



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKRİLAMİDİN TM3 LEYDİĞ HÜCRELERİNDE
STEROİDOGENİK GENLERİN İFADE DÜZEYİNE ETKİSİ**

Nebahat YILDIZBAYRAK

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Melike ERKAN

Haziran, 2015

İSTANBUL

Bu çalışma 12/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

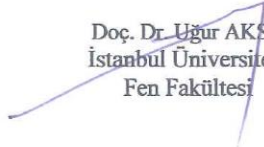


Prof. Dr. Melike ERKAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Tülay İREZ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Doç. Dr. Uğur AKSU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Meliha İNCELİ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Yrd. Doç. Dr. Cenk SESAL
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 47199 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, akrilamidin TM3 Leydig hücre soyunda hücre canlılığı, üretilen testosteron miktarı ve testosteron biyosentezinde görevli genler üzerine etkileri ortaya çıkarılmak amacıyla yapılmıştır.

Lisans ve lisansüstü öğrenimim süresince emeği geçen, değerli fikirlerini ve bilgilerini benimle paylaşan, fikirleriyle bana yol gösteren çok değerli danışmam hocam Sayın Prof. Dr. Melike ERKAN'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübeleriyle devamlı yanımda olan ve manevi desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Uzm. Biyolog Banu ORTA YILMAZ' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezım süresince deneyimlerini benimle paylaşan ve manevi desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Yasemin TUNALI'ya ve Araş. Gör. Uzm. Biyolog Vahap ELDEM'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için bana laboratuvarını açan Yrd. Doç. Dr. Cenk SESAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiç yalnız bırakmayan, karşılaştığım her türlü güçlüğü aşmamda yardımcı olan sevgili anneme, babama ve ablama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2015

Nebahat YILDIZBAYRAK

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. TESTİSİN GENEL YAPISI	3
2.2. LEYDİĞ HÜCRESİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	4
2.3. TESTOSTERON BİYOSENTEZİ.....	5
2.4. LEYDİĞ HÜCRELERİNDE STEROİDOGENEZİN TRANSKRİPSİYONEL KONTROLÜ.....	8
2.5. AKRİLAMİD.....	11
2.5.1. Akrilamidin Genel Özellikleri.....	11
2.5.2. Akrilamidin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	15
3. MALZEME VE YÖNTEM	17
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	17
3.1.1. Kullanılan Hücre Soyu	17
3.1.2. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı.....	17
3.1.3. Hücre İnkübasyon Koşulları	17
3.1.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	18
3.1.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	18
3.2. AKRİLAMİD KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI.....	18
3.3. MTT HÜCRE CANLILIĞI TESTİ	19
3.4. SERBEST TESTOSTERON TAYİNİ.....	20
3.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İNCELEMELERİ	21

3.5.1. Total RNA İzolasyonu	21
3.5.2. Total RNA'nın Komplementer DNA'ya (cDNA) Çevrilmesi.....	22
3.5.3. Primerlerin Seçilmesi	23
3.5.4. RT-PCR ile Genlerin İfade Düzeyinin Belirlenmesi	24
3.5.5. $\Delta\Delta C_T$ Metodu ile Verilerin Değerlendirilmesi.....	26
3.6. İSTATİSTİK ANALİZ	27
4. BULGULAR	28
4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI.....	28
4.1.1. MTT Bulguları	28
4.2. SERBEST TESTOSTERON BULGULARI	29
4.3. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) BULGULARI	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ.....	50

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.3.1: Leydig hücresinde testosteron biyosentezi ve metabolik aktivasyon yolları.....	6
Şekil 2.5.1: Akrilamidin kimyasal yapısı.	11
Şekil 2.5.2: Akrilamidin metabolizması.	14
Şekil 4.1.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde % canlılık oranı üzerine etkileri (***:p<0,001; **:p<0,01).	28
Şekil 4.2.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde serbest testosteron üzerine etkileri (**:p<0,01).	29
Şekil 4.3.1: Kontrol grubunun RT-PCR sonuçlarına göre amplifikasyon eğrileri.	30
Şekil 4.3.2: 0.1 mM Akrilamide maruz kalmış grubun RT-PCR sonuçlarına göre amplifikasyon eğrileri.	31
Şekil 4.3.3: 2 mM Akrilamide maruz kalmış grubun RT-PCR sonuçlarına göre amplifikasyon eğrileri.	31
Şekil 4.3.4: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde StAR geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), (p<0.01).	32
Şekil 4.3.5: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde Cyp11a1 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), (p<0.01, p<0.05).	32
Şekil 4.3.6: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde HSD3B geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), (p<0.01, p<0.05).	33
Şekil 4.3.7: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde HSD17B geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), (p<0.05).	33
Şekil 4.3.8: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde Cyp17a1 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), (p<0.01).	34
Şekil 4.3.9: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde SF-1 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi	34
Şekil 4.3.10: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde Nur77 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), (p<0.01).	35
Şekil 4.3.11: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde GATA-4 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), (p<0.01).	35

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.3.1: Steroidogenik protein ve enzimleri kodlayan genler.	7
Tablo 2.4.1: Leydig hücrelerinde bulunan transkripsiyon faktörleri.	8
Tablo 2.4.2: SF-1, GATA-4 ve Nur77'nin steroidogenik yolaktaki hedef genleri.	10
Tablo 2.5.1: Akrilamidin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.	11
Tablo 3.5.1: RT-PCR işleminde kullanılan primer dizileri (F: Forward, R: Reverse).	23
Tablo 3.5.2: Real Time PCR cihazı deney koşulları	25

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kisaltmalar	Açıklama
17β-HSD	: 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz
3β-HSD	: 3 β -hidroksidehidrogenaz
AA	: Akrilamid
C/EBP	: CCAAT enhansır bağlayıcı protein
cAMP	: Siklik AMP
CRE	: cAMP karşılık elementi
CREB	: cAMP karşılık elementi bağlayıcı protein
CYP11A1	: Kolesterol yan zincir kırıcı enzim
CYP17A1	: 17 α -hidroksilaz/C17-20 liyaz
CYP2E1	: Sitokrom P450
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
GSH	: Glutasyon
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenz
HRP	: Horseradish peroksidaz
HSD3B	: Hidroksi delta 5 steroid dehidrogenaz geni
HSD17B	: 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz geni
LH	: Luteinizan Hormon
MTT	:3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolium bromid
PCR	:Polymerase Chain Reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu
PKA	: Protein Kinaz A
RT-PCR	: Real time Polymerase Chain Reaction, Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SF-1	: Steroidogenik faktör 1
SREBP	: Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein
StAR	: Steroidogenik akut düzenleyici protein

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKRİLAMİDİN TM3 LEYDİĞ HÜCRELERİNDE STEROİDOGENİK GENLERİN İFADE DÜZEYİNE ETKİSİ

Nebahat YILDIZBAYRAK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Melike ERKAN

Bu çalışmada, akrilamidin testosteron yapımını sağlayan steroidogenik yolaktaki etkilerine odaklanılmıştır. Fare Leydig hücre soyu olan TM3 hücreleri luteinizan hormon (LH) ile stimule edilmiştir ve akrilamid maruziyeti sonucunda steroidogenik enzimleri kodlayan genlerin (StAR, Cyp11a1, Cyp17a1, HSD3B ve HSD17B) ve bu genleri düzenleyen belirli ortak transkripsiyon faktörlerinin (SF-1, GATA-4, Nur77) ifade düzeylerindeki değişiklikler *in vitro* çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca luteinizan hormon (LH) ile stimule edilmiş Leydig hücrelerinde testosteron sekreyonu da değerlendirilmiştir.

Akrilamid 1970'lerden beri polimer, kozmetik, kağıt, tekstil, atık su iyileştirme ve laboratuvar jellerinin üretimi gibi çeşitli endüstri alanlarında kullanılan suda çözünebilen, kimyasal olarak reaktif bir moleküldür. Endüstride ve laboratuvarlarda kullanımının yanı sıra akrilamidin ısıtma işlemi uygulanmış belirli yiyecek ürünlerinde bulunduğu 2002 yılında İsveç Ulusal Gıda Ajansı ve Stokholm Üniversitesi araştırmacıları tarafından rapor edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda akrilamid içeren patates çipsi, kızarmış ekmek, bisküvi, kahvaltılık tahıllar ve kahve insanların günlük akrilamid maruziyetinde en fazla payı olan gıda maddeleridir. Ayrıca akrilamidin sigara dumanında da bulunduğu gösterilmiştir.

Akrilamid 24 saat süreyle 0.01 mM ile 10 mM aralığında 9 farklı konsantrasyonda TM3 Leydig hücrelerine LH uyarımlı koşullarda uygulanmıştır. Bu doz aralığında TM3 Leydig hücrelerinin canlılığını %80 oranının altına düşüren ilk doz (0.1 mM) ile hücre canlılığını % 50'ye düşüren (2 mM) dozlar bu tez çalışmasında kullanılacak olan iki

farklı akrilamid konsantrasyonu olarak seçilmiştir. Steroidogenik genlerin (StAR, Cyp11a1, Cyp17a1, HSD3B) ve bu genlerin ortak transkripsiyon faktörlerinin (SF-1, GATA-4, Nur77) ifade düzeyleri ve Leydig hücrelerinde üretilen serbest testosteron miktarı ölçülmüştür. Bulgular akrilamidin hücre canlılığını azalttığını ve üretilen serbest testosteron seviyesini düşürdüğünü göstermektedir. Steroidogenik yolakta görevli genlerin anlatımındaki değişiklikler ile testosteron biyosentezini negatif yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.

Haziran 2015, 60 sayfa.

Anahtar kelimeler: Akrilamid, Leydig hücresi, Steroidogenez, Gen anlatımı, Testosteron

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EFFECT OF ACRYLAMIDE ON THE EXPRESSION OF STEROIDOGENESIS GENES IN TM3 LEYDIG CELLS

Nebahat YILDIZBAYRAK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Melike ERKAN

In this study, we focused on the effects of acrylamide on the steroidogenic pathway that provides the testosterone production. Following acrylamide exposure, we demonstrated the changes in expression levels of genes (StAR, Cyp11a1, Cyp17a1, HSD3B and HSD17B) and their regulator transcription (SF-1, GATA-4, Nur77) factors in luteinizing hormone (LH) stimulated TM3 cells (mouse Leydig cell line) *in vitro*. In addition, we evaluated testosterone secretion in luteinizing hormone (LH) - stimulated Leydig cells.

Acrylamide is a water-soluble and chemically reactive molecule, and since 1970 it has had various industrial uses including polymers, cosmetics, paper, textile, waste water treatment, and the production of laboratory gels. The Swedish National Food Agency and Stockholm University reported in 2002 that acrylamide can be found in certain heat-processed foods, in addition to its use in the industry and laboratory. Potato chips, toasted bread, biscuits, breakfast cereals and coffee contain high concentrations of acrylamide, and these foods have the maximum contribution to individuals' daily exposure to acrylamide. In addition, acrylamide is also present in cigarette smoke.

Acrylamide was exposed to TM3 Leydig cells for 24 hours in 9 different concentration between 0.01 mM and 10 mM with LH-stimulated conditions. In this dose range first concentration that decreased the cell viability rate under 80% (0.1 mM) and concentration (2 mM) that decreased the cell viability rate 50% were selected as the two different acrylamide concentration that will be used in this thesis study. Steroidogenic genes (StAR, Cyp11a1, Cyp17a1, HSD3B and HSD17B) and common transcription

factors (SF-1, GATA-4, Nur77) of that genes expression levels and the amount of free testosterone which produced in Leydig cells, were measured. The results indicated that acrylamide reduced the cell viability and decreased the level of free testosterone. With the changes on expression level of the genes which are official at steroidogenic pathway, concluded that it was negatively affected the testosterone biosynthesis.

June 2015, 60 pages.

Keywords: Acrylamide, Leydig cell, Steroidogenesis, Gene expression, Testosterone

1. GİRİŞ

Akrilamid birçok endüstri alanında (kağıt, boya, kozmetik gibi) yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır; ancak insanlar akrilamide en fazla tahıllı ve nişastalı yiyeceklerin (patates, bebek bisküvileri gibi) pişirilme sürecinde ortaya çıkmasıyla maruz kalırlar (Doergo ve diğ., 2008). Akrilamidin kimyasal ve toksikolojik özellikleri birçok çalışmanın konusu olmuştur. Özellikle kemirgenlerde yapılan yüksek doz uygulanan hayvan çalışmaları akrilamidin karsinojenik ve genotoksik bir madde olduğunu göstermiştir (Yang ve diğ., 2005). Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı, yapılan hayvan deneylerine dayanarak akrilamidi insanlar için olası karsinojen kimyasallar (Grup 2A) grubuna dahil etmiştir (IARC, 1994).

Akrilamid, dünya çapında günlük diyetle yaygın olarak tüketilen çeşitli yiyeceklerde bulunur (Parzefall, 2007). Besinlerin içeriğinde bulunmayan akrilamid, karbohidratça zengin yiyeceklerin ısı işlem (120°C ve daha yüksek sıcaklıklarda) uygulanarak pişirilmesi sırasında karbohidratların ve aminoasitlerin bir tepkimesi sonucunda ortaya çıkmaktadır (Mottram ve diğ., 2002; Stadler ve diğ., 2002; , Zyzak ve diğ., 2003). Akrilamidin yiyeceklerde bulunması ilk olarak Nisan 2002'de İsveç Ulusal Gıda Komisyonu ve Stokholm Üniversitesi bilim adamları tarafından rapor edilmiştir (Tareke ve diğ., 2002). Patates ve tahıllar gibi bitkisel içerikli ürünler, glukoz/fruktoz ve aspargin gibi akrilamid oluşumunda etkili olan bileşenleri doğal olarak bulundurdukları için yüksek miktarda akrilamid içermeye eğilimindedirler (Pedreschi ve diğ., 2013).

