



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HAMİLELİKTE VE LAKTASYONDA AKRİLAMİD
VE ALKOL UYGULANAN FARELERİN ERKEK
YAVRULARININ TESTİS GELİŞİMİ**

EMİNE ŞEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Melike ERKAN

Haziran, 2013

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAMİLELİKTE VE LAKTASYONDA AKRİLAMİD VE ALKOL UYGULANAN FARELERİN ERKEK YAVRULARININ TESTİS GELİŞİMİ

Emine ŞEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

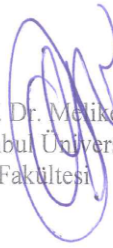
Prof. Dr. Melike ERKAN

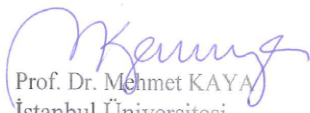
Haziran, 2013

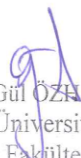
İSTANBUL

2601090381 öğrenci numaralı Emine ŞEN tarafından hazırlanan bu çalışma 06/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof. Dr. Melike ERKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Mehmet KAYA
İstanbul Üniversitesi
Tıp Fakültesi


Doç. Dr. Gül ÖZKAN
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi


Doç. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ
İstanbul Üniversitesi
Veteriner Fakültesi


Yard. Doç. Dr. Meliha İNCELİ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 7503 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada günlük beslenme alışkanlıklarımız dolayısıyla sıklıkla maruz kaldığımız akrilamid ve alkolün anneden erkek yavruya geçerek testiste oluşturduğu etkinin histolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca bilgisiyle ve tecrübesiyle gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı bilimsel düşüncenin ne olduğunu öğrendiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Melike ERKAN'a en içten dileklerle teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma boyunca manevi olarak yardımlarını esirgemeyen, her zaman tavsiyelerinden yararlandığım çalışma arkadaşım ve ablam olan Araş. Gör. Dr. Yasemin TUNALI AYUN'a ve eşi Mehmet Resul AYUN'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca yardımcı olan arkadaşım Uzman Biyolog Banu ORTA'ya ve deneylerim sırasında yardımlarını esirgemeyen biyolog Batuhan COŞKUN, Ezgi HAMZAOĞLU, Gülnaz YILDIRIM ve Mine CELEP'e teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'de görevli deney hayvanlarının bakımı ve madde uygulama sırasında yardımları dolayısıyla Sayın Gökhan ORUÇ'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi olarak tüm öğrenim hayatım boyunca destekleri ile yanımda olan çok sevgili ANNEM Gülşen ŞEN'e, BABAM, ABLAM ve EŞİN'E teşekkür ederim. Ayrıca her zaman yanımda olan dayım Prof. Dr. Veysel GAZİ'ye ve kuzenim Rakıp MERCAN'a teşekkürlerimi sunarım. Son olarak her türlü zorlukta yanımda olan arkadaşlarım Münevver EROĞLU ve Dilek ADEMOĞLU'na teşekkür ederim.

Haziran, 2013

Emine ŞEN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. TESTİSİN GENEL YAPISI	3
2.2. AKRİLAMİD	7
2.3. ALKOL.....	13
2.4. OKSİDATİF HASAR.....	17
3. MALZEME VE YÖNTEM	19
3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	19
3.2. GONADOSOMATİK İNDEKS	21
3.3. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER.....	22
3.4. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER.....	23
3.4.1. Total Protein Tayini	23
3.4.2. Membran Lipit Peroksidasyonun Tayini.....	24
3.4.3. Katalaz Tayini	25
3.4.4. Süperoksit dismutaz (SOD) Tayini	27
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	28
4. BULGULAR	29
4.1. GONADOSOMATİK İNDEKS	29
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	30
4.3. HİSTOMETRİK BULGULAR	33
4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	41

4.4.1. Total Protein Miktarı.....	41
4.4.2. Lipit Peroksidasyonu.....	42
4.4.3. Katalaz Enzimi Miktarı	43
4.4.4. SOD Enzimi Miktarı	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ.....	73

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.2.1.: Akrilamidin moleküler yapısı.....	7
Şekil 2.2.2.: Akrilamid ve metaboliti olan glisidamidin metabolik şeması.....	10
Şekil 2.3.1.: Alkol metabolizması	14
Şekil 2.4.1.: Serbest radikallerin oluşum mekanizması.	18
Şekil 4.1.1.: Kontrol ve deney gruplarının gonadosomatik indeks.	29
Şekil 4.2.1.: Kontrol ve hamilelik dönemi deney gruplarının testis kesitleri	30
Şekil 4.2.2.: Kontrol ve laktasyon dönemi deney gruplarının testis kesitleri.....	31
Şekil 4.2.3.: Kontrol ve hamilelik+laktasyon dönemi deney gruplarının testis kesitleri	32
Şekil 4.3.1.: Kontrol ve deney gruplarında mm ² 'de spermatogonyum miktarı.....	36
Şekil 4.3.2.: Kontrol ve deney gruplarında mm ² 'de primer spermatosit miktarı	36
Şekil 4.3.3.: Kontrol ve deney gruplarında mm ² 'de sekonder spermatosit miktarı.....	37
Şekil 4.3.4.: Kontrol ve deney gruplarında mm ² 'de erken spermatid miktarı.....	37
Şekil 4.3.5.: Kontrol ve deney gruplarında mm ² 'de Sertoli hücresi miktarı	38
Şekil 4.3.6.: Kontrol ve deney gruplarında mm ² 'de Leydig hücresi miktarı.....	38
Şekil 4.3.7.: Kontrol ve deney gruplarında mm ² 'de dejenere hücre miktarı	39
Şekil 4.3.8.: Kontrol ve deney gruplarında testis verimliliği.....	39
Şekil 4.4.1.1.: Kontrol ve deney gruplarında total protein miktarı.....	41
Şekil 4.4.2.1.: Kontrol ve deney gruplarında testiste oluşan MDA miktarı	42
Şekil 4.4.3.1.: Kontrol ve deney gruplarında testisteki katalaz enzimi miktarı.....	43
Şekil 4.4.4.1.: Kontrol ve deney gruplarında testisteki SOD enzimi miktarı	44

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.2.1.: 2009 yılında gıdalarda bulunan akrilamid miktarları ($\mu\text{g/kg}$).....	9
Tablo 3.1.: Akrilamid, Alkol ve Akrilamid + Alkol Uygulanan Deney Grupları.....	21
Tablo 4.3.1.: Kontrol ve deney gruplarında spermatogenik hücre oranları a: Kontrol grubuna göre.....	40

SEMBOL LİSTESİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AKR	: Akrilamid Grubu
AKR+AL	: Akrilamid ve Alkol Grubu
AL	: Alkol Grubu
ALD	: Alkol Dehidrogenaz
ALDH	: Aldehit Dehidrogenaz
CYP2E1	: Sitokrom P450 E1
FAS	: Fetal Alkol Sendromu
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S Transferaz
H	: Hamilelik Grubu
HL	: Hamilelik ve Laktasyon Grubu
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
L	: Laktasyon Grubu
LH	: Luteinleştirici Hormon
LOAEL	: Etki Görülen En Düşük Doz
NOAEL	: Etki Gözlenmeyen Doz
MDA	: Malondialdehit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
UV	: Ultraviyole Işın

ÖZET

HAMİLELİKTE VE LAKTASYONDA AKRİLAMİD VE ALKOL UYGULANAN FARELERİN ERKEK YAVRULARININ TESTİS GELİŞİMİ

Bu çalışmada hamilelik ve laktasyon süresince oral yolla akrilamid ve alkol uygulanan farelerin erkek yavrularında testis gelişimi ve testiste oluşabilecek oksidatif hasar incelenmiştir.

Endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan akrilamidin, son yıllarda yüksek sıcaklıkta pişirilen gıdalarda kendiliğinden oluştuğu bulunmuştur. Besinlerde bulunan akrilamidin insan ve hayvan sağlığı üzerine norötoksik ve kanserojenik etkileri bulunmaktadır. Ayrıca, erkek üreme sisteminde görülen toksik etkilerinden dolayı infertiliteye neden olabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda testiste ve epididimiste görülen toksisitenin oksidatif hasara bağlı olabileceği gözlenmiştir.

Diyetle alınabilen diğer bir madde de alkoldür ve alkolün vücutta birçok farklı toksik etkisi bulunurken erkek üreme sistemini de olumsuz etkilediği bilinmektedir. Alkol, yetişkin erkeklerde özellikle testosteron seviyesini düşürerek, Sertoli ve Leydig hücrelerini etkileyerek ve kan-testis bariyerinin bütünlüğünü bozarak üreme sistemini etkilerken; fetal dönemde gonad gelişiminde gerileme ve germ hücrelerinde hasara neden olmaktadır. Alkolün bu etkileri, serbest radikalleri arttırarak ya da endojen antioksidanları azaltarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Özellikle beslenme alışkanlıklarının değişmesiyle akrilamid ile alkolün birlikte tüketiminin erkek üreme sistemine etkisinin belirlenmesi önem kazanmıştır.

Dişi farelere hamileliğin 6. gününden itibaren doğumdan sonra 21 güne kadar 14 mg/kg akrilamid ve 2 g/kg alkol günlük olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada akrilamid ve alkol uygulanmasından sonra gonadosomatik indeksin azaldığı belirlenmiştir. Testiste akrilamid ve alkol uygulanması sonucunda multinükleer hücreler, dejeneratif hücreler, atrofik tübüller ve gelişimin primer spermatosit evresinde tutuklu kalan tübüller gözlenmiştir. Yapılan histometrik incelemelerde spermatogenik hücre, Sertoli ve Leydig hücre miktarlarında azalma görülürken, en fazla azalmanın sekonder spermatosit ve erken spermatid evresinde olduğu belirlenmiştir. Akrilamid ve alkol uygulanması sonrası testiste oluşan lipid peroksidasyonu miktarının ve SOD enzimi aktivitesinin artarken, katalaz enzimi aktivitesinin değişmediği bulunmuştur.

Bu bulgular, alkolün akrilamitten daha etkili bir toksin olduğunu, birlikte uygulandığında ise bu toksik etkinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, akrilamid ve alkol uygulanmasında hamilelik döneminin laktasyon dönemine göre daha duyarlı olduğu ve her iki dönemde madde maruziyetinde de duyarlılığın arttığı düşünülmektedir.

SUMMARY

TESTICULAR DEVELOPMENT OF MALE MICE OFFSPRING EXPOSED TO ACRYLAMIDE AND ALCOHOL IN THE GESTATION AND LACTATION

In this study we investigated the effect of alcohol on development of testicles in male mice ofsprings on potential change in the oxidative damage by oral administration acrylamide and alcohol during gestation and lactation period.

In the recent years acrylamide, which is commonly used in the industrial sector, has been found that is formed in the food products which have been cooked in high temperatures. The acrylamide found in the food products has neurotoxic and carcinogenic effects on human and animal health. In addition, it has been shown that it can cause infertility due to its toxic effect on the male reproductive system. In the studies it has been shown that the toxicity in the testes and epididymis might be due to the oxidative damage

Another substance with has many toxic effects on human body and negative effects on the male reproductive system is alcohol. Alcohol is affecting the reproductive system, in particular in grown up males, by decreasing the level of testosterone, affecting the Sertoli and Leydig cells, and damaging the blood-testis barrier. In the fetal period, it results in decline in gonad development and damage in germ cells. However, the effects of acrylamide and alcohol together on the male reproductive system have not been investigated in the literature so far. In this article, we investigate the effect of consuming acrylamide and alcohol together. In particular, we investigate histological and biochemical the effects of acrylamide and alcohol on male offspring of mothers consuming them during gestation and lactation.

Female mice were daily exposed to 14 mg/kg acrylamide and 2 g/kg alcohol from the sixth day of gestation to the post natal day 21. It was found that gonadosomatic index of offspring of mice exposed to acrylamide and alcohol decreased. It was seen that multinuclear giant cells, degenerative cells, atrophic tubules, and maturation arrested at the primer spermatosit level. In the histometric investigation, it was observed that there was a decrease in the amount of spermatogenic cells, Sertoli, and Leydig cells. Maximum decrease was determined in the secondary spermatocytes and round spematides. While the amount of lipid peroxidation and SOD enzyme activity increased after the expose to acrylamide and alcohol, the activity of catalase did not change.

The results show that alcohol is more toxic than acrylamide and when consumed together toxic effect increases even more. Moreover, the gestation period is more susceptible to the adverse effects of acrylamide and alcohol than the lactation period and exposition to these in both periods further increases the adverse effects.

1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde beslenme alışkanlıkları sebebiyle akrilamid içeren besinler çokça tüketilmektedir (Richmond ve diğ., 2003; Yıldız ve diğ., 2010). Akrilamidin insan sağlığını tehdit ettiği anlaşıldıktan sonra gıdalardan daha az miktarda akrilamid alımını sağlamak için çeşitli pişirme teknikleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Zhang ve diğ., 2007a; Zhang ve diğ., 2007b). Akrilamid, yüksek sıcaklık uygulanmış (120°C) gıdalarda, karbohidratların ve aminoasitlerin tepkimesi sonucu oluşan bir bileşiktir (Stadler ve diğ., 2002). Özellikle tahıllı ve nişastalı gıdalar yüksek miktarda akrilamid içermektedir (WHO, 2002). Akrilamid, boya, kağıt, tekstil ve kozmetik endüstrisinde ve ayrıca su arıtımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Parzefall ve diğ., 2008). Akrilamid, suda eriyebilen oldukça küçük bir amittir (USEPA, 1985). Akrilamidin genotoksik, nörotoksik, kanserojenik ve mutajenik etkileri olduğu belirlenmiştir ve erkek üreme sistemini de olumsuz etkilediği bilinmektedir (Friedman, 2003). Hamile anneler çok çeşitli kimyasallara maruz kalırlar ve bu kimyasallardan çoğunun kolaylıkla anneden fetüse geçebildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Myllynen ve diğ., 2005; Annola ve diğ., 2008, 2009). Akrilamid, düşük molekül ağırlığı ve suda yüksek çözünme özelliğiyle plasentadan ve anne sütünden yavrulara geçerek maternal toksisiteye neden olmaktadır (Friedman ve diğ., 1999; Schettgen ve diğ., 2004).

Akrilamide benzer şekilde alkol de sıklıkla tüketilmektedir. Alkol, yetişkin erkeklerde özellikle testosteron seviyesini düşürerek, Sertoli ve Leydig hücrelerini etkileyerek ve kan-testis bariyerinin bütünlüğünü bozarak üreme sistemini etkiler (Mendelson ve diğ., 1976). Ayrıca, fetal dönemde gonad gelişiminde gerileme ve germ hücrelerinde hasara neden olmaktadır (Saradha, 2006). Hamilelik veya laktasyon dönemlerinde tüketilen alkolün yavruya geçebildiği ve yavruya üreme sisteminde bozukluklara neden olduğu bilinmektedir. Alkolün bu etkileri, serbest radikalleri arttırarak ya da endojen antioksidanları azaltarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Murillo ve diğ., 2001).

Akrilamid ve alkolün hamilelik ve laktasyonda erkek yavruya etkisini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunurken, bu maddelerin birlikte uygulandığı durumu içeren çalışmaya rastlanmamıştır (Sokol, 1981; Addolorato ve diğ., 1997; Friedman ve diğ., 1999, Murillo ve diğ., 2001; Takahashi ve diğ., 2008, 2009, 2011)

Bu çalışmada, hamilelik ve laktasyon dönemlerinde akrilamid ve alkol uygulanan dişi farelerin erkek yavrularının testislerinde, akrilamid, alkol, akrilamid ve alkolün birlikte meydana getirdiği hasar incelenmiştir. Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde testisin genel yapısı, akrilamid, alkol ve oksidatif hasar ayrıntılı olarak tanımlanmıştır.

Tezin “Malzeme ve Yöntem” bölümünde laboratuarda uygulanan işlemler ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. Yapılan bu işlemler sonucunda elde edilen veriler tezin “Bulgular” bölümünde belirtilmiştir.

Tezin “Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler mevcut literatür bilgisi ile yorumlanarak sonuca varılmıştır.

Bu çalışma, annelerin hamilelik ve laktasyon boyunca akrilamid, alkol, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı dişilerin erkek yavrularının testislerinde meydana gelen hasarları, birbiri ile karşılaştırarak, testiste meydana getirebileceği değişikliklerin ortaya çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.TESTİSİN GENEL YAPISI

Erkek üreme sistemi; sperm üreten ve androjenleri salgılayan testisler, spermilerin iletiildiği kanal sistemi olan epididimis, vaza deferens, ejakülatör kanallar, semeni oluşturan yardımcı bezler olan seminal vesikül, prostat bezi, bülboüretal bez ve çiftleşme organı olan penisten meydana gelmiştir (Kiersenbaum, 2006).

Testisler, skrotum içinde bulunan, çift taraflı erkek üreme organlarıdır. Skrotumun karın boşluğunun dışında oluşu, testislerin vücut sıcaklığından daha düşük bir ısıda saklanmasını sağlar (Junqueira ve diğ., 1992). Testisler, üç bağ doku tabakası ile çevrelenmiştir. En dışta skrotumun iç kısmını döşeyen tunika vaginalis bulunur ve testis, epididimis ve vas deferensin başlangıç kısmını içe alır. Ortada testis kapsülü olarak isimlendirilen tunika albuginea bulunur. Tunica albuginea rete testisin bulunduğu yerde kalınlaşarak mediastinumu oluşturur. Mediastinumdan testise uzanan fibröz yapıdaki septalarla testis 250-300 lobüle ayrılır. En içte ise gevşek bağ doku, fibroblast ve kan damarlarından oluşan tunika vaskülosa bulunur (Sadler ve Langman, 2000, Kiersenbaum, 2006; Knobil ve Neill, 2006). Testis kapsülü spontan kasılmalar yapar, bu testis kanal sisteminin pompalanmasını sağlar ve spermatozoaların iletilmesi kolaylaştır (Solomon ve diğ., 1997). Seminifer tübüller uzun, kıvrımlı tüplerdir ve birkaç fibroblast katmanından oluşan bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve kompleks bir seminifer epitelden oluşmaktadır. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan ve düz kas özellikleri gösteren tabaka yassılaştırmış miyoepitel hücreleri içermektedir (Junqueira ve diğ., 1992).

Seminifer epitel, Sertoli hücreleri ve spermatogenik siklusun farklı evrelerinde bulunan farklılaşmış germ hücrelerinden meydana gelir. Seminifer tübüllerin esas hücreleri olan spermatogonyumlar, seminifer tübüllerin bazal membranlarına bitişik olarak yerleşmiştir. Spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirerek üç tip spermatogonyum

oluşturur. Bu üç tip spermatogonyumdan birinci olan spermatogonyum A'lar, açık renkli sitoplazma, nukleus zarına yakın olarak bir ya da iki nukleolus, az heterokromatin içeren yuvarlak veya oval nukleusa sahiptirler ve Sertoli hücreleri arasında görünürler. Spermatogonyum A'lar germinal epitelin kök hücreleri olarak görev yaparlar. İkincisi olan intermediate spermatogonyum, spermatogonyum A'ya benzer; fakat kromatini daha koyu boyanarak çekirdek içerisine dağılmış olarak görünür. Üçüncüsü olan spermatogonyum B'ler ise farklı miktarda kromatin içeren küresel nukleusa sahiptirler, kromatin nukleus zarı boyunca dağılmıştır ve nukleolus merkezi olarak yerleşmiştir. Spermatogonyum B'ler mitoz bölünme geçirerek primer spermatositleri verirler (Russell ve diğ.,1990; Knobil ve Neill, 2006).

Primer spermatositler, nukleuslarının kromatin aktiviteleri nedeniyle farklı görünümündedirler. Mayotik bölünme sırasında hücre ve nukleus boyutları artar, bu artış geç profazda daha belirgin olarak gözlenir (Russell ve diğ.,1990; Junqueira ve diğ., 1992; Sadler ve Langman, 2000). Primer spermatositler seminifer tübüllerde gözlenen en belirgin ve en büyük germinal hücrelerdir. Bu hücreler germinal epitelin orta kısmında yerleşmişlerdir. Primer spermatositler mayoz I'in bölünmesi sonunda nukleusları daha yoğun kromatin içeren ve daha küçük hücreler olan sekonder spermatositleri oluştururlar. Sekonder spermatositler, oluştuktan kısa bir süre sonra mayoz II'i geçirerek spermatidleri oluşturur. Spermatidler, primer ve sekonder spermatositlerden küçük olması ve iri kromatin tanecikleri içermesiyle ayrılırlar. Bu hücreler Sertoli hücreleri ile sıkı ilişkide olacak şekilde, seminifer tübüllerin lümenine yakın kısımlarda gruplar halinde yerleşmişlerdir. Bu bölgede spermatidler spermiyogenez ile spermatozoonlara farklılaşırlar. Olgunlaşmakta olan spermatidlerin baş kısımları Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içine gömülüdür. Kuyruk kısımları ise seminifer tübül lümenine doğru serbest olarak uzanır (Russel ve diğ.,1990; Knobil ve Neill, 2006; Sadler ve Langman, 2000).

Spermatidler, spermatogenezin son evresi spermiyogenezini geçirerek olgun spermatidlere dönüşürler. Spermiyogenez dört ana evreye ayrılmıştır. İlk evre Golgi evresidir ve spermatid içinde akrozomik granüller görülür, hidrolitik enzimler Golgi aygıtından akrozomal vesiküle aktarılır. İkinci evre şapka veya kep evresidir ve akrozom kesesi yassılaşıp, nukleus zarına yakın bir şapka oluşturarak çekirdek

çevresini sarmaya başlar. Diğer evre akrozomal evredir. Bu evrede akrozom çekirdeği sararken, çekirdek disk şeklini alır ve aksonem oluşur. Son evre olan olgunlaşma evresinde gelişmekte olan spermatidler morfolojik değişiklikler geçirerek serbest spermatozoonları oluşturur (Leblond ve diğ.,1952).

Testisin seminifer tübülleri içinde bulunan, Sertoli hücreleri spermatogenezin düzenlenmesi ve sürdürülmesinde büyük rol oynar. Sertoli hücreleri ince, uzun, düzensiz sınırlı hücreler olup, seminifer tübüllerin bazal membranından lümenine kadar uzanır. Sertoli hücrelerinin nükleusu genellikle oval veya üçgen, hafif uzamıştır ve çok az miktarda ince, dağınık kromatin içerirlerken, bir ya da daha fazla sayıda nükleous içerebilirler. Seminifer tübülün boyuna kesitlerinde oval ya da küresel görünürler (Russell ve diğ., 1990; Knobil ve Neill, 2006). Sertoli hücreleri sitoplazmasında düz ve granüllü endoplazmik retikulum, mitokondriler, lizozomlar, lipit damlacıkları, yaygın Golgi aygıtı ve zengin bir hücre iskeletine sahiptir. Sertoli hücrelerinin fonksiyonları; gelişmekte olan spermatogenik hücelere desteklik etmek ve spermatidlerdeki atık sitoplazmayı fagosite etmek; olgun spermleri seminifer tübüllerin lümenine atmak, spermin beslenme ve nakli için gerekli testis sıvısını salgılamaktır (Kiersenbaum, 2006). Sertoli hücreleri yan yüzlerindeki sıkı bağlantı kompleksleri ile birbirlerine bağlanarak kan-testis bariyerini yaparlar. Kan-testis bariyeri seminifer tübül duvarını bazal ve lümen altı kompartımana ayırır. Bu bariyer kanda bulunan zararlı maddelerin germinal epitele geçişini engeller ve gelişen spermatositlerdeki yüzey antijenlerinin kana ve bağışıklık sistemine geçmesini engeller (Russell ve diğ., 1990; Kiersenbaum, 2006). Sertoli hücreleri folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarımıyla androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve salgılanmasını gerçekleştirir. ABP testosteron ve dihidrotestosteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesi bulunan proteinlerdir ve seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlar. Sertoli hücreleri ayrıca aktivin ve inhibin salgılayarak FSH salınımını düzenler (Kiersenbaum, 2006). Sertoli hücre sayısı ile günlük spermatid üretimi arasında doğru orantı vardır (Berndtson ve diğ., 1990).

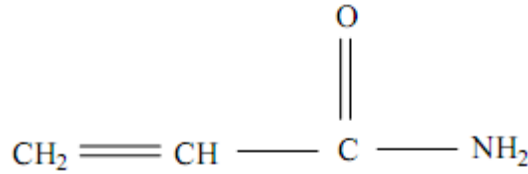
Seminifer tübüllerin arasındaki interstisiyal alanlarda, Leydig hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, miyoid hücreler, lenfositler, parankima sinirleri ve kan damarları bulunur. Leydig hücreleri, sitoplazmaları tanecikli, oval nükleusa sahip, büyük küresel ya da

poligonal şekilli hücrelerdir. Leydig hücreleri sitoplazmalarında lipit damlacıkları, mitokondriler ve iyi gelişmiş bir düz endoplazmik retikulum içerir. Leydig hücreleri testosteron üreterek, sperm üretimini ve ikincil eşey karakterlerinin düzenlenmesini sağlar (Sadler ve Langman, 2000; Kiersenbaum, 2006; Knobil ve Neill, 2006).

Normal spermatogenez, hipofiz bezinin adenohipofiz kısmından salgılanan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH)'la düzenlenir. LH Leydig hücrelerinden testosteron üretilmesini uyarır. Spermatogenezin normal devamı için seminifer tübüllerde yüksek düzeyde testostere gereksinim vardır. FSH testiste, Sertoli hücrelerinden ABP salgılatarak spermatogenezi başlatır. LH salınımı serumdaki testosteronun düzeyi tarafından negatif geri bildirim mekanizması ile kontrol edilir. Serum testosteron düzeyi düşüklüğünde, hipotalamustan LH salgılatıcı hormon gonadotropin salgılatıcı hormon (GNRH) ve adenohipofizden LH salgılanır. FSH salınımının kontrolü ise Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin ve aktivin proteinleriyle sağlanır (Sadler ve Langman, 2000).

