



**AKRİLAMİD'İN ZEBRA BALIKLARI
(*Danio rerio*)'NDA SUBLETAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Saniye PERÇİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Saniye PERÇİN

27/12/2021

AKRİLAMİD'İN ZEBRA BALIKLARI (*Danio rerio*)'NDA SUBLETAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Saniye PERÇİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2021

ÖZET

Akrilamid (C_3H_5NO , CAS No. 79-06-1), aktifleştirilmiş bir çift bağ içeren, kristal ve kokusuz özelliklere sahip beyaz renkte görünen, çevreden doğal bir kaynağı olmayan endüstriyel doymamış bir amit ve katı bir monomerdır. Birçok kaynakta oluşması ve çoğu sektörde kullanılması sebebiyle hayatımızın neredeyse her yerinde karşımıza çıkabilecek olan akrilamid canlılara farklı şekillerde zarar vermektedir. Akrilamidin düşük konsantrasyonlarının bile farklı canlı türlerinde hasar oluşturduğu saptanmış ve genotoksik, nörotoksik, karsinojenik etkileri sebebiyle endişe yaratan bir kimyasal olarak görülmesine neden olmuştur. Bu çalışmada ekotoksikolojik çalışmalarda model organizma olarak kullanılan zebra balıklarında (*Danio rerio*) akrilamidin akut toksik etkisi ve subletal konsantrasyonlarının DNA üzerinde yarattığı hasar incelenmiştir. 96 saatlik LC_{50} değeri 98,60 mg/L (84,47-111,28 mg/L-%95 güven aralığı) olarak saptanmıştır. 96 saatlik LC_{50} değerinin 1/2 ve 1/10 değerleri subletal konsantrasyonlar olarak kullanılmış ve 24 ile 96 saat süreyle 10 ve 50 mg/L akrilamide maruz kalan erişkin zebra balıklarında kontrol grubuna göre DNA hasarı olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Sonuç olarak akrilamide kısa süreli ve subletal maruziyetin sucul ekosistemde DNA hasarına yol açtığı saptanmıştır.

Bilim Kodu : 90319

Anahtar Kelimeler : Akrilamid, zebra balığı, *Danio rerio*, subletal etki

Sayfa Adedi : 43

Danışman : Prof. Dr. Aysel Çağlan GÜNAL

DETERMINATION OF SUBLETHAL EFFECTS OF ACRYLAMIDE ON
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

(M. Sc. Thesis)

Saniye PERÇİN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2021

ABSTRACT

Acrylamide (C_3H_5NO , CAS No. 79-06-1) is an industrial unsaturated amide and solid monomer with an activated pair of bonds, appearing in white with crystalline and odorless properties, with no natural source from the environment. Acrylamide, which can appear almost anywhere in our lives due to its formation in many sources and its use in most sectors, harms living things in different ways. Even low concentrations of acrylamide were found to cause damage to different species and were seen as a chemical that caused concern due to its genotoxic, neurotoxic, carcinogenic effects. In this study, the acute toxic effects of acrylamide in zebrafish (*Danio rerio*) used as model organisms in ecotoxicological studies and the damage caused by sublethal concentrations on DNA were examined. The 96-hour LC_{50} value was 98.0 mg/L (84.7-111.28 mg/L-95% confidence interval). The 1/2 and 1/10 values of the 96-hour LC_{50} were used as sublethal concentrations and DNA damage was detected in adult zebrafish exposed to 10 and 50 mg/L acrylamide for 24 to 96 hours compared to the control group ($p<0,05$). As a result, short-term and sublethal exposure to acrylamide was found to cause DNA damage in the aquatic ecosystem.

Science Code : 90319

Key Words : Acrylamide, zebrafish, *Danio rerio*, sublethal effects

Page Number : 43

Supervisor : Prof. Dr. Aysel Çağlan GÜNAL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	ix
REİSMLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Akrilamid	3
2.2. Akrilamid Toksisitesinin Mekanizması	4
2.2.1. Gıdalarda akrilamid.....	6
2.2.2. Akrilamidin su arıtımında kullanılması	8
2.2.3. Akrilamid ile yapılan <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> deneyler	9
2.3. DNA Hasarı ve Oksidatif Stres	10
2.4. Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>)	11
2.4.1. Akrilamidin zebra balıkları üzerindeki toksik etkileri	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Deney Organizması.....	17
3.1.1. Araştırma yeri	17
3.1.2. Akvaryum ve suyun özellikleri	17
3.1.3. Deneyde kullanılan envanterler.....	18
3.2. Yöntem	19

	Sayfa
3.2.1. Akut toksisite	19
3.2.2. Subletal deney	20
3.3. Biyokimyasal Analiz	22
3.3.1. DNA ekstraksiyonu	22
3.3.2. DNA hidrolizi	22
3.3.3. 8OHdG analizi	23
3.4. İstatistik Değerlendirme	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	27
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	43

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı gıdalardaki maksimum akrilamid miktarları	7
Çizelge 2.2. Dünya kahve tüketim verileri (Ekim-Kasım) (bin çuval).....	7
Çizelge 2.3. Akrilamide maruz kalan sucul canlılar için LC ₅₀ değeri	9
Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan suyun kimyasal özellikleri	18
Çizelge 3.2. Aligent 6420 LC-MS/MS özellikleri	24
Çizelge 3.3. LC-MS/MS cihaz parametreleri özellikleri	24
Çizelge 4.1. Akrilamidin zebra balığı üzerindeki 96 saatik LC ₅₀ değerleri	27
Çizelge 4.2. 8OHdG (ng/100 mg doku) sonuçları	30

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Akrilamidin formları.....	5
Şekil 2.2. Gıdalarda akrilamid sentezi	6
Şekil 2.3. Zebra balığı gelişim evreleri.....	12
Şekil 3.1. Kalibrasyon eğrisi	26
Şekil 4.1. Yetişkin zebra balıklarında (<i>Danio rerio</i>) 96 saatlık akrilamid için hesaplanan probit değeri ve regresyon grafiği	28
Şekil 4.3. 8OHdG sonuçları grafiği	30

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Deneyde kullanılan akrilamid.....	19
Resim 3.2. Deney başlangıcı akvaryumlar	20
Resim 3.3. Deney ortamı	21
Resim 3.4. Balıkların boy-kilo ölçümü.....	21
Resim 4.1. Akrilamide maruz kalmış balıkların yüzme seviyeleri	29



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
kg	Kilogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimol
°C	Santigrat Derece
W	Watt
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

Açıklamalar

8OHdG	8-hidroksideoksiguanozin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GC	Gaz Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GSH	Glutatyon
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
LC	Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle /Kütle Spektrometresi
SNFA	İsveç Ulusal Gıda İdaresi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Günümüzde karasal ya da sucul canlılar farkında olmadan birçok toksik maddeye maruz kalmaktadır. Bu toksik maddelerin oluşum, yayılım ve etki mekanizmaları araştırmalar yapıldıkça zamanla ortaya çıkmaktadır. Neredeyse her gün ve neredeyse her insanın karşısına çıkan toksik maddelerden biri de akrilamiddir. Akrilamid, 1893 yılında kimyasal bir bileşik olarak keşfedilmiştir. 1994 yılında Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) insanlar için potansiyel kanser yapıcı madde olarak sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırma Dünya Sağlık Örgütü (WHO) danışmanlığı tarafından 2002 yılında onaylanmıştır [1]. Sınıflandırma sonrası dönemde özellikle çalışmalar artmış ve olası kaynakları keşfedilmeye ya da kullanım alanları araştırılmaya çalışılmıştır.

Akrilamid özellikle yüksek sıcaklıkta işlem gören gıdalarda ortaya çıkmaktadır. Patates kızartması, patates cipsi, kurabiyeler ve kahveler gibi yüksek karbonhidratlı yiyeceklerde pişirme, kızartma veya fırınlama gibi yüksek sıcaklıkta (>120 °C) işlenen gıdalarda yüksek konsantrasyonlarda akrilamid varlığı bildirilmiştir [2]. Gıdadaki oluşumunda özellikle Maillard reaksiyonunun (esmerleşme reaksiyonu) meydana gelmesi gerekmektedir. Pek çok ve sıkça tüketilen gıdalarda bu reaksiyonun meydana gelmesi canlıların akrilamide maruz kalma olasılığını artırmaktadır. Maruz kalma sonucunda da farklı şekillerde sağlığı olumsuz yönde etkilemektedir.

Akrilamidin çevresel uygulamaları, bitkilere su ve besin tedarikini iyileştirme, toprağın erozyon kontrolü, arazi iyileştirme planları, bahçecilik ile ilgili kullanımlar veya pestisit kullanımları için püskürtme sapmasını azaltmakta kullanılır. Hidrofilik özelliğinden dolayı, akrilamid kum, organik madde veya killere üzerinde adsorpsiyonla zayıf bir şekilde tutulur [3]. Akrilamid toprakta biyolojik bozulmaya maruz kalır. 22 °C'deki aerobik koşullar altında, topraktaki 25 mg / kg akrilamidin yarı ömrü 18-45 saattir. Azalan akrilamid konsantrasyonu ve artan sıcaklık ile bozunma oranı artar. Çözünür olması sebebiyle toprağa karışan akrilamidin sızmaya eğilimli olduğu ve buharlaşma, adsorpsiyon ve biyolojik birikim gibi süreçlerden çok az etkilendiği ortaya konulmuştur; bununla birlikte, toprakta ve suda biyolojik bozunmaya maruz kalır, bu da olası süzülme için mevcut akrilamid miktarını etkiler. Biyolojik bozunmaya yatkınlığı göz önüne alındığında, akrilamidin sızıntı potansiyeli ve yeraltı suyu kirliliği, makro gözenekli akış yoluyla toprakta hızlı bir şekilde

taşınması durumunda en yüksek olacaktır [4]. Akrilamid toksik, kanserojen ve mutajenik özellikler gösteren kimyasallar listesine kayıtlıdır. Akrilamid aynı zamanda birçok sektörde farklı amaçlarla da kullanılmaktadır. Örnek olarak su ve atık su arıtma tesislerinde ülkemizde çok yaygın olmamakla beraber flokleştirici madde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tütün dumanında da akrilamidin varlığı tespit edilmiştir.

Akrilamidin nörotoksik etkisi kendini öne çıkarmış ve araştırmalar bu yönde yoğunlaşmıştır. Fakat yapılan diğer çalışmalar akrilamidin kanserojen ve nörotoksik etkisi dışında da zararlarının olduğunu göstermiştir. Bu zararlar genotoksisite, üreme toksisitesi, iç organlarda hasar ve deri teması varsa deri iltihaplanması (dermatit) şeklinde kendini göstermektedir.

Zebra balığı (*Danio rerio*), OECD tarafından ekotoksikolojik çalışmalarda standart test organizması olarak kullanılan sucul omurgalıdır. Üreme kapasitesinin yüksekliği, ucuz oluşu, hastalık ve gelişim genlerinin yapısal olarak insaninkine benzerlik gösteren bir genom yapısı olması sebebiyle, laboratuvar çalışmalarında kullanılan bir tür haline gelmiştir.

Bu çalışmada ekotoksikolojik çalışmalarda model organizma olarak kullanılan zebra balığında (*Danio rerio*) akrilamidin akut toksik etkisi ve subletal konsantrasyonlarının DNA üzerinde yarattığı hasarın incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular sucul ekosistemlerde akrilamidin oluşturduğu etkilerin saptanmasını sağlayarak ulusal ve uluslararası literatüre katkılar sağlayacaktır. Ayrıca akrilamid ile ilgili sucul ortamda çevresel risk değerlendirmesine ilişkin veri oluşturacaktır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Akrilamid

Akrilamid (C_3H_5NO , CAS NO. 79-06-1) (Şekil 2.1.C), aktifleştirilmiş bir çift bağ içeren, organik, kristal ve kokusuz özelliklere sahip beyaz renkte görünen, çevreden doğal bir kaynağı olmayan endüstriyel doymamış bir amit ve katı bir monomerdur [5]. Elementel analize göre akrilamidin yapısında %50,69 karbon, %22,51 oksijen, %19,71 azot ve %7,09 hidrojen atomları bulunur [6,7]. Suda veya diğer polar çözücülerde (metanol, etanol vb.) kolayca çözünebilen yapıdadır [8,9]. Akrilamid, bilinen tüm monomerler içinde serbest radikal polimerizasyonu için en reaktif monomerdur [10]. Ek olarak akrilamid, *in vivo* olarak epoksidi olan glisidamide biyolojik olarak dönüştürülür. Glisidamid hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak genotoksik özelliklere sahiptir [11].

Akrilamid kimya mühendisliği, moleküler laboratuvarlar, su arıtma tesisleri, tekstil, madencilik, kâğıt üretimi ve kozmetik endüstrisinde kullanılır [12]. Ek olarak, toprakta erozyon kontrolü, arazi restorasyon planlamaları, bitkilere su ve besin tedarikini iyileştirmek için bahçecilik veya pestisit kullanımında sprey sürüklenmesini azaltmada yardımcı ürün olarak kullanılmaktadır [13].

Nisan 2002’de Stockholm Üniversitesi ve İsveç Ulusal Gıda İdaresi (SNFA)’den bir grup araştırmacı, yaygın olarak tüketilen fırınlanmış vekızartılmış yiyeceklerde önemli miktarda akrilamid tespit ettiklerini bildirmişlerdir [14]. İsveç bildirisi, gıdalardaki yüksek seviyelerde akrilamid varlığına ilişkin ilk rapordur [15].

WHO’nun 2011 yılı raporunda, içme suyunda 0,5 $\mu g/L$ ’den yüksek akrilamid limitlerinin kanser riskini artırabileceği bildirilmiştir. Ayrıca su arıtma tesislerinde kullanılan flokülanlarda kalıntı akrilamid seviyeleri 0,5 – 600 mg/L arasında değişmektedir [16]. Tüm bunlara ek olarak akrilamid sigara dumanında bulunan ana bileşiklerden bir tanesidir ve yemekten sonra akrilamide maruz kalmanın ikinci önemli kaynağı olarak görülmektedir [17, 18].

Akrilamid genotoksisite, kanserojenite ve nörotoksisite dahil olmak üzere çeşitli toksik özelliklere sahiptir. IARC, 1994'te akrilamidi olası bir insan kanserojeni olarak sınıflandırılmıştır (Grup 2A) [15]. 2021 yılında yapılan bir çalışma da insanda özellikle de kadınlarda gıda ile alınan akrilamidin meme, endometrial ve yumurtalık kanseri riskinde anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [3].

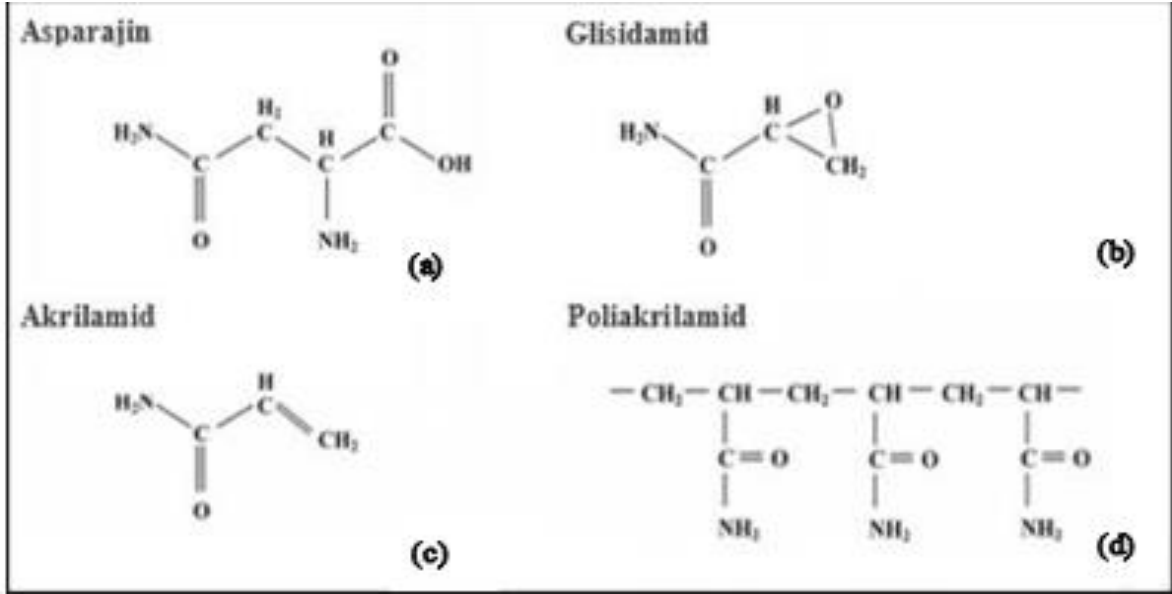
Ayrıca Gıda Bilimsel Komitesi (SCF, 2002) akrilamidin genotoksik olduğunu bildirmiştir [4]. İlâveten akrilamidin endokrin bozucu potansiyelinin olduğu ve özellikle de tiroid hormonları üzerinde etkilerinin olduğu düşünülmektedir [19].

2.2. Akrilamid Toksisitesinin Mekanizması

Akrilamidin vücuda girmesinin üç farklı yolu vardır.

1. Sindirim sistemi yolu,
2. Solunum sistemi yolu,
3. Cilt emilimi.

Ağız yoluyla verilen akrilamid karaciğerde metabolize edilir ve bu sitokrom P450 ile gerçekleşir. Biyotransformasyonun birinci aşamasında hem insanlarda hem de deney hayvanlarında, yutulan akrilamidin önemli bir kısmı metabolik olarak, akrilamidin kanserojenitesinde önemli bir rol oynaması muhtemel olan kimyasal olarak reaktif ve genotoksik epoksit glisidamite (2,3-epoksipropan amid) dönüştürülür [8,20]. Akrilamid, in vivo olarak epoksidi olan glisidamit'e biyolojik olarak dönüştürülür. Biyotransformasyonun ikinci aşaması sırasında, akrilamid ve glisidamid, glutatyon S-transferaz ailesinden enzimler tarafından indirgenmiş glutatyon (GSH) ile birleştirilir ve bu da glutatyon konjugatlarının oluşumuna yol açar. GSH ile reaksiyon sonucunda akrilamid ve türevleri toksik özelliklerini kaybeder ve organizmadan daha kolay atılabilir. Akrilamid günlük dozunun sadece yaklaşık %50'si, esas olarak idrarda olmak üzere organizmadan atılır [8].



Şekil 2.1. Akrlamidin formları a) Asparajin, b) Glisidamid, c) Akrlamid, d) Poliakrlamid [21]

Akrlamid üç farklı şekilde reaktiftir [75].

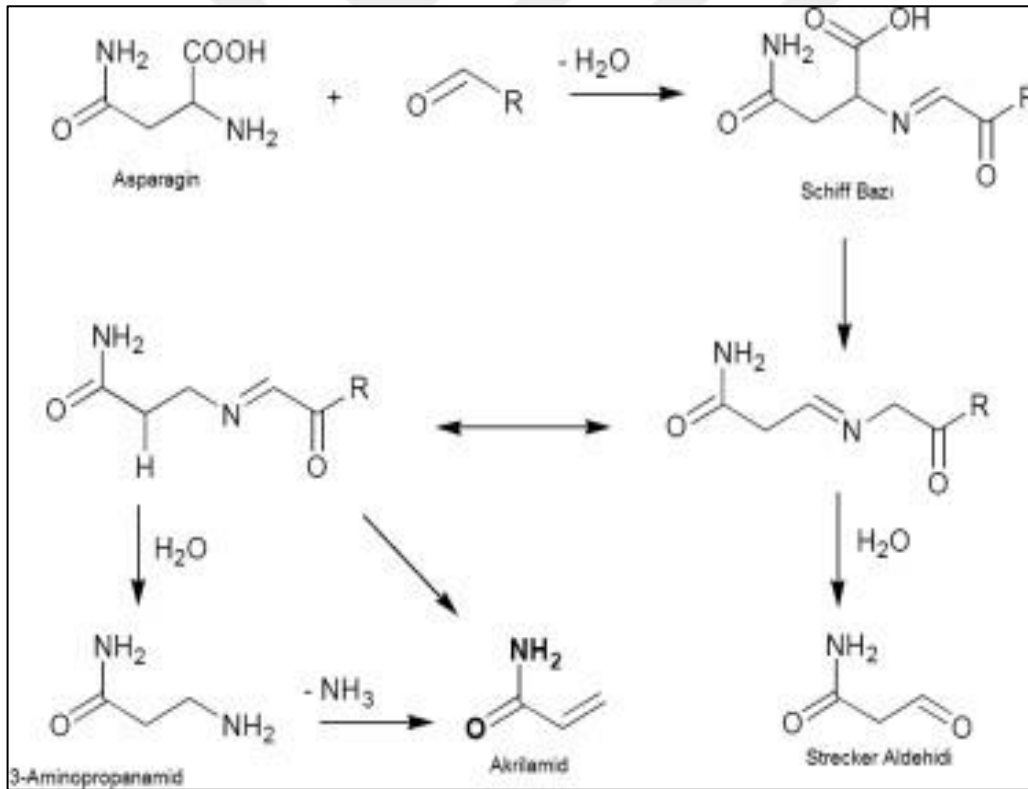
- Radikal aracılı polimerizasyona uğrayabilir. Bu süreç en iyi anaerobik olarak elde edilir.
- α - β doymamış karbonil bileşiği olarak akrlamid, bir Maillard alıcısı olarak işlev görebilir ve tiyol, hidroksil veya amino gruplarına eklenebilir. Tiyol ilavesi esas olarak akrlamid-glutatyon konjugantlarına idrarla atılabilir son ürün vererek büyük ölçüde bir detoksifikasyon yolunu temsil eder.
- Akrlamid bir epoksit türevi olan glisidamide metabolize edilebilir ve sitokrom P450 2E1 tarafından DNA (deoksiribonükleik asit) ve diğer makro moleküllere karşı kolayca reaktiftir.

Akrlamid hem insanlarda hem de deney hayvanlarında metabolik olarak glisidamide dönüşür ve bu dönüşüm akrlamid kaynaklı DNA eklentisinin oluşumunda zorunlu bir adımdır [22]. Ayrıca akrlamid glisidamiden daha zayıf bir toksindir. P450 2E1'in kimyasallar tarafından uyarılması, glisidamid üretimini artırabilir ve böylece in vivo akrlamidin genotoksitesini artırabilir. Akrlamid ve glisidamid, hücresel antioksidanlar ve mitotik proteinler gibi biyolojik olarak önemli moleküller dahil olmak üzere çeşitli nükleofillerle yoğunlaşabilir ve bunlara zarar verebilir. Akrlamid genotoksitesinin öncelikle sitokrom P450 enzimleri, özellikle de P450 2E1 tarafından üretilen bir epoksit

metaboliti olan glisidamide çevirdiği yaygın olarak kabul edilmektedir, ancak akrilamidin kendisinin potansiyel rolü göz ardı edilmemelidir [23].

2.2.1. Gıdalarda akrilamid

Akrilamid, gıdalardaki en yaygın toksinlerden biridir [24]. Gıdalarda akrilamid bir reaksiyon sonucu oluşur ve reaksiyon adını Louis Camile MAILLARD'dan alır [25]. Gıdalarda akrilamid, patates ve tahıllardaki ana aminoasit olan asparajin (Şekil 2.1.A) ile fruktoz ve glikoz gibi indirgeyici şekerler arasındaki Maillard reaksiyonunun bir sonucu olarak 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ısıtılma sırasında gıda bileşenlerinden kolaylıkla üretilir [26]. Akrilamid reaksiyon sırasında oluşan ara bileşenlerinden biridir (Şekil 2.2) [27].



Şekil 2.2. Gıdalarda akrilamid sentezi

Diğer adıyla da esmerleşme reaksiyonu olan Maillard reaksiyonu nemin, sıcaklığın ve pH'nın yükselmesiyle hızlanır [25]. Gıdalarda akrilamid analizi için LC-MS, LC-MS/MS, GC, GC-MS ve HPLC yöntemlerinin sıkça kullandığı görülmektedir [28].

Çizelge 2.1. Bazı gıdalardaki maksimum akrilamid miktarları

Gıda Türü	Miktar($\mu\text{g/kg}$)
Kavrulmuş Kahve	975
Patates Cipsi	3770
Kızartılmış Patates	5200
Tost Ekmeği	1430
Ekmek	130
Kahvaltılık Gevrek	1057
Kakao Tozu	909
Çiğ Patates	<50
Toz Kahve	4948
Fındık	339
Bebek Bisküvisi	150-610

Üzerinde çokça çalışma yapılmış ürünlerden biri de Çizelge 2.1.'de [29,30] gösterilen kahvedir. Çoğu ülkede bolca tüketilen kahve günlük akrilamide maruz kalmanın önemli kaynaklarından biridir. Örneğin; Türk kahvesi 4,10 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, French press 3,19 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, espresso 2,13 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ ve filtre kahve 2,95 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ akrilamid barındırır. Ayrıca suda yüksek oranda çözünür akrilamidin öğütülmüş kahveden kolayca oluştuğu bilinmektedir [31]. Dünya kahve tüketim verilerine de bakıldığında (Çizelge 2.2.) Türkiye'nin kahve tüketiminin yükselişte olduğu görülmektedir [32,33].