Akrilamidin nörotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkilerinin yanı sıra üreme sistemlerinde de hasara yol açtığı gösterilmiştir (Exon, 2006). Akrilamidin üreme sistemi üzerine olan etkileri birçok kemirgen deneyinde gözlemlenmiş ve hayvanlara verilen akut dozlar sonucunda doğurganlık, postnatal canlılık azalmış ve embriyonun implantasyonunda sorunlar ortaya çıkmıştır (Tyl ve Friedman, 2003). Yayınlanan raporlara göre akrilamidin veya metaboliti olan glisidamidin spermatid protaminlerine bağlanarak spermde vakuolleşme, şişme, nekroz gibi histopatolojik değişikliklere aynı zamanda gonadal hücrelerde ölüm oranının artmasına neden olduğu gösterilmiştir

(Sakamoto ve Hashimota, 1986; Sakomota ve diğ., 1988). Bununla birlikte seminifer tubüllerde sperm parametrelerini etkileyecek birçok apoptotik hücre ile çok nukleuslu dev hücrelerin (giant hücre) oluşumunda rol aldığı yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. (Tyl ve Friedman, 2003; Yang ve diğ., 2005). Akrilamid kan-testis bariyerini ve kan-epididimis bariyerini aşarak erkek üreme hücrelerinde toksisiteye neden olur (Ma ve diğ., 2011). Aynı zamanda cinsiyet steroidlerinin taşınması ve spermatogenez ile ilgili gen anlatımını negatif yönde etkilediği ve kauda epididimisteki sperm miktarını azalttığı göstermişlerdir (Yang ve diğ., 2005). Yapılan tüm bu çalışmalarla birlikte akrilamidin neden olduğu testikular toksisitenin mekanizması halen tam olarak anlaşılammıştır (Camocho ve diğ., 2012).

Bu çalışmada akrilamidin farklı dozlarının TM3 Leydig hücrelerine uygulanması sonucu steroidogenik genlerin ve belirli transkripsiyon faktörlerinin ifade düzeyinde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde testis, Leydig hücresi, testosteron biyosentezi, Leydig hücrelerinde steroidogenezin transkripsiyonel kontrolü ve akrilamid ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

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

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

Bu çalışma akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde olası toksik etkilerinin ortaya çıkarılması amacıyla yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı akrilamid dozları uygulanan Leydig hücrelerinde hücre canlılığı, üretilen testosteron miktarı, steroidogenik genler ve bu genlerin ortak transkripsiyon faktörlerinin ifade düzeyleri ölçülmüştür.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. TESTİSİN GENEL YAPISI

Üreme tüm canlılarda genetik devamlılığı sağlayan fizyolojik bir süreçtir (Bozdoğan, 2000). Erkek üreme sistemi, spermlerin üretildiği testislerden, spermlerin geçişini, olgunlaşmasını ve depolanmasını sağlayan epididimis ve genital kanallardan, semen sıvısını üretilen seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretal bez gibi yardımcı bezlerden ve spermin dişiye aktarılmasını sağlayan penisten oluşmaktadır (Creasy ve Foster, 2002).

Testisin iki ana fonksiyonu vardır. Bunlardan birincisi; türün devamlılığını sağlamak için erkek germ hücresi üretmek, ikincisi ise erkeğin cinsel farklılaşması, erkek germ hücresi üretimi ve ikincil seks karakterlerinin gelişimi için gerekli olan steroid hormon üretim ve salgılamasını yapmaktır (Gnessi ve diğ., 1997).

Testis seminifer tübüller ve interstisyel alan olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Tübüler kısım ise Sertoli hücreleri, germinal hücreler ve tübüllerini çevreleyen miyoid hücrelerden oluşmaktadır. Sertoli hücreleri, tübüller kısımdaki diğer hücrelerden farklı olarak, sabit sayıdadırlar. Seminifer epitelde spermatogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynayan Sertoli hücreleri; spermatogonyumların kontrol edilmesinde, spermlerin gelişmesinde ve yaşamlarının devam ettirilmesinde hayati öneme sahip bir destek görevi görür (Edwart ve Brody 1995; Ross ve diğ. 2003). Bununla birlikte komşu Sertoli hücreleri birbirleriyle sıkı bağlantılar kurarak kan-testis bariyeri olarak bilinen yapıyı oluşturmaktadırlar (Walker ve Cheng, 2005). İntersitisiyel alan ise Leydig hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve kan damarlarından oluşmaktadır (Bozdoğan 2000; Aktümsek 2006). Leydig hücreleri testisleri meydana getiren lobüller arasındaki bağ dokusu bölmelerinde bulunurlar. Testosteron hormonunun üretimi ve salgılanmasından ve ikincil seks karakterlerinin gelişmesinden sorumludurlar. Leydig hücreleri salgıladıkları testosteron hormonu ile spermatogenezin devamlılığını sağlarlar (Bozdoğan, 2000; Aktümsek, 2006).

2.2. LEYDIG HÜCRESİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

1850 yılında Franz Leydig memeli testisinde seminifer tübüller arasında bulunan intersitisiyel alanda hücreler tanımlamıştır. Bu hücrelere Leydig hücresi veya intersitisiyel hücre adı verilmiştir (Christensen, 2007). Leydig hücreleri, spermatogenezin, erkek üreme kanallarının ve erkek fenotipinin oluşması ve devamlılığının sağlanması için esas androjen olan testosteronun ana kaynağıdır (Sriraman ve diğ., 2003).

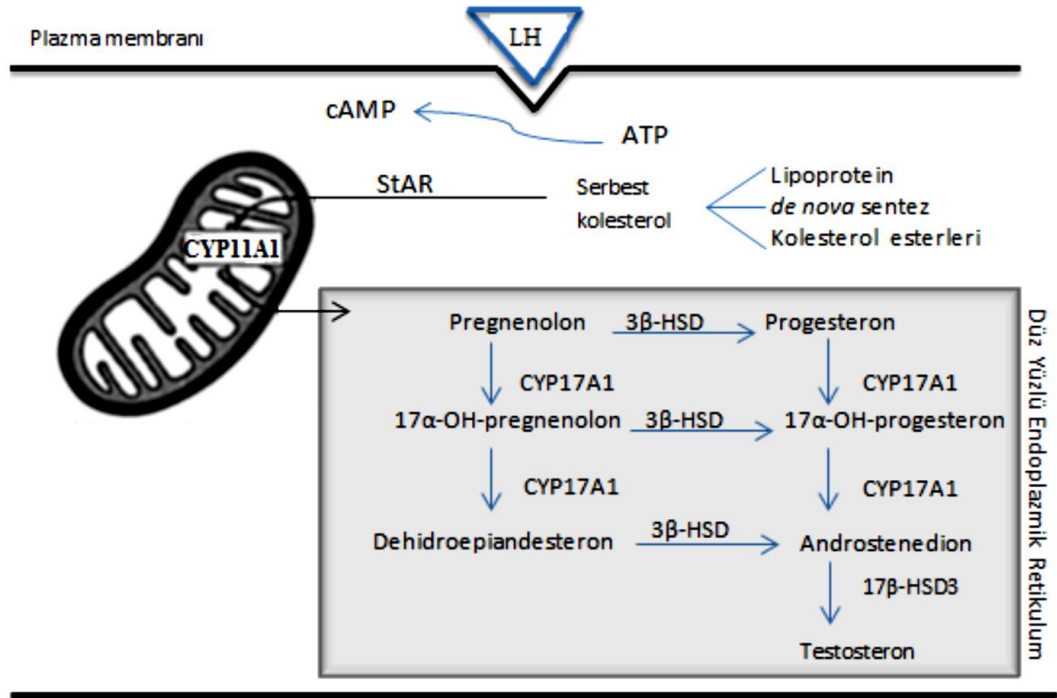
Leydig hücreleri tek tek veya gruplar halinde bulunabilirler. Steroid yapıda salgı yapan diğer hücreler gibi bol miktarda düz yüzlü endoplazmik retikulum, mitokondriye ve iyi gelişmiş Golgi kompleksine sahiptirler. Sitoplazmalarında lipaz, oksidatif enzimler, esteraz ve steroid dehidrogenaz enzimleri bulunur (Trainer, 1995).

Androjenlerin testikular salgılanması Leydig hücrelerinin sayısına ve aktivitesine bağlıdır. Bu süreç Leydig hücrelerinin çoğalmasını ve testosteron üretebilme kapasitesini kazanmalarını içerir. Leydig hücrelerinin fonksiyonunu yerine getirebilmesinde luteinizan hormon anahtar düzenleyici görevi görür, bununla birlikte farklılaşmaları ve çoğalmaları için vazgeçilmez bir hormondur (Benton ve diğ., 1995; Sriraman ve diğ., 2003).

Androjenlerin birincil kaynağının olmasının yanı sıra Leydig hücreleri diğer steroidleri ve bazı steroid olmayan faktörleri de üretirler. Bu diğer faktörler testis çevresinin vasküler ve immünolojik kontrolü ile erkek üremesinde önemli rol üstlenirler (Hedger ve Kretser 2000).

2.3. TESTOSTERON BİYOSENTEZİ

Testosteron, fetal dönem boyunca cinsel gelişim ve testislerin inmesi için, erginlik dönemi boyunca da seminifer tübüllerde sperm üretimi, aksesuar cinsiyet organlarının ve cinsel davranışın sağlanması için gerekli olan başlıca hormondur (Payne ve Youngblood, 1995; Wilson, 2001; Hardy ve diğ., 2008). Testisin interstisiyel alanında bulunan Leydig hücreleri, kolesterolden testosteron biyosentezi yapabilme kapasitesindedirler (Ye ve diğ., 2011). Testosteron biyosentezi esas olarak hipofizden salınan bir gonadotropin olan luteinizan hormon (LH) kontrolündedir. LH, Leydig hücreleri yüzeyindeki özelleşmiş reseptörüne bağlanır ve hücre içi ikincil mesajcı olan siklik AMP (cAMP)'nin üretimini sağlar. cAMP'nin Leydig hücrelerinde gerçekleşen steroidogenez sürecinde iki esas rolü vardır. Bunlardan birincisi; kolesterolün steroidogenik yolağa taşınmasıyla gerçekleşen testosteron biyosentezinin akut düzenlenmesi rolüdür. cAMP bağımlı protein kinaz A, hücreler arası lipoprotein kaynaklarından, kolesterolün de novo sentezinden veya hücre içi kolesterol havuzlarından kolesterolün taşınmasını aktive eder. Şekil 2.3.1'de Leydig hücrelerinde gerçekleşen testosteron biyosentezi şematik olarak gösterilmiştir. Kolesterolün mitokondri iç zarına taşınması her ne kadar cAMP bağımlı bir süreç olsa da steroidogenik akut düzenleyici protein (StAR) kontrolünde gerçekleşir. cAMP'nin Leydig hücrelerindeki ikinci ve kronik etkisi, steroidogenik enzimlerin gen anlatımının düzenlenmesi rolüdür (Chen ve Zirkin, 2000; Stocco, 2000).



Şekil 2.3.1: Leydig hücresinde testosteron biyosentezi ve metabolik aktivasyon yolları.

Kolesterol, mitokondriye transfer olduğunda, mitokondri iç zarının iç yüzünde bulunan kolesterol yan zincir kırıcı (Cyp11a1) enzimi aracılığıyla pregnenolona dönüşür. Pregnenolon 3 β -hidroksidehidrogenaz (3 β -HSD) enziminin etkisi ile progesteronu oluşturacağı yer olan düz yüzlü endoplazmik retikuluma geçer. Daha sonra progesteron 17 α -hidroksilaz/C₁₇₋₂₀ liyaz (Cyp17a1) enzimi aracılığıyla önce 17 α -hidroksi progesterona arkasından da androstenediona dönüşür. Son basamakta androstenedion 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz (17 β -HSD) enziminin etkisi ile testosteronu oluşturur (Hales, 2002; Ge ve Hardy, 2007). Testosteron biyosentezi süresince görev alan enzimlerin hücrede buldukları yerler ve bu enzimleri kodlayan genlerin listesi tablo 2.3.1’de verilmiştir.

Tablo 2.3.1: Steroidogenik protein ve enzimleri kodlayan genler.

	Protein ve enzim adı	Kodlayan genin adı	Hücrede bulunduğu yer	Sinonimi
Protein	Steroidogenik akut düzenleyici protein	StAR	Sitoplazmada sentezlenip mitokondriye taşınır.	–
Sitokrom P450 enzimleri (CYPs)	Kolesterol yan zincir kırıcı enzim	Cyp11a1	Mitokondri iç zarı	P450scc
	P450 17 α -hidroksilaz/ c17-20 liyaz	Cyp17a1	Mitokondri iç zarı	P450c17
Hidroksisteroid dehidrogenazlar (HSDs)	3 β - hidroksisteroid dehidrogenaz	HSD3B	Mitokondri, düz yüzlü endoplazmik retikulum	3 β -HSD/ Δ 4- Δ 5 izomeraz
	17 β - hidroksisteroid dehidrogenaz	HSD17B	Düz yüzlü endoplazmik retikulum	17 β -HSD
Steroid redüktazlar	Steroid 5 α - redüktaz 1-2	SRDA1-2	Endoplazmik retikulum	3-oxo-5 α -Steroid-redüktaz

2.4.LEYDİG HÜCRELERİNDE STEROİDOGENEZİN TRANSKRİPSİYONEL KONTROLÜ

Transkripsiyon faktörleri dokuya özgü gen ekspresyonunda pozitif veya negatif düzenleyici olarak görev alan nükleer proteinlerdir ve hücreler arası sinyallerin alınmasında, yorumlanmasında ve taşınmasında rol aldıklarından dolayı birçok hücrenel süreçte ön plana çıkarlar (Tremblay, 2007). Hücrelerin, belli gen gruplarını aktive eden sinyallere, hücre çoğalması, farklılaşması ve aktivasyonunu düzenleyen faktörler gibi uyarılara genomik olarak karşılık vermesinde transkripsiyon faktörleri esas rol oynarlar. Birçok transkripsiyon faktörü multifonksiyoneldir ve ayrıca DNA replikasyonunun başlamasını direkt olarak etkiledikleri de bilinmektedir.

Ökaryotlarda yaklaşık olarak 3000 adet transkripsiyon faktörü belirlenmiştir ve bu faktörler DNA'ya bağlanma bölgelerindeki aminoasit dizilerinin benzerliklerine göre dört ana aileye sınıflandırılmışlardır. Bu aileler; temel domain, çinko parmak, sarmal-dönüş-sarmal ve β -scaffold'u içerir (Latchman, 2004). Leydig hücrelerinde bulunan transkripsiyon faktörleri tablo 2.4.1'de gösterilmiştir (Tremblay, 2007).

Tablo 2.4.1: Leydig hücrelerinde bulunan transkripsiyon faktörleri.

