



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HAMİLELİKTE VE LAKTASYONDA AKRİLAMİD VE
ASKORBİK ASİT UYGULANAN FARELERİN ERKEK
YAVRULARININ TESTİS GELİŞİMİ**

F. Esra YAZICIOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Melike ERKAN

Haziran, 2013

İSTANBUL

Bu çalışma 28/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Melike ERKAN
İstanbul Üniversitesi



Prof. Dr. Tülay İREZ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi



Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM
İstanbul Üniversitesi



Y. Doç. Dr. Meliha İNCELİ
İstanbul Üniversitesi



Y. Doç. Dr. Mehmet Rıfki TOPÇUL
İstanbul Üniversitesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 7502 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, günlük beslenme alışkanlıklarımız nedeniyle, besinler aracılığıyla alınan akrilamid ve askorbik asidin, anneden erkek yavrularına plasenta ve anne sütü ile geçerek yavruların testislerinde oluşturdukları etkilerin, histolojik ve biyokimyasal incelemelerle ortaya çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

Lisans ve Lisansüstü öğrenimim sırasında bilgisi, deneyimi ve sabrıyla bana destek olan danışman hocam Prof. Dr. Melike ERKAN' a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca desteğiyle yanımda olan çalışma arkadaşım Araş. Gör. Dr. Yasemin TUNALI AYUN' a teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'de deney hayvanlarının bakımında ve deney süresince madde uygulanmasında yardımcı olan bütün görevlilere, başta Gökhan ORUÇ olmak üzere teşekkür ederim.

İlk öğretmenim annem Handan İŞLEREL'e, yaratıcı fikir ve yaklaşımlarıyla lisans ve lisansüstü öğrenimim boyunca yanımda olan can yoldaşım Özgür GÜLTEKİN' e ve tezin bilgisayarda düzenlenmesinde yardımına koşan arkadaşım Nurdan AŞAR' a teşekkür ederim.

Haziran, 2013

F. Esra YAZICIOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. TESTİS	3
2.2. AKRİLAMİD	7
2.3. OKSİDATİF HASAR.....	12
2.4. ASKORBİK ASİT	15
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	18
3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI VE UYGULAMA	18
3.2. GONADOSOMATİK İNDEKSİN HESAPLANMASI.....	20
3.3. HİSTOLOJİK VE HİSTOMETRİK YÖNTEMLER	21
3.4. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER.....	21
3.4.1. Total Protein Miktarının Belirlenmesi	21
3.4.1.1. Kullanılan Çözeltiler	22
3.4.1.2. Uygulama	22
3.4.1.3. Hesaplama.....	22
3.4.2. Membran Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	22
3.4.2.1. Kullanılan Çözeltiler	23
3.4.2.2. Uygulama	23
3.4.2.3. Hesaplama.....	23
3.4.3. Katalaz Miktarının Belirlenmesi	24
3.4.3.1. Kullanılan Çözeltiler	24

3.4.3.2. Uygulama	24
3.4.3.3. Hesaplama.....	24
3.5. İSTATİKSEL ANALİZ	25
4. BULGULAR	26
4.1. GONADOSOMATİK İNDEKS	26
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	27
4.3. HİSTOMETRİK BULGULAR	31
4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	37
4.4.1. Total Protein Miktarı.....	37
4.4.2. Lipit Peroksidasyonu	38
4.4.3. Katalaz Miktarı	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	40
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Farede Spermatogenezin Evreleri	6
Şekil 2.2: Akrilamid Metabolizması.....	12
Şekil 2.3: Reaktif Oksijen Türleri, Oksidatif Hasar ve Antioksidanlar.	15
Şekil 2.4: Askorbik Asit L ve D İzomerleri.....	16
Şekil 2.5: Askorbik Asidin Redoks Durumları.....	16
Şekil 4.1.1: Kontrol ve Deney Gruplarında Gonadosomatik İndeks.	26
Şekil 4.2.1: Kontrol ve Hamilelik Dönemi Deney Gruplarının Testis Kesitleri.....	28
Şekil 4.3.1: Kontrol ve Deney Gruplarında mm ² 'de Spermatogonyum Miktarı.....	32
Şekil 4.3.4: Kontrol ve Deney gruplarında mm ² 'de Erken Spermatid Miktarı.	34
Şekil 4.3.5: Kontrol ve Deney Gruplarında mm ² 'de Sertoli Hücresi Miktarı.	34
Şekil 4.3.6: Kontrol ve Deney Gruplarında mm ² 'de Leydig Hücre Miktarı.	35
Şekil 4.3.7: Kontrol ve Deney Gruplarında mm ² 'de Dejenere Hücre Miktarı.	35
Şekil 4.3.8: Kontrol ve Deney Gruplarında Testis Verimliliği.....	36

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Kontrol ve Deney Grupları.	20
Tablo 3.2: Total Protein Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Örnek ve Kör Tüplerinin İçeriği.	22
Tablo 3.3: Membran Lipit Peroksidasyonu Miktarının Belirlenmesi için Hazırlanan Örnek ve Kör Tüplerinin İçeriği.	23
Tablo 3.4: Katalaz Miktarı Belirlenmesi İçin Hazırlanan Örnek ve Kör Tüplerinin İçeriği.	24
Tablo 4.1: Kontrol ve Deney Gruplarında % Spermatogenik Hücre Oranı.	36

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
BSA	: Sığır Serum Albumini
CAT	: Katalaz
CYP2E1	: Sitokrom P450 E1
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
LH	: Luteinleştirici Hormon
MDA	: Malondealdehit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
-NH₂	: Amino Grubu
RNA	: Ribonükleik Asit
-SH	: Tiyoil Grubu
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyoarbütirik asit
TCA	: Triklorasetik asit
UV	: Ultraviyole Işın

Kısaltmalar	Açıklama
AA	: Askorbik Asit Grubu
Akr	: Akrilamid Grubu
Akr+AA	: Akrilamid ve Askorbik Asit Grubu
EPA	: Environmental Protection Agency
FAO	: Food and Agriculture Organization

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAMİLELİKTE VE LAKTASYONDA AKRİLAMİD VE ASKORBİK ASİT UYGULANAN FARELERİN ERKEK YAVRULARININ TESTİS GELİŞİMİ

F. Esra YAZICIOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Melike ERKAN

Bu çalışma, hamilelik ve laktasyon dönemleri süresince oral olarak akrilamid uygulamasıyla erkek yavrularda oluşan oksidatif hasarın testis gelişimi üzerine etkisini ve ayrıca askorbik asitin bu hasara karşı iyileştirici etkisinin olup olmadığını açığa çıkarmak amacıyla yapılmıştır. Endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan akrilamidin son yıllarda yüksek sıcaklıklarda pişirilen gıdalarda kendiliğinden oluştuğu bulunmuştur. Besinlerle alınan akrilamidin insan ve hayvan sağlığı üzerine nörotoksik ve kanserojenik etkileri bulunmaktadır. Bununla beraber erkek üreme sisteminde görülen toksik etkilerinden dolayı akrilamidin infertiliteye neden olabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda testiste ve epididimiste görülen toksisitenin oksidatif hasara bağlı olabileceği gözlenmiştir. Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin önlenmesi veya etkisinin en aza indirilmesi için yeterli miktarda antioksidan tüketilmelidir. Askorbik asit, kuvvetli indirgeyici özelliği nedeniyle güçlü bir antioksidandır. Askorbik asit, süperoksit (O_2^-) ve hidroksil ($OH\cdot$) radikalleri ile tepkimeye girerek oksijen radikallerinin etkilerinden ve oksidatif hasardan hücreyi korur. Bazı memeli türleri (primatlar, yarasalar, guinea pigler) askorbik asit sentezleyemezken; fareler, karaciğerlerinde askorbik asit sentezler. Sentezleyemeyen türler için askorbik asit esansiyel bir antioksidandır. Sentezlendiği türlere askorbik asidin eksojen olarak uygulandığında oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin olup olmadığı ilgi çeken araştırma konularındandır.

Çalışmamızda dişi farelere, gebeliklerinin altıncı gününden başlayarak laktasyon dönemlerinin sonuna kadar günlük 14 mg/kg akrilamid ve/veya 1,5 g/kg askorbik asit gavaj yoluyla uygulandı. Akrilamid uygulanan farelerin yavrularında vücut ağırlığı ve gonadosomatik indekste azalma bulundu. Ayrıca yavruların testis dokularında, multinuklear dev hücreler, dejenere hücreler, atrofik seminifer tübülleri gözlemlendi. Primer spermatosit evresinde olgunlaşmanın tutuklu kaldığı seminifer tübüllere rastlandı. Histometrik incelemelerde spermatogenik hücreler ile Sertoli ve Leydig hücrelerinin miktarlarında azalma görüldü. Hücre sayısındaki azalmanın, en fazla sekonder spermatosit ve erken spermatidlerde olduğu belirlendi. Bununla birlikte akrilamid uygulamasından sonra testis dokusunda lipit peroksidasyonunda artış görülürken, katalaz aktivitesinde değişiklik görülmedi. Akrilamide ek olarak askorbik asit uygulanan gruplarda ise akrilamid uygulanan gruplara göre, spermatogenik hücre, Sertoli ve Leydig hücreleri miktarları ile lipit peroksidasyonu ve katalaz aktivitesinde değişim görülmedi. Elde edilen sonuçlar, hamilelik döneminin laktasyon dönemine göre akrilamidin zararlı etkilerine daha duyarlı olduğunu ve her iki dönemde birden uygulama ile zararlı etkilerin arttığını göstermektedir. Bununla birlikte testis dokusunda akrilamidin zararlı etkilerine karşı askorbik asidin iyileştirici etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Haziran 2013, 78 Sayfa.

Anahtar kelimeler: Akrilamid, askorbik asit, hamilelik, laktasyon, testis

SUMMARY

M. Sc. THESIS

TESTİCULAR DEVELOPMENT OF MALE OFFSPRINGS EXPOSED TO ACRYLAMIDE AND ASCORBIC ACID IN THE GESTATION AND LACTATION

F. Esra YAZICIOĞLU

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Biology Department

Supervisor : Prof. Dr. Melike ERKAN

This work was conducted to reveal the potential oxidative damage of acrylamide on testicular development in male mice offsprings by oral administration during gestation and lactation periods and if there is any protective effect of ascorbic acid on this damage. In the recent years, it has been found that acrylamide which is commonly used in the industrial sector, is formed in the food products that have been cooked at high temperatures. Dietary acrylamide has neurotoxic and cancerogenic effects on human and animal health. In addition, it has been shown that it may cause infertility due to its toxic effect on the male reproduction system. In those studies it has been shown that the toxicity in the testis and epididymis might be due to the oxidative damage. Enough amounts of antioxidants must be consumed for prevention or to minimize the effect of oxidative stress that is caused by free radicals. Ascorbic acid is a powerful antioxidant by its strong reducing property. Ascorbic acid prevents cell from the effects of oxygen radicals and oxydative damage by reacting with superoxide and hydroxyl radicals. Mice synthesis ascorbic acid in their livers while some species of mammals (primates, bats, guinea pigs) synthesis. Ascorbic acid is an essential antioxidant for species which can't

synthesis. Species that synthesis ascorbic acid whether the protective effect against oxidative damage exogenously applied is one of research topics of interest.

In our study, female mice were daily exposed to 14 mg/kg acrylamide and/or 1.5 g/kg ascorbic acid by oral gavage from the six day of gestation to the postnatal day 21. It was found that the weight and gonadosomatic index of offsprings of mice exposed to acrylamide decreased. Besides, multinuclear giant cells, degenerative cells, atrophic seminifer tubules were seen. And also seminifer tubules that maturation arrested at primer spermatosit stage in offsprings testis tissue was observed. In the histometric investigation, a decrease in the amounts of spermatogenic cells, Sertoli and Leydig cells were observed. Maximum decrease was determined in the secondary spermatocytes and early spermatides. While the amount of lipid peroxidation increased after the expose to acrylamide, the activity of catalase did not change. On the other hand, no change in the amounts of spermatogenic cells, Sertoli and Leydig cells and also lipid peroxidation, catalase activity after the expose to acrylamide determined for the specimens by orally gavaged combined with ascorbic acid. The results show that the gestation period is more susceptible to the adverse effects of acrylamide than the lactation period and exposition to acrylamide in both periods further increases the adverse effects. However, ascorbic acid has no the protective effect against the harmful effects of acrylamide in testicular tissue.

June 2013, 78 Page.

Keywords: Acrylamide, ascorbic acid, gestation, lactation, testis

1. GİRİŞ

Akrilamid, günlük yaşantımızda kullandığımız birçok ürünün içeriğinde bulunmaktadır. Ayrıca karbonhidrat içerikli gıdalara yüksek ısıl işlem uygulanmasıyla oluşan akrilamide beslenme alışkanlıklarımız nedeniyle sürekli olarak maruz kalınmaktadır (Friedman ve diğ., 2003). Akrilamidin genotoksik, nörotoksik, kanserojenik ve mutajenik etkilerinin yanı sıra üreme ve gelişim üzerine de olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (Takahashi ve diğ., 2008). Akrilamid uygulanan erkek bireylerde çiftleşme alışkanlığının değiştiği; testis ve epididimis ağırlıklarının azaldığı, testis doku bütünlüğünün bozulduğu gözlenmiştir. Akrilamid, sperm sayısı, canlılığı ve hareketini etkilemektedir (Junko ve diğ., 1986). Ayrıca seminifer tübül hücrelerinde apoptozu uyatarak, serum testosteron seviyesini ve Leydig hücrelerinin canlılığını düşürerek spermatogenezi olumsuz etkilemektedir. 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). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda testiste ve epididimiste görülen toksisitenin başlıca nedeninin oksidatif stres olduğu düşünülmektedir (Yousef ve diğ., 2006).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin önlenmesi ve etkisinin en aza indirilmesi için yeterli miktarda antioksidan tüketilmelidir. Güçlü bir antioksidan olan askorbik asit, indirgeyici etkisiyle serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırır ve radikallerin sebep oldukları hasarı önler (Botelho ve diğ., 2009).

Yapılan literatür çalışmalarında, akrilamidin hamilelik ve laktasyon dönemlerinde uygulanması sonucunda erkek yavrularda birçok olumsuz etkiye yol açtığına dair çalışmalara rastlanmıştır (Sakamoto ve diğ., 1986; Sublet ve diğ., 1989; Sega ve diğ., 1990; Dearfield ve diğ., 1995; Friedman ve diğ., 1999; Tyl ve diğ., 2000; Takahashi ve diğ., 2008, 2009, 2011; Ma ve diğ., 2011). Ayrıca askorbik asidin üreme sistemi üzerine etkilerine dair çalışmalar bulunmaktadır (Frohberg ve diğ., 1973; Allave ve diğ., 1976; Norkus ve diğ., 1981; Zalani ve diğ., 1989; McDowell, 1989; Dawson ve diğ., 1990; Luck ve diğ., 1995; Baydas ve diğ., 2002).

Bu çalışmada, hamilelik ve laktasyon dönemlerinde akrilamid ve askorbik asit uygulanan dişi farelerin erkek yavrularının testislerinde, akrilamidin meydana getirdiği hasar ve eksojen askorbik asidin bu hasara karşı etkisi incelendi. Tezin "Genel Kısımlar" bölümünde, testis, akrilamid, oksidatif hasar ve askorbik asit ayrıntılı olarak anlatıldı.

Tezin "Malzeme ve Yöntem" bölümünde yapılan deney ve deney sonucunda alınan örneklerin hangi yöntemler kullanılarak incelendiği ayrıntılı olarak açıklandı. Elde edilen verilere tezin "Bulgular" bölümünde yer verildi.

Tezin "Tartışma ve Sonuç" bölümünde elde edilen bulgular değerlendirilerek var olan literatür bilgisi ile yorumlanıp sonuca varıldı.

Bu alışma, dişi farelere hamilelik ve/veya laktasyon dönemleri süresince akrilamid ve eksojen askorbik asidin ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonucunda erkek yavruların testislerinde meydana gelen hasarın ve bu hasara karşı askorbik asidin etkisinin ortaya çıkarılması amacıyla yapıldı.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. TESTİS

Haploid erkek eşey hücrelerinin (sperm) üretildiği ve erkek cinsiyet hormonlarının (androjenler) sentezlenerek salgılandığı testisler; spermin çiftleşme organı olan penise taşındığı kanallar (epididimis, vas deferens, ejakülator kanal), seminal sıvıyı üreterek spermin iletim ve beslenmesinde etkili olan yardımcı bezler (seminal vesikül, prostat bezi ve bulboüretral bez) ve penis, erkek üreme sistemini oluşturur (Junqueira ve diğ., 2003; Kierszenbaum, 2006).

Testisler, dıştan içe doğru sırasıyla, karın boşluğunun dışında bulunan, deriyle kaplı bir cep olan skrotum, peritondan kökenlenen ve skrotumun içini döşeyen tunika vajinalis, yoğun bağ dokudan oluşan ve testis kapsülü olarak da bilinen tunika albugina ve içine kan damarlarının gömülü olduğu gevşek bağ dokudan oluşan tunika vasküloza ile çevrelenir (Johnson, 1991). Tunika albugina, testisin testis içi kanallar ağı olan rete testis bölgesinde kalınlaşarak mediastinum adını alır. Mediastinum, testisin içine doğru uzanan fibröz septumlarla testis dokusunu 250-300 lobüle ayırır. Lobüller pramidal bölmeler olup birbirleriyle ilişkilidir. Her lobülde kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücrelerini) içeren gevşek bağ doku ile sarılı 1-4 seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller, başlangıçta kör uçlu, kıvrımlı, yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğunda yapılardır (Junqueira ve diğ., 2003).

Seminifer tübüller, fibroblastlar ve miyoid hücrelerin bulunduğu fibröz bir bağ doku kılıfı (tunika propriya), belirgin bir bazal lamina ve özelleşmiş seminifer epitelden oluşur. Seminifer epitel, 4-8 tabaka olarak seminifer tübülün bazal membranından lümenine kadar düzenlenen spermatogenik hücreler (spermatogonyum, spermatosit, spermatid) ile bu hücrelere destek somatik hücreler olan Sertoli hücrelerinden meydana gelir (Gartner ve diğ., 2003).

Bazal membranın tabanında bulunan ve germ kök hücreleri olan spermatogonyumların bölünmeler geçirerek farklılaşması ile oluşan hücreler, bazal membrandan gittikçe daha da uzaklaşarak lümeneye doğru yaklaşır. Böylece herbir hücre tipi, seminifer tübülün belli bir katmanında bulunur (Siu ve Cheng, 2004). Sertoli hücreleri, seminifer tübül duvarından lümeneye kadar yayılır ve tüm spermatogenik hücrelerle hücre-hücre teması vardır (Dym ve diğ., 1970). Ardışık Sertoli hücreleri arasında bulunan tıkaçıcı bağlantılar (okludens bağlantıları) kan-testis bariyerini oluşturarak seminifer epiteli, bazal ve adluminal kompartman olarak ikiye ayırır. Spermatogonyumlar ve genç spermatositler (leptoten, zigoten) bazal kompartmanda yer alırken, olgun spermatositler (pakiten) ve spermatidler, adluminal kompartmanda bulunur (Bellve ve diğ., 1977; Kopera ve diğ., 2010).

Diploid hücreler olan spermatogonyumlar, aktif olarak mitoz bölünmelerin görüldüğü intermediate spermatogonyumlar ve Tip B spermatogonyumlar ile rezerv hücreleri olan Tip A spermatogonyumlardan oluşur. Seminifer epitelin kök hücreleri olan Tip A spermatogonyumlar, oval heterokromatik çekirdekli hücrelerdir. Hücre döngüsünün G₀ fazında bulunurlar. Ancak mitoz bölünmeyle ökromatik çekirdekli intermediate spermatogonyumları verebilecek potansiyele sahiptirler. Intermediate spermatogonyumların mitoz bölünmesiyle oluşan Tip B spermatogonyumlar, mitoz bölünmeyle primer spermatositleri oluştururlar. Tip B spermatogonyumda, çekirdek zarı altında yoğunlaşmış kromatin ile belirgin bir nukleoluslu küresel çekirdek, hücrenin merkezinde konumlanır (Rooij, 1998; McLean ve diğ., 2003).

Tip A spermatogonyumların bölünmeleriyle ortaya çıkan hücreler, bu hücrelerden biri Tip B spermatogonyuma farklılaşana kadar ayrı kalırlar. Bundan sonra, Tip B spermatogonyumların bölünmesiyle oluşan hücreler, tamamen birbirlerinden ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı olarak bulunurlar. Hücreler arasındaki köprüler, aynı spermatogonyumdan oluşan primer, sekonder spermatositler ve spermatidler arasındaki ilişkiyi sağlar. Bu köprüler, hücreden hücreye bilgi aktarımına olanak tanıyarak spermatogenezde önemli bir rol oynar. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazmanın ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak atılmasıyla olgun spermatidler arasında bir ayrılma olur (Ehmckel ve diğ., 2006).

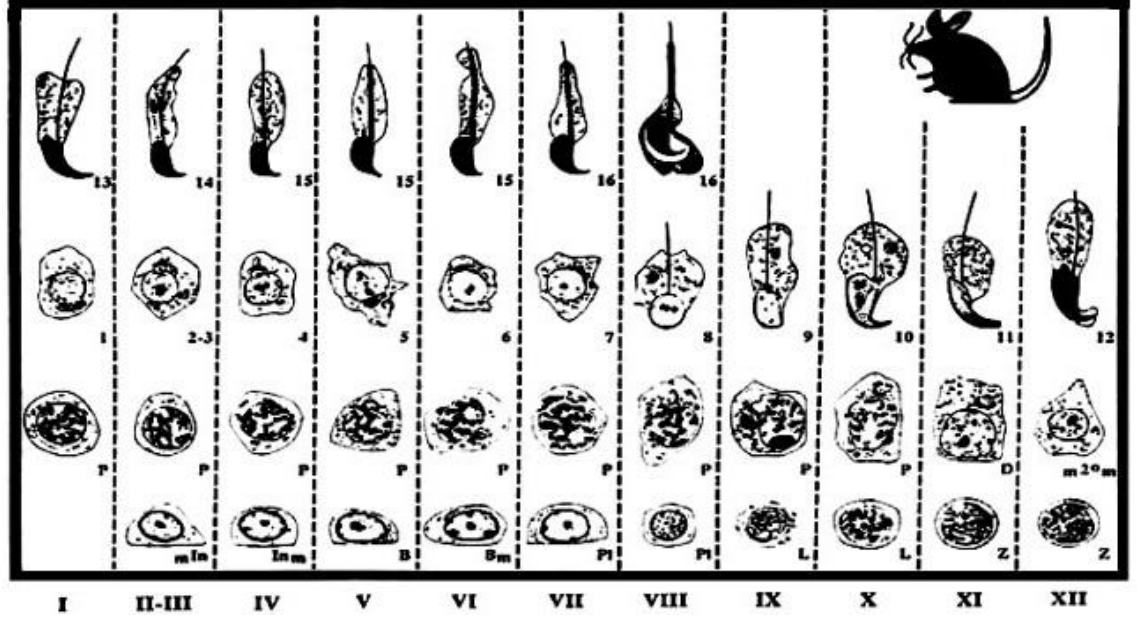
Seminifer epitelin en büyük ve belirgin spermatogenik hücreleri olan primer spermatositler, spermatogonyumlara göre iki kat DNA miktarına (4C DNA) sahiptirler. Bir primer spermatosit, birinci mayoz bölünmeyle iki adet sekonder spermatosit oluşturur. Haploid hücreler olan sekonder spermatositlerden her biri ise ikinci mayoz bölünme sonucunda herhangi bir hücre bölünmesi görülmeyen ve sperm şeklinde olgunlaşacak olan iki adet spermatid verir.