2.2 AKRİLAMİD

Akrilamid doymamış çift bağ içeren bir amiddir (Şekil 2.2.1.) (Blasiak ve diğ., 2004). 2-propenoamid, etilen karboksamid, akrilik asit amid, vinil amid, propenoik asit amid olarak da bilinmektedir. Sıvı halde iken beyaz bir kristal gibi görülür, kokusuzdur ve suda yüksek çözünürlüğe sahiptir. Erime sıcaklığı 84,5°C, kaynama sıcaklığı (25 mm Hg) 125°C'dir (atmosfer basıncında 192,6°C) (Lingnert ve diğ., 2002). Moleküler ağırlığı 71.08 g/mol olan akrilamid suda ve diğer polar çözücülerde (aseton, metanol, etanol vb.) kolaylıkla çözünür, fakat polar olmayan (I₂, CCl₄ vb.) çözücülerde çözünmez (IRAC, 1994). Akrilamid iki farklı fonksiyonel gruba sahip monomerik bir yapıdır ve bu gruplar nedeniyle amonyak ve alkoller gibi nükleofilik maddelerle ve serbest radikallerle çeşitli reaksiyonlara girer. Erime noktasının altındaki sıcaklıklarda veya UV ışık altında kolayca polimerleşir (Lingnert, 2002; Ötleş ve diğ., 2004).



Şekil 2.2.1.: Akrilamidin moleküler yapısı (IRAC, 1994)

Akrilamid, sanayide çok amaçlı kullanılan poliakrilamid sentezinde monomer olarak kullanılmaktadır (Lingnert ve diğ., 2002). Poliakrilamid içme suyu ve atık sularda bulunan parçacık ve kirlilikleri uzaklaştırılmasında yararlanılan bir kimyasal olup yapıştırıcı, boya, kağıt, tekstil endüstrisi, kozmetik ürünleri yapımında, gıda ambalajı olarak ve pestisit yapımında kullanılmaktadır (Tareke ve diğ., 2002, Wenzl ve diğ., 2003, Parzefall, 2008). Laboratuvarlarda akrilamidin monomerik formu elektroforez jellerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Yaygın endüstriyel kullanımı nedeniyle doğrudan dermal ve solunum yolu ile mesleki maruziyeti bulunur. (Vattem ve Shetty, 2003). Akrilamid su arıtılması sırasında, yeraltı ve yüzey sularına geçerek içme suyuyla oral olarak da alınmaktadır (Stadler ve diğ., 2002). Sigara kullanımıyla solunum yolu ile de alınır (Bergmark, 1997; Boettcher ve diğ., 2005; Parzefall, 2008).

Besinlerin doğal yapısında bulunmayan akrilamid, besinlerin yüksek sıcaklıklarda (120°C - 170°C) pişirilmesi sırasında karbohidratlar (glukoz ve fruktoz) ve proteinlerin (asparajin) Maillard tepkimesi sonucunda doğal olarak oluşur (Mottram ve diğ., 2002; Stadler ve diğ., 2002; Wilde ve diğ., 2005). Pişirilen gıdalardaki varlığı, 2002 yılında İsveç Ulusal Gıda Komisyonu'nun yaptığı çalışmalarla gösterilmiştir (Stadler ve diğ., 2002). Akrilamid oluşumunda gıdanın içerdiği şeker ve aminoasitlerin çeşitleri ve miktarları, pişirme süresi, ortamın pH değeri ve su içeriğinin önemli etkenler olduğu bilinmektedir (Brown, 2003). Akrilamid oluşumunda tepkimeye giren fruktoz en aktif şeker iken, glukoz ve sukrozun daha az etkin olduğu gösterilmiştir (Biedermann ve diğ., 2003, Claeys ve diğ., 2005). Evde hazırlanan ya da endüstriyel olarak üretilen besinlerde, 120°C üzerindeki sıcaklıklarda kızartma ve fırınlama gibi işlemler sonucunda oluşan akrilamid beslenme alışkanlıklarımız nedeniyle her yaş grubunun her öğünde tükettiği gıdalarda bulunmaktadır (Tareke ve diğ., 2000; 2002). Özellikle tahıllı ve patatesli ürünlerinin yüksek miktarda akrilamid içerdiği belirlenmiştir (WHO, 2002).

Akrilamid, Uluslararası Kanseri Araştırmaları Kurumu tarafından insanlar için muhtemelen kanser yapıcı maddeler grubunda (2A) sınıflandırılmıştır (IARC, 1994). Avrupa Birliğinde endüstriyel ürünlerde bulunabilecek akrilamid miktarları gıdalarda $0.8\text{ }\mu\text{g/kg}$, sularda $0.1\text{ }\mu\text{g/l}$, paketleme materyallerinde $10\text{ }\mu\text{g/kg}$, havada $30\text{ }\mu\text{g/m}^3$ ve kozmetik ürünlerinde 0.5 mg/kg ile sınırlandırılmıştır (EC, 1998; FAO/WHO, 2005; Karagöz, 2009). Akrilamidin günlük tüketilen birçok gıdada varlığı saptanmıştır (Dybing ve diğ., 2003). En yüksek konsantrasyona kızartılarak hazırlanmış ürünlerde rastlanmıştır (Friedman ve diğ., 2003) (Tablo 1). Ortalama günlük akrilamid tüketiminin erişkinlerde $1\text{-}4\text{ }\mu\text{g/kg}$ olduğu ve bu miktarın çocuklarda $1.5\text{-}4.2\text{ }\mu\text{g/kg}$ olduğu belirlenmiştir (Vinci ve diğ., 2012). Ayrıca sigara tüketimi ile de $1\text{-}2\text{ }\mu\text{g/sigara}$ akrilamid maruziyeti bulunmaktadır (Claus ve diğ., 2008). Akrilamidin nörotoksitesi için NOAEL (hiçbir yan etki göstermeyen doz) değeri $0.2\text{-}0.5\text{ mg/kg}$, LOAEL (etki gözlenen en düşük doz) değeri 2 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Akrilamidin üreme toksisitesi üzerine NOAEL değeri $2\text{-}5\text{ mg/kg}$ olduğu bulunmuştur (Exon, 2006).

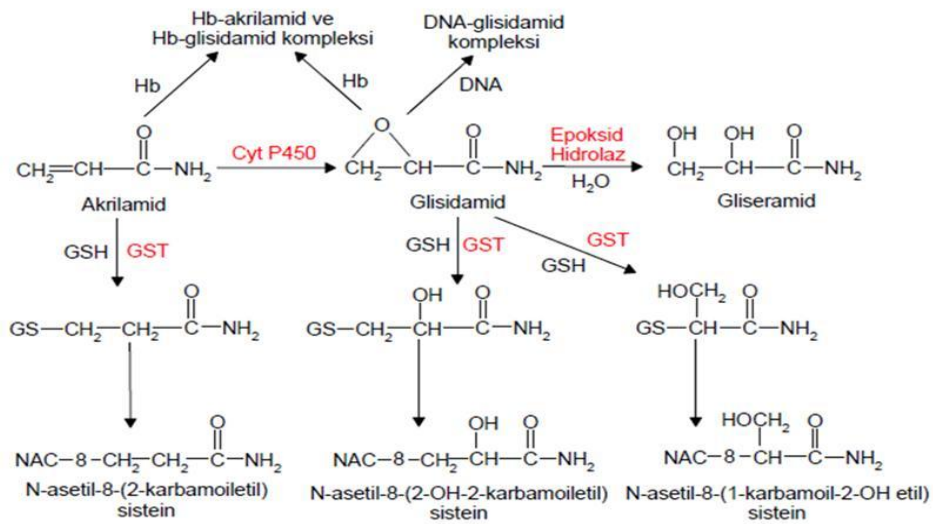
Tablo 1: 2009 yılında gıdalarda bulunan akrilamid miktarları ($\mu\text{g/kg}$) (EFSA, 2011).

Gıda çeşitleri	Ortalama	Maksimum
Bisküvi	317	4200
Ekmek	136	2430
Kahve	253	1158
Patates Kızartması	350	2668
Patates Cipsleri	628	4180
Diğer ürünler	313	4700

Yapılan çeşitli çalışmalarla akrilamidin küçük bir molekül olması ve suda kolay çözünmesi nedeniyle hızlı ve yaygın bir şekilde emilerek dokulara dağıldığı ve yarılanma ömrünün 2 saat olduğu gösterilmiştir (USEPA, 1985; Doerge ve diğ., 2005). Akrilamidin farelere intraperitoneal, oral ve diyet yoluyla uygulanması sonucunda serumdaki akrilamid miktarları karşılaştırıldığında, intraperitoneal uygulama sonucu %100 kabul edilerek farelerdeki serum akrilamid seviyelerinin gavaj ile %32-50 ve diyet ile %23 olduğu belirtilmiştir (Doerge ve diğ., 1995). Akrilamidin dermal absorpsiyonun belirlenmesi amacıyla gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada deri üzerine uygulanan %50 akrilamid çözeltisinin 24 saat içinde absorpsiyonunun %26 olduğu görülmüştür (Dybing ve diğ., 2005). Sıçanlarda yapılan bir başka dermal absorpsiyon çalışmasında ise %21-30 absorpsiyon belirlenmiştir (Sumner ve diğ., 2003). Sıçanlarda akrilamide solunum yoluyla maruziyet sonucunda en yüksek dağılımın kanda sonra sırasıyla deri, testis ve karaciğerde gözlemlendiği belirtilmiştir (Sumner ve diğ., 2003).

Akrilamid plasentadan kolayca geçebilir ve anne sütünde de bulunmaktadır (Tritscher, 2004). Hamile hayvanlar (sıçan, tavşan, köpek ve domuz) üzerine yapılan deneylerde genel olarak organlarda ve fetüsteki dağılımda, türlere göre anlamlı farklılıklar olmadığı belirlenmiştir (Ikeda ve diğ., 1985). Akrilamid içeren gıdalarla beslenen annelerde, plasenta ve anne sütü aracılığıyla yavruya akrilamid geçişi olduğu saptanmıştır (Sorgel ve diğ., 2002). Akrilamidli yemle beslenen ineklerin sütlerinde ve besi kuşlarının yumurtalarında da akrilamid varlığı belirlenmiştir (Kienzle ve diğ., 2005; Pabst ve diğ., 2005).

Akrilamid iki farklı yolla metabolize edilmektedir. İlk olarak akrilamid glutatyon-S-transferaz (GST) enzimi reaksiyona girerek, glutatyon (GSH) konjugasyonu oluşturur ve sonuç olarak N-asetil-S(3-amino-3-oksipropil) sistein metabolitini oluşturur (Dybing ve diğ., 2005). GSH oldukça nükleofilik yapıdadır ve elektrofilik moleküllerin detoksifikasyonunda oldukça önemli bir yoldur (Çavdar ve diğ., 1997). İkinci olarak akrilamidi sitokrom P450E1 (CYP2E1) ile oksidasyon tepkimesine girerek epoksiti olan glisidamid dönüşür (Calleman ve diğ., 1990). Glisidamid de akrilamid ile benzer metabolik yol kullanarak GSH ile konjugat oluşturarak N-asetil-8-(2-OH-2-karbamoiletıl) sistein ve N-asetil-8-(1-karbamoil-2-OH etıl) sistein metabolitlerini oluşturur (Calleman ve diğ., 1990). Akrilamid ve glisidamid metabolizmasında da önemli olan epoksid hidrolazlar, kimyasal maddelerin detoksifikasyonunda rol oynayan faz I biyotransformasyon enzimleridir (Morisseau ve Hammock, 2005). Akrilamid oksidasyonunun ve glisamid oluşumunun farelerde, sıçanlara göre daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir (Sumner ve diğ., 1992). İnsanlarda temel metabolizma ise akrilamid ile GSH konjugasyonu sonucu oluşan N-asetil-S(3-amino-3-oksipropil) sistein metaboliti üzerinden devam eder. Diğer metabolitlerinde olduğu fakat miktarlarının az bulunduğu gösterilmiştir (Fennell ve diğ., 2004). Fare ve sıçanlarda glisidamid büyük ölçüde glutatyon ile konjugat oluşturarak metabolize edilirken, insanlarda glisidamid büyük ölçüde hidroliz yoluyla ve az miktarda glutatyon ile konjugat oluşturarak metabolize edilir (Şekil 2.2.2.) (Friedman ve Monttram, 2004).



Şekil 2.2.2.: Akrilamid ve metaboliti olan glisidamidin metabolik şeması

Yapılan çeşitli araştırmalarda akrilamidin nörotoksik, genotoksik, karsinojenik etkileri olduğu ve üreme sistemlerinde hasara yol açtığı gösterilmiştir (Dearfield ve diğ., 1995; Sickles ve diğ., 2002; Friedman, 2003; Mucci ve diğ., 2003; Yang ve diğ., 2005) Akrilamid olası toksik etkilerini kendisinin ve türevlerinin doğrudan oluşturduğu etkilerle ve CYP2E1 aktivasyonu sırasında oluşan reaktif oksijen türleri aracılığı ile dolaylı olarak gösterir (Ghanayem ve diğ., 2005; Yousef ve diğ., 2006) Akrilamidin mutajenik ve karsinojenik etkilerinden temel olarak glisidamidin sorumlu olduğu bildirilmektedir. Glisidamid DNA'daki adenin ve guanin bazları ile reaksiyona girerek DNA'da değişiklikler meydana getirir ve tümörlere sebep olur (Doerge ve diğ., 1995). Oral ya da intraperitoneal olarak akrilamid uygulanmasında akrilamidin mutajenik etkilerinin olduğu bulunmuştur (Chapin ve diğ., 1995; Adler ve diğ., 2000; Friedman ve diğ., 1999). Akrilamid ve glisidamid sıçan ve farelerde hemoglobin ve DNA ürünlerinde değişime neden olmaktadır (Costa ve diğ., 2011). Akrilamid ve glisidamid erkek farelerin germ ve somatik hücrelerinde mutasyonlara sebep olmaktadır (Adler ve diğ., 2004). Yüksek dozlarda akrilamid uygulanmasında farelerin spermatositlerinde ve spermalarında kromozom aberasyonlarında artış görülmüştür (Adler ve diğ., 2000). Akrilamid, farelerin kemik iliği hücrelerinde, retikülositlerinde, lenfositlerinde, fare ve sıçanların spematidlerinde mikronukleus görünümüne sebep olmaktadır (Lähdetie ve diğ., 1994).

İnsanlarda akrilamid maruziyeti sonucunda iskelet kaslarında zayıflık ve kaslarda düzensiz hareketi gözlenmiştir (Lopachin, 2004). Akrilamid el ve ayaklarda karıncalanmaya, hissizliğe, zayıf bacaklara ve refleks kaybına sebep olmaktadır (Hagmar ve diğ., 2001, Lopachin, 2004). akrilamidin siyatik sinirinde protein taşınmasını azalttığı bulunmuştur (Sickles ve diğ., 1994). Akrilamidin düşük doz uygulamalarında bile sinir uçlarında ve sinir aksonlarında dejenerasyonlara, beyin, beyincik ve omurilikte lezyonlara sebep olduğu gösterilmiştir (Lehning ve diğ., 2003). Akrilamid nörofilamentlerdeki kinezin motor proteinleri inhibe ederek sinir iletimini durdurur (Sickles ve diğ., 1994 ve 2002). Akrilamid hücre bağlantılarında bulunan sistein proteinindeki ve sinir uçlarındaki sinaps öncesinde bulunan sinaptonemal proteinlerin sülfid gruplarına bağlanarak etki etmektedir (Lopachin, 2004).

Akrilamid uygulanmasında farelerde spermatogenezde, kauda epididimiste sperm yoğunluğunda azalma ve spermelerde morfolojik dejenerasyonlar gözlenmiştir (Yang ve diğ., 2005). Akrilamidin farelerde sperm sayısını düşürdüğü, anormal sperm sayısını arttırdığı, testiste hasara yol açtığı (vakuolizasyon ve erken spermatidlerde anormallik), germ hücre evrelerinde DNA kırıklarına sebep olduğu bilinmektedir (Sakomoto ve diğ., 1988; Sega ve diğ., 1990). Sıçanlarda yüksek dozlarda akrilamid uygulandığı durumda sıçanlarda çiftleşme davranışında, canlı doğan yavru sayısında ve yaşayabilen yavru sayısında azalmaya sebep olmaktadır (Friedman ve diğ., 1999; Exon, 2006). Akrilamid ayrıca serumdaki testosteron miktarını da düşürmektedir (Camacho ve diğ., 2012, Hamdy ve diğ., 2012).

Akrilamidin hormon seviyelerini düşürmesi sperm hareketliliğinin düşmesine ve testiste atrofiye sebep olmaktadır (Friedman, 2003). Akrilamidin nörotoksik etkisinde olduğu gibi üreme sisteminde toksik olmasının mekanizması kinezin motor proteinleri etkilemesi olabileceği bildirilmiştir (Friedman ve diğ., 1999). Kinezin motor proteinleri sinir sisteminde olduğu gibi spermelerin flagellalarında da bulunmaktadır (Miller ve diğ., 1999). Bu proteinlerin etkilenmesi sperm hareketliliğini ve dölleme yeteneğini düşürmektedir (Friedman, 2003, Exon, 2006). Kinezin motor proteinleri ayrıca hücre bölünmesinde anafaz evresinde kromozomların ayrılmasında görev almaktadır (Sperry ve diğ., 1996; Walczak ve diğ., 1996; Sickles ve diğ., 2007). Akrilamidin üreme üzerinde etkili olmasında diğer bir mekanizma ise spermelerin baş ve kuyruklarındaki protamin gibi proteinlerin sülfid bağlarının akrilamid tarafından alkilenmesi olabilir (Sega ve diğ., 1990). Bu spermelerin dölleme yeteneğini düşürüp, implantasyon öncesi kayıpları arttırabilmektedir (Dearfielt ve diğ., 1995). Spermelerde mikronukleus görünümü ile akrilamidin protaminlere bağlanması arasında güçlü bir bağlantı bulunur. Geç spermatitten erken spermatozoaya kadar protamin miktarında artma gözlenir, bu evrelerde spermatozoonlar akrilamide daha duyarlıdır (Friedman, 2003). Nörotoksiteye benzer olarak akrilamid, üreme hücrelerinde de hücreler arası bağlantı proteinlerinde sülfid gruplarına bağlanarak da toksik etki gösterebilmektedir. Akrilamid genotoksik etkisi ile de üreme hücrelerinde mutasyonlara neden olabilmektedir (Exon, 2006).

2.3. ALKOL

Alkoller, bir karbon atomuna, üç hidrojen atomunun ve bir hidroksil (OH) grubunun bağlanmasıyla oluşan bileşiklerdir. Renksiz, özel kokusu ve tadı olan uçucu maddelerdir. Alkoller, metil alkol ve etil alkol başta olmak üzere, endüstride kullanılan en önemli çözücülerdir. Boya, patlayıcı madde, mürekkep, vernik endüstrisinde çözücü; birçok kimyasal maddelerin yapımında; içten yanmalı motorlarda antifriz çözeltisi olarak, dezenfektan ve anestetik olarak kullanılırlar. Genel olarak alkol dendiğinde etil alkol anlaşılır. Çözücü özelliğinden başka birçok kimyasal maddenin antifriz maddesi ve patlayıcı madde hazırlanmasında kullanılır. Etil alkol endüstri ve laboratuvarında kullanma dışında, alkollü içkilerde bulunmaktadır (Vural, 2005).

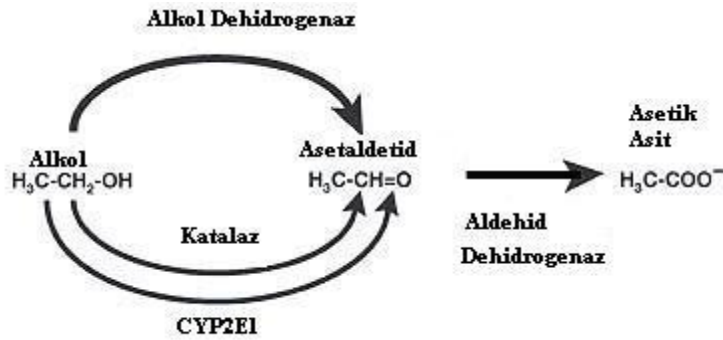
Alkol; polisakkarit içeriği yüksek meyveler, meyve suları, patates veya hububat tanelerinin mayalarca fermentasyonu yolu ile elde edilir. Fermentasyon sonucunda oluşan alkol oranı yaklaşık %15-17'dir. Alkol oranı düşük bazı içkiler (örneğin; şarap, bira) doğrudan fermentasyon sonucunda üretilir. Yüksek oranda alkol içeren içkiler (rakı, votka, viski vs.), ya şaraba saf alkol katılmasıyla ya da fermentasyona uğramış sıvının distilasyonu ile hazırlanırlar (Kayaalp, 2009; Vural, 2005).

Oral olarak alınan alkol, mide ve bağırsaktan pasif difüzyonla emilir. Alkol küçük molekül, iyonize olmayan sıvı olduğu için mide ve bağırsaktan emilim hızı oldukça fazladır. Alkol alındıktan 5 dakika sonra kanda izlenebilir. Alınan alkolün %20'si ilk olarak mideden, kalanın tamamı ise ince bağırsaktan emilir, kolona geçemez. Alkolün ince bağırsaktan emilim hızı mideye göre daha fazladır. Normal bireylerde alkol alındıktan yaklaşık 40-60 dakika sonra kandaki alkol konsantrasyonu maksimuma çıkarmaktadır. Ayrıca bireyin midesinin dolu olması, alınan alkolün alkol oranı emilim hızını etkileyen faktörlerdir. Alkolle birlikte alınan yağlı, karbonhidratlı ve proteinli besinler alkolün bağırsaktan emilimini azaltır. Alkol veya alkollü losyonlar koklandığında, alkol akciğerdeki alveollerce azda olsa emilir (Kayaalp, 2009).

Alkol küçük bir molekül olduğu için tüm vücut sıvılarına geçebilir. Beyin omurilik sıvısı gibi vücut boşluklarındaki sıvılardaki alkol konsantrasyonu kan ile yaklaşık olarak aynıdır. Alkol alındıktan 15 dakika sonra plesantadan fetal dolaşıma kolaylıkla geçebilir

ve fetüs kanındaki konsantrasyonu, anne kanındaki alkol konsantrasyonuna eşittir (Kayaalp, 2009). Alınan alkolün %90'ı biyotransformasyon ile elimine edilirken, %10 ise vücuttan ter, idrar ve akciğerlerden solunumla atılır. Solunumla atılan alkol kandaki alkolün bir göstergesidir ve aralarındaki oran yaklaşık 1/1300'ü kadardır (Kayaalp, 2009)

Alkol temel olarak karaciğerde, ikincil olarak mide mukozasında ve az da olsa diğer dokularda metabolize edilir. Alkol metabolizmasında ilk olarak alkol asetaldehite oksitlenir. Alkol, en fazla karaciğer hücreleri içerisinde çinko içeren bir enzim olan alkol dehidrogenazlarla (ADH); daha sonra endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P450E1 (CYP2E1) enzimleri ile asetaldehide çevrilir. Alkol ayrıca karaciğer hücrelerinde peroksizomlarda bulunan katalaz enzimi ile de asetaldehite çevrilebilir. Ancak katalaz enzimi alkolün asetaldehite çevrilmesinde önemli bir yolak değildir (İlter ve Tekin, 2005). Alkol metabolizmasında ikinci basamak asetaldehidin asetik aside dönüştürülmesidir. Reaksiyonu mitokondriyel bir enzim olan aldehid dehidrogenaz (ALDH) katalizler (Şekil: 2.3.1.). Asetaldehid alkolden çok daha toksiktir ve alkol kullanımıyla ilgili fiziki değişikliklerin çoğu asetaldehitten kaynaklanmaktadır (Goedde ve diğ., 1992). Asetaldehiden oluşan asetik asit kısmen metabolize edilerek karbondioksit ve suya dönüştürülür (Kayaalp, 2009).



Şekil 2.3.1: Alkol metabolizması

Alkol, vücutta asıl etkilerini merkezi sinir sistemi üzerinde gösterir. Kronik olarak alınan alkol ise özellikle karaciğer ve mide olmak üzere, beyinde, kalp ve iskelet kaslarında, pankreasta hasara sebep olur (Alvaro ve diğ., 2004; Kayaalp, 2009). Kronik veya akut

alkol uygulanması dokularda nekroz ve apoptoz oluşumuna neden olur (Emanuale ve diğ., 2001). Alkol bu etkileri direkt kendisi ya da metabolizması sonucu ortaya çıkan toksik maddeler aracılığıyla yapar (Bondy ve diğ., 1992; Cederbaum ve diğ., 2006). Alkol etkisini, yıkım ürünü asetaldehite bağlı olarak, çeşitli mekanizmalarla ve önemli olarak da lipit peroksidasyonu ve serbest radikal artışı yaparak gösterir (Scott ve diğ., 2000; Cederbaum ve diğ., 2006). Alkol lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, hidroksil radikali oluşturarak, antioksidan enzim miktarını özellikle glutatyonu düşürerek hücre zar yapısını bozarak, dokuda hasar meydana getirir (Husain ve diğ., 2001; Cederbaum ve diğ., 2006)

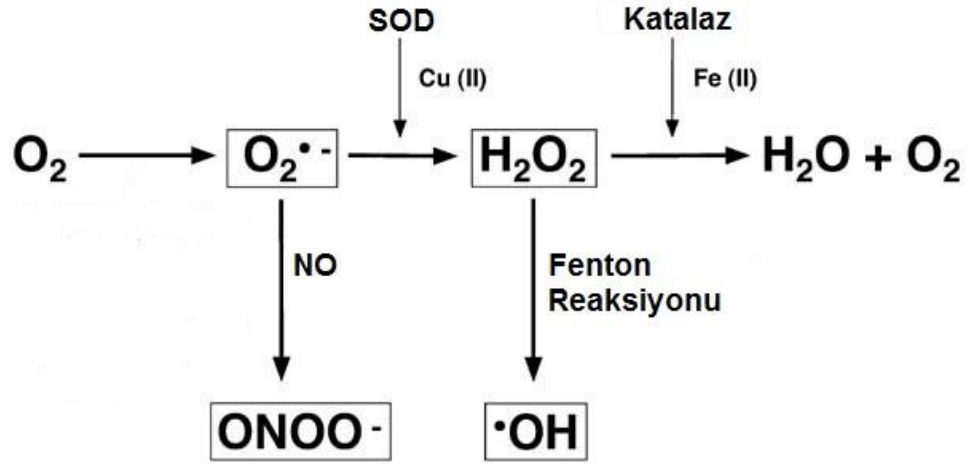
Alkol erkeklerde ve dişilerde mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilidir. Alkol ilk metabolit ürünü olan asetaldehid yolu ile mutajenik etkisini gösterir. Asetaldehid, DNA zincirleri arasında bağlantı bölgelerini ve kardeş kromatidleri değiştirir, kromozomal kırıklara neden olur (Obe ve diğ., 1979). Ayrıca, alkol testislerde oksidatif stres yaparak da hasara neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda günlük alkol alınması, testiste antioksidan sistemde glutatyon miktarında ve glutatyon peroksidaz enzimi (GPx) aktivitelerinde azalma ile lipit ve protein oksidasyonunun artmasına sebep olmaktadır (Grattagliano ve diğ., 1997; Scott ve diğ., 2000; Husain ve diğ., 2001). Testiste yapılan subkronik ve kronik alkol kullanımında alkol, spermatogonyumlarda ve spermatositlerde apoptozu artırır (Zhu ve diğ., 2000; Koh, 2006,). Alkol testiste lezyonlara, seminifer tübüllerde germ hücrelerinde azalmaya ve dejenerasyon ile Leydig hücre sayısında önemli derecede azalmaya sebep olur (El-Sokkary ve diğ., 1999). Bunlara ek olarak seminifer tübül çaplarında ve germ hücre sayısında azalma gözlenmiştir (Haider ve diğ., 1985). Anderson ve diğerleri (1983), prostat ve seminal vesikül fonksiyonlarının incelenmek için kronik alkol uygulanmış farelerin semen içeriğini analiz etmiş ve semende fruktoz ve alkalın fosfataz miktarının düştüğünü gözlemlemişlerdir. Ayrıca alkol, GnRH miktarının düşmesine sebep olarak, kandaki LH salınımını inhibe eder. Yine aynı çalışmada, kronik alkollün Leydig hücrelerinde testosteron üretiminden görev alan steroidogenik akut regülatör proteinin (StAR) sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir (Kim ve diğ., 2003). Testosteron düzeyinde düşüş ve sperm üretiminde azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Eriksson ve diğ., 1983)

Gebelik döneminde alkol alınması yavruda beyin gelişiminde bozukluklara ve teratojenik etkilere neden olmaktadır (Sokol, 1981; Buts ve diğ., 1992; Bielawski ve Abel, 1997; Riley ve diğ., 2011). Hamilelik döneminde alınan alkol, fetüslerde Fetal Alkol Sendromu (FAS)'nın oluşumuna neden olur (Udani ve diğ., 1985). Hem dişi yavrularda hem de erkeklerde üreme fonksiyonlarını bozmaktadır (Wilson ve Handa, 1997). Hamilelik döneminde alkol uygulanan sıçanlarda, doku ve organ ağırlıklarında önemli bir değişiklik gözlenmezken, perinatal (doğum öncesi) testosteron düzeyinin düştüğü bilinmektedir (Osztozics ve Szaszovszky, 1978; Abel ve diğ., 1995; Murillo ve diğ., 2001). Gonadotropin salınımı, fetal dönemde alkol uygulanmasına bağlı olarak hem erkek hem de dişi sıçanlarda prepubertal dönemde değişiklik göstermektedir. Gonadotropin salınımındaki değişikliklerin, hayvanlarda gelişen üreme organlarının hasarında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Wilson ve Handa, 1997). Yapılan çalışmalarda hamilelik sonrası laktasyon sırasında da alkol alınmasıyla da benzer etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Murillo ve diğ., 2001).

