



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2023; 37 (3): 188 - 194
http://www.fusabil.org

Sıçan Dalak Dokusunda Akrilamidin İndüklediği Oksidatif Stres, İnflamasyona ve Apoptoza Karşı Morinin Koruyucu Etkileri: Biyokimyasal ve Histopatolojik Bir Yaklaşım

Nurhan AKARAS^{1, a}
Fatih Mehmet KANDEMİR^{2, b}
Hasan ŞİMŞEK^{3, c}
Sefa KÜÇÜKLER^{4, d}
Rabia OĞUZ KABAYEL^{5, e}

¹ Aksaray Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Ana
Bilim Dalı,
Aksaray, TÜRKİYE

² Aksaray Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Ana Bilim
Dalı,
Aksaray, TÜRKİYE

³ Aksaray Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Ana Bilim Dalı,
Aksaray, TÜRKİYE

⁴ Atatürk Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Ana Bilim Dalı,
Erzurum, TÜRKİYE

⁵ Doğuş Üniversitesi,
Meslek Yüksekokulu,
Tıbbi Laboratuvar
Teknikleri,
İstanbul, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-8457-9448

^b ORCID: 0000-0002-8490-2479

^c ORCID: 0000-0001-5573-4923

^d ORCID: 0000-0002-8222-5515

^e ORCID: 0000-0003-2992-3880

Geliş Tarihi : 18.05.2023
Kabul Tarihi : 09.06.2023

Yazışma Adresi Correspondence

Nurhan AKARAS
Aksaray Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Ana
Bilim Dalı
Aksaray – TÜRKİYE

nurakaras@hotmail.com

Akrilamid (AKR), yaygın endüstri kullanımının yanı sıra yüksek karbonhidrat içerikli gıda maddelerinin ısı kaynaklı işlemleri (kavurma, fırınlama ve kızartma) sırasında oluşan sitotoksik ve kanserojen etkilere sahip kimyasal bir monomerdur. Morin (MOR) ise antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuar özelliklere sahip fenolik bir bileşiktir. Bu çalışma, MOR'in AKR kaynaklı dalak toksisitesine karşı etkilerini deneysel modelde incelemeyi amaçlamaktadır. Çalışmada, *Sprague-dawley* sıçanlarına ardışık 10 gün boyunca AKR (38.27 mg/kg vücut ağırlığı) ve MOR (50 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı) oral yoldan uygulanmış çalışma sonunda dalak, biyokimyasal ve histolojik olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, MOR'in antioksidan özellikler sergileyerek süperoksit dismutaz (P<0.05), katalaz (P<0.05), glutatyon peroksidaz (P<0.05) aktiviteleri ile glutatyon (P<0.05) düzeylerini yükselttiğini bununla birlikte AKR uygulaması ile artan malondialdehit (P<0.05) düzeylerini düşürdüğünü ortaya koymuştur. Ayrıca MOR, dalak dokusunda AKR kaynaklı artan NF-κB (P<0.05), IL-1B (P<0.05), TNF-α (P<0.05) ve COX-2 (P<0.05) seviyelerini azaltarak antiinflamatuar etki, kaspaz-3 (P<0.05) seviyelerini azaltarak antiapoptotik etki göstermiştir. MOR ayrıca patolojik değişiklikleri modüle ederek AKR'nin neden olduğu olumsuz etkileri azaltmıştır. Tüm bulgularımıza göre deneysel akrilamid uygulamasının dalakta oluşturduğu toksisiteye karşı morinin yararlı etkilerinin olduğu ifade edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, dalak, inflamasyon, morin, oksidatif stres, sıçan

Protective Effects of Morin Against Acrylamide-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Rat Spleen Tissue: A Biochemical and Histopathological Approach

Acrylamide (ACR) is a chemical monomer with cytotoxic and carcinogenic effects that is formed during heat-induced processing (roasting, baking and frying) of foods with high carbohydrate content, as well as widespread industrial use. Morine (MOR) is a phenolic compound with antioxidant, antiapoptotic and anti-inflammatory properties. This study aimed to examine the effects of MOR against ACR-induced spleen toxicity in an experimental model. In the study, the spleen was evaluated biochemically and histologically in Sprague-Dawley rats that received oral administration of ACR (38.27 mg/kg body weight) and MOR (50 and 100 mg/kg body weight) for 10 consecutive days. The results revealed that MOR exhibited antioxidant properties and increased glutathione (P<0.05) levels with superoxide dismutase (P<0.05), catalase (P<0.05), glutathione peroxidase (P<0.05) activities, and decreased malondialdehyde (P<0.05) levels, which increased with ACR application. In addition, MOR showed anti-inflammatory effect by decreasing the increased levels of NF-κB (P<0.05), IL-1B (P<0.05), TNF-α (P<0.05), and COX-2 (P<0.05) caused by ACR in the spleen tissue, and anti-apoptotic effect by decreasing caspase-3 (P<0.05) levels. MOR also modulated pathological changes, reducing the adverse effects caused by ACR. According to all our findings, it can be expressed that morin has beneficial effects against spleen toxicity induced by experimental acrylamide administration.

Key Words: Acrylamide, spleen, inflammation, morin, oxidative stress, rat

Giriş

Akrilamid (AKR), akrilik amid; prop-2-enamid; kimyasal formül C₃H₅NO) su arıtma endüstrisi, gıda, boya sentezi, sigara dumanı, kağıt ambalajlama, tekstil ve laboratuvar işlemleri gibi birçok alanda kullanılan suda çözünür bir bileşiktir (1-3). Normalde yüksek karbonhidrat içerikli gıdaların çiğ hallerinde bulunmayan AKR, ısıtıldıklarında (120°C'den fazla) asparajın ve indirgeyici şekerler arasındaki Maillard reaksiyonu sonucunda oluşur. Özellikle insanlar tarafından oldukça fazla tüketilen patates kızartması ve unlu mamüller nedeniyle artan AKR riski, sağlık açısından endişe yaratıcı bir durum ortaya çıkarmıştır (1, 3, 4). Ayrıca AKR maruziyetinin lipid oksidasyonu oluşumunda katkısı olduğu bilinen bir gerçektir (1, 3).

AKR'in gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunmasından dolayı oral maruziyetine ilişkin toksikolojik çalışmalar çok ilgi çekmiştir. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) gıda maddelerinden günlük AKR tüketiminin 0.3–0.8 µg/kg vücut ağırlığı/gün olduğunu bildirmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) AKR'i, olası bir insan kanserojeni olan 2A sınıfında değerlendirmiştir (2, 5). AKR'nin kanserojen etkisinin yanı sıra genotoksik, nörotoksik, hepatotoksik, nefrotoksik gibi etkilere neden olduğu rapor edilmiştir (1, 2, 4, 6, 7). AKR toksisitesi oluşturulmuş hayvan modellerinde lenfosit sayısındaki azalmalar,

timus, lenf bezleri ve dalaktaki patolojik değişiklikler humoral ve hücre aracılı bağışıklık bozukluklarına sebep olur (5, 6).

AKR'in çeşitli dokular üzerindeki toksik etkileri lipid peroksidasyonu, enzimatik aktivitelerinin bozulması, DNA oksidatif hasarı, inflamatuvar hücre infiltrasyonu şeklinde sıralanabilir. Bütün bu etkilerin başlıca nedeni artmış reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre zarı, DNA, protein, lipid ve biyomoleküllere saldırması yatmaktadır. Bununla birlikte AKR, mitokondriyal fonksiyonu bozarak sitokrom C'yi serbest bırakır ve apoptotik yolları tetikler (1, 7-10).

AKR toksisitesine karşı doğal bileşiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Antioksidan özelliği olan flavonoidler AKR toksisitesiyle mücadelede yararlı bir yöntem olabilir (1, 9, 11). Hemen hemen bütün meyvelerde, sebzelerde ve tohumlarda bulunan flavonlar antioksidan özellikleri yanında antiinflamatuvar, antikanserojen ve antiapoptotik özelliklere de sahiptir. Önemli flavonlardan biri olan MOR (2',3,4',5,7-pentahidroksiflavon), *Maclura tinctoria*, *Maclura pomifera* ve *Psidium guajava'nın* yapraklarından izole edilirler. MOR'in en büyük avantajı yüksek dozlarda bile yan etkilerinin olmamasıdır. Son yıllarda MOR'in özellikle çeşitli organ toksisitelerine karşı farmakolojik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (1, 2, 4).

Bütün bu bilgiler ışığında sunulan çalışma, sıçan dalak dokularında AKR kaynaklı oksidatif stres, inflamatuvar, apoptotik ve patolojik tepkilere karşı morinin etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Mevcut çalışma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından incelendi ve onaylandı (Onay No:11/161).

Kimyasallar: Morin hidrat (CAS No: 654055-01-3, molekül ağırlığı: 302.24 g/mol), AKR (CAS Numarası 79-06-1, molekül ağırlığı: 71.08 g/mol) ve diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma (St. Louis, ABD) tarafından sağlanmıştır.

Hayvanlar ve Deneysel Protokolü: Deneysel hayvanlar üzere Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden 35 adet erişkin erkek Sprague-dawley sıçanları (250±20 g ağırlığında) temin edildi. Sıçanlar deney süresince 24±1°C'de, %45±5 nemde ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan bir odada bekletildi. Hayvanlara çalışma süresinde standart yem ve su verildi.

Çalışmada sıçanlar her grupta 7 adet olacak şekilde rastgele beş gruba ayrıldı. Gruplara uygulanan toksik ve tedavi dozları daha önceki çalışmalara bakılarak belirlendi (1, 3, 4). Tüm ilaçlar 10 gün boyunca gastrik sonda ile uygulandı.

Grup I (Kontrol): Bu gruptaki sıçanlara 10 gün boyunca serum fizyolojik verildi.

Grup II (AKR): Sıçanlara 10 gün 38.27 mg/kg dozda AKR verildi.

Grup III (MOR): 10 gün boyunca sıçanlara 100 mg/kg dozda MOR oral olarak verildi.

Grup IV (AKR+MOR 50): 10 gün boyunca sıçanlara 38.27 mg/kg AKR oral olarak uygulandıktan 30 dakika sonra 50 mg/kg dozda MOR oral olarak uygulandı.

Grup V (AKR+MOR100): 10 gün boyunca oral yoldan 38.27 mg/kg AKR uygulandıktan 30 dakika sonra 100 mg/kg MOR oral olarak verildi.

Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra hafif sevofluran anestezisi uygulanan sıçanlardan alınan dalak dokuları biyokimyasal incelemeler için -20 °C'de, histolojik analizler için ise uygun solüsyonunda saklandı.

Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi: Dalak dokuları -20°C'den çıkarıldıktan sonra sıvı nitrojen ile içerisinde toz haline getirildi. Toz haline getirilen dalak dokuları %1.15 KCl ile sulandırılarak homojenizasyon yapıldı (Tissue Lyser II, Qiagen). Santrifüjledikten sonra elde edilen süpernatantlar lipid peroksidasyon ve antioksidan ölçümü için kullanıldı. Dokulardaki malondialdehit (MDA) düzeyi Placer ve ark. (12)'nin yöntemine göre ölçüldü ve nmol/g doku olarak ifade edildi. Glutasyon (GSH) düzeyi Sedlak ve Lindsay (13)'ün kullandığı yöntemle ölçüldü ve nmol/g doku olarak verildi. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Sun ve ark. (14) yöntemine göre hesaplandı ve U/g olarak ifade edildi. Aebi (15)'nin methoduna göre katalaz (KAT), Lawrence ve Burk (16) methoduna göre ise glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi ölçüldü. Toplam protein analizinde ise Lowry ve ark. (17) geliştirdiği method kullanıldı.

İnflamasyon ve Apoptoz Belirteçlerinin Analizi: Nükleer faktör kappa-B (NF-κB), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α), interlökin 1-beta (IL-1β) seviyeleri ile siklooksijenaz 2 (COX-2) ve kaspaz-3 aktivitelerinin ölçümleri ELISA kitleri kullanılarak (Sunred, Şangay, Çin) üretici firma talimatları doğrultusunda yapılarak sonuçlar standart grafik kullanılarak hesaplandı.

Histolojik Analiz: Deneysel hayvanlardan alınan dalak dokuları 72 saat boyunca %10'luk nötr tamponlu formalin içinde bekletildi ve fikse edildi. Ardından dokular dehidrasyon için artan dereceli alkol serilerinden (%70-100) geçirilerek takibe başlandı. Alkolden sonra dokuları şeffaflaştırmak için ksilolden geçirildi ve infiltrasyon için erimiş sıcak parafinde bekletildi. Dalak dokularından kesit almak için parafin bloklar hazırlandı ve mikrotom (Leica, RM2255) ile 5 mikrometrelik kesitler alındı. Dokular mikroskop altında değerlendirilmesi için hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyandı. Boyanan kesitler, bir Binoküler Olympus Cx43 ışık mikroskobu (Olympus Inc., Tokyo, Japonya) kullanılarak incelendi ve mikroskoba bağlı EP50 marka kamera (Olympus Inc., Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı.

İstatistiksel Analiz: Çalışma sonunda elde edilen verilerde gruplara ait değerlerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için Shapiro-Wilk normallik analizi yapıldı ve testin sonucunda tüm parametrelerdeki değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Gruplar arasındaki fark ve anlamlılık düzeylerinin belirlenmesi

için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi kullanıldı. Tüm değerler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edildi (18). $P<0.05$ 'te anlamlı fark kabul edildi.

Bulgular

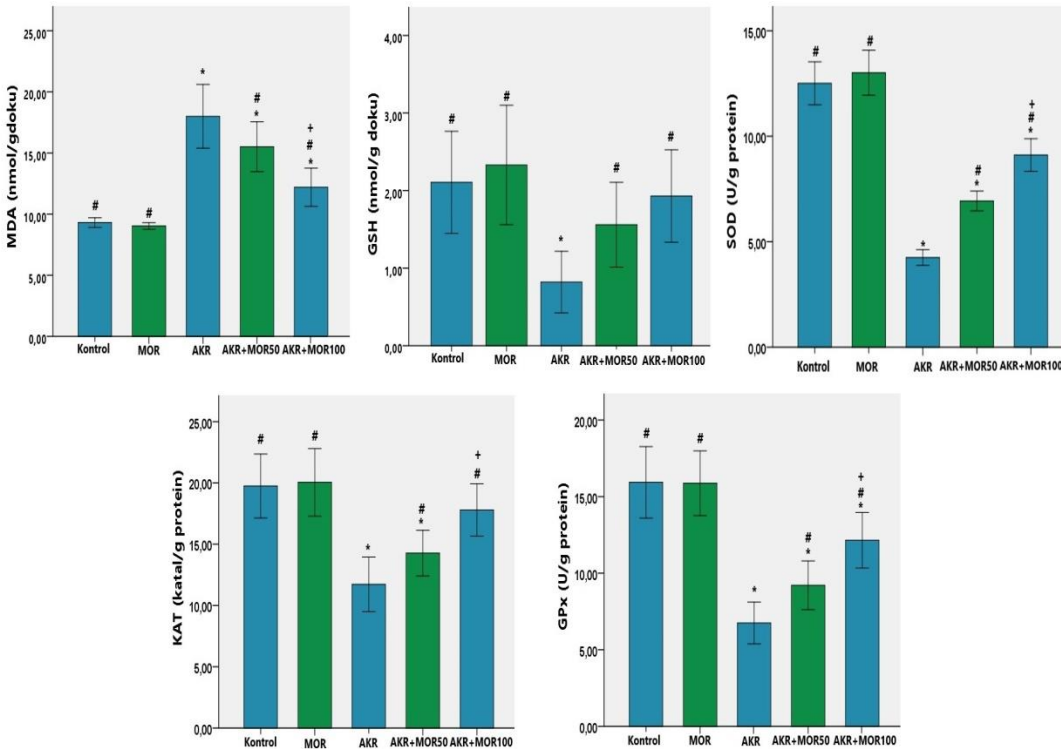
AKR ve MOR'nin Dalak Oksidan-Antioksidan Denge Üzerindeki Etkileri: MOR'in, AKR ile indüklenen sıçanların dalak dokularındaki MDA, GSH seviyeleri ve SOD, KAT, GPx aktiviteleri üzerindeki koruyucu etkileri Şekil 1'de gösterildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AKR uygulanan grupta MDA seviyesi önemli ölçüde artarken GSH, SOD, KAT ve GPx gibi antioksidan parametreleri anlamlı ölçüde azalma tespit edildi ($P<0.05$). MDA seviyesinin AKR+MOR 50 ve AKR+MOR 100 gruplarında AKR grubuna göre düştüğü saptandı. GSH düzeyleri ve SOD, KAT, GPx aktivitelerinin ise tedavi gruplarında AKR grubu ile kıyaslandığında arttığı belirlendi ($P<0.05$).

AKR ve MOR'nin Dalak İnflamasyonu Üzerindeki Etkileri: MOR ile tedavi edilen sıçanların dalak dokusundaki inflamatuvar belirteçler (NF- κ B, IL-1 β , TNF- α , COX-2) analiz edilmiş ve sonuçları şekil 2'de verildi. Dalak dokularında AKR kaynaklı NF- κ B, IL-1 β , TNF- α ve COX-2 seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ($P<0.05$), MOR ile tedavinin NF- κ B, IL-1 β , TNF- α düzeylerini ve COX-2 aktivitelerini anlamlı şekilde düşürdüğü belirlendi. Özellikle MOR 100

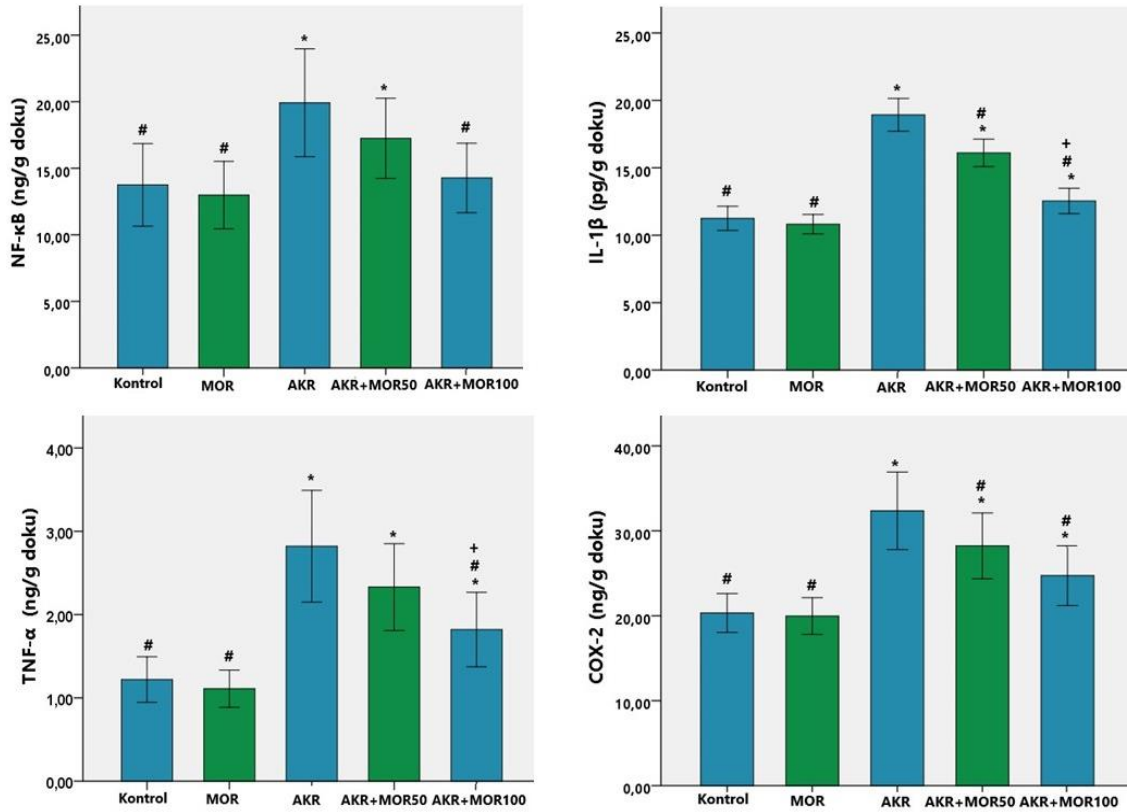
mg/kg dozunun IL-1 β ve TNF- α düzeylerinde daha etkili olduğu saptandı ($P<0.05$).

AKR ve MOR'nin Dalak Apoptoz Belirteçleri Üzerindeki Etkileri: MOR'in antiapoptotik etkisini değerlendirmek için AKR ile indüklenen sıçanların dalak dokularındaki kaspaz-3 aktivitesi incelendi (Şekil 3). AKR ile indüklenen grupta kontrol grubuna göre kaspaz-3 seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu ve apoptozisin hızlandığı görülürken ($P<0.05$), AKR ile birlikte verilen MOR'in yüksek dozu, sadece AKR uygulanan grupla karşılaştırıldığında, kaspaz-3 seviyelerini önemli ölçüde azalttığı tespit edildi ($P<0.05$).

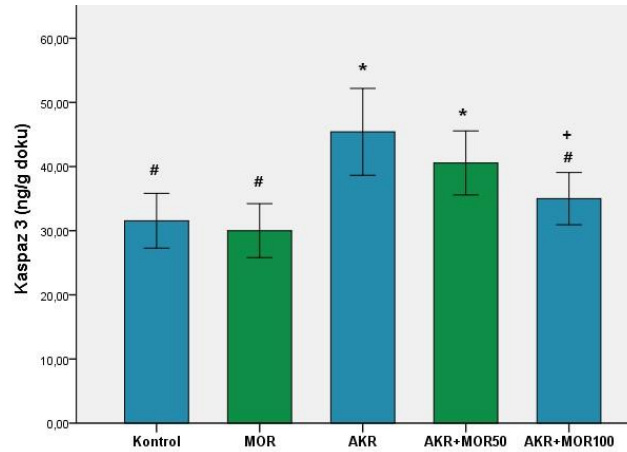
Histopatolojik Sonuçlar: Kontrol ve MOR grubu dalak histolojik görüntüleri incelendiğinde organı saran kapsül normal kalınlıkta ve trabeküllerdeki arter ve venlerin yapısı korunmuştu. Dokunun ana yapısını oluşturan kırmızı ve beyaz pulpaların sınırları düzgün ve ayırt edilebiliyordu. Ayrıca beyaz pulpadaki germinal merkez ve merkezi arter yapısını koruduğu görüldü (Şekil 4A, B). Tam tersi olarak AKR grubunda ise pulpa arasındaki sınır bozulmuş ve beyaz pulpa hücrelerinde azalma ve vakuolizasyon tespit edildi. Bu gruba ait dalak dokusunda damarlarda konjesyon ve sinozidlerde genişlemeler gözlemlendi. (Şekil 4C). Tedavi gruplarına bakıldığında AKR'e kıyasla pulpa ayrımları düzgün ve beyaz pulpa normal büyüklükte olduğu görüldü. Dalak kordonlarının yapısal olarak bütünlüğü korunduğu ve histolojik olarak iyileşmelerin meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4D, E).



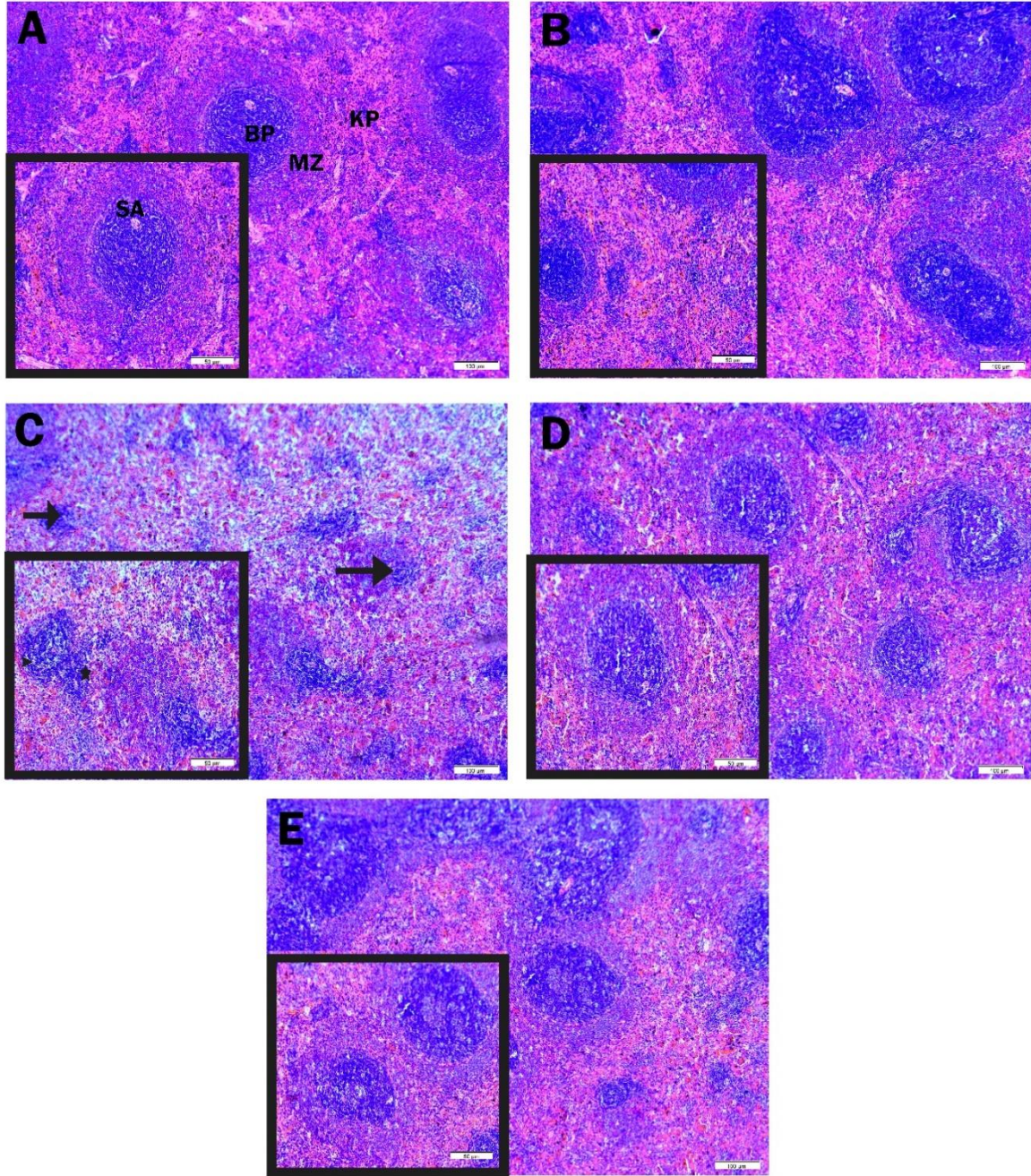
Şekil 1. AKR ve MOR uygulamasının sıçan dalak dokularında oksidatif stres belirteçleri üzerindeki etkileri. [Malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx)]. İstatistiksel anlamlılık (Kontrol grubu ve diğer gruplar arasındaki karşılaştırma: * $P<0.05$, AKR grubu ve diğer gruplar arasındaki karşılaştırma: # $P<0.05$, AKR+MOR 50 ve AKR+MOR 100 grupları arasındaki karşılaştırma: + $P<0.05$) tek yönlü ANOVA ve Tukey testi kullanılarak analiz edildi.



Şekil 2. AKR ve MOR uygulamasının siçan dalak dokularında NF-κB, IL-1β, TNF-α ve COX-2 aktiviteleri üzerindeki etkileri. NF-κB: Nükleer faktör kappa-B, IL-1β: Interleukin-1 beta, TNF-α: Tümör nekroz faktörü alfa, COX-2: Siklooksijenaz 2. İstatistiksel anlamlılık (Kontrol grubu ve diğer gruplar arasındaki karşılaştırma: * P<0.05, AKR grubu ve diğer gruplar arasındaki karşılaştırma: # P<0.05, AKR+MOR 50 ve AKR+MOR 100 grupları arasındaki karşılaştırma: +P<0.05) tek yönlü ANOVA ve Tukey testi kullanılarak analiz edildi.



Şekil 3. AKR ve MOR uygulamasının siçan dalak dokularında kaspaz-3 aktiviteleri üzerine etkileri. Kaspaz-3: Sistein aspartata özgü pROSeaz-3. İstatistiksel anlamlılık (Kontrol grubu ve diğer gruplar arasındaki karşılaştırma: * P<0.05, AKR grubu ve diğer gruplar arasındaki karşılaştırma: # P<0.05, AKR+MOR 50 ve AKR+MOR 100 grupları arasındaki karşılaştırma: +P<0.05) tek yönlü ANOVA ve Tukey testi kullanılarak analiz edildi.



Şekil 4. Dalak dokusundaki histolojik değişikliklerin fotomikrografları. (H&E boyama, 100-200x). **A.** Kontrol grubu; BP: Beyaz Pulpa, KP: Kırmızı Pulpa, MZ: Marjinal Zon, SA: Merkezi Arteriol. **B.** MOR (Morin) grubu. **C.** AKR (Akrilamid) grubu; ok: Küçülmüş ve sınırları bozulmuş beyaz pulpa, yıldız: Kanama, ok başı: Vakuollü hücreler. **D.** AKR+MOR 50 (Akrilamid + Morin 50) grubu. **E.** AKR+MOR 100 (Akrilamid + Morin 100) grubu

Tartışma

AKR yaygın endüstriyel kullanımı ve günlük tüketilen gıda ile alımının fazlalığı sebebiyle her geçen gün daha da önemli halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bu nedenle araştırmacılar son zamanlarda AKR'in toksisite mekanizmalarını aydınlatmak ve hasara karşı yeni terapötik ya da alternatif seçenekler bulmak için yoğun bir şekilde çalışmaktadırlar (1, 2, 4). Bu

çalışmanın amacı AKR'in neden olduğu dalak toksisitesi üzerine MOR'in etkilerini araştırmaktır.

Katı geçirgenliğe sahip, suda çözünür toksik bir madde olan AKR, hızla kan dolaşımına karışabilir ve dalak hasarını tetikleyebilir (4-6). AKR kaynaklı hastalıkların patogeneğinde süperoksit, peroksitler ve hidroksil radikali gibi oksidatif metabolizmanın yan ürünleri olan ROS'nin hücrelerde DNA, ROS ve lipidlere

saldırması yatmaktadır (1, 2, 4, 19). ROS'lerinin vücuttan temizlenmesi için enzimatik (SOD, KAT ve GPx) ve enzimatik olmayan (GSH) antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır (20-22). Vücut homeostasisinin korunmasını sağlayan antioksidan savunma sistemleri AKR maruziyeti sonucu bozulur ve oksidatif stres gelişir (5).

AKR'in DNA oksidatif hasarını artırdığı ve antioksidan enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu, böylece doku hasarı gelişimini hızlandırdığı Gür ve ark. tarafından bildirilmiştir (4). Yine farklı dokular üzerinde yapılan çalışmalarda MOR'in oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (1, 2, 4). Mevcut çalışmada AKR'in antioksidan-oksidan dengenin oksidan lehine dönmesine ve oksidatif strese neden olduğu görülmüştür. Bunun olası nedenlerinin AKR'in GSH depolarını tüketmesi ve -SH gruplarına bağlanarak antioksidan enzimleri inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca MOR enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan düzeylerini yükselterek lipid peroksidasyonunu azalttığı ve böylece AKR tarafından tetiklenen oksidatif stresi azalttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında MOR'in antioksidan etkisi, yapısındaki hidroksil grupları tarafından ROS'lerini süpürme özelliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

İmmün hastalıkların patogeneğinde inflamasyon ana rol oynar. İnflamasyon, vücutta kimyasal, fiziksel veya biyolojik bir maddenin varlığında yanıt olarak ortaya çıkar. Temel transkripsiyon faktörü olan NF- κ B immün sistem hastalıklarında, apoptozda ve inflamasyonda kritik düzenleyicisi olduğu iyi bir şekilde belgelenmiştir. NF- κ B'nin, IL-1 β , TNF- α , ve COX-2, vb. gibi birçok proinflamatuvar aracının transkripsiyonunu destekleyen, inflamatuvar sürecin temel düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (23-25). Gür ve ark. (4) AKR'nin NF- κ B'yi aktive ettiğini ve buna bağlı olarak proinflamatuvar sitokin düzeylerinin artması nedeniyle nöroinflamasyonun meydana geldiğini bildirmiştir. Kandemir ve ark. (1) ise AKR maruziyeti sonrası ROS üretiminin arttığını ve buna bağlı olarak proinflamatuvar yolların tetiklediğini bildirmişlerdir. Sunulan bulgular AKR uygulamasının NF- κ B seviyelerindeki artışa ek olarak TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyeleri ile COX-2 aktivitesini arttırdığını ve böylece inflamasyona neden olduğunu ortaya koymuştur. Önceki çalışmalar, MOR'in çeşitli dokularda NF- κ B aktivasyonunu baskılayarak inflamasyonu azalttığını bildirmiştir (1, 4). Sunulan çalışmada MOR'in, NF- κ B, IL-1 β , TNF- α düzeylerini ve COX-2 aktivitesini düşürerek AKR'nin neden olduğu inflamasyona karşı önemli ölçüde koruma sağlayabildiği tespit edilmiştir. NF- κ B sinyal yollarının

inflamasyondaki önemi nedeniyle inflamatuvar ajanlara karşı bu yolları hedef alan terapötiklerin kullanılması tedavide önemli avantajlar sağlayacaktır.

Apoptozis oksidatif stres ve inflamasyon dahil olmak üzere çeşitli patolojik ve fizyolojik uyarılar tarafından yönlendirilen programlı hücre ölüm sürecidir. Dokularda belirli sınırdan geçen apoptozis bazı faktörlere bağlı olarak artar ve organlarda disfonksiyona sebep olur. Sistein aspartik asit proteaz aile üyelerinden biri olan kaspaz-3 apoptozun erken evrelerinde aktive olmaktadır (25-30). AKR ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı dokularda kaspaz-3'ün aşırı ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (1, 2). Kandemir ve arkadaşları yaptıkları in-vivo çalışmada AKR'in apoptozdan sorumlu kaspaz-3'ü arttığını bildirmiştir (1). Bu çalışmada sıçanlarda AKR uygulamasının kaspaz-3 aktivitesini artırdığı ve MOR tedavisi ise bir antioksidan olarak kaspaz-3'ü azaltabileceği bildirilmiştir. Özetle yüksek doz MOR'in kaspaz-3 aktivitesini inhibe ettiği ve dolayısıyla MOR'in antiapoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada histopatolojik bulgularımızın biyokimyasal bulgularımızla paralel olduğu görülmüştür. Yapılan in-vivo çalışmalarda AKR maruziyetinin, dalak dokusunun özellikle pulpa sınırlarını ve histomimarisini bozduğu bildirilmiştir (5, 6, 31). Verilerimize göre, AKR uygulamasından sonra dalak dokusunda dejeneratif değişiklikler tespit edilmiştir. Dalak dokusu kırmızı ve beyaz pulpanın normal yapısının bozulduğu gözlenmiştir. Özellikle beyaz pulpanın hücreleri azalmış, hemorajik alanlar, sinüzoidal dilatasyon ve vakuollü hücreler izlenmiştir. Bu patolojik bulguların altındaki sebebin ROS birikimine bağlı olduğu düşünülmüştür. AKR ve MOR verilen gruplarda dalak dokusu incelendiğinde ise normal morfolojide beyaz ve kırmızı pulpa görülmüştür. Ayrıca beyaz ve kırmızı pulpada vakuollü hücreler ve hemoraji azalmıştır.

Akrilamid toksisitesinin artan insidansı ve prevalansı göz önüne alındığında, en etkili ve güvenli tedavi yönteminin veya kombinasyonunun bulunması önemlidir. Bu çalışma, AKR'in oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu başlatarak dalak toksisitesine neden olduğunu, MOR'in AKR kaynaklı dalak hasarını azalttığını, bu etkisini de antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri sayesinde sağladığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, elde edilen veriler ışığında MOR' in AKR' in neden olduğu dalak hasarına karşı alternatif ya da destekleyici tedavi olarak kullanılması yönünde yapılacak çalışmalara destek sağlaması açısından önemlidir.

Kaynaklar

1. Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, et al. Protective effects of morin against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity: A multi-biomarker approach. *Food Chem Toxicol* 2020; 138: 111190.
2. Kucukler S, Çağlayan C, Darendelioğlu E, Kandemir FM. Morin attenuates acrylamide-induced testicular toxicity in rats by regulating the NF- κ B, Bax/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. *Life Sci* 2020; 261: 118301.
3. Pietropaoli F, Pantalone S, Cichelli A, d'Alessandro N. Acrylamide in widely consumed foods - a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2022; 39: 853-887.

4. Gur C, Kandemir FM, Darendelioglu E, et al. Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: An investigation into different signal pathways. *Environ Sci Pollut Res Int* 2021; 28: 49808-49819.
5. Shukla P, Sahu NK, Kumar R, et al. Quercetin ameliorates acute acrylamide induced spleen injury. *Biotech Histochem* 2023; 98: 1-9.
6. Hashem MM, Abo-El-Sooud K, Abd El-Hakim YM, et al. The impact of long-term oral exposure to low doses of acrylamide on the hematological indicators, immune functions, and splenic tissue architecture in rats. *Int Immunopharmacol* 2022; 105: 108568.
7. Hong Y, Nan B, Wu X, Yan H, Yuan Y. Allicin alleviates acrylamide-induced oxidative stress in BRL-3A cells. *Life Sci* 2019; 231: 116550.
8. Jiang G, Lei A, Chen Y, et al. The protective effects of the *Ganoderma atrum* polysaccharide against acrylamide-induced inflammation and oxidative damage in rats. *Food Funct* 2021; 12: 397-407.
9. Banc R, Popa DS, Cozma-Petruț A, et al. Protective effects of wine polyphenols on oxidative stress and hepatotoxicity induced by acrylamide in rats. *Antioxidants* 2022; 11: 1347.
10. Firouzabadi AM, Imani M, Zakizadeh F, et al. Evaluating effect of acrylamide and ascorbic acid on oxidative stress and apoptosis in ovarian tissue of wistar rat. *Toxicol Rep* 2022; 9: 1580-1585.
11. El-Shehawi AM, Sayed S, Hassan MM, et al. Taify pomegranate juice (TPJ) abrogates acrylamide-induced oxidative stress through the regulation of antioxidant activity, inflammation, and apoptosis-associated genes. *Front Vet Sci* 2022; 9: 833605.
12. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
13. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
14. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
16. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
18. Ozdamar K. *Biostatistics with SPSS*. Kaan Bookstore, 2001.
19. Fang Z, Luo Y, Ma C, Dong L, Chen F. Blueberry anthocyanins extract attenuates acrylamide-induced oxidative stress and neuroinflammation in rats. *Oxid Med Cell Longev* 2022; 2022: 7340881.
20. Akaras N, Gur C, Kucukler S, Kandemir FM. Zingerone reduces sodium arsenite-induced nephrotoxicity by regulating oxidative stress, inflammation, apoptosis and histopathological changes. *Chem Biol Interact* 2023; 374: 110410.
21. Ileriturk M, Kandemir O, Akaras N, et al. Hesperidin has a protective effect on paclitaxel-induced testicular toxicity through regulating oxidative stress, apoptosis, inflammation and endoplasmic reticulum stress. *Reprod Toxicol.* 2023; 118: 108369.
22. Gur C, Akarsu SA, Akaras N, Tuncer SC, Kandemir FM. Carvacrol reduces abnormal and dead sperm counts by attenuating sodium arsenite-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in the testicular tissues of rats. *Environ Toxicol* 2023; 38: 1265-1276.
23. Ileriturk M, Kandemir O, Kandemir FM. Evaluation of protective effects of quercetin against cypermethrin-induced lung toxicity in rats via oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and endoplasmic reticulum stress pathway. *Environ Toxicol* 2022; 37: 2639-2650.
24. Çomaklı S, Kandemir FM, Küçükler S, Özdemir S. Morin mitigates ifosfamide induced nephrotoxicity by regulation of NF-kappaB/p53 and Bcl-2 expression. *Biotech Histochem* 2022; 97: 423-432.
25. Kandemir FM, Yıldırım S, Çağlayan C, Kucukler S, Eser G. Protective effects of zingerone on cisplatin-induced nephrotoxicity in female rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019; 26: 22562-22574.
26. Varışlı B, Çağlayan C, Kandemir FM, et al. The impact of Nrf2/HO-1, caspase-3/Bax/Bcl2 and ATF6/IRE1/PERK/GRP78 signaling pathways in the ameliorative effects of morin against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *Mol Biol Rep* 2022; 49: 9641-9649.
27. Gur C, Kandemir FM, Çağlayan C, Satici E. Chemopreventive effects of hesperidin against paclitaxel-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via amendment of Nrf2/HO-1 and caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Chem Biol Interact* 2022; 365: 110073.
28. Akdemir FNE, Yıldırım S, Kandemir FM. The possible beneficial impacts of evodiamine on hepatotoxicity induced by cisplatin. *Environ Sci Pollut Res Int* 2022; 29: 89522-89529.
29. Kandemir FM, Çağlayan C, Darendelioglu E, et al. Modulatory effects of carvacrol against cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by molecular targeting regulation. *Life Sci* 2021; 277: 119610.
30. Şimşek H, Akaras N, Gür C, Küçükler S, Kandemir FM. Beneficial effects of Chrysin on Cadmium-induced nephrotoxicity in rats: Modulating the levels of Nrf2/HO-1, RAGE/NLRP3, and Caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Gene* 2023; 875: 147502.
31. Zamani E, Shokrzadeh M, Ziar A, Abedian-Kenari S, Shaki F. Acrylamide attenuated immune tissues' function via induction of apoptosis and oxidative stress: Protection by L-carnitine. *Hum Exp Toxicol* 2018; 37: 859-869.