Aile	Transkripsiyon Faktörleri
Temel Domainler	c-Jun, c-Fos, Fra-2, CREB, CREM, C/EB- β , SHARP-2, USF1, USF2, SREBP
Çinko bağımlı DNA bağlanma bölgesi olan domainler	Ap-2, GR, MR, AR, Era, Er β , RAR α - β , RXR α - β , Nur77 , Nurr1, SF-1 , LRH-1, PPAR α - β , TR4, COUP-TFI, GATA-4 , Sp1, Sp3, Egr-1, GIOT1, GIOT2
Sarmal-Dönüş-Sarmal	Arx, Rhox4, Pbx1, Lhx9
β -scaffold	NF-KB, STAT5A, STAT5B, NF-Y

Steroidogenez, hipofiz hormonlarına bağı olarak düzenlenen bir süreçtir. Steroidogenik dokularda hormonal uyarım; cAMP üretimi, protein kinaz A (PKA) aktivasyonu ve hedef transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu içeren hücreler arası sinyal yollarının aktivasyonunu tetikler. Klasik cAMP sinyal yolağında PKA, CREB (cAMP karşılık elementi bağlayıcı protein)'i fosforilize eder ve CREB daha sonra promotör bölgelerinde cAMP-karşılık element (CREs) bulunan hedef genlerle etkileşime girerek gen aktivasyonunu sağlar. Ancak, steroidogenik dokularda eksprese edilen birçok genin promotör bölgesinde CREs bulunmaz. Transkripsiyonel düzenlenmenin, transkripsiyon faktörleri için özel tanıma motifleri sunan çeşitli DNA elementleri aracılığıyla sağlandığı bilinmektedir (Stocco ve diğ., 2003; Viger ve Tremblay, 2003; Viger ve diğ., 2008).

Steroidogenik faktör 1 (SF-1), CCAAT enhansır bağlayıcı protein (C/EBP), karaciğer reseptör homolog 1 (LHR-1), sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP), CREB/CRE modülatör protein, SF-1, Nur77, GATA-4 Leydig hücrelerinde hedef genleri olan transkripsiyon faktörleridir. Bu transkripsiyon faktörlerinden SF-1, Nur77 ve GATA-4 steroidogenik yolda görev alan hedef genleri bakımından karşılaştırıldığında benzerlik göstermektedirler (Tablo 2.4.2) (Jameson ve diğ., 2001; Viger ve Tremblay, 2003; Lee ve diğ., 2012).

Ad4BP veya NR5A1 olarak da bilinen Steroidogenik faktör 1 (SF-1), steroidogenik enzimleri kodlayan birçok genin düzenlenmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinden ilk tespit edilenidir (Lala ve diğ., 1992). Orfan nükleer reseptör ailesi transkripsiyon faktörlerinden olan SF-1'in etkisi gen inaktivasyonu yapılarak gösterilmiştir. SF-1 nakavt yapılan farelerde adrenal bezler ve gonadlar gelişmemiş ve XY bireylerde dişi iç genital fenotipi gözlemlenmiş (Luo ve diğ., 1994).

GATA faktörleri tüm ökaryotik organizmaların gelişiminde ve farklılaşmasında kritik rolleri olan evrimsel olarak korunmuş bir grup transkripsiyonel düzenleyicidirler. Üreme ile ilgili dokularda da, GATA gen anlatımının yapıldığı ortaya konulmuştur (LaVoie, 2003; Viger ve diğ., 2008). Yapılan *in vitro* çalışmalar GATA-4'ün steroidogenik hücrelerde fosforillendiğini ve fosforilasyon seviyelerinin cAMP ile uyarıldığını göstermektedir. Fosforilasyon GATA-4'ün DNA bağlama aktivitesini artırır, böylelikle birçok steroidogenik promotör üzerindeki transkripsiyonel özellikleri

yükselir. GATA faktörleri hedef promotör bölgelerini SF-1 ile sinerjistik bir ilişki ile düzenler (Tremblay ve Viger, 2003). Kimerik fare kullanılarak yapılan bir çalışmada GATA-4'ün fetal fare testisinde Leydig hücresi farklılaşmasını direkt olarak etkilediği gösterilmiştir (Bielinska ve diğ., 2007).

NR4A1 veya NGFI-B olarak da bilinen Nur77 transkripsiyon faktörü NR4A nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu transkripsiyon faktörleri hızlı erken yanıt faktörleri olarak sınıflandırılırlar; çünkü gen anlatımları steroidogenik gonadal hücreleri de içeren birçok dokuda hızlıca uyarılır. Son yıllarda NR4A üyeleri Leydig hücrelerinde bazal ve hormon uyarımlı gen ekspresyonunda yeni düzenleyiciler olarak dikkat çekmektedirler.

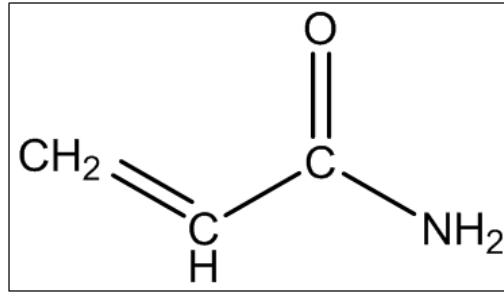
Tablo 2.4.2: SF-1, GATA-4 ve Nur77'nin steroidogenik yolaktaki hedef genleri.

Transkripsiyon Faktörleri			
	Steroidogenik faktör 1 (SF-1)	GATA-4	Nur77
Steroidogenik yolaktaki hedef genleri	ACTH-R, StAR, P450scc, HSD3B, 21-hidroksilaz, 11 β -hidroksilaz, 17 α -hidroksilaz, P450aldo, Aromataz, HDL-R, SR-B1	ACTH-R StAR, P450scc, HSD3B, HSD17B, 21-hidroksilaz, 11 β -hidroksilaz, 17 α -hidroksilaz, Aromataz P2, LH-R	21-hidroksilaz, 17 α -hidroksilaz, HSD3B, StAR, 20-hidroksisteroid dehidrogenaz

2.5.AKRİLAMİD

2.5.1. Akrilamidin Genel Özellikleri

Akrilamid (AA) kokusuz, beyaz, kristal yapıda katı bir bileşiktir. Vinil amid, propenoik asit amid, akrilik amid olarak sinonimleri mevcuttur (EPA, 2007). Şekil 2.5.1’de akrilamidin kimyasal yapısı gösterilmiştir (Friedman, 2003).



Şekil 2.5.1: Akrlamidin kimyasal yapısı.

Akrilamid su, aseton ve etonelde çözünebilir, toprakta ve yeraltı sularında taşınabilen ve biyolojik olarak parçalanabilen doymamış çift bağ içeren bir amiddir (Smith ve diğ., 1996). Oda sıcaklığında stabil olan akrilamid ultraviyole radyasyona maruz kaldığında veya erime noktasına kadar ısıtıldığında hızlıca polimerize olur (Budavari ve diğ., 1989). Akrlamidin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri tablo 2.5.1’de verilmiştir.

Tablo 2.5.1: Akrlamidin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Kimyasal formülü	C ₃ H ₅ NO
Moleküler ağırlığı	71.08
Yoğunluk	1.12g/ml (30°C)
Kaynama noktası	192.6°C
Erime noktası	84.5°C
Suda çözünürlüğü	2.155g/ml (30°C)

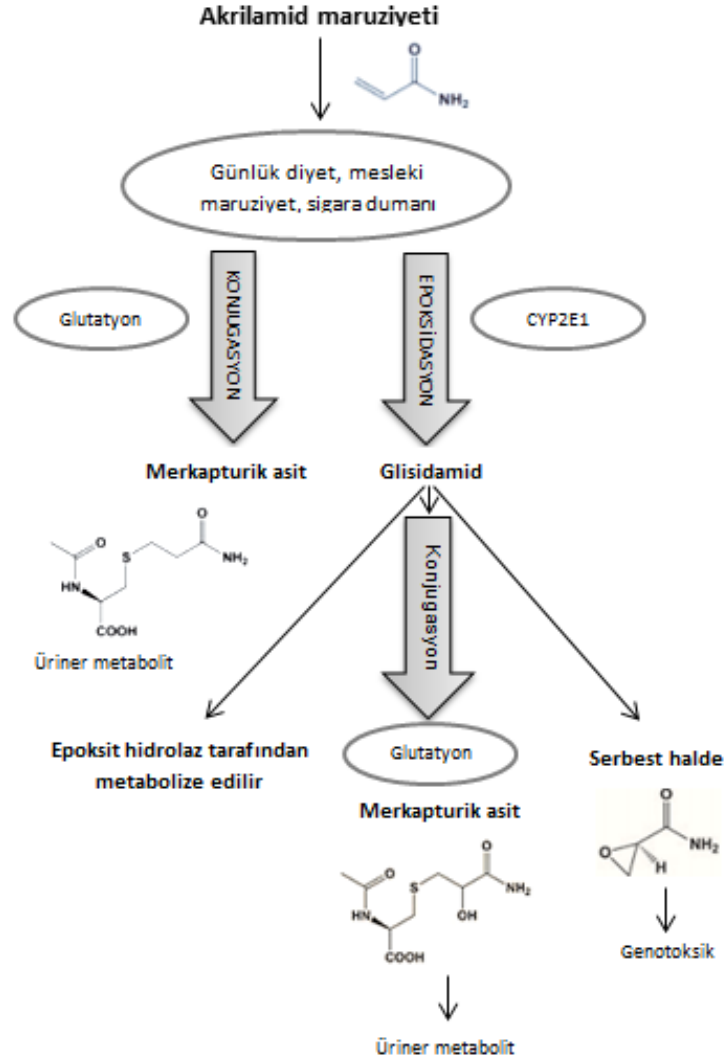
Ticari üretimine 1954'te başlanan doğadaki akrilamidin tamamı sentetiktir. Akrilamid endüstriyel bir materyal olarak poliakrilamid üretimi, endüstriyel atık suların arıtılması, içme suyu depoları ve kanalizasyon hatlarının yapımı, jel elektroforezi uygulamaları, kağıt ve tekstil endüstrisi, madencilik ve kozmetik gibi çeşitli alanlarda kullanılır (Stadler ve diğ., 2002; Tareke ve diğ., 2002; Friedman, 2003; Parzefall, 2008). Akrilamid sigara dumanının bir bileşenidir ve sigara dumanının ortalama 1.1 – 2.34 µg akrilamid içerdiği hesaplanmıştır (Smith ve diğ., 2000).

İsveç Ulusal Gıda Komisyonu ve Stokholm Üniversitesi akrilamidin ekmek, kızartılmış besinler ve kahve gibi yaygın olarak tüketilen gıdalarda bulunduğunu 2002 yılında rapor etmiştir. İlerleyen çalışmalar akrilamidin karbohidrat bakımından zengin içerikli yiyeceklerin 120°C ve üzeri sıcaklıklarda kızartılması, kavrulması ya da ızgara yapılması sonucu besin maddelerinin içeriğindeki şekerler ve asparjin aminoasiti arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu yoluyla oluştuğunu göstermektedir (Mottram ve diğ., 2002; Stadler ve diğ., 2002). Yapılan birçok çalışmada karbonillerin Maillard reaksiyonunu tetiklediği belirtiliyor. Bir çeşit α -hidroksi karbonil olan fruktozun düşük sıcaklık ve nem koşulları altında akrilamid oluşturma kapasitesi glukoz ve sukroza göre daha yüksektir (Yaylayan ve Stadler, 2005). Maillard reaksiyonu fırınlanan ve kızartılan besin maddelerindeki renk, lezzet ve aromanın oluşmasından sorumludur (Karagöz, 2009). Gıdaların doğal yapısında bulunmayan akrilamidin, meyve ve sebzelerin çiğ ya da haşlanarak tüketildiğinde sağlık açısından bir risk oluşturmadığı bildirilmiştir. Yetişkinler için günlük olarak alınan ortalama akrilamid 0.3 – 0.6 µg/kg vücut ağırlığı olarak hesaplanmıştır; ancak çocukların ve ergenlerin vücut ağırlığına oranla günlük olarak daha fazla (0.4 – 0.6 µg/kg) akrilamid aldıkları gösterilmiştir. Yüksek miktarlarda akrilamid içeren besinlerin alınımı, beslenme biçimlerine ve besinlerin hazırlanma yöntemlerine göre ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir (Schieber ve diğ., 2007). Avrupa Birliği Komisyonunun talep ettiği belli kategorilerdeki gıdaların akrilamid içeriği EFSA tarafından kızartılmış patatesten 600 µg/kg, patates cipslerinde 1000 µg/kg, ekmekte 150 µg/kg, bisküvi ve krakerlerde 500 µg/kg, kahvaltılık tahıllarda 400 µg/kg ve kahvede 450 µg/kg olarak bildirilmiştir (EC, 2013).

Akrilamidin düşük molekül ağırlığına ve suda yüksek çözünürlüğe sahip olması, insanlarda ve hayvanlarda ki çeşitli biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilmesine

olanak sağlar (Sumner ve diğ., 1992; Friedman, 2003). İnsanların akrilamide maruziyeti üç temel yol ile gerçekleşir: oral (yüksek ısıl işlem görmüş gıdaların tüketimi), inhalasyon (sigara dumanı, endüstriyel materyal) ve dermal (kozmetik ürünler, araştırma laboratuvarlarında kullanılan poliakrilamid jeller) (Carere, 2006). Akrilamid vücut içine alındıktan sonra kan dolaşımı yoluyla tüm vücuda hızlı bir şekilde dağılır, timüs, kalp, beyin, karaciğer, böbrek ve testis dokularında bulunabilir (Abramsson-Zetterberg ve diğ., 2005). Ayrıca, hamileliği süresince akrilamid içeriği yüksek diyet ile beslenen annelerden, bebeklere plasenta ve anne sütü yoluyla akrilamid geçtiği gösterilmiştir (Sörgel ve diğ., 2002).

Akrilamid metabolizmasında iki ana yolak bulunur (Şekil 2.5.2) (Baker ve diğ., 2014). Bu yolakların birinde akrilamid doğrudan glutatyon-S-transferaz enziminin katalizlediği konjugasyon reaksiyonu ile glutatyona (GSH) dönüşür ve idrar ile merkapturik asit olarak atılır (Dybing ve diğ., 2005). Glutatyon, akrilamid detoksifikasyonundaki temel radikal temizleyici olarak gösterilmektedir (Kurebayashi ve Ohno, 2006). Diğer metabolik yolakta ise akrilamid, karaciğerde CYP2E1 (sitokrom P450) enzimi aracılığıyla epoksidi olan glisidamide oksitlenir (Fennel ve diğ., 2005). Glisidamid daha sonra GSH ile konjugat oluşturur veya epoksit hidrolaz aracılığıyla metabolize edilir (Paulson ve diğ., 2005). Epoksitler oksijen içeren heterosiklik bileşiklerdir ve çok reaktiftirler bu sebepten proteinlerdeki ve DNA'daki nükleofilik bölgelerle kolayca reaksiyona girebilirler (Melnick, 2003). Akrilamid ve glisidamidin her ikisi de hemoglobin, glutatyon ve DNA gibi vücutta bulunan nükleofilik moleküllerle etkileşime girebilirler. Ancak, akrilamidin DNA ile olan reaktivitesinin glisidamide oranla daha düşük olduğu belirtilmiştir (Doerge ve diğ., 2005; Ghanayem ve diğ., 2005).