Çizelge 2.2. Dünya kahve tüketim verileri (Ekim-Kasım) (bin çuval)

	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19	2019/20	2020/21
Türkiye	66 360	72 000	82 560	104 400	102 660	105 240
İsviçre	64 140	65 280	60 780	64 740	63 600	64 440
Kanada	215 700	216 000	229 740	241 200	235 740	240 660
Rusya	258 180	278 340	259 440	281 460	277 860	280 860
ABD	1 520 160	1 546 800	1 566 720	1.665.540	1 599 060	1 618 920
AB	2 556 240	2 534 880	2 429 460	2 506 080	2 385 480	2 415 060

2.2.2. Akrilamidin su arıtımında kullanılması

Su kirliliği, özellikle gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere dünyanın en önemli sorunlarından biridir. Bu ülkelerde, kirlenmiş suyun %90'ı alıcı ortama arıtılmadan deşarj edilmektedir. Kirleticiler arasında ağır metaller, besinler, mikroorganizmalar ve organik maddeler yer alabilir. Bu nedenle kirleticiler su kalitesini bozmakta, insan sağlığı ve ekosistem için tehlike oluşturmaktadır. Birçok kirletici koloidal parçacıklar (1nm-1µm çapında) halinde bulunur. Birbirlerini itmelerine neden olan elektrostatik yükleri (genellikle negatif) nedeniyle sürekli olarak askıda kalırlar. Bu nedenle, bu tür kirleticilerin çökmesi için flokülant kullanılması gerekir. Sentetik flokülant olarak en önemli ve yaygın kullanılanı poliakrilamiddir (Şekil 2.1.). Evsel atık sularda poliakrilamid giderim verimi KOİ-%98, BOİ-%54, N-%53 ve P-%57'dir [34,35]. Arıtma ve flokülasyon işlemi sırasında poliakrilamid kalıntısı, kalıntı salınımı ile içme suyunu kiretebilir. İçme suyundaki akrilamid düzeylerinin rutin analizleri, dünya genelindeki çoğu su tedarikçisi ve belediyeler tarafından, özellikle de gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkeler tarafından ihmal edilmektedir [36].

Bakteriler nitrojen ve karbon kaynağı olarak akrilamid kullanabilirler. Bakterilerin yardımıyla suda akrilamid bozunması 8-12 gün sürer ve kısa bir kalış süresinde kanalizasyon ve atık sularda tamamen bozunamaz. >2 mg/L üzerindeki konsantrasyonlar suda kolayca bozulmaz; bu nedenle bu konsantrasyonların mikroorganizmalar için toksik olduğu kabul edilmektedir. Akrilamid biyolojik bozunması için optimum su kalitesi parametrelerinin pH 6-8 ve sıcaklık 15-30 °C olduğu bildirilmiştir [36].

Polimerlerin yaklaşık %95'i flokülasyon aşamasında partiküller üzerinde absorbe olurlar. Polimerlerin %5'i ve tüm artık monomerler suda çözünmüş halde kalır, yüzey ve yeraltı sularında yayılabilir [37]. Suda yüksek oranda çözünür ve hareketli olduğu için akrilamid, içme suyu kaynaklarına kolayca deşarj olabilir. Geleneksel arıtma yöntemleriyle giderilemez, ozon, potasyum permanganat ile muamele konsantrasyonunu bir miktar azaltabilir. Ayrıca su içerisinde bakteriler tarafından bozunabilir [38]. Akrilamid biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik oksijen ihtiyacı, azot ve amonyağa dönüşümüne dayalı teorik değerin %54-75'idir [39].

Özellikle gıda endüstrisi çamuru yüksek organik madde içeriği ve önemli miktarda faydalı makro ve mikro besinler, toprağın fizikokimyasal özellikleri üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir ve bu atıkların tarımda kullanımını önerilmiştir. Avrupa Birliği yönetmeliklerine (EEC, 1774/2002) göre, diğer organik kalıntılar gibi çamur da yeterince arıtılmalı ve hijyenik olarak güvenli olduğu kanıtlanmalıdır. Daha spesifik olarak, çamur stabilizasyonunun amacı patojenleri azaltmak, rahatsız edici kokuları ortadan kaldırmak ve uçucu organik fraksiyonun biyolojik olarak indirgenmesi veya kimyasalların eklenmesiyle yapılan çürüme potansiyelini engellemek, azaltmak veya ortadan kaldırmaktır. Akrilamid çamur susuzlaştırma işleminde de kullanılmaktadır [40]. Arıtma işlemi bittiğinde, kalan çamur çökeltme lagünlerinde depolanır veya bazı durumlarda tarımsal uygulamalar için yayılabilir [37]. Akrilamidin sudaki çözünürlüğü ve minerallere ve organik maddelere karşı zayıf adsorpsiyonu, onu toprakta sızıntıya ve potansiyel bir yeraltı suyu kirleticisine duyarlı hale getirir [41].

2.2.3. Akrilamid ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneyler

Japonya'da 3-6 yaş arasındaki 230 erkek ve 198 kız çocuğu ile yapılan araştırmada 3 günlük gıda yolu ile alınan akrilamidin ergenlik öncesi dönemde özellikle erkek çocukların seks hormonlarını (androjen metabolizmasını) etkilediği belirtilmiştir [42]. Akrilamid, fareler ve ratlar için kanserojendir. Akrilamid alımında farelerde akciğer tümörü ve cilt tümörü oluştururken ratlarda beyinde, memede ve tiroid foliküllerinde tümör oluşumuna sebep olur [20]. Ek olarak, ratlarda yapılan deneylerde kan, beyin, kemik iliği, karaciğer, testis ve adrenal bezlerde DNA hasarı görülmüştür [2]. Sucul canlılar ile yapılan çalışmalarda LC₅₀ değerleri Çizelge 2.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Akrilamide maruz kalan sucul canlılar için LC₅₀ değeri

Sucul Canlılar	Süre (saat)	LC ₅₀ (mg/L)	Kaynak
<i>Rasbora heteromorpha</i>	96	130	[16]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	110	
<i>Poecilia reticulata</i>	168	35	
<i>Lepomis macrochirus</i>	-	100	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	96	411	[43]

<i>Heteropneustes fossilis</i>	24	104,13	[44]
	48	86,81	
<i>Danio rerio (embriyo)</i>	72	191,91	[45]
	96	156,4	
<i>Danio rerio (larva)</i>	72	167,04	[46]
<i>Clarias gariepinus</i>	96	133	[79]

Oreochromis niloticus ile yapılan çalışmada balıklar 8,96 µg/L akrilamide 24, 48, 72 ve 96 saat maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda beyin dokusunda serbest radikallerin olduğu gözlenmiş, nörotoksik bulguların görüldüğü belirtilmiştir [47].

2.3. DNA Hasarı ve Oksidatif Stres

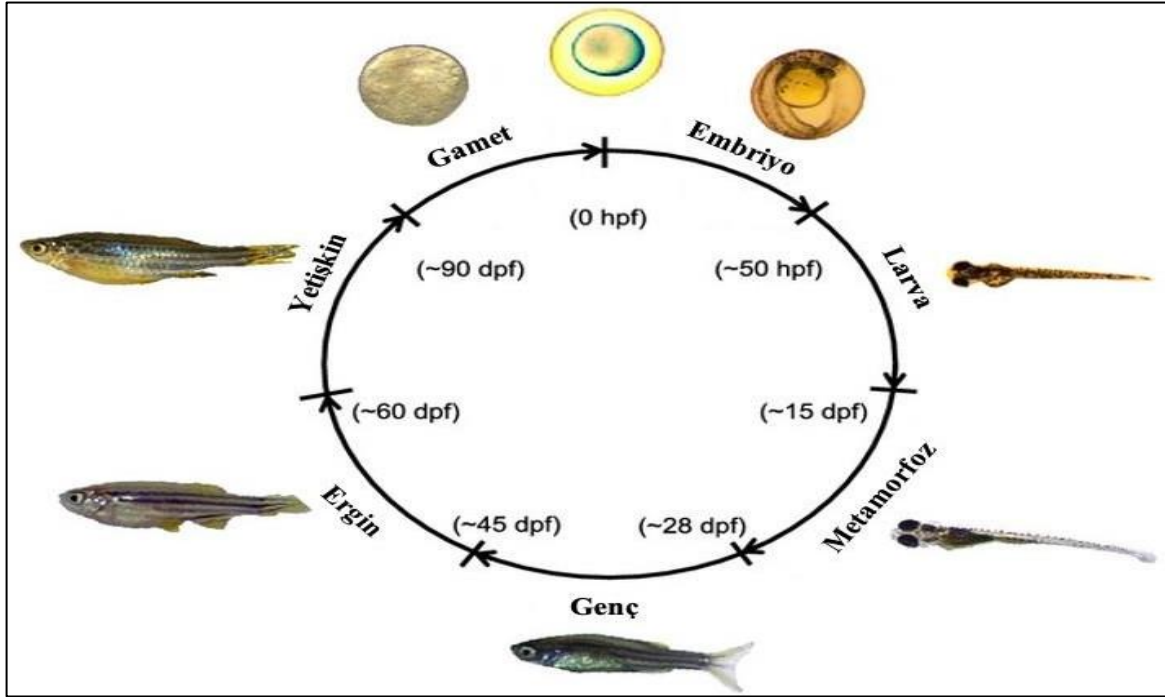
DNA, genetik bilgi deposudur ve türleri korumak için nesiller boyunca kararlı olmalıdır. Evrim için mutasyon gerekli olduğundan, DNA'nın kararlılığı mükemmel değildir [48]. DNA bütünlüğündeki değişiklikler normal hücresel süreçleri bozabilir ve doğrudan veya dolaylı olarak DNA ile etkileşime girerek genetik kararsızlığa neden olabilir [49]. DNA hasarı kendini tek baz değişimi, zincir kırıkları, aynı veya farklı DNA zincirleri arasında çapraz bağlama vb. gösterebilir [50]. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ile biyolojik sistemlerin reaktif araçları ortadan kaldırma veya hasarı onarma kapasitesi arasındaki negatif dengesizliğe oksidatif stres adı verilir. [49]. Özellikle gıdalar işlem gördükçe serbest radikal oluştururlar ve biyolojik sistemdeki antioksidanlarla olan dengenin bozulmasını sağlayarak oksidatif stres meydana getirirler. Oluşan serbest radikaller sayesinde, oksidatif stres oluşturan akrilamid [51] DNA'nın tamir mekanizmasını baskılayarak DNA hasarı oluşturur. Bu hasar genellikle DNA eklentisi oluşumu şeklinde görülür. Akrilamid, oksidatif strese neden olan bir maddedir [80].

Akrilamidin genotoksisitesinin çoğundan da glisidamidin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Doza bağlı olarak akrilamid *in vitro*ya göre *in vivo*da daha reaktiftir ve daha fazla DNA hasarı oluşturur. Akrilamid ve metaboliti olan glisidamide maruz kalınması sonucunda mutajenik klastojenik olarak etki ederek kendini gösterir. Akrilamid, CYP2E1'in etkisi ile oluşan epoksit türevi glisidamidin elektrofilik formu nedeniyle spesifik DNA eklentileri oluşturabilir. Glisidamid, guaninin N7-pozisyonları veya adenin N3- ve N1-pozisyonu (17-

19) ile reaksiyonlara bağı olarak birkaç spesifik DNA eklentisi oluşturur [26]. Örneğin farelerdeki *in vivo* deneylerinde gen mutasyonu ve kromozal anormallik oluştururken insanlarda bronşiyal epitel hücrelerinde tümör baskılayıcı gen olan TP53'te eklenti oluşturduğu bulunmuştur. Akrilamid karaciğerde metabolize olduktan sonra metaboliti olan glisidamide dönüşür ve akrilamid doygunluğa ulaşabilirken glisidamid doygunluğa ulaşmaz ve bu sebepten akrilamide göre daha mutajeniktir. Akrilamide ya da glisidamide maruz kalmanın sonucunda adenin-guanin (A-G) geçişi, guanin-sitozin (G-S) dönüşümü ve guanin-timin (G-T) transversiyonunda da artış olduğu görülmüştür [20].

2.4. Zebra Balığı (*Danio rerio*)

Zebra balığı Güneydoğu Asya kökenli küçük bir ayrı eşeyli tatlı su balığıdır ve genetik çalışmalar için memeli olmayan omurgalıların başında gelir. Doğal yaşam alanlarında, zebra balığı, avcılarının saldırılarını en aza indirmek için genellikle suyun dibine yakın bulunur. Döllenmeden 5 gün sonra, zebra balığı larvaları çoğunlukla paramecium ve rotifer gibi zooplanktonlarla beslenir ve genç larvalar 100 µm boyutuna kadar yapay yem veya canlı yemle beslenebilir. Zebra balığının yaygın olarak uygulanan beslenme oranı, vücut ağırlığının yaklaşık %4'ü kadardır. Zebra balığının en avantajlı özellikleri, tam dizili bir genom, genomunun kolay manipülasyonu, yüksek doğurganlık, kısa üreme süresi (yaklaşık 3 ay), hızlı embriyonik gelişim (24 saat) ve dış döllenmedir [52].



Şekil 2.3. Zebra balığı gelişim evreleri [83]

Zebra balığının gelişim evreleri Şekil 2.3.'te gösterilmiştir. Yetişkinleri 2-3 cm uzunluğundadır. Zebra balığı adını vücudunun her iki yanında birkaç yatay çizgiye sahip olası nedeniyle zebraya benzerliğinden alır. Koşullara bağlı olarak yaşam süreleri 3-5 yıl arasında değişmektedir. 1980'den beri zebra balığı, insan davranışının, gelişiminin ve hastalığının birçok ve çeşitli yönlerinin incelenmesi için popüler bir model organizma haline gelmiştir [53-55].

Zebra balığı, toksikoloji araştırmalarının ön saflarında yer almaktadır; su numunelerindeki toksinleri tespit etmek ve çevresel toksinlerin etki mekanizmalarını ve bunlarla ilgili hastalıkları araştırmak için bir araç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [56].

2.4.1. Akrilamidin zebra balıkları üzerindeki toksik etkileri

Zebra balık (*Danio rerio*)' larında akrilamidin miyelin kılıf üzerinde etkisi olduğu görülmüştür. Çalışmada döllenme sonrası 3 günlük zebra balıklarına, 8 saat boyunca 6,25 mM akrilamid uygulanmış, daha sonra 16 saat boyunca kimyasal bulunmayan tatlı suya aktarılmış ve bu uygulamadan sonra oligodendrositlerde ve Schwann hücrelerinde miyelin bazik protein (MBP) ekspresyonunda azalma görülmüştür. Bu sonuç akrilamidin ya MBP

üreten hücrelerin kaybını indüklediğini ya da MBP transkriptlerinin üretimini azalttığını göstermektedir [57].

5 günlük postlarva zebra balıkları 3 gün boyunca 0,5 mM ve 1,0 mM'e akrilamide maruz kalmasıyla kontrol grubuna kıyasla, bazal lokomotor aktivitesinde önemli ölçüde azalma ve görsel motor yanıtında belirgin bir düşüş görülmüştür. 1,0 mM uygulamasında ayrıca akustik/titreşime olan uyarılara tepkinde %44-60 azaldığı gözlemlenmiştir [46].

72 saat boyunca 0,75 mM akrilamide maruz kalan ergin zebra balıklarının davranış değişiklikleri incelenmiş ve maruziyet sonrası deney tanklarındaki zebra balıklarının yüzeydeki hareketleri azalmış ve dipte durma eğilimleri artmıştır. Ayrıca kortizol düzeyinin arttığı, hareketlerinin düzensizleştiği ve deri renginin koyulaştığı gözlemlenmiştir. Ayrıca balıklarda dopamin, norepinefrin, glutamat, aspartat ve serotonin düzeylerinin de önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır [58]. Davranış değişikliklerinin incelendiği başka bir çalışmada 3 gün süre ile 0,75 mM akrilamide maruz bırakılan ergin zebra balıklarında yüzme anormallikleri, ışığa yönelim ve yüzme hızında azalma gözlenmiştir [59].

Zebra balığı embriyoları 100, 300 ve 500 mg/L dozlarında akrilamide maruz bırakılmış ve dimetil-sülfoksit (DMSO-15 µL) çözücü olarak kullanılmıştır. Bu uygulama sonucunda tüm konsantrasyonlarda kuluçkadan çıkma süresinde gecikme ve kuluçka sürecini tamamlayan embriyo sayısında azalma, 32 saat içinde şiddetli perikardiyal ödem (özellikle 300 mg/L'de), yumurta kesesi ödemi, skolyoz ve kafatası kusurları saptanmıştır. 32 saat sonunda ise kalp atım sayısında ve kan akışında azalma gözlemlenmiştir. Akrilamid konsantrasyonu arttıkça etkiler daha da belirgin hale gelmiştir [60]. Zebra balıklarına döllenmeden hemen sonra 2,0 mM akrilamid uygulanmıştır. Döllenmeden 48 saat sonra perikardiyal ödem ve miyo-endokardiyal hücre sayıları ve mitotik hücreler önemli ölçüde azalmıştır [61].

2,0 mM akrilamide maruz kalan zebra balığı larvalarında reaktif oksijen seviyesi önemli ölçüde arttığı ve süperoksit dismutaz, glutatyon ve glutatyon-S-transferaz aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Akrilamid maruziyetinin atrioventriküler kanalda deformiteye ve kusurlu atrioventriküler kapakçığa yol açtığını görülmüştür [45]. Akrilamide 2,0 mM maruz kalan balıkların kalp boyutunda, ventrikül kesit alanında ve kan akışında azalmaya ve kontrollere kıyasla 96 saat sonrası sinüs venosus-bulbus arteriosus mesafesinde artışa neden olmuştur [45,61].

Akrilamid içeren (860 μ M akrilamid içeren suda yetiştirilen) *Artemia* ile beslenen ergin zebra balığı dalaklarında ciddi şekilde şişkinlik melanomakrofaj merkezinin ortaya çıkması, makrofajların aktivasyonu ve dalakta majör inflamatuvar sitokinlerin yukarı regülasyonu ile gösterildiği gibi bağışıklık tepkilerinin eşlik ettiği kist oluşumu, kanama ve inflamasyon dahil olmak üzere birçok dalak hasarları saptanmıştır [62].

Transgenik zebra balığı Tg'nin (Tp1: d2GFP; myl7: mCherry) embriyosu 7 gün boyunca 0-1,0 mM arasında değişen akrilamide maruz bırakılmıştır. Embriyolarda, düzensiz miyofibriller ve kardiyomiyositlerde proliferasyon ve anormal mitokondri morfolojisi gibi patolojik durumlar saptanmıştır. [63]. Akrilamidin zebra balıklarında retina hasarına neden olduğu ve 36 saat süreyle 2,0 mM akrilamide maruz kalan ergin zebra balıklarında retinasında dış segmentlerinin neredeyse kaybolduğu gözlemlenmiştir [64].

24 saatten küçük embriyolar, 10 gün boyunca veya yumurtadan çıkana kadar akrilamide maruz bırakılmıştır. Yumurtaların %50'sinin hayatta kalabilmesi için akrilamid miktarı LC₅₀ değeri 585 mg/L-48 saat olarak belirlenmiştir. Embriyoların maruz kalması, konsantrasyona bağlı bir şekilde kuluçka kabiliyetini ve larva yaşam oranını önemli ölçüde azaltmıştır [65].

Nörotoksosite

4 günlük zebra balığı larvaları 8 saat boyunca 6,25 mM akrilamide maruz bırakılmış ve sonrasında 16 saat akrilamid olmayan su içerisinde bekletilmiştir. Bunun sonucunda dopaminerjik nöron kaybı, nöronal apoptoz, optik ve motor nöronlarda hasar gözlenmiştir. Akrilamidin zebra balığı üzerindeki en belirgin olan özelliği nörotoksik hasar oluşumuna sebep olmasıdır. [57].

Nörotoksik etkilerini belirlemek için yetişkin zebra balıklarına 3 gün boyunca 0,75 mM akrilamide maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak üstte kalma süresini ve hareketlilik durumunu önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca hareketsiz kalma sayısı ve süresi ile düzensiz hareket süresi akrilamide maruziyet sonrası artmıştır [58].

Fizyolojik etki

Akrilamide maruz kalmanın iskelet sistemine etkisi üzerinde yapılan bir çalışmada 0,5, 1 ve 2 mM'lük dozlara 1 günden 5 güne kadar maruz kalan zebra balığı embriyolarının hayatta kalma ve kuluçka oranı azalmış, vücut uzunluğunda kısalma, kıkırdak malformasyonu ve iskelet alanında azalma meydana geldiği görülmüştür [66].

Zebra balığı embriyoları (döllenen 6 saat sonra) 114 saat boyunca bir ortam içinde dört konsantrasyonda akrilamide (10, 30, 100 veya 300 mg/L) maruz bırakılmışlardır. Akrilamid yüzme hızı ve kat edilen mesafe olarak ölçülen lokomotor aktiviteyi bozmuştur. Ek olarak, 100 mg/L akrilamid ile maruziyet beyin ve omuriliğin genişliğini kısaltarak nöronal toksisiteyi göstermiştir [67].

Bir ay boyunca gıda yolu ile akrilamid alımının (12,8 mg/kg-haftada bir kez) yetişkin zebra balıklarında dalak şişmesine neden olduğu, ayrıca kist oluşumu, kanama ve iltihaplanma da dahil olmak üzere dalak hasarı yarattığı yapılan çalışmada kanıtlanmıştır [62].

Zebra balığı embriyoları (döllenen 6 saat sonra) 114 saat boyunca bir ortam içinde dört konsantrasyonda akrilamide (10, 30, 100 veya 300 mg/L) maruz bırakılmışlardır. Akrilamid, yumurta sarısı retansiyonu, skolyoz, yüzücü mesane eksikliği ve vücudun eğriliği ile karakterize gelişimsel toksisiteye neden olmuştur [67].

Kardiyovasküler Etki

Zebra balığı yumurtalarının döllenmesi sonrası yapılan 96 saatlik artan şekilde 0,5 – 1,0 – 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 ve 5,0 mM'lük akrilamid alımı ile yapılan çalışma sonucunda larva aşamasına gelen balık yumurtaları dozun artışına bağlı olarak incelendiğinde kalp malformasyonu ve işlev bozukluğu, buna ek olarak yetersiz gelişen bir kardiyovasküler sistemin oluşmasını sağlamıştır [45]. Yani, akrilamide maruz kalmanın, zebra balıklarında erken kalp gelişimi üzerinde zararlı bir etkisi olduğunu göstermektedir [61, 63].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deney organizması

Bu çalışmada, klinik olarak sağlıklı zebra balıkları (*Danio rerio*) kullanılmıştır. Kullanılan balıkların ortalama boyları $2,51 \pm 0,49$ cm ve ağırlıkları da $0,14 \pm 0,06$ g'dır. Zebra balığı, biyodeneý çalışmalarında standart test balığı olması nedeniyle tercih edilmiştir ve akvaryum üreticisinden temin edilmiştir. Deneylerde 100 adet balık kullanılmıştır. Birbirine yakın boy ve ağırlıkta olan balıklar tercih edilmiştir. Balıklar temin edildikten sonra içerisinde 1/3 su, 2/3 hava içeren plastik balık taşıma torbalarında, 30 dakika içerisinde deney ortamına getirilmiştir. Balıklar önce stok akvaryum suyunda su sıcaklığındaki değişimi minimize etmek ve akvaryuma balıkların adaptasyonunu kolaylaştırmak için taşıma torbası ile 30-35 dakika boyunca bırakılmış, daha sonra torbanın ağzı kesilerek açılmak suretiyle balıkların akvaryum suyuna geçmeleri sağlanmıştır. Deney öncesi laboratuvarı adaptasyona tabi tutulmuşlardır.

3.1.1. Araştırma yeri

Biyo-deneýler, Mayıs 2021 tarihinde Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Laboratuvarı'nda yapılmıştır. DNA analizi çalışmaları ise Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Akvaryum ve suyun özellikleri

6 adet eşit hacimli (10x20x35) cam akvaryumlara 15'er litre su konularak (buharlaşma göz önünde bulundurularak suya) eklemeler yapılmıştır. Akvaryumlarda kaynak suyu kullanılmıştır ve balıklar stoklanmadan önce havalandırılmaya başlanmıştır. Suyun kimyasal özellikleri Çizelge 3.1.'deki gibidir. Akvaryumlara deney sonuna kadar *Aquawing Aquarium Air Pump (5W)* marka hava pompaları ile havalandırılmıştır.

Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan suyun özellikleri

İçerik	Değerler (mg/mL)
Florür	0,04
Fosfat	<0,65
Bikarbonat	88,3
Karbonat	<1
Klorür	0,9
Nitrat	<0,2
Nitrit	<0,09
Silikat	8,9
Sülfat	7,2
Sülfür	<0,01
Alüminyum	<0,002
Amonyum	<0,05
Kalsiyum	22,8
Magnezyum	4,2
Potasyum	<0,5
Sodyum	4,3
Demir	<0,01
pH	7,8

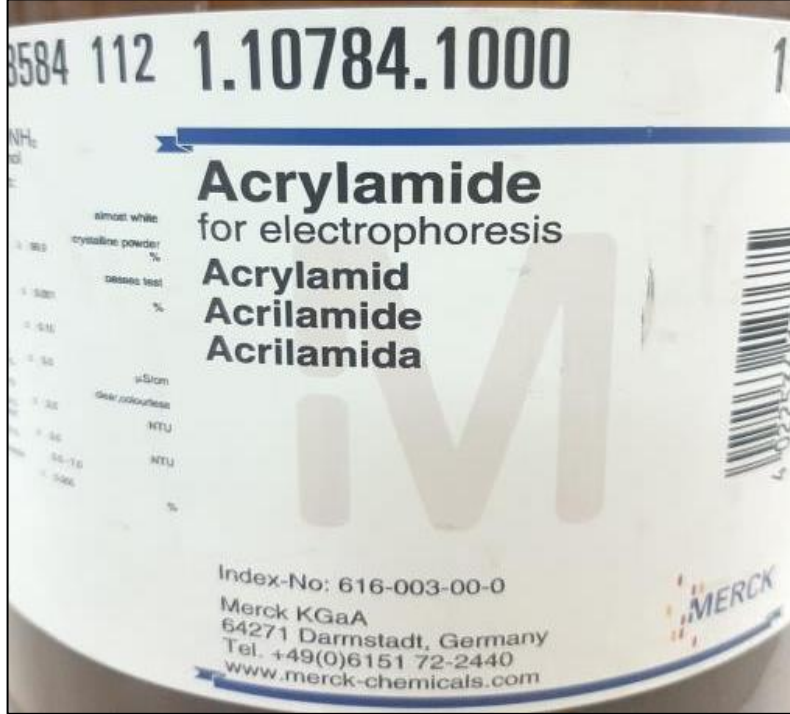
3.1.3. Deneyde kullanılan envanterler

Sarf Malzemeler

- Eppendorf tüp
- Mezür
- Balon joje
- Akvaryum
- Neşter
- Buz kalıbı
- Etiket
- Balık kepçesi

Kimyasallar

- Akrilamid (%99,9) (Merck) (Resim 3.1.)



Resim 3.1. Deneyde kullanılan akrilamid

DNA analizi için Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit ile alınan numune örneklerinin DNA'ları saflaştırılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Akut Toksisite

Deneyin gerçekleştirilmesi

Tüm biyodeneyle, ZSF tayini yöntemi APHA, OECD, TSE, ISO ve FAO 'nun yöntemlerine göre yapılmıştır [68,69]. Statik yöntem kullanılarak gerçekleştirilen deneyler iki aşamalı olarak yürütülmüştür.

- Ön Deney: 24 saat süreli ön deneylerde 1, 1/10, 1/100, 1/1000 gibi geniş konsantrasyon aralıkları kullanılarak [70] ana deneyin konsantrasyonlarını saptamada baz alınabilecek

değerler tespit edilmiştir. %100 ölüm görülen en düşük konsantrasyon ve %0 ölüm görülen (ölüm görülmeyen) en yüksek konsantrasyon aralığı belirlenmiştir [71].

- b) Ana Deney: 96 saatte statik yöntem kullanılacak bu deneyde, ön deney sonucu elde edilen verilerin ışığı altında geometrik seri hesaplanmıştır. Deneyin yapıldığı şekil ve şartlarla birlikte yürütülen iki farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Akrilamid verilme esnasında havalandırma durdurulmuş, akvaryumlara otomatik pipetler yardımıyla verilmiş ve cam bagetlerle karıştırılarak suda dağılması sağlanmıştır.
- c) Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi Finney'in Probit analiz yönteminin değişik "trimmed Spearman-Kärber" istatistiki metoduna göre yapılmıştır [72]. Bilgisayar ortamındaki analizler ise E.P.A.'nın geliştirdiği LC₅₀ programının versiyon 1,00'i kullanılmıştır.

3.2.2. Subletal deney

Akut toksisite deney sonrasında 96 saatlik LC₅₀ değerinin ½ ve 1/10 değerleri subletal konsantrasyonlar olarak kullanılmıştır. Zebra balıkları, 24 ve 96 saat süreyle 10 ve 50 mg/L akrilamide maruz bırakılmışlardır. İçerisine kimyasal maddenin kullanılmadığı kontrol grubu kullanılmıştır. Deney ortamı Resim 3.2.'de görülmektedir.



Resim 3.2. Deney başlangıcı akvaryumlar

Deney süresince balıklar beslenmemiştir. Tüm deney gruplarında deney süresince balıkların akrilamide maruziyetinde tepkileri gözlenmiş, 24 ve 96 saat sonunda DNA hasarı için balık numuneleri alınmıştır.



Resim 3.3. Deney ortamı



Resim 3.4. Balıkların kilo-boy ölçümü

Akrilamide maruz kalan balıkların 24 ve 96 saat sonunda buz anestezisi yapılarak cetvelle ve hassas terazi boy-kilo ölçümleri yapılmıştır (Resim 3.3., 3.4.). Doku örnekleri etiketlenerek eppendorflara konulmuş önce sıvı azota daha sonra biyokimyasal analizleri yapılınca kadar -80°C dipfrize alınmıştır.

3.3. Biyokimyasal Analiz

3.3.1. DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için 180 µL parçalama (digestion) çözeltisi eklenerek bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün 20 µL Proteinaz K ilave edilerek vortekslenmiştir. Daha sonra 56°C sıcaklıkta termomikser ile 1-2 saat inkübe edilip, tekrar vortekslenmiştir. 20 µL Rnaz A solüsyonu eklenip vorteksleme yapılmıştır ve 10 dk sonra oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 200 µL doku yıkıcı (Lysis) çözeltisi eklenip homojen karışım elde edene kadar 15 saniye boyunca ve bunun üzerine 400 µL %50'lik etanol eklenip vortekslenmiştir.

Kit içerisinde bulunan filtreli tüplere 600 µL alınıp 1 dk 6000xg'de santrifüj edilmiştir. Tüpün dip kısmına biriken solüsyon ayrılıp atılmıştır. Yıkama solüsyonlarını hazırlamak için kit içerisinde bulunan iki ayrı yıkama solüsyonu şişelerine ayrı ayrı 30 mL %96'lık etanol eklenerek şişe üzerine gerekli işaretlemeler yapılmıştır. 500 µL yıkama tamponu (Wash Buffer) I eklenerek 1 dakika 8000xg'de santrifüj edilip, dip kısmında biriken sıvı döküldü. Tekrar eppendorf üzerinde 500 µL yıkama tamponu (Wash Buffer) II ilave edilerek 3 dk 12000 xg'de santrifüj edilip alt kısmındaki sıvı tüple birlikte atılıp yeni tüp kullanılmıştır. 200 µL Elution Buffer eklenip 1 dakika 8000 xg'de santrifüj edilmiş ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak, üst kısımdaki filtreli tüpler atılıp altta biriken pelet yeni eppendorf tüplere alınarak etiketleme yapılmıştır. Kolon tüpler atılarak eppendorf tüplerinde toplanan DNA miktarları nanodropta (spektrofotometre vb.) ölçülmüştür.

3.3.2. DNA hidrolizi

50 µL elüsyon solüsyonu içindeki DNA örnekleri 3 dakika 95 °C'deki ısıtıcı blokta bekletilip buz üzerinde soğutulularak tek sarmallı DNA'lar elde edilmiştir. DNA örneklerinin üzerinde 100 µL 2mmol/L DFAM, 100 µL 20 mmol/L asetat solüsyonu (pH=5) eklenmiş

ve çözelti DNA içeriği için 260 nm’de spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Sonrasında 20 – 500 µg DNA, 20 mmol/L asetat tamponu (pH=5) eklenmiş ve 65°C’de 10 dakika hazırlanan 4 µL-3,3 mg/mL nükleaz P1 süspansiyonu ile inkübe edilerek, nükleotidlere hidrolize edilmiştir. 20 µL, 1 mol/L Tris-HCL tamponu (pH=8,5) karışımı eklenmiş, 4 µL, 1 U/L alkalin fosfotaz, 37°C’de 1 saat inkübe edilerek, nükleosidlere hidrolize edilmiştir. 20 µL, 3 mol asetat tamponu (pH=5) hidrolizata edilerek, 20 µL, 50 mmol/L EDTA (10 mmol/L DFAM içinde) solüsyonu ile devam edilmiştir. Karışım, 0,22 µm milipore filtre ünitesinden filtre edilmiş, (eppendorf tüplerinin içindeki filtreler) 4°C’de, 20 dakika 10000xg’de santrifüj edildikten sonra örnekler 8OHdG analizi için hazır hale getirilmiştir.

3.3.3. 8OHdG analizi

8-hidroksideoksiguanozin (8OHdG), oksidatif DNA hasarının bir biyolojik belirteçidir [81]. 8OHdG ölçümü Agilent LC-MS/MS cihazı (Çizelge 3.2., 3.3.) kullanılarak elektrosprey iyonizasyon (ESI) metodu ve pozitif iyon modu ile yapılmıştır. Çalışmada ACE C18 (50 mm x 4,6 mm x 5µm) kolonu kullanılmıştır. Kolon fırın sıcaklığı 40 °C’ye ayarlanmıştır. Mobil faz olarak solvent A distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat + %0.01 Formik Asit çözeltisi, solvent B olarak metanol içinde %0,01 Formik Asit çözeltisi kullanılmıştır.

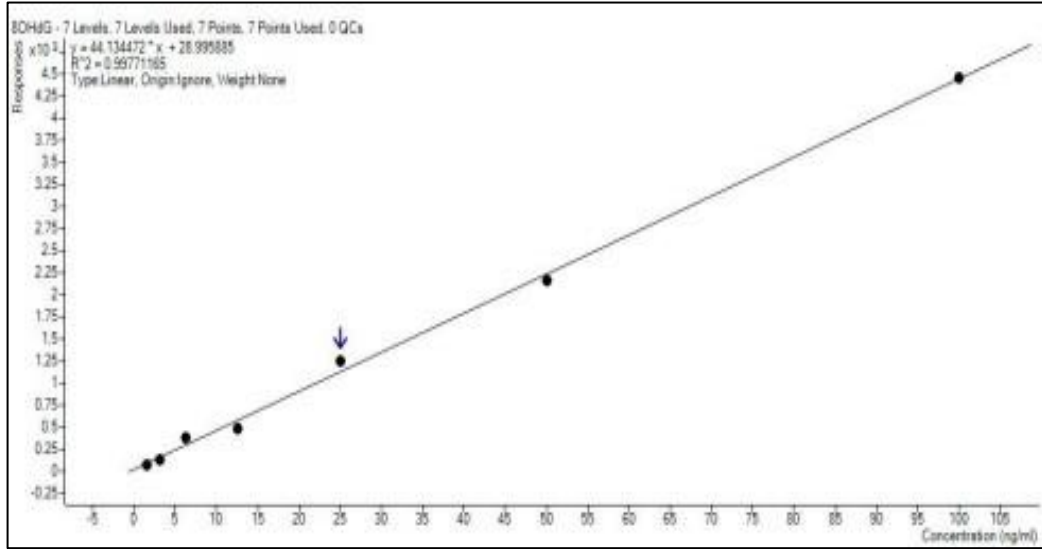
Çalışmada izokratik metot kullanılmıştır. %70 A fazı %30 B fazı olacak şekilde düzenlenmiştir. Akış 0,4 mL/dakika olacak şekilde kullanılmıştır. 8OHdG ana kütle / yük (m/z) değeri 284,1, bundan elde edilen Q3 m/z değerleri ise 167,9, 150,9, 139,8 ve 116,7 olarak bulunmuştur. Fragmentor voltaj 90 V olarak uygulandı. Numune ve standartlar 10 mikrolitre cihaza enjekte edilmiştir. 8OHdG ana stok standartı %0.01 Formik Asit / Distile su içinde 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu stok standarttan %50 Metanol içerisinde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu standartlar 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 ng/mL 7 seviyeli olacak şekilde analiz edilerek kalibrasyonu (Şekil 3.1) yapılmış ve r^2 değeri 0,997 olarak saptanmıştır.

Çizelge 3.2. Agilent 6420 LC-MS/MS özellikleri

Cihaz	Agilent 6420 LCMS/MS										
Kolon	ACE C18 (50mm x 4.6 mm x 5µm)										
Kolon sıcaklığı	40°C										
Mobil faz	Solvent A (distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat+ %0,01 Formik Asit çözeltisi)										
	Solvent B (metanol içinde %0,01 Formik Asit çözeltisi)										
İzokratik Tablosu	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zaman</th><th>Solvent A</th><th>Solvent B</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td><td>%70</td><td>%30</td></tr> <tr> <td>5 dk</td><td>%70</td><td>%30</td></tr> </tbody> </table>		Zaman	Solvent A	Solvent B	0	%70	%30	5 dk	%70	%30
Zaman	Solvent A	Solvent B									
0	%70	%30									
5 dk	%70	%30									
	0,4 ml/dk										
Akış hızı											
Enjeksiyon hacmi	10 µl										
Süre	5 dk										

Çizelge 3.3. LC-MS/MS cihaz parametre özellikleri

Cpd Name	Prec Ion MS1	Prod Ion MS2	Dwel	Frag (V)	CE (V)	Cell Acc (V)	Polarity
8OHdG	284.1	167.9	100	90	8	7	Pos
		150.9	100	90	34	7	Pos
		139.8	100	90	38	7	Pos
		116.7	100	90	8	7	Pos
Parameter				Value (+)			
Gas Temp (°C)				250			
Gas Flow (l/min)				10			
Nebulizer (psi)				25			
Capillary (V)				4000			



Şekil 3.1. Kalibrasyon eğrisi

3.4. İstatistik Değerlendirme

Akut toksisite sonuçları EPA probit analiz yöntemi, DNA hasarı ise Graphpad programında Tukey Kramer Çoklu Karşılaştırma Testi ile istatistik olarak değerlendirilmiştir.

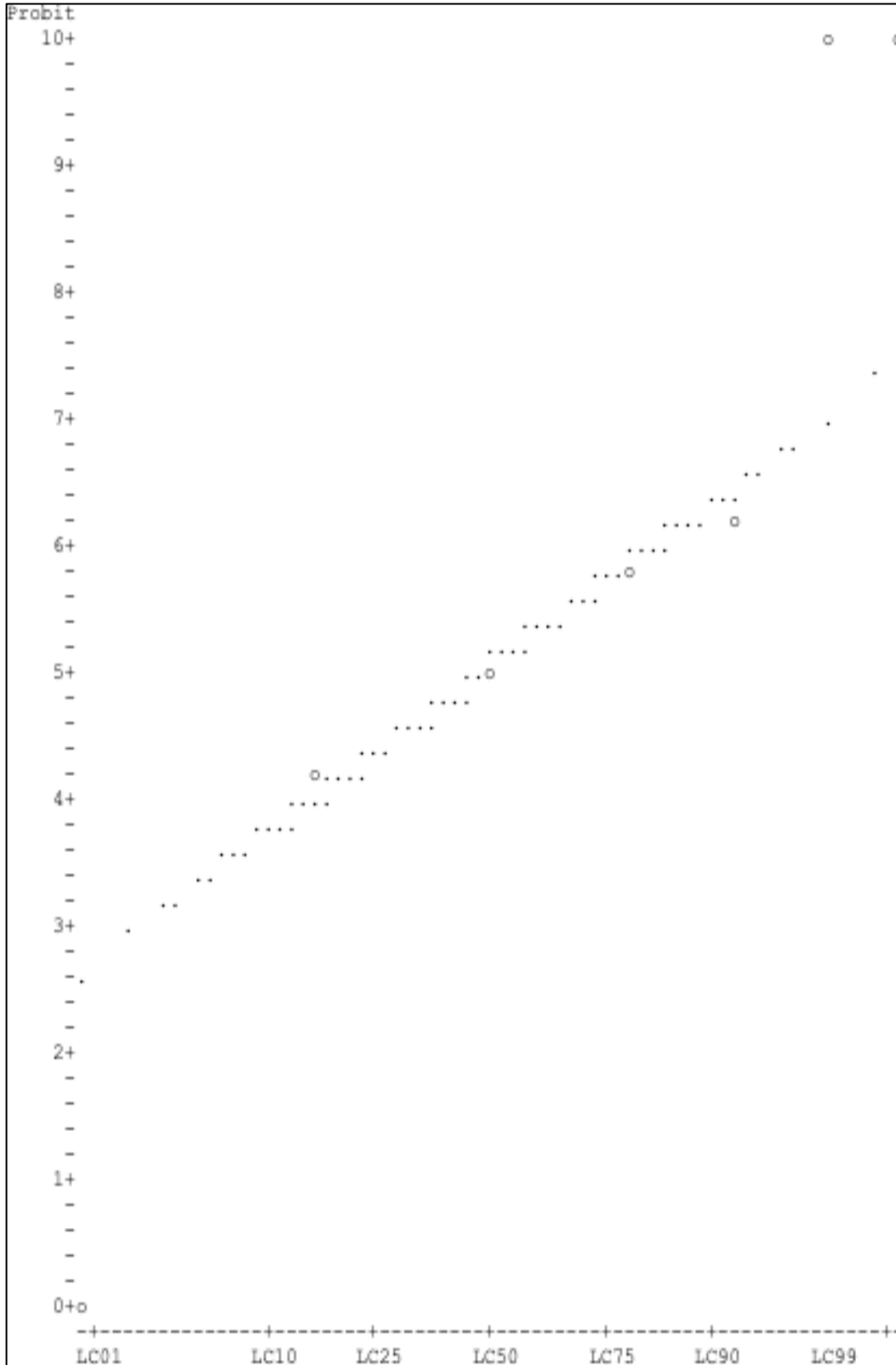


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

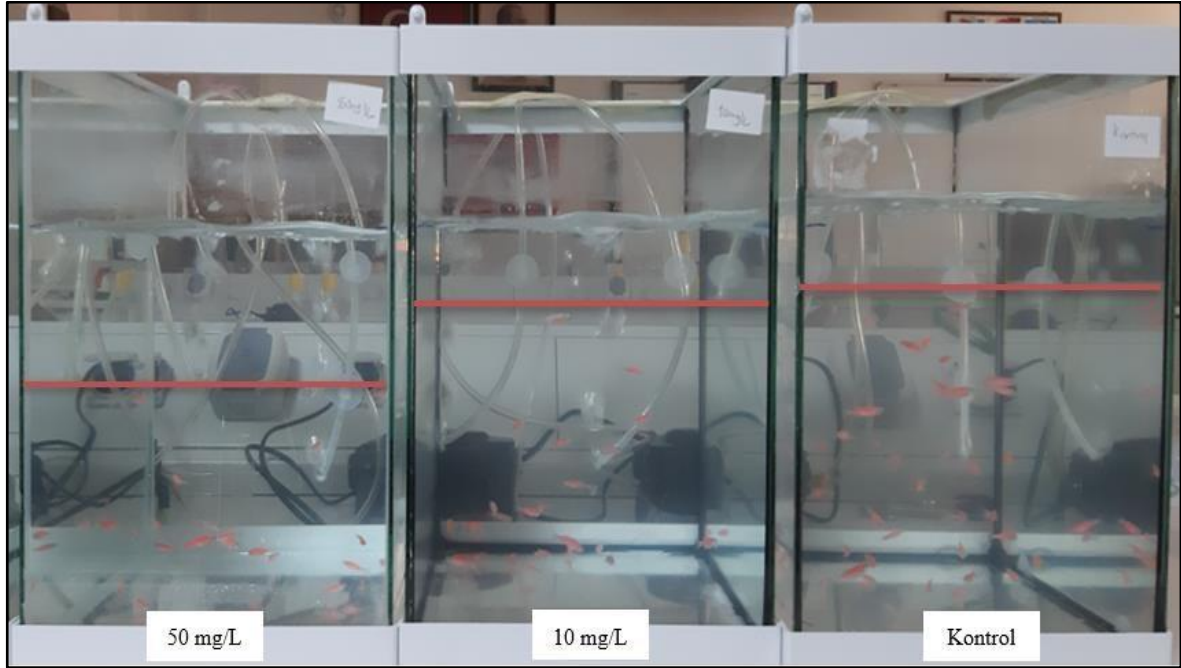
Bu çalışmada ekotoksikolojik çalışmalarda model organizma olarak kullanılan zebra balıklarında (*Danio rerio*) akrilamidin akut toksik etkisi ve subletal konsantrasyonlarının DNA üzerinde yarattığı hasar incelenmiştir. 96 saatlik LC₅₀ değeri 98,60 mg/L (84,47-111,28 mg/L-%95 güven aralığı) olarak saptanmıştır. Bu çalışma dahilindeki 96 saatlik LC₅₀ değerleri belirlenmiştir ve bu değerler Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Ayrıca probit değerleri ve regresyon grafiği de Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Akrilamidin zebra balığı üzerindeki 96 saatlik LC₅₀ değeri

Nokta	Konsantrasyon (mg/L)	%95 Güven Sınırları
LC 1	51,76	30,65-65,44
LC 5	62,52	41,83-75,40
LC 10	69,13	49,26-81,49
LC 15	73,99	54,93-85,99
LC 50	98,60	84,47-111,28
LC 85	131,40	116,05-161,17
LC 90	140,63	123,19-178,69
LC 95	155,52	133,87-209,27
LC 99	187,84	155,06-284,05



Şekil 4.1. Yetişkin zebra balıklarında (*Danio rerio*) 96 saatlik akrilamid için hesaplanan probit değerleri ve regresyon grafiği



Resim 4.1. Akrilamide maruz kalmış balıkların yüzme seviyeleri

Resim 4.1’de görüldüğü gibi 24 saat balıklara verilen akrilamid dozu arttıkça dipte durma eğiliminde artış görülmüştür.

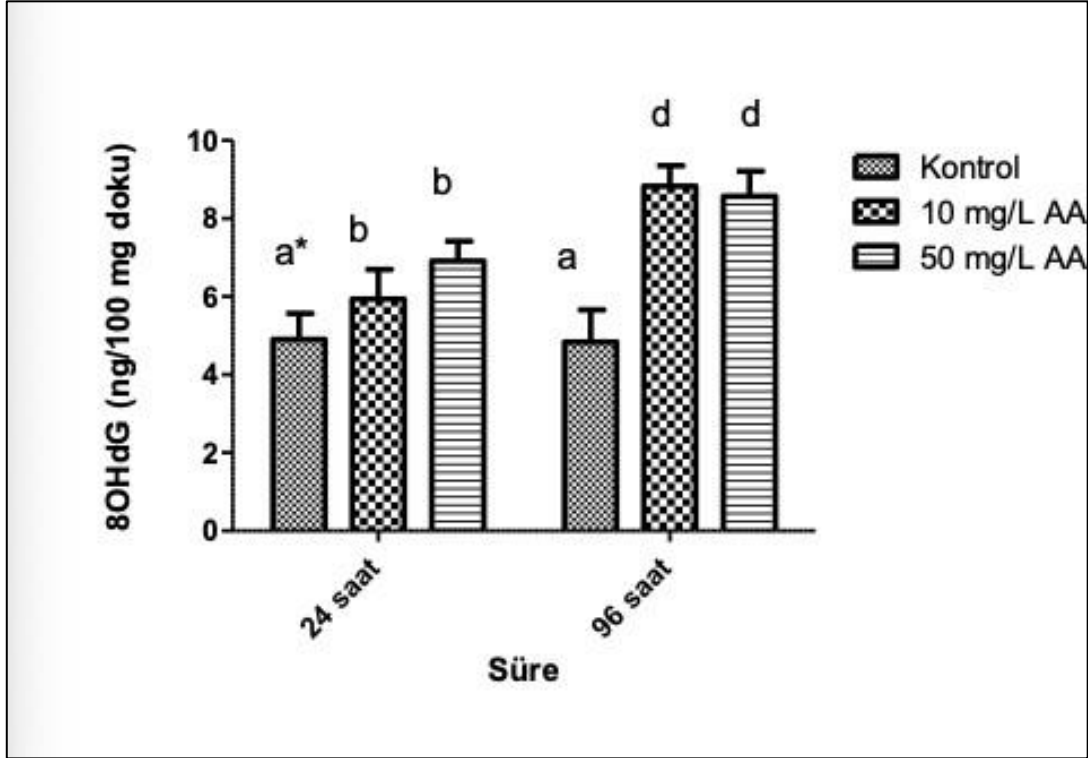
24 ve 96 saat süre ile 10 ve 50 mg/L akrilamide maruz kalan zebra balıklarında ve kontrol grubunda ortalama 8OHdG (ng/100 mg doku) değerleri Şekil 4.3.’te gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü üzere, Ortalama 8OHdG değerleri 24 saat kontrol grubunda $4,90 \pm 1,55$ ng/100 mg doku, 10 mg/L akrilamide maruz kalan grupta $5,94 \pm 2,24$ ve 50 mg/L’de ise $6,91 \pm 2,61$ ng/100 mg doku olarak saptanmıştır. 96 saatlik değerler kontrol grubunda $4,84 \pm 0,82$, 10 mg/L akrilamide maruz kalan grupta $8,82 \pm 3,33$ ng/100 mg doku ve 50 mg/L’da ise $8,57 \pm 3,24$ ng/100 mg doku olarak belirlenmiştir. Değerlere bakıldığında doz ve süreyle doğru orantılı olarak 8OHdG seviyelerinde artış görüldüğü saptanmıştır (Çizelge 4.2.). Fakat en yüksek değer 96 saat ve 10 mg/L akrilamid verilen deneklerde görülmüştür (Şekil 4.3.). Bu da düşük doza uzun süre maruz kalmanın DNA hasarı oluşumu için daha uygun bir koşul oluşturduğunu düşündürmektedir.

Tukey Kramer Çoklu Karşılaştırma Testi ile $p < 0.05$ olarak bulunmuştur. Bu da gruplar arası farkın önemli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. 8OHdG (ng/100 mg doku) sonuçları

Süre	Kontrol	10 mg/L	50 mg/L
24 saat	4,90±0,67a*	5,94±0,76b	6,91±0,51c
96 saat	4,84±0,82a	8,83±0,52d	8,57±0,64d

*Aynı satır ve sütunda küçük harfler arasında fark istatistik olarak önemlidir (P<0.05)



*Grafikte küçük harfler arasında fark istatistik olarak önemlidir (P<0.05)

Şekil 4.3. 8OHdG sonuçları grafiği

5. TARTIŞMA

24 saat süreli ön deneylerde 1, 1/10, 1/100, 1/1000 gibi geniş konsantrasyon aralıkları kullanılarak ana deneyin konsantrasyonlarını saptandı. %100 ölüm görülen en düşük konsantrasyon ve %0 ölüm görülen (ölüm görülmeyen) en yüksek konsantrasyon aralığı belirlenmiştir. Deneyin yapıldığı şekil ve şartlarla birlikte yürütülen iki farklı kontrol grubu kullanılmıştır.

Bu çalışma da ise 96 saatlik LC₅₀ değeri 98,60 mg/L (Çizelge 4.1.) olarak bulunmuştur. Yetişkin zebra balıklarının embriyolara göre akrilamide karşı daha dayanıklı olduğu çıkarımı yapılabilir. Yani zebra balıklarında özelinde yaşam evresi ilerledikçe akrilamide karşı dayanıklılıkta artmaktadır. Bu çalışmada, akrilamidin zebra balıkları üzerinde DNA hasarı oluşturduğu saptanmıştır.

Zebra balığı embriyolarında yapılan 96 saatlik çalışma sonucunda elde edilen LC₅₀ değeri 156,4 mg/L bulunmuştur [45]. 72 saatlik sürelerde ise embriyo ve larvalarda sırasıyla 191,9 ve 167,1 saptanmıştır [45]. Bu daha önce yapılan çalışmalarda da LC₅₀ değerleri üzerinden doğrulanmaktadır.

Denizel ortamda ekotoksikolojik çalışmalarda biyoindikatör canlı olarak bilinen ve süzerek beslenen Akdeniz midyesi, *Mytilus galloprovincialis*'in 96 saatlik LC₅₀ değerinin (411 mg/L) yüksek olması zebra balığına kıyasla kabuklu deniz canlılarının akrilamide karşı daha dayanıklı olduğunu göstermektedir [43].

Maniere ve diğerlerinin, 2005 yılında yaptıkları çalışmada ratlara oral yolla vücut ağırlığı başına 18, 36 ve 54 mg/kg akrilamid verilmiştir. Çalışma sonucunda testis, beyin ve karaciğerde karsinojenite tespit edilmiş ve DNA hasarının gözlemlendiği belirtilmiştir. Çalışmada akrilamid maruziyetinin genotoksisitenin basit bir biyolojik belirteci olabileceği de vurgulanmıştır [76].

Nixon ve diğerlerinin 2012'de erkek farelerde yaptıkları çalışmalarda farelerin sularının içine 0,001, 0,01, 0,1, 1 ve 10 µg/mL'lik dozlarda akrilamid bir yıllık bir süre ile eklenmiştir. 1, 3, 6 ,9 ve 12. Aylarda erkek germ hücreleri takibe alınmış ve özellikle 6 aylık maruz

kalma sonucunda DNA hasarında önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir. 12 aylık süre sonrasında da 0,01 µg/mL kadar düşük dozlarda bile hasar artışının görüldüğü belirtilmiştir [77].

Ansar ve diğerlerinin 2016'da 5 gün yaptıkları çalışmada ise akrilamid ve quercetin ile wistar sıçanları üzerindeki DNA hasarı incelenmiş ve sadece akrilamid kullanımında (50 mg/kg vücut ağırlığı) karaciğer dokularındaki 8OHdG seviyesini yükselttiği gözlemlenmiş ve DNA hasarı olduğu, ayrıca her ikisi birlikte kullanıldığında (50 mg/kg vücut ağırlığı akrilamid + 10 mg/kg vücut ağırlığı quercetin) ise quercetin ilavesinin DNA hasarının sadece akrilamid uygulanan gruba göre daha az olduğunu göstermiştir [78].

Alturfan ile diğerlerinin yaptıkları çalışmada, akrilamide maruz kalan ratlar üzerinde resveratrol (doğal antioksidan) tedavisinde DNA hasarına karşı değişimleri incelenmiştir. 10 gün süren bu deneyde sadece akrilamid (40 mg/kg vücut ağırlığı) kullanılan grupta DNA hasarı gözlenmiştir fakat akrilamid ve resveratrolün (40 mg/kg vücut ağırlığı akrilamid + 30 mg/kg vücut ağırlığı resveratrol) birlikte kullanıldığı durumda ise DNA hasarının azaldığı görülmüştür [81].

Şengül ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada, 10 gün boyunca akrilamid verilen erkek ratlara 1 mL salin, 38,27 mg/kg vücut ağırlığı akrilamid ve 0,5-1 vücut ağırlığı selenyum verilmiştir. Ayrıca aynı süre içinde 1 mL salin ve 38,27 mg/kg vücut ağırlığı akrilamid başka bir gruba uygulanmıştır. Sonuç olarak selenyum eklentisinin ratlar üzerinde akrilamidin oluşturduğu DNA hasarını azalttığını ortaya koymuştur [82].

Yukarıda özetlenen çalışmalarda da belirtildiği gibi akrilamidin DNA hasarı oluşturduğu ortadadır. Son dönemde yapılan DNA hasarı çalışmalarının ise oluşan bu hasarı azaltma yollarının belirlenmesi üzerine olduğu görülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

24 ve 96 saatlik, 10 ve 50 mg/L akrilamid ile yapılan yetişkin zebra balığı üzerindeki subletal etkileri çalışmasında özellikle akrilamid dozunun düşük ve devamlı oluşunun DNA üzerinde daha zararlı bir etki bıraktığı, aynı süredeki yüksek dozların ise daha az zarar verdiği bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmanın yani akrilamidin zebra balığı üzerindeki DNA hasarına dair bir çalışmanın literatürde olmaması da çalışmayı kendi içinde önemli kılmaktadır. Sadece akrilamid alımı düşünüldüğünde, akrilamidin DNA'ya hasar verdiği deney yapılan diğer canlılarda da bilinmektedir ve yapılan bu çalışma diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ek olarak gözlemlenebilir değişiklikler (spiral hareket, durgunluk vb.) de aynı şekilde diğer çalışmalara benzerlik göstermektedir.

Endokrin bozucu etkileri belirlenmeye çalışılan akrilamidin dopamin seviyesini etkilediği yönündeki çalışmaya ek olarak akrilamidin hücre içi lipid birikimine neden olması sebebiyle de canlılarda obezite oluşumu [73] üzerindeki etkileri daha geniş bir kapsamda sorgulanmalıdır. Ayrıca zebra balığı üzerindeki nörotoksik etkileri (Parkinson hastalığı [74] ve türevi nörodavranışsal hastalıkların üzerine etkisi) ile ilgili çalışmalarının kapsamının artırılmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Krishnakumar, T. and Visvanathan, R. (2014). Acrylamide in Food Products: A Review. *Journal of Food Processing & Technology*. 5(7):334.
2. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2015. *Scientific Opinion on Acrylamide in Food, EFSA Journal* 2015. 13(6):4104-321.
3. Benisi-Kohansal, S., Salari-Moghaddam, A., Rohani, Z.S. and Esmailzadeh, A. (2021). Dietary Acrylamide Intake and Risk of Women's Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *British Journal of Nutrition*. 1-9.
4. Correa, C.L.O., Mercês, E.P., Anjos, M.R., Pacheco, S., Freitas-Silva, O. and Luna, A.S.. Influence on the Content of Caffeine, Chlorogenic Acid, and Caffeic Acid. *Food Chemistry*. 338, 128045.
5. Perçin, S. ve Günel, A.Ç. (2021). Akrilamidin Sucul Canlılar Üzerine Etkileri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 14(1), 57-66.
6. Ngema, S.S., Basson, A.K. and Maliehe, T.S. (2020). Synthesis, Characterization and Application of Polyacrylamide Grafted Bioflocculant. *Physics and Chemistry of the Earth*. 115, 102821.
7. Kopanska, M., Muchacka, R., Czech, J., Batoryna, M. and Formicki, G. (2018). Acrylamide Toxicity and Cholinergic Nervous System. *Journal of Physiology Pharmacology*. 69(6), 847-858.
8. Semla, M., Goc, Z., Martiniakova, M., Omelka, R. and Formicki, G. (2017). Acrylamide: A Common Food Toxin Related to Physiological Functions and Health. *Physiological Research*. 66, 205-217.
9. Zamani, E., Shokrzadeh, M., Fallah, M. and Shaki, F. (2017). A Review of Acrylamide Toxicity and Its Mechanism. *Pharmaceutical and Biomedical Research*. 3(1):1-7.
10. Lu, L., Pan, Z., Hao, N. and Peng, W. (2014). A Novel Acrylamide-Free Flocculant and its Application for Sludge Dewatering. *Water Research*. 57, 304-312.
11. Klaunig, J.E. (2008). Acrylamide Carcinogenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 5984-5988.
12. Şengül, E., Gelen, V., Yıldırım, S., Tekin, S. and Dağ, Y. (2021). The Effects of Selenium in Acrylamide-Induced Nephrotoxicity in Rats: Roles of Oxidative stress, Inflammation, Apoptosis, and DNA Damage. *Biological Trace Element Research*. 199, 173-184.
13. Junqua, G., Spinelli, S. and Gonzalez, C. (2015). Occurrence and Fate of Acrylamide in Water-Recycling Systems and Sludge in Aggregate Industries. *Environmental Science and Pollution Research*. 22, 6452-6460.

14. Wilson, K.M., Rimm, E.B., Thompson, K.M. and Mucci, L.A. (2006). Dietary Acrylamide and Cancer Risk in Humans: A Review. *Journal of Consumer Protection and Food Safety / Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 1, 19-27.
15. İnternet: WHO to Hold Urgent Expert Consultation on Acrylamide in Food After Findings of Swedish National Food Administration. URL: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/release32/en/> , Son Erişim Tarihi: 01.09.2021.
16. Xu, W., Tan, L., Zhu, X. and Wang, J. (2020). Toxicity Assessments of Acrylamide in Aquatic Environment using Two Algae *Nitzschia closterium* and *Scenedesmus quadricauda*, *Environmental Science and Pollution Research*.
17. Jaiswal, A.S., Connors, S.K., Armas, M.L., Panda, H. and Narayan, S. (2011). Cigarette Smoke, DNA Damage Repair, and Human Health. *Encyclopedia of Environmental Health*. 1, 669-679.
18. Mojska, H., Gielecinska, I. and Cendrowski, A. (2016). Acrylamide Content in Cigarette Mainstream Smoke and Estimation of Exposure to Acrylamide from Tobacco Smoke Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 23(3), 456-461.
19. Matoso, V., Bargi-Souza, P., Ivanski, F., Romano, M.A. and Romano, R.M. (2019). Acrylamide: A Review About Its Toxic Effects in The Light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) Concept. *Food Chemistry*. 283, 422-430.
20. Rice, J.M. (2005). The Carcinogenicity of Acrylamide. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 580, 3-20.
21. Raffan, S., Oddy, J. and Halford, N.G. (2020). The Sulphur Response in wheat Grain and Its Implications for Acrylamide Formation and Food Safety. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 3876.
22. Mei, N., McDaniel, L.P., Dobrovolsky, V.N., Guo, X., Shaddock, J.G., Mittelstaedt, R.A., Azuma, M., Shelton, S.D., McGarrity, L.J., Doerge, D.R. and Heflich, R.H. (2010). The Genotoxicity of Acrylamide and Glycidamide in Big Blue Rats. *Toxicological Sciences*. 115(2), 412-421.
23. Tan, D., Li, L., Wang, S., Wei, B., Zhang, X., Sun, B. and Ji, S. (2013). The Cytogenetic Effects of Acrylamide on *Carassius auratus* Peripherial Blood Cells. *Food and Chemical Toxicology*. 62, 318-322.
24. Semla, M., Goc, Z., Martiniakova, M., Omelka, R. and Formicki, G. (2017). Acrylamide: A Common Food Toxin Related to Physiological Functions and Health. *Physiological Research*. 66, 205-217.
25. Yıldız, O., Şahin, H., Kara, M., Aliyazıcıoğlu, R., Tarhan, Ö. ve Kolaylı, S. (2010). Maillard Reaksiyonları ve Reaksiyon Ürünlerinin Gıdalardaki Önemi. *Akademik Gıda*. 8(6), 44- 51.

26. Ishii, Y., Matsushita, K., Kuroda, K., Yokoo, Y., Kijima, A., Takasu S., Kodama, Y., Nishikawa, A. and Umemura, T. (2015). Acrylamide Induces Specific DNA Adduct Formation and Gene Mutations in A Carcinogenic Target Site, The Mouse Lung. *Mutagenesis*. 30, 227-235.
27. Arusoğlu, G. (2015). Akrilamid Oluşumu ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Akademik Gıda*. 13(1), 61-71.
28. Akgün, B. (2019). *Türk Kahvesinin Akrilamid İçeriği ile Asparaginaz Enziminin Akrilamid Oluşumu ve Uçucu Bileşikler Profillerine Etkileri*. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 33.
29. Rifai, L. and Saleh, F.A. (2020). A Review on Acrylamide in Food: Occurrence Toxicity, and Mitigation Strategies. *International Journal of Toxicology*. 39(2), 93-102.
30. Erkekoğlu, P. and Baydar, T. (2010). Toxicity of Acrylamide and Evaluation of its Exposure in Baby Foods. *Nutrition Research*. 23, 323-333.
31. Michalak, J., Czrnowska-Kujawska, M., Gujska, E., Klepacka, J. and Tonska, E. (2020). Effect of the Brewing Process on the Acrylamide Content in Coffee Beverages. *Proceedings of the Nutrition Society*. 79(OCE2), E293.
32. Kaya, G. and Toker, S. (2019). Kahve Tüketim Alışkanlıklarının İncelenmesi: İstanbul Örneği. *International Journal of Economics, Politics, Humanities & Social Sciences*. 2(3), 146-164.
33. International Coffee Organization. URL: <https://www.ico.org/> Son Erişim tarihi: 04.19.2021.
34. Ngema, S.S., Basson, A.K. and Maliehe, T.S. (2020). Synthesis, Characterization and Application of Polyacrylamide Grafted Bioflocculant. *Physics and Chemistry of the Earth*. 115, 102821.
35. Kılıç, H. (2012). *Flokülasyon ve Flok-Flotasyon Yöntemleri ile Doğaltaş Atıksularının Arıtılması*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 6.
36. Tepe, Y. and Çebi, A. (2019). Acrylamide in Environmental Water: A Review on Sources, Exposure, and Public Health Risks. *Expo Health*. 11, 3-12.
37. Guzzo, J. and Guezenec, A.G. (2015). Degradation and Transfer of Polyacrylamide Based Flocculent in Sludge and Industrial and Natural Waters. *Environmental Science and Pollution Research*. 22, 6387-6389.
38. Tepe, Y. (2016). Acrylamide in Surface and Drinking Water, Acrylamide in Food, Analysis. *Content and Potential Health Effects, Chapter 14*. 275-293.
39. World Health Organization. (1991). *Acrylamide Health and Safety Guide* (Health and Safety Guide No.45). WHO. Geneva, 1-21.

40. Mroczek, E., Konieczny, P., Lewicki, A., Waskiewicz, A. and Dach, J. (2016). Preliminary Study of Acrylamide Monomer Decomposition during Methane Fermentation of Dairy Waste Sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 45, 108-114.
41. Lentz, R.D., Andrawes, F.F., Barvenik, F.W. and Koehn, A.C. (2008). Acrylamide Monomer Leaching from Polyacrylamide-Treated Irrigation Furrows. *Technical Reports: Vadose Zone Process and Chemical Transport*. 37, 2293-2298.
42. Nagata, C., Konishi, K., Wada, K., Tamura, T., Goto, Y., Koda, S., Mizuta, F., Nishizawa, S., Sukigara, E., Watanabe, K. and Ando, K. (2017). Associations of Acrylamide Intake with Urinary Sex Hormone Levels Among Preschool-Age Japanese Children. *American Journal of Epidemiology*. 187(1), 75-81.
43. Larguinho, M., Cordeiro, A., Diniz, M.S., Costa, P.M. and Baptista, P.V. (2014). Metabolic and Histopathological Alterations in the Marine Bivalve *Mytilus galloprovincialis* induced by chronic Exposure to Acrylamide. *Environmental Research*. 135, 55-62.
44. Shanker, R. and Seth, P.K. (1986). Toxic Effects of Acrylamide in a Freshwater Fish, *Heteropneustes fossilis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 37, 274-280.
45. Huang, M., Jiao, J., Wang, J., Xia, Z. and Zhang, Y. (2018). Characterization of Acrylamide- Induced Oxidative Stress and Cardiovascular Toxicity in Zebrafish Embryos. *Journal of Hazardous Materials*. 347, 451-460.
46. Prats, E., Gomez-Canela, C., Ben-Lulu, S., Ziv, T., Padros, F., Tornero, D., Garcia-Reyero, N., Tauler, R., Admon, A. and Raldua, D. (2017). Modeling Acrylamide Acute Neurotoxicity in Zebrafish Larvae. *Scientific Reports*. 7, 13952.
47. Gopika, C.M. and Chitra, K.C. (2018). Acute Neurotoxicity Effect of Acrylamide in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *International Journal of Fisheries and Aquatic Research*. 3(1), 1-8.
48. Kaufmann, W.K. (2015). Systems Biology of the DNA Damage Response, Chapter 9. *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*. 2007-224.
49. Poletta, G.L., Gonzalez, E.L., Burella, P.M., Romito, M.L., Siroski, P.A. and Mudry, M.D. (2017). Biomarkers of Environmental Contamination in Reptile Species: The Effect of Pesticide Formulations on Broad-snouted Caiman *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae), Chapter 20. *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Aquatic Models*. 469.
50. Kurtoğlu, E.L. ve Tekedereli, İ. (2015). DNA Onarım Mekanizmaları. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. 4(3), 169-177.
51. İnce, S., Acaröz, U., Arslan Acaröz, D., Varol, N., Gürler, Z., Küçük Kurt, İ., Demirel, H.H. ve Eryavuz, A. (2018). Sıçanlarda Akrilamid ile İndüklenen Oksidatif Strese Karşı Taurinin Koruyucu Etkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*. 11(4), 479-490.

52. Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M. and Zhou, Z. (2019). The Use of Zebrafish (*Danio rerio*) as Biomedical Models. *Animal Frontiers*. 9(3), 68-77.
53. Cark, K.J. and Ekker, S.C. (2013). Zebrafish. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. 396-398.
54. Ge, W. (2018). Zebrafish, Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). *Reference Module in Life Sciences*. 6, 704-710.
55. Kossack, M.E. and Draper, B.W. (2019). Genetic Regulation of Sex Determination and Maintenance in Zebrafish (*Danio rerio*)-Chapter Four. *Current Topics in Developmental Biology*. 134, 119-149.
56. Bambino, K. and Chu, J. (2017). Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Current Topics in Developmental Biology*. 124,331-367.
57. Parng, C., Roy, N.M., Ton, C., Lin, Y. and McGrath, P. (2007). Neurotoxicity Assessment using Zebrafish. *Journal of Pharmacological and Toxicology Methods*. 55, 103-112.
58. Faria, M., Ziv, T., Gomez-Canela, C., Ben-Lulu, S., Prats, E., Novoa-Luna, K.A., Admon, A., Pina, B., Tauler, R., Gomez-Olivan, L.M. and Raldua, D. (2018). Acrylamide Acute Neurotoxicity in Adult Zebrafish. *Scientific Report*. 8, 7918.
59. Faria, M., Valls, A., Prats, E., Bedrossiantz, J., Orozco, M., Porta, J.M., Gomez-Olivan, L.M. and Raldua, D. (2019): Further Characterization of the Zebrafish Model of Acrylamide Acute Neurotoxicity: Gait Abnormalities and Oxidative Stress. *Scientific Reports*. 9, 7075.
60. Larguinho, M., Costa, P.M., Sousa, G., Costa, M.H., Diniz, M.S. and Baptista, P.V. (2013). Histopathological Findings on *Carassius auratus* Hepatopancreas Upon Exposure to Acrylamide: Correlation with Genotoxicity and Metabolic Alterations. *Journal of Applied Toxicology*. 34, 1293-1302.
61. Huang, M., Jiao, J., Wang, J., Xia, Z. and Zhang, Y. (2018). Exposure to Acrylamide Induces Cardiac Developmental Toxicity in Zebrafish During Cardiogenesis. *Environmental Pollution*. 234, 656-666.
62. Komoike, Y., Nomura-Komoike, K. and Matsuoka, M. (2020). Intake of Acrylamide at the Dietary Relevant Concentration Causes Splenic Toxicity in Adult Zebrafish. *Environmental Research*. 189, 109977.
63. Huang, M., Zhu, F., Jiao, J., Wang, J. and Zhang, Y. (2019). Exposure to Acrylamide Disrupts Cardiomyocyte Interactions During Ventricular Morphogenesis in Zebrafish Embryos. *Science of the Total Environment*. 656, 1337-1345.
64. Jia, L., Raghupathy, R.K., Albalawi, A., Zhao, Z. and Reilly, J. (2017). A Colour Preference Technique to Evaluate Acrylamide-Induced Toxicity in Zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 199, 11-19.

65. Spencer, H., Wahome, J. and Haasch, M. (2018). Toxicity Evaluation of Acrylamide on the Early Life Stages of the Zebrafish Embryos (*Danio rerio*). *Journal of Environmental Protection*. 9, 1082-1091.
66. Zhu, F., Wang, J., Jiao, J. and Zhang, Y. (2021). Exposure to Acrylamide Induces Skeletal Developmental Toxicity in Zebrafish and Rat Embryos. *Environmental Pollution*. 271, 116395.
67. Park, J.S., Samanta, P., Lee, S., Lee, J., Cho, J.W., Chun, H.S., Yoon, S. and Kim, W.K. (2021). Developmental and Neurotoxicity of Acrylamide to Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*. 22, 3518.
68. Baird, R.B., Eaton, A.D., Rice E.W. (Eds). (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (23rd Edition)*, Washington: APHA, 889-1026.
69. The United Nations Environment Programme. (1989). *Biological Indicators and Their Use in the Measurement of the Condition of the Environment* (Reports and Studies. No. 55). New York: The United Nations Environment Programme, 1-56.
70. Schäperclaus, W. (1979). *Akademie Verlag*. Berlin. 1-1089.
71. Reish, D.L. and Oshida, P.S. (1987), Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 10. Short -Term Static Bioassays. *FAO Fish Technical*. (247), 17-33.
72. Kesici, T. ve Kocabaş, Z. (1998). Biyoistatistik. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*. Yayın No: 79. Ankara.
73. Lee, H.W. and Pyo, S. (2019). Acrylamide Induces Adipocyte Differentiation and Obesity in Mice. *Chemico-Biological Interactions*. 298, 24-34.
74. Singh, A. (2020). Acrylamide Induced Parkinson's Like Neurobehavioral Abnormalities in Adult Zebrafish via Gut Brain Axis. *Parkinsonism and Related Disorders*. 79, e3- e126.
75. Besaratinia, A. and Pfeifer, G.P. (2005). DNA Adduction and Mutagenic Properties of Acrylamide. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 580, 31-40.
76. Maniere, I., Godard, T., Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Guffroy, M., Laurentie, M. and Poul, J.M. (2005). DNA Damage and DNA Adduct Formation in Rat Tissues Following Oral Administration of Acrylamide. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 582 (1-2), 119-129.
77. Nixon, B.J., Stanger, S.J., Nixon, B. and Romn, S.D. (2012). Chronic Exposure to Acrylamide Induces DNA Damage in Male Germ Cells of Mice. *Toxicological Sciences*. 129(1), 135-145.
78. Ansar, S., Siddiqi, N.J., Zargar, S., Ganaie, M.A. and Abudawood, M. (2016). Hepatoprotective Effect of Quercetin Supplementation Against Acrylamide-Induced DNA Damage in Wistar Rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16, 327.

79. Ibrahim, M.A. and Ibrahim, M.D. (2019). Acrylamide-Induced Hematotoxicology, Oxidative Stress, and DNA Damage in Liver, Kidney and Brain of Catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental Toxicology*. 35(2), 300-308.
80. Abdel-Daim, M.M., Abd Eldaim, M.A. and Hassan, A.G.A. (2015). *Trigonella Foenum- Graecum* Ameliorates Acrylamide-Induced Toxicity in Rats: Roles of Oxidative Stress, Proinflammatory Cytokines, and DNA Damage. *Biochemistry and Cell Biology*, 93, 192-198.
81. Alturfan, A.A., Tozan Beceren, A., Şehirli, A.Ö., Demiralp, E., Şener, G. and Omurtag, G.Z. (2012). Resveratrol Ameliorates Oxidative DNA Damage and Protects Against Acrylamide-Induced Oxidative Stress in Rats. *Molecular Biology Reports*. 39, 4589- 4596.
82. Şengül, E., Gelen, V., Yıldırım, S., Tekin, S. and Dağ, Y. (2021). The Effect of Selenium in Acrylamide-Induced Nephrotoxicity in Rats: Roles of Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, and DNA Damage. *Biological Trace Element Research*. 199(1), 173-184.
83. Ribas, L. Piferrer, F. (2013). The Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*. 6(4):209-240.





GAZİ GELECEKTİR..