde akrilamid içerecek şekilde hazırlanan kan örneklerinde hemoglobin düzeyinin belirlenmesi sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.3'de verilmiş ve Şekil 4.3'de şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Çeşitli derişimlerde akrilamid eklenen kan örneklerinin içerdiği hemoglobin düzeyleri

Akrilamid Derişimi (mM)	Hemoglobin Düzeyleri (g/dL)
0	16,3±1,1
0,25	12,1±1,1
0,5	8,3±1,3
1	7,2±0,4
5	5,5±0,2



Şekil 4.3. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren tam kandaki hemoglobin düzeyinde meydana gelen değişiklikler

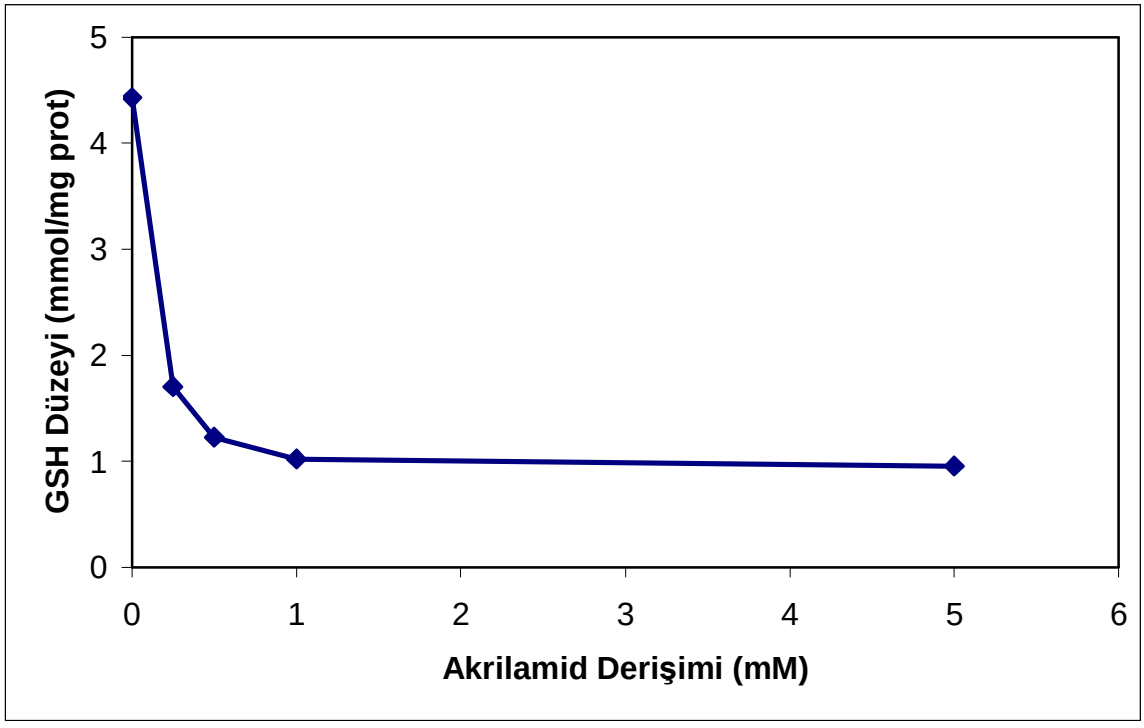
Akrilamid ile etkileştirilmeyen kandaki hemoglobin düzeyi 16,3 g/dL olarak ölçülmüştür. 0,25; 0,5; 1; 1,5 mM derişimlerdeki akrilamid ile etkileştirilen kanlardaki hemoglobin düzeyleri ise sırasıyla 12,1; 8,3; 7,2 ve 5,5 g/dL olarak bulunmuştur.