Şekil 2.5.2: Akrilamidin metabolizması.

Akrilamidin farklı canlı gruplarında çeşitli doku ve organlar üzerinde toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Bu toksik etkiler, nörotoksisite, karsinojenite, genotoksisite ve üreme sistemleri üzerine olan etkiler olarak sınıflandırılır (Friedman, 2003; Parzefall, 2008; Exon, 2010). Akrilamidin nörotoksik etkileri birçok çalışmanın konusu olmuştur; çünkü hem insanlarda hem laboratuvar hayvanlarında etkileri gözlenen tek toksik özelliğidir. Ortaya çıkan nörotoksik etkilerin temelinde akrilamidin kinezin aracılı aksonomal taşımayı ve nörotransmisyonu inhibe etmesi bulunmaktadır (LoPachin, 2002; Sickles ve diğ., 2002). Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu akrilamidi insanlar için muhtemel karsinojen olarak sınıflandırmıştır (IARC, 1994). Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda da akrilamidin beyin, merkezi sinir sistemi, üreme ile ilgili

organlar, tiroid ve diğer endokrin bezlerde tümör oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir (Friedman, 2003). Akrilamid ve metaboliti glisidamidin karsinojenik ve genotoksik etkileri çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Koyama ve diğ.,2006; Ehlers ve diğ., 2013). Akrilamid ile ilişkilendirilen genotoksik ve mutajenik etkilerin temelinde kendisine göre daha reaktif olan metaboliti glisidamid vardır (Wilson ve diğ., 2006). İnsan ve farelerden elde edilmiş hücre soyları ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında akrilamid kromozom kırıklarına, nokta mutasyonlarına ve özellikle guanin bazının yerine adeninin ve adenin bazı yerine sitozinin geçtiği gen mutasyonlarına neden olmuştur (Mei ve diğ., 2008; Pingorilho ve diğ., 2013).

2.5.2. Akrilamidin Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Yapılan çeşitli hayvan çalışmaları ile akrilamidin üreme fonksiyonları üzerinde oluşturduğu etkiler incelenmiş ve bu çalışmaların sonucunda akrilamidin erkek üreme kapasitesini olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada akrilamid uygulanması sonucu seminifer tubüllerde atrofi, çok nukleuslu dev hücre oluşumları, vakuolizasyon ve çok sayıda apoptotik hücre görülmesi gibi histopatolojik bulgulara rastlanmıştır (Yang ve diğ., 2005). Subkronik akrilamid maruziyeti sperm canlılığının azalmasına ve spermatozoanın normal gelişiminin etkilenmesine neden olur (Song ve diğ., 2008). Akrilamid uygulanan erkek sıçanlarda çiftleşme ve fertilitenin baskılandığı bununla birlikte spermlerin uterusu ulaşamamasından dolayı hamile bırakabilme oranının düştüğü belirtilmiştir (Tyl ve diğ., 2000). Akrilamid spermatid protaminlerinde sülfid bağlarını alkilleyerek gonadal hücrelerde baskın olarak ölüme ve bununla birlikte sperm (baş, kuyruk) morfolojisinde anomolilere sebep olur (Sega ve diğ., 1989; Sega, 1991). Yapılan bazı çalışmalarda bu durumun sperm penetrasyonunu etkilediği ve implantasyon öncesi kayıpları tetiklediği gösterilmiştir (Dearfield ve diğ., 1995; Tyl ve diğ., 2000). Ayrıca akrilamid, kinezin ve dinein motor proteinlerine bağlanması sonucu flagella fonksiyonunu bozarak sperm hareketliliğini de olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Tyl ve Friedman, 2003).

Akrilamid başlıca metaboliti olan glisidamidin DNA'ya gösterdiği reaktiviteyle ilişkili olarak sıçan ve fare spermatidlerinde klastojenik (kromozomlara hasar verebilme yeteneği) etkilere sebep olur ve germ hücresi mutajeni olarak gösterilir (Adler ve diğ., 2000). Erkek farelerle yapılan bir çalışmada akrilamid uygulanması sonucu germ

hücre gelişiminin belirli evrelerinde DNA kırıkları oluştuğu gözlenmiştir (Sega ve Generoso, 1990).

Yapılan bir diğer çalışmada akrilamidin Leydig hücrelerine doğrudan hasar verdiği ve bu sebepten testisin endokrin fonksiyonu üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (Song ve diğ., 2008). Artan doza bağlı olarak akrilamid Leydig hücre canlılığını ve serumda bulunan testosteron seviyesini düşürerek spermatogenez kapasitesinin düşmesine neden olur. Ayrıca, spermatogenez ile ilgili gen anlatımını negatif yönde etkilediği, kauda epididimisteki sperm miktarını azalttığı ve cinsiyet steroidlerinin taşınmasında olumsuz etkiler yaptığı gösterilmiştir (Yang ve diğ., 2005).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, akrilamidin farklı dozları TM3 Leydig hücrelerine LH uyarımlı olarak 24 saat boyunca uygulanmıştır. Deney süresi tamamlandığında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hücre canlılığı ve üretilen testosteron miktarı, RT-PCR yöntemi ile steroidogenik genler (StAR, Cyp11a1, Cyp17a1, HSD3B ve HSD17B) ve bu genlerin ortak transkripsiyon faktörlerinin (SF-1, GATA-4, Nur77) ifade düzeyi ölçülerek akrilamidin Leydig hücreleri üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.1.1. Kullanılan Hücre Soyu

Deneyde model olarak kullanılan TM3 hücre soyu ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan temin edilmiştir.

TM3 Leydig hücre soyu, 11-13 günlük *Mus musculus* türü farelerin testis dokusundan izole edilmiş, tümorogenik olmayan bir hücre soyudur. Epidermal büyüme faktörü (EGF), androjen, östrojen ve progesteron reseptörlerine sahip olan TM3 hücreleri Luteinizan hormon varlığında kolesterolü metabolize edebilme yeteneğindedir.

3.1.2. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı

Ticari olarak satın alınan DMEM/F12 50:50 kültür medyumunun 500 ml'lik şişesinden 50 ml çekildi. Daha sonra içerisine 25 ml at serumu, 12.5 ml fetal sığır serumu ve 7.5 ml Hepses tamponu 0.20 µm'lik filtreden süzülerek eklendi. 5 ml PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterin) antibiyotik karışımı ilave edildikten sonra maddelerin karışması için çalkalanan medyum +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.3. Hücre İnkübasyon Koşulları

Deneylerde kullanılan hücreler % 5CO₂'li inkübatörde, 37°C'de ve % 95 nemli ortamda 75 cm²'lik kültür kaplarında kültür medyumunu ile inkübe edilmiştir.

3.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler konfluent (%70-80 yoğunluk) duruma gelince kültür kabındaki medyum çekilip atılır. Kültür kabındaki hücreler 5ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkanır. Her 75 cm²'lik kültür kabı için 2-3 ml tripsin-EDTA solüsyonu hücelere 37°C'de 2-4 dakika boyunca uygulanır ve hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkması sağlanır. Yüzeyden ayrılan hücreler kültür medyumuyla pipetaj yapılarak toplanır ve santrifüj tüpüne aktarılır. 1500g'de oda ısısında 5dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılır ve dipte kalan hücre peleti bir miktar taze kültür medyumunu ile süspansiyon edilir. Hücre sayımı Neubauer lamı ile belirlendikten sonra hücreler kültür medyumunu konulmuş kaplara gerekli miktarda ekilir. Hücrelerin pasaj işlemi deney süresince haftada iki üç defa olmak üzere tekrarlandı.

3.1.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücelere pasaj işlemi uygulandıktan sonra yeterli miktarda kültür medyumunu ile pipetaj yapılır ve elde edilen hücre süspansiyonundan 1900 µl çekilip kriyotüpe aktarılır. Her tüpe dondurucu ajan görevinde 100 µl DMSO (dimetil sülfoksit) eklenir. Deney süresince her hücre dondurma işleminde stok tüpler bir gece -20°C'de tutulduktan sonra -86°C'ye alındı ve uzun süreli depolama için -196°C'lik sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.2. AKRİLAMİD KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Akrilamid ile çeşitli hücre soylarında yapılan *in vitro* çalışmalarda kullanılan dozlar esas alınarak bir doz aralığı oluşturulmuştur. %1'lik at serumu içeren deney medyumunu içerisinde 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında akrilamid solüsyonları hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak da %1'lik at serumu içeren kültür medyumunu kullanılmıştır.

Hazırlanan akrilamid solüsyonları ve kontrol grubu 0.2 µm milipor filtre ile steril edilip LH (100 ng/ml) uyarımı yapıldıktan sonra TM3 Leydig hücrelerine 24 saat uygulanmıştır.

3.3. MTT HÜCRE CANLILIĞI TESTİ

Sitotoksik etkilerin değerlendirilmesinde kantitatif, kolorimetrik bir yöntem olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil tetrazolium bromid] testi kullanılmıştır. Bu yöntem, canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesini belirlemede kullanılan en bilindik testtir. MTT testi, metabolik olarak aktif olan hücrelerin, sarı renkli bir tetrazolium tuzu olan MTT'yi mor renkli formazan kristallerine indirgeyebilme esasına dayanır. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. MTT formazanları suda çözünemediği için absorbansın ölçülmesinden önce kristallerin çözünebilmesi için organik çözücülere ihtiyaç vardır.

Uygun hücre kültürü koşullarında çoğalmaya bırakılan hücreler konfluent duruma gelince tripsin-EDTA solüsyonu ile kültür kabının zemininden kaldırılmıştır. Neubauer lamı kullanılarak sayılan hücreler, MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde %1'lik at serumu kullanılarak ekilmiştir. Hücrelerin tutunması için bir gece beklenildikten sonra, hücreler akrilamidin 0.01 mM ile 10 mM arasında dokuz farklı konsantrasyonu ile LH uyarımı yapılan deney medyumlarında 24 saat süreyle 37°C'de CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda her bir kuyucuğa 10 µl MTT I solüsyonu eklenmiştir ve 4 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µl MTT II solüsyonu (SDS) eklenmiş ve bir gece boyunca CO₂ inkübatöründe bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Mossman, 1983).

3.4. SERBEST TESTOSTERON TAYİNİ

Hücre kültürü süpernatandındaki serbest testosteron miktarı, kompetitif immunoenzimatik renk ölçüm metodu ile belirlenmiştir. Serbest testosteron tayini, MyBioSource Rat Free Testosterone Elisa Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sırasında kullanılan kültür kaplarının kuyuları Keçi-anti-tavşan antikoru ile kaplıdır. Standart veya örnekler testosterona ve testosteron ile işaretlenmiş Horseradish peroksidaz (HRP) konjugatına spesifik antikorla kuyulara uygun şekilde eklenir ve inkübasyona bırakılır. Kompetitif inhibisyon reaksiyonu, HRP işaretli ve işaretli olmayan testosteron ile antikor arasında gerçekleşir.

Deneye başlamadan önce kullanılacak olan tüm solüsyonların oda ısısına getirilmesi sağlanmıştır. Akrilamidin iki farklı konsantrasyonunu (0.1 mM ve 2 mM) içeren deney medyumları ile 24 saat süreyle 37°C'de CO₂'li inkübatörde inkübe edilen hücrelerin üzerinden medyumlar pipet ile çekilip santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 15 dk boyunca 1000 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant hızlıca toplanmıştır ve kültür kaplarına her kuyuda 50µl olacak şekilde aktarılmıştır. Blank (kör) kuyusu hariç tüm kuyulara 50 µl HRP konjugat ve 50 µl antikor eklendikten sonra 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her kuyu 200 µl Wash Buffer ile iki kere yıkanmıştır ve sıvı kalmadığından emin olmak için kültür kabı ters çevrilerek temiz bir peçeteye hafifçe vurulmuştur. Tüm kuyulara önce 50 µl Substrat A, arkasından 50 µl Substrat B eklenip renk değişimi kontrol edilerek 37°C'de karanlıkta 15dk süreyle inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için tüm kuyulara 50 µl Stop Solution eklenmiştir ve örneklerde oluşan optik yoğunluk 10 dk içinde 540 nm dalga boyunda ELISA cihazında okunmuştur. Konsantrasyon değerleri standart grafiği oluşturularak belirlenmiştir. Bu test her gruptaki örnekler için üç kez tekrarlanmıştır.

3.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İNCELEMELERİ

3.5.1. Total RNA İzolasyonu

Hücre kültürü ortamında akrilamidin iki farklı konsantrasyonuna (0.1 mM ve 2 mM) 24 saat boyunca maruz bırakılmış hücrelerden total RNA izolasyonu, QIAGEN RNeasy Mini Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kit slika temelli seçici bağlanma özelliklerine sahip membranı hızlı mikrosipin teknolojisiyle birlikte kullanarak yüksek kalitede RNA saflaştırılmasını sağlar.

Deneye başlamadan önce kullanılacak olan tüm solüsyonların oda ısısına getirilmesi sağlanmıştır. Altı kuyulu hücre kültür kaplarında akrilamid içeren deney medyumları ile 24 saat süreyle 37°C'de CO₂'li inkübatörde inkübe edilen hücrelerin üzerinden medyum çekilip atılır. Hücrelerin yapıştıkları zeminden kalkmaları için tripsin ile muamele edilir. Kalkan hücrelerin üzerine medyum eklenir ve RNase-free santrifüj tüplerine toplanır. 300 g'de 5 dk süreyle santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılır ve hücre duvarlarının ve organel zarlarının parçalanması için 350 µl RLT solüsyonu eklenir. Pipetaj yapılarak veya vorteks ile iyice karışması sağlanır. Hücre lizatının homojenizasyonu için lizat 20 gauge iğneden RNase free şırınga kullanılarak en az 5 kere geçirilir. Homojenize olmuş hücrelere RNA'nın çökmesi için eşit hacimde %70 etanol eklenir. İyice karıştırıldıktan sonra 700 µl örnek 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy spin kolona aktarılır ve 8000 g'de 15 sn süreyle santrifüj edilir. Bu basamaktan sonra yıkama adımlarına geçilir. RNeasy spin kolonun membranında kalmış RNA'lar için 700 µl RW1 solüsyonu, kullanılan diğer solüsyonlardan kalan tuz kalıntılarını yıkamak için de 500 µl RPE solüsyonu eklenir, her solüsyon eklendikten sonra 800 g'de 15 sn süreyle santrifüj edilir. Her santrifüj işleminden sonra toplama tüpü spin kolumdan dikkatlice ayrılıp boşaltılır ve bir sonraki adımda tekrar kullanılmak üzere spin kolona takılır. RPE solüsyonuyla yapılan son santrifüjün ardından spin colum 1.5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilir ve 50 µl RNase free su eklenerek 1 dk süreyle 8000 g'de santrifüj edilir. Bu adımın sonunda elde edilmek istenen total RNA 1.5 ml'lik toplama tüpünde elde edilir. Örnekler -80°C'de muhafaza edilir.