Yoğunlaşmış kromatin bölgeleri ile ayırt edilebilen, küçük hücreler olan spermatidler, Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içine gömülü olarak adluminal kompartmanın seminifer tübül lümenine yakın olan bölgesinde bulunur. Spermatidler, spermiyogenez adı verilen hücre farklılaşması evresini (golgi evresi, akrozom evresi, olgunlaşma evresi) geçirerek serbest spermatozoonları oluştururlar (Grootegoed ve diğ., 2000).

Farelerde spermatogonyumdan spermatozoona kadar olan gelişim, spermatogonyal evreler 8 gün, mayoz 13 gün ve spermiyogenez 13,5 gün olmak üzere toplam 34,5 gün sürer (Gilbert, 2010).

Spermatogenezin sürdürülmesi, düzenlenmesi ve desteklenmesinde işlevsel olan Sertoli hücreleri, bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin belirgin nukleolus ve az miktarda heterokromatin içeren, oluklu çekirdekleri bulunur (Junqueira ve diğ., 2003). Sertoli hücreleri, spermiyogenez sonunda spermatidlerin attığı fazla hücre kısımlarını (rezidual cisimcikleri) fagosit eder; olgun spermatidlerin seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırır; seminifer tübül lümenine protein ve iyonlarca zengin bir sıvı salgılar (Griswold, 1998). Ayrıca folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarılarına yanıt olarak androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezler ve salgılar. ABP, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sentez ve salgılanmasında işlevsel olduğu inhibin ve aktivin aracılığıyla Sertoli hücreleri, FSH salınımını düzenler (Walker ve Cheng, 2005).

İntersitisiyel hücreler olan Leydig hücreleri, lüteinleştirici hormon (LH) uyarılarına yanıt olarak testosteron sentezleyip salgılayan, yuvarlak ya da poligonal şekilli, merkezi konumlu çekirdeği olan ve sitoplazmasında lipid damlacıkları bulunan hücrelerdir (Tsuruhara ve diğ., 1977; Ewing ve diğ., 1981; Junqueira ve diğ., 2003).



Şekil 0.1: Farede Spermatogenezin Evreleri (Russell ve diğ., 1990).

2.2. AKRİLAMİD

Christian Moureau tarafından 1893 yılında tanımlanan akrilamidin CAS numarası: 79-06-1 ve adlandırması: 2-propenamiddir (Becalski ve diğ., 2003). Etilen karboksamid, propenoik asit amid, akrilik amid ve vinil amid, sinonim isimleriyle de bilinir. Molekül ağırlığı, 71.08 g/mol olan akrilamid, oda sıcaklığında beyaz renkli kristaller halinde bulunur; suda ve polar organik çözücülerde (metanol, etanol, aseton gibi) iyi çözünen ancak polar olmayan çözücülerde çok az çözünen bir monomerdur. Hem zayıf asidik hem de zayıf bazik özellik gösterir (Friedman, 2003).

Akrilamid, içerdiği elektrofilik çift bağ ve amid grubu ile kimyasal tepkimelere katılır. Çift bağ ile amonyak, aminler, alkoller gibi nükleofilik maddelerle Michael tipi katılma reaksiyonları verir. Ayrıca Diels-Alder tepkimelerine ve serbest radikallerle çeşitli tepkimelere girer. Amid grubu ise hidroliz, dehidrasyon ve aldehitlerle kondensasyon tepkimeleri verir. Akrilamid, elektrofilik özelliği nedeniyle biyomoleküllerin yapısında bulunan -SH ve -NH₂ gibi nükleofilik gruplarla tepkimelere girebilir. Akrilamid, erime derecesinin altındaki sıcaklıklarda ya da ultraviyole ışık altında polimerleşme tepkimesi başlatarak ve hidrofilik polimerler oluşturur (Lingnert ve diğ., 2002).

Monomerik formu araştırma laboratuvarlarında elektroforez jellerin hazırlanmasında; tünel, kanalizasyon, baraj gibi su geçirmezliğin önemli olduğu yapıların inşasında kullanılan akrilamidin polimerik formu, su arıtma, kağıt üretimi, tekstil, kozmetik, maden cevheri ve ham yağ işlenmesi gibi birçok farklı endüstriyel alanda kullanılır (Smith ve diğ., 1997).

Yaygın endüstriyel kullanımı nedeniyle doğrudan dermal ve aerosol yollarla mesleki maruziyeti bulunur (Marsh ve diğ., 1999; Wu ve diğ., 2010). Ayrıca sigara kullanımı ile aerosol olarak alınır (Parzefall, 2008). Su arıtılmasında istenmeyen maddelerin filtre edilmesinde kullanılan akrilamid, yeraltı ve yüzey sularında bulunduğu için içme suyuyla oral olarak alınır (Besaratnia ve Pfeifer, 2007). Isıl işlem gören gıdalardaki varlığı, 2002 yılında İsveç Ulusal Gıda Komisyonu'nun yaptığı çalışmalarla gösterilmiştir (Stadler ve Scholz, 2004).

Besinlerin doğal yapılarında bulunmayan akrilamid, karbonhidratlar ile proteinlerin yüksek sıcaklıklarda, enzimatik olmayan esmerleşme tepkimesi olarak bilinen, Maillard

tepkimesi vermesi sonucunda oluşur (Wilde ve diğ., 2005; Gökmen ve Şenyuva, 2007). Maillard tepkimesinin temel katılımcıları, indirgen şekerler olan glukoz ve fruktoz ile tahıl ürünlerindeki en önemli aminoasit olan asparajindir (Stadler ve diğ., 2004; Svensson ve diğ., 2003). Fruktozun akrilamid oluşumunda en etkin şeker olduğu (Biedermann ve diğ., 2002) ve fruktozu etkinlik olarak sırasıyla glukoz ve sukrozun izlediği gösterilmiştir (Claeys ve diğ., 2005). Yapılan çalışmalar sonucunda Maillard tepkimesinin ürünü olarak oluşan akrilamid miktarında, aminoasit çeşidinin de etkili olduğu belirlenmiştir. Glukoz ile tepkimeye veren farklı aminoasitlerden biri olan asparajinin en fazla akrilamid oluşturan aminoasit olduğu; glutamin ve aspartik asidin iz miktarda; glisin, sistein, metiyoninin ise saptanabilir miktarın altında akrilamid oluşturduğu belirtilmiştir (Svensson ve diğ., 2003).

Besinlerde Maillard tepkimesiyle akrilamid oluşumunda, besinin içerdiği indirgeyici şeker, aminoasit çeşit ve miktarlarıyla birlikte besinin gördüğü ısı işlemin türü (kızartma, ızgara, v.b.) ve süresi; ortamın pH değeri ve su içeriğinin de önemli etkenler olduğu bilinmektedir (Claeys ve diğ., 2005). Zengin karbonhidrat içeren besinlerin 120 °C üzeri ısı işlem görmesiyle, özellikle kızartılması ve fırınlanmasıyla doğal olarak (kendiliğinden) oluşan akrilamid, beslenme alışkanlıklarımız nedeniyle her yaş grubunun her öğünde tükettiği besinlerde bulunmaktadır (Tareke ve diğ., 2000; 2002). Evde hazırlanan ya da endüstriyel olarak üretilen besinlerde, kızartma ve fırınlama yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Besin içeriklerinde akrilamid belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar, gerek ana öğünlerle gerekse atıştırmalık olarak tüketilen ürünlerle alınan akrilamid miktarlarını ortaya koymaktadır (Tareke ve diğ., 2002; Konings ve diğ., 2003). Özellikle tahıl ve patates ürünlerinin yüksek miktarda akrilamid içerdiği belirlenmiştir (WHO, 2004).

Yapılan çeşitli çalışmalarla akrilamidin düşük molekül ağırlığı ve yüksek çözünürlüğü nedeniyle hızlı ve yaygın bir şekilde kana emilerek dokulara dağıldığı gösterilmiştir (EPA, 2010). Ayrıca akrilamid plasentadan kolayca geçebilmekte ve anne sütünde bulunmaktadır (Sörgel ve diğ., 2002). Akrilamidin farelere intraperitoneal, oral gavaj 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

(Döerge ve diğ., 2005). Akrilamidin dermal absorpsiyonun belirlenmesi amacıyla gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada deri üzerine uygulanan %50'lik akrilamid çözeltisinin 24 saat içinde absorpsiyonunun %26 olduğu görülmüştür (Fennell ve Friedman, 2005). Sıçanlarda yapılan bir başka dermal absorpsiyon çalışmasında ise %21-30 absorpsiyon belirlenmiştir (Sumner ve diğ., 2003). Sıçanlarda akrilamide inhalasyon yoluyla maruz bırakılma sonucunda en yüksek dağılımın kanda sonra sırasıyla deri, testis ve karaciğerde bulunduğunu bildirmişlerdir (Sumner ve diğ., 2003). Ayrıca Carlson ve Weaver'in (1985) çalışmalarında oral akrilamid uygulamasının sonucu olarak dokulardaki akrilamid miktarını incelediklerinde absorpsiyonun en çok karaciğerde ve testislerde olduğunu saptamışlardır.

Ikeda ve diğerleri (1983) hamile hayvanlarla (sıçan, tavşan, köpek ve domuz) yaptıkları çalışmalarında akrilamidin genel olarak fetüste ve organlarda dağılımında, türlere göre anlamlı bir farklılık olmadığını belirlemişlerdir. Marlowe ve diğerleri (1986) hamile farelere oral olarak akrilamid uyguladıkları çalışmalarının sonucunda hem annede hem de fetüste benzer akrilamid dağılımı belirlemişler, fetüse dağılımın hızlı ve yaygın olduğu görmüşlerdir. Akrilamid içeren gıdalarla beslenen annelerde, plasenta ve anne sütü aracılığıyla bebeğe akrilamid geçişi olduğu saptanmıştır (Sörgel ve diğ., 2002). Ayrıca Schettgen ve diğerleri (2004) çalışmalarının sonucunda akrilamidin yavrular üzerindeki maternal etkisinin sigara kullanan annelerin yavrularında kullanmayanlarınkine göre daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Kienzle ve diğerleri (2005) ile Pabst ve diğerleri (2005) inekleri ve besi kuşlarını akrilamid içeren yemle besledikleri çalışmalarının sonucunda ineklerin sütlerinde ve besi kuşlarının yumurtalarında akrilamid varlığı belirlemişlerdir.

Akrilamidin genel olarak iki farklı yolla metabolize edildiği bilinmektedir. Bu yollardan biri, beyinde ve karaciğerde glutatyon-S-transferaz enzimi ile katalizlenen glutatyon konjugasyonu sonucunda N-asetil-S (3 amino-3-oksipropil) sistein metabolitinin oluşmasıdır (Fennell ve diğ., 2005). Diğer metabolik yol ise akrilamidin CYP 2E1 aracılığı ile oksidasyon tepkimesine girerek epoksiti olan glisidamide dönüşmesidir (Calleman ve diğ., 1996). Glisidamidin akrilamide göre daha reaktif olduğu; hemoglobin ve DNA ile daha fazla etkileştiği bilinmektedir (Paulsson ve diğ., 2002). Oral olarak alınan akrilamid, mideden yüksek verimle kana emilerek, karaciğer, böbrek

ve pankreas tarafından elimine edilmekte ve plasentaya geçmektedir (Marlowe ve diğ., 1986). Shipp ve diğerlerinin (2006) ¹⁴C ile işaretli akrilamidi oral, dermal, inhalasyon yolu ile uyguladıkları çalışmalarında, akrilamidin %40-70 oranında idrar, %5-6 oranında feçes, %6 oranında solunum, %15 oranında safra ile atıldığı tespit etmişlerdir.

Akrilamidin çevresel bir kirletici olarak çeşitli canlılar üzerinde önemli etkileri vardır. Bu etkilerin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Starostina ve diğerlerinin (1983) çalışmalarında akrilamidin *Escherichia coli* ve *Pseudomonas putida* populasyonlarının canlılığını azalttığı belirlenmiştir.

Bir tatlı su algı olan *Selenastrum capricornutum* ile yapılan bir başka çalışmada ise büyümenin baskılanmasına yol açan akrilamid değerleri hesaplanmıştır (NICNAS, 2002). Akrilamidin omurgasız canlılar üzerindeki toksik etkisinin anlaşılması amacıyla akrilamidle kontamine olan bir nehirdeki omurgasız türler incelenmiş ve akrilamidin omurgasız canlılar üzerine seçici olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir ve akrilamid nedeniyle yosunla kaplı taşlarda yaşayan böcek sayısında azalma belirlenmiştir (Brown, ve diğ., 1982).

Petersen ve diğerlerinin (1987) çalışmalarında ise *Oncorhynchus mykiss* balıkları 15 gün süreyle 25 mg/L ve 50 mg/L konsantrasyonlarında akrilamide maruz bırakılarak akrilamidin etkileri gözlenmiştir. 25 mg/L akrilamide maruz kalan balıkların solungaçlarında ve karaciğerlerinde histolojik lezyonlar belirlenirken; 50 mg/L akrilamid maruziyetinde ek olarak sefalik ve periferik bölgelerde lezyonlar gözlemlenmiştir. Ayrıca her iki dozda da sagittal ve proksimal sinir pleksuslarında lezyonlar; 50 mg/L dozda ise optik sinirde lezyonlar belirlenmiş ve yüzme sırasında yönelmede zorluk görülmüştür (Petersen ve diğ., 1987).

Yapılan çeşitli araştırmalarda ise akrilamidin omurgalılarda nörotoksik, genotoksik, karsinojenik etkileri olduğu ve üreme sistemlerinde hasara yol açtığı gösterilmiştir. Akrilamid, olası toksik etkilerini birbiriyle ilişkilendirilebilen iki şekilde ortaya koymaktadır. Bunlardan biri akrilamid ve türevlerinin doğrudan oluşturduğu etkiler diğeri ise CYP2E1 aktivasyonu sırasında oluşan reaktif oksijen radikalleri aracılığıyla dolaylı etkilerdir (Ghanayem ve diğ., 2005; Yousef ve Demerdash, 2006). Akrilamidin CYP2E1 aracılığıyla detoksifikasyonu, reaktivliği yüksek ara bileşiklerle gerçekleşmektedir.

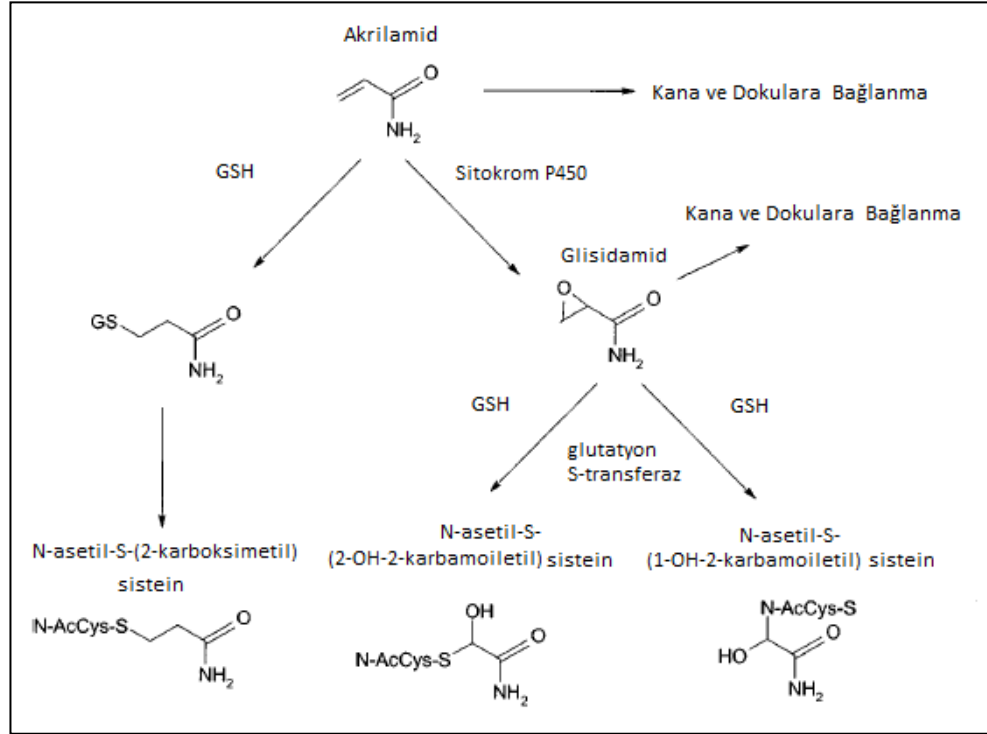
CYP2E1 genine sahip olan ve olmayan iki grup fareyle yapılan bir çalışmada ise, akrilamid uygulaması sonrası CYP2E1 olmayan farelerde karaciğer, testis ve akciğerlerde glisidamidin DNA eklentileri olan N7-(2-karbomoil-2-hidroksietil) guanin (N7-GA-Gua) ve N7-(2-karbomoil-2-hidroksietil) adenin (N7-GA-Ade) düzeylerinin ve buna bağlı hasarın % 67 daha az olduğu gözlenmekte ve akrilamidin mutajenik ve karsinojenik etkilerinden temel olarak akrilamid metaboliti glisidamidin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Döerge ve diğ., 2005).

Akrilamidin epoksiti olan glisidamidin bakterilerde ve memeli hücrelerinde mutajenik olduğu, sıçan ve farelere intraperitoneal uygulanması sonrası mikronukleus oluşumunu hızlandırdığı gözlenmiştir. Glisidamidin oral yolla uygulanmasıyla erkek farelerin üreme hücrelerinde baskın letal mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (Ghanayem ve diğ., 2005). Yang ve diğerlerinin (2005) çalışmalarında farelere günlük 60 mg/kg akrilamid uygulamışlar ve kontrol grubuna göre akrilamid uygulanan grupta kauda epididimisteki sperm miktarında azalma belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmalarında spermelerde morfolojik dejenerasyonlara rastlamışlardır.

Yu ve diğerlerinin (2006) çalışmalarında sıçanlara intraperitoneal olarak 20 mg/kg ve 40 mg/kg akrilamid uygulamışlar ve 40 mg/kg akrilamid uygulanan grupta siyatik sinir dokusunda hücre iskeleti proteinlerinin miktarında azalma belirlemişlerdir ve bu bulguyu akrilamid kaynaklı periferik nöropatilerinin bir nedeni olarak değerlendirmişlerdir. Akrilamidin epoksiti olan glisidamid, DNA'ya ve hemoglobine bağlanmakta ve oluşan eklentiler akrilamide maruz kalmanın kandaki belirteçleri olarak değerlendirilmektedir (Ghanayem ve diğ., 2005). Akrilamid ve glisidamid globulinin N-ucuna bağlanarak hemoglobin eklentileri meydana getirmektedir (Fennell, 2005). Gahanayem ve diğerleri (2005) yüksek dozlarda (250 mg/kg ve 500 mg/kg) akrilamid uygulaması sonucu karaciğer, testis, böbrek, beyin ve akciğer dokularında lipid peroksidasyonunun arttırdığını, sülfidril grup içeriğini ve protein miktarının ise azaldığını bildirmişlerdir.

Akrilamid, Uluslararası Kanseri Araştırma Enstitüsü tarafından insanda kanserojenik etki yapma olasılığı bulunan bileşikler (Grup 2A) arasında sınıflandırılmıştır (Erdreich ve Friedman, 1995). Johnson ve diğerleri (1986) ile Rice (2005) sıçanlara akrilamidi içme suyuyla birlikte uygulamaları sonucunda sıçanların vücutlarının farklı bölgelerinde

tümör görülme sıklığının arttığı gözlenmiştir. Fare ve sıçanlarla akut ve kronik akrilamid uygulamalarının sonucunda cilt, akciğer, tiroit bezi, merkezi sinir sistemi ve üreme sisteminde tümör oluşumu belirlenmiştir (Bull ve diğ., 1984; Johnson ve diğ., 1986; Friedman ve diğ., 1995). Ayrıca mesleki maruziyet sonucu pankreas kanseri görülme sıklığının arttığı belirlenmiştir (Schulz ve diğ., 2001).



Şekil 0.2: Akrilamid Metabolizması (Kirman ve diğ., 2003).

2.3. OKSİDATİF HASAR

Eşleşmemiş elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller, serbest radikaller olarak tanımlanır. Serbest radikaller, yüksek enerjili ve kararsız yapılar olmaları nedeniyle oldukça reaktif olup, başka moleküllerle kolayca elektron alışverişinde bulunurlar (Sies, 1996). Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı, moleküler oksijendir (Dröge, 2002). Serbest oksijen radikallerinin oluşumunda birçok endojen ve ekzojen kaynak etkilidir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, endoplazmik retikulum ve nuklear membrandaki elektron taşıma sistemleri, peroksizomlar ile fagositik hücreler, nötrofiller ve monositler gibi bağışıklık hücrelerinin etkinlikleri, oksidan

enzimler ve otooksidasyon tepkimeleri, serbest oksijen radikallerinin oluşumunda etkili olan endojen kaynaklarken (Rosen ve diğ., 1995; Hensley ve diğ., 2000; Stadtman, ve diğ., 2006); iyonize radyasyon, ultraviyole ışınlar, çevresel kirlleticiler, ilaç oksidasyonları ise ekzojen kaynaklardır (Helmut, 1996; Turner ve diğ., 2008). Hidroksil ($\bullet\text{OH}$), alkoksil ($\text{RO}\bullet$), peroksil ($\text{ROO}\bullet$), nitrik oksit ($\text{NO}\bullet$), süperoksit ($\text{O}_2\bullet^-$), azot dioksit ($\text{NO}_2\bullet$), başlıca reaktif oksijen türevleridir (Toyokuni, 1999).