4.1.4. Çeşitli Derişimlerde Akrilamid İçeren Tam Kandaki GSH Düzeyleri

Çeşitli derişimlerde akrilamid içerecek şekilde hazırlanan kan örneklerindeki GSH düzeylerinin belirlenmesi sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.4'de verilmiş, Şekil 4.4'de ise şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren kan örneklerinde tespit edilen GSH düzeyi

Akrilamid Derişimi (mM)	GSH Düzeyi (mmol/mg prot)
0	4,430±0,130
0,25	1,704±0,200
0,5	1,227±0,007
1	1,022±0,140
5	0,954±0,004



Şekil 4.4. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren tam kandaki GSH düzeyinde meydana gelen değişiklikler

Akrilamid ile etkileştirilmeyen kandaki GSH düzeyi 4,43 mmol/mg prot olarak ölçülmüştür. 0,25; 0,5; 1; 1,5 mM derişimlerdeki akrilamid ile etkileştirilen

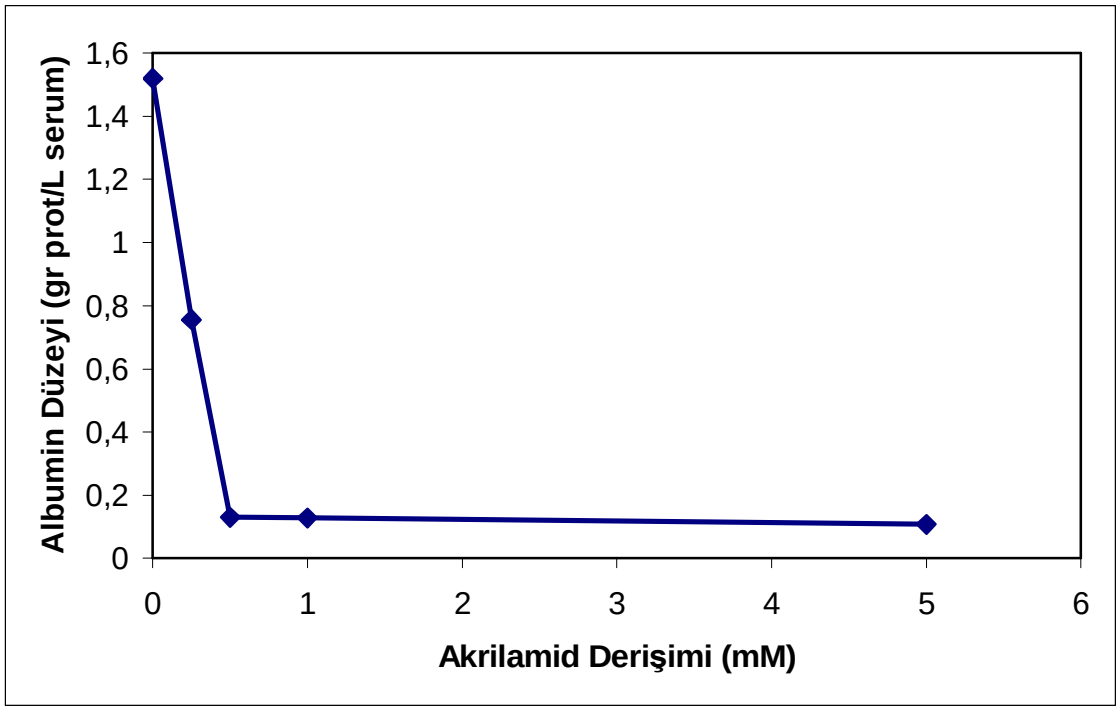
kanlardaki GSH düzeyleri ise sırasıyla 1,704; 1,227; 1,022 ve 0,954 mmol/mg prot olarak bulunmuştur.

4.1.5. Çeşitli Derişimlerde Akrilamid İçeren Tam Kandaki Albumin Düzeyleri

Çeşitli derişimlerde akrilamid içerecek şekilde hazırlanan kan örneklerindeki albumin düzeylerinin belirlenmesi sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.5'de verilmiş Şekil 4.5'de ise şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Çeşitli derişimlerde akrilamid eklenen kan örneklerinde belirlenen albumin düzeyi

Akrilamid Derişimi (mM)	Albumin Düzeyi (gr prot/L serum)
0	1,520±0,050
0,25	0,755±0,050
0,5	0,130±0,080
1	0,128±0,040
5	0,108±0,008



Şekil 4.5. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren tam kandaki albumin düzeyinde meydana gelen değişiklikler

Çizelgede görüldüğü gibi akrilamid ile etkileştirilmemiş kandaki albumin düzeyi 1,520 g prot/L serum olarak bulunmuştur. 0,25; 0,5; 1; 1,5 mM derişimlerdeki akrilamid ile etkileştirilen kanlardaki albumin düzeyleri ise sırasıyla 0,755; 0,130; 0,128 ve 0,108 g prot/L serum olarak ölçülmüştür.

4.1.6. Zar Elde Edilmesi ve Zarın Protein Tayini

Elde edilen zar örneğinden bir miktar alınarak protein tayini yapılmıştır. Protein tayini sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4. 6. Zar örneğinin içerdiği protein miktarı

Absorbans	Protein Miktarı (mg prot/mL)
0,07	2,37

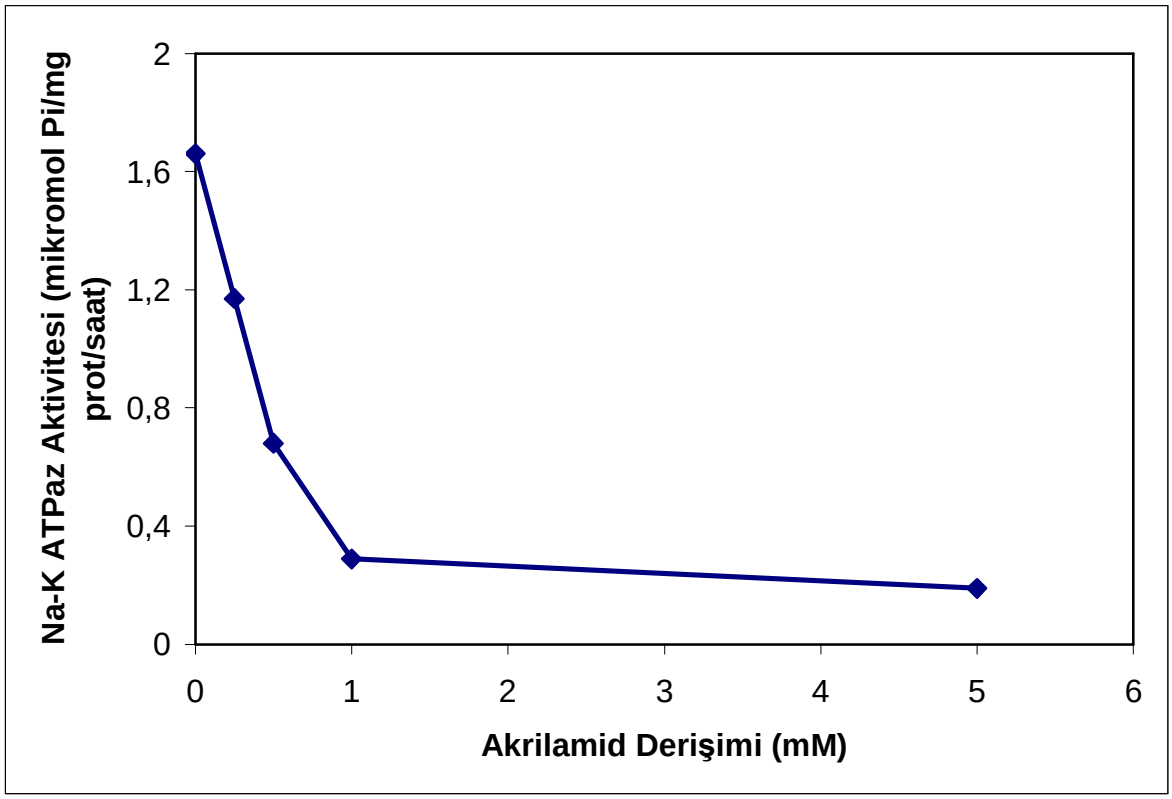
Elde edilen verilerden yararlanılarak zar örnekleri 1 mM EDTA ve 10 mM Tris-HCl içeren tampon çözelti ile seyreltilerek son derişimi 1 mg zar proteini/mL olacak şekilde zar proteinleri hazırlanmıştır.

4.1.7. Zarın Çeşitli Derişimlerdeki Akrilamid İle Etkileştirilmesi Sonucunda Na^+-K^+ ATPaz Enzim Aktivite Değerleri

Çeşitli derişimlerdeki akrilamid ile etkileştirilen zarda Na^+-K^+ ATPaz enzim aktivite değerlerinin belirlenmesi sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.7'de verilmiştir. Şematik olarak ise Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren zar örneklerinde belirlenen Na^+-K^+ ATPaz enzim aktivitesi

Akrilamid Derişimi (mM)	Na^+-K^+ ATPaz Aktivitesi (µmol Pi/mg prot/saat)
0	1,66±0,05
0,25	1,17±0,04
0,5	0,68±0,004
1	0,29±0,002
5	0,19±0,002



Şekil 4.6. Çeşitli derişimlerde akrilamid içeren zar örneklerinin Na^+-K^+ ATPaz aktivitesinde meydana gelen değişiklikler

Çizelgede görüldüğü gibi akrilamid ile etkileştirilmemiş zar örneğindeki Na^+-K^+ ATPaz aktivitesi 1,66 µmol Pi/mg prot/saat olarak belirlenmiştir. 0,25; 0,5; 1; 1,5 mM derişimlerdeki akrilamid ile etkileştirilen zar örneğindeki Na,K-ATPaz aktivitesi ise sırasıyla 1,17; 0,68; 0,29 ve 0,19 g µmol Pi/mg prot/saat olarak ölçülmüştür.

4.2. Tartışma

Akrilamid nükleofillerle, özellikle tiyolat anyonlarıyla reaksiyona girer. Tiyol grupları birçok önemli biyolojik proteinlerin aktivasyonu için gereklidir ve aynı zamanda indirgeyici ajanlar ve hücresel antioksidanlar için önemlidir. Hemoglobin, serum albumini ve GSH muhtemelen kanda en fazla bulunan tiyollerdir. (Friedman ve ark.1965, Blumental ve ark. 1995).

Bu çalışmada in vitro olarak çeşitli derişimlerde akrilamid ile etkileştirilen kanlara ait GSH düzeyleri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz verilerden akrilamid derişimi

arttıkça GSH düzeyinin anlamlı ölçüde azaldığı bulunmuştur. Bu azalış, akrilamid derişimi 0,25 mM olduğunda %61,5, 0,5 mM olduğunda %72,3, 1 mM olduğunda %76,9 ve 5 mM olduğunda ise %78,5 oranındadır (Çizelge 4.4).

Srivastava ve ark. (1983) karaciğerde ve beyinde akrilamidin GSH düzeyine olan etkisini araştırmışlar ve akrilamidin karaciğerde ve beyinde GSH miktarının azalmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Dixit ve ark. (1984) sıçan eritrositlerinde GSH ve akrilamidin etkileşimi ile ilgili araştırma yapmışlar ve akrilamid varlığında GSH miktarının azaldığını belirlemişlerdir. Tong ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada GSH ile akrilamidin reaksiyona girdiğini ve bunun sonucunda GSH miktarının azaldığını rapor etmişlerdir. Bulgularımız bu çalışmaların sonuçları ile uyumludur.

Yaptığımız çalışmada farklı derişimlerdeki akrilamidin hemoglobin ve albumin düzeylerine olan etkileri de araştırılmıştır. Kan örneği 0,25 mM akrilamid ile etkileştirildiğinde hemoglobin düzeyinde %25,8, albumin düzeyinde %50,3'lük bir azalma saptanmıştır.Akrilamid miktarına bağlı olarak belirlenen hemoglobin ve albumin düzeyindeki bu azalışın akrilamid derişimi 0,5 mM olduğunda hemoglobin için %49,1 , albumin için %91,5 , 1mM olduğunda hemoglobin için %55,8 , albumin için %91,6 ve 5mM olduğunda ise hemoglobin için %66,3 albumin için ise %92,9 olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.3 ve 4.5).

Akrilamid hemoglobinin amino terminal ucuyla reaksiyona girmekte ancak tiyol gruplarının akrilamidle daha hızlı reaksiyona girdiği bilinmektedir (Bergmark ve ark. 1993). Yaptığımız bu çalışmada akrilamid miktarına bağlı olarak hemoglobin ve albumin düzeyinde belirlenen azalmalar karşılaştırıldığında albumin miktarındaki azalmanın hemoglobin miktarındaki azalmaya oranla daha fazla olduğu saptanmıştır.

Tong ve ark. (2004) serum albumini ile akrilamidin reaksiyonunu incelemişler ve tiyol gruplarının akrilamid ile reaksiyona girdiğini tespit etmişlerdir. Schettgen ve ark. (2004) hemoglobin düzeyinin akrilamid varlığında azaldığını, Paulsson ve ark. (2002) çeşitli dozlarda akrilamid ile muamele edilen eritrositlerdeki hemoglobin miktarının azaldığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda ayrıca akrilamidin hücre zarı Na^+-K^+ ATPaz aktivitesine olan etkisi araştırılmıştır.

Yaptığımız çalışmada akrilamid ile etkileştirilmeyen eritrositlerdeki Na^+-K^+ ATPaz spesifik aktivitesi 1,66 µmol Pi/mg prot/saat olarak belirlenmiştir. 0,25 mM derişimdeki akrilamid ile etkileştirilen zar örneğindeki Na^+-K^+ ATPaz spesifik aktivitesi akrilamid içermeyen örnekle karşılaştırıldığında Na^+-K^+ ATPaz spesifik aktivitesinde %29,5'lik bir inhibisyon bulunmuştur. Bu inhibisyonun akrilamid derişimi 0,5 mM olduğunda %59,1 , 1 mM olduğunda %82,5 ve 5 mM olduğunda ise %88,5 olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.7).

Akrilamid derişiminin artmasına bağlı olarak Na^+-K^+ ATPaz spesifik aktivitesinin azaldığı ve 5 mM akrilamid derişiminde enzim spesifik aktivitesindeki azalma 1 mM akrilamid derişimindeki azalma ile karşılaştırıldığında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. Enzimin spesifik aktivitesindeki bu azalma akrilamid varlığında plazma zarında bulunan Na^+-K^+ ATPaz enziminin inhibe olmasından kaynaklanmaktadır. Ancak yaptığımız literatür çalışmasında direkt farklı derişimlerdeki akrilamidin Na^+-K^+ ATPaz üzerine etkisini inceleyen çalışmaya rastlanmadığından bulgularımız literatürle tartışılamamıştır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1) Farklı derişimlerde (0,25mM, 0,5mM, 1mM, 5mM) akrilamid ile etkileştirilen kandaki hemoglobin düzeyinde bir azalma saptanmıştır. Bu azalmanın 0,25mM akrilamid derişiminde %25,8 iken akrilamid derişimi 0,5mM olduğunda %55,8 olduğu tespit edilmiştir.
2) Akrilamid derişimi 0,25mM olduğunda dahi kandaki GSH düzeyinde %61,5 oranında oldukça büyük bir azalma saptanmıştır.
3) Derişimi az da olsa akrilamid ile etkileştirilen kandaki albumin düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır.
4) Yaptığımız çalışmada akrilamidin Na^{+}-K^{+} ATPaz enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

Akrilamid sadece işlenmiş gıda ürünlerinde değil evde yüksek sıcaklıkta pişirilen gıdalarda da oluşabilmektedir. Yaptığımız bu in vitro çalışmalara ilave olarak akrilamidin in vivo etkileri de araştırılabilir.

KAYNAKLAR

ATKINSON, A., GATENBY, A.D., LOWE, A.G., 1973. The determination of inorganic orthophosphate in biological systems. Biochim. Biophys. Acta, 320:195.

AWAD, M.E., ABDEL-RAHMAN, M.S. AND HASSAN S.A., 1998. Acrylamide toxicity in isolated rat hepatocytes. Toxicol. in Vitro, 12:699-704.

BAUM, M., FAUTH, E., FRITZEN, S., HERRMANN, A., METRES, P., MERZ, K., RUDOLPHI, M., ZANKL, H., AND EISENBRAND, G., 2005. Acrylamide and glycidamide: genotoxic effets in V79-cells and human blood. Mutation Res./Gen. Toxicol. and Environ. Mutagen., 580:61-69.

BECALSKI, A., LAU, B.P.Y., LEWIS, D., SEAMAN, S.W., 2003. Acrylamide in foods: occurrence, sources and modelling. J. Agricult. and Food Chem., 51(3):802-808.

BERGMARK, E., CALLEMAN, C.J., HE, F., COSTA, L.G., 1993**.** Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. Toxicol. Appl. Pharmacol., 120:45-54.

BESARATINIA, A. AND PFEIFER, G.P., 2005**.** DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. Mutation Res./Gen. Toxicol. and Environ. Mutagen., 580:31-40.

BLASIAK. J., GLOC, E., WOZNIAK, K., AND CZECHOWSKA, A., 2004. Genetoxicity of acrylamide in human lymphocytes. Chemico-Biological Interac., 149:137-149.

DIXIT, R., DAS, M., SETH, K.P., AND MUKHTAR, H., 1984. Interaction of acrylamide with glutathione in rat erythrocytes. Toxicol. Letters, 23:291-298.

DURLING, L.J.K., AND ABRAMSSON-ZETTERBERG, L., 2005. A comparison of genetoxicity between three common heterocyclic amines and acrylamide. Mutation Res./Gen. Toxicol. and Environ. Mutagen., 580:103-110.

FRIEDMAN, M., CAVIS, J.F., WALL, J.S., 1965. Relative nucleophilic reactivities of amino groups and mercaptide ions in addition reactions with alpha, beta-unsaturated compounds. J. Am. Chem. Soc., 87:3672- 3682.

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biüret reaction. J. Biol. Chem., 66:177-751.

HANAHAN, U.J. AND ECHOLM, J.E., 1974. Mth. Enzymol., 31:168-172.

KAMPEN, E.J., 1961. Klinik Kimya. s.78-82.

LINGNERT, H., 2002. Acrylamide in food–mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. The Swedish Institute For Food and Biotechnology Chairman of Expert Committee.

LOPACHIN, R.M., ROSS, J.F., LEHNING, E.J., 2002. Nerve terminals as the primary site of acrylamide action: a hypothesis. Neuro Toxicol., 23:43-59.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., AND RANDAL, R.S., 1951. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

MENG, F.G., ZHOU, H.W., AND ZHOU, H.M., 2001. Effects of acrylamide on creatine kinase from rabbit muscle. The International Journal of Biochemistry & Cell biology., 33:1064-1070.

MURRAY, R.K., MAYES, P.A., GRANNER, D.K., RODWELL, V.W., 1991. Harper's Biochemisry. p.48-58.

ODLAND, L., ROMERT, L., CLEMEDSON, C., WALUM, E., 1994**.** Glutathione content, glutathione transferase activity and lipid peroxidation in acrylamide- treated neuroblastoma N1E 115 cells. Toxicol. in Vitro, 8:263-267.

PATEL, J.M., BLOCK, E.R., 1993. Acrolein induced injury to cultured pulmonary artery endothelial cells. Toxicol. and Appl. Pharmacol., 122:46-53.

PAULSSON, B., GRAWE, S. AND TORNQVIST, M., 2002. Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. Mutation Res., 516:101-111.

READING, H.W., AND ISBIR, T., 1980. The role of cation activated ATPase in transmitter releare from the art iris. QJ Exp Physiol., 65:105.

ROBINSON, J.D., 1974. Cation interactions with different functional states of the Na^+-K^+ ATPase. Ann-New York Acad Sci., 242: 185.

ROSSIER, B.C., GEERING, K.G., AND KRAEHENBUHL, J.P., 1987**.** Regulation of the sodium pump:how and why?. Trends Biochem. Sci., 12: 483.

SCHETTGEN, T., ROSSBACH, B., KUTTING, B., LETZEL, S., DREXLER, H., AND ANGERER, J., 2004. Determination of hemoglobin adducts of acrylamide and glycamide in smoking and non-smoking persons of the general population. Int. J. Hygiene and Environ. Health, 207:531-539.

SRIVASTAVA, S.P., DAS, M., AND SETH, P.K., 1983. Enhancement of lipid peroxidation in rat liver on acute exposure to styrene and acrylamide a consequence of glutathione depletion. Chemico-Biological Interact., 45:373-380.

SUMNER, S.J.S., FENNELL, T.R., MOORE, T.A., CHANAS, B., GONZALEZ, F., GHANAYEM, B. I., 1999. Role of cytochrome P4502E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in Mice. Chem. Res. Toxicol., 12:1110-1116.

TONG, G.C., CORNWELL, W.K., MEANS, G.E., 2004. Reactions of acrylamide with glutathione and serum albumin. Toxicol. Letters, 147:127-131.

YANG, H.J., LEE, S.H., JIN, Y., CHOI, J.H., HAN, D.U., CHAE, C., LEE, M.H., AND HAN, H.C., 2005. Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. Reproductive Toxicol., 19:527- 534.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Adana'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1999 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi, Buca Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitimi Bölümünden mezun oldum. 2000 yılından bu yana sınıf öğretmeni olarak görev yapmaktayım.