Elde edilen RNA örneklerinin içerdiği nükleik asit konsantrasyonları (ng/μl) ve saflık derecelerinin (A260/230) ölçümü için nanodrop cihazı kullanılmıştır.

3.5.2. Total RNA'nın Komplementer DNA'ya (cDNA) Çevrilmesi

Hücrelerden izole edilen RNA'lar Biomatik marka First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Turbo-1 Reverse (ters) transkriptaz yeni nesil bir transkriptazdır ve tek iplikli RNA veya DNA kalıplarından cDNA ipliklerinin sentezini katalizler.

Reverse transkripsiyon reaksiyonlarının RNase-free ortamda gerçekleşmesi gerektiği için çalışma alanı DEPC'li (diethylpirokarbonat) su ile silinir. Elde edilen RNA örnekleri nükleaz free su ile konsantrasyonları eşit olacak şekilde sulandırılır. Uygun konsantrasyonlara getirilmiş RNA örnekleri hızlıca çözündürülür ve buz üzerinde çalışmak koşuluyla reaksiyon karışımı hazırlanır. Reaksiyon karışımına her örnek için uygun hacimde RNA eklendikten sonra sırasıyla 1 μl Random primer, 1 μl dNTP karışımı ve toplam hacim 14.5 μl olacak şekilde nükleaz free su eklenir. Karışım 65°C'de 5 dk süreyle inkübe edildikten sonra en az bir dk buz üzerinde bekletilir ve kısa bir santrifüj işleminden geçirilir. Reaksiyon karışımına sırasıyla 4 μl 5X RT Tamponu, 0.5 μl RNase inhibitörü ve 1 μl Turbo-1 Reverse transkriptaz eklenir. Toplam hacmi 20 μl olan karışım kısa bir santrifüj işleminden geçirildikten sonra cDNA sentezinin tamamlanması için önce 42°C'de 50 dk sonra 85°C'de 5 dk süreyle inkübe edilir. İnkübasyonların ardından tüpler buz üzerine alınır ve reaksiyon durdurulur. Yeni sentezlenmiş cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilir.

Elde edilen cDNA örneklerinin içerdiği nükleik asit konsantrasyonları (ng/μl) ve saflık derecelerinin (A260/280) ölçümü için nanodrop (Thermo Scientific 2000) cihazı kullanılmıştır.

3.5.3. Primerlerin Seçilmesi

Ekspresyon çalışmalarında kullanılan genlerin primer çiftleri tablo 3.5.1’de belirtilen kaynaklar baz alınarak BIOMATIC firmasına sentezlettirilmiştir.

Tablo 3.5.1: RT-PCR işleminde kullanılan primer dizileri (F: Forward, R: Reverse).

GEN ADI	PRİMER DİZİSİ	BAZ ÇİFTİ	Kaynak
StAR	F: 5'-CTGCTAGACCAGCCCATGGAC-3' R: 5'-TGATTTCCCTGACATTTGGGTTC-3'	109	Horstman ve diğ., 2012
Cyp11a1	F: 5'-CGTGACCAGAAAAGACAACA-3' R: 5'-AGGATGAAGGAGAGGAGAGC-3'	152	Liu ve diğ., 2014
Cyp17a1	F: 5'-CATCCCACACAAGGCTAACAT-3' R: 5'-CTCCGAAGGGCAAATAACTG-3'	200	Liu ve diğ., 2014
HSD3B	F: 5'-TAGTATTGCTTTTATTCCCCCT-3' R: 5'-ATTTATTGCTGTTTTGTTTTGC-3'	91	Liu ve diğ., 2014
HSD17B	F: 5'-TGGGGCTGGAGGGAGAGT-3' R: 5'-TATTTGGGGGGAGGGGTTC-3'	228	Liu ve diğ., 2014
SF-1	F: 5'-GCCCTGTTGGATTACACCTTG-3' R: 5'-GTTGCCAAATGCTTGTGGTA-3'	382	Matzkin ve diğ., 2012
Nur77	F: 5'-CGGGATCCGCTACTACCTAGCTTAGTGACC-3' R: 5'-CTGGTACCGCGTGCCTCTGCAATCCTTC-3'	1013	Martin ve diğ., 2008
GATA-4	F: 5'-CTCTGGAGGCGAGATGGGAC-3' R: 5'-CGTCGTCACCTTCTCTACGCG-3'	414	Liu ve diğ., 2014
B-Actin	F: 5'-CGTTGACATCCGTAAGAC-3' R: 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAG-3'	201	Liu ve diğ., 2014
GAPDH	F: 5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3' R: 5'-TGAAGGGGTCGTTGATGG-3'	108	Liu ve diğ., 2014

3.5.4. RT-PCR ile Genlerin İfade Düzeyinin Belirlenmesi

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve kesin sonuçlar veren nicel PCR yöntemi gerçek zamanlı PCR'dır (Bustin, 2000). RT-PCR, floresan ışığa yapan haberci moleküller kullanarak PCR reaksiyonunun her döngüsünde çoğalan DNA miktarını eş zamanlı olarak görüntülenmesini sağlayan bir tekniktir, böylece nükleik asit çoğalması ve belirlenmesi adımlarını tek bir basamakta yapılmasına olanak sağlar (Wong ve Medrano, 2005). Hedef genin çoğalmasının ilk belirlendiği zaman genellikle döngü eşik değeri (cycle treshold C_T) ile ifade edilir. Hedef gen için belirlenen floresan yoğunluğunun geçmiş PCR döngülerine göre en kuvvetli olduğu değer cycle treshold C_T değerini verir. Reaksiyonun C_T değeri başlangıçtaki kalıp DNA'nın miktarıyla orantılıdır. Başlangıçta fazla miktarda kalıp DNA bulunuyorsa PCR reaksiyonunun erken döngülerinde floresan sinyali verilebilmesi için yeterli ürün çoğaltılır; ancak reaksiyona az miktarda kalıp DNA ile başlanılırsa kuvvetli floresan sinyalinin görülebilmesi için daha fazla döngü gerçekleşmiş olması gerekir (Bustin ve diğ., 2005). C_T değerleri arasındaki bu ilişki RT-PCR'ın kantitatif olarak değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Farklı miktarlardaki başlangıç ürünlerinden kaynaklanacak hatalardan kaçınmak için ve elde edilen sonuçların normalizasyonu için internal kontrol kullanılması gereklidir. Internal kontrol olarak, temel hücresel fonksiyonların yerine getirilmesi için gerekli olan ve her durumda ekspresyonu gerçekleşmekte olan referans gen veya housekeeping gen olarak adlandırılan genler kullanılır (Bustin, 2000).

Bu tez çalışmasında seçilen steroidogenik genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için LightCycler® Nano (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) Sistemi ve LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green 1 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kiti kullanılmıştır. PCR ürünlerinin oluşması SYBR Green 1 floresan sinyalinin ölçülmesiyle saptanır. SYBR Green 1 DNA çift sarmalına eklenir. Solüsyondaki DNA'ya bağlanmamış SYBR Green 1 boyası çok az floresan gösterirken DNA bağlanmasına bağlı olarak floresan miktarı oldukça artar. Bu nedenle PCR sırasında, SYBR Green 1 floresanının artması doğrudan çift iplikli DNA oluşumu ile orantılıdır

Real time PCR yönteminde DNA kalıbı olarak akrilamidin düşük ve yüksek dozları uygulanmış hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri kullanılmıştır. Master karışımı

hazırlamak için kit içeriğinde bulunan enzimden (FastStart tag DNA polimeraz) 14 µl çekilip reaksiyon karışımı etiketli tüpe eklenir. Pipetaj yapılarak karışması sağlanır ve hazırlanan master karışım ışıktan korunur. Her bir örnek için hazırlanan 20 µl hacimli reaksiyon karışımı 5 µl cDNA, 9 µl PCR grade su, son konsantrasyonları 0.5 µM olacak şekilde hazırlanmış mRNA'ya özgü 2 µl primer ve 4 µl Master karışım içerir. PCR tüplerinde hazırlanan örnekler Light Cycler cihazına yerleştirilir. LightCycler® Nano cihazı dört farklı program içerir: FastStart DNA polimerazın aktivasyonu ve DNA'nın denatürasyonunun gerçekleşmesi için ön-inkübasyon, hedef DNA'nın çoğaltılması (amplifikasyon), PCR ürünlerinin tanımlanması ve rotor ile termal kısmın soğuması (inkübasyon). Reaksiyon koşullarına uygun sıcaklıklar ve döngü sayıları ayarlandıktan sonra PCR başlatılır (Tablo 3.5.2).

Tablo 3.5.2: Real Time PCR cihazı deney koşulları

Program	Döngü Sayısı	Hedef Sıcaklık		Süre
Ön İnkübasyon	1	95°C		10 dk
Çoğalma	45	Denatürasyon	95°C	10 sn
		Bağlanma	54°C	30 sn
		Uzama	72°C	25 sn
İnkübasyon	1	40°C		30 sn

3.5.5. $\Delta\Delta C_T$ Metodu ile Verilerin Değerlendirilmesi

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu bağıl gen ekspresyonu analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hedef genlere ve referans genlere ait C_T değerleri RT-PCR cihazından alınır. Öncelikle hedef genin C_T değeri referans gene göre normalize edilir, bu işlem hem madde uygulaması yapılmış test geni için hem de kontrol grubu için gerçekleştirilir:

$$\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{hedef,test})} - C_{T(\text{referans,test})}$$

$$\Delta C_{T(\text{kontrol})} = C_{T(\text{hedef,kontrol})} - C_{T(\text{referans,kontrol})}$$

İkinci adım olarak uygulama yapılmış test geninin ΔC_T değeri kontrol grubunun ΔC_T değerine göre normalize edilir:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{kontrol})}$$

Son olarak ekspresyon oranı hesaplanır:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Normalize edilmiş ekspresyon oranı}$$

Sonuç, referans genin ekspresyonuna göre normalize edilmiş madde uygulaması yapılmış test geninin ifadesinin kontrol grubuna göre kaç kat azaldığını veya arttığını verir (Livak ve Schmittgen, 2001) .

3.6. İSTATİSTİK ANALİZ

Deney gruplarında uygulanan doza bağılı olarak hücre canlılığı ve serbest testosteron verilerinin istatistik değerlendirilmesinde Graphpad Prism 5.0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey's testi uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde $p<0.001$ ve $p<0.01$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

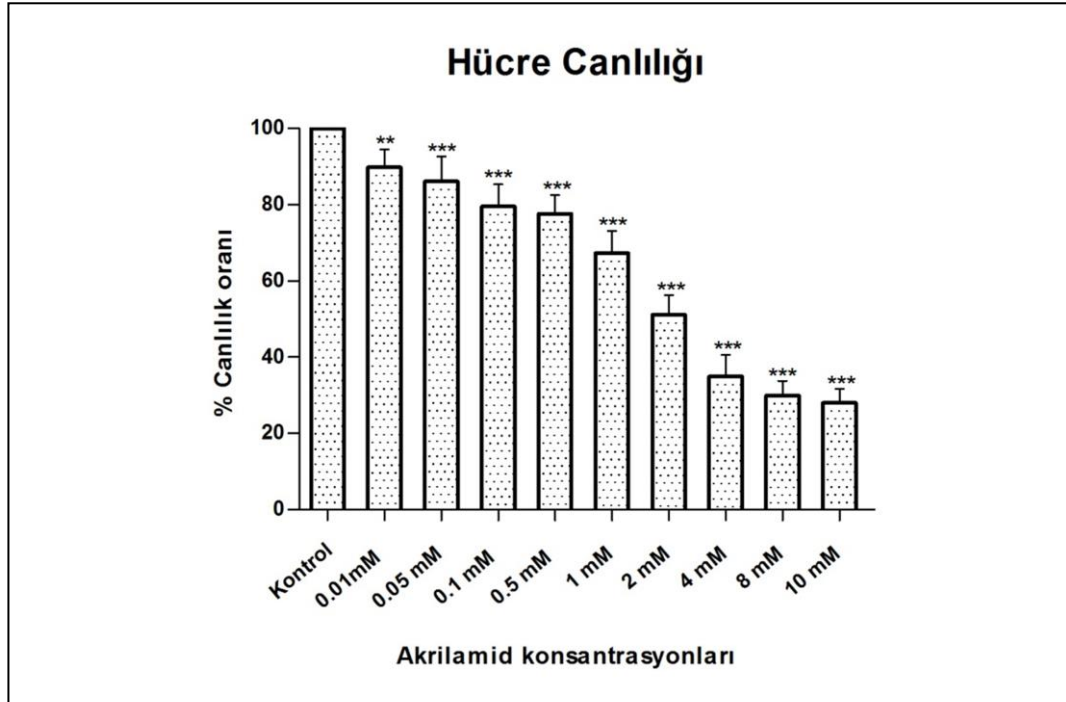
Steroidogenik genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin mRNA düzeylerindeki, uygulanan akrilamid dozuna bağımlı değişimlerin istatistiksel olarak değerlendirmesi Livak ve Schmittgen 2001'e ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey's test (Ct değeri olarak belirlenmiş) sonuçları referans gen olan β -actin ve kontrol koşullarına göre anlamlılık ($p<0.05$, $p<0.01$) dereceleri belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI

4.1.1. MTT Bulguları

Akrilamidin 0.01 mM ile 10 mM aralığındaki LH uyarımı yapılmış dokuz farklı dozunun testis TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sürede hücre canlılığı üzerine etkisi MTT testi yapılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kontrol ve akrilamid gruplarındaki hücre canlılık oranları şekil 4.1.1.'de verilmiştir.



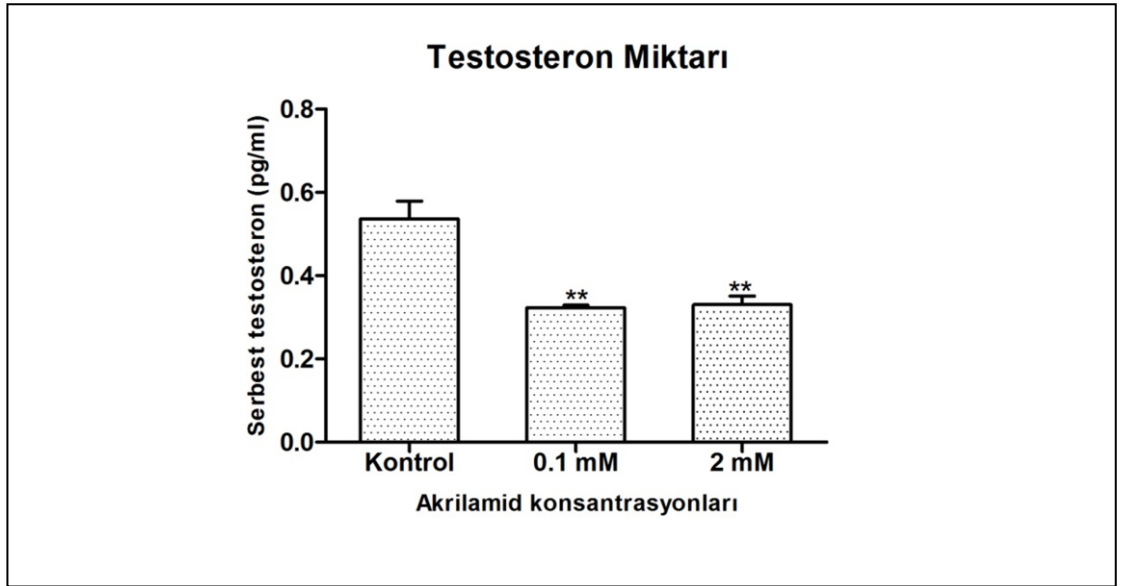
Şekil 4.1.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde % canlılık oranı üzerine etkileri (***:p< 0,001; **:p< 0,01).

Akrilamidin TM3 hücre soyu üzerindeki 24 saatlik maruziyeti sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma 0.01 mM konsantrasyonunda görülmeye başlamıştır. Hücre canlılığını %80 oranının altına (%79,52) düşüren ilk dozun 0.1 mM akrilamid konsantrasyonu olduğu tespit edilmiştir. 2 mM akrilamid dozunun ise hücre canlılık oranını % 50'ye düşürdüğü bulunmuştur.

Akrilamidin 0.01 mM ile 10 mM aralığındaki dokuz farklı konsantrasyonuyla yapılan doz denemeleri sonucunda bu tez çalışmasında kullanılacak olan iki farklı akrilamid konsantrasyonuna karar verilmiştir. MTT testi sonuçlarına göre akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinin %50'sini öldüren 2 mM dozu yüksek doz olarak, hücre canlılık oranını %80'in altına düşüren ilk doz olan 0.1 mM dozu düşük doz olarak seçilmiştir.

4.2. SERBEST TESTOSTERON BULGULARI

TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında kompetitif immunoenzimatik renk ölçüm metodu kullanılarak hesaplanan testosteron miktarları şekil 4.2.1'de verilmiştir.

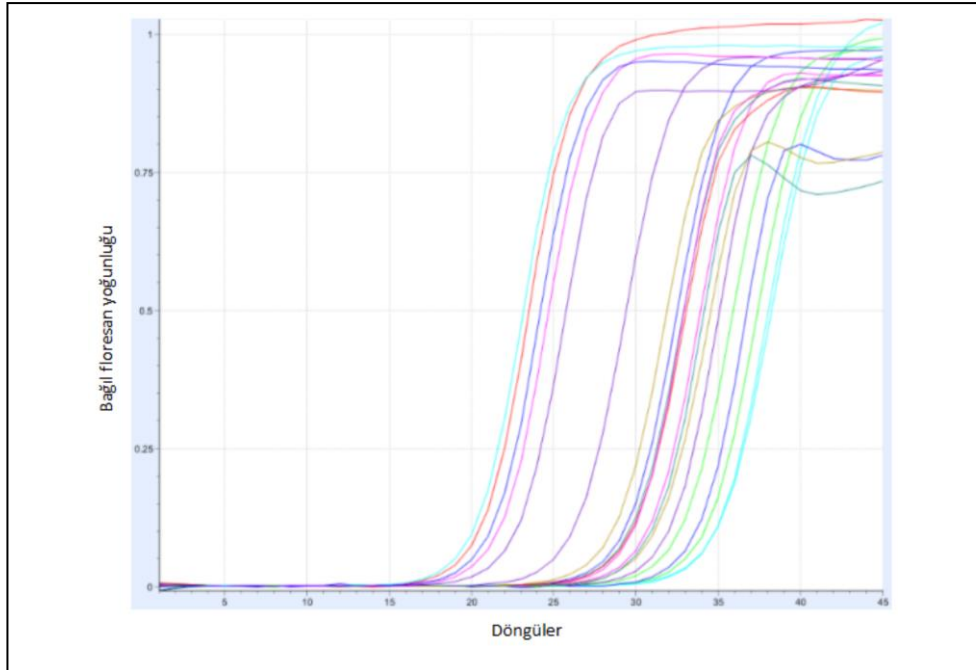


Şekil 4.2.1: Akrilamidin TM3 Leydig hücrelerinde serbest testosteron üzerine etkileri (**:p<0,01).

24 saat sonunda kontrol grubu ve akrilamidin iki farklı dozu serbest testosteron miktarı bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı (p<0,01). Akrilamidin 0.1 mM ve 2 mM dozları 24 saatin sonunda, birbirlerine göre kıyaslandığında ise anlamlı bir fark bulunamadı.

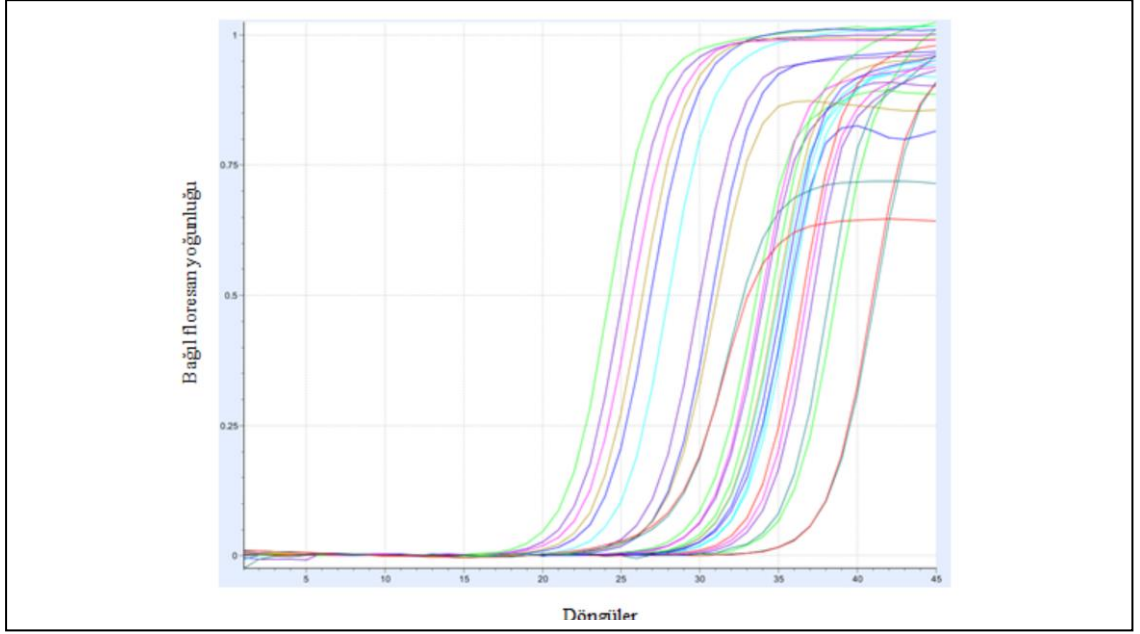
4.3. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) BULGULARI

Akrilamidin, steroidogenik genler (StAR, Cyp11a1, Cyp17a1, HSD3B ve HSD17B) ve transkripsiyon faktörlerinin (SF-1, GATA-4, Nur77) gen anlatım seviyeleri üzerindeki etkileri TM3 Leydig hücrelerinde SYBR Green I floresans boyası ile RT-PCR kullanılarak belirlenmiştir. 24 saat süreyle akrilamidin LH uyarımı yapılmış 0.01 ve 2 mM dozlarına maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinde sadece LH uyarımı yapılmış kontrol grubuna göre anlamlı ve anlamsız bulgular elde edilmiştir. Tüm sonuçlar referans gen olarak kullanılan β -aktin'e göre normalize edilmiştir. Kontrol grubuna ait örneklerin RT-PCR sonuçlarına göre Ct değerlerinin görüldüğü amplifikasyon eğrileri grafiği şekil 4.3.1'de verilmiştir.

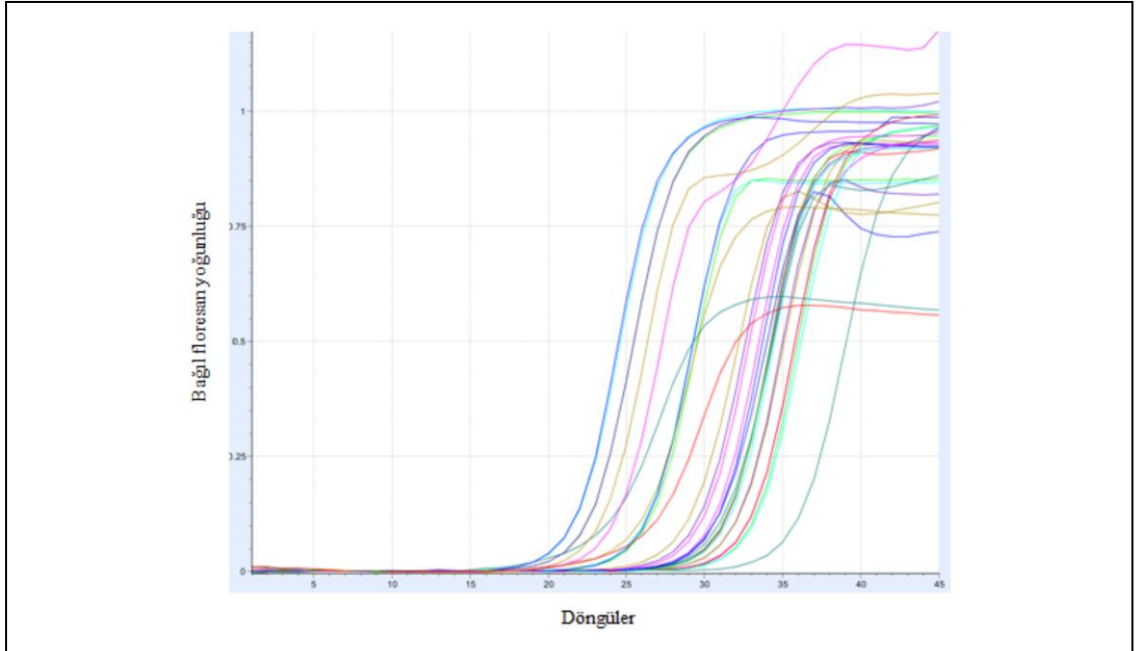


Şekil 4.3.1: Kontrol grubunun RT-PCR sonuçlarına göre amplifikasyon eğrileri.

0.1 ve 2 mM AA konsantrasyonlarına maruz bırakılmış örneklerin RT-PCR sonuçlarına göre Ct değerlerinin görüldüğü amplifikasyon eğrileri grafiği sırasıyla şekil 4.3.2 ve 4.3.3’de verilmiştir.

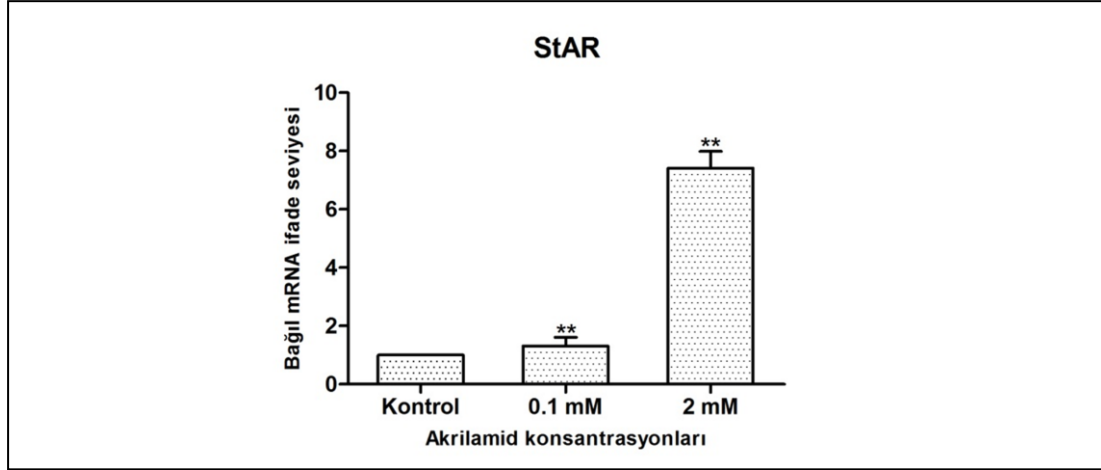


Şekil 4.3.2: 0.1 mM akrilamide maruz kalmış grubun RT-PCR sonuçlarına göre amplifikasyon eğrileri.



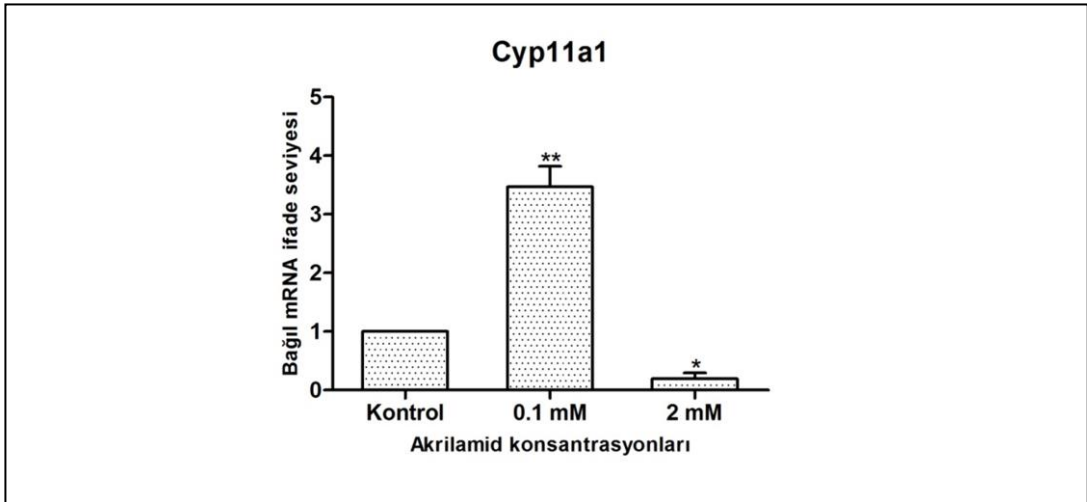
Şekil 4.3.3: 2 mM akrilamide maruz kalmış grubun RT-PCR sonuçlarına göre amplifikasyon eğrileri.