Serbest oksijen radikalleri düşük konsantrasyonlarında, hücre farklılaşmasında işlevsel olan hücre içi sinyal iletiminin sağlanması; hücre büyümesinin durdurulması ve apoptozun uyarılması; bağışıklık sisteminin aktivitesinin düzenlenmesi gibi birçok biyokimyasal olayda rol oynar (Thannickal ve diğ., 2000; Kannan, 2000; Dröge, 2002). Ancak yüksek konsantrasyonları veya yetersiz detoksifikasyonları sonucunda, serbest oksijen radikalleri, biyolojik makromoleküllerde yapısal hasara ve metabolik fonksiyon bozukluklarına yol açan oksidatif strese neden olurlar (Juranek ve diğ., 2005). Membran lipidlerinin peroksidasyonu ile zar yapı ve işlevinin bozulması (Gutteridge, 1995); nükleik asit bazlarının peroksidasyonu ile DNA hasarı sonucu kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, kanser oluşumu, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar (Halliwell, 1991; Marnett, 2000); proteinlerin oksidasyonu ile protein ve enzim metabolizmalarında oluşan bozukluklar (Davies, 1987; Berlett ve diğ., 1997), serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasara verilebilecek başlıca örneklerdir.

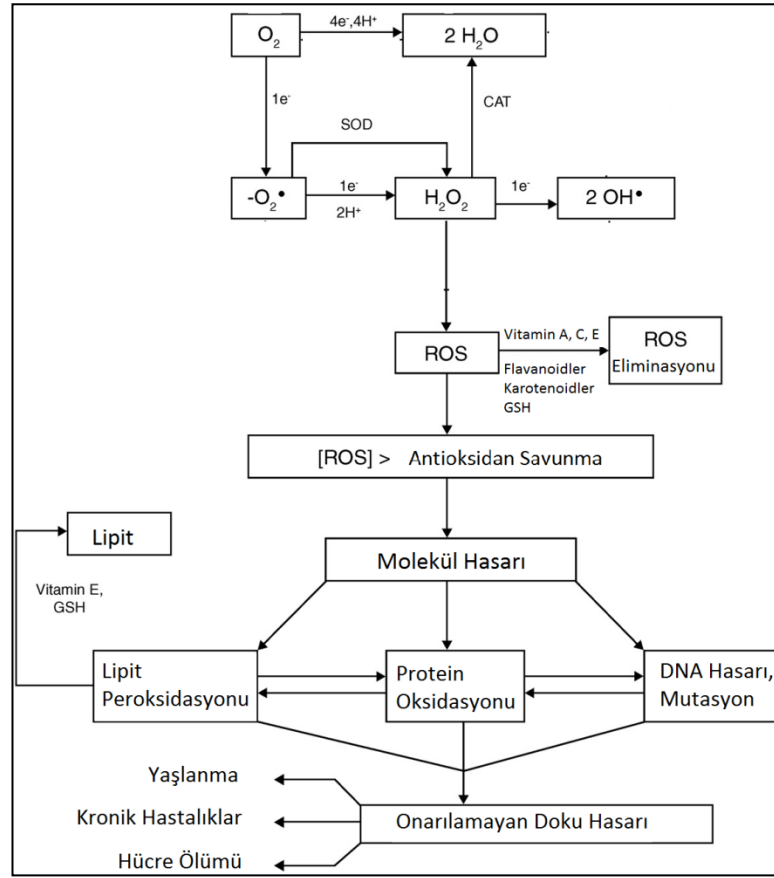
Lipit peroksidasyonu, membrandaki fosfolipit, glikolipit, gliserol ve sterolde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli moleküllere yıkılma tepkimesidir (Frankel, 1985; Gutteridge, 1995). Membrandaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran geçirgenliğinin, membran iyon gradientinin ve salgılama işlevinin bozulmasına neden olur (Halliwell, 1993). Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan zar hasarı, geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olabilir (Dargel, 1992). Lipit peroksidasyonu ürünlerinden olan malondialdehitin (MDA) proteinlerle, fosfolipitlerle ve nükleik asitlerle etkileşmesi, hem hücre membranında hem de hücre içi yapılarda hasara neden olur (Urso ve diğ., 2003). MDA, membran bileşenlerinin polimerizasyonu

ve çapraz bağ yapmalarına neden olarak hücre zarının yapısını ve bütünlüğünü bozup enzim aktivitesi ve iyon taşınmasını olumsuz etkiler (Halliwell, 1993).

Antioksidanlar, oksidatif hasarı engelleyen, geciktiren ya da oluşan hasarı onaran maddelerdir. Bir kısmı, serbest radikallerin oluşumunu engellerken bir kısmı ise zincir kırma ve serbest radikalleri zararsız hale getirmede etkilidir (Diplock, 1998). Antioksidan savunmada etkili olan maddeler, hücre dışında albumin, billirubin, transferrin iken (Chaudière ve diğ., 1999); hücre içinde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) ve sitokrom oksidaz enzimleridir (Sies, 1996). Enzimatik savunmaya ek olarak enzimatik olmayan savunma için, askorbik asit, α -tokoferol, glutatyon (GSH) ve flavonoidler gibi düşük molekül ağırlıklı maddeler de antioksidan etkinlik gösterirler (Kohen ve diğ., 2002).

Hücre içinde antioksidan etki gösteren enzimlerden biri olan katalaz, peroksizomlarda bulunan, her biri bir hem grubu ve bir NADPH bulunduran dört protein alt grubundan oluşur (Kirkman ve Gaetani, 1984). Katalaz, karaciğer ve eritrositlerde yüksek aktivite gösterir (Higas, 1963; Agar, 1986). Ayrıca katalazın organizmanın birçok dokusunda yaygın bir dağılımı vardır. Katalaz, hidrojen peroksitin (H_2O_2) su ve oksijene dönüşümünü katalizler (Goldman ve Blobel, 1978). Böylece H_2O_2 'nin oksidan etkisinin oluşmasını engeller.

Testiste spermatogonyumlardan serbest spermatozoonların oluşumu, yüksek mitotik aktivite gerektirir. Mitoz bölünme sıklığı, testis dokusunun oksijen ihtiyacını artırır ve spermatogenez ile Leydig hücrelerinde gerçekleştirilen steroidogenezi oksijene oldukça duyarlı hale getirir (Aitken ve diğ., 2008). Bununla birlikte testis dokusu yüksek oksijen konsantrasyonunda oluşabilecek oksidatif hasara karşı enzimatik (SOD, CAT gibi) ve enzimatik olmayan (askorbik asit, α -tokoferol gibi) antioksidanlarca korunur (Agarwal ve diğ., 2008). Ancak bazı ekzojen oksidatif stres kaynakları (ağır metal iyonları, ksenobiyotikler, iyonize radyasyon gibi) testis dokusunda antioksidanlarca etkisizleştirilemeyerek dokuda oksidatif hasara neden olur (Tremellen, 2008; Aitke ve diğ., 2008). Böylece spermatogenik hücrelerin membran yapı ve geçirgenlikleri ile enzim aktiviteleri bozulur (Sanocka ve diğ., 2004).

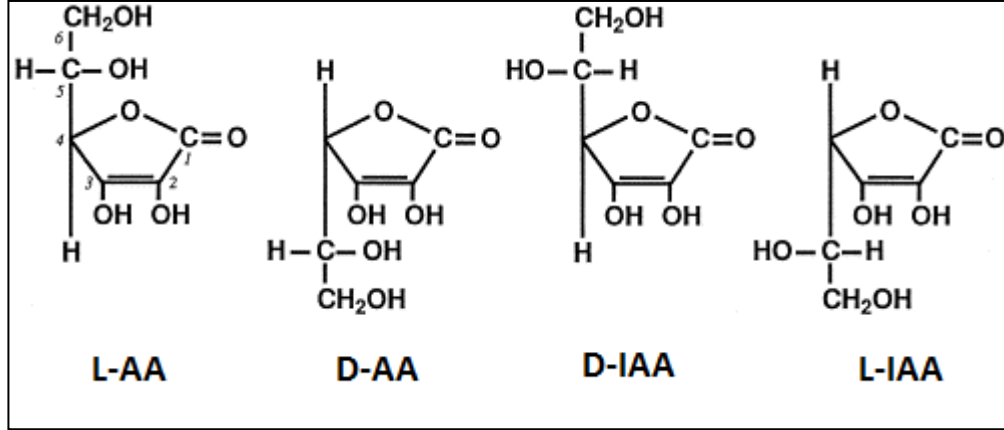


Şekil 0.3: Reaktif Oksijen Türleri, Oksidatif Hasar ve Antioksidanlar (França ve diğ., 2007).

2.4. ASKORBİK ASİT

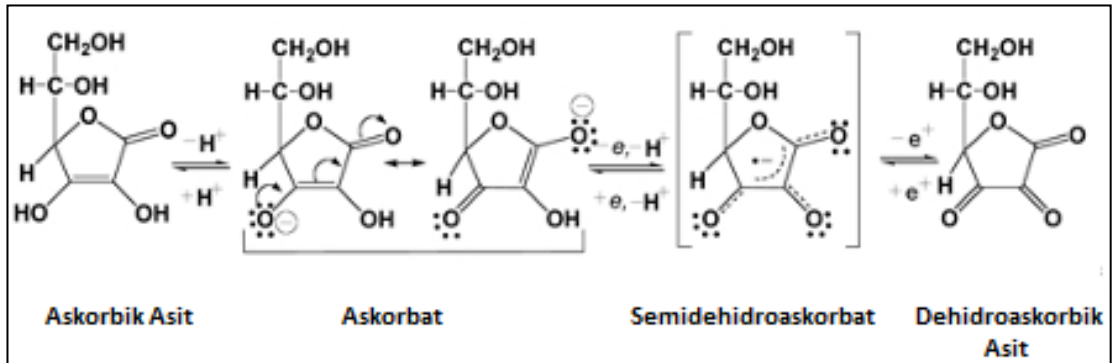
Albert Szent-Gyorgyi' nin 1928'de izole ettiği askorbik asidin L ve D izomerleri bulunur (McDowell, 1989; Iqbal ve diğ., 2004). Askorbik asidin L izomeri, IUPAC- IUB komisyonu tarafından 2,3-dehidro-L-treo-hekzano-1,4-lakton olarak adlandırılmıştır (Johnston ve diğ., 2001). Kimyasal formülü, $C_6H_8O_6$ ve moleküler ağırlığı 176,13 g/mol'dür. Suda iyi çözünen beyaz kristalize toz halinde bulunur, kaynama noktası, 190-192 °C'dir. Sudaki çözünürlüğü 20 °C'de 33 g/100 ml; sudaki pH değeri ise 2.4-2.8 olup ışık ve ısıdan etkilenir (Johnston ve diğ., 2001). Askorbik asit pKa değerleri 4.25 ve 11.8 olan iyonize olabilen 2 gruba sahiptir. Bu nedenle mide sıvısı hariç tüm vücut kompartmanlarında en yaygın bulunan formu olan mono anyonu askorbattır (Tolbert ve diğ., 1975). Askorbik asidin L ve D izomerlerinin moleküler yapıları, L-Askorbik Asit

(L-AA), D-Askorbik Asit (D-AA), D-İzo-Askorbik Asit (DI-AA), L-İzo-Askorbik Asit (LI-AA), Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 0.4: Askorbik Asit L ve D İzomerleri.

Askorbik asit bir çok elektron taşıma sisteminde güçlü bir indirgeyici ajandır. Organizmada normal fizyolojik koşullar altında askorbik asit iyonize formu olan askorbat anyonu şeklinde bulunur. Bir elektron kaybettiğinde semihidroaskorbat (veya askorbil) radikali, iki elektron kaybettiğinde ise stabil olmayan dehidroaskorbat molekülü oluşur. Askorbil radikali ve dehidroaskorbat nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen (NADH) veya glutasyonu (GSH) indirgeyici kaynak olarak kullanarak askorbata geri dönüşebilirler. Askorbil radikali reaktif değildir, bu zayıf reaktivite askorbatın antioksidan etkisinin temelini oluşturmaktadır. Alkoksil (RO, RO₂), hidroksil (OH) ve azot dioksit (NO₂) gibi yüksek reaktif serbest radikaller askorbat tarafından indirgenip zayıf reaktif yapıda olan yeni askorbil radikali oluşturur.



Şekil 0.5: Askorbik Asidin Redoks Durumları.

Askorbik asit, omurgasızlarda, böceklerde ve balıklarda, kuşların ve memelilerin bir kısmında sentezlenemezken; amfibiler, sürüngenler (böbrekte) ve bazı kuşlarda ile memelilerde (karaciğerde) sentezlenebilir (Isherwood ve diğ., 1954; Grollman ve diğ., 1957). İnsanlar, primatlar ve meyve yarasalar ise L-glukanolakton oksidaz enziminin yokluğu nedeniyle askorbik asit sentezleyemezler (Asard ve diğ., 2003). Askorbik asit, seminal sıvıda bulunan en önemli antioksidanlardandır (Niki, 1991). Seminal plazmada kan plazmasına oranla on kat daha fazla bulunur (Lewis ve diğ., 1997). Askorbik asidin doğrudan veya dolaylı olarak katıldığı bazı metabolik olaylar şunlardır: Kollajen sentezi, prolinin hidroksilasyonu , tirozin yıkımı, tirozinden adrenalın sentezi, safra asidi oluşumu, demir emilimi; karnitin ve norepinefrin biyosentezi (Barnes ve Kodicek, 1972; Evans ve diğ., 1982; Lisa ve diğ., 1984; Thoma ve Handerson, 1984; Padh, 1991). Ayrıca bağışıklık sisteminin virüs ve bakterilere karşı yanıt oluşturmada, alerik tepkimeler, astım ve otoimmün hastalıklarda etkilidir (Hume ve Weywes, 1973; Goldschmidt, 1991; Hatch, 1995).

Sulu çözeltilerde zincir kırıcı antioksidan olarak süper oksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ile tepkime vererek oksidatif etkilerini engeller (May, 1999). Tokoferoksil radikalini tokoferole indirger (Halliwell ve Whiteman, 1998). Askorbik asit, oksidatif hasara karşı koruyucu etkisini proteinlerin ve kollagenin oksidasyonunu ve lipit peroksidasyonunu önleyerek gerçekleştirir (Mukhopadhyay ve Chatterjee., 1994). Askorbik asit, glutatyon, lipoik asit, koenzim Q 10 ve E vitamini ile sinerjit etkilidir (Meister, 1994; Comhaire ve diğ., 2000). Ayrıca neonatal dönemde oksidatif hasara karşı koruyucu etkilidir (Gopinathan ve diğ., 1994).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, akrilamid ve askorbik asit, dişi farelere hamilelik ve/veya laktasyon dönemleri süresince ayrı ayrı veya birlikte uygulandı. Laktasyon dönemleri sona eren (21 günlük) erkek yavruların gonadosomatik indeksi belirlendi ve testislerinden biri histolojik ve histometrik incelemeler için; diğeri ise biyokimyasal incelemeler için kullanıldı. Testis dokularının histolojik olarak incelenmesiyle dokuda meydana gelen histopatolojik değişimler belirlendi. Yapılan histometrik çalışmalarla testisteki spermatogenik hücreler ile Sertoli ve Leydig hücrelerinin miktarları belirlenerek; spermatogenik hücrelerin testiste bulunma oranları ve Sertoli hücresi başına düşen germ hücre sayısı hesaplanarak testis verimliliği elde edildi. Testis dokusunda oluşan oksidatif hasarın araştırılması amacıyla yapılan biyokimyasal çalışmalarla, dokuda total protein miktarı, lipid peroksidasyonu (MDA) ve katalaz enzim miktarı belirlendi.

3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI VE UYGULAMA

Deneyde İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'den sağlanan *Mus musculus Balb/c* türü 30 adet dişi fare, hamilelik ve laktasyon dönemlerinde akrilamid ve/veya askorbik asidin etkisinin araştırılması amacıyla kullanıldı. Deney süresince farelerin bakımı, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanılması El Kitabı'nda (National Research Council, A.B.D) belirlenen koşullarda (20-25 °C sıcaklık, % 50-60 bağıl nem, 12:12 saat aydınlık karanlık periyodu) yapıldı. Doğal yollarla çiftleştirilerek hamilelikleri sağlanan üreme dönemindeki (25-30 gram ağırlıktaki)

30 adet dişi fare, her grupta üçer dişi birey olacak şekilde 10 farklı gruba ayrıldı (Tablo 3.1). Hamileliklerinin 14. gününde her bir birey ayrı kafeslere alınarak doğuma ve yavru bakımına hazırlanmaları ve hamilelik dönemlerinin sonunda yavruların annelerinden süt emmeleri sağlandı. Hamilelik ve/veya laktasyon dönemlerinde bireylere aşağıda ayrıntılı olarak açıklanan uygulamalar yapıldı.

Kontrol grubundaki (1.grup) bireylere, hamileliklerinin 6. gününden başlanarak laktasyon döneminin sonuna kadar, 24 saatte bir %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su oral gavaj yoluyla uygulandı (Doerge ve diğ., 2005).

Deney gruplarından hamilelik grupları olan 2.grup, 5.grup ve 8.gruplara hamileliklerinin 6. gününden başlayarak doğuma kadar, 24 saatte bir olmak üzere sırasıyla, 14 mg/kg akrilamid, 1,5g/kg askorbik asit, 14 mg/kg akrilamid ve 1,5g/kg askorbik asit, %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su içerisinde çözülerek oral gavaj yoluyla; ayrıca aynı gruplara doğumdan laktasyon döneminin sonuna kadar %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su oral gavaj yoluyla uygulandı.

Laktasyon grupları olan 3.grup, 6.grup ve 9.gruplara hamileliklerinin 6. gününden başlayarak doğuma kadar, 24 saatte bir olmak üzere %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su, oral gavaj yoluyla uygulandı. Aynı gruplara (3.grup, 6.grup ve 9.grup) doğumdan laktasyon döneminin sonuna kadar, 24 saatte bir olmak üzere sırasıyla 14 mg/kg akrilamid, 1,5g/kg askorbik asit, 14 mg/kg akrilamid ve 1,5g/kg askorbik asit, %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su içerisinde çözülerek oral gavaj yoluyla uygulandı.

Deney gruplarından hamilelik ve laktasyon grupları olan 4.grup, 7.grup ve 10.gruba ise hamileliklerinin 6. gününden başlayarak laktasyon döneminin sonuna kadar, 24 saatte bir olmak üzere sırasıyla 14 mg/kg akrilamid, 1,5g/kg askorbik asit, 14 mg/kg akrilamid ve 1,5g/kg askorbik asit, %0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su içerisinde çözülerek oral gavaj yoluyla uygulandı (Tablo 3.1).

Tablo 0.1: Kontrol ve Deney Grupları.

	Uygulama Dönemi	Uygulanan Madde
1.Grup	Hamilelik ve Laktasyon	%0,9'luk 0,5 ml fizyolojik su
2.Grup	Hamilelik	14 mg/kg/gün akrilamid
3.Grup	Laktasyon	14 mg/kg/gün akrilamid
4.Grup	Hamilelik ve Laktasyon	14 mg/kg/gün akrilamid
5.Grup	Hamilelik	1,5g/kg/gün askorbik asit
6.Grup	Laktasyon	1,5g/kg/gün askorbik asit
7.Grup	Hamilelik ve Laktasyon	1,5g/kg/gün askorbik asit
8.Grup	Hamilelik	14 mg/kg/gün akrilamid 1,5g/kg/gün askorbik asit
9.Grup	Laktasyon	14 mg/kg/gün akrilamid 1,5g/kg/gün askorbik asit
10.Grup	Hamilelik ve Laktasyon	14 mg/kg/gün akrilamid 1,5g/kg/gün askorbik asit

3.2. GONADOSOMATİK İNDEKSİN HESAPLANMASI

Deney sonunda 21 günlük erkek bireylerin vücut ağırlıkları belirlenerek bireylere servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi uygulandı. Farelerin testisleri disekte edilerek testis ağırlıkları ölçüldü ve testis ağırlıkları vücut ağırlıklarına oranlanarak gonadosomatik indeks, 3.1 eşitliğindeki gibi hesaplandı (Barber ve Blake, 2006).

$$\text{Gonadosomatik İndeks} = \frac{\text{Testis Ağırlığı (g)}}{\text{Vücut Ağırlığı (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.3. HİSTOLOJİK VE HİSTOMETRİK YÖNTEMLER

21 günlük erkek farelerin birer testisleri histolojik incelemeler için 12 saat Bouin çözeltisinde fikse edilerek % 70 alkole alınıp yükselen alkol serilerinden geçirildi ve parafine gömüldü. Parafin bloklardan Thermo Scientific marka mikrotom ile 5-6 µm kalınlığında enine kesitler alınarak preparatlar hazırlandı ve Hematoksilen - Eozin (H&E) ile boyandı (Humanson, 1972). Preparatlar, Nikon Eclipse E200 marka mikroskopta incelenerek, Nikon Coolpix4500 marka dijital fotoğraf makinası ile fotoğrafları alındı.

Histometrik incelemeler için H&E ile boyanan preparatlardaki spermatogenik hücrelerle, Sertoli ve Leydig hücrelerinin miktarlarını belirlemek amacıyla, her gruptan sekizer bireye ait testis kesitleri standart nokta sayımı yöntemine göre 100X büyütmede her bir birey kesitinde 100 nokta bulunan 30 alan sayıldı (Wreford, 1995; Aktaş ve diğ., 2008). Bu sayımlar sonucunda, spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, erken spermatid, Sertoli, Leydig hücreleri ile dejenere hücreler sayıldı. Elde edilen hücre miktarlarına göre yüzde spermatogenik hücre oranı belirlendi ve Sertoli hücresi başına düşen germ hücre sayısı hesaplanarak testis verimliliği elde edildi (Atanosova ve diğ., 1993).

3.4. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Biyokimyasal incelemeler için alınan testisler, IKA RW20 digital marka homojenizatör ile 1500 rpm'de buz içine yerleştirilen ayrı bir kapta 1M PBS tampon çözeltisiyle homojenize edildi. Homojenat, +4°C'de 10000 g'de 20 dakika Nüve marka soğutmalı santrifüj kullanılarak santrifüj edildi ve toplanan süpernatatlar biyokimyasal incelemelerde kullanıldı.

3.4.1. Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Total protein tayini, Lowry ve diğerlerinin, (1953) yöntemine göre yapıldı. Deneyin prensibi, fosfomolibdotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteau belirteci) tirozin bakiyeleri ile reaksiyona girerek mavi bir renk oluşturması 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 Tablo 3.2'deki gibi hazırlandı.

Tablo 0.2: Total Protein Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Örnek ve Kör Tüplerinin İçeriği.

	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 sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra karanlıkta karışımın homojen olarak karışması sağlanarak karışıma D reaktifi eklendi. Tüpler oda sıcaklığında 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 miktarları hesaplandı.

3.4.2. Membran Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Lipit peroksidasyon miktarı, Devasagayam ve Tarachand (1987)'in yönteminde olduğu gibi örnekteki malondialdehit içeriğine göre ölçüldü. Deneyin prensibi, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan son ürünlerden biri olan malondealdehit (MDA)'ın sıcak ortamda tiyobarbitirik 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 KH₂PO₄

3.4.2.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri Tablo 3.3'teki gibi hazırlandı.

Tablo 0.3: Membran Lipit Peroksidasyonu Miktarının Belirlenmesi için Hazırlanan Örnek ve Kör Tüplerinin İçeriği.

	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 eklenip 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

$$TBARS(nmol/ml) = \frac{V_{toplam} \times A_{örnek} \times 10^6}{V_{örnek} \times \epsilon_{mM} \times LP} \quad (3.2)$$

TBARS için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon = 1,56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$

V_{toplam} (Toplam hacim): 4 ml

$V_{örnek}$ (Kullanılan örnek hacmi): 0,2 ml

$A_{örnek}$: Örnek absorbansı

LP: Işık Yolu

3.4.3. Katalaz Miktarının Belirlenmesi

Katalaz gösterilmesi için Sinha (1972)'nin yöntemi kullanıldı. Katalaz enzimi, hücre için çok zararlı olan hidrojen peroksiti (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 absorbanans 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 g 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 Tablo 3.4'teki gibi hazırlandı.

Tablo 0.4: Katalaz Miktarı Belirlenmesi İçin Hazırlanan Örnek ve Kör Tüplerinin İçeriği.

	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 çalkalanır. Daha sonra dikromat/asetik asit belirteci eklenir ve tüpler 10 dk kaynayan su banyosunda inkübe edilir. İnkübasyondan sonra tüpler soğutularak 570 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.4.3.3. Hesaplama

$$Tüketilen H_2O_2 = \frac{A_{örnek} \times df \times V_{toplaml}}{\epsilon_{mM} \times V_{örnek} \times LP} \quad (3.3)$$

H₂O₂ için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon_{mM} = 1,88 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

V_{toplam} (Toplam hacim): 1,2 ml

V_{örnek} (Kullanılan örnek hacmi): 0,1 ml

A_{örnek}: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

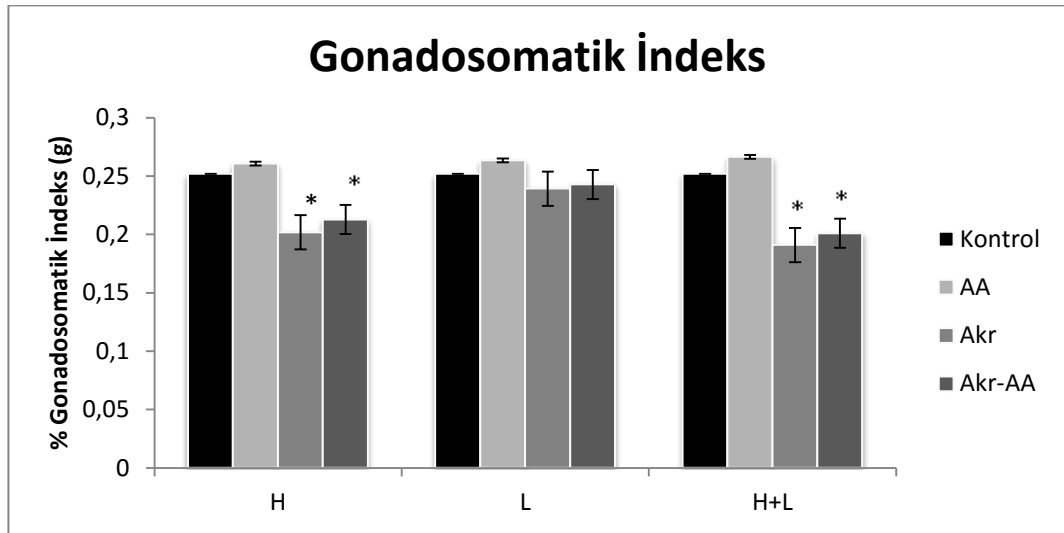
3.5. İSTATİKSEL ANALİZ

Deney sonunda testis dokusunda yapılan incelemelerle gonadosomatik indeks, testiste mm² alandaki hücre miktarları, % spermatogenik hücre oranları, dokudaki total protein miktarı, membran lipid peroksidasyonu, katalaz enzimi miktarı, uygulanan maddeye ve uygulamanın yapıldığı döneme göre $p < 0,005$ anlamlılık derecesinde tek yönlü varyans analizi yöntemi olan Kruskal-Wallis testi ile hesaplandı. İkili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi uygulanarak istatistiksel analiz yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde $p < 0,01$ ve $p < 0,05$ anlamlılık seviyeleri temel alındı.

4. BULGULAR

4.1. GONADOSOMATİK İNDEKS

Tüm bireylerin vücut ve testis ağırlıkları ölçülerek her grup için ortalama gonadosomatik indeks hesaplandı. Gonadosomatik indeks sonuçları Şekil 4.1.1'de verildi. Akrilamid tek başına ve askorbik asitle birlikte uygulandığı gruplarda, laktasyon dönemi dışında, kontrol grubuna göre gonadosomatik indekste anlamlı bir azalma görüldü. Tüm dönemlerde askorbik asit uygulanan gruplarda ise, kontrol grubuna göre gonadosomatik indekste anlamlı bir fark gözlenmedi. Akrilamid ve askorbik asit uygulanan gruplardan laktasyon dönemi dışında askorbik asit uygulanan gruplara göre gonadosomatik indekste anlamlı bir azalma görülürken, akrilamid uygulanan gruplara göre ise anlamlı bir fark görülmedi. Akrilamid uygulanan gruplar ve akrilamidle birlikte askorbik asit uygulanan gruplar uygulama dönemlerine göre karşılaştırıldıklarında ise hamilelik döneminde, gonadosomatik indekste, laktasyon dönemine anlamlı bir azalma görülürken; hem hamilelik hem de laktasyon dönemine göre ise anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 4.1.1).

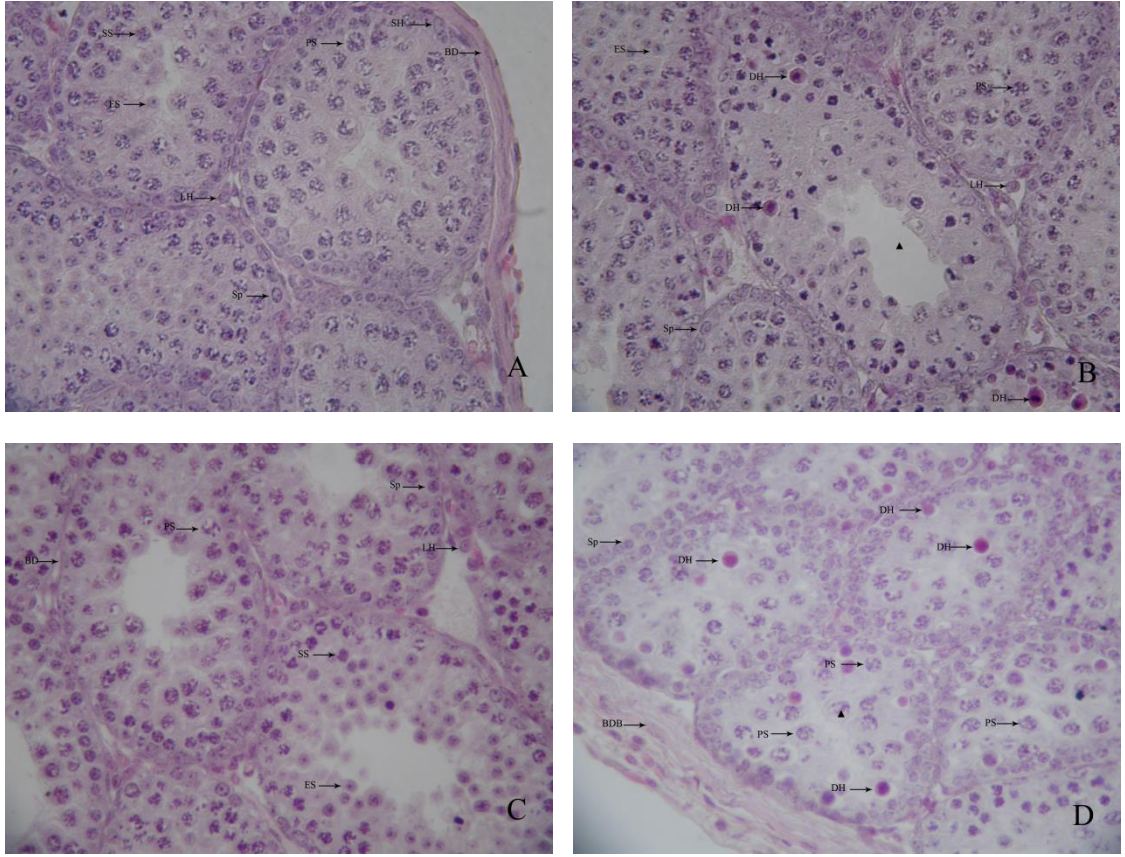


Şekil 0.1.1: Kontrol ve Deney Gruplarında Gonadosomatik İndeks.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.

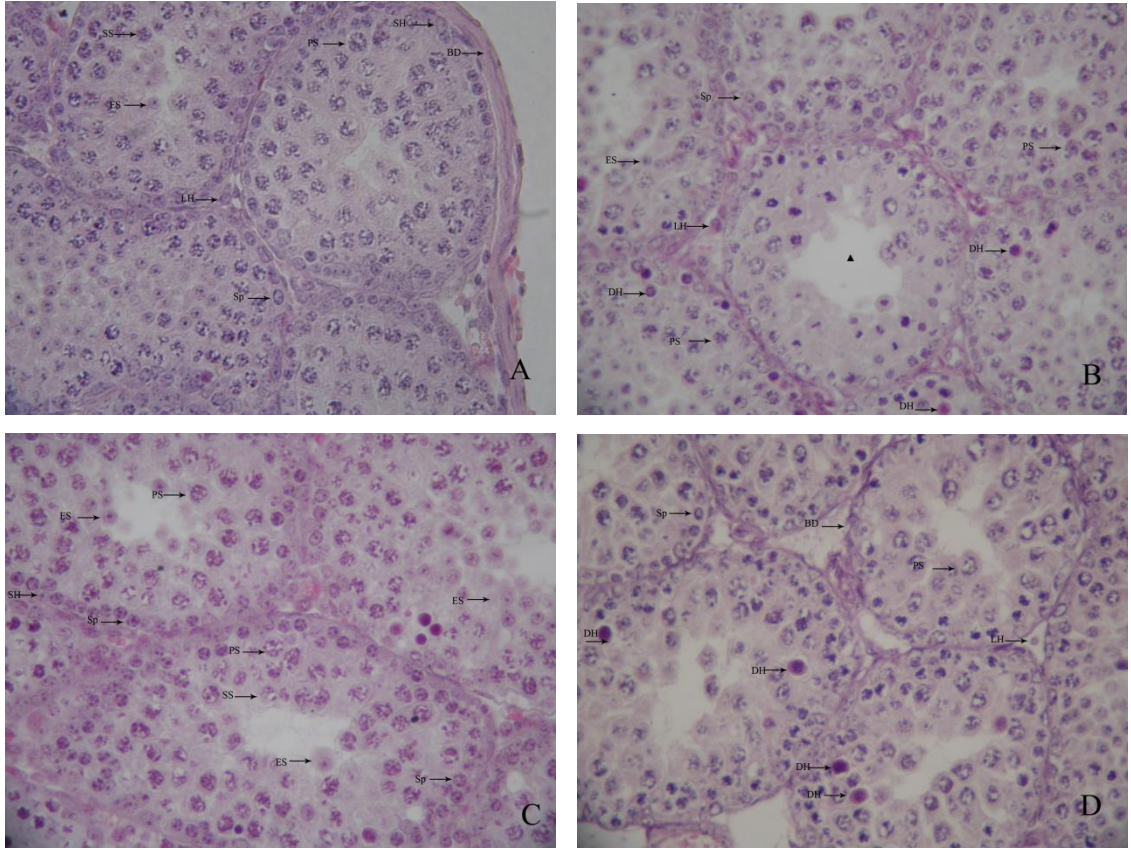
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

Kontrol grubunun testis kesitleri incelendiğinde, testis bağ dokusu ile spermatogenik hücreler, Sertoli ve Leydig hücrelerinin morfoloji, yoğunluk ve sayılarının normal olduğu görüldü. Askorbik asit uygulanan tüm dönemlerin (hamilelik, laktasyon, hem hamilelik hem laktasyon) gruplarının testis kesitleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, testis bağ dokusu ile spermatogenik hücreler, Sertoli ve Leydig hücrelerinin morfoloji, yoğunluk ve sayılarında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Tüm dönemlerde (hamilelik, laktasyon ve hem hamilelik hem laktasyon) sadece akrilamid uygulanan gruplar ile akrilamid ve askorbik asidin birlikte uygulandığı grupların testis kesitleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise bağ doku morfolojisinde özellikle kollagen liflerin yapısında düzensizlik, atrofik seminifer tübüller ayrıca seminifer tübüllerde multinükleer dev hücreler ve dejenere hücreler görüldü. Ayrıca bu gruplarda spermatogenezin çoğunlukla primer spermatosit evresinde tutuklu kaldığı belirlendi (Şekil 4.2.1, Şekil 4.2.2, Şekil 4.2.3).



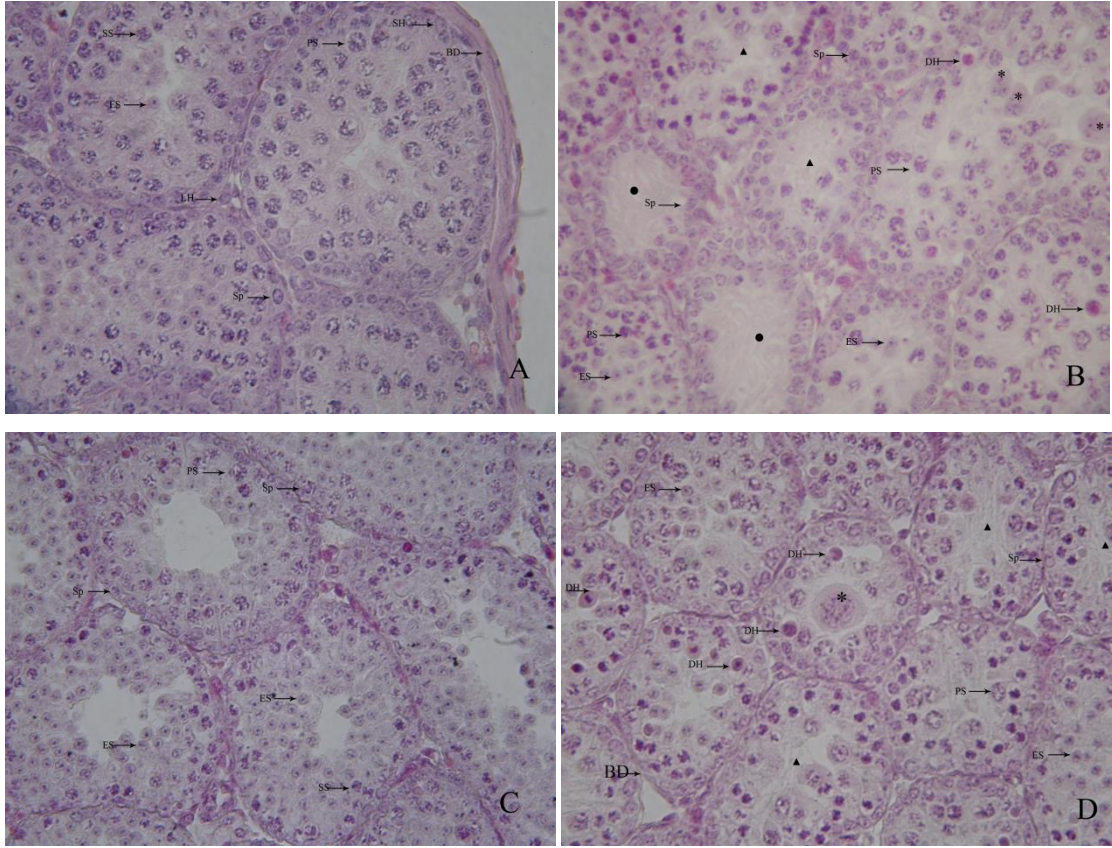
Şekil 0.2.1: Kontrol ve Hamilelik Dönemi Deney Gruplarının Testis Kesitleri.

Boya: H&E (A: Kontrol, B: Akr, C: AA, D: Akr+AA)
 spermatogonyum (Sp), primer spermatosit (PS), sekonder spermatosit (SS), erken spermatid (ES), Sertoli hücresi (SH), Leydig hücresi (LH), dejenere hücre (DH), bağ doku (BD), bağ dokuda dejenerasyon (BDD), multinuklear dev hücre (*), tutuklu kalan tübül (▲).



Şekil 0.2.2: Kontrol ve Laktasyon Dönemi Deney Gruplarının Testis Kesitleri.

Boya: H&E (A: Kontrol, B: Akr, C: AA, D: Akr+AA)
 spermatogonyum (Sp), primer spermatosit (PS), sekonder spermatosit (SS), erken spermatid (ES), Sertoli hücresi (SH), Leydig hücresi (LH), dejenere hücre (DH), bağ doku (BD), bağ dokuda dejenerasyon (BDD), multinuklear dev hücre (*), tutuklu kalan tübül (▲).



Şekil 0.2.3: Kontrol ve Hamilelik ve Laktasyon Dönemi Deney Gruplarının Testis Kesitleri.

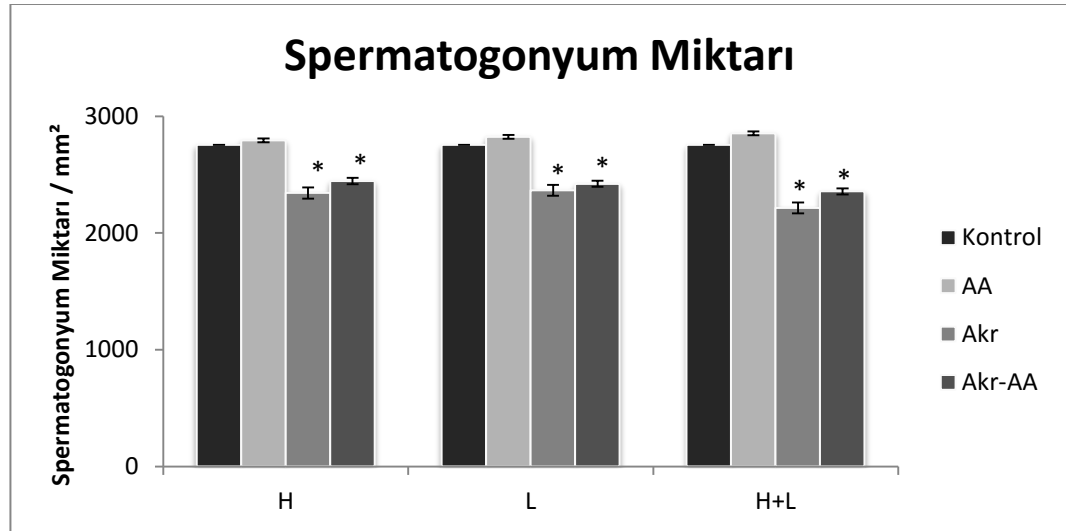
Boya: H&E (A: Kontrol, B: Akr, C: AA, D: Akr+AA) , spermatogonyum (Sp), primer spermatosit (PS), sekonder spermatosit (SS), erken spermatid (ES), Sertoli hücresi (SH), Leydig hücresi (LH), dejenere hücre (DH), bağ doku (BD), bağ dokuda dejenerasyon (BDD), multinuklear dev hücre (*), atrofik tübül (●), tutuklu kalan tübül (▲).

4.3. HİSTOMETRİK BULGULAR

Hamilelik, laktasyon ve hem hamilelik hem laktasyon dönemlerinde yalnızca akrilamid uygulanan ve akrilamidle birlikte askorbik asit uygulanan gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, erken spermatid ve Leydig hücresi miktarlarında anlamlı bir azalma görülürken; dejenere hücre sayısında anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2, Şekil 4.3.3, Şekil 4.3.4, Şekil 4.3.6, Şekil 4.3.7). Bunun yanı sıra, laktasyon dönemi dışında tüm dönemlerde yalnızca akrilamid ve askorbik asitle birlikte akrilamid uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna göre, testis verimliliği ve Sertoli hücre miktarının anlamlı olarak azaldığı görülürken; laktasyon dönemindeki uygulamalar sonucunda anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi (Şekil 4.3.5, Şekil 4.3.8). Spermatogenik hücre (%) oranları incelendiğinde ise, akrilamid uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna göre, spermatogonyum ve primer spermatosit oranlarında anlamlı bir artış görülürken; sekonder spermatosit ile erken spermatid oranlarında anlamlı bir azalma belirlendi (Tablo 4.1). Tüm dönemlerde (hamilelik, laktasyon, hem hamilelik hem de laktasyonda) tek başına askorbik asit uygulanan gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, erken spermatid, Sertoli ve Leydig hücreleri ile dejenere hücre sayısında, testis verimliliğinde ve yüzde spermatogenik hücre oranlarında anlamlı bir değişim görülmedi (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, Tablo 4.1).

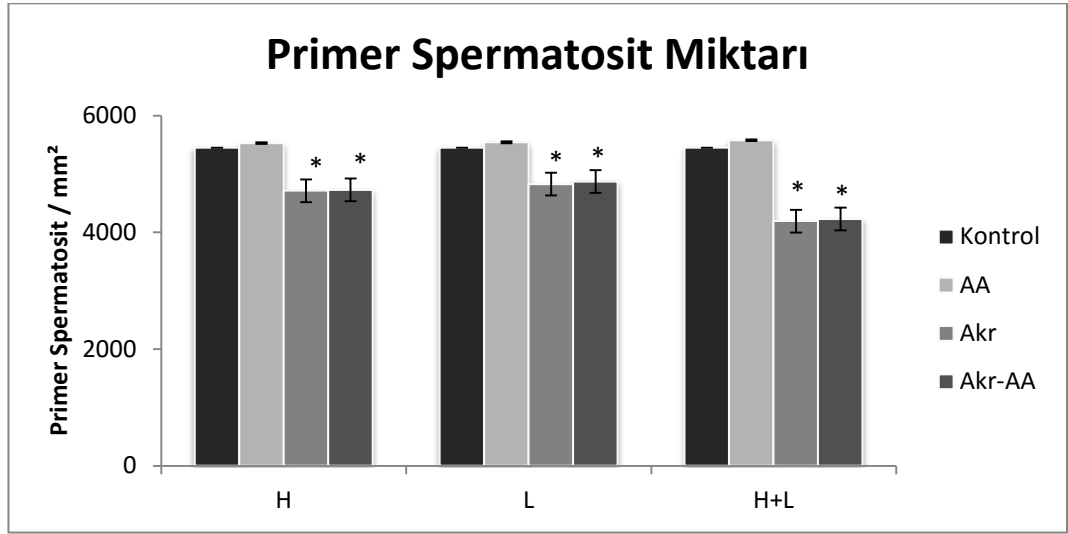
Akrilamidin tek başına ve askorbik asitle birlikte uygulandığı gruplar uygulanma dönemlerine göre karşılaştırıldıklarında ise laktasyon dönemi gruplarında hamilelik dönemi gruplarına göre, spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, erken spermatid ve dejenere hücre miktarında anlamlı bir fark görülmezken; testis verimliliği ile Sertoli, Leydig hücreleri miktarlarında anlamlı bir artış görüldü (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). Ayrıca yine laktasyon döneminde tek başına akrilamid ve askorbik asitle birlikte akrilamid uygulanan gruplar hamilelik döneminde aynı uygulamaların yapıldığı gruplarla karşılaştırıldığında spermatogenik hücre (%) oranlarında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Tablo 4.1). Hem hamilelik hem de laktasyon döneminde yalnızca akrilamid uygulanan ve akrilamidle birlikte askorbik asit uygulanan gruplar, laktasyon döneminde ya da hamilelik döneminde yalnızca akrilamid uygulanan ve akrilamidle birlikte askorbik asit

uygulanan gruplar ile karşılaştırıldıklarında, spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, erken spermatid, Leydig hücresi, Sertoli hücresi miktarlarında ve testis verimliliğinde anlamlı bir azalma görülürken; dejenere hücre miktarında ise anlamlı bir artma belirlendi (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). Hem hamilelik hem de laktasyon döneminde yalnızca akrilamid uygulanan ve akrilamidle birlikte askorbik asit uygulanan gruplar, laktasyon döneminde ya da hamilelik döneminde yalnızca akrilamid uygulanan ve akrilamidle birlikte askorbik asit uygulanan gruplar ile karşılaştırıldıklarında, spermatogonyum ve primer spermatosit oranlarında anlamlı bir fark görülmezken; sekonder spermatosit ve erken spermatid oranlarında anlamlı bir azalma saptandı (Tablo 4.1). Ayrıca tüm dönemlerde akrilamid ve askorbik asidin birlikte uygulandığı gruplarda, tüm dönemlerde akrilamid uygulanan gruplarla karşılaştırıldıklarında spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, erken spermatid, Sertoli ve Leydig hücreleri, dejenere hücre miktarlarında ve testis verimliliği ile spermatogenik hücre oranlarında anlamlı bir fark bulunmadı (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, Tablo 4.1).



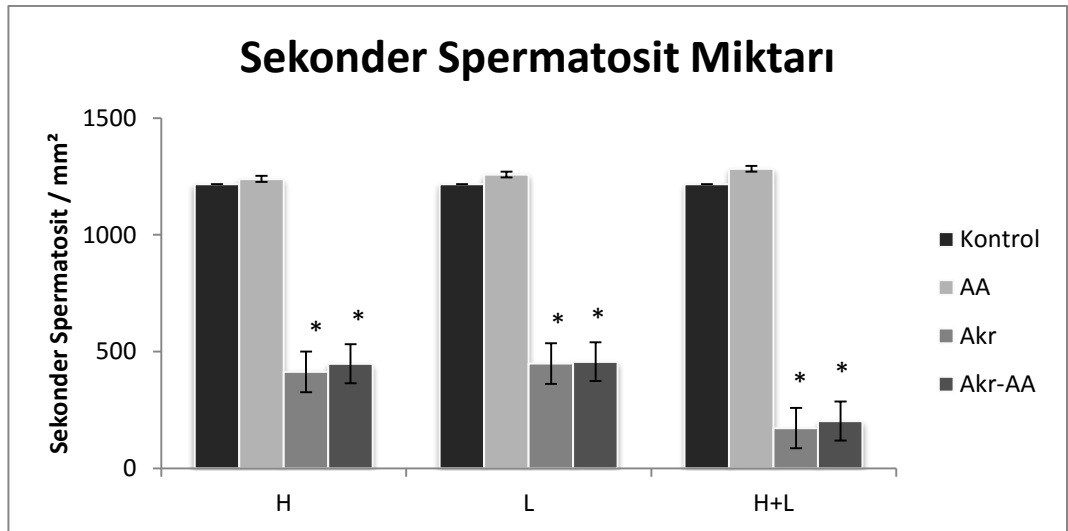
Şekil 0.3.1: Kontrol ve Deney Gruplarında mm²'de Spermatogonyum Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.



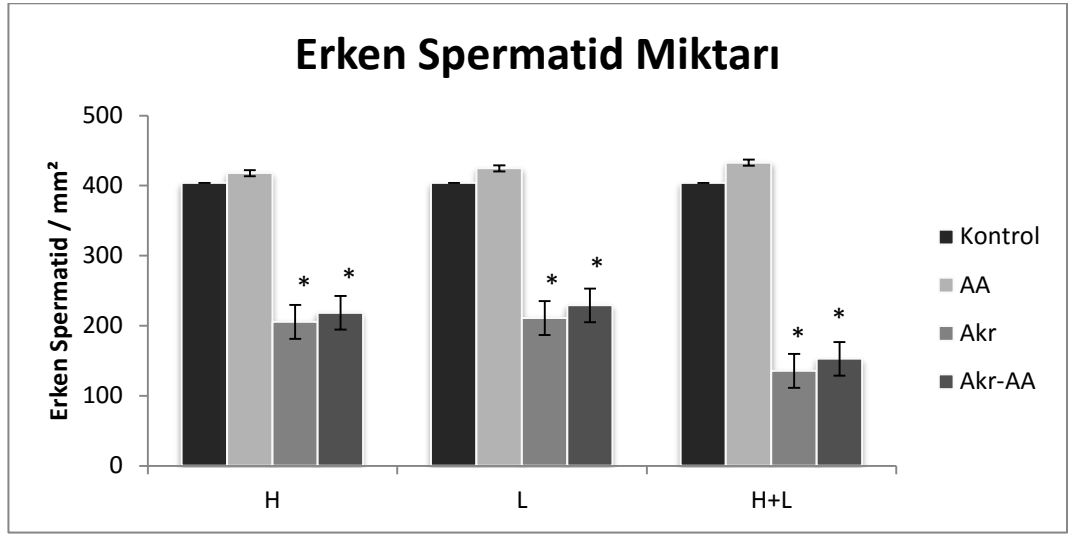
Şekil 0.3.2: Kontrol ve Deney Gruplarında mm²'de Primer Spermatosit Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.



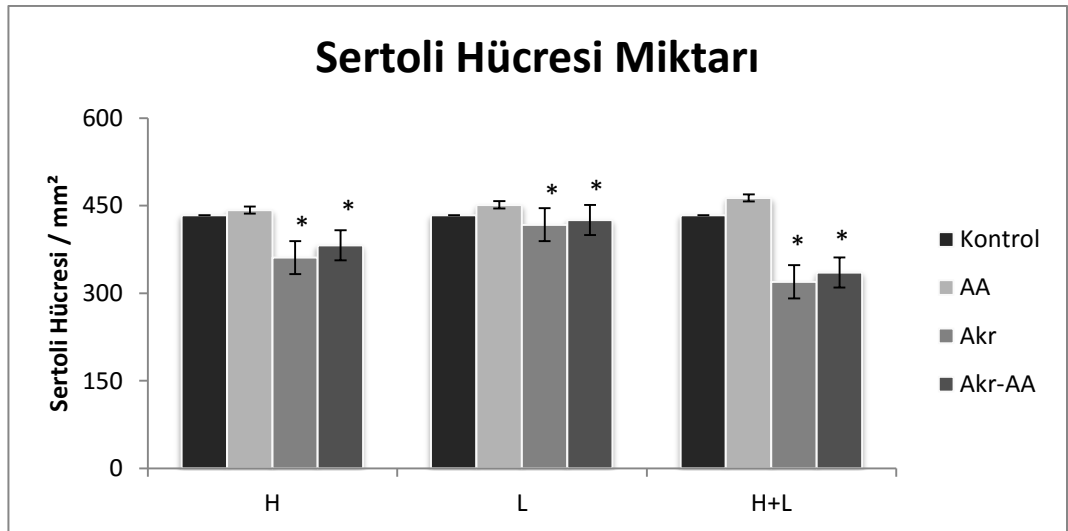
Şekil 0.3.3: Kontrol ve Deney Gruplarında mm²'de Sekonder Spermatosit Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.



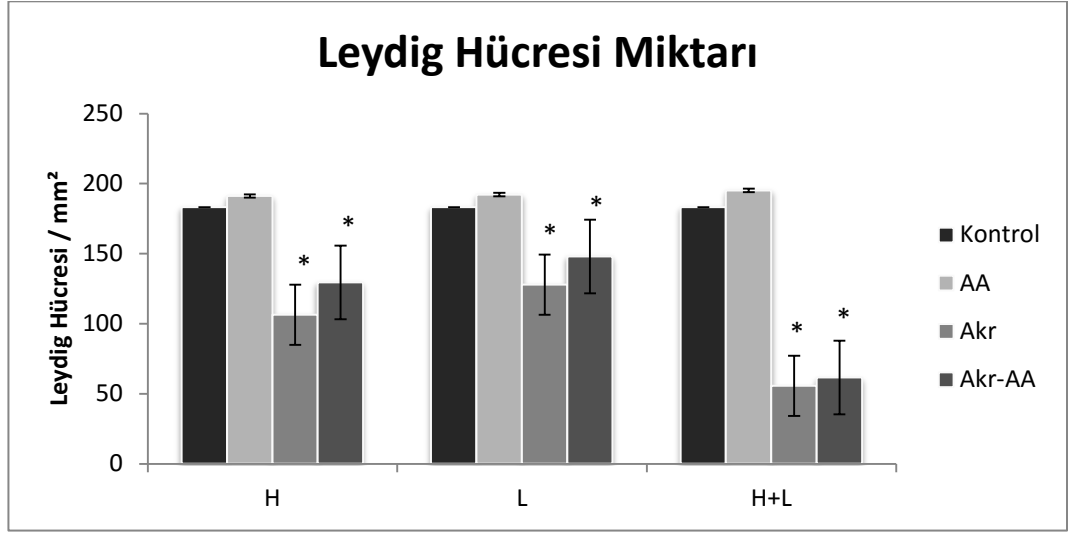
Şekil 0.3.4: Kontrol ve Deney gruplarında mm²'de Erken Spermatid Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.



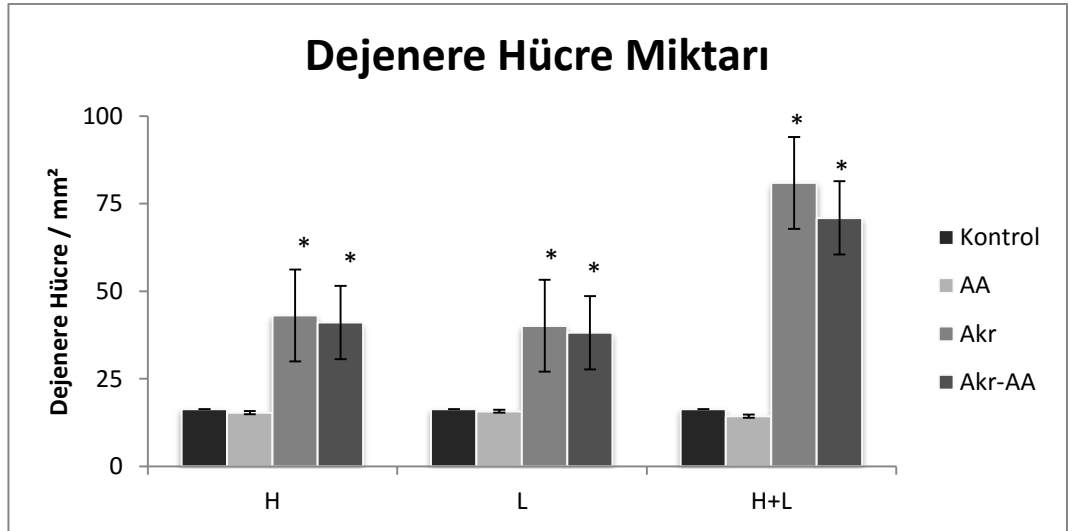
Şekil 0.3.5: Kontrol ve Deney Gruplarında mm²'de Sertoli Hücresi Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.



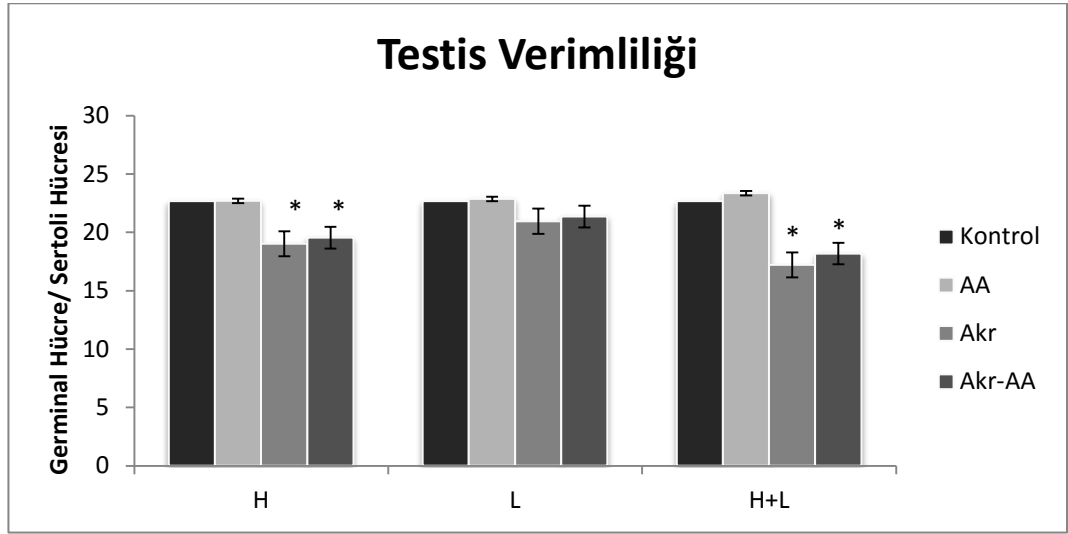
Şekil 0.3.6: Kontrol ve Deney Gruplarında mm²'de Leydig Hücre Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.



Şekil 0.3.7: Kontrol ve Deney Gruplarında mm²'de Dejenere Hücre Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.



Şekil 0.3.8: Kontrol ve Deney Gruplarında Testis Verimliliği. *: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.

Tablo 0.1: Kontrol ve Deney Gruplarında % Spermatogenik Hücre Oranı *: Kontrol grubuna göre $p < 0,05$.

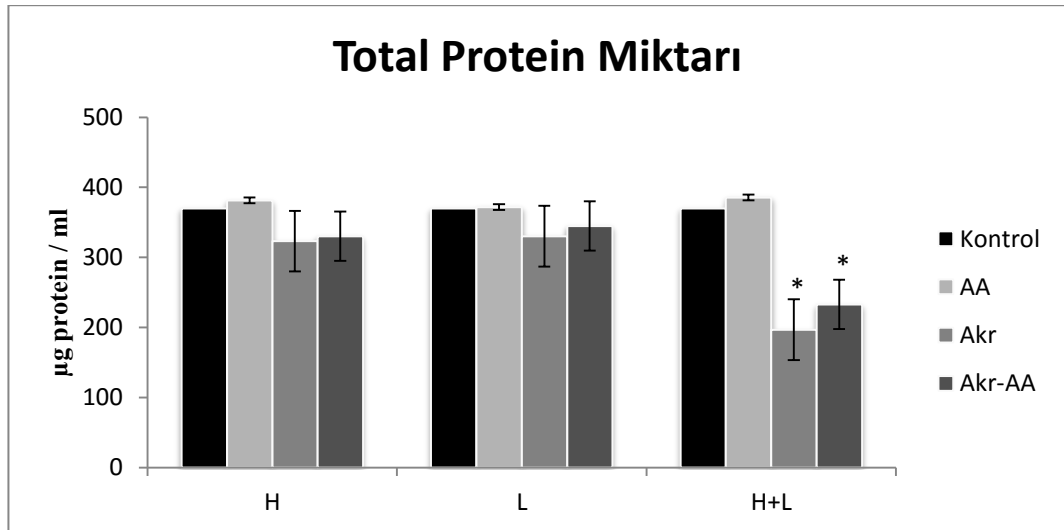
	% Spermatogonyu m	% Primer Spermatosit	% Sekonder Spermatosit	% Erken Spermatid
Kontrol	28,02811 ± 1,42	55,47281 ± 2,65	12,38816 ± 1,31	4,108358 ± 0,32
AKR-H	30,52205 ± 1,37*	61,41647 ± 1,52*	5,381208 ± 1,30*	2,677643 ± 0,76*
AKR-L	30,12752 ± 3,16*	61,46618 ± 3,27*	5,714956 ± 1,26*	2,68854 ± 0,47*
AKR-HL	32,98168 ± 3,41*	62,43034 ± 3,25*	2,564413 ± 0,62*	2,020715 ± 0,59*
AA-H	27,99453 ± 1,65	55,39512 ± 2,19	12,42125 ± 1,18	4,18651 ± 0,27
AA-L	28,09753 ± 1,39	55,14975 ± 2,31	12,52305 ± 1,23	4,227047 ± 0,31
AA-HL	28,11593 ± 1,53	54,95185 ± 2,14	12,63576 ± 0,92	4,293845 ± 0,29
Akr AA- H	31,19643 ± 1,39*	60,2981 ± 3,25*	5,715236 ± 1,21*	2,787514 ± 0,68*
Akr AA-L	30,35881 ± 1,43*	61,04157 ± 3,19*	5,724633 ± 1,27*	2,872085 ± 0,54*
Akr AA-HL	33,95757 ± 1,51*	60,92257 ± 3,23*	2,915894 ± 1,35*	2,201072 ± 0,48*

4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.4.1. Total Protein Miktarı

Akrilamid ve askorbik asidin hamilelik, laktasyon ve her iki dönemde de ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı bireylerin testis dokularıyla oluşturulan kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanarak hesaplanan total protein miktarı, Şekil 4.4.1'de verilmiştir.

Tüm dönemlerde yalnızca askorbik asit uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre total protein miktarında anlamlı bir fark görülmedi. Hamilelik dönemi ve laktasyon döneminde akrilamidin tek başına ve askorbik asitle birlikte uygulandığı gruplar, total protein miktarı bakımından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.4.1). Hem hamilelik hem de laktasyon dönemleri boyunca akrilamidin tek başına ve askorbik asitle birlikte uygulandığı gruplarda ise kontrol grubuna göre total protein miktarında anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 4.4.1). Benzer bir şekilde hem hamilelik hem de laktasyon dönemleri süresince akrilamidin tek başına ve askorbik asitle birlikte uygulandığı gruplarda, yalnızca hamilelikte ve yalnızca laktasyonda akrilamidin tek başına ve askorbik asitle birlikte uygulandığı gruplara göre ise anlamlı bir azalma gösterdiği belirlendi (Şekil 4.4.1).



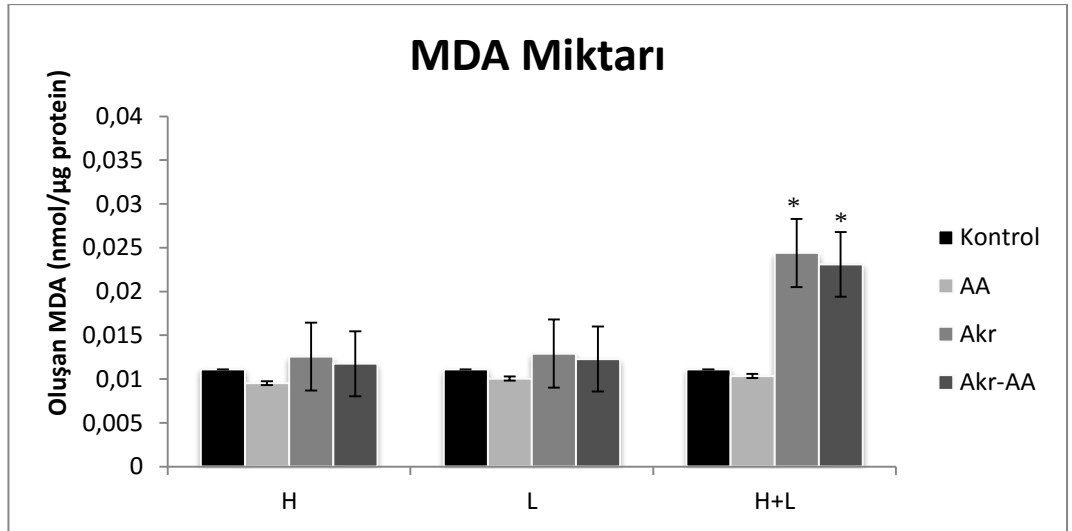
Şekil 0.4.1: Kontrol ve Deney Gruplarında Testisteki Total Protein Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.

4.4.2. Lipit Peroksidasyonu

Akrilamid ve askorbik asidin hamilelik, laktasyon ve her iki dönemde de ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı bireylerin testis dokularıyla oluşturulan kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan malondealdehit (MDA) değerleri, Şekil 4.4.2'de verilmiştir.

Tüm dönemlerde yalnızca askorbik asit uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre MDA miktarında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.4.2). Akrilamid ve askorbik asidin tek başına ve birlikte uygulandığı tüm deney gruplarında hamilelik ve laktasyon dönemi dışında tüm deney gruplarında MDA miktarı, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.4.2). Hamilelik ve laktasyon dönemlerinde ise akrilamidin tek başına ya da askorbik asitle birlikte uygulandığı gruplarda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir artış belirlendi (Şekil 4.4.2).



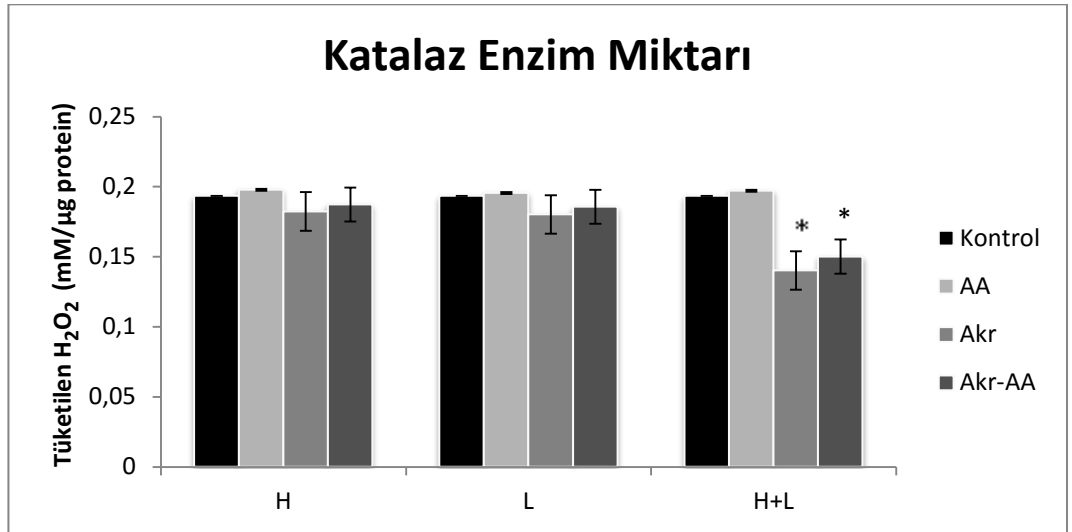
Şekil 4.4.2: Kontrol ve Deney Gruplarında Testiste Oluşan MDA Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.

4.4.3. Katalaz Miktarı

Akrilamid ve askorbik asidin hamilelik, laktasyon ve her iki dönemde de uygulandığı bireylerin testis dokularıyla oluşturulan kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanarak hesaplanan katalaz enzim miktarı, Şekil 4.4.3'de verilmiştir.

Tüm dönemlerde yalnızca askorbik asit uygulanan gruplarda katalaz enzim miktarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.4.3). Akrilamidin tek başına ve askorbik asitle birlikte hamilelik döneminde ya da laktasyon döneminde uygulandığı gruplar, katalaz enzim miktarı bakımından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.4.3). Ancak hem hamilelik hem de laktasyon dönemleri boyunca akrilamidin tek başına ya da askorbik asitle birlikte uygulandığı gruplarda, kontrol grubuna göre katalaz enzim miktarında anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.3: Kontrol ve Deney Gruplarında Testisteki Katalaz Enzim Miktarı.

*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çevresel birçok etken, erkek üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilerde bulunarak kalıcı hasara ve kısırlılığa yol açabilmektedir (Hess, 1999). Endüstriyel ürünlerle ve besinlerle birlikte alınan maddeler, bu etkenlerin başlıcalarıdır (Saradha ve Mathur, 2006; Wong ve Cheng, 2011). Besinlerle alınan toksik etkili maddeler, çeşitli amaçlarla kullanılan katkı maddeleri ya da besinlerin tüketime hazırlanırken yüksek ısı işlem görmesi sonucunda oluşan furan ve akrilamid gibi maddelerdir (Studer ve diğ., 2004; Wenzl ve diğ., 2007; Crews ve diğ., 2007). Ayrıca bu maddeler plasenta ve anne sütüyle anneden yavrulara geçebilmekte ve toksik etki oluşturabilmektedirler (Sonawane ve diğ., 1995; Sörgel ve diğ., 2002; Erkekoğlu ve Baydar, 2010).

Akrilamid, hem endüstriyel kullanımı oldukça yaygın hem de karbonhidrat içerikli besinlerin yüksek ısı işlem görmesi sonucunda besinlerde doğal olarak oluşan; nörotoksik, kanserojenik ve üreme sistemi üzerine toksik etkisi olan bir maddedir (Friedman, 2003; Boon ve diğ., 2005; Claus ve diğ., 2008; Parzefall ve diğ., 2008; Annola ve diğ., 2008). Tareke ve diğerlerinin (2002) yüksek ısı işlem gören besinlerin yüksek miktarlarda akrilamid içerdiğini göstermelerinden sonra, yapılan birçok çalışmayla besinlerdeki akrilamid miktarı, akrilamidin kimyasal oluşum tepkimeleri,metabolizması ve toksisitesi ortaya konulmuştur (Lingnert ve diğ., 2002; Kirman ve diğ., 2003; Taeymans ve diğ., 2004; Besaratinia ve Preifer, 2007; Parzefall ve diğ., 2008). Tyl ve diğerlerinin (2000) çalışmalarıyla akrilamidin üreme sistemi üzerine toksik etkisinin gözlemlendiği en düşük doz günlük 2-5 mg/kg olarak belirlenmiştir. Akrilamid, sperm sayısını azaltarak, seminifer tübüllerde vakuolleşmeye ve geç spermatidlerde dejenerasyona ve farklı evrelerdeki germ hücrelerinde DNA hasarına yol açarak erkek üreme sistemi üzerine etkisini göstermektedir (Sakomoto ve diğ., 1986; Sublet ve diğ., 1989; Sega ve diğ., 1990; Tyl ve diğ., 2000; Ma ve diğ., 2011). Ayrıca üreme başarısını erkek sıçanlara akrilamid uygulanması sonucunda gösterildiği gibi çiftleşme-dölleme yeteneğini ve hamileliğin sürdürülmesi oranlarını azaltarak olumsuz olarak etkilemektedir (Dearfielt ve diğ., 1995; Friedman ve diğ., 1999; Exon, 2006). Akrilamidin ergin bireylerdeki pek çok etkisinin yanı sıra, düşük molekül ağırlığı ve

suda yüksek çözünürlüğü nedeniyle dişi bireylere hamilelikleri ve laktasyonları süresince akrilamid uygulandığında, yavrularda doğum anormalliklerinin arttığı, organ ağırlıklarının azaldığı ve organlarda morfolojik değişimlerin görüldüğü, akrilamidin sinir sistemi ve üreme sistemi gelişiminde gerilemeye yol açtığı bilinmektedir (Friedman ve diğ., 1999; Wise ve diğ., 1995; Tyl ve diğ., 2000; Shipp ve diğ., 2006; Takahashi ve diğ., 2008; 2009; 2011).

Askorbik asit, omurgasızlarda, balıklarda, kuşların ve memelilerin bir kısmında sentezlenemezken; amfibiler, sürüngenler ve bazı kuşlarda ile memelilerde sentezlenebilir (Isherwood ve diğ., 1954; Grollman ve diğ., 1957). Primatlarda, guinea piglerinde ve yarasalarda biyosentezini katalizleyen karaciğer enzimlerinden biri olan L-glunolakton oksidazın yokluğu nedeniyle sentezlenemez; dolayısıyla bu canlılar askorbik asiti esansiyel olarak almak zorundadır (Grollman ve Lehninger, 1957; Nishikimi ve Yagi, 1996; Linster ve Schaftingen, 2007). Askorbik asit, sodyum bağımlı aktif taşımayla ince bağırsaktan emilmekte ve kan plazmasına serbest bir anyon olarak taşınmaktadır (Horning ve diğ., 1981). Dokularda oldukça yaygın dağılımı olan askorbik asit, hipofiz bezi, adrenal bez ve gonadlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Davis ve diğ., 1991; Das ve diğ., 2006). İnsan, sıçan ve farelerde, günlük 500-1000 mg askorbik asidin oral olarak kullanımının bağışıklık sisteminin fizyolojisinin iyileştirilerek etkisinin güçlendirilmesinde, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi kronik hastalıkların tedavisinde olumlu sonuçlar verdiği bilinmektedir. Ayrıca askorbik asit, erkek üreme sistemi üzerine olumlu etkileri olan temel bir antioksidandır (Cameron ve Pauling, 1979; McDowell, 1989; Enstrom ve diğ., 1992; Hemila, 1992; Hoffer ve Pauling, 1993; Carr ve Frei, 1999; Lenton ve diğ., 2003; Chen ve diğ., 2005; Hoffer ve diğ., 2008; Basnet, 2010).

Askorbik asit erkeklerde, seminifer tübüllerinin bazal lamina yapısında bulunan temel kollajenler olan, kollagen I ve kollagen IV'ün biyosentezinin ve steroidogenezin hidroksilasyon basamağının gerçekleştirilmesinde işlevseldir (Luck ve diğ., 1995). Ayrıca DNA, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar gibi biyolojik makromoleküllerin OH⁻, H₂O₂, NO benzeri serbest oksijen radikalleri ile oksidasyonunun önlenmesinde veya azaltılmasında önemli işlevleri vardır (Mukhopadhyay ve diğ., 1994; May, 1999; Young ve Woodside, 2001). Askorbik asit yokluğunda ya da yetersizliğinde sperm sayısında,

sperm motilitesi ve aglutinasyonunda azalma, anormal sperm sayısında ise artma görülmektedir (Dawson ve diğ., 1990). Dişilerde ise yumurtalıkların yeniden düzenlenmesi, foliküler-luteal döngü boyunca kollagen sentezinin gerçekleşmesi ve progesteron, oksitosin hormonlarının sentezi üzerine etkilidir (Luck ve diğ., 1995).

Plasentayla ve anne sütüyle yavrulara geçebilen suda çözünür bir vitamin olan askorbik asidin hamilelik ve laktasyon dönemlerinde etkisi üzerine birçok çalışma bulunmaktadır (Frohberg ve diğ., 1973; Allave ve diğ., 1976; Norkus ve diğ., 1981; Zalani ve diğ., 1989; Baydas ve diğ., 2002). Alleve ve diğerleri (1976) çalışmalarında sıçanlara ve hamsterlere oral olarak günlük 50, 150, 450 mg/kg ve guana piglere hamilelikleri boyunca 400 mg/kg askorbik asit uygulanmışlar ve askorbik asidin spontan emilimi ile yavruların hayatta kalımında anlamlı bir fark yaratmadığını belirlemişlerdir. Frohberg ve diğerlerinin (1973) hamilelikleri boyunca, sıçanlara günlük 150-1000 mg/kg ve farelere günlük 250-1000 mg/kg askorbik asit uyguladıkları çalışmalarının sonucunda bu uygulamaların herhangi bir etkiye yol açmadığını saptamışlardır (Frohberg ve diğ., 1973). Ayrıca yüksek dozlarda (2 g, 3 g, 5 g, 8 g, 10 g) askorbik asit uygulamalarının sıçanlar, fareler ve guinea pigleri üzerine etkisinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Lang, 1965; Hanck, 1982; EVM, 2002). Lang ve diğerlerinin (1965) sıçanlara ve guinea piglere askorbik asit uyguladıkları çalışmalarında günlük 10 g/kg askorbik asit uygulamasının toksik etki göstermeyen en yüksek doz olduğunu rapor etmişlerdir. Hanck ve diğerleri (1982) askorbik asidin farelerdeki oral toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmalarının sonucunda askorbik asidin LD₅₀ değerinin 8021 mg/kg olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca toksik etkiye yol açmayan en yüksek doz, uzun dönemde günlük 2g, kısa dönemde ise 3 g olarak belirlenmiştir (EVM, 2002).

Üreme ve gelişmenin desteklenmesi, endüstriyel ve besinlerle alınan maddelerin neden olduğu toksisite ve oksidatif hasarın iyileştirilmesi ile kronik hastalıkların tedavisi amacıyla oral olarak günlük en az 500 mg/kg askorbik asit alınması önerilmektedir (Basnet, 2010). Turuçgiller ve birçok meyve ile başta yeşil yapraklı sebzeler olmak üzere birçok sebzelerin içeriğinde bol miktarda askorbik asit bulunmasına rağmen, askorbik asidin yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlılığını kaybederek bozulmasından kaynaklı modern tarım ve işleme yöntemlerinin uygulanmasıyla

besinlerin içerdikleri askorbik asit miktarı azalmaktadır. Bu nedenle besinler ile günlük 500 mg/kg ve üzeri askorbik asit alınması imkansız hale gelmektedir (Basnet, 2010). Dolayısıyla özellikle hamilelik ve laktasyon döneminde olan kadınların ve kronik hastalıkları olanların besinlere ek olarak günlük 1000 mg askorbik asidi oral olarak almaları önerilmektedir (Basnet, 2010).

Akrilamid ve askorbik asidin ayrı ayrı testis ağırlığı ve gonadosomatik indeks üzerine etkileriyle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Hsu ve diğ., 1998; Sönmez ve diğ., 2005; Takahashi ve diğ., 2009; 2011; Ji ve diğ., 2012). Takahashi ve diğerlerinin (2009) dişi sıçanlara hamileliğin 6. gününden başlayarak laktasyon döneminin sonuna kadar 25, 50, 100 ve 200 ppm akrilamid uyguladıkları çalışmalarında, 50 ppm ve daha yüksek dozlarda erkek yavrularda vücut ağırlığının anlamlı olarak azaldığı, belirlenmiştir. Dişi sıçanlara hamileliğin 7. gününden doğuma kadar ve hamileliğin 7. gününden laktasyonun sonuna kadar 10 mg/kg akrilamidin oral olarak uygulandığı başka bir çalışma ile hamilelik ve hamilelikle birlikte laktasyon dönemlerinde akrilamid alan yavruların vücut ağırlıklarının azaldığı saptanmıştır. Takahashi ve diğerlerinin (2011) çalışmalarında, laktasyon dönemi sonunda ve ergin döneminde erkek sıçanlara, 50, 100, 200 ppm akrilamid içme suyu ile birlikte dört hafta süresince uygulanarak bireylerin gonadosomatik indeksi incelenmiş ve 100, 200 ppm dozlarında yavru grubunun gonadosomatik indekslerinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür.

Ji ve diğerleri (2012) sekiz haftalık erkek CD1 farelerine ayrı ayrı olmak üzere intraperitoneal olarak 24 saatte bir 2 mg/kg kadminyum klorür ($CdCl_2$), her 8 saatte bir ise 100 mg/kg askorbik asitve $CdCl_2$ ile askorbik asit uygulamışlardır. 24 saat sonunda alınan testis örneklerinde, $CdCl_2$ 'ün germ hücrelerinde apoptozu uyardığı ve testis ağırlığı ile gonadosomatik indekste anlamlı bir azalmaya neden olduğunu bununla birlikte yalnız askorbik asit uygulanan grupta, kontrol grubuna göre germ hücrelerinde apoptoz, testis ağırlığında ve gonadosomatik indekste anlamlı bir fark olmadığını görmüşlerdir. Her iki maddeyi birlikte uyguladıkları gruplarda ise, germ hücrelerinde apoptoz ve testis ağırlığı ile gonadosomatik indekste artışın yalnızca $CdCl_2$ uygulanan gruba göre azaldığını belirlemişlerdir. Hsu ve diğerleri (1998) ise çalışmalarında kurşun toksisitesine karşı vitamin C ve vitamin E'nin ayrı ayrı ve birlikte etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada ergin Sprague-Dawley sıçanlara içme suyuyla altı hafta

süresince 500 mg/L vitamin C uyguladıkları ve 10 mg/kg kurşun asetat ile birlikte 500 mg/L vitamin C uyguladıkları gruplarda vücut ağırlıkları ile epididimis ağırlıklarında anlamlı bir fark gözlememişlerdir. Sönmez ve diğerleri (2005) çalışmalarında ise ergin sıçanlara içme suyula birlikte günde 250 mg/kg ve 500 mg/kg olmak üzere iki farklı doz askorbik asidi sekiz hafta boyunca uygulamışlardır. Her iki uygulamada da kontrol grubuna göre bireylerin vücut ile testis ağırlıklarında ve spermatozoon hareketliliğinde anlamlı bir değişim bildirmemişlerdir (Sönmez ve diğ., 2005).

Çalışmamızda, dişi farelere 14 mg/kg akrilamid, hamilelik ve/veya laktasyon dönemlerinde uygulanmıştır. Akrilamidin hamilelik döneminde ve hamilelik dönemiyle birlikte laktasyon döneminde uygulandığı grupların erkek yavrularının gonadosomatik indeksinde azalma görülmesi, daha önce yapılan çalışmaları desteklemektedir (Takahashi ve diğ., 2009; Allam ve diğ., 2011; Takahashi ve diğ., 2011). Yaptığımız çalışma ile akrilamide ek olarak 1,5 g/kg askorbik asit uygulanan gruplar, yalnızca akrilamid uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında gonadosomatik indekste, Ji ve diğerlerinin (2012) çalışmalarından farklı ancak Hsu ve diğerleri (1998) ile Sönmez ve diğerlerinin (2005) çalışmalarına benzer şekilde askorbik asidin iyileştirici bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Akrilamidin farklı dönemlerde uygulanmasıyla, deney hayvanlarında testis bağ dokusunda dejenerasyon, atrofik seminifer tübülleri, seminifer tübüllerin lümenine atılan spermatogenik hücreler ve spermatogenik hücrelerde vakuolleşme görülmüştür (Wang ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2005 a; b; Takahashi ve diğ., 2008; 2009; 2011; Hamdy ve diğ., 2012; Takami ve diğ., 2012). Wang ve diğerlerinin (2005) çalışmalarında, 10 mg/kg akrilamidin ergin erkek bireylere sekiz hafta süresince uygulanması sonucunda germinal epitel yüksekliğinde azalma ve spermatogenik hücrelerde vakuolleşme gözlemlendiği bildirilmiştir. Yang ve diğerleri (2005a) ergin bireylere beş gün boyunca 5, 10, 15, 30, 45 ve 60 mg/kg akrilamidi oral olarak uygulamalarıyla seminifer tübüllerde multinükleer dev hücreler, spermatositlerde vakuolleşme ve seminifer tübüllerde apoptotik hücreler saptamışlardır. Yang ve diğerlerinin (2005b) başka bir çalışmalarında ise ergin erkek farelere günlük 60 mg/kg akrilamid oral olarak uygulanan bireylerin testisleri incelenmiş ve spermatogenik hücrelerde dejenerasyon, multinükleer dev hücreler ve bağ dokusunda dejenerasyon belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise

ergen sıçanlara 5, 10, 15mg/kg akrilamid, sekiz hafta boyunca oral olarak uygulanmış ve 5 mg/kg akrilamid uygulanan bireylerde spermatogonyumlarda dejenerasyon, 10 mg/kg akrilamid uygulanan bireylerde lümenlerinde spermatid bulunmayan seminifer tübüller ve 15 mg/kg akrilamid uygulanan bireylerde ise primer spermatosit evresinde tutuklu kalan seminifer tübüller görülmüştür (Hamdy ve diğ., 2012).

Takahashi ve diğerlerinin (2008) çalışmalarında hamilelik ve laktasyon dönemlerinde 100 ve 200 ppm akrilamid uygulanması sonucunda seminifer tübüllerde spermatogenik hücre tabakalarında azalma görülmüş bununla birlikte, epididimis histolojisinde ise bir değişiklik gözlenmemiştir. Yaptıkları başka bir çalışmada Takahashi ve diğerleri (2009), 100 ppm akrilamidi içme suyuyla dişi bireylere hamilelik ve laktasyon dönemleri boyunca, doğan yavrulara ise 50 mg/kg akrilamidi intraperitoneal olarak uygulamış ve testiste spermatogenezin durduğu tübüllerin olduğunu göstermişlerdir. Takahashi ve diğerleri (2011) başka bir çalışmalarıyla ergenlik dönemi öncesindeki erkek bireylere, 100 ve 200 ppm akrilamidi oral olarak uygulamış ve sonuç olarak her iki doz uygulamasında da erken spermatid sayısında azalma ve erken spermatidlerde dejenerasyon, seminifer tübül lümenine atılan spermatogenik hücreler ve atrofik tübüller saptanmıştır. Takami ve diğerleri (2012) dişi sıçanlara (F334) hamilelik dönemlerinden başlayarak üç haftalık laktasyon dönemlerinin sonuna kadar içme suyuyla birlikte 10, 20 ve 40 ppm akrilamid uygulamışlardır. Laktasyon döneminin sona ermesiyle annelerine uygulanan dozlarla aynı olmak üzere yavrulara üç hafta süreyle daha içme suyuyla birlikte akrilamid uygulamasına devam etmişlerdir. Deneylerinin sonunda akrilamidin neden olduğu doku hasarını belirlemek amacıyla yavrulardan beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve testis örnekleri alarak bu örnekleri histopatolojik olarak incelenmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda 40 ppm akrilamid uygulanan bireylerin testislerinin seminifer epitelinde dejenerasyona, atrofik tübüllere ve nekroza rastlamışlardır.

Uzunhisarcıklı ve diğerleri (2007) yaptıkları çalışmalarında bir insektisit olan metil parathionun neden olduğu akut, subakut ve subkronik testis hasarına karşı C vitamini ve E vitaminin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 90 günlük Wistar sıçanlara oral gavaj yoluyla günlük 0,28 mg/kg metil parathion ve 200 mg/kg C vitamini ile 200 mg/kg E vitamini, ayrı ayrı ve birlikte uygulanmıştır. 24 saat, 4. hafta ve 7. hafta

sonunda alınan testis örneklerinde sperm morfolojisi ve histopatolojisini incelenmişlerdir. Vitaminlerin uygulandığı grupla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Metil parathion ile vitaminlerin birlikte uygulandığı grupta ise anormal sperm sayısında ve testisteki histopatolojik bulgularda anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Bu nedenlerle Uzunhisarcikli ve diğerleri, vitamin C ve vitamin E nin metil parathionun testis toksisitesini azalttığı ancak tam bir koruyucu etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda annelerine hamilelik ve/veya laktasyon dönemlerinde 14 mg/kg akrilamid uygulanan erkek bireylerin testislerinde multinükleer dev hücrelerin görülmesi Yang ve diğerlerinin çalışmalarıyla (2005a; 2005b) benzerlik gösterirken; hamilelikte ve laktasyonda akrilamid uygulanan grupların bireylerinde testis bağ dokusunda dejenerasyon, atrofik tübüller ve primer spermatosit evresinde tutuklu kalan tübüllerin görülmesi, daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Sakamoto ve diğ., 1988; Wang ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2005; Takami ve diğ., 2012). Ayrıca Takahashi ve diğerlerinin (2008 ve 2009) yaptıkları çalışmalara benzer olarak çalışmamızda akrilamid uygulamasının primer spermatosit evresinde tutuklu kalan tübüllere neden olduğu görülmüştür. Yaptığımız çalışma ile akrilamide ek olarak 1,5 g/kg askorbik asit uygulanan gruplar, yalnızca akrilamid uygulanangruplarla karşılaştırıldığında, histopatolojik bulgularda Uzunhisarcikli ve diğerlerinin (1997) çalışmalarına benzer olarak askorbik asidin iyileştirici bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Akrilamidin farelerde testiste kaspaz 3 yolağını etkileyerek germ hücrelerini apoptoza götürdüğünü (Zhang ve diğ., 2009) ve Leydig hücre sayısını azalttığını (Sakamoto ve Hashimoto, 1986; Yang ve diğ., 2005; Camacho ve diğ., 2012; Hamdy ve diğ., 2012) gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yang ve diğerlerinin (2005b) ergin sıçanlara 0,5, 15, 30, 45, 60 mg/kg akrilamid uyguladıkları çalışmalarında 0,5 mg/kg dışındaki tüm dozlarda Leydig hücre miktarını ve kaudal epididimiste sperm miktarını azalttığı gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise 5 ve 10 mg/kg akrilamid uygulamasıyla Leydig hücre miktarında artma ve epididimisteki sperm sayısında ise azalma görülmüştür (Wang ve diğ., 2010). Zhang ve diğerlerinin (2010) ergin farelere 60 gün süresince 10 mg/kg akrilamid uyguladıkları çalışmalarında 100 Sertoli hücresi başına

düşen spermatogonyum miktarı ve geç spermatid miktarında azalma görülürken; primer spermatosit ve erken spermatid miktarında ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmediği bulunmuştur. Yapılan bir başka çalışmada ise ergenlik öncesi dönemde ve ergenlik döneminde 100 ppm akrilamid uygulamasıyla spermatidlerde DNA hasarı belirlenmiştir (Takahashi ve diğ., 2011). Camacho ve diğerleri (2012) 2, 5, 10 ve 50 mg/kg akrilamidi 14 gün süreyle oral olarak uygulayarak doza bağlı Leydig hücre sayısında azalma bildirmişlerdir.

Ural ve diğerleri (2006) akut olarak uygulanan diazinonun neden olduğu testis dokusundaki toksik değişikliğe vitamin C ve Vitamin E nin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada 335 mg/kg diazinon oral olarak, 200 mg/kg vitamin C intraperitoneal ve 150 mg/kg vitamin E ise intramuskular olarak Wistar albino erkek sıçanlara uygulanmışlardır. Vitamin C ve Vitamin E nin testis dokusunda bu hasara (seminifer epitel yapısındaki düzensizlik ve spermatogenik hücre sayısındaki azalma) karşı koruyucu olmadığını belirtmişlerdir (Ural ve diğ. 2006).

Çalışmamızda hamilelik ve/veya laktasyon dönemlerinde 14 mg/kg akrilamid uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre, spermatogonyum, primer ve sekonder spermatosit, erken spermatid ve Leydig hücre miktarlarında azalma görülmesi, Zhang ve diğerlerinin (2009) çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir. Wang ve diğerlerinin (2005) çalışmalarında Leydig hücresi miktarında artma bildirilirken; Yang ve diğerlerinin (2005) ve Camacho ve diğerlerinin (2012) çalışmalarında çalışmamızda olduğu gibi Leydig hücresi miktarında azalma belirlenmiştir. Ayrıca bununla birlikte çalışmamızda, spermatogonyum ve primer spermatosit miktarlarında kontrol grubuna göre azalma saptanmıştır. Hamilelik ve hem hamilelik hem de laktasyon dönemlerinde akrilamid uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre Sertoli hücre sayısında, Takahashi ve diğerlerinin (2005) çalışmalarından farklı olarak azalma görülmüştür. Yaptığımız çalışma ile akrilamide ek olarak 1,5 g/kg askorbik asit uygulanan gruplar, yalnızca akrilamid uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında spermatogenik hücre, Sertoli hücresi ve Leydig hücre sayılarında, Ural ve diğerlerinin (2006) çalışmalarına benzer olarak askorbik asidin iyileştirici bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Dejenere hücre varlığı ve sayısı, dokuda meydana gelen hasarı tanımlamakta kullanılmaktadır. Histolojik incelemelerde düzensiz nükleus yapısı, parçalı nüklear

kromatin varlığı, hücre içinde vakuolleşmenin görülmesi ve hücrenin sitoplazmasında oluşan büzülme ya da şişme, dejenere hücrelerin, dokuda bulunan sağlıklı hücrelerden ayırt edilmesinde kullanılan farklılıklardır (Rousen ve Runge, 1973). Yang ve diğerlerinin (2005) ergin sıçanlara 60 mg/kg akrilamidi oral olarak 10 gün süreyle uygulanması sonucunda testiste dejenere hücreler görmüşlerdir.

Çalışmamızda hamilelik ve/veya laktasyon dönemlerinde 14 mg/kg akrilamid uygulanan grupların testis kesitleri incelendiğinde Yang ve diğerlerinin (2005) çalışmalarına benzer olarak, dejenere hücre sayısında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Yaptığımız çalışma ile akrilamide ek olarak 1,5 g/kg askorbik asit uygulanan gruplar, yalnızca akrilamid uygulanan gruplarla, karşılaştırıldığında dejenere hücre sayısına askorbik asidin iyileştirici bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Çalışılan maddelerin incelenen dokuda meydana getirdiği hasarı belirlemek için dokuda hangi hücrelerin hangi evrelerde etkilendiğinin saptanması, maddenin doku üzerine etkisinin ortaya çıkartılabilmesi için önemlidir (Creasy, 2003). Bu nedenle toplam germ hücresi başına düşen germ hücrelerinin her bir evresindeki toplam hücre sayılarının oranlanmasıyla elde edilen %spermatogenik hücre oranları ve Sertoli hücresi başına düşen toplam germ hücresi oranı kullanılarak elde edilen testis verimliliği, çalışılan maddenin spermatogenezin hangi evresinde nasıl etki ettiğinin saptanmasında önemli kriterlerdir. Gupta ve diğerleri (2007) ergin erkek farelere içme suyula birlikte 2, 4, 6 ppm sodyum florürü uyguladıkları çalışmalarının sonucunda testisteki tüm spermatogenik hücre tiplerinde azalma belirlemişlerdir. Bu çalışmada, uygulanan doza bağlı spermatogenik hücre sayısındaki azalmanın, spermatogonyumlarda %44, %47 ve %50; sekonder spermatositlerin %49, %53 ve %59 oranlarında; erken spermatidlerde ise en yüksek dozda, %72 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise, ergin farelere 15 gün süreyle intraperitoneal olarak 25 mg/kg doxorubicin uygulanmış ve çalışma sonucunda başta sekonder spermatosit oranı olmak üzere tüm germ hücre tiplerinin oranında azalma saptamışlardır (Adbella ve Ahmed, 2009).

Çalışmamızda hamilelik, laktasyon ve hem hamilelik hem de laktasyon dönemlerinde 14 mg/kg akrilamid uygulanan grupların erkek yavrularında, sekonder spermatosit ve erken spermatid % hücre oranlarında Gupta ve diğerleri (2007) ile Adbella ve Ahmed' in (2009) benzer olarak, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Farklı

evrelerdeki seminifer epitel hücrelerinin toplam seminifer epitel hücrelerine oranları incelendiğinde spermatogenezin spermatogonyum ve primer spermatosit evrelerinde kaldığı görülmüştür. Bu bulgu, Sakamoto ve Hashimoto (1986), Yang ve diğerleri (2005), Tahashi ve diğerleri (2008, 2009, 2011), Onu ve diğerleri (2010) nin çalışmaları sonucunda elde ettikleri spermatogenik hücre sayılarıyla benzerlik göstermektedir. Yaptığımız çalışma ile akrilamide ek olarak 1,5 g/kg askorbik asit uygulanan gruplar, yalnızca akrilamid uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında % hücre oranlarında askorbik asidin iyileştirici bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Reaktif oksijen türleri, birçok biyolojik makromoleküle (DNA, proteinler, lipidler) bağlanarak hücrelerde oksidatif hasara yol açmaktadır (Fraga ve diğ., 1991). Membran lipidlerinin reaktif oksijen türlerince okside edilmesi sonucunda oluşan lipid peroksidasyon ürünleri, membran bütünlüğü ve geçirgenliğini bozmaktadır (Gutteridge ve diğ., 1995; Juranek ve diğ., 2005). Dokuda oluşan oksidatif hasarın belirlenmesinde lipid peroksidasyon ürünlerinden biri olan malondialdehit miktarı değerlendirilir. Akrilamidin lipid peroksidasyonuna neden olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Yousef ve diğ., 2006; Zhang ve diğ., 2009; 2010; Hamdy ve diğ., 2012). Yousef ve diğerleri (2006) ergin erkek sıçanlara 0,5, 5, 25, 50, 250 ve 500 µg akrilamidi 10 hafta süreyle oral olarak uygulamışlar ve 10 haftanın sonunda bireylerin karaciğer, beyin, akciğer, böbrek ve testis dokularında oluşan lipid peroksidasyonunu incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda 25 µg ve üzeri dozlarda akrilamid uygulamasıyla, testiste lipid peroksidasyonun kontrol grubuna göre arttığını görmüşlerdir (Yousef ve diğ., 2006). Zhang ve diğerlerinin (2010) farelere 10 mg/kg akrilamidi 60 gün boyunca uyguladıkları çalışmalarının sonucunda ise epididimisteki spermelerde lipid peroksidasyonu miktarının arttığı belirlenmiştir. Hamdy ve diğerleri (2012) sıçanlara 8 hafta süresince 5, 10 ve 15mg/kg akrilamid uyguladıkları çalışmalarının sonucunda plazmada oluşan lipid peroksidasyonu miktarında artış bildirmişlerdir. Zhang ve diğerlerinin (2009) bir başka çalışmalarında ise farelere 7 ve 14 gün boyunca 50 mg/kg akrilamid intraperitoneal olarak uygulanmış ve sonuç olarak testisteki lipid peroksidasyonu miktarında artma görülmüştür.

Askorbik asit testiste bulunan güçlü bir antioksidan olup reaktif oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasarı engeller ya da dokuda oluşan hasarı onarır (McDowell,

1989; Dawson ve diğ., 1990). Ayrıca redoks sistemlerine elektron verme özelliği ile lipid peroksidasyonunu önler, tokoferoksil radikalının tokoferole redüklenmesini sağlar ve hidrojen peroksit radikalının neden olduğu DNA hasarını engeller (Jialal ve Fuller, 1993). Gupta ve diğerleri (2004) çalışmalarında, kadmiyumun neden olduğu oksidatif hasara karşı askorbik asidin koruyucu etkisi araştırmışlardır. Çalışmalarında erişkin erkek sıçanlara farklı dozlarda (0, 13 ve 0, 15 mg/kg) kadmiyuma ek olarak 24 saatte bir olmak üzere toplam 48 saat süreyle 200 mg/kg askorbik asit uygulamışlardır. Sonuç olarak kadmiyuma ek olarak askorbik asit uygulanan gruplarda, tek başına kadmiyum uygulanan gruplara göre testis dokusunda lipid peroksidasyonu ve testosteron miktarında anlamlı azalma görmüşlerdir. Chang ve diğerleri (2007) çalışmalarında fare testisinde arseniğin neden olduğu toksisiteye karşı askorbik asidin koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlamışlardır. Bu çalışmada 20 ve 40 mg/L sodyum arsenik, 0,75 ve 1,5 g/L askorbik asit, ayrı ayrı ve birlikte olmak üzere beş hafta süresince içme suyuyla sekiz haftalık erkek farelere uygulamışlardır. Arseniğe ek olarak askorbik asit uygulanan gruplarda testikular testosteron ve MDA miktarlarında anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Sönmez ve diğerleri (2005) askorbik asidin testis dokundaki lipid peroksidasyonu ve testosteron konsantrasyonuna etkisini inceledikleri çalışmalarında, ergin sıçanlara içme suyuyla birlikte günde 250 mg/kg ve 500 mg/kg olmak üzere iki farklı doz askorbik asidi, sekiz hafta boyunca uygulamışlar ve her iki uygulama grubunda da kontrol grubuna göre kan plazmasında ve testisteki lipid peroksidasyonunda anlamlı bir azalma belirlemişlerdir (Sönmez ve diğ., 2005).

Çalışmamızda hamilelik ve laktasyon döneminde 14 mg/kg akrilamid uygulanan grubun bireylerinin testislerindeki lipid peroksidasyonu miktarında artış görülmesi, Yousef ve diğ. (2006), Zhang ve diğ. (2009), Hamdy ve diğ. (2012), Zhang ve diğ., (2010) çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Yaptığımız çalışma ile akrilamide ek olarak 1,5 g/kg askorbik asit uygulanan gruplar, yalnızca akrilamid uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında Gupta ve diğerleri (2004) ile Sönmez ve diğerlerinin (2005) çalışmalarından farklı olarak, Chang ve diğerlerinin (2007) çalışmalarına ise benzer olarak, testisteki lipid peroksidasyonunda askorbik asidin iyileştirici bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Dokularda reaktif oksijen türlerinin etkisiz hale getirilmesinde işlevsel olan birçok enzim bulunmaktadır (Sies, 1996). Bu enzimlerden biri olan katalaz, hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümü tepkimesini katalizleyerek hidrojen peroksitin ortadan kalkmasını sağlar (Goldman ve Blobel, 1978). Akrilamidin katalaz enzimi üzerine etkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (Zhang ve diğ., 2010; Camacho ve diğ., 2012). Zhang ve diğerlerinin (2010) çalışmalarında farelere 10 mg/kg akrilamid 60 gün süreyle oral olarak uygulamışlar ve çalışmalarının sonucunda testis dokusunun katalaz miktarında anlamlı bir değişime rastlamamışlardır. Camacho ve diğerleri (2012) 4 ve 8 mg/kg akrilamidi 60 gün süreyle içme suyuyla verdikleri çalışmalarında ise 8 mg/kg akrilamid alan grubun bireylerinin testislerinde katalaz gen miktarında artma bildirilmişlerdir. Çalışmamızda sadece hamilelik ve sadece laktasyon dönemlerinde 14 mg/kg akrilamid uygulanan gruplarda testisteki katalaz enzim miktarında anlamlı bir değişim görülmemesi, Zhang ve diğerlerinin (2010) çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte hamilelik ve laktasyon döneminde 14 mg/kg akrilamid uygulanan grupta testisteki katalaz enzim miktarında anlamlı bir azalma görülmesi akrilamidin uzun dönem uygulamalarında toksik etkisini daha fazla ortaya çıkarttığını düşündürmektedir. Yaptığımız çalışma ile akrilamide ek olarak 1,5 g/kg askorbik asit uygulanan gruplar, yalnızca akrilamid uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında testisteki katalaz enzimi miktarında askorbik asidin iyileştirici bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgulara göre akrilamid, gonadosomatik indeksin azalmasına; testiste bağ dokunun dejenerasyonu, multinükleer dev hücrelerin oluşması ve dejenere hücrelerle birlikte seminifer epitelde vakoulleşmelerin görülmesi gibi patolojilere neden olmaktadır. Ayrıca akrilamid testiste spermatogenik hücre sayısının azalmasına, dejenere hücre sayısının ve lipid peroksidasyonunun artmasına yol açmaktadır. Testisteki katalaz enzimi miktarının hamilelik ve laktasyon dönemi grubunda azalması ise akrilamidin antioksidan enzimler üzerine etkisini uzun sürede açığa çıkarttığını göstermektedir. Akrilamide ek olarak 1,5 g/kg askorbik asit uygulanan gruplar, yalnızca akrilamid uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında, testis dokusunda oluşan histopatolojik ve oksidatif hasara karşı askorbik asidin iyileştirici bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Agar, N.S, Sadrzadeh, S.M.H., Hallaway, P.E, Eaton, J.W., 1986, Erythrocyte Catalase A Somatic Oxidant Defense?, *The American Society for Clinical Investigation*, 77, 319-321.
- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R., 2008, Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update, *American Journal of Reproductive Immunology*, 59, 2–11.
- Aitken, R.J., Roman, S.D., 2008, Antioxidant systems and oxidative stress in the testes, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1,1,15-24.
- Aktaş, A., Ulkay, M.B., Bozkurt, H.H., 2008, The Effects of Genistein on the Cockerel Testis during Embryonic Development, *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 14, 2, 157-160.
- Allam, A., Gharee, A., Hamid, A., Baikry, A., Sabri, M.I., 2011, Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: Biochemical and morphological studies, *Toxicology and Industrial Health*, 27, 291–306.
- Alleva, F.R., Alleva, J.J., Balazs, T., 1976, Effect of large daily doses of ascorbic acid on pregnancy in guinea pigs, rats, and hamsters, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 35, 2, 393-395.
- Annola, K., keski-rahkonen, P., Vahakangas, K., Lehtonen, M., Simultaneous determination of acrylamide, its metabolite glycidamide and antipyrine in human placental perfusion fluid and placental tissue by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, 2008, *Journal of Chromatography, B*, 876, 191-197.
- Asard, H., May, M.J., Smirnoff, N., *Vitamin C Function and biochemistry in animals and plants*, 2003, Taylor & Francis, 1-85996-293-9.
- Bacha, J.W., Bacha, L.M., 2000, *Color Atlas of Veterinary Histology*, Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore, Maryland, 0-683-30618-9.
- Barber, B.J., Blake, N.J., 2006, *Reproductive physiology*, Elsevier, 357-406.
- Barnes, M.J. and Kodicek, E., 1972, Biological hydroxylation and ascorbic acid with special regards to collagen metabolism, *Vitamins and Hormones*, 30, 1-43.
- Basnet, P., 2010, Vitamin C: Prevention of Chronic Diseases and Optimal Doses, *Norsk Farmaceutisk Tidsskrift*, 1-24.

- Baydas, G., Karatas, F., Gursu, M.F., Bozkurt, H.A., Ilhan, N., Yasar, A., Canatan, H., 2002, Antioxidant Vitamin Levels in Term and Preterm Infants and Their Relation to Maternal Vitamin Status, *Archives of Medical Research*, 33, 276–280.
- Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D., Seaman, S.W., 2003, Acrylamide in Foods: Occurrence, Sources, and Modeling, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 802-808.
- Becalski, A., Lau, B.P., LEWIS, D., SEAMAN, S.W., 2002, Acrylamide in foods; occurrence, source, *Los Angeles CA. AOAC. Annual Meeting*, 22-26.
- Bellve, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'brien, D.A., Bhatnagar, Y.M., Dym, M., 1977, Spermatogenic Cells of the Prepuberal Mouse Isolation and Morphological Characterization, *The Journal of Cell Biology*, 74, 68-85.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997, Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 33, 20313–20316.
- Besaratinia, A., Preifer, G.P., 2007, Advance Access publication A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity, *Carcinogenesis*, 28, 519–528.
- Biedermann, M., Brem, S.B., Noti, A., Grob, K., 2002, Methods for Determining the Potential of Acrylamide Formation and Its Elimination in Raw Materials for Food Preparation, such as Potatoes, *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 1-12.
- Boon, P.E., Mula, A., Voetb, H., Donkersgoeda, G., Brettec, M., Klaverena, J., 2005, Calculations of dietary exposure to acrylamide, *Mutation Research*, 580, 143–155.
- Botelho, G.G.K., Bufalo, A.C., Boareto, A.C., Muller, J.C., Morais, R. N., Andrade, A.J.M., Lemos, K.R, Dalsenter, P.R., 2009, Vitamin C and Resveratrol Supplementation to Rat Dams Treated with Di(2-ethylhexyl)phthalate: Impact on Reproductive and Oxidative Stress End Points in Male Offspring, *Arch. Environ. Contam. Toxicology*, 57, 785–793.
- Brown, C.L., Michael, M.R., Hill, D, Keith, C., Bancroft, C., 1982, Qualitative and quantitative studies on the *in situ* adsorption, degradation and toxicity of acrylamide by the spiking of the waters of two sewage works and a river, *Water Research*, 579–591.
- Bull, R.J., Robinson, M., Laurie, R.D., Stoner, G.D., Greisiger, E., Meier, J.R, Stober, J., 1984, Carcinogenic Effects of Acrylamide in Sencar and A/J Mice, *Cancer Research*, 44, 107-111.
- Calleman, C.J., 1996, The Metabolism and Pharmacokinetics of Acrylamide: Implications for Mechanisms of Toxicity and Human Risk Estimation, *Drug Metabolism Reviews*, 28, 4, 527- 590.

- 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.
- Cameron, E., Pauling, L., Leibovitz, B., 1979, Ascorbic Acid and Cancer: A Review, *Cancer Research*, 9, 663-681.
- Carlson, G.P., Weaver, P.M., 1985, Distribution and binding of [¹⁴C] acrylamide to macromolecules in SENCAR and BALB/C mice following oral and topical administration, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 79, 2, 307-313.
- Carr, A.C., Frei, B., 1999, Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans Am. J. Clin. Nutr., 69, 1086–107.
- Chang, S.M., Jin, B., Youn, P., Park, C., Park, J.D., Ryu, D.Y., 2007, Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218, 196–203.
- Chaudiere, J., Iliou, R.F., 1999, Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 949-962.
- Chen, Q, Espey, M.G., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., Corpe, C.P., Buettner, G.R., Shacter, E., Levine, M., 2005, Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues, *PNAS*, 102, 38, 13604–13609.
- Claeys, W.L., Vleeschouwer, K.D., Hendrick, M.E., 2005, Kinetics of Acrylamide Formation and Elimination during Heating of an Asparagine-Sugar Model System, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9999-10005.
- Claeys, W.L., Vleeschouwer, K.D., Hendrick, M.E., 2005, Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide, *Trends in Food Science & Technology*, 16, 181-193.
- Claus, A., Carle, R., Schieber, A., 2008, Acrylamide in cereal products: A review, *Journal of Cereal Science*, 47, 118-133.
- Commhaire, F.H., Christophe, A.B., Zalata, A.A., Dooge, W.S., Mahmoud, A.M.A., Depuydt, C.E., The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men, 2000, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 63, 3, 159-165.
- Creasy, D.M., 1997, Evaluation of Testicular Toxicity in Safety Evaluation Studies: The Appropriate Use of Spermatogenic Staging, *Toxicologic Pathology*, 25, 2, 119-131.

- Creasy, D.M., 2001, Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity, *Toxicologic Pathology*, 29, 1, 64–76.
- Crews, C., Hasnup, S., Roberts, D.P.T., Castle, L., 2007, Factors affecting the analysis of furan in heated foods, *Food Additives and Contaminants, Supplement*, 24,S1, 108-113.
- Dargel, R., 1992, Lipid peroxidation-a common pathogenetic mechanism?, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 44, 4, 169–181.
- Dassarkar, S., Maiti, R., Ghosh, D., 2006, Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and Vitamin-E co-administration in the albino rat, *Reproductive Toxicology*, 22, 606-612.
- Davies, M.B., Austin, J.A., Partridge, D.A., 1991, *Vitamin C: It's Chemistry and Biochemistry*, Royal Society of Chemistry, 0-85186-333-7.
- Davies, K.J.A., 1987, Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals, *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 20, 9895-9901.
- Dawson, E.B., Harris, W.A., Powel, L.C., 1990, Relationship between ascorbic acid and male fertility, In "Aspects of Some Vitamins, Minerals and Enzymes in Health and Disease", (Ed by GH Bourne), World Review of Nutrition and Dietetic, 62, 1-26.
- Dearfield, K.L., Douglas, G.R., Ehling, U.H., Moore, M.M., Sega, G.A., Brusick, D.J., 1995, Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk, *Mutation Research*, 330, 71-99.
- Devasagayam, T.P., ve Tarachand, U., 1987, Decreased lipid peroxidation in the rat kidney during gestation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198, 273-80.
- Diplock, A.T., 1998, Defence Against Reactive Oxygen Species, *Free Rad. Res.*, 29, 463-467.
- 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, 199- 209.
- Dröge, W., 2002, Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiol. Rev.*, 82, 47-95.
- Dym, M., Fawcett D.W., 1970, The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartmentation of Seminiferous Epithelium, *Biology of Reproduction*, 3, 308-326.
- Ehmckel, J., Wistuba, J., Schlatt, S., 2006, Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives, *Human Reproduction Update*, 12, 3, 275-282.

- Enstrom, J.E., Kanım, L.E., Klein, M.A., 1992, Vitamin C Intake and Mortality among a sample of the united states population, *Epidemiology*, 3, 3, 194-202.
- EPA/635/R-07/009F, Toxicological Review of Acrylamide (CAS No. 79-06-1) In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), 2010, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Erdreich, L.S., Friedman, M.A., 2004, Epidemiologic evidence for assessing the carcinogenicity of acrylamide, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, 150-157.
- Erkekoğlu, P., Baydar, T., 2010, Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods, *Nutrition Research Reviews*, 1- 11.
- Evans, R.M., Currie, L., Campbell, A., 1982, Distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood in normal individuals and its relation to the plasma concentrations, *British Journal of Nutrition*, 47, 473-482.
- Ewing, L.L., Zirkin, B.R., Chubb, C., 1981, Assessment of Testicular Testosterone Production and Leydig Cell Structure, *Environmental Health Perspectives*, 38, 19-27.
- EXON, J.H., 2006, A Review of the Toxicology of Acrylamide, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9, 397-412.
- Fennell, T.R., Friedman, M.A., 2005, Comparison of Acrylamide Metabolism in Humans and Rodents, *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, Springer Science+Business Media, Inc., 109-116.
- Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Shigenaga, M.K., Helbock, H.J., Jacobs, R.A., Ames, B.N., 1991, Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 11003-11006.
- França, M.B., Panek, A.D., Eleuthero, E.C.A., 2007, Oxidative stress and its effects during dehydration, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146, 621-631.
- Frankel, E.N., 1985, Chemistry of Free Radical and Singlet oxidation of Lipids, *Prog. Lipid Res.*, 23, 197-221.
- Friedman, M., 2003, Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 16, 4504-4526.
- Friedman, M.A., Dulak, L.H., Stedham, M.A., 1995, A Lifetime Oncogenicity Study in Rats with Acrylamide, *Toxicol. Sci.*, 27, 1, 95-105.
- 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 offsprings., *Reprod. Toxicology*, 13, 511-520.

- Frohberg, H., Gleich, J., Kieser, H., 1973, Reproduction-toxicologic studies on ascorbic acid in mice and rats, *Arzneimittelforschung*, 8, 1081-1082.
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L., Strum, J.M., 2003, *Cell Biology and Histology*, Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore, Maryland, 0-7817-3310-3.
- 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.
- Gilbert, S.F., 2010, *Developmental Biology*, Ninth Edition, Sinauer Associates, Inc., 978-0878935581.
- Goldman, B.M. ve Blobel, G., 1978, Biogenesis of peroxisomes: Intracellular site of synthesis of catalase and uricase, *Proceedings in National Academic Science*, 75, 10, 5066-5070.
- Gopinathan, V., Miller, N.J., Milner, A.D., Rice-evans, C.A., 1994, Billirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma, *FEBS Letters*, 349, 197-200.
- Gökmen, V., Şenyuva, H.Z., 2007, Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction, *Food Chemistry* 103, 196-203.
- Griswold, M.D., 1998, The central role of Sertoli cells in spermatogenesis, *Cell and Developmental Biology*, 9, 411- 416.
- Grollman, A.P., Leninger, A.L., 1957, Enzymic synthesis of L-ascorbic acid in different animal species, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 69, 458-467.
- Grootegeod, J.A., Slep, M., Baarend, W. M., 2000, Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis, *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 14, 3, 331-343.
- Gupta, R.S., Kim, J., Gomes, C., Oh, S., Park, J., Im, W.B., Seong, J.Y., Ahn, R.S., Kwon, H.B., Soh, J., 2004, Effect of ascorbic acid supplementation on testicular steroidogenesis and germ cell death in cadmium-treated male rats, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 221, 57–66.
- Gutteridge, J.M.C., 1995, Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clin. Chem.*, 41, 12, 1819-1828.
- Hallwell, B., Aruoma, O.I., 1991, DNA damage by oxygen derived species, *Elsevier Science Publishers*, 281, 12, 9-19.
- Hallwell, B., Chirico, S., 1993, Lipid peroxidation: Its Mechanism measurement and significance, *Am.J.Clin.Nutr.*, 57, 715S-25S.
- Hallwell, B., Whiteman, M., 1998, Measurement of peroxynitrite scavengers, *Methods in Enzymology*, 301, 333–342.

- Hamdy, S.M , Bakeer, H.M, Eskander, E.F, Sayed, O.N, 2011, Effect of acrylamide on some hormones and endocrine tissues in male rats, *Human and Experimental Toxicology*, 1–9.
- Hammadeh, M.E., Alixides, F.A., Hamad, M.F., 2009, Reactive Oxygen Species and antioxidant in Seminal Plasma and Their Impact on Male Fertility, *International Journal of Fertility and Sterility*, 3, 3, 87-110.
- Hanck, A., 1982, Tolerance and Effects of High Doses of Ascorbic Acid, *Unit of Social and Preventive Medicine*, University of Basle, Switzerland.
- Hatch, G.E., 1995, Asthma, inhaled oxidants and dietary antioxidants, *Am.J.Clin.Nutr.*, 625-30.
- Hensley, K., Robinson, K.A, Gabbita, S.P., Salsman, S., Floyd, R.A., 2000, Reactive Oxygen Species, Cell Signalling and Cell Injury, *Free Radical Biology & Medicine*, 28, 10, 1456–1462.
- Hess, R.A., 1999, Effects of environmental toxicants on the efferent ducts, epididymis and fertility, *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 53, 247-259.
- Higashi, T., Peters, T., 1963, *Studies on Rat Liver Catalase*, *The Journal of Biological Chemistry*, 238, 12, 3945-3951.
- Hoffer, A., 2009, *Injectable Vitamin C and the Treatment of Viral and Other Diseases*, Hygea Publishing Co., ISBN 978-0-9639098-8-6.
- Horning, D., 1981, Distribution of Ascorbic acid, Metabolites and Analogues in Man and Animals, *Department of Vitamin and Nutrition Reserach*, Switzerland.
- Hsu, P.C., Liu, M.Y., Hsu, C.C., Chen, L.Y., Guo, L.G., 1998, Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm, *Toxicology*, 128, 169–179.
- Humanson, G.L., 1972, *Animal Tissue Techniques* 3rd Edn. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 641.
- Hume, R., Weywers, E., 1973, Changes in Leucocyte ascorbic acid during the common cold, *Scot. med. J.*, 18, 3.
- Ikeda, G.J., Miller, E., Sapienza, P.P., Michel, T.C., King, M.T., Turner, V.A., Blumenthal, H., 1983, Distribution of ¹⁴C-labelled acrylamide and betaine in foetuses of rats, rabbits, beagle dogs and miniature pigs, *Food and Chemical Toxicology*, 21, 1, 49-58.
- Iqbal, K., Khan, A., Ali, M.M., Khattak, K., 2004, Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health – A Review, *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 1, 5-13.

- Isherwood, F.A., Chen, Y.T., Mapson, L.W., 1954, Synthesis of l-ascorbic acid in plants and animals, *Biochem. J.* 1954, 56, 1, 1–15.
- Ji, Y.L., Wang, Z., Wang, H., Zhang, C., Zhang, H., Zhao, M., Chen, Y.H., Meng, X.H., XU, Z., 2012, Ascorbic acid protects against cadmium-induced endoplasmic reticulum stress and germ cell apoptosis in testes *Reproductive Toxicology*, 34, 357– 363.
- Jialal, I., Singh, U., 2006, Is vitamin C an antiinflammatory agent?, *Am J Clin Nutr.*, 83, 525–526.
- Johnson, K.A., Gorzinski, S.J., Bodner, K.M., Campbell, R.A., Wolf, C.H., Friedman, M.A., Mast, R.W., 1986, Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 85, 2, 154-168.
- Johnson, K.E., 1991, *Histology and Cell Biology*, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 0-683-06210-7.
- Johnston, C.S., Steinberg, F.M., Rucker, R.B., 2001, *Handbook of vitamins: Ascorbic acid*, 529-554.
- Junko, S., Kazuo, H., 1986, Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice effects on fertility and sperm morphology., *Arch. Toxicol.*, 59, 201–205.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2003, *Basic Histology*, Mc Graw-Hill Companies, 0-07-141365-0.
- Juranek, I., Bezek, Š., 2005, Controversy of Free Radical Hypothesis: Reactive Oxygen Species – Cause or Consequence of Tissue Injury?, *Gen. Physiol. Biophys.*, 24, 263-278.
- Kannan, K., Jain, S.K., 2000, Review Oxidative stress and apoptosis, *Pathophysiology*, 7, 27, 153-163.
- Kierszenbaum, A.L., 2006, *Histology and Cell Biology- An Introduction to Pathology*, Mosby, 0-323-01639-1.
- Kirkman, M.N. ve Gaetani, G.F., 1984, Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 4343-4347.
- Kirman, C., Gargas, M., Deskin, R., Navarro, L.T., Andersen, M., 2003, A Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Acrylamide and Its Metabolite, Glycidamide in the Rat, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, A, 66, 3, 253-274.

- 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*), *Physiology and Animal Nutrition*, 89, 79-83.
- Kohen, R., Nyska, A. , 2002, Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification, *Toxicologic Pathology*, 30, 6, 620-650.
- Konings, E.J.M., Baars, A.J., Klaveren, J.D., Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Hiemstra, M., Kooij, J.A., Peters, P.W.J., 2003, Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1569-1579.
- Kopera, I.A., Bilinska, B., Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2010, Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 365, 1593-1605.
- Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodoma, H., Gangnon, C., 1997, Reactive oxygen species and sperm physiology, *Review of Reproduction*, 2, 48-54.
- Lang, K., 1965, Wiss. Veroffentl. Dtsch. Ges. f. Ernahr., 14, 149.
- Lenton, K., Sane, A.T., Terriault, H., Cantin, A.M., Payette, A., Wagner, H.M., 2003, Vitamin C augments lymphocyte glutathione in subjects with ascorbate deficiency, *Am. J. Clin. Nutr.*, 77, 189-195.
- Levine, M., 1986, New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid, *The New England Journal of Medicine*, 314, 14, 892-902.
- Lewis, S.E.M., Sterling, E.S.L., Young, I., Thompson, W., 1997, Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men, *Fertility and Sterility*, 67, 1, 142-147.
- Linster, C.L., Schaftingen, E.V., 2007, Vitamin C Biosynthesis, recycling and degradation in mammals, *FEBS Journal*, 274, 1-22.
- Lisa, R., Calabrese, G., Bitonti, M.B., Arrigoni, O., 1984, Relationship between ascorbic acid and cell division, *Experimental Cell Research*, 150, 314-320.
- Lingnert, H., Grivas, S., Jagerstad, M., Skog, K., Törnqvist, M., Aman, P., 2002, Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods, *Scandinavian Journal of Nutrition*, 46, 4, 159-172.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with folin phenol reagent, *Journal Of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luck, M.R., Jeyaseelan, I., Scholes, R.A., 1995, Ascorbic acid and fertility, *Biology of Reproduction*, 52, 262-266.

- Ma, Y, Shi, J, Zheng, M., Liu, J, Tian, S., He, Z., Zhang, H., Li, G., Zhu, J., 2011, Toxicological effects of acrylamide on the reproductive system of weaning male rats, *Toxicology and Industrial Health*, 27, 7, 617-627.
- Marlowe, C., Clark, M.J., Mast, R.W., Friedman, M.A., Waddell, W.J., 1986, The distribution of [^{14}C] acrylamide in male and pregnant Swiss- Webster mice studied by whole-body autoradiography, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 86, 3, 457-465.
- Marnett, L.J., 2000, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 21, 3, 361-370.
- Marsh, G.M., Lucas, L.J., Youk, A.O., Schall, L.C., 1994, Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up, *Occup Environ Med*, 56, 181-190.
- May, J.M., 1999, Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?, *The FASEB Journal*, 13, 9, 995-1006.
- McDowell, 1989, *Vitamins in Animal Nutrition: Comparative Aspects to Human Nutrition, Animal Feeding and Nutrition; A Series of Monographs and Treatises*, Academic Press, Michigan Uni., 0124833721.
- Mclean, D.J., Friel, P.J., Johnston, D.S., Griswold, M.D., 2003, Characterization of Spermatogonial Stem Cell Maturation and Differentiation in Neonatal Mice, *Biology of Reproduction*, 69, 2085-2091.
- Meister, A., 1994, Glutathione-Ascorbic Acid Antioxidant System in Animals, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 13, 9397-9400.
- Mukhopadhyay, C.K., Chatterjee, I.B., 1994, Free Metal Ion-independent Oxidative Damage of Collagen, *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 48, 2, 30200-30205.
- National Research Council, 2011, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 0-309-15401-4.
- NICNAS, 2002, *Acrylamide Priority Existing Chemical Assessment Report No.23*, ISBN: 0-642-501-89-0.
- Niki, E., 1991, Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals, *American Society for Clinical Nutrition*, 54, 1119S-24S.
- Nishikimi, M., Yagi, K., 1996, *Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis*, Institute of Applied Biochemistry, Gifu, Japan.; Minnesota, 03-064-51484.
- Norkus, E.P., Rosso, P., 1981, Effects of maternal intake of ascorbic acid on the postnatal metabolism of this vitamin in the guinea pig, *The Journal of Nutrition*, 111, 4, 624-630.

- Pabst, K., Mathar, W., Palavinskas, R., Meisel, H., Bluthgen, 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.
- Padh, H., 1991, Vitamin C: New Insights into its biochemical functions, *Nutrition Review*, 49 3, 65-70.
- Parzefall, W., 2008, Minireview on the toxicity of dietary acrylamide, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1360-1364.
- Paulsson, B., Graweb, J., Törnqvist, M., 2002, Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment, *Mutation Research*, 516, 101-111.
- Petersen, D.W., Cooper, K.P., Friedman, M.A., Lech, J.J., 1987, Behavioral and histological effects of acrylamide in rainbow trout, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 87, 1, 177-184.
- Rice, J.M., 2005, Review: The carcinogenicity of acrylamide, *Mutation Research* 580, 3-20.
- Rooij, D.D.G., 1998, Stem cells in the testis, *Int. J. Exp. Path.*, 79, 67-80.
- Rosen, G.M., Pou, S., Ramos, C.L., Cohen, M.S., Britigan, B.E., 1995, Free radicals and phagocytic cells, *FASEB*, 8, 200-209.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P., Clegg, E. D., 1990, *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River, Clearwater, 1-40.
- Sakamoto, J., Hashimoto, K., 1986, Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice effects on fertility and sperm morphology, *Archives of Toxicology*, 59, 4, 201-205.
- Sanocka, D., Kurpysz, M., 2004, Reactive oxygen species and sperm cells, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 12, 1-7.
- Saradha, B., Mathur, P.P., 2006, Effect of environmental contaminants on male reproduction, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21, 34-41.
- Schettgen, T., Kutting, B., Horningnig, M., Beckmann, M.W., Weiss, T., Drexler, H., Angerer, J., 2004, Trans-placental exposure of neonates to acrylamide—a pilot study., *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 77, 213-216.
- Schulz, M., Picciotto, I.H., Wijngaarden, E.V., Hernandez, J, Ball, L., 2001, Dose response relation between acrylamide and pancreatic cancer, *Occup. Environ. Med.*, 58, 9, 609.

- Sega, G.A., Generoso, E.E., Brimer, P.A., Mallng, 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.
- Shipp, A., Lawrence, G., Gentry, R., McDonald, T., Bartow, H., Bounds, J., Macdonald, N., Clewell, H., Allen, B., Landingham, C.V., 2006, Acrylamide: Review of Toxicity Data and Dose-Response Analyses for Cancer and Noncancer Effects, *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 481-608.
- Sies, H., 1997, Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants, *Experimental Physiology*, 82, 291-295.
- Sinha, A.K., 1972, Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, 47, 389-394.
- Siu, M.K.Y., CHENG C.Y., 2004, Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis, *Wiley Periodicals, BioEssays* 26, 978-992.
- Smith, E.A., PRUES, S.L., Oehme, F.W., 1997, Environmental Degradation of Polyacrylamides II. Effects of Environmental (Outdoor) Exposure *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37, 76-91.
- Sonawane, B.R., 1995, Chemical Contaminants in Human Milk: An Overview, *Environ Health Perspect*, 103, 6, 197-205.
- Sönmez, M, Türk, G., Yüce, A., 2005, The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats *Theriogenology*, 63, 2063–2072.
- Sörgel, F., Weissenbacher, R., Schippers, M.K., Hofmann, A., Anderas, M., Landersdorfer, S.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.
- Stadler, R.H., Scholz, G., 2004, Acrylamide: An Update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanisms of Formation, and Potential Strategies of Control, *Nutrition Reviews*, 449-467.
- Stadtman, E.R., 2006, Protein oxidation and aging, *Free Radical Research*, 40, 12, 1250-1258.
- Starostina, N.G., Lusta, K.A., Fikhte, B.A., 1983, Morphological and physiological changes in bacterial cells treated with acrylamide, *European Journal of App. Mic. and Biotec.*, 18, 5, 264-270.

- Studer, A., Blank, I., Stadler, R.H., 2004, Thermal Processing Contaminants in Foodstuffs and Potential Strategies of Control, *Proc. Chemical Reaction in Food*, 22, 1-9.
- Sublet, V.H., Zenick, H., Smith, M.K., 1989, Factors associated with reduced fertility and implantation rates in females mated to acrylamide- treated rats, *Toxicology*, 55, 1,2, 53-67.
- 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 Sciences*, 75, 260-270.
- Svensson, K., Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellena s, K.A., Lind, Y., Rosen, J., 2003, Dietary intake of acrylamide in Sweden, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1581-1586.
- Szeto, Y.T., Tomlinson, B., Benzie, I.F.F., 2002, Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation, *British Journal of Nutrition*, 87, 55–59.
- Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R.H., Gonde, P., Ejck, V.P., Lalljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Müller, D., Tallmadge, D., O'Brien, J., Thompson, S., Silvan, S., Whitmore, T., 2004, A Review of Acrylamide: An Industry Perspective on Research, Analysis, Formation and Control, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 323-347.
- Takahashi, M., Shibutani, M., Nakahigashi, J., Sakaguchi, N., Inoue, K., Morikawa, T., Yoshida, M., Nishikawa, A., 2009, Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods, *Arch. Toxicol.*, 83, 785-793.
- Takahashi, M., Inoue, K., Koyama, N., Yoshida, M., Irine, K., Morikawa, A., Shibutani, M., Honma, M., Nishikawa, A., 2011, Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity *Arch Toxicol*, 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, *The Journal of Toxicological Sciences*, 33, 1, 11-24.
- Takami, S., Imai, T., Cho, Y.M., Ogawa, K., Hirose, M., Nishikawaa, A., 2012, Juvenile rats do not exhibit elevated sensitivity to acrylamide toxicity after oral administration for 12 weeks, *J. Appl. Toxicol.*, 32, 959–967.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Törnqvist, A., 2000, Acrylamide: A Cooking Carcinogen?, *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 517-522.

- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Törnqvist, A., 2002, Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4998-5006.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000, Reactive oxygen species in cell signaling, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 279, L1005-L1028.
- Thoma, W.J. and Handerson, L.M., 1984, Effects of vitamin C deficiency on hydroxylation of trimethylaminobutyrate to carnitine in the guinea pig, *Biochem. and Biophysical A.*, 797, 136-139.
- Tolbert, B.M., Downin, M., Carlson, R.W., Knight, M.K., Baker, E.M., 1975, Chemistry and Metabolism of Ascorbic Acid and Ascorbate Sulfate, *Annals of New York Academy of Sciences*, 258, 48-69.
- Toyokuni, S., 1999, Reactive Oxygen Species Induced Molecular Damage and Its Application in Pathology, *Pathology International*, 49, 91-102.
- Tremellen, K., 2008, Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective, *Human Reproduction Update*, 14, 3, 243-258.
- Tsuruhara, T., Dufau, M.L., Cigorrage, S., Catt, K., 1977, Hormonal Regulation of Testicular Luteinizing Hormone Receptors, *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 24, 9002-9009.
- Turner, T.T., Lysiak, J.J., 2008, Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction, *Journal of Andrology*, 29, 5, 488-497.
- Tyl, R.W., Friedman, M.A., Losco, P.E., Fisher, L.C., Johnson, K.A., Strother, D.E., Wolf, C.E., 2000, Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water, *Reproductive Toxicology* 14, 385-401.
- Ural, M., Özgüner, M., Büyükvanlı, B., Kuplay, H., Köylü, H., 2006, Akut diazinon toksisitesinin testis dokusunda oluşturduğu histolojik değişiklikler ve bu değişikliklere C vitamini ve E vitaminin etkisi, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 13, 2, 22-25.
- Urso, M.L., Clarkson, P.M., 2003, Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, *Toxicology*, 189, 41-54.
- Uzunhisarcikli, M., Kalender, Y., Dirican, K., Kalender, S., Ogutcu, A., Buyukkomurcu, F., 2007, Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87, 115-122.
- Walker, W.H., Cheng, J., 2005, FSH and testosterone signaling in Sertoli cells, *Reproduction*, 130, 15-28.

- Wang, C., Zhang, Y., Liang, J., Shan, G., Wang, Y., Shi, Q., 2006, Impacts of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in testis, *Clinica Chimica Acta*, 370, 82–88.
- 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., Lachenmeier, D.W., Gökmen, V., 2007, Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food, *Anal Bioanal Chem.*, 389, 119–137.
- WHO, FAO, 2004, Discussion Paper on Acrylamide, Rotterdam, The Netherlands, 1-16.
- Wilde, T.D., Meulenaer, B.D., Mestdagh, F.R., Govaert, Y., Vandeburie, S., Ooghe, W., Fraselle, S.P., K., Demeulemeester, Peteghem, C.V., Calus, A., Degroot, J.M., Verheä, R. ., 2005, Influence of Storage Practices on Acrylamide Formation during Potato Frying, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 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.
- Wong, E.W.P., Cheng, C.Y., 2011, Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction, *Trends in Pharmacological Sciences*, 32, 5, 290-299.
- Wreford, N.G., 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.
- Wu, K.Y., Huang, Y.F., Chen, M.F., Shih, T., Uang, S.N., Mao, I.F., Chen, M.L. , 2010, Exposure Assessment of Airborne Acrylamide for Occupationally Exposed Workers by Using an Isotope-Dilution Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry, *Ann. Occup. Hyg.*, 54, 5, 575-583.
- 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, *Vet. Sci.*, 6, 2, 103-109.
- Yang, J.D., 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.
- Young I.S., Woodside, V.J., 2001, Antioxidants in health and disease, *J. Clin. Pathol.*, 54, 176–186.
- Yousef, M.I., Demerdash, F.M., 2006, Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats, *Toxicology*, 219, 133-141.

- Yu, S., Son, F., Yu, J., Zhao, X., Yu, L., Li, G., X., K., 2006, Acrylamide Alters Cytoskeletal Protein Level in Rat Sciatic Nerves, *Neurochem Res.* 31, 1197–1204.
- Zalani, S., Rajalakshmi, R., Parekh, L.J., 1989, Ascorbic acid concentration of human fetal tissues in relation to fetal size and gestational age, *British Journal of Nutrition*, 61, 601–606.
- 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, 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 Mechanisms and Methods*, 19, 3, 219–224.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	F. Esra YAZICIOĞLU
Uyruğu	T.C
Doğum tarihi, Yeri	1984, Bornova
Telefon	0505 495 26 87
E-mail	yazicioğluesra@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyoloji/ Zooloji	2013
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi/ Biyoloji	2009
Lise	Ankara Gazi Anadolu Lisesi	2003