2.4.OKSİDATİF HASAR

Dış yörüngesinde en az bir çiftlenmemiş elektron içeren, nötr veya iyonize tüm atom yada moleküllere ‘serbest radikal’ denir. (Dökmeci, 2000). Serbest radikaller hidroksil, süper oksit, nitrik oksit, lipid peroksit gibi yapılara sahiptir (Çavdar ve diğ., 1997). Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijen molekülü üzerinde değişikliklerle meydana gelen ‘serbest oksijen radikalleri’ ya da ‘reaktif oksijen türleri’ (ROS) olarak adlandırılan moleküllerdir (Halliwell, 1991). Çok reaktif olan bu radikaller yüksek derişimlerde lipidler, nükleik asitler, amino asitler gibi biyolojik moleküllerle etkileşerek hücre ve doku hasarına sebep olurlar (Dökmeci, 2000).

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasara karşı organizmada antioksidan işleve sahip bir savunma sistemi vardır. Organizma süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz, glutatyon redüktaz enzimleri gibi endojen ve ekzojen moleküllerle (E vitamini, glutatyon, urat, bilirubin) oksidanların olumsuz etkilerinden korunur. Süperoksit anyonu süperoksitdismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 dokuda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülür. Hidrojen peroksit, Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{2+} , Zn^{2+} gibi) en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur (Çavdar ve diğ., 1997). Redükte glutatyon (GSH) GPx tarafından okside glutatyon (GSSG) formuna indirgeyerek, H_2O_2 'yi ortadan uzaklaştırır. Enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin en önemli elemanı olan glutatyon karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen tripeptittir. Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. (Akkuş, 1995). Oksidan moleküller ile savunma sistemleri fizyolojik şartlarda denge halindedir. Oluşan oksidan moleküller antioksidanlar tarafından yeterince etkisizleştirilemezse hücrede reaktif oksijen türleri artar ve hücrede olumsuz etkiye sebep olurlar. Reaktif oksijen türlerinin hücrelerde meydana getirdiği hasara ‘oksidatif stres’ denir (Beckman ve diğ., 1998) (Şekil 2.4.1).



Şekil 2.4.1.: Serbest radikallerin oluşum mekanizması

Lipit peroksidasyonu sonucu çoklu doymamış yağ asitleri kaynaklı çeşitli toksik aldehitler oluşur. En önemli aldehitler malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenaldir. Oksidatif stresin sonucunda bu aldehitler hedef hücre membranlarında lipit modifikasyonuna neden olarak akışkanlığı azaltarak membran bütünlüğünü bozabilir. Lipit peroksidasyonu sadece lipit üzerinde etkin olmayıp membran proteinlerinde de hasara yol açabilir (Paloma ve diğ., 2004). Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan toksik aldehitler, zarlarda protein kümeleri oluşturarak, membran reseptörlerinin ve enzimlerin aktivitelerinde kayıplara neden olabilirler. Ayrıca özellikle DNA bazları ile tepkimeleri sonrası mutasyonların gelişebildiği de bilinmektedir (Beckman ve diğ., 1998, Çırak ve diğ., 2003).

Testisin sperm üretiminin ve steroidogenezin devamlılığı için korunmasına rağmen, bazı çevresel faktörler bu savunmayı geçerek, testiste oksidatif stres meydana getirebilmektedir. Oksidatif stres sonucunda ise, erkek germ hücrelerinde DNA hasarı, spermlerde DNA hasarı, lipit peroksidasyonunun artması, testisteki antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk, SOD ve katalaz enzimlerinin baskılanması görülür (İkeda ve diğ., 1999).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada akrilamid ve alkol, ayrı ayrı ve birlikte olarak hamile dişi farelere hamilelik ve laktasyon dönemi boyunca uygulanmıştır. Doğan erkek yavruların gonadosomatik indeksi belirlenerek, testislerinden biri histolojik ve histometrik incelemeler için, diğeri ise biyokimyasal incelemeler için kullanılmıştır. Testisteki spermatogenik ve diğere hücrelerin yoğunluğu belirlenerek, spermatogenik hücrelerin oranı ve testis verimliliği saptanmıştır. Dokuda meydana gelen oksidatif hasar, lipid peroksidasyonu gösterilmesiyle, total protein miktarı, katalaz ve SOD enzim miktarının gösterilmesiyle ortaya çıkarılmıştır.

3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'den temin edilen *Mus musculus Balb/c* türü 30 dişi fare, hamilelik ve laktasyon süresince kullanılmıştır. Hamile dişi farelerin ortalama ağırlığı 25 gr'dır. Dişi fareler sıcaklık 20-25°C, arasındaki oda sıcaklığında bağıl nem % 50-60, günlük 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık periyodu olan ortamlarda türlerine özgü yem ve içme suyu ile beslenmiştir. Üreme dönemindeki dişi fareler doğal yollarla çiftleştirilerek hamile kalmaları sağlanmıştır. Hamile fareler her grupta 3 dişi birey olacak şekilde 10 farklı gruba ayrılmıştır. Hamile hayvanlar doğumdan hemen önce ayrı kafeslere alınarak, yavruların doğumdan sonra annelerinden süt emmesi sağlanmıştır. Deney süresince Kontrol grubundaki bireylere hamileliğin 6. gününden başlanarak laktasyon döneminin sonuna kadar günde bir defa olmak üzere %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su oral olarak (gavaj) verilmiştir (Takahashi ve diğ., 2009). Deney süresince akrilamid uygulanan gruplara anneden yavruya geçerek yavru da toksik etkiler oluşturabilen en düşük doz olan 14 mg/kg (100 ppm) akrilamid ve alkolün günlük alım dozu olan 2 g/kg alkol günlük olarak uygulanmıştır (Takahashi ve diğ., 2009; Friedman ve diğ., 2003; Grattagliano ve diğ., 1997). Hamileliğin 6. gününden itibaren deney gruplarından hamilelik dönemi boyunca, akrilamid alan gruba (Akr-H) 14 mg/kg akrilamid, alkol alan gruba (Al-H) 2 g/kg alkol, akrilamid ve alkol birlikte alan gruba (Akr+Al-H) 14 mg/kg akrilamid ve 2 g/kg alkol %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su içerisinde çözülerek oral olarak verilmiştir. Deney gruplarından laktasyon dönemi boyunca madde uygulanan dişi bireylere

hamileliklerinin 6. gününden itibaren doğuma kadar %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su verilmiştir. Doğumun olduğu gün 0. gün sayılarak 21 gün (laktasyon dönemi) boyunca akrilamid alan (Akr-L) gruba 14 mg/kg akrilamid, alkol alan (Al-L) gruba 2 g/kg alkol, akrilamid ve alkol birlikte alan (Akr+Al-L) gruba 14 mg/kg akrilamid ve 2 g/kg alkol %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su içerisinde çözülerek, oral olarak verilmiştir. Deney gruplarından hamilelik ve laktasyon dönemleri boyunca hamileliklerinin 6. gününden itibaren laktasyon döneminin sonuna kadar akrilamid (Akr-HL) alan gruba 14 mg/kg akrilamid, alkol (Al-HL) alan gruba 2 g/kg alkol, akrilamid ve alkol birlikte (Akr+Al-HL) alan gruba 14 mg/kg akrilamid 2 g/kg alkol, %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su içerisinde çözülerek oral olarak verilmiştir (Tablo 3.1.). Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan "Etik Kurul İlkelerine Uygun" raporu doğrultusunda yapılmıştır.

Tablo 3.1.: Akrilamid, Alkol ve Akrilamid + Alkol Uygulanan Deney Grupları

	1.	Kontrol Grubu	%0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su (Hamilelik ve laktasyon dönemi boyunca)
HAMİLELİK	2.	AKR-H	14 mg/kg Akrilamid + %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su
	3.	AL-H	2 g/kg Alkol + %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su
	4.	AKR+AL-H	14 mg/kg Akrilamid + 2 g/kg Alkol + %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su
LAKTASYON	5.	AKR-L	14 mg/kg Akrilamid + %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su
	6.	AL-L	2 g/kg Alkol + %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su
	7.	AKR+AL-L	14 mg/kg Akrilamid + 2 mg/kg Alkol + %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su
HAMİLELİK + LAKTASYON	8.	AKR-HL	14 mg/kg Akrilamid + %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su
	9.	AL-HL	2 g/kg Alkol + %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su
	10.	AKR+AL-HL	14 mg/kg Akrilamid + 2 g/kg Alkol + %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su

3.2. GONADOSOMATİK İNDEKS

Deney sonunda 21 günlük erkek yavru farelerin vücut ağırlıkları alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi uygulandı ve testisleri disekte edildi. Disekte edilen testislerin ağırlığı ölçüldü ve testis ağırlıkları vücut ağırlıklarına oranlanarak gonadosomatik indeks aşağıdaki formülle hesaplandı (Panter ve diğ., 2008).

$$\text{Gonadosomatik indeks} = \frac{\text{Testis Ağırlığı (g)}}{\text{Vücut Ağırlığı (g)}} \times 100$$

3.3. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

Tablo 3,1’de gösterilen gruplara ait 21 günlük erkek farelerin testis dokularından biri Bouin fiksatif ile 12 saat fikse edildikten sonra dokular yükselen alkol serilerinden geçirilerek parafine gömüldüler. Bloklar Thermo Scientific Marka mikrotom aracılığıyla 5-6 µm kalınlığında kesitler alınarak preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı (Humason, 1972). Preparatlar, Nikon Eclipse E200 marka mikroskopta incelenerek, Nikon Coolpix4500 marka dijital fotoğraf makinası ile fotoğrafları çekildi.

Histometrik incelemeler için H&E ile boyanmış preparatlardaki Sertoli, Leydig ve germ hücreleri miktarını belirlemek için her gruptan sekiz bireye ait testis kesitleri standart nokta sayımı metoduna göre 100X büyütmede her bir birey kesidinde 100 nokta bulunan 30 alan sayıldı (Wreford, 1995; Aktaş ve diğ., 2008). Seminifer tübüllerdeki, spermatogonyum, primer ve sekonder spermatosit, erken spermatid, Sertoli ve Leydig hücreleri ile dejenere hücreler sayıldı. Bulunan hücre miktarlarına göre yüzde spermatogenik hücre oranları saptandı ve Sertoli hücresi başına düşen germ hücresi hesaplanarak testis verimliliği bulundu (Atanassova ve diğ., 1999).

3.4. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Yapılan deneylerde her grup için 8 erkek birey testisi kullanılmıştır. Biyokimyasal incelemeler için alınan testisler IKA RW20 digital marka homojenizatör ile 1500 rpm'de 1M PBS tamponu içerisinde homojenize edildi. Homojenize edilen dokular +4°C'de 10000 g'de 20 dakika Nüve marka soğutmalı santrifüj kullanılarak santrifüjlendi ve toplanan süpernatantlar, deneylerde kullanıldı. Deneylerde her birey için iki ölçüm alınmıştır.

3.4.1. Total Protein Tayini

Total protein tayini Lowry ve diğerlerinin 1953 yöntemine göre yapıldı. Deneyin prensibi fosfomolibdotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu belirteci) tirozin bakiyeleri ile reaksiyona girerek mavi bir renk oluşturma esasına dayanır. Bu mavi renk 660 nm dalga boyunda absorbans verir.

3.4.1.1. Kullanılan Çözeltiler

A Reaktifi: 0,1 N NaOH içinde % 2 (w/v) Na_2CO_3

B Reaktifi: %1 (w/v) Na-K Tartarat içinde % 5 (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

C Reaktifi: 50 ml A reaktifine 1 ml B reaktifi eklenerek C belirteci hazırlanır. Bu bileşik taze hazırlanır.

D Reaktifi: Folin belirteci 1:2 oranında sulandırılarak hazırlanır. Bu belirteç taze olarak hazırlanır ve ışıktan korunur.

3.4.1.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı:

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,1 ml	—
Tris Tamponu	—	0,1 ml
C Reaktifi	1 ml	1 ml
D Reaktifi	0,1 ml	0,1 ml

Örnek ve kör tüplerine C Reaktifi konup 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra karanlıkta karışımın homojen olarak karışması sağlanarak D reaktifi eklendi. Tüpler oda ısısı ve karanlıkta 30 dk inkübe edildi. Bu süre sonunda absorbanslar 660 nm'de spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.4.1.3. Hesaplama

Total protein miktarını belirlemek için Sığır Serum Albümini (BSA) Standart grafik kullanılarak okunan absorbaslara denk düşen protein miktarı hesaplanmıştır.

3.4.2. Membran Lipit Peroksidasyonun Tayini

Lipit peroksidasyonunun miktarı Devasagayam ve Tarachand (1987)'in yönteminde olduğu gibi örnekteki malondialdehit içeriğine göre ölçülmüştür. Deneyin prensibi poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan son ürünlerden biri olan malondealdehit (MDA)'in sıcak ortamda Tiyobarbütirik asit (TBA) ile oluşturduğu bileşiğin pembe-kırmızı renginin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

3.4.2.1. Kullanılan Çözeltiler

-% 10 Triklorasetik asit (TCA): 0.25 N HCl içinde hazırlanır.

-% 0.375 Tiyobarbütirik asit (TBA): 0.25 N HCl içinde hazırlanır.

-0.25 N Hidroklorik asit

Deney Karışımı:

1 ml 0,15 M Tris-HCl tamponu (pH 7,4)

0,3 ml 10 mM KH_2PO_4

3.2.2.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,2 ml	—
Tris Tamponu	—	0,2 ml
Deney karışımı	1,3 ml	1,3 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1,5 ml	1,5 ml

Örnek ve kör tüplerine deney karışımı konup 37°C çalkalayıcı su banyosunda 20 dk inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon TCA eklenerek durduruldu. Tüpler iyice çalkalanarak TBA eklendi ve 20 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra

soğutulan tüpler 10 dakika 2000 g'de santrifüj edilip, süpernatantın absorbansı 532 nm'de köre karşı okundu.

3.4.2.3. Hesaplama

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \frac{V_{\text{toplam}} \times A_{\text{örnek}} \times 10^6}{V_{\text{örnek}} \times \epsilon_{\text{mM}} \times \text{LP}}$$

MDA için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

V_{toplam} (Toplam hacim): 4 ml

$V_{\text{örnek}}$ (Kullanılan örnek hacmi): 0.2 ml

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı

LP: Işık yolu

3.4.3. Katalaz Tayini

Katalaz gösterilmesi için Sinha (1972)'nin yöntemi kullanıldı. Katalaz enzimi hücre için çok zararlı olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) su ve moleküler oksijene dönüştürür. Deney prensibi H_2O_2 'nin dikromat/asetik asit belirteci ile oluşturduğu koyu mavi-mor çökeltinin kaynatılarak açık yeşil renge dönüştürülmesi esasına dayanır. Bu açık yeşil renk 570 nm dalga boyunda absorbans verir.

3.4.3.1. Kullanılan Çözeltiler

0,01 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7)

2 M H_2O_2

Dikromat/asetik asit belirteci: 5 gr potasyum dikromat 100 ml ultrasaf suda çözülür. Bu karışıma yavaşça 300 ml glasiyal asetik asit eklenir.

3.4.3.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,1 ml	—
Tris Tamponu	—	0,1 ml
Sodyum Fosfat Tamponu	0,5 ml	0,5 ml
H_2O_2	0,4 ml	0,4 ml
Dikromat/Asetik asit Belirteci	0,2 ml	0,2 ml

Örnek ve kör tüplerine sodyum fosfat tamponu, H_2O_2 ve hücre süspansiyonu konduktan sonra tüpler hafifçe çalkalandı. Daha sonra dikromat/asetik asit belirteci eklenir ve tüpler 10 dk kaynayan su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler soğutularak 570 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.4.3.3. Hesaplama

$$\text{Tüketilen } H_2O_2 = \frac{A_{\text{örnek}} \times df \times V_{\text{Toplam}}}{\epsilon_{mM} \times V_{\text{örnek}} \times LP}$$

H_2O_2 için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon_{mM} = 1.88 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$

V_{toplam} (Toplam hacim): 1.2 ml

$V_{\text{örnek}}$ (Kullanılan örnek hacmi): 0.1 ml

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.4.4. Süperoksit dismutaz (SOD) Tayini

Süperoksit dismutaz enzimi gösterilmesi için Marklund ve Marklund (1974)'un yöntemi kullanıldı. Deneyin prensibi pyrogallolün otooksidasyonunun SOD enzimi tarafından inhibe edilmesi esasına dayanır.

3.4.4.1. Kullanılan Çözeltiler

0,05 M Tris Tamponu (pH 8,5)

20 mM Pyrogallol

3.4.4.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,05 ml	—
Tris Tamponu	1,4 ml	1,45 ml
Pyrogallol	0,05 ml	0,05 ml

Örnek ve kör tüplerindeki absorbans değişimi çözeltiler konduktan sonra 3 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla 420 nm'de spektrofotometrede okunur.

3.4.4.3. Hesaplama

Körün absorbans değişimi: ΔA

Örneğin absorbans değişimi: ΔB

$$\Delta A = \frac{A_{\text{son}} - A_{\text{ilk}}}{T_{\text{son}} - T_{\text{ilk}}}$$

$$\Delta B = \frac{B_{\text{son}} - B_{\text{ilk}}}{T_{\text{son}} - T_{\text{ilk}}}$$

SOD'un %50

$$\text{inhibisyon miktarı} = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 100}{\Delta A \times 50}$$

(1/unit)

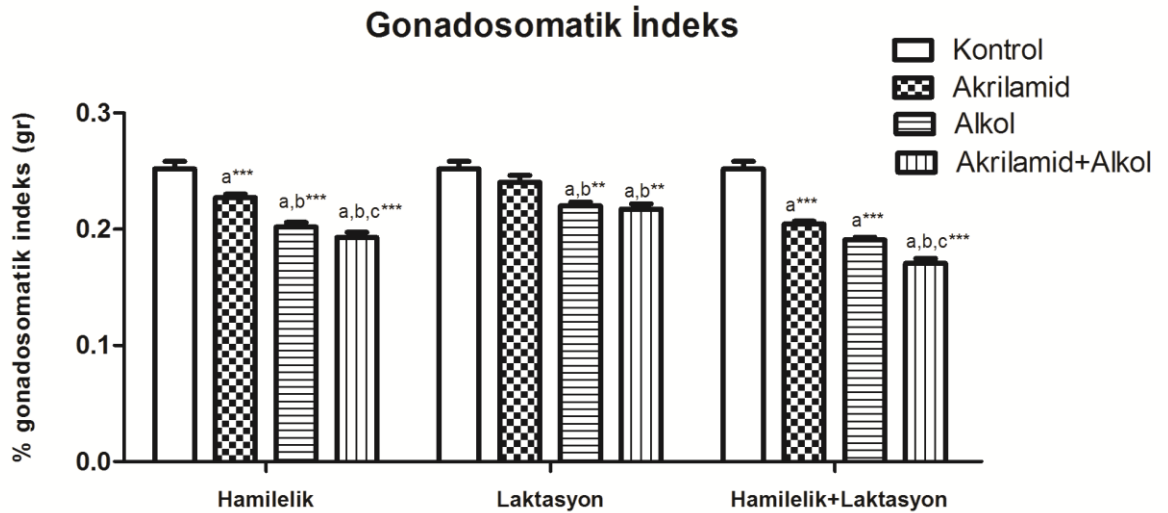
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deneyde kullanılan hayvanlarda yapılan incelemelerde gonadosomatik indeks, testisteki mm²'deki hücre miktarları, spermatogenik hücrelerin oranları, dokudaki total protein, lipit peroksidasyonu, katalaz ve SOD enzimi miktarı saptandı. Daha sonra karşılaştırmalarda ANOVA Tukey testi uygulandı. Sonuçların değerlendirilmesinde $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$ anlamlılık seviyesi temel alındı.

4. BULGULAR

4.1. GONADOSOMATİK İNDEKS

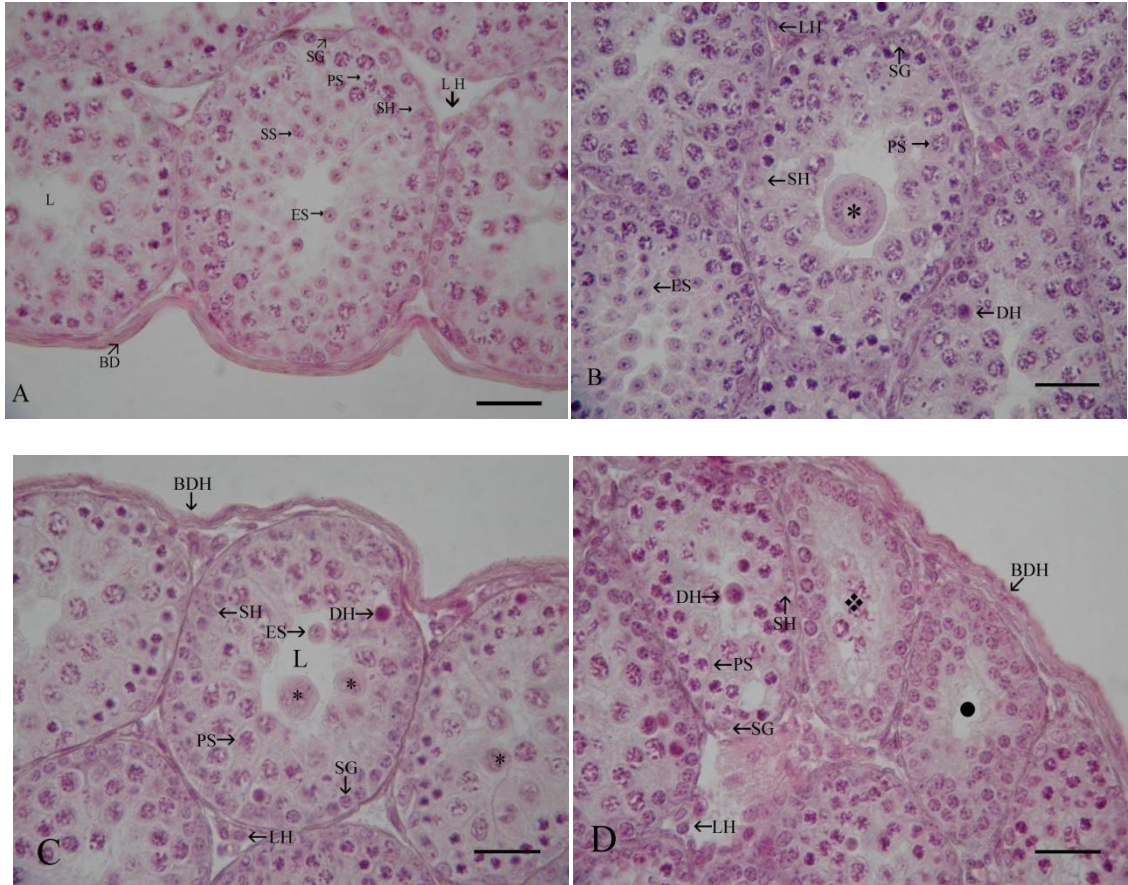
Kontrol grubuna göre akrilamidi sadece laktasyon dönemi boyunca alan grup dışında tüm deney gruplarında gonadosomatik indekste anlamlı bir azalma gözlenmektedir. Tüm dönemlerde akrilamid uygulanan gruplara (Akr-H, Akr-L, Akr-HL grupları) göre, hamilelik ve laktasyonda alkol uygulanan grup dışındaki alkol gruplarında (Al-H, Al-L, Al-HL grupları) ve akrilamid ile alkolün birlikte uygulandığı gruplarda (Akr+Al-H, Akr+Al-L, Akr+Al-HL grupları) gonadosomatik indekste anlamlı bir azalma görülmektedir. Tüm dönemlerde alkol uygulanan gruplara (Al-H, Al-L, Al-HL grupları) göre, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplardan hamilelikte ve her iki dönemde uygulama yapılan grupta gonadosomatik indekste anlamlı bir azalma bulunmaktadır. Hamilelik gruplarına göre (Akr-H, Al-H ve Akr+Al-H grupları) laktasyon gruplarında (Akr-L, Al-L ve Akr+Al-L grupları) gonadosomatik indekste anlamlı bir artış bulunurken, her iki dönemde uygulama yapılan gruplardan akrilamid uygulanan, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda gonadosomatik indekste anlamlı bir azalma görülmektedir. Laktasyonda gruplarına göre her iki dönemde uygulama yapılan tüm gruplarda (Akr-HL, Al-HL, Akr+Al-HL grupları) gonadosomatik indekste anlamlı bir azalma görülmektedir (Şekil 4.1.1.).



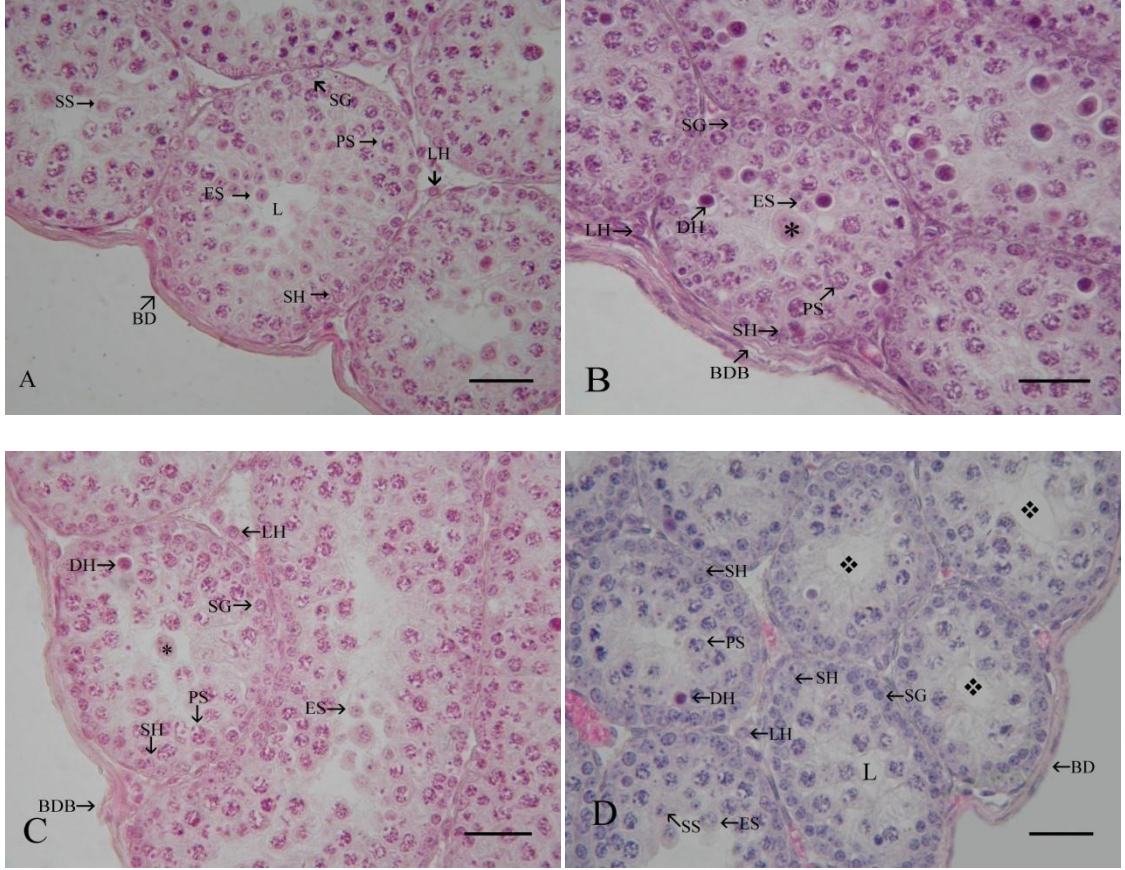
Şekil 4.1.1.: Kontrol ve deney gruplarının gonadosomatik indeksi a: Kontrol grubuna göre, b:Akrilamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre *: $p<0.001$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.005$

4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

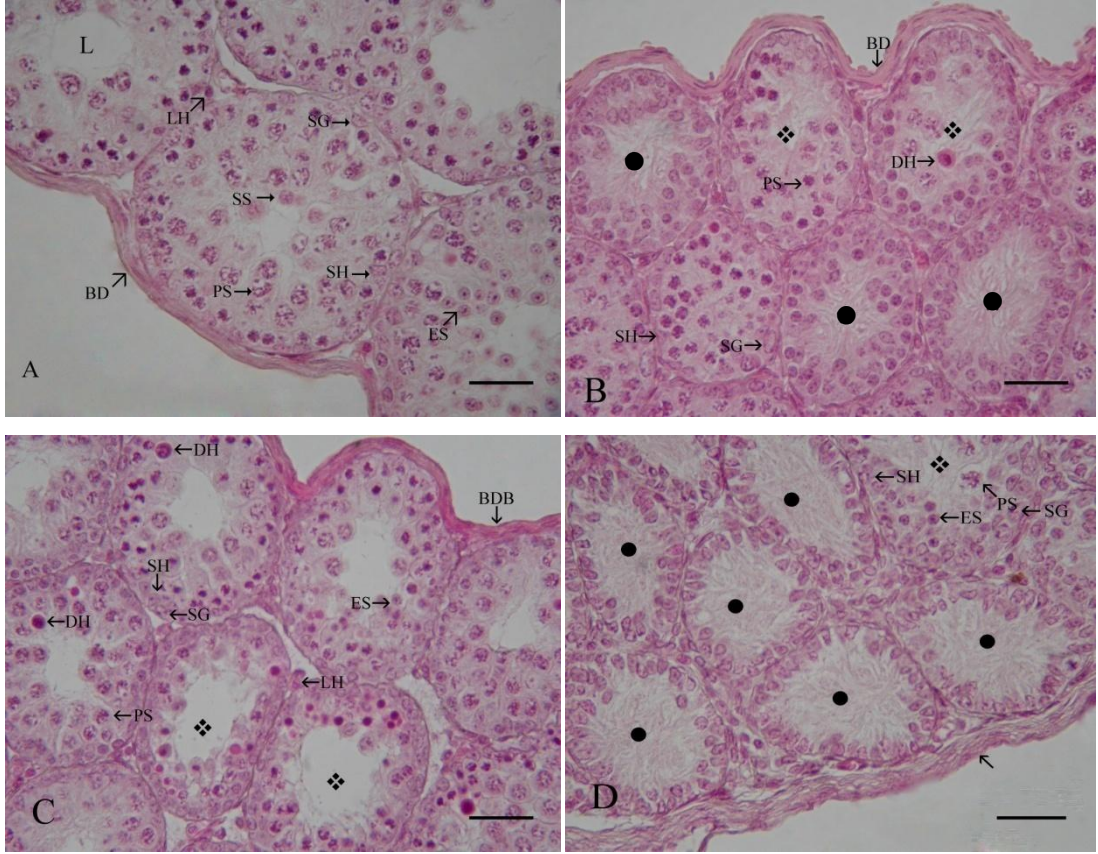
Kontrol grubundaki bireylerin kesitlerinde testisteki bağ dokusunun ve seminifer tübülün düzenli yapısının korunduğu, seminifer tübülde bulunan spermatositlerin yoğunluğunun ve morfolojilerinin normal olduğu gözlemlendi. Hamilelik döneminde akrilamid, laktasyon döneminde akrilamid ve alkolün tek başına uygulandığı gruplarda seminifer tübül lümeninde multinükleer giant hücreler ve bağ dokusunda kollajen yapısının bozulmasıyla oluşan yapısal değişimler gözlenirken, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda ise bağ dokusunda bozukluğun yanı sıra atrofik tübüller gözlemlendi. Ayrıca bu grupta spermatogenezin genellikle primer spermatosit evresinde tutuklu kaldığı tübüller gözlemlendi (Şekil 4.2.1., Şekil 4.2.2.). Buna benzer şekilde hem hamilelik hem de laktasyon dönemleri boyunca uygulama yapılan tüm gruplarda atrofik tübüller, spermatogenezin tutuklu kaldığı tübüller ve testis bağ dokusunda yapısal bozukluklar gözlemlendi (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.1.: Kontrol ve hamilelik dönemi deney gruplarının testis kesitleri Boya: H&E (A:Kontrol, B:Akr, C:Al, D:Akr+ Al), Spermatogonyum (SG), Primer spermatosit (PS), Sekonder spermatosit (SS), Erken spermatid (ES), Sertoli hücresi (SH), Leydig hücresi (LH), Dejenere hücre (DH), Lümen (L), Bağdoku (BD), Bağdoku bozukluğu (BDB), (*), Multinükleer giant hücre, (•), Atrofik tübül, (•), Tutuklu kalan tübül, Bar: 30µm



Şekil 4.2.2.: Kontrol ve laktasyon dönemi deney gruplarının testis kesitleri, Boya: H&E (A:Kontrol, B:Akr, C:Al, D:Akr+ Al), Spermatogonyum (SG), Primer spermatosit (PS), Sekonder spermatosit (SS), Erken spermatid (ES), Sertoli hücresi (SH), Leydig hücresi (LH), Dejenere hücre (DH), Lümen (L), Bağdoku (BD), Bağdokuda bozukluk (BDB), (*), Multinükleer giant hücre, (❖), Atrofik tübül, (●), Tutuklu kalan tübül, Bar: 30µm



Şekil 4.2.3: Kontrol ve hamilelik ve laktasyon dönemi deney gruplarının testis kesitleri, Boya: H&E, (A:Kontrol, B:Akr, C:Al, D:Akr+ Al), Spermatogonyum (SG), Primer spermatosit (PS), Sekonder spermatosit (SS), Erken spermatid (ES), Sertoli hücresi (SH), Leydig hücresi (LH), Dejenere hücre (DH), Lümen (L), Bağdoku (BD), Bağdokuda bozukluk (BDB), (*), Multinüklear giant hücre, (❖), Atrofik tübül, (●), Tutuklu kalan tübül, Bar: 30µm

4.3. HİSTOMETRİK BULGULAR

Kontrol grubuna göre tüm deney gruplarında mm^2 deki spermatogonyum, primer ve sekonder spermatosit, erken spermatid ve Leydig hücresi miktarlarında istatistiki olarak anlamlı bir azalma bulunurken, dejenere hücre miktarında anlamlı bir artış görülmektedir. Akrilamidin sadece laktasyon dönemi boyunca uygulama yapılan grubu (Akr-L grubu) dışında diğer tüm gruplarda kontrol grubuna göre Sertoli hücresi miktarı ve testis verimliliğinde anlamlı bir azalma görülmektedir (Şekil 4.3.1., Şekil 4.3.2., Şekil 4.3.3., Şekil 4.3.4., Şekil 4.3.5., Şekil 4.3.6., Şekil 4.3.7. ve Şekil 4.3.8.). Spermatogenik hücre oranlarına bakıldığında kontrol grubuna göre tüm deney gruplarında spermatogonyum oranında anlamlı bir artış ve hamilelikte tek başına alkol uygulanan (Al-H grubu) grup ile akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı (Akr+Al-H grubu) gruplar dışında diğer tüm gruplarda primer spermatosit miktarında anlamlı bir artış gözlenirken, sekonder spermatosit ve erken spermatid oranlarında azalma görülmektedir (Şekil 4.3.9.).

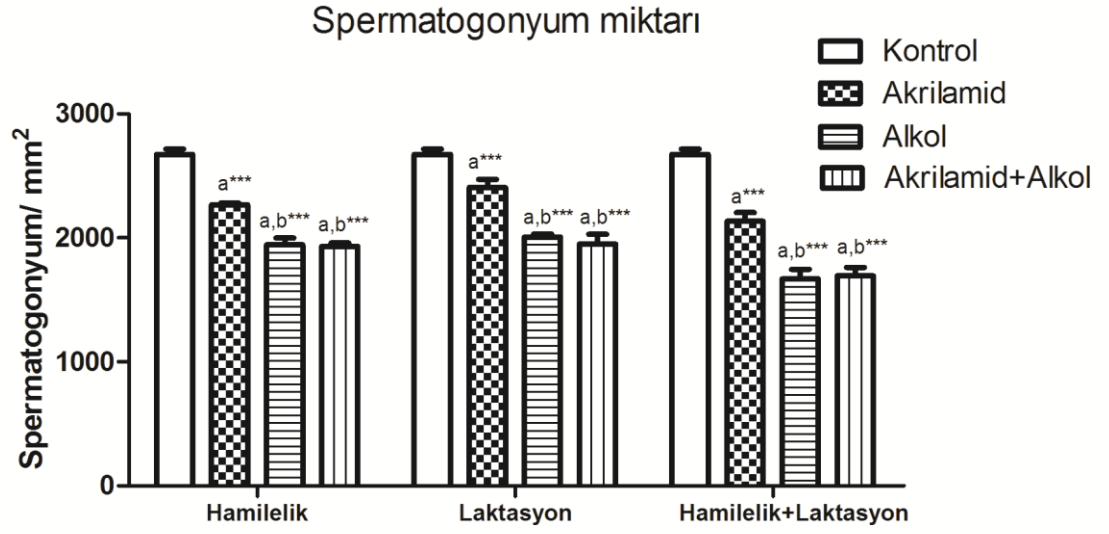
Tüm dönemlerde akrilamid uygulanan gruplara (Akr-H, Akr-L, Akr-HL grupları) göre, alkol uygulanan gruplarda (Al-H, Al-L, Al-HL grupları) ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda (Akr+Al-H, Akr+Al-L, Akr+Al-HL grupları) spermatogonyum, primer spermatosit, Sertoli hücresi miktarı ve testis verimliliğinde anlamlı bir azalma görülmektedir (Şekil 4.3.1., Şekil 4.3.2., Şekil 4.3.5. ve Şekil 4.3.8.). Sadece hamilelik ve sadece laktasyon döneminde akrilamid uygulanan gruplara (Akr-H ve Akr-L grupları) göre, alkol uygulanan gruplarda (Al-H ve Al-L grupları) sadece Leydig hücresi miktarında anlamlı bir azalma ve dejenere hücre miktarında anlamlı bir artış görülürken, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı (Akr+Al-H ve Akr+Al-L grupları) gruplarda ise sekonder spermatosit, erken spermatid ve Leydig hücresi miktarlarında anlamlı bir azalma ve dejenere hücre miktarında ise anlamlı bir artış görülmektedir (Şekil 4.3.3., Şekil 4.3.4., Şekil 4.3.6. ve Şekil 4.3.7.). Her iki dönemde akrilamid uygulanan gruba (Akr-HL grubu) göre, alkol uygulanan grupta (Al-HL grubu) sadece erken spermatid miktarında anlamlı bir azalma görülürken, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı grupta (Akr+Al-HL grubu) ise, sekonder spermatosit ve erken spermatid miktarlarında anlamlı bir azalma ve dejenere hücre miktarında anlamlı bir artış görülmektedir (Şekil 4.3.3., Şekil 4.3.4. ve Şekil 4.3.7.).

Spermatogenik hücre oranlarına bakıldığında hamilelik döneminde akrilamid uygulanan gruba göre alkol uygulanan grupta spermatogonyum ve primer spermatosit oranlarında anlamlı bir artış görülürken, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı grupta spermatogonyum ve primer spermatosit oranlarında anlamlı bir artış ve erken spermatid oranında anlamlı bir azalma görülmektedir. Laktasyonda akrilamid uygulanan gruba göre akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı grupta sadece erken spermatid oranlarında anlamlı bir azalma bulunurken, hamilelikte ve laktasyonda akrilamid uygulanan gruba göre tek başına alkol uygulanan ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda erken spermatid oranlarında anlamlı bir azalma bulunmaktadır (Şekil 4.3.9.).

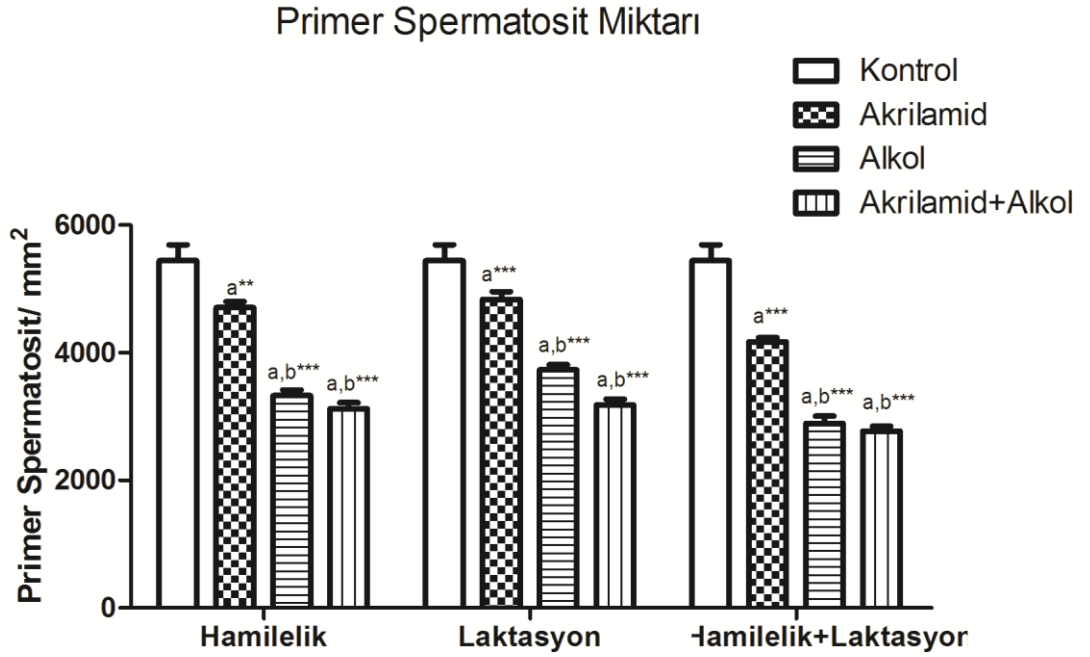
Tüm dönemlerde alkol uygulanan gruplara (Al-H, Al-L, Al-HL grupları) göre, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda (Akr+Al-H, Akr+Al-L, Akr+Al-HL grupları) sadece sekonder spermatosit miktarında anlamlı bir azalma görülmektedir (Şekil 4.3.3.). Sadece hamilelik döneminde alkol uygulanan (Al-H grubu) gruba göre akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı grupta (Akr+Al-H grubu) erken spermatid, Sertoli hücresi ve Leydig hücresi miktarlarında anlamlı bir azalma gözlenirken, dejenere hücre miktarında anlamlı bir artış görülmektedir (Şekil 4.3.4., Şekil 4.3.5., Şekil 4.3.6. ve Şekil 4.3.7.). Sadece laktasyon dönemine bakıldığında alkol grubuna (Al-L grubu) göre, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı grupta (Akr+Al-L grubu) primer spermatosit, erken spermatid ve Leydig hücresi miktarlarında anlamlı bir azalma bulunmaktadır. Her iki dönemde alkol uygulanan gruba (Al-HL grubu) göre, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı grupta (Akr+Al-HL grubu) testis verimliliğinde anlamlı bir azalma görülürken, dejenere hücre miktarında anlamlı bir artış görülmektedir (Şekil 4.3.2., Şekil 4.3.4., Şekil 4.3.6., Şekil 4.3.7. ve Şekil 4.3.8.). Spermatogenik hücre oranlarına bakıldığında tüm dönemlerde alkol uygulanan gruplara göre akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda sadece erken spermatid oranında anlamlı bir azalma görülmektedir. Laktasyon gruplarında spermatogonyum oranında anlamlı bir artış görülürken, sekonder spermatosit oranında anlamlı bir azalma görülmektedir (Şekil 4.3.9.).

Hamilelikte akrilamid uygulanan gruba göre laktasyon grubunda sadece testis verimliliğinde anlamlı bir artış görülürken, hamilelik ve laktasyon gruplarında primer ve sekonder spermatosit, erken spermatid ve Leydig hücresi miktarında anlamlı bir azalma ve dejenere hücre miktarında anlamlı bir artış görülmektedir. Hamilelikte alkol uygulanan gruba göre laktasyon grubunda sadece primer spermatosit miktarında anlamlı bir artış görülürken, hamilelik ve laktasyon gruplarında spermatogonyum, primer ve sekonder spermatosit, erken spermatid, Sertoli hücresi ve Leydig hücresi miktarlarında anlamlı bir azalma görülürken, dejenere hücre miktarında anlamlı bir artış gözlenmektedir (Şekil 4.3.1., Şekil 4.3.2., Şekil 4.3.3., Şekil 4.3.4., Şekil 4.3.5., Şekil 4.3.6., Şekil 4.3.7. ve Şekil 4.3.8.). Spermatogenik hücre oranlarına bakıldığında ise, hamilelik döneminde uygulama yapılan tüm gruplara göre hamilelik ve laktasyon dönemlerinde uygulama yapılan tüm gruplarda sekonder spermatosit ve erken spermatid oranlarında anlamlı bir azalma görülürken, hamilelik döneminde alkol uygulanan gruba göre hamilelik ve laktasyon döneminde alkol uygulanan grupta ayrıca primer spermatosit oranında da anlamlı bir artış bulunmaktadır (Şekil 4.3.9.).

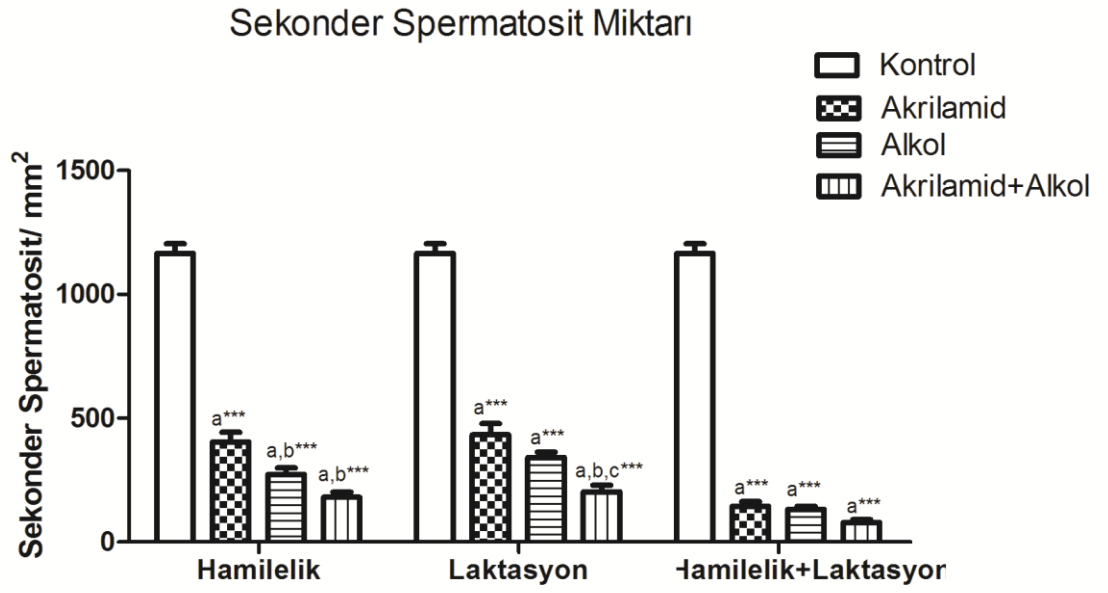
Laktasyon döneminde uygulama yapılan tüm gruplara göre hamilelik ve laktasyon gruplarında spermatogonyum, primer ve sekonder spermatosit, erken spermatid ve Leydig hücresi miktarında anlamlı bir azalma görülürken, dejenere hücre miktarında anlamlı bir artış görülmektedir (Şekil 4.3.1., Şekil 4.3.2., Şekil 4.3.3., Şekil 4.3.4., Şekil 4.3.6. ve Şekil 4.3.7.). Bunun yanı sıra laktasyon döneminde alkol uygulanan gruba göre hamilelik ve laktasyon dönemlerinde alkol uygulanan grupta Sertoli hücresi miktarında anlamlı bir azalma görülürken, laktasyonda akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruba göre hamilelikte ve laktasyonda akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı grupta Sertoli hücresi miktarında ve testis verimliliğinde anlamlı bir azalma görülmektedir (Şekil 4.3.5. ve Şekil 4.3.9.). Spermatogenik hücre oranlarına bakıldığında laktasyon döneminde uygulama yapılan tüm gruplara göre hamilelik ve laktasyon dönemlerinde uygulama yapılan tüm gruplarda sekonder spermatosit ve erken spermatid oranlarında anlamlı bir azalma görülürken, laktasyon döneminde alkol uygulanan gruba göre hamilelik ve laktasyon döneminde alkol uygulanan grupta ayrıca primer spermatosit oranında da anlamlı bir artış bulunmaktadır (Şekil 4.3.9.).



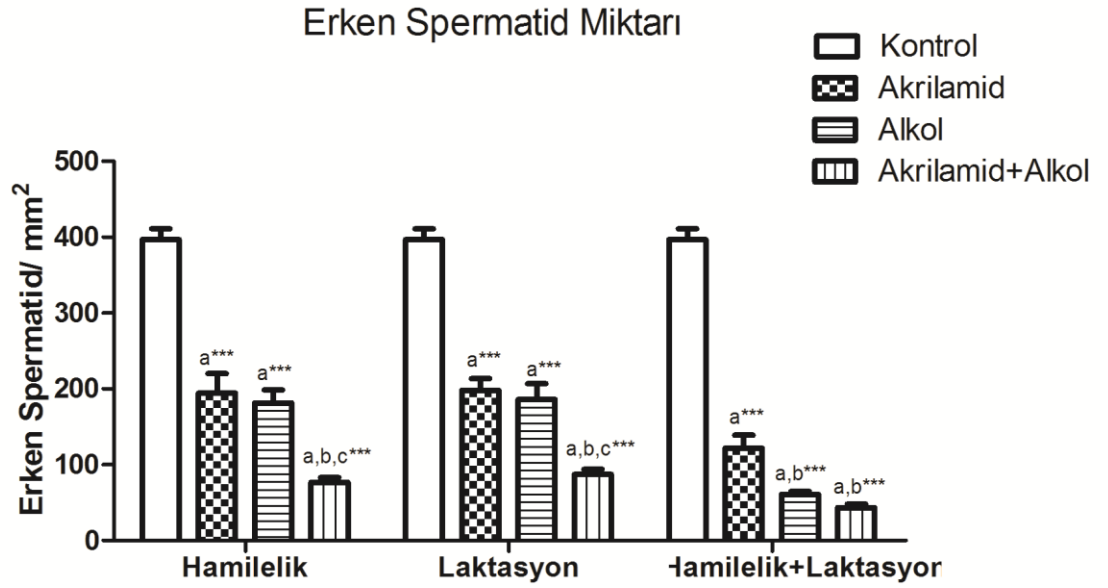
Şekil 4.3.1: Kontrol ve deney gruplarında mm²'de spermatogonyum miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrilamid uygulanan gruplara göre ***: p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.005



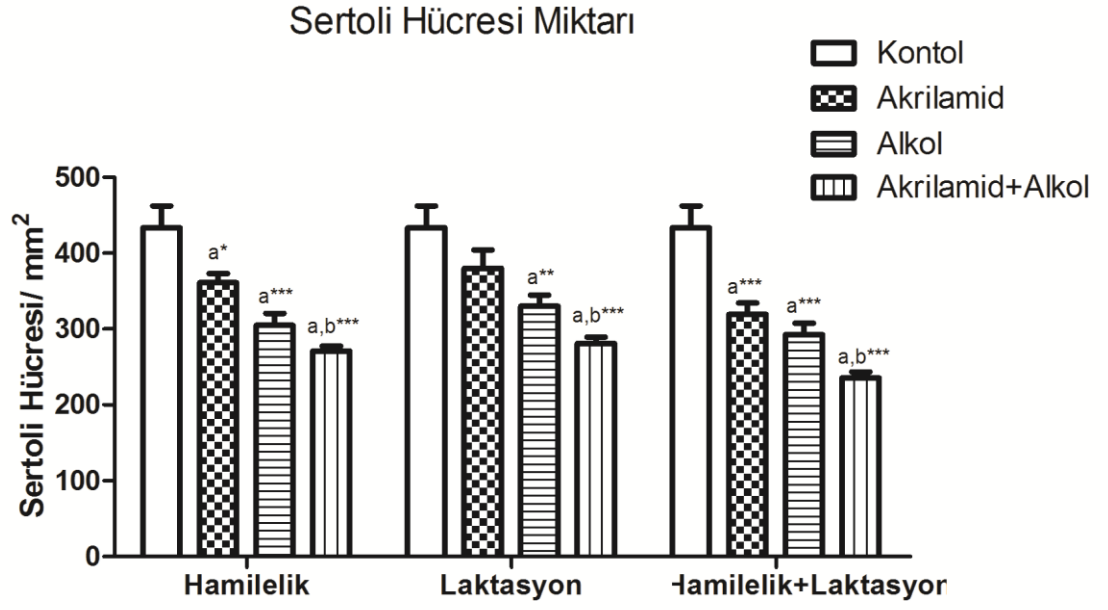
Şekil 4.3.2: Kontrol ve deney gruplarında mm²'de primer spermatosit miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrilamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre p<0.001, **: p<0.01



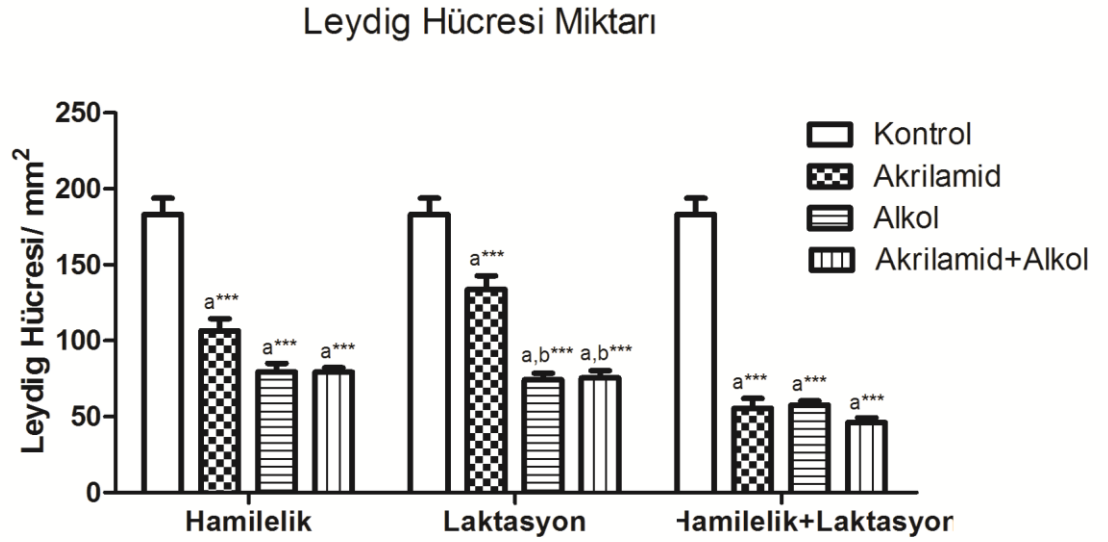
Şekil 4.3.3.: Kontrol ve deney gruplarında mm^2 'de sekonder spermatosit miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrilamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre ***: $p < 0.001$



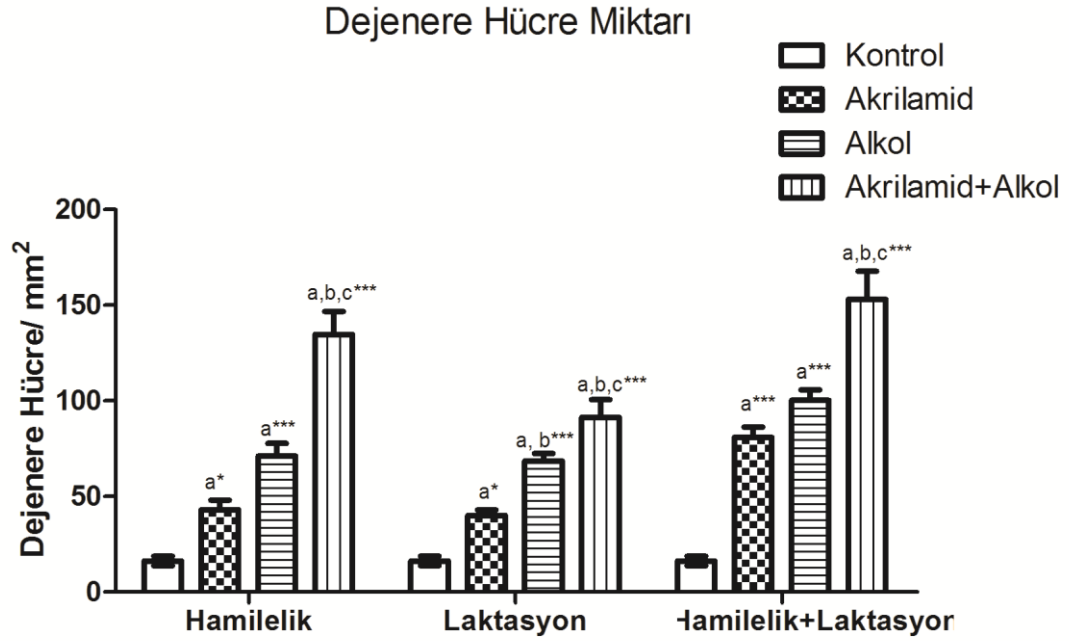
Şekil 4.3.4.: Kontrol ve deney gruplarında mm^2 'de erken spermatid miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrilamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre ***: $p < 0.001$



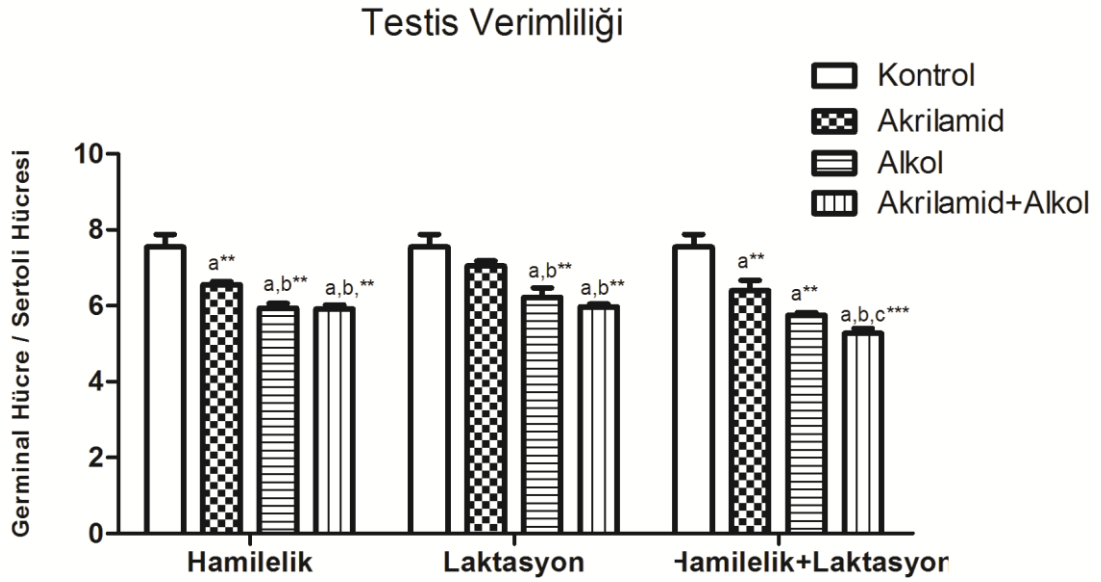
Şekil 4.3.5.: Kontrol ve deney gruplarında mm²'de Sertoli hücresi miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrlamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre ***: p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.05



Şekil 4.3.6.: Kontrol ve deney gruplarında mm²'de Leydig hücresi miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrlamid uygulanan gruplara göre, ***: p<0.001



Şekil 4.3.7.: Kontrol ve deney gruplarında mm^2 'de dejenere hücre miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrlamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$



Şekil 4.3.8.: Kontrol ve deney gruplarında testis verimliliği a: Kontrol grubuna göre, b:Akrlamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$

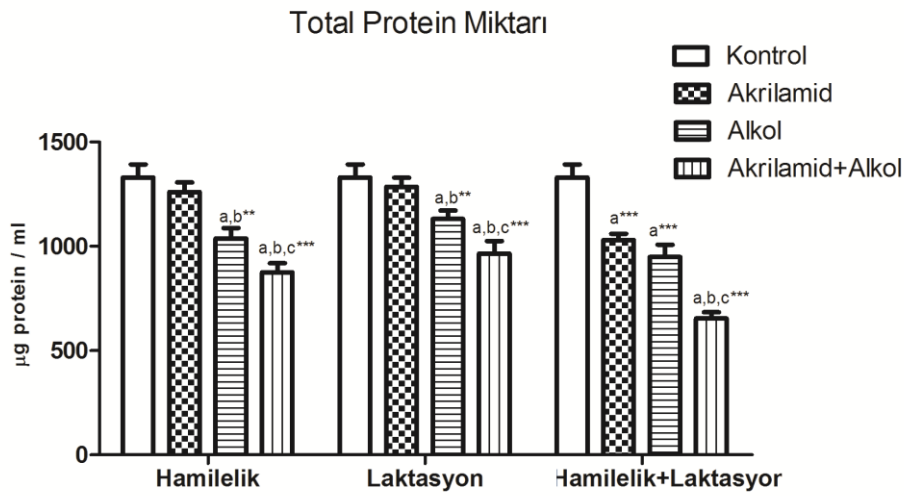
Tablo 4.3.1.: Kontrol ve deney gruplarında spermatogenik hücre oranları a: Kontrol grubuna göre, b:Akrilamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre, p<0,05

	% Spermatogonyum	% Primer Spermatosit	% Sekonder Spermatosit	% Erken Spermatid
Kontrol	27,96 ± 1,68	55,87 ± 3,06	12,07 ± 1,53	4,10 ± 0,44
AKR-H	30,95 ± 1,49 ^a	61,39 ± 1,67 ^a	5,08 ± 1,50 ^a	2,58 ± 0,88 ^a
AL-H	34,41 ± 2,20 ^{ab}	57,72 ± 2,20 ^b	4,74 ± 1,25 ^a	3,12 ± 0,71 ^{ab}
AKR+AL-H	36,48 ± 1,58 ^{abc}	58,52 ± 1,30 ^{ab}	3,51 ± 1,11 ^{ab}	1,49 ± 0,31 ^{abc}
AKR-L	31,08 ± 3,39 ^a	60,98 ± 3,35 ^a	5,44 ± 1,46 ^a	2,50 ± 0,59 ^a
AL-L	32,03 ± 1,43 ^a	59,49 ± 1,57 ^a	5,52 ± 0,96 ^a	2,95 ± 0,90 ^a
AKR+AL-L	35,45 ± 2,45 ^{abc}	59,09 ± 1,97 ^{ac}	3,81 ± 1,34 ^{abc}	1,65 ± 0,42 ^{abc}
AKR-HL	32,20 ± 3,69 ^a	63,75 ± 3,59 ^a	2,19 ± 0,75 ^a	1,86 ± 0,74 ^{ab}
AL-HL	35,07 ± 1,71 ^a	60,81 ± 1,88 ^a	2,81 ± 0,68 ^a	1,31 ± 0,19 ^a
AKR+AL-HL	36,89 ± 2,65 ^{ab}	60,41 ± 2,51 ^a	1,77 ± 0,75 ^{ac}	0,94 ± 0,25 ^{abc}

4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.4.1. Total Protein Miktarı

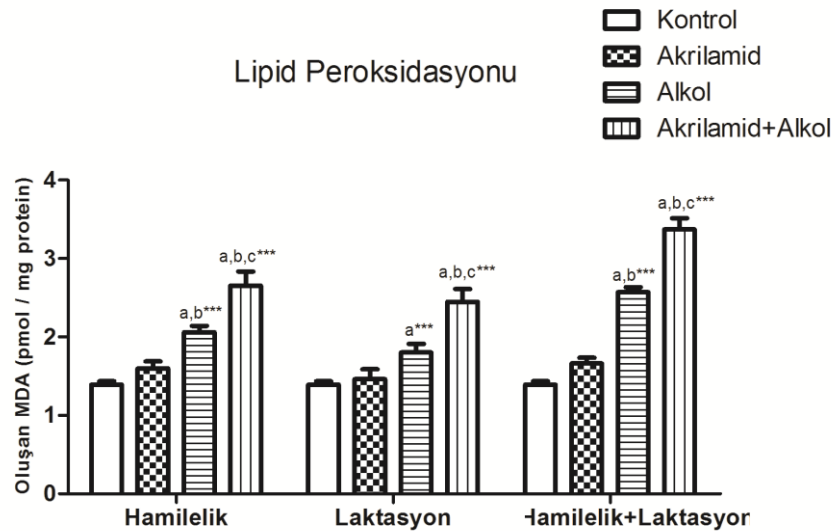
Yapılan biyokimyasal çalışmalarda Lowry yöntemi kullanılarak her grup için testislerdeki total protein miktarı belirlenmiştir ve grupların karşılaştırılmasıyla oluşturulan grafik Şekil 4.4.1.1’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre akrilamidi sadece hamilelikte ve sadece laktasyonda alan grup dışında tüm deney gruplarında total protein miktarında anlamlı bir azalma gözlenmektedir. Tüm dönemlerde tek başına akrilamid uygulanan gruplara (Akr-H, Akr-L, Akr-HL grupları) göre, hamilelik ve laktasyon döneminde tek başına alkol uygulanan grup dışında alkol uygulanan tüm gruplarda (Al-H, Al-L, Al-HL grupları) ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda (Akr+Al-H, Akr+Al-L, Akr+Al-HL grupları) total protein miktarında anlamlı bir azalma bulunmaktadır. Tüm dönemlerde alkol uygulanan gruplara göre, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda total protein miktarında anlamlı bir azalma görülmektedir. Hamilelik gruplarına (Akr-H, Al-H ve Akr+Al-H grupları) göre, laktasyon gruplarında (Akr-L, Al-L ve Akr+Al-L grupları) tüm uygulama yapılan gruplarda anlamlı bir fark bulunmazken, hamilelik ve laktasyon gruplarından tek başına akrilamid uygulanan ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda anlamlı bir azalma bulunmaktadır. Laktasyon gruplarına göre, her iki dönemde uygulama yapılan tüm gruplarda (Akr-HL, Al-HL ve Akr+Al-HL grupları) total protein miktarında anlamlı bir azalma gözlenmektedir (Şekil 4.4.1.1.).



Şekil 4.4.1.1.: Kontrol ve deney gruplarında testisteki total protein miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrilamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$

4.4.2. Lipit Peroksidasyonu

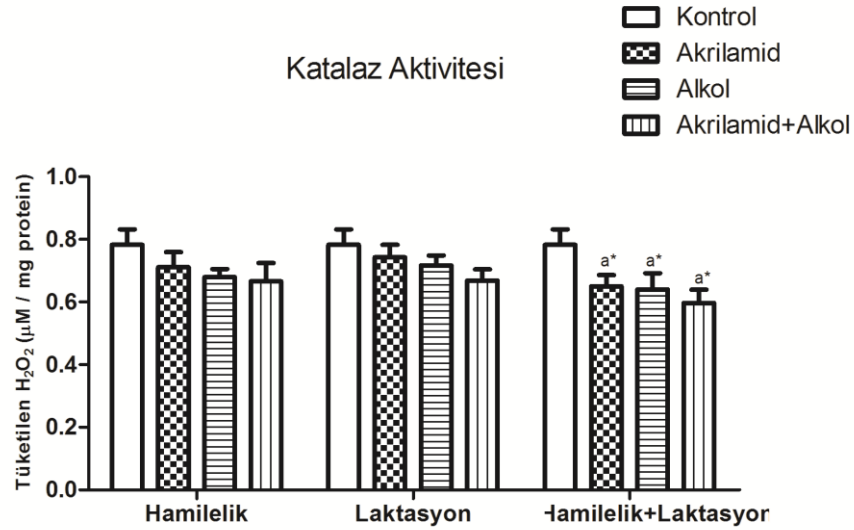
Yapılan biyokimyasal çalışmalar sonucunda kontrol grubu ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan lipit peroksidasyon ürünü olan malondealdehit (MDA) değerleri Şekil 4.4.2.1’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre akrilamidi sadece hamilelikte ve sadece laktasyonda alan grup dışında tüm deney gruplarında MDA miktarında anlamlı bir artış gözlenmektedir. Tüm dönemlerde tek başına akrilamid uygulanan gruplara (Akr-H, Akr-L, Akr-HL grupları) göre, sadece laktasyon döneminde tek başına alkol uygulanan grup dışında alkol uygulanan tüm gruplarda (Al-H, Al-L, Al-HL grupları) ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda (Akr+Al-H, Akr+Al-L, Akr+Al-HL grupları) MDA miktarında anlamlı bir artış bulunmaktadır. Tüm dönemlerde alkol uygulanan gruplara göre, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda MDA miktarında anlamlı bir artış görülmektedir. Hamilelik gruplarına (Akr-H, Al-H ve Akr+Al-H grupları) göre, laktasyon gruplarında (Akr-L, Al-L ve Akr+Al-L grupları) tüm uygulama yapılan gruplarda anlamlı bir fark bulunmazken, hamilelik ve laktasyon gruplarından tek başına alkol uygulanan ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda anlamlı bir artış bulunmaktadır. Laktasyon gruplarına göre, hamilelik ve laktasyon döneminde tek başına alkol ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda MDA miktarında anlamlı bir artış olduğu bulundu (Şekil 4.4.2.1.).



Şekil 4.4.2.1.: Kontrol ve deney gruplarında testiste oluşan MDA miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrilamid uygulanan gruplara göre, c:Alkol uygulanan gruplara göre, ***: p<0.001

4.4.3. Katalaz Enzimi Miktarı

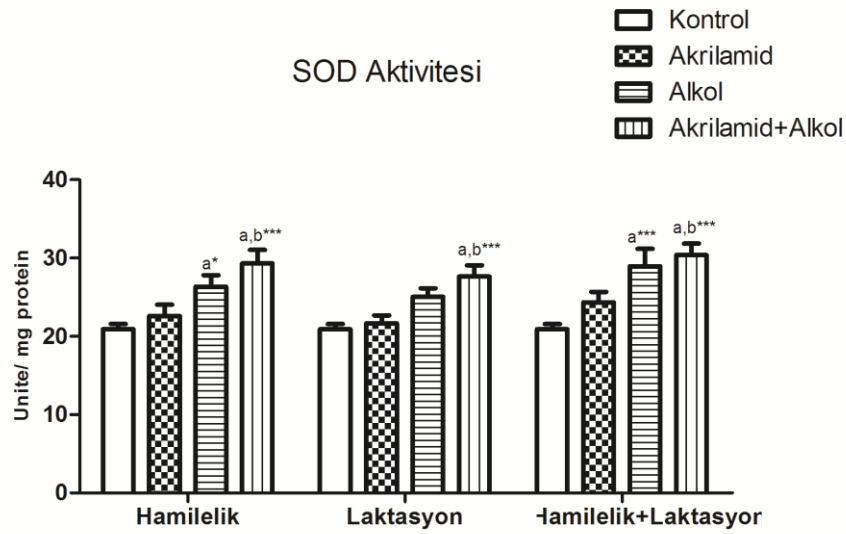
Yapılan biyokimyasal çalışmalar sonucunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak tüketilen H_2O_2 miktarına bağlı olarak hesaplanan katalaz enzimi miktarı Şekil 4.4.3.1’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre hamilelik ve laktasyon dönemi boyunca tek başına akrilamid, tek başına alkol ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda katalaz enzimi miktarında anlamlı bir azalma gözlenmektedir (Şekil 4.4.3.1.). Tüm dönemlerde akrilamid uygulanan grup, alkol uygulanan ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı grup ile karşılaştırıldığında ve tüm yapılan uygulamalar hamilelik, laktasyon ve hamilelik ve laktasyon dönemlerinde karşılaştırıldığında katalaz enzimi miktarı bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.4.3.1.: Kontrol ve deney gruplarında testisteki katalaz enzimi miktarı a: Kontrol grubuna göre, *: $p < 0.05$

4.4.4. Süperoksit Dismutaz Enzimi Miktarı

Yapılan biyokimyasal çalışmalar sonucunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan SOD enzimi miktarı Şekil 4.4.4.1’de verilmiştir. Kontrol grubuna göre akrilamidi sadece hamilelikte ve sadece laktasyonda alan grup dışında tüm deney gruplarında SOD enzimi miktarında anlamlı bir artış gözlenmektedir. Tüm dönemlerde tek başına akrilamid uygulanan gruplara (Akr-H, Akr-L, Akr-HL grupları) göre, tek başına alkol uygulanan gruplarda anlamlı bir fark gözlenmezken, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda (Akr+Al-H, Akr+Al-L, Akr+Al-HL grupları) SOD enzimi miktarında anlamlı bir artış bulunmaktadır (Şekil 4.4.4.1.). Tüm dönemlerde alkol uygulanan gruplara göre, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda SOD enzimi miktarında anlamlı bir fark görülmemektedir. Tüm dönemlerde akrilamid uygulanan grup, alkol uygulanan grup ve akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı grup ile karşılaştırıldığında ve tüm yapılan uygulamalar hamilelik, laktasyon, hamilelik ve laktasyon dönemlerinde karşılaştırıldığında SOD enzimi miktarı bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.4.4.1.: Kontrol ve deney gruplarında testisteki SOD enzimi miktarı a: Kontrol grubuna göre, b:Akrilamid uygulanan gruplara göre ***: $p < 0.001$, *: $p < 0.05$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çevreden alınan birçok toksik maddenin erkek üreme sistemi üzerine etkilerinin olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada bu toksinlerin erkek üreme sisteminde kalıcı hasara yol açtığı belirlenmiştir (Rees, 1993). Bu maddeler besinler ile birlikte alınabildiği gibi endüstriyel ürünlere bulaşarak da maruz kalınabilmektedir (Dhar ve diğ., 2010). Hamile bireyler, çevresel toksik maddelere maruz kalır ve birçok toksik madde, fetal dönemde plasentadan ve doğumdan sonra emzirme ile anneden yavruya geçebilmektedir. Ayrıca bu maddeler yavruda toksik etkiler oluşturabilmektedir (Myllynen ve diğ., 2005; Chu ve diğ., 2008). Akrilamid ve alkol, besinlerle alındığında anneden yavruya geçerek toksik etkiler oluşturabilen maddelerdir (Sokol ve diğ., 1981; Addolorato ve diğ., 1997; Friedman ve diğ., 1999; Schettgen ve diğ., 2004).

Birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan akrilamidin nörotoksik, kanserojenik ve üreme sistemi üzerinde toksik olduğu bilinmektedir (WHO, 2002). Son yıllarda karbonhidrat ve asparajin içeriği bulunan gıdaların pişirilmesi sırasında akrilamid oluştuğunun bulunması, dünyada akrilamidin risk değerlendirmesi çalışmalarının önem kazanmasına sebep olmuştur (Exon, 2006; Parzefal, 2008). Akrilamid, üreme parametreleri üzerinde sperm sayısını azaltarak, vakuolleşme ve geç spermatidlerde dejenerasyon gibi seminifer tübüllerde atrofiye ve germ hücre evrelerinde DNA kırıklarına sebep olmaktadır (Sakamoto ve diğ., 1988; Sega ve diğ., 1990). Erkek sıçanlara akrilamid uygulandığında çiftleşmede, dölleme yeteneğinde ve hamile kalma oranlarında azalma görülmektedir (Friedman ve diğ., 1999). Akrilamidin erginlerde testis ağırlığını düşürdüğü ve annenin hamilelik ve laktasyon dönemlerinde akrilamid maruziyeti sonucunda, akrilamidin yavruya geçebildiği, fetüste doğum anormalliklerinin arttığı, nöron gelişimini azalttığı, yavrunun organ ağırlıklarında azalmaya ve morfolojik değişikliklere sebep olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Dearfield ve diğ., 1995; Wise ve diğ., 1995; Friedman ve diğ., 1999; Schettgen ve diğ., 2004; Lee ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2005; Takahashi ve diğ., 2008, 2009; Ferguson ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2010; Allam ve diğ., 2011; Takahashi ve diğ., 2011).

Alkol kullanımının erkek üreme sistemi üzerine toksik etkisinin bulunduğu hem insan hem de hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir (Villalta ve diğ., 1997; Tadic ve diğ., 2000; Frias ve diğ., 2002; Jana ve diğ., 2010). Alkol, bir testis toksinidir ve erkeklerde sperm miktarında, sperm hareketliliğinde azalmaya neden olmaktadır (Maneesh ve diğ., 2005). Erkeklerde kronik alkol uygulaması testiste atrofiye, seminifer tübül çapında azalmaya, spermatogenik hücrelerin her evresinde azalmaya neden olmaktadır (Villalta ve diğ., 1997; El-Sokkary ve diğ., 1999; Emanuele ve Emanuele, 2001; Koh, 2006). Alkol kullanımı spermatogenezi engelleyerek ve germ hücrelerinde apoptoza sebep olarak üreme aktivitesini düşürmektedir (Salonen ve diğ., 1990; Zhu ve diğ., 2000; Koh, 2006). Ayrıca, alkol oksidatif stresin artmasına ve testosteron seviyesinin azalmasına bağlı olarak testiste çeşitli üreme bozukluklarına sebep olmaktadır (Emanuele diğ., 2001; Frias ve diğ., 2002). Bunların yanı sıra, alkolün anneden yavruya geçerek yavruya çeşitli anormalliklere yol açtığı bulunmuştur (Sokol ve diğ., 1981; Abel ve diğ., 1995; Rout ve diğ., 2010).

Akrilamid ve alkolün ayrı ayrı testis ağırlığı ve gonadosomatik indeks üzerine etkisi ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Salonen ve diğ., 1990; Addolorato ve diğ., 1997; Grattagliano ve diğ., 1997; Zhu ve diğ., 2000; Murillo ve diğ., 2001; Fakoya ve diğ., 2004; Onu ve diğ., 2004; Lee ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2005; Takahashi ve diğ., 2008; Onu ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2010; Allam ve diğ., 2011; Takahashi ve diğ., 2011). Takahashi ve diğerlerinin (2009) dişi sıçanlara hamileliğin 6. gününden itibaren laktasyon dönemi sonuna kadar 25, 50, 100 ve 200 ppm akrilamid uyguladıkları çalışmada, erkek yavrularda 50 ppm dozundan sonra vücut ağırlıklarının anlamlı olarak azaldığını saptamışlardır. Yapılan bir başka çalışmada dişi sıçanlara hamileliğin 7. gününden itibaren doğuma kadar ve hamileliğin 7. gününden itibaren laktasyon döneminin sonuna kadar 10 mg/kg akrilamidi oral olarak uygulamışlardır. Çalışma sonucunda hem hamilelik döneminde hem de hamilelik ve laktasyon döneminde akrilamid alan yavruların vücut ağırlıklarında azalma saptamışlardır (Allam ve diğ., 2011). Takahashi ve diğerleri 2011 yılında yaptıkları çalışmada laktasyon dönemi sonunda ve ergin dönemde erkek sıçanlara 50, 100 ve 200 ppm akrilamidi içme suyuna karıştırarak dört hafta boyunca uygulamış ve laktasyon dönemi sonunda uygulama yapılan yavru grubunda 100 ve 200 ppm dozlarında gonadosomatik indekste azalma olduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda 14 mg/kg akrilamid farelere hamileliklerinin altıncı gününden itibaren sadece hamilelik, sadece laktasyon ve hem hamilelik hem de laktasyon döneminde uygulanmıştır. Akrilamidin sadece hamilelikte ve her iki dönemde uygulandığı grupların gonadosomatik indeksinde azalma görülmesi daha önce yapılmış olan çalışmaları desteklemektedir (Takahashi ve diğ., 2009; Allam ve diğ., 2011; Takahashi ve diğ., 2011).

Alkolün hem ergin bireylerde hemde yavruda testis ağırlığını azalttığı bilinmektedir (Salonen ve diğ., 1990; Srikanth ve diğ., 1995; Fakoya ve diğ., 2004; Onu ve diğ., 2004). Hamileliğin dokuzuncu ve onikinci günleri arasında sıçanlara 5.8 g/kg alkol uygulandığı bir çalışmada, doğumda yavruların ağırlığında azalma, erginlikte ise vücut ağırlığında, testis ağırlığında ve gonadosomatik indekste azalma gözlenmiştir (Fakoya ve diğ., 2004). Onu ve diğerlerinin (2004) yaptıkları diğer bir çalışmada ise, dişi farelere hamilelik ve laktasyon boyunca %30 alkol uygulamış ve yavruları hamileliğin 1., 2. ve 3. haftası ile hamilelik ve laktasyon döneminin 4., 5. ve 6. haftasında disekte etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda hem hamilelik hem laktasyon dönemi boyunca uygulama yapılan grupta daha fazla olmak üzere tüm gruplarda testis ağırlığının azaldığı tespit edilmiştir. Onu ve diğerleri (2010) yaptıkları çalışmada, önce dişi farelere %20 alkolü hamilelik ve hem hamilelik hem de laktasyon döneminde uyguladıklarında, doğan erkek yavrularda epididimis ağırlıklarının hamilelik döneminde ve iki dönemde alkol uygulanan gruplarda azaldığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada, 2 g/kg alkol dişi farelere hamilelik, laktasyon ve her iki dönem boyunca oral olarak uygulanmıştır. Alkol uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna göre gonadosomatik indekste azalma görülmesi Fakoya ve diğerleri (2004), Onu ve diğerleri (2004 ve 2010) çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Ayrıca Onu ve diğerlerinin (2004) yaptıkları çalışmaya benzer olarak her iki dönemde alkol uygulanan gruplarda alkolün etkisinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Sonuçta alkolün uygulandığı tüm dönemlerde, akrilamid uygulanan gruplara göre daha toksik olduğu düşünülmektedir. Tek başına akrilamid ve tek başına alkol uygulanan grupların yanı sıra çalışmamızda akrilamid ve alkol birlikte hamilelik, laktasyon ve her iki dönemde birden uygulanmıştır. Akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı tüm gruplarda, akrilamid gruplarına göre gonadosomatik indekste anlamlı bir azalma görülürken, alkol uygulanan

gruplara göre sadece her iki dönemde uygulama yapılan grupta anlamlı bir azalma görülmesi, akrilamidin uzun dönem uygulandığında alkolün etkisini arttırabilecek bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir.

Akrilamidin farklı dönemlerde uygulanmasında, deney hayvanlarında testis bağ dokusunda bozukluklara, atrofik tübüllere, seminifer tübüllerde lümene atılmış spermatogenik hücrelere, spermatogenik hücrelerde vakuolleşmeye sebep olarak hasara yol açtığı bulunmuştur. (Sakamoto ve diğ., 1988; Lee ve diğ., 2005; Wang ve diğ., 2010; Yang ve diğ., 2005; Takahashi ve diğ., 2008; Takahashi ve diğ., 2011; Camacho ve diğ., 2012; Hamdy ve diğ., 2012). Wang ve diğerleri (2010) yaptıkları çalışmada, 10 mg/kg akrilamidi ergin bireylere sekiz hafta boyunca uygulamış ve germinal epitel yüksekliğinin azaldığını ve vakuolleşme olduğunu rapor etmişlerdir. Yang ve diğerlerinin (2005a) yaptıkları çalışmada 5, 10, 15, 30, 45 ve 60 mg/kg akrilamid beş gün boyunca oral olarak verilmiş ve ergin bireylerin testisinde seminifer tübüllerde multinükleer dev hücreler, spermatositlerde vakuolleşme görülürken, aynı zamanda apoptotik hücreler de tespit edilmiştir. Yang ve diğerlerinin (2005b) yaptıkları bir başka çalışmada ise, kontrol gruplarına göre 60 mg/kg akrilamid oral olarak uygulandığı gruplarda, spermatogenik hücrelerde dejenerasyon, multinükleer dev hücreler ve testis bağ dokusunda bozukluklar gözlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise, ergin sıçanlara 5, 10 ve 15 mg/kg akrilamid oral olarak sekiz hafta boyunca uygulanmış ve 5 mg/kg akrilamid uygulanan dozda spermatogonyumlarda dejenerasyon, 10 mg/kg akrilamid uygulanan dozda lümende spermatid bulunmayan tübüller ve 15 mg/kg akrilamid dozunda ise primer spermatosit evresinde kalan tübüller görülmüştür (Hamdy ve diğ., 2012).

Takahashi ve diğerlerinin (2008) yaptıkları çalışmada hamilelik ve laktasyon döneminde 100 ve 200 ppm akrilamid uygulanmış ve sonuçta testiste seminifer tübüllerde spermatogenik hücre tabakalarında azalma görülürken, epididimiste histolojik olarak fark bulunamamıştır. Yapılan başka bir çalışmada Takahashi ve diğerleri (2009) 100 ppm akrilamidi içme suyuna karıştırılarak annelere hamilelik ve laktasyon dönemleri boyunca ve doğan yavrulardan oluşan bir gruba 50 mg/kg akrilamidi intraperitonel olarak uygulandığında testiste, spermatogenezin durduğu tübüllerin olduğu gösterilmiştir. Takahashi ve diğerlerinin (2011) başka bir

çalışmasında ise, 100 ve 200 ppm akrilamidi ergenlik öncesi dönemdeki bireylere içme suyuna karıştırarak oral olarak uygulamışlardır. Bu çalışma sonucunda, ergenlik öncesi dönemde 100 ve 200 ppm akrilamid uygulanan gruplarda erken spermatidlerde bozukluklar ve azalma, spermatogenik hücrelerin atıldığı tübüller ve atrofik tübüller gözlenirken, ergin bireylerde 200 ppm akrilamid alan grupta spermatogenik hücrelerin lümene atıldığı tübüller saptanmıştır.

Çalışmamızda hamilelikte ve laktasyonda 14 mg/kg akrilamid alan erkek yavruların testislerinde multinükear dev hücrelere rastlanması Yang ve diğerlerinin çalışmalarıyla (2005a; 2005b) benzerlik gösterirken, hamilelik ve laktasyon döneminde akrilamid uygulanan grupta bağ dokuda bozukluk, atrofik tübüller ve primer spermatosit evresinde tutuklu kalan tübüller görülmesi daha önce yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Sakamoto ve diğ., 1988; Wang ve diğ., 2010; Yang ve diğ., 2005). Takahashi ve diğerlerinin (2008 ve 2009) yaptıkları çalışmalara benzer olarak çalışmamızda da akrilamidin primer spermatosit evresinde tutuklu kalan tübüllere sebep olduğu gözlenmiştir.

Alkolün ise testiste ödeme, seminifer tübüllerde atrofiye, germ hücrelerinde lümene dökülme ve vakuolleşmeye sebep olduğu bilinmektedir (Fakoya ve diğ., 2004; Onu ve diğ., 2004; Sönmez ve diğ., 2010; Çanilloğlu ve diğ., 2011). Fakoya ve diğerlerinin çalışmaları (2004) hamileliğin dokuzuncu ve on ikinci günleri arasında 5.8 g/kg alkolün uygulandığı farelerin 42 günlük yavrularının testisinde seminifer tübüllerde azalma, geniş lümenli tübüller, spermatogenezin tutuklu kaldığı tübüller, spermatogenik hücrelerde azalma ve intersitisiyal alanlarda azalma olduğu bulunmuştur. Onu ve diğerlerinin (2004) yaptığı çalışmada farelere hamilelik döneminde ve hem hamilelik hem laktasyon döneminde %30 alkol uygulanmıştır. Hamilelik sonrasında yavruların testisinde seminifer tübüllerin çapında azalma gözlenirken, hamilelik ve laktasyon dönemlerinde alkol alan yavruların testisinde ise seminifer tübül çaplarında azalma ve primer spermatosit evresinde kalan tübüller gözlenmiştir. Dişi sıçanlara hamileliğin 14. gününden itibaren doğuma kadar %30'luk alkol uygulanan başka bir çalışmada ise, doğan yavrularda testis bağ dokusunda artma, tübül çaplarında azalma ve düzensiz sıralı spermatogonyumlar ve 15 günlük yavrularda testis bağ dokuda kalınlaşma, seminifer tübüllerin çapında küçülme ile birlikte lümeni olmayan düzensiz sınırlı ve atrofik

tübüller bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışmada, 30 günlük yavruların testisinde, atrofik tübüller, lümene atılmış spermatogenik hücreler ve vakuolleşme görülmüş olup, 90 günlük bireylerin testisinde sadece spermatogonyum ve Sertoli hücrelerinden oluşan tübüller ile tübül lümenine dökülmüş hücreler görülmüştür (Çanilloğlu ve diğ., 2011).

Bu çalışmada ise hamilelik ve laktasyon döneminde 2 g/kg alkol alan gruplarda multinükleer dev hücreler ve bağ dokuda bozukluklar gözlenirken, her iki dönemde alkol uygulanan grupta primer spermatosit evresinde kalan tübüller, atrofik tübüller ve bağ dokuda bozukluk görülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda alkol alımında multinükleer dev hücrelerin oluştuğu bildirilmemesine rağmen, atrofik tübüller ve primer spermatosit evresinde kalan tübüllerin görülmesi daha önce yapılan çalışmaları desteklemektedir (Fakoya ve diğ., 2004; Onu ve diğ., 2004; Çanilloğlu ve diğ., 2011). Sonuç olarak yapılan bu çalışmada akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda, tüm dönemlerde bağ dokuda bozukluklar, atrofik tübüller ve primer spermatosit evresinde kalan tübüller gözlenmesi, primer spermatosit evresinde tutuklu kalan tübüllerin artması hem hamilelikte hem laktasyonda akrilamid ve alkol alan grupta arttığının gözlenmesi, alkolün etkisinin akrilamid tarafından artırıldığını düşündürmektedir.

Akrilamid ve alkol serumda testosteron ve diğer hormon seviyelerini etkileyerek testiste Leydig hücre sayısını azaltabilmektedir (Sakamoto ve diğ., 1988; Salonen ve diğ., 1990; Frias ve diğ., 2002; Wang ve diğ., 2010; Yang ve diğ., 2005; Camacho ve diğ., 2012; Dosumu ve diğ., 2012; Hamdy ve diğ., 2012). Akrilamidin testiste kaspaz 3 yolağını etkileyerek germ hücrelerini apoptoza götürdüğü bulunmuştur (Zhang ve diğ., 2009). Akrilamid ve alkolün sperm sayısını azalttığı ve bu etkisini spermatogenezde çeşitli evrelerdeki hücreleri azaltarak yaptığı düşünülmektedir (Villalta ve diğ., 1997; El-Sokkary ve diğ., 2001; Yang ve diğ., 2005; Wang ve diğ., 2010; Zhang ve diğ., 2010; Takahashi ve diğ., 2011; Dosumu ve diğ., 2012). Yang ve diğerlerinin (2005b) ergin sıçanlara 0.5, 15, 30, 45 ve 60 mg/kg akrilamid uyguladıkları çalışmalarında tüm dozlarda kaudal epididimisteki spermelerde ve testiste Leydig hücre miktarında azalma görülmüştür. En fazla etki 15 mg/kg akrilamid ve üzerindeki dozlarda sonra gözlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise, ergin sıçanlara 5 ve 10 mg/kg akrilamid uygulanmasında epididimiste sperm sayısında azalma ve Leydig hücre sayısında artma

görülmüştür (Wang ve diğ., 2010). Zhang ve diğerleri (2010) ergin farelere 60 gün boyunca 10 mg/kg akrilamid uyguladıkları çalışmalarında, 100 Sertoli hücresi başına düşen spermatogonyum ve geç spermatid miktarında azalma, primer ve erken spermatid miktarlarında ise kontrol grubuna göre bir fark olmadığını bulmuşlardır. Yapılan bir başka çalışmada ise, erginlik öncesi dönemde ve ergenlikte 100 ppm akrilamid uygulamasında testiste spermatidlerde DNA hasarı gözlenmiştir (Takahashi ve diğ., 2011). Camacho ve diğerleri (2012) 2, 5, 10 ve 50 mg/kg akrilamidi oral olarak 14 gün boyunca uygulanmış ve doza bağlı olarak Leydig hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir.

Bu çalışmamızda hamilelikte, laktasyonda, hamilelik ve laktasyonda 14 mg/kg akrilamid uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre spermatogonyum primer ve sekonder spermatosit, erken spermatid ve Leydig hücre sayılarında azalma görülmesi Zhang ve diğerlerinin (2010) çalışmalarına paralellik göstermektedir. Ayrıca Wang ve diğerlerinin 2010 yılındaki çalışmalarında Leydig Hücresi sayısında artma gözlemlenmesine rağmen, çalışmamızda, Camacho ve diğerlerinin (2012) ve Yang ve diğerlerinin (2005) çalışmalarına paralel olarak Leydig hücresi sayılarının azaldığı gözlenmiştir. Buna ek olarak, testiste spermatogenik hücrelerin spermatogonyum evresinde ve primer spermatosit evresinde sayılarının azaldığı bulunmuştur. Takahashi ve diğerlerinin (2011) çalışmalarında, Sertoli hücrelerinin akrilamid uygulamasından etkilenmediği söylenmesine rağmen, çalışmamızda Sertoli hücre sayısının hamilelikte ve her iki dönemde anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.

Genel olarak kronik alkol kullanımının üreme sistemini olumsuz etkilediği kabul edilmektedir. Alkolün organizmada birçok hormonal değişikliğe sebep olarak, testosteron seviyesini düşürdüğü ve kısırlığa yol açtığı bilinmektedir (Emanuelle ve Emanuelle 2001). Alkol testiste oksidatif strese sebep olarak spermatogenik hücrelerde azalmaya sebep olmaktadır (Villalta ve diğ., 1997; El-Sokkary ve diğ., 2001; Jang ve diğ., 2002). Villalta ve diğerleri (1997) ortalama 39 yaşındaki 18 ± 2 yıl boyunca günde 100-350 g alkol kullanan bireylerde, alkol kullanmayan bireylere göre sperm sayısında ve sperm hareketliliğinde azalma, anormal sperm sayısında artma tespit etmişlerdir. El-Sokkary ve diğerleri (2001) ergin sıçanlara 3 g/kg alkolü 30 gün boyunca oral olarak uygulamışlardır. Sonuç olarak testiste Sertoli hücresi, spermatogonyum, primer ve sekonder spermatosit, spermatid ve Leydig hücre sayılarında azalma saptamışlar ve

alkolün spermatogenezin tüm evrelerinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Jang ve diğerlerinin (2002) yaptıkları *in vitro* çalışmada ise, Leydig hücrelerine 50, 100, 500 mM alkol 12 saat boyunca uygulanmıştır. Çalışma sonucunda Leydig hücrelerinin canlılık oranlarında azalma, hücrelerde ovalleşme ve yüzey biçimlerinde düzensizlik gözlenmiştir. Koh ve diğerleri (2006), ergin sıçanlara 1.5 ve 3 g/kg alkolü 10 gün boyunca uygulamışlar ve alkolün testiste spermatogonyum ve primer spermatositlerin sayılarında azalmaya sebep olduğunu bulmuşlardır.

Çalışmamızda 2 g/kg alkol uygulanan tüm gruplarda testisteki tüm hücre tiplerinde azalma görülmesi El-Sokkary ve diğerlerinin (2001) çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Çalışmamızda her iki maddenin birlikte uygulandığı gruplarda spermatogenik, Leydig ve Sertoli hücre sayısında görülen azalma akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığında daha olumsuz etki edebileceğini düşündürmektedir. Fakat, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda alkol gruplarına göre spermatogonyum ve primer spermatosit evrelerindeki hücre sayılarının arasında fark bulunmamasına karşın, sekonder spermatosit ve erken spermatid miktarlarında anlamlı farkların bulunması akrilamidin özellikle sekonder spermatosit evresinden sonra hücreleri etkilediğini düşündürmektedir (Sakamoto ve diğ., 1988).

Bilindiği gibi dejenere hücre, ölmekte olan hücreleri tanımlar. Histolojik preparatlarda dejenere hücreler, düzensiz nükleus yapısı veya parçalı nüklear kromatin içermesi, sitoplazmada şişkinlik veya büzülmelerin olması, vakuolleşmelerin görülmesi ve mitokondrilerinde anormal değişikliklerin bulunması ile normal hücrelerden ayrılırlar (Rousen-Runge ve Barlow, 1953). Dejenere hücrelerin tip A spermatogonyumlardan intermediate spermatogonyumlara farklılaşırken, primer spermatositlerde zigoten evresinden pakiten evresine geçerken ve mayoz bölünme sırasında görülebildikleri gösterilmiştir (Rousen-Runge, 1973). Ergin erkek sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 90-120 günlük sıçanların testisleri alınıp, histolojik olarak incelendiğinde spermatogenik hücrelerin tamamının gözlendiği evrede dejenere hücrelerin görüldüğü bildirilmiştir (Kerr, 1992). Yang ve diğerlerinin (2005) yaptıkları çalışmada ise, 60 mg/kg akrilamid 10 gün boyunca ergin sıçanlara oral olarak uygulandığında testiste dejenere hücrelere rastlanmıştır.

Çalışmamızda da hamilelik, laktasyon ve hem hamilelik hem de laktasyon döneminde ayrı ayrı ve birlikte 14 mg/kg akrilamid ve 2 g/kg alkol alan erkek yavruların testisleri incelendiğinde dejenere hücre miktarının tüm gruplarda anlamlı olarak artması Yang ve diğerlerinin (2010) yaptıkları çalışmaya paraleldir. Eftnik ve Selvidge'nin (1982) çalışmalarında akrilamidin, alkolün biyotransformasyonunda görev alan alkol dehidrogenaz enzimlerini inhibe ettiği öne sürülmüştür ki, çalışmamızda hem akrilamid hem alkolün uygulandığı gruplarda spermatogenik hücrelerin azalması ve dejenere hücre miktarlarının artmasının sebebi olabileceğini düşündürmektedir.

Testis verimliliği ile ilgili olarak, spermatogenik hücrelerin birbirlerine göre oranının önemli bir kriter olduğu bilinmektedir. Çünkü etkilenen hücrenin bulunduğu evre, çalışılan maddelerin etkisini ortaya çıkarmada büyük önem taşır (Creasy, 2003). Gupta ve diğerleri (2007) yaptıkları çalışmalarında ergin erkek farelere 2, 4, 6 ppm sodyum florürü altı ay boyunca içme suyuna karıştırarak oral olarak uygulamışlardır. Çalışma sonucunda testis örnekleri incelendiğinde testisteki tüm hücre tiplerinde azalma tespit etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada spermatogonyumlarda doza bağlı olarak %44, %47 ve %50, sekonder spermatositlerin %49, %52 ve %59 oranlarında azalırken, erken spermatidlerin ise en yüksek dozda %72 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, ergin farelere 15 gün boyunca intraperitonel olarak 25 mg/kg doxorubicin uygulanmıştır ve çalışma sonucunda testiste tüm hücre tiplerinin sayısında azalma ve özellikle sekonder spermatositlerin oranında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Abdella ve Ahmed, 2009).

Bizim çalışmamızda ise hamilelikte, laktasyonda ve her iki dönemde 14 mg/kg akrilamid, 2 g/kg alkol ve her iki maddenin de uygulandığı deney gruplarında Gupta ve diğerlerinin (2007) ve Abdella ve Ahmed'in (2009) çalışmalarına benzer olarak sekonder spermatosit oranlarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Genel olarak bakıldığında seminifer tübül içerisinde hücrelerin spermatogonyum ve primer spermatosit evrelerinde kaldığının belirlenmesi Sakamoto ve diğerleri (1988), Takahashi ve diğerleri (2008, 2009 ve 2011), Yang ve diğerleri (2005), Onu ve diğerleri (2010), Çanilloğlu ve diğerlerinin (2011) histolojik bulguları ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda hücrelerin sekonder spermatosit ve erken spermatide farklılaşmadığı ve buna bağlı olarak spermatogenezin devam etmediği

düşünülmektedir. Ek olarak, çalışmamızda Leydig hücre sayısında gözlenen azalmanın bu duruma sebep olduğu düşünülmektedir. Akrilamid ve alkol uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, alkolün anlamlı olarak spermatogonyum ve primer spermatosit oranlarını arttırması, sekonder spermatosit ve erken spermatit oranlarının anlamlı olarak azaltması hamilelik döneminde daha etkili bir toksin olduğunu düşündürmektedir. Tek başına akrilamid ve alkol uygulanan gruplara göre akrilamid ve alkolü birlikte her iki dönemde alan grupta sekonder spermatosit ve erken spermatid oranının anlamlı olarak azalması her iki maddenin birlikte uygulandığı gruplarda akrilamidin alkolün etkisini attırdığını düşündürmektedir.

Oksidatif stres birçok biyolojik moleküle özellikle DNA'ya, proteinlere ve lipitlere zarar verebilir. Bu hasar hücrelerde reaktif oksijen türleri tarafından meydana getirilebilmektedir (Cai ve diğ., 1997). Reaktif oksijen türleri tarafından membrandaki lipitlerin okside edilmesiyle lipit peroksidasyon ürünleri oluşarak membran bütünlüğü bozulur (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Akrilamidin lipit peroksidasyonuna etkilerini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır (Yousef ve diğ., 2006; Zhang ve diğ., 2010; Allam ve diğ., 2011; Hamdy ve diğ., 2012; Zhang ve diğ., 2012). Yousef ve diğerlerinin çalışmalarında (2006), ergin sıçanlara 0.5, 5, 25, 50, 250 ve 500 µg akrilamidi 10 hafta boyunca oral olarak uygulamışlardır ve çalışma sonunda erkek bireylerin karaciğer, beyin, testis, akciğer ve böbrek örneklerini almışlardır ve lipit peroksidasyon miktarının testiste 25 µg akrilamid uygulanmasından sonra arttığı görülmüştür. Zhang ve diğerlerinin (2010) yaptıkları çalışmada ise farelere 10 mg/kg akrilamid 60 gün boyunca uygulanmıştır ve deney sonucunda epididimisteki spermelerde lipit peroksidasyonu miktarında artma görülmüştür. Allam ve diğerlerinin (2011) yaptıkları çalışmada sıçanlarda hamileliğin 7. gününden itibaren doğuma kadar ve hamileliğin 7. gününden laktasyon döneminin sonuna kadar 10 mg/kg akrilamid anneye oral olarak uygulanmış ve sonuçta gelişmekte olan beyinde lipit peroksidasyonu miktarın ve oksidatif stresin arttığı bulunmuştur. Hamdy ve diğerlerinin (2012) sıçanlara sekiz hafta boyunca 5, 10 ve 15 mg/kg akrilamid uyguladıkları çalışmalarında, plazmada oluşan lipid peroksidasyonu miktarında artış saptanmıştır. Yapılan bir başka çalışmada Zhang ve diğerleri (2012), farelere yedi ve ondört gün boyunca 50 mg/kg akrilamid intraperitonel olarak uygulamışlar ve çalışma sonucunda testiste lipit peroksidasyonu miktarında artma bulmuşlardır.

Alkolün reaktif oksijen türlerini arttırarak lipid peroksidasyonuna sebep olduğu, lipid peroksidasyon ürünlerinin miktarını arttırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Grattagliano ve diğ., 1997; Husain ve Somani, 1998; Emanuele ve Emanuele, 2001; Jurczuk ve diğ., 2004; Amanvermez ve diğ., 2005; Maneesh ve diğ., 2005; Grissa ve diğ., 2006). Grattagliano ve diğerlerinin (1997) yaptıkları çalışmada, erişkin sıçanlara 4.05 g/kg alkol sekiz hafta boyunca oral olarak verilmiş ve testiste oluşan lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunda artış tespit edilmiştir. Husain ve Somani (1998) yaptıkları çalışmada ergin erkek sıçanlara 2 g/kg alkol oral olarak 6.5 hafta boyunca uygulamışlar ve çalışma sonucunda testiste lipid peroksidasyonun arttığını bulmuşlardır. Yapılan bir başka çalışmada ergin sıçanlara 90 gün boyunca 2.5 g/kg alkol oral olarak uygulandığında, testiste, ovaryumda, böbrekte, karaciğerde lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu miktarında artma gözlenmiştir (Amanvermez ve diğ., 2005). Maneesh ve diğerlerinin 2005 yılında ergin sıçanlara 1.6 g/kg alkol oral olarak dört hafta uyguladıkları çalışmalarında testiste oluşan lipid peroksidasyonu miktarında artma görülmüştür. Grissa diğerleri (2006), sıçanlara 3 ve 5 g/kg alkolü intraperitoneal olarak 6 hafta boyunca uygulamışlardır. Alkol uygulamasında testiste lipid peroksidasyonu miktarında artma bulmuşlardır. Erişkin sıçanlara 7 g/kg alkolün oral olarak dört hafta boyunca uygulandığı bir başka çalışmada, testiste oluşan lipid peroksidasyonu miktarında artma tespit edilmiştir (Dosumu ve diğ., 2012).

Bizim çalışmamızda 14 mg/kg akrilamid ve 2 g/kg alkolün farklı dönemlerde uygulanmasında, akrilamidi hamilelik ve laktasyon döneminde alan grupta testiste oluşan lipid peroksidasyonu miktarında artma görülmesi, Yousef ve diğ., (2006), Zhang ve diğ., (2010), Camacho ve diğ., (2012), Zhang ve diğ., (2012) çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. Allam ve diğerlerinin (2011) benzer dönemlerde yaptıkları çalışmalarında beyinde sadece hamilelikte, hamilelik ve laktasyon döneminde lipid peroksidasyonu miktarının arttığı bulunmasına rağmen, çalışmamızda sadece her iki dönem akrilamid uygulanmasında lipid peroksidasyonunun arttığı gözlenmiştir. Alkol ile yapılan diğer çalışmalara benzer olarak çalışmamızda alkol uygulanan gruplarda hamilelik, laktasyon ve her iki dönemde de testiste oluşan lipid peroksidasyonu miktarında artma görülmüştür (Grattagliano ve diğ., 1997; Husain ve Somani, 1998; Jurczuk ve diğ., 2004; Amanvermez ve diğ., 2005; Maneesh ve diğ., 2005; Grissa ve

diğ., 2006). Bu bulgu bize alkolün kısa dönem uygulanmasında akrilamidten daha etkili olduğunu düşündürmektedir. Akrilamid ve alkol grupları karşılaştırıldığında lipit peroksidasyonun laktasyon döneminde fark görülmezken, diğer dönemlerde anlamlı şekilde arttığı görülmesi her iki maddenin de hamilelik döneminde daha etkili maddeler olduğunu düşündürmektedir. Akrilamid ve alkolün birlikte uygulandığı gruplarda akrilamid uygulanan ve alkol uygulanan gruplara göre dokuda oluşan lipit peroksidasyonu miktarının anlamlı şekilde arttığı bulunması her iki maddenin birlikte uygulanmasında daha toksik olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca her iki maddenin uygulandığı hamilelik dönemi ve laktasyon dönemi gruplarında dokuda oluşan lipit peroksidasyonu miktarında fark görülmezken, her iki dönemde uygulama yapılan grupta dokuda oluşan lipit peroksidasyonu miktarının anlamlı olarak artmış olması uzun dönem uygulamalarda akrilamid ve alkolün daha etkili olduğunu düşündürmektedir.

Antioksidan enzimler olan katalaz ve SOD reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında görevlidir. Katalaz, hidrojen peroksiti ortadan kaldırmada görev alan enzimlerden biridir. Katalaz genel olarak peroksizomlarda bulunur ve iki hidrojen peroksit molekülünü reaksiyona sokarak su ve O₂ oluşumunu sağlar (Cederbaum ve diğ., 2009). Akrilamidin katalaz enzimi üzerine etkilerini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır (Zhang ve diğ., 2010; Camacho ve diğ., 2012). Zhang ve diğerlerinin (2010) farelere 10 mg/kg akrilamid 60 gün boyunca oral olarak uyguladıkları çalışmalarında, katalaz miktarında fark bulunamamıştır. 2012 yılında yapılan başka bir çalışmada ise 4 ve 8 mg/kg akrilamid 60 gün boyunca suya karıştırılarak uygulanmıştır ve testiste 8 mg/kg akrilamid dozunda, katalaz gen miktarında artma görülmüştür (Camacho ve diğ., 2012).

Alkolün katalaz enzimi üzerine etkisini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Husain ve Somani, 1998; İyidoğan ve diğ., 2001; Maneesh ve diğ., 2005; Dosumu ve diğ., 2012). Husain ve Somani (1998) ergin erkek sıçanlara oral olarak 2 g/kg alkolü 6.5 hafta uyguladıkları çalışmalarında, testiste katalaz enzimi aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır. Yapılan bir başka çalışmada, ergin sıçanlara günde 2 kere olmak üzere intraperitonel olarak 3 g/kg alkol uygulamasında, testiste katalaz enzimi aktivitesinde fark bulunamamıştır (İyidoğan ve diğ., 2001). Maneesh ve diğerlerinin (2005) ergin sıçanlara 1.6 g/kg alkol oral olarak dört hafta uyguladıkları çalışmalarında testiste

katalaz enzimi aktivitelerinde azalma bulmuşlardır. Erişkin sıçanlara 7 g/kg alkolün oral olarak dört hafta boyunca uygulandığı bir başka çalışmada ise, testiste katalaz enzimi aktivitesinde artma tespit edilmiştir (Dosumu ve diğ., 2012).

Çalışmamızda sadece hamilelik, sadece laktasyon dönemleri boyunca akrilamid alkol ve her iki maddeyi alan tüm gruplarda katalaz enzimi miktarında anlamlı azalma bulunmaması Zhang ve diğerlerinin (2010) akrilamidin ile yaptıkları çalışmayla benzerlik göstermektedir. Alkolün Husain ve Somani (1998) ile Maneesh ve diğerlerinin (2005) çalışmalarında katalaz enzimi aktivitesini azalttığı gözlenmesine rağmen, bizim çalışmamızda İyidoğan ve diğerlerinin (2001) çalışmalarına benzer olarak alkol uygulanan gruplarda fark bulunmamaktadır. Ayrıca, her iki maddenin uygulandığı gruplarda ise katalaz aktivitesinde azalma görülmesi, akrilamidin alkolün etkisini arttırdığını düşündürmektedir. Ayrıca, hamilelik ve laktasyon dönemleri boyunca akrilamid, alkol ve hem akrilamid hem alkolü birlikte alan gruplarda katalaz enzim miktarında anlamlı bir azalma görülmesi, uzun dönemde bu maddelerin daha zararlı olduğunu düşündürmektedir.

SOD enzimi süperoksit radikallerinin yok edilmesi reaksiyonlarını katalizler. SOD enzimi sitoplazmada, mitokondri zarları arasında ve mitokondri matriksinde bulunmaktadır (Fridovich, 1997). Yousef ve diğerlerinin (2006), ergin sıçanlara 0.5, 5, 25, 50, 250 ve 500 µg akrilamid 10 hafta boyunca oral olarak uyguladıkları çalışmalarında erkek bireylerin karaciğer, beyin, testis, akciğer ve böbrek örneklerini almışlardır. SOD enzimi miktarının testiste 50 µg akrilamid dozundan sonra arttığı bulunmuştur. Zhang ve diğerlerinin 2010 yılında yaptıkları çalışmalarında ise, farelere 10 mg/kg akrilamid 60 gün boyunca uygulanmışlar ve deney sonucunda epididimisteki spermelerde SOD enzimi miktarında azalma görülmüştür. Allam ve diğerlerinin 2011 yılında yaptıkları çalışmada da sıçanlarda hamileliğin 7. gününden itibaren doğuma kadar ve hamileliğin 7. gününden laktasyon döneminin sonuna kadar 10 mg/kg akrilamid anneye oral olarak uygulanmıştır. Gelişmekte olan beyinde SOD enzimi miktarında azalma bulunmuştur. Yapılan bir başka çalışmada Zhang ve diğerleri (2012), farelere 7 ve 14 gün boyunca 50 mg/kg akrilamid intraperitonel olarak uygulamışlar ve çalışma sonucunda testiste SOD enzimi aktivitesinde azalma bulunmuştur. 2012 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise, 4 ve 8 mg/kg akrilamid 60 gün boyunca suya

karıştırılarak uygulanmıştır ve testiste 8 mg/kg dozunda SOD enzimi geni miktarında artma görülmüştür (Camacho ve diğ., 2012).

Kronik alkol maruziyetinde SOD aktivitesi tartışmalıdır. SOD aktivitesinin azaldığı, değişmediği ve arttığı çalışmalar bulunmaktadır ve SOD aktivitesi çalışmaya, diyetle, ve alkol kullanıma bağlı değişiklik göstermektedir (Polavarapu ve diğ., 1998). Ergin erkek sıçanlara 2 g/kg alkolün 6.5 hafta boyunca oral olarak uygulandığı bir çalışma sonucunda testiste SOD enzimi miktarının kontrol grubuna göre alkol gruplarında azaldığı gözlenmiştir (Husain ve Somani, 1998). Yapılan başka bir çalışmada Jurczuk ve diğerleri (2004), erişkin sıçanlara günde 5 g/kg alkol 12 hafta boyunca oral olarak uygulanmıştır, karaciğer ve böbrekte SOD miktarını düşürdüğü bulunmuştur. Maneesh ve diğerlerinin 2005 yılında ergin sıçanlara 1.6 g/kg alkol oral olarak dört hafta boyunca uyguladıkları çalışmalarında testiste SOD enzimi aktivitesinde azalma saptamışlardır.

Çalışmamızda 14 mg/kg akrilamid ve 2 g/kg alkolün, hamilelikte, laktasyonda ve her iki dönemde uygulandığı gruplardan, akrilamidin her iki dönemde uygulandığı grupta SOD enzim miktarının arttığı bulunmuştur. Zhang ve diğ., 2010, Allam ve diğ., 2011 ve Zhang ve diğ., 2012 yapıkları çalışmalarda SOD enzimi miktarının azaldığı görülmekteyken, bizim çalışmamızda, Yousef ve diğerlerine (2006) ve Camacho ve diğerlerine (2012) paralel olarak SOD miktarında artma görülmektedir. Alkol uygulanan gruplarda ise akrilamide benzer olarak SOD enzim aktivitesinde anlamlı olarak artma görülmüştür. Sridevi ve diğerlerinin (1998) yaptıkları çalışmada da toksik maddeler sonucu oluşan oksidatif hasar sırasında SOD enzimi miktarının artabileceğini söylemişlerdir.

Alkol metabolizmasında görevli olan alkol dehidrogenazların akrilamid tarafından inhibe edildiği düşünülmektedir (Dixit ve diğ., 1981). Alkol metabolizmasında diğer bir basamak sitokrom P450 proteinleri ile mikrozomal olarak oksitlenmesidir ve alkol tüketimi ile sitokrom P450 E1 gen miktarının arttığı bilimektedir (Liansp unsakul, 2005). Sitokrom P450 E1 aynı zamanda akrilamidin daha toksik epoksiti olan glisidamide dönüşümünde görev alır (Koop, 1992). Yaptığımız bu çalışma sonucunda akrilamid ve alkolü birlikte alan gruplarda toksik etkinin oldukça fazla görülmesinin

sebebinin alkol indüklemesi sonucu artan sitokrom Sitokrom P450 E1'in akrilamidi daha fazla glisidamide dönüştürmesi nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre, akrilamid ve alkolün gonadosomatik indeksin azalmasına, testiste patolojik değişiklikler oluşmasına, spermatogenik hücre sayısının azalmasına, dejenere hücre sayınının ve lipit peroksidasyonunun artmasına sebep olurken, hem akrilamid ve hem alkolün birlikte uygulandığı gruplarda ise bu etkinin daha fazla oluşu bulunmuştur. Akrilamid ve alkolün hamilelik ve laktasyon dönemlerinde katalaz enzim miktarını değiştirmediği her iki dönemde hem akrilamid hemde alkolün uygulandiği gruplarda ise katalaz enzim miktarının azaldiği tespit edilmiştir. SOD enzimi ise, çalışmanın tüm gruplarında testisi toksik etkiden korumaya devam etmektedir. Ayrıca, tek başına akrilamid ve alkolün hamilelik dönemi uygulamalarında, laktasyon dönemi uygulamalarına göre daha toksik olduğu ve bu toksik etkinin her iki dönem uygulamasında arttığı bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre, alkolün uygulandiği tüm dönemlerde, akrilamid uygulanan gruplara göre daha toksik olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, akrilamid ve alkolün birlikte uygulandiği tüm gruplarda ise toksik etkinin arttığı ortaya çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

- ABDELLA, E.M., AHMED, R.R., 2009, Suppression of doxorubicin apoptotic histopathologic, mutagenic and oxidative stress effects in mice bone marrow and testis tissues by aqueous rosemary leaves extract, *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 38(1-4), 35-57.
- ABEL, E. L., AND HANNIGAN, J. H., 1995, Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: Provocative and permissive influences, *Neurotoxicology and Teratology*, 17(4), 445-462.
- ADDOLORATO, G., GASBARRINI, A., MARCOCCIA, S., SIMONCINI, M., BACCARINI, P., VAGNI, G., GRIECO, A., SBRICCOLI, A., GRANATO, A., STEFANINI, G.F., GASBARRINI, G., 1997, Prenatal exposure to ethanol in rats: effects on liver energy level and antioxidant status in mothers, fetuses, and newborns, *Alcohol*, 14 (6), 569-573.
- ADLER, I.D., BAUMGARTNER, A., GONDA, H., FRIEDMAN, M.A., SKERHUT, M., 2000, 1-Aminobenzotriazole inhibits acrylamide-induced dominant lethal effects in spermatids of male mice, *Mutagenesis*, 15 (2), 133-136.
- ADLER, I.D., GONDA, H., DE ANGELIS, H., JENTSCH, I., OTTEN, I.S., SPEICHER, M.R., 2004, Heritable translocations induced by dermal exposure of male mice to acrylamide, *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1-4), 271-276.
- AKTAŞ, A., ULKAY, M.B., BOZKURT, H.H., 2008, The effects of genistein on the cockerel testis during embryonic development, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 14(2), 157-160.
- AKKUŞ, İ., 1995, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, s:1-131.
- ALLAM, A., EL-GHAREEB, A.A., ABDUL-HAMİD, M., BAİKRY, A., SABRİ, M.I., 2011, Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: Biochemical and morphological studies, *Toxicology Industrial Health*, 27(4), 291-306.
- ALVARO A., NADKA B., SARKAR D., K., 2004, Circadian Rhythms of Granzyme B, Perforin, IFN- γ , and NK Cell Cytolytic Activity in the Spleen: Effects of Chronic Ethanol, *The Journal of Immunology*, 172(5), 2811-2817.
- AMANVERMEZ, R., DEMİR, Ş., TUNÇEL, Ö.K., ALVUR, M., AGAR, E., 2005, Alcohol-induced oxidative stress and reduction in oxidation by Ascorbate/L-Cys/L-Met in the testis, ovary, kidney and lung of rat, *Advances in Therapy*, 22 (6), 548-558.
- ANDERSON, R.A., WILLIS, B.R., OSWALD, C., ZANEVELD, L.J.D., 1983, Male reproductive tract sensitivity to ethanol: A critical overview, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 18(1), 305-310.
- ANNOLA, K., KARTTUNEN, V., KESKİ-RAHKONEN, P., MYLLYNEN, P., SEGERBÄCK, D., HEINONEN, S., VÄHÄKANGAS, K., 2008, Transplacental transfer of acrylamide and glycidamide are comparable to that of antipyrine in perfused human placenta, *Toxicology Letters*, 182, 50-56.
- ANNOLA, K., KESKİ-RAHKONEN, P., VÄHÄKANGAS, K., LEHTONEN, M., 2009, Simultaneous determination of acrylamide, its metabolite glycidamide and antipyrine in human placental perfusion fluid and placental tissue by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 876 (2), 191-197.

- ATANASSOVA, N., MCKINNELL, C., WALKER, M., TURNER, K. J., FISHER, J. S., MORLEY, M., MILLAR, M. R., GROOME, N.P., SHARPE, R.M., 1999, Permanent Effects of Neonatal Estrogen Exposure in Rats on Reproductive Hormone Levels, Sertoli Cell Number, and the Efficiency of Spermatogenesis in Adulthood, *Endocrinology*, 140(11), 5364-5373.
- BECKMAN, K.B., BRUCE N.A., 1998, The Free Radical Theory of Aging Matures, *Physiological Reviews*, 78, 547–581.
- BERGMARK, E., 1997, Hemoglobin Adducts of Acrylamide and Acrylonitrile in Laboratory Workers, Smokers and Nonsmokers, *Chemical Research in Toxicology*, 10(1), 78-84.
- BERNDTSON WE., THAMSON TL., 1990, Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in sprague-dawley rats. *Journal of Andrology*, 11(5), 429-435.
- BIEDERMANN, M., NOTI, A., BIEDERMANN-BREM, S., MOZZETTI, V., GROB, K., 2003, Potential of Acrylamide Formation, Sugars, and Free Asparagine in Potatoes: A Comparison of Cultivars and Farming Systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5556-5560.
- BIELAWSKI, D.M., ABEL, E.L., 1997, Acute treatment of paternal alcohol exposure produces malformations in offspring, *Alcohol*, 14 (4), 397-401.
- BLASIÁK, J., GLOC, E., WOZNIAK, K., CZECHOWSKA, A., 2004, Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes, *Chemico-Biological Interactions*, 149(2-3), 137-149.
- BOETTCHER, M.I., SCHETTGENA, T., KÜTTINGA, B., PISCHETSRIEDERB, M., ANGERERA, J., 2005, Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1-2), 167-176.
- BONDY, S.C., 1992, Ethanol toxicity and oxidative stress, *Toxicology Letter*, 63, 231–242.
- BROWN, R., 2003, Formation, occurrence and strategies to address acrylamide in food, *FDA Food Advisory Committee Meeting on Acrylamide*.
- BUTS, JP, SOKAL, E.M., VAN HOOFF, F., 1992, Prenatal exposure to ethanol in rats: effects on postnatal maturation of the small intestine and liver, *Pediatric Research*, 32(5), 574-579.
- CAI, Q., RAHN, R.O., ZHANG, R., 1997, Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals, *Cancer Letters*, 119(1), 99-107.
- CALLEMAN, C.J., BERGMARK, E., COSTA, L.G., 1990, Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation, *Chemical Research in Toxicology*, 3 (5), 406–412.
- CAMACHO, L., LATENDRESSE, J.R., MUSKHELISHVILI, L., PATTON, R., BOWYER, J.F., THOMAS, M., DOERGE, D.R., 2012, Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats, *Toxicology Letters*, 211, 135-143.
- CEDERBAUM, A.I., DEY, A., 2006, Alcohol and oxidative liver injury, *Hepatology*, 43, 63-74.
- CEDERBAUM, A.I., LU, Y., WU, D., 2009, Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury, *Archives of Toxicology*, 83(6), 519-548.

CHAPIN, R.E., FAIL, P.A., GEORGE, THOMAS, J.D., GRIZZLE, JERROLD, B., HEINDEL, J., HARRY, G.J., COLLINS, B.J., TEAGUE, J., 1995, The Reproductive and Neural Toxicities of Acrylamide and Three Analogues in Swiss Mice, Evaluated Using the Continuous Breeding Protocol, *Toxicological Sciences*, 27(1), 9-24.

CHU, I., BOWERS, W.J., CALDWELL, D., NAKAI, J., WADE, M.G., YAGMINAS, A., LI, N., MOIR, D., ABBAS, L.E., HAKANSSON, H., GILL, S., MUELLER, R., PULIDO, O., 2008, Toxicological effects of in utero and lactational exposure of rats to a mixture of environmental contaminations detected in Canadian arctic human population, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 71 (2), 93-108.

CLAEYS, W.L., DE VLEESCHOUWER, K., HENDRICKX, M. E., 2005, Kinetics of Acrylamide Formation and Elimination during Heating of an Asparagine–Sugar Model System, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9999-10005.

CLAUS, A., CARLE, R., SCHIEBER, A., 2008, Acrylamide in cereal products: A review, *Journal of Cereal Science*, 47, 118-133.

COSTA, K.L.C., MATTA, S.L.P., GOMES, M.L.M., PAULA, T.A.R., FREITAS, K.M., CARVALHO, F.A.R., SILVERIA, J.A., DOLDER, H., MANDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C., 2011, Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield, *Animal Reproduction Science*, 127, 202-212.

CREASY, D.M., 2003, Evaluation of testicular toxicology: A synopsis and discussion of the recommendations proposed by the Society of Toxicologic Pathology, *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 68(5), 408–415.

ÇANILLIOĞLU, Y.E., ERCAN, F., 2011, *In utero* etanol uygulamasının sıçan testis morfolojisi üzerine etkisi, *Acta Academiae Universitatis Sağık Bilimleri Dergisi*, 2, 10-16.

ÇAVDAR, C., SİFİL, A., ÇAMSARI, T., 1997, Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi (Office Journal of the Turkish Nephrology)*, 3(4), 92-95.

ÇIRAK, B. İNCİ, S., PALOĞLU, S., BERTAN, V., 2003, Lipit peroxidation in cerebral tumours, *Clinica Chimica Acta*, 327 (1-2), 103-107.

DEARFIELD, K.L., DOUGLAS, G.R., EHLİNG, U.H., MOORED, M. M., SEGA, G.A., BRUSICK, D. J., 1995, Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 330(1-2), 71-99.

DEVASAGAYAM, T.P., TARACHAND, U., 1987, Decreased lipid peroxidation in the rat kidney during gestation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198, 273-80.

DHAR, P., SOMESH, M.S., KAUSHAL, P., SEHGAL, R., MEHRA, R.D., 2010, Effects of arsenic exposure during early postnatal period on Leydig cells of rat testis, *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92 (6), 1157-1168.

DİXİT, R., MUKHTAR, H., SETH, P.K., 1981, In vitro inhibition of alcohol dehydrogenase by acrylamide: interaction with enzyme-sh groups, *Toxicology Letters*, 7(6), 487-492.

DOERGE, D.R., COSTA, G.G., MCDANIEL, L.P., CHURCHWELL, M.I., TWADDLE, N.C., BELAND, F.A., 1995, DNA adducts derived from administration of acrylamide and

glycidamide to mice and rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 580(1-2), 131-141.

DOERGE, D. R., YOUNG, J. F., MCDANIEL, L. P., TWADDLE, N. C., CHURCHWELL, M. I., 2005, Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208(3), 199–209.

DOSUMU, O.O., AKINOLA, O.B., AKANG, E.N., 2012, Alcohol-induced testicular oxidative stress, 2005, Role of oxidative stress in ethanol induced germ cell apoptosis-an experimental study in rats, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20 (2), 62-67.

DÖKMECİ, İ., 2000, *Farmakoloji Temel Kavramlar*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 714-720.

DYBING, E., FARMERB, P.B., ANDERSENC, M., FENNELL, T.R., LALLJEE, S.P.D., MÜLLER, D.J.G., OLING, S., PETERSENH, B.J., SCHLATTERI, J., SCHOLZJ, G., SCIMECAK, J.A., SLIMANIL, N., TÖRNQVISTM, M., TUIJTELAARSN, S., VERGERO, P., 2005, Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food, *Food and Chemical Toxicology*, 43(3), 365-410.

EC, EUROPEAN COMMISSION, 1998, On the quality of the water intended for human consumption, *Official journal of European Communities*, L330, 21-29.

EFSA, European Food Safety Authority, 2011, Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and exposure assessment, *EFSA Journal*, 9(4), 2133.

EFTINK, M.R., SELVIDGE, L.A., 1982, Fluorescence quenching of liver alcohol dehydrogenase by acrylamide, *Biochemistry*, 21, 117-125.

EL-SOKKARY, G., REITER, R.J., TAN, D.X., KIM, S.J., CABRERA, J., 2001, Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration, *Alcohol and Alcoholism*, 34 (6), 842-850.

EMANUELE, M. A., EMANUELE, N., 2001, Alcohol and the Male Reproductive System, *Alcohol Research and Health*, 25(4), 282-287.

EMANUELE, A., 2006, Alcohol, oxidative stress and free radical damage, *Proceedings of the Nutrition Society*, 65, 278-290.

EMANUELE, N.V., LAPAGLI, N., STEINER, J., COLANTONI, A., VAN THIEL, D.H., EMANUELE, M.A., 2001, Peripubertal paternal EtOH exposure, *Endocrine*, 14(2): 213–219.

ERIKSSON, C.J.P., WIDENIUS, T.V., YLIKAHRI, R.H., HÄRKONEN, M., LEINONEN, P., 1983, Inhibition of testosterone biosynthesis by ethanol, *Biochemical Journal*, 210, 29-36.

EXON, J.H., 2006, A review of the toxicology of acrylamide, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 9, 397-412.

FAKOYA, F.A., CAXTON-MARTINS, E.A., 2004, Morphological alterations in the seminiferous tubules of adult Wistar rats: the effects of prenatal ethanol exposure, *Folia Morphologica*, 63 (2), 195-202.

FENNELL, T.R., SUMNER, S. C.J., SNYDER, R.W., BURGESS, J., SPICER, R., BRIDSON, W.E., FRIEDMAN, M.A., 2004, Metabolism and Hemoglobin Adduct Formation of Acrylamide in Humans, *Toxicological Sciences*, 85(1), 447-459.

FAO/WHO, 2005, Joint FAO/WHO expert committee on food Additives: Summary and conclusions report from sixty-fourth meeting, Rome, 8-17 February, JECFA:64.

FERGUSON, S.A., GAREY, J., SMITH, M.E., TWADDLE, N.C., DOERGE, D.R., PAULE, M.G., 2010, Prewaning behaviors, developmental landmarks, and acrylamide and glycidamide levels after pre- and postnatal acrylamide treatment in rats, *Neurotoxicology and Teratology*, 32, 373-382.

FRIAS, J., TORRES, J.M., MIRANDA, M.T., RUIZ, E., ORTEGA, E., 2002, Effects of acute alcohol intoxication on pituitary-gonadal axis hormones, pituitary-adrenal axis hormones, β -endorphin and prolactin in human adults of both sexes, *Alcohol and Alcoholism*, 37 (2), 169-173.

FRIEDMAN, M.A., TYL, R.W., MARR, M.C., MYERS, C.B., GERLING, F.S., ROSS, W.P., 1999, Effects of lactational administration of acrylamide on rat dams and offspring, *Reproductive Toxicology*, 13, 511-520.

FRÍDOVÍCH, I., 1997, Superoxide Anion Radical ($O_2^{\cdot -}$), Superoxide Dismutases, and Related Matters, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 18515-18517.

FRÍEDMAN, M., 2003, Chemistry, Biochemistry and Safety of Acrylamide. A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4504-4526.

FRÍEDMAN, M., MONTTRAM, D., S., 2004, *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, American Chemical Society Meeting in Anaheim, California, Springer Science-Business Media.

FRÍEDMAN, M.A., TYL, R.W., MARR, M.C., MYERS, C.B., GERLING, F.S., ROSS, W.P., 1999, Effects of lactational administration of acrylamide on rat dams and offsprings., *Reproductive Toxicology*, 13, 511-520.

GENEROSO, W.M., SEGA, G.A., LOCKHART, A.M., HUGHES, L.A., CAIN, K.T., CACHEIRO, N.L.A., SHELBY, M.D., 1996, Dominant lethal mutations, heritable translocations, and unscheduled DNA synthesis induced in male mouse germ cells by glycidamide, a metabolite of acrylamide, *Mutation Research*, 371, 175-183.

GHANAYEM, B.I., MCDANIEL, L.P., CHURCHWELL, M.I., TWADDLE, N.C., SNYDER, R., FENNELL, T.R., DOERGE, D.R., 2005, Role of CYP2E1 in the Epoxidation of Acrylamide to Glycidamide and Formation of DNA and Hemoglobin Adducts, *Toxicological Sciences*, 88(2), 311-318.

GOEDDE, H.W., AGARWAL, D.P., 1992, Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism, *Pharmacogenetics and Genomics*, 2(2), 47-89.

GRATTAGLIANO, I., VENDEMIALE, G., ERRICO, F., BOLOGNINO, E., LILLO, F., SALERNO, M.T., ALTOMARE, E., 1997, Chronic ethanol intake induces oxidative alterations in rat testis, *Journal of Applied Toxicology*, 17 (5), 307-311.

GRISSA, A.K., MORNAGUI, B., AOUANI, E., HAMMAMI, M., GHARBI, N., KAMOUN, A., EL-FAZAA, S., 2006, Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats, *Alcohol and Alcoholism*, 41(3), 236-239.

GUPTA, R.S., KHAN, T.I., AGRAWAL, D., KACHHAWA, J.B.S., 2007, The toxic effects of sodium fluoride on the reproductive system of male rats, *Toxicology Industrial Health*, 23(9), 507-513.

HAGMAR, L., TÖRNQVIST, M., NORDANDER, C., ROSÉN, I., BRUZE, M., KAUTIAINEN, A., MAGNUSSON, A.L., MALMBERG, B., APREA, P., GRANATH F.,

- AXMON, A., 2001, Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose, *Scandinavian Journal of Work*, 27(4), 219-226.
- HAIDER, S.G., HOFMANN, N., PASSIA, D., 1985, Morphological and Enzyme Histochemical Observations on Alcohol induced Disturbances in Testis of two Patients, *Andrologia*, 17(6), 532-540.
- HALLIWELL, B., 1991, Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease, *The American Journal of the Medical Sciences*, 91, 14-21.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1990, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- HAMDY, S.M., BAKEER, H.M., ESKANDER, E.F., SAYED, O.N., 2012, Effect of acrylamide on some hormones and endocrine tissues in male rats, *Human and Experimental Toxicology*, 31 (5), 483-491.
- HUMASON, G.L., 1972, *Animal tissue techniques*, H.W. Freeman and Company, San Fransisco, 0-7167-0692.
- HUSAIN, K., SCOTT, B.R., REDDY, S.K., SOMANI, S.M., 2001, Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defence system, *Alcohol*, 25, 89-97.
- HUSAIN, K., SOMANI, S.M., 1998, Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on testicular antioxidant system in rat, *Journal of Applied Toxicology*, 18, 421-429.
- IKEDA, G.J., MILLER, E., SAPIENZA, P.P., MICHEL, T.C., KING, M.T., SAGER, A.O., 1985, Maternal-foetal distribution studies in late pregnancy. II. Distribution of [^{14}C]acrylamide in tissues of beagle dogs and miniature pigs, *Food and Chemical Toxicology*, 23(8), 757-761.
- IKEDA, M., KODAMA, H., FUKUDA, J., SHIMIZU, Y., MURATA, M., KUMAGAI, J., TANAKA, T., 1999, Role of Radical Oxygen Species in Rat Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Heat Stress, *Biology of Reproduction*, 61(2), 393-399.
- İLTER, T., TEKİN, F., 2005, Alkol Metabolizması, *Güncel Gastroenteroloji*, 9(1), 58-62.
- İYİDOĞAN, Y.Ö., GÜRDÖL, F., ÖNER, P., 2001, The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes, *Pharmacological Research*, 44 (2), 87-93.
- IARC, İnternational Agency for Research on Cancer, 1994, *Acrylamide*, Lyon, France.
- JANA, K., JANA, N., DE, D.K., GUHA, S.K., 2010, Ethanol induces mouse spermatogenic cell apoptosis in vivo through over-expression of Fas/Fas-L, p53, and Caspase-3 along with cytochrome c translocation and glutathione depletion, *Molecular Reproduction and Development*, 77, 820-833.
- JANG, M.H., SHIN, M.C., SHIN, H.S., KIM, K.H., PARK, H.J., KIM, E.H., KIM, C.J., 2002, Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via bax-dependent caspase-3 activation, *European Journal of Pharmacology*, 449, 39-45.
- JUNKO, S., KAZUO, H., 1986, Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice effects on fertility and sperm morphology., *Archives of Toxicology* 59, 201-205.

JUNQUEIRA, L.C., CARNIERO, J., KELLEY, R.O., 1992, *Basic Histology: Text & Atlas*, Appleton & Lange Press, Norwalk, 407-422.

JURCZUK, M., BRZÓSKA, M.M., MONIUSZKO-JAKONIUK, J., GALAZYN-SIDORCZUK, M., KULIKOWSKA-KARPIŃSKA, E., 2004, Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol, *Food and Chemical Toxicology*, 42(3), 429-438.

KAYAALP, S. O., *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Revize 12 Baskı, Pelikan Kitabevi, Ankara, 2009.

KARAGÖZ, A., 2009, Akrilamid ve Gıdalarda Bulunuşu (Acylamide and its Presence in Foods), *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 8(2), 187-192.

KERR, J.B., 1992, Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle, *Journal of Reproduction and Fertility*, 95, 825-830.

KIERSENBAUM, A.L., 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Özkan Matbaacılık Gazetecilik San. Tic. Lts. Şti., Ankara, 0-323-01639-1, 418-434.

KIM, J. H., KIM, H. J., NOH, H.S., ROH, G.S., KANG, S.S., CHO, G.J., PARK, S.K., LEE, B. J., CHOIA, W.S., 2003, Suppression by ethanol of male reproductive activity, *Brain Research* 989(1), 91-98.

KIENZLE, E., RANZ, D., THIELEN, C., JEZUSSEK, M., SCHIEBERLE, P., 2005, Carry over (transfer) of feed-borne acrylamide into eggs, muscle, serum, and faeces – a pilot study with Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*), *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 89(3-6), 65-237.

KNOBIL, E., NEILL, J.D., 2006, *Physiology Of Reproduction*, Third Edition, Academic Press, 0125154011, 769- 1267.

KOH, P.O., 2006, Ethanol exposure suppresses survival kinases activation in adult rat testes, *Journal of Veterinary Medical Science*, 69 (1), 21-24.

KOOP, D., 1992, Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1, *The FASEB Journal*, 2, 724-730.

LÄHDETIE, J., SUUTARI, A., SJÖBLOM T., 1994, The spermatid micronucleus test with the dissection technique detects the germ cell mutagenicity of acrylamide in rat meiotic cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 309(2), 255-262.

LEBLOND, C. P., CLERMONT, Y., 1952, Definition Of The Stages Of The Cycle Of The Seminiferous Epithelium In The Rat, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55, 548-571.

LEE, K.Y., SHIBUTANI, M., KUROIWA, K., TAKAGI, H., INOUE, K., NISHIKIWA, H., MIKI, T., HIROSE, M., 2005, Chemoprevention of acrylamide toxicity by antioxidative agents in rats- effective suppression of testicular toxicity by phenylethyl isothiocyanate, *Archives Toxicology*, 79, 531-541.

LEHNING, E.J., BALABAN, C.D., ROSS, J.F., LOPACHIN, R.M., 2003, Acrylamide Neuropathy: II. Spatiotemporal Characteristics of Nerve Cell Damage in Brainstem and Spinal Cord, *NeuroToxicology*, 24(1), 109-123.

- LIANGPUNSAKUL, S., KOLWANKAR, D., GORSKI, C.J., HALL, S.D., CHALASANI, N., 2005, Activity of CYP2E1 and CYP3A enzymes in adult with moderate alcohol consumption: a comparison with nonalcoholics. *Hepatology*, 41, 1144-1150.
- LİNGNERT, H., GRİVAS, S., JÄGERSTAD, M., SKOG, K., TÖRNQVİST, M., AMAN, P., 2002, Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods, *Scandinavian Journal of Nutritio*, 46, 159–172.
- LOPACHIN, R.M., 2004, The Changing View of Acrylamide Neurotoxicity, *NeuroToxicology*, 25(4), 617–630.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1953, Protein measurement with folin phenol reagent, *Journal Of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- MANEESH, M., JAYALAKSHMI, H., DUTTA, S., CHAKRABARTI, A., VASUDEVAN, D.M., 2005, Experimental therapeutic intervention with ascorbic acid in ethanol induced testicular injuries in rats, *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(4), 422-426.
- MARKLUND, S. VE MARKLUND, G., 1974, Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *European Journal of Biochemistry*, 47, 469-474.
- MENDELSON, J.H. MELLO, N.K., ELLİGNBEE, J., 1976, Effects of acute alcohol intake on pituitary- gonadal hormones in normal human males, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 202, 676-682.
- MILLER, M.G., MULHOLLAND, D.J., VOGL, A.W., 1999, Rat Testis Motor Proteins Associated with Spermatid Translocation (Dynein) and Spermatid Flagella (Kinesin-II), *Biology of Reproduction*, 60(4), 1047-1056.
- MORISSEAU, C., HAMMOCK, D., 2005, EPOXIDE HYDROLASES: Mechanisms, Inhibitor Designs, and Biological Roles, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 311-333.
- MOTTRAM, D.S., WEDZİCHA, B.L., DODSON, A.T., 2002, Food chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature*, 419, 448-449.
- MUCCI, L.A., DİCKMAN, P.W., STEİNECK, G., ADAMI H.O., AUGUSTSSON, K., 2003, Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: Absence of an association in a population-based study in Sweden, *British Journal of Cancer*, 88, 84–89.
- MURİLLO, L., ARTİLLO, F.R., CARREAS O., 2001, Effects of maternal chronic alcohol administration in the rat: lactation performance and pup's growth, *European Journal Of Nutrition*, 40, 147-154.
- MYLLYNEN, P., PASONEN, M., PELKONEN, O., 2005, Human Placenta: a Human Organ For Developmental Toxicology, *Placenta*, 26, 361-371
- OBE, G., RISTOW, H., 1979, Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 65(4), 229–259.
- ONU, J.E., EZEASOR, D.N., IHAMELANDU, E.C., 2004, Morphological analysis of mouse testes following gestational and lactational alcohol exposure, *Nigerian Veterinary Journal*, 23 (2), 15-22.

- ONU, J.E., EZEASOR, D.N., IHAMELANDU, E.C., 2010, Effect of maternal alcohol consumption on epididymal growth in neonatal mice, *Nigerian Veterinary Journal*, 31 (4), 279-282.
- OSZTOVICS, M., SZASZOVSKY, E., 1978, Maternal alcohol consumption and birth weight, *British Medical Journal*, 125, 1365-1366
- ÖTLEŞ, S., ÖTLEŞ S., 2004, Acrylamide in food: chemical structure of acrylamide, *Agricultural and Food Chemistry*, 3(5), 1–8.
- PABST, K., MATHAR, W., PALAVİNSKAS, R., MEİSELA, H., BLÜTHGEN A., KLAFFKE, H., 2005, Acrylamide—occurrence in mixed concentrate feed for dairy cows and carry-over into milk, *Food Additives and Contaminants*, 22(3), 210-213.
- PALOMA, C., ENRIQUE, C., JAVIER, D.C., 2004, Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer, *Cancer Causes Control*, 15, 707-719.
- PANTER, G.H., THOMPSON, R.S., SUMPTER, J.P., 1998, Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone, *Aquatic Toxicology*, 42(4), 243–253.
- PARZEFALL, W., 2008, Minireview on the toxicity of dietary acrylamide, *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1360-1364.
- POLAVARAPU, R., SPITZ, D.R., SİM, J.E., FOLLANSBEE, M.H., OBERLEY, L.W., RAHEMTULLA, A., NANJİ, A.A., 1998, Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil, *Hepatology*, 27(5), 1317–1323.
- REES, T.R., The toxicology of male reproduction, 1993, *Applied Toxicology*, 19, 160-182.
- RILEY, E.P., INFANTE, M.A., WARREN, K.R., 2011, Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview, *Neuropsychology Review*, 21(2), 73-80.
- RİCHMOND P, BORROW R., 2003. Acrylamide in food, *The Lancet* 361(2): 361-362.
- ROOSEN-RUNGE, E.C. ve BARLOW, F.D., 1953, Quantitative studies on human spermatogenesis. I. Spermatogonia, *Am J Anat*, 93 (2), 143-169.
- ROOSEN-RUNGE, E.C., 1973, Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis, *Journal of Reproduction and Fertility*, 35, 339-348.
- ROUT, U.K., DHOSSCHE, J.M., 2010, Liquid-Diet with Alcohol Alters Maternal, Fetal and Placental Weights and the Expression of Molecules Involved in Integrin Signaling in the Fetal Cerebral Cortex, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 4023-4036.
- RUSSELL, L.D., ETTLİN, R.A., SİNHA HİKİM, A.P., CLEGG, E.D., 1990, *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, First Edition, Cache River Press, ISBN: 0962742201.
- SADLER, T.W., LANGMAN, J., 2000, *Langman's Medical Embryology*, Eighth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 0683306502.

- SAKAMOTO, J., KUOSAKA, Y., HASHIMOTO, K., 1988, Histological changes of acrylamide- induce testicular legions in mice, *Experimental and Molecular Pathology*, 48, 324-334
- SALONEN, I., HUHTANIEMI, I., 1990, Effects of chronic ethanol diet on pituitary-testicular function of the rat, *Biology of Reproduction*, 42, 55-62.
- SARADHA, B., MATHUR, P.P., 2006, Effects of envorimental contaminants on male reproduction, *Envorimental Toxicology and Pharmacology*, 21(1), 34-41.
- SCHETTGEN, T., KUTTING, B., HORNIG, M., BECKMANN, M.W., WEISS, T., DREXLER, H., ANGERER, J., 2004, Trans-placental exposure of neonates to acrylamide- a pilot study, *International Archives of Occupational and Environmental*, 77, 213-216.
- SCOTT, R.B., REDDY, K.S., HUSAIN, K., SCHLORFF, E.C., 2000, Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung and kidney in rat, *Pathophysiology*, 7, 25-32.
- SEGA, G. A., GENEROSO, E.E., BRIMER, P.A., MALLING, H.V., 1990, Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled dna synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16(3), 137-142.
- SICKLES, D. W., PEARSON, J. K., BEALL, A., TESTINO, A., 1994, Toxic axonal degeneration occurs independent of neurofilament accumulation, *Journal of Neuroscience Research*, 39(3), 347-354.
- SICKLES, D.W., SPERRY, A.O., TESTINO, A., FRIEDMAN, M., 2007, Acrylamide effects on kinesin-related proteins of the mitotic/meiotic spindle, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(1), 111-121.
- SINHA, A.K., 1972, Colorimetric assay of catalase, *Analytical Biochemistry*, 47, 389-394.
- SICKLES, D.W., STONE, J.D., FRIEDMAN, M.A., 2002, Fast Axonal Transport: A Site of Acrylamide Neurotoxicity?, *NeuroToxicology*, 23(2), 223-251.
- SOKOL, R.J., 1981, Alcohol and abnormal outcomes of pregnancy, *Canadian Medical Association*, 125(2), 143-148.
- SOLOMON, B., RAVINDRANATH, N., DALAL, R., DJAKIEW, D., DYM, M., 1997, Loss of telomerase activity during during male germ cell differentiation, *Endocrinology*, 138, 4026-4029.
- SORGEL, F., WEISSENBACHER, R., KINZIG-SCHIPPERS, M., HOFMANN, A., ILLAUER, M., SKOTT, A., LANDERSDORFER, C., 2002, Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans, *Chemotherapy*, 48, 267-274.
- SÖNMEZ, M.F., AKKUŞ, D., SELVİ, F., BALCIOĞLU, E., 2010, Melatonin ve C vitamini'nin kronik alkolik sıçanların testis dokusundaki hasar ve eNOS immunaktivitesi üzerine etkileri, *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 19 (1), 1-11.
- SPERRY A.O., ZHAO, L.P., 1996, Kinesin-related proteins in the mammalian testes: candidate motors for meiosis and morphogenesis, *Molecular Biology of the Cell*, 7(2), 289-305.

- SRIKANTH, V., BALASUBRAMANIAN, K., GOVINDARAJULU, P., 1995, Effects of ethanol treatment on leydig cellular NADPH-Generating enzymes and lipid profiles, *Endocrine Journal*, 42 (5), 705-712.
- SRĪDEVĪ, B., REDDY, K.V., REDDY, S. L. N., 1998, Effect of Trivalent and Hexavalent Chromium on Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in a Freshwater Field Crab, *Barytelphusa guerini*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(3), 384-390.
- STADLER, R.H., BLANK, I., VARGA, N., ROBERT, F., HAU, J., GUY, P.A., ROBERT, M.C., RĪEDĪKER, S., 2002, Acrylamide from Maillard Reaction Products., *Nature*, 419, 449-450.
- SUMNER, S.C.J., MACNEELA, J.P., FENNELL, T.R., 1992, Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylamide in rats and mice using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chemical Research in Toxicology*, 5(1), 81-89.
- SUMNER, S.C.J., WILLIAMS, C.C., SNYDER, R.W., KROL, W.L., ASGHARIAN, B., FENNELL, T.R., 2003, Acrylamide: A Comparison of Metabolism and Hemoglobin Adducts in Rodents following Dermal, Intraperitoneal, Oral, or Inhalation Exposure, *Toxicological Science*, 75, 260–270.
- TADIC, S.D., ELM, M.S., SUBBOTIN, V.M., EAGON, P.K., 2000, Hypogonadism precedes liver feminization in chronic alcohol-fed male rats, *Hepatology*, 31, 1135-1140.
- TAKAHASHI, M., INOUE, K., KOYAMA, N., YOSHIDA, M., IRIE, K., MORIKAWA, T., SHIBUTANI, M., HONMA, M., NISHIKAWA, A., 2011, Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity, *Archives Toxicology*, 85, 1109-1120.
- TAKAHASHI, M., SHIBUTANI, M., INOUE, K., FUJIMOTO, H., HIROSE, M., NISHIKAWA, A., 2008, Pathological assessment of the nervous and male reproductive systems of rat offspring exposed maternally to acrylamide during the gestation and lactation periods- a preliminary study, *The Journal of Toxicological Sciences*, 33 (1), 11-24.
- TAKAHASHI, M., SHIBUTANI, M., NAKAHIGASHI, J., SAKAGUCHI, N., INOUE, K., MORIKAWA, T., YOSHIDA, M., NISHIKAWA, A., 2009, Limited lactation transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods, *Archives of Toxicology*, 83, 785-793.
- TAREKE, E., RYDBERG, P.K., ERIKSSON, S., TORNQVIST, M., 2000, Acrylamide: A cooking carcinogen?, *Chemical research in toxicology*, 13, 517-522.
- TAREKE, E., RYDBERG, P.K., ERIKSSON, S., TORNQVIST, M., 2002, Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4998- 5006.
- TRITSCHER, A.M., 2004, Human health risk assessment of processing-related compounds in food, *Toxicology Letters*, 149(1–3), 177–186.
- UDANI, M., PARKER, S., GAVATER, J., VAN THIEL, D.H., 1985, Effects of in Utero Exposure to Alcohol upon Male Rats, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 9(4), 355–359.
- USEPA (US Environmental Protection Agency), 1985, Health and Environmental Effects Profile for Acrylamide, Office of Research and Development, Washington, USA.

- VATTEM, D., A., SHETTY, K., 2003, Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(3), 331–338.
- VILLALTA, J., BALLESCA, J.L., NICOLAS, J.M., MARTINEZ de OSABA, M.J., ANTUNEZ, E., PIMENTAL, C., 1997, Testicular function in asymptomatic chronic alcoholics: relations to ethanol intake, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21 (1), 128-133.
- VINCI, R.M., METSDAGH, F., MEULENAER, B.D., 2012, Acrylamide formation in fried potato products- Present and future, acritical review on migration strategies, *Food Chemistry*, 133, 1138-1154.
- VURAL, N., 2005, *Tokiskoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, ISBN: 975-482-289-1.
- WALCZAK, C.E., MITCHISON, T.J., DESAI, A., 1996, XKCM1: A Xenopus Kinesin-Related Protein That Regulates Microtubule Dynamics during Mitotic Spindle Assembly, *Cell*, 84(1), 37-47.
- WANG, H., HUANG, P., LIE, T., LI, J., HUTZ, R.J., LI, K., SHI, F., 2010, Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats, *Reproductive Toxicology*, 29, 225-230.
- WENZL, T., BEATRÍZ M, ANKLAM E., 2003, Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review, *Food Additives and Contaminants*, 20(10), 885–902.
- WHO (World Health Organization), 2002, Health implications of acrylamide in food, Report of a joint FAO/WHO consultation, WHO, Geneva, Switzerland, 22-27.
- WILSON, M.E., HANDA, R.J., 1997, Gonadotropin secretion in infantile rats exposed to ethanol in utero, *Alcohol*, 14(5), 497-501.
- WILDE, T., MEULENAER, B., MESTDAGH, F., GOVAERT, Y., VANDEBURIE, S., OOGHE, W., FRASELLE, S., DEMEULEMEESTER, K., VAN PETEGHEM, C., CALUS, A., DEGROODT, J., VERH, R., 2005, Influence of Storage Practices on Acrylamide Formation during Potato Frying, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6550-6557.
- WISE, L.D., GORDON, L. R., SOPER, K.A., DUCHAI, D.M., MORRISSEY, R.E., 1995, Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dawley rats, *Neurotoxicology and Teratology*, 17(2), 189–198.
- WREFORD, NG., 1995, Theory and practice of stereological techniques applied to the estimation of cell number and nuclear volume in the testis, *Microscopy Research and Technique*, 32, 423-436.
- YANG, H.J., LEE, S.H., JIN, Y., CHOI, J.H., HAN, C.H., LEE, M.H., 2005, Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats, *Veterinary Science*, 6 (2), 103-109.
- YANG, H.J., LEE, S.H., JIN, Y., CHOI, J.H., HAN, D.U., CHAE, C., LEE, M.H., HAN, C.H., 2005, Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile, *Reproductive Toxicology*, 19, 527-534.
- YANG, J.Y., ZHANG, Y.F., LIANG, A.M., KONG, X.F., LI, Y.X., MA, K.W., JING, A.H., FENG, S.Y., QIAO, X.L., 2010, Toxic effects of T-2 toxin on reproductive system in male mice, *Toxicology and Industrial Health*, 26 (1), 25-31.

- YILDIZ, O., ŞAHİN, H., KARA, M., ALİYAZICIOĞLU, R., TARHAN, Ö., KOLAYLI, S., 2010, Maillard Reaksiyonları ve Reaksiyon Ürünlerinin Gıdalardaki Önemi, *Akademik Gıda (Academic Food Journal)*, 8(6), 44-51.
- YOUSEF, M.I., EL-DEMERDASH, F.M., 2006, Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats, *Toxicology*, 219, 133-141.
- ZHANG, Y., CHEN, J., ZHANG, X., WU, X., ZHANG, Y., 2007, Addition of Antioxidant of Bamboo Leaves (AOB) Effectively Reduces Acrylamide Formation in Potato Crisps and French Fries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2), 523-528.
- ZHANG, Y., ZHANG, Y., 2007, Study on reduction of acrylamide in fried bread sticks by addition of antioxidant of bamboo leaves and extract of green tea, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16 (1), 131-136.
- ZHANG, J.X., YUE, W.B., REN, Y.S., ZHANG, C.X., 2010, Enhanced fat consumption potentiates acrylamide-induced oxidative stress in epididymis and epididymal sperm and effect spermatogenesis in mice, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20 (2), 75-81.
- ZHANG, L., ZHANG, H., MIAO, Y., WU, S., YE, H., YUAN, Y., 2012, Protective effect of allicin against acrylamide-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3306-3312.
- ZHANG, X., CHEN, F., HUANG, Z., 2009, Apoptosis induced by acrylamide is suppressed in a 21.5% fat diet through caspase-3-independent pathway in mice testis, *Toxicology of Mechanism and Methods*, 19 (3), 219-224.
- ZHU, Q., MEISINGER N., EMANUELE, N.V., EMANUELE, M.A., LAPAGLIA, N., THIEL, D.V.H., 2000, Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24 (10), 1550-1556.
- ZHU, Q., THIEL, D.H.V., GAVALER, J.S., 1997, Effects of ethanol on rat Sertoli cell function: studies in vitro and in vivo, *Clinical and Experimental Research*, 21 (8), 1409-1417.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Bulgaristan'ın Kırcaali şehrinde doğdum. İlk öğrenimime Reşat Tardu İlköğretim Okulu'nda başladım ve Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Lise öğrenimimi 2001-2004 yılları arasında Sefaköy Lisesinde tamamladıktan sonra, 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım ve 2009 yılında mezun oldum. 2010 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Anabilimdalı Zooloji Programında Yüksek Lisans öğrenimine başladım.