Şekil 4.3.4'te 24 saat boyunca akrilamidin iki farklı dozu uygulanan TM3 Leydig hücrelerinde çalışılan StAR gen ifadelerinin kontrole göre değerlendirilmesi verilmiştir. Tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0.01$).



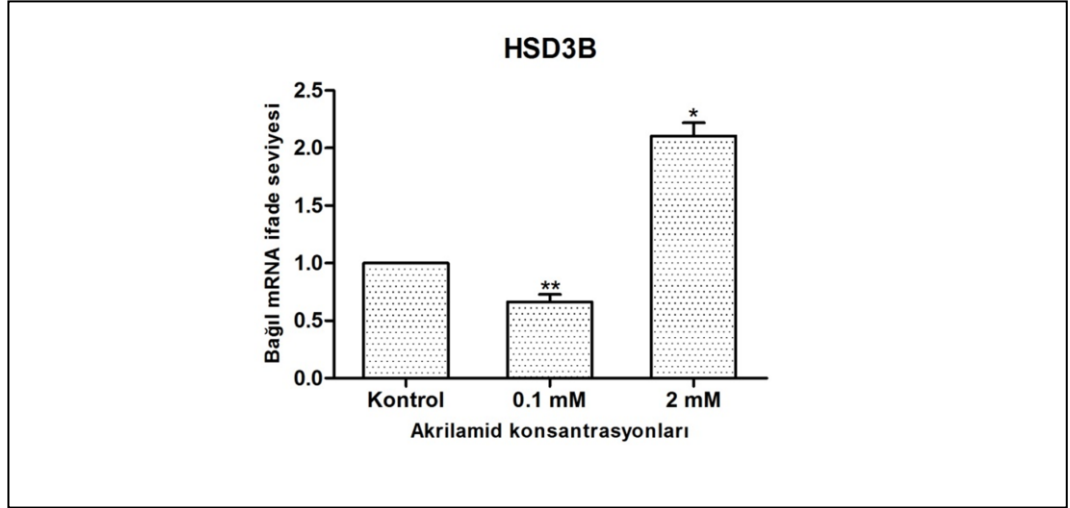
Şekil 4.3.4: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde StAR geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), ($p < 0.01$).

TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda akrilamid uygulanan grupların kontrol grubuna göre CYP11A1 gen ifadeleri şekil 4.3.5'te verilmiştir. 0.1 mM dozunda gen ifade seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.01$) olarak artış gösterirken, 2 mM dozu kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) olarak düşüş göstermektedir.

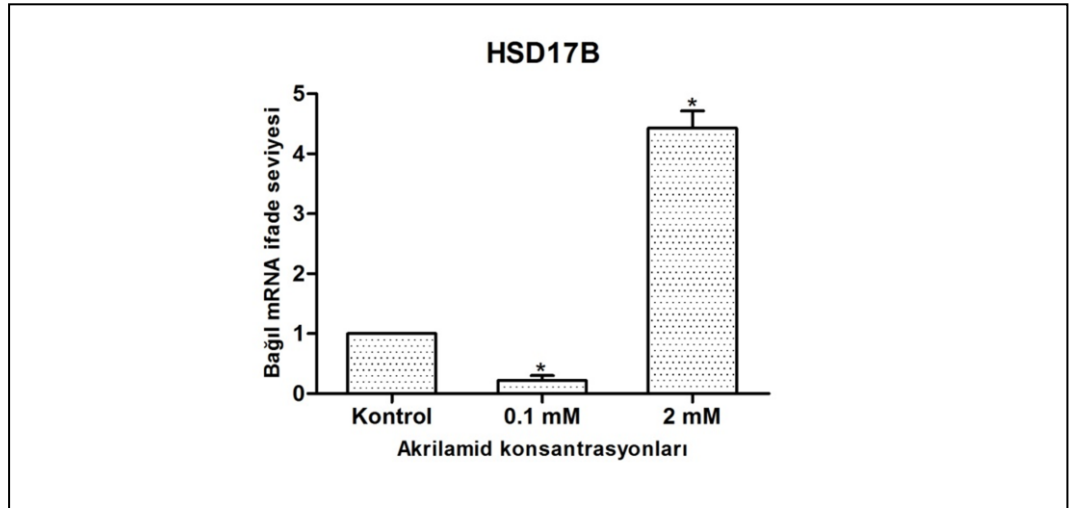


Şekil 4.3.5: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde Cyp11a1 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), ($p < 0.01$, $p < 0.05$).

24 saat boyunca akrilamidin iki farklı dozu uygulanan TM3 Leydig hücelerinde çalışılan HSD3B ve HSD17B genlerinin ifade seviyeleri sırasıyla şekil 4.3.6 ve 4.3.7’de verilmiştir. Her iki gende de 0.1 mM akrilamid uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı ($p < 0.01$, $p < 0.05$) azalma görülmüştür. 2 mM akrilamid uygulanan gruplarda ise kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı ($p < 0.05$) bir artış görülmüştür.

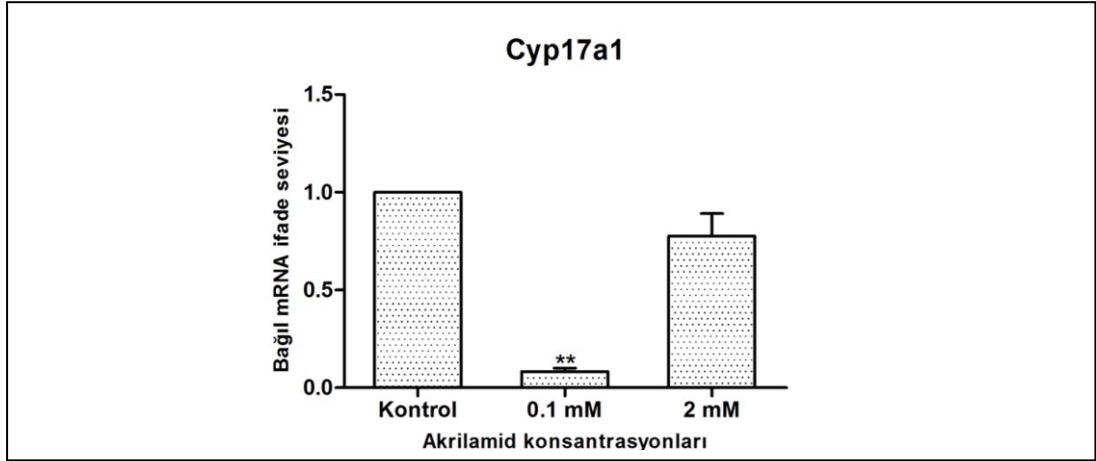


Şekil 4.3.6: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde HSD3B geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), ($p < 0.01$, $p < 0.05$).



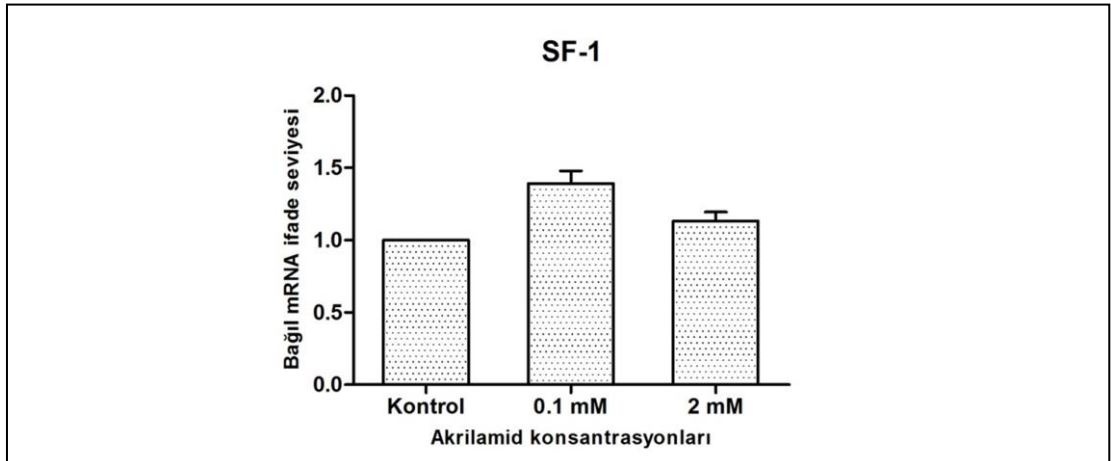
Şekil 4.3.7: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde HSD17B geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), ($p < 0.05$).

Akrilamide 0.1 ve 2 mM konsantrasyonlarında 24 saat boyunca maruz bırakılan TM3 Leydig hücrelerinde CYP17A1 geninin mRNA ifade seviyeleri şekil 4.3.8’de verilmiştir. CYP17A1 gen ifadesinde deney grupları kontrole göre karşılaştırıldığında 0.1 mM dozunda anlamlı ($p < 0.01$) bir azalma görülürken 2 mM dozunda kontrole göre anlamlı bir etki görülmemiştir.



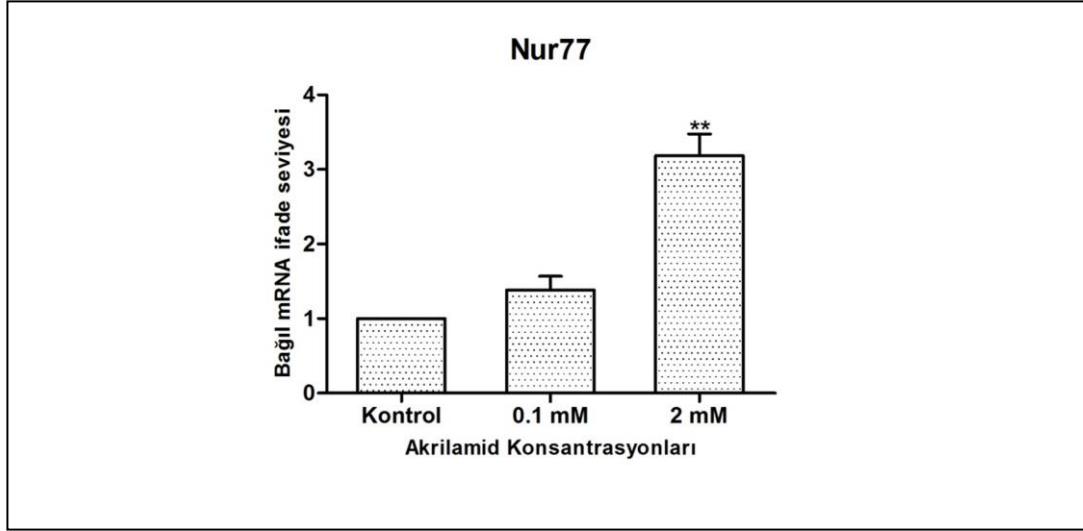
Şekil 4.3.8: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde Cyp17a1 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), ($p < 0.01$).

Şekil 4.3.9’da 24 saat boyunca akrilamidin iki farklı dozu uygulanan TM3 Leydig hücrelerinde çalışılan SF-1 gen ifadelerinin kontrole göre değerlendirilmesi verilmiştir. Deney grupları kontrole karşılaştırıldığında hiçbir grup anlamlılık göstermemektedir.

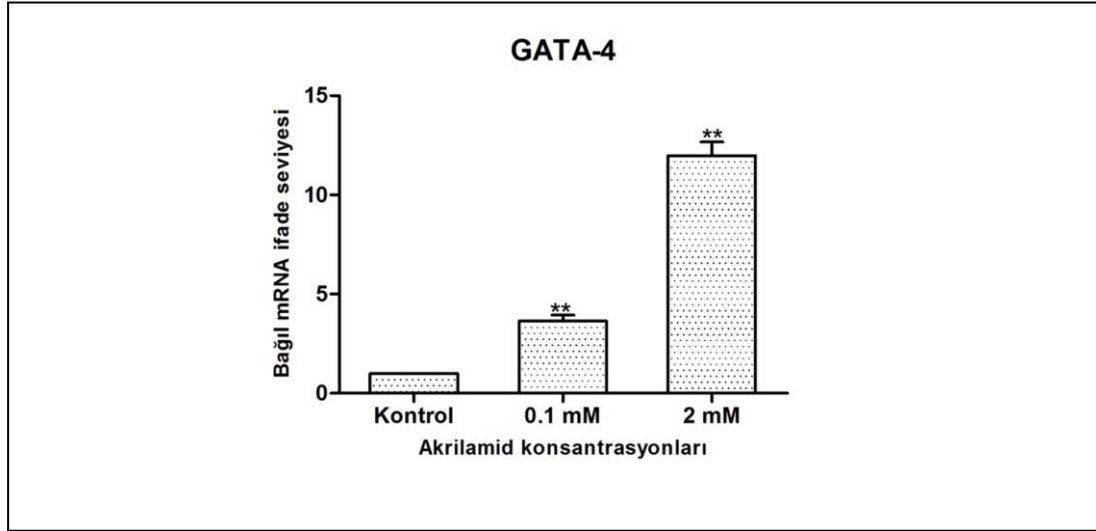


Şekil 4.3.9: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde SF-1 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi.

TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda akrilamid uygulanan grupların kontrol grubuna göre Nur77 ve GATA-4 genleri ifadeleri sırasıyla şekil 4.3.10 ve şekil 4.3.11’de verilmiştir. 0.1 mM dozunda sadece GATA -4 geninde kontrole göre anlamlı bir artış görülürken 2 mM dozunda her iki genin de ifade düzeylerinde artış görülmüştür.



Şekil 4.3.10: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde Nur77 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), ($p < 0.01$).



Şekil 4.3.11: Akrilamidin TM3 Leydig hücreleri üzerinde GATA-4 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: kontrole göre), ($p < 0.01$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akrilamid 1970'lerden beri polimer, kozmetik, kağıt, tekstil, atık su iyileştirme ve laboratuvar jellerinin üretimi gibi çeşitli endüstri alanlarında kullanılan suda çözünebilen, kimyasal olarak reaktif bir moleküldür (Friedman 2003, Parzefall 2008). Endüstride ve laboratuvarında kullanımının yanı sıra akrilamidin ısıtılmış uygulanmış belirli yiyecek ürünlerinde bulunduğu 2002 yılında İsveç Ulusal Gıda Ajansı ve Stokholm Üniversitesi araştırmacıları tarafından rapor edilmiştir (Claus ve diğ., 2008). Yüksek konsantrasyonlarda akrilamid içeren patates cipsi, kızarmış ekmek, bisküvi, kahvaltılık tahıllar ve kahve insanların günlük akrilamid maruziyetinde en fazla payı olan gıda maddeleridir (Friedman 2003, Stadler ve Scholz 2004). Ayrıca akrilamidin sigara dumanında da bulunduğu gösterilmiştir (Schettgen ve diğ., 2003; Fennel ve diğ., 2005). Akrilamidin biyolojik sistemler üzerindeki toksik etkileri nörotoksisite, genotoksisite, üreme toksisitesi ve embriyotoksisite olarak sıralanır (Exon 2006, Ma ve diğ., 2011). Deney hayvanlarına oral olarak akrilamid uygulaması yapılan birçok çalışmada akrilamidin testikular fonksiyon üzerindeki etkileri test edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda sperm sayısında ve canlılığında azalma, anormal sperm morfolojisinde artış, seminifer tubullerde histopatolojik değişiklikler (vakuolizasyon, apoptotik ve dev hücre oluşumları) gözlenmiştir (Sakamoto ve Hashimoto 1986; Yang ve diğ., 2005; Song ve diğ., 2008; Kermani-Alghoraishi ve diğ., 2010). Akrilamidin sperm üzerinde genotoksik etkisi olduğu da mikronukleus ve kromozom aberasyonu testleri yapılarak gösterilmiştir (Yang ve diğ., 2005). Germ hücreleri ile yapılan birçok çalışmaya rağmen akrilamidin Leydig hücrelerinde steroidogenik yolak üzerindeki etkilerinin gen düzeyinde *in vitro* olarak gösterildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Akrilamidin hücre canlılığı üzerine etkisi ile ilgili farklı hücre soylarıyla ve dokularla yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Awad ve diğ., 1998; Yang et al., 2005b; Zödl ve diğ., 2007; Kermani-Alghoraishi ve diğ., 2010; Ma ve diğ., 2011; Camacho ve diğ., 2012; Chen ve diğ., 2013; Lee ve diğ., 2014; Wei ve diğ., 2014; Pourtezarı ve diğ., 2014). Awad ve diğerlerinin 1998 yılında sıçan hepatosit hücrelerine 30, 60 ve 120 dakika boyunca 0.1, 1 ve 10 mM akrilamid uyguladıkları çalışmada 1 ve 10 mM

dozlarında hücre canlılığının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Caco-2 hücre soyuna 24 saat süreyle 0.1, 0.5 ve 1 mM konsantrasyonlarında akrilamid uygulanan bir çalışmada 1 mM'dan düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığında bir etki gözlenmezken, 1 mM dozunda hücre canlılığı düşmüştür (Zödl ve diğ., 2007). Fare ovaryumundan izole edilen granüloza hücreleriyle yapılan bir diğer çalışmada ise, hücrelere 48 saat süreyle 0.5 mM ve 5 mM akrilamid uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda iki farklı akrilamid konsantrasyonunun da hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir (Wei ve diğ., 2014). İnsan astrostoma hücrelerine ve sıçan astrosit hücrelerine 0.1, 0.5, 1 ve 2 mM dozlarında akrilamid uygulandığı çalışmalarda da akrilamidin hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2013, Lee ve diğ., 2014).

Akrilamidin erkek üreme sistemi üzerine toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, akrilamidin sperm canlılığını ve hareketliliğini olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. 2010 yılında farelere 5 ve 10 mg/kg akrilamidin içme sularıyla günlük olarak verildiği bir çalışmada 2 ayın sonunda sperm izolasyonu yapılmıştır. Yapılan sperm analizinde deney gruplarında sperm canlılığında ve konsantrasyonunda düşüş olduğu tespit edilmiştir (Kermani-Alghoraishi ve diğ., 2010). Sütten kesilmiş üç haftalık erkek sıçanlarla yapılan bir diğer çalışmada 5, 15 ve 30 mg/kg dozlarında akrilamid bireylere farklı sürelerle uygulanmıştır. Deney sonunda akrilamidin doz ve zamana bağlı olarak sperm canlılık oranını, sperm sayısını ve hareketliliğini anlamlı biçimde düşürdüğü gösterilmiştir (Ma ve diğ., 2011). Yang ve diğerleri 2005 yılında yaptıkları çalışmada sıçanlara beş gün boyunca gavaj yoluyla 5, 15, 30, 45 ve 60 mg/kg dozlarında akrilamid uygulamışlardır. Deney sonunda kauda epididimisteki sperm konsantrasyonunda özellikle 15 mg/kg/gün'den yüksek dozlarda doza bağımlı düşüş olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte akrilamid uygulanmış testislerden izole edilen Leydig hücrelerinde 30, 45 ve 60 mg/kg akrilamid uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı biçimde hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada 2.5, 10 ve 50 mg/kg akrilamid dozlarının sıçanlara içme suyu ile 14 gün boyunca uygulanması sonucunda testisteki Leydig hücrelerinin ortalama hacminde, 50 mg/kg dozunda anlamlı bir düşüş olduğu gösterilmiştir (Camocho ve diğ., 2012).

Yapılan bu çalışmada, daha önce akrilamidin hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelendiği *in vitro* çalışmalardaki dozlar baz alınarak oluşturulan doz aralığı TM3 hücre soyuna uygulanmıştır. TM3 Leydig hücrelerine akrilamidin 0.01 ile 10 mM konsantrasyonları arasında LH uyarımı yapılmış farklı dozlarının (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 10 mM) 24 saat süreyle uygulanması sonucunda tüm dozlarda hücrelerin canlılığında azalma görülmesi Yang ve diğerlerinin (2005) ve Camocho ve diğerlerinin (2012) yaptıkları çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Erkek üreme sisteminde androjenik hormon biyosentezi öncelikle Leydig hücrelerinde görülür ve Leydig hücreleri testosteron üretiminin ana kaynağıdır (Zhang ve diğ., 2008). Akrilamidin, üretilen testosteron miktarı üzerindeki etkisi daha önce yapılan çalışmalarda incelenmiş ve akrilamid konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği bulunmuştur (Yang ve diğ., 2005b; Wang ve diğ., 2009; Hamdy ve diğ., 2011; Ma ve diğ., 2011; Mazen ve Elnegris, 2012; Yassa ve diğ., 2012; Pourentezari ve diğ., 2014; Khalil ve diğ., 2014). Albino sıçanlara 8 hafta süreyle günlük olarak 15 mg/kg akrilamid uygulanan bir çalışmada deney süresinin sonunda hayvanlardan kan örnekleri alınmıştır. Serum testosteron seviyeleri ölçüldüğünde kontrol grubuna göre düşüş olduğu gösterilmiştir (Mazen ve Elnegris, 2012). Yassa ve diğerlerinin 2011 yılında albino sıçanlara akrilamidin LD₅₀ dozunun 1/10'unu (15 mg/kg) ve 1/5'ini (30 mg/kg) uyguladıkları çalışmada serum testosteron seviyeleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşüş görülmüştür. Yapılan bir diğer çalışmada sıçanlara günlük 5, 10, 15 mg/kg akrilamid 8 haftalık deney süresince oral olarak uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda hem plazmada serbest halde bulunan testosteron hem de total testosteron seviyeleri düşmüştür (Hamdy ve diğ., 2011). Khalil ve diğerleri sıçanlarla yaptıkları çalışmada 4 ve 8 hafta süreyle günlük olarak 5, 10, 15 mg/kg akrilamid uyguladıkları deney gruplarında, serbest halde bulunan testosteron ve total testosteron düzeylerinde artan doza ve uygulama süresine göre kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. 2005 yılında sıçanlara 5 gün süreyle 5, 15, 30, 45, 60 mg/kg akrilamid uygulanan çalışmada serum testosteron seviyeleri ölçüldüğünde tüm gruplarda testosteron miktarında düşüş tespit edilmiştir ancak kontrol grubuna göre anlamlılık akrilamidin 30, 45, 60 mg/kg dozlarında görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan sıçanların testislerinden izole edilen Leydig hücrelerinin kültür medyumundan 24 saat inkübasyonun sonunda alınan

örneklerdeki testosteron konsantrasyonu ölçülmüştür ve tüm gruplarda kontrole göre anlamlı bir azalma görülürken dozlar arasında bir anlamlılık bulunmamıştır. En düşük testosteron konsantrasyonu da 15 mg/kg akrilamid uygulanan grupta tespit edilmiştir. (Yang ve diğ., 2005b).

Testosteron seviyelerinin artan akrilamid konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak azalma gösterdiği çalışmalara karşın yapılan bazı çalışmalarda akrilamidin testosteron seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2010; Ma ve diğ., 2011). Wang ve diğerleri (2010) yaptıkları çalışmada sıçanlara 8 hafta boyunca 5, 10 mg/kg/gün dozlarında akrilamid uygulamış ve 10 mg/kg akrilamid alan grupta serum testosteron konsantrasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak artma olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise, ergin sıçanlara 5, 15, 30 mg/kg akrilamid oral olarak 4 hafta boyunca uygulanmış ve 5, 10 mg/kg akrilamid uygulanan gruplarda serum testosteron seviyelerinde artış görülmüştür, 30 mg/kg akrilamid uygulanan grupta ise serum testosteron seviyesinde azalma tespit edilmiştir (Ma ve diğ., 2011).

Yapılan bu çalışmada TM3 Leydig hücrelerine LH uyarımlı olarak 0.1 ve 2 mM akrilamid dozlarının uygulandığı deney gruplarında serbest testosteron miktarlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmesi Hamdy ve diğ. (2011) ile Khalil ve diğ. (2014)'nin yaptıkları çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Yang ve diğerlerinin (2005b) hücre kültür medyumunda yaptıkları çalışmada en düşük testosteron miktarının uygulanan düşük dozlarda tespit edilmesi ve deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmaması yapmış olduğumuz çalışmayı desteklemektedir.

Erkek üreme sisteminde androjenik hormon biyosentezinin başlıca gerçekleştiği Leydig hücrelerinde kolesterolün testosteroon dönüşümü StAR proteini ve steroidogenik enzimlerin fonksiyonuna bağlıdır. Kolesterol dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana taşınca Cyp11a1 enzimi aracılığıyla kolesterolden pregnenolon üretilir. Bunu takiben Cyp17a1, HSD3B ve HSD17B enzimlerinin düzenlediği süreçte önce progesteron arkasından da testosteron üretimi gerçekleşir (Hales, 2002). Testosteron biyosentezinde görevli genlerin ifade düzeylerini çevresel toksinlerin ve endokrin bozucu kimyasalların nasıl etkilediğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Feng ve diğ., 2012; Chen ve diğ., 2013; Adedara ve diğ., 2014; Liu ve

diğ., 2014). Ayrıca akrilamidin steroidogenik yolakla ilgili genlerin ifade düzeylerini nasıl etkilediğini gösteren sınırlı sayıda *in vivo* çalışma (Camacho ve diğ., 2012) bulunurken *in vitro* çalışma yoktur.

Ergin sıçanlarla yapılan bir çalışmada deney gruplarına 14 gün boyunca bisfenol AF maddesi 2, 10, 50 ve 200 mg/kg dozlarında gavaj yoluyla uygulanmıştır. Bisfenol AF'nin kolesterol taşınmasında ve steroidogenezde rol alan genler üzerine etkisine bakıldığında 200 mg/kg uygulama yapılan grupta StAR, Cyp11a1 ve HSD17B genlerinin ifade düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmektedir. Ancak; bisfenol AF uygulanan gruplarla kontrol grupları karşılaştırıldığında HSD3B ve Cyp17a genlerinin anlatımında anlamlı bir değişiklik görülmemektedir (Feng ve diğ.; 2012).

Chen ve diğerleri (2013) dibütil ve monobütil fitalatların Leydig tümör hücrelerinde (MLTC-1 hücre soyu) steroidogenik yolaktaki etkilerini incelemek için yaptıkları çalışmada hücrelere 24 saat boyunca 0.01, 1, 100 µmol/l dozlarında dibütil fitalat ve 0.1, 10, 1000 µmol/l dozlarında monobütil fitalat uygulamışlardır. Her iki maddede de artan uygulama dozlarına bağlı olarak P450scc, HSD3B ve P450c17 genlerinin mRNA seviyelerinde kontrol grubuna göre azalma tespit etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada da fare Leydig tümör hücrelerine hCG uyarımı yapılarak 0, 10(-9), 10(-8), 10(-7) ve 10(-6) M monobütil fitalat 24 saat süreyle uygulanmıştır. StAR mRNA seviyesi ve protein miktarında 10(-9) ve 10(-8)M konsantrasyonlarında bir değişiklik gözlenmezken, 10(-7) ve 10(-6) M monobütil fitalat hem mRNA seviyesinde hem de protein miktarında artışa sebep olmuştur. 3β-HSD ve p450scc protein miktarlarında ise 24 saatin sonunda bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı çalışmada SF-1 ve GATA-4 transkripsiyon faktörlerinin de DNA'ya bağlanma oranlarına ve protein miktarlarına bakılmış ve düşük doz gruplarında (10(-6)M) bu transkripsiyon faktörleri ile StAR promotör bölgelerinin DNA'ya bağlanma oranlarında artış gözlenmiştir (Hu ve diğ., 2013).

Farelerden izole edilen Leydig hücreleriyle yapılan bir çalışmada 1, 5, 10, 20 µg/ml zearalenon 1, 6, 12 ve 24 saat boyunca hücrelere uygulanmıştır ve tüm gruplar 0.2 nmol cAMP ile inkübe edilmiştir. Cyp11a1, Cyp17a1 ve HSD17B genlerinin mRNA seviyelerinde artan zearalenon konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak anlamlı bir

azalma görülmüştür. StAR geninin ekspresyonunda ise uygulama dozu ve süresinden bağımsız olarak artış tespit edilmiştir. HSD3B geninin mRNA seviyesinde de artan doza ve zamana bağlı olarak yükselme gözlenmiştir (Liu ve diğ., 2014).

Khan ve diğ. (2013) sıçanlarla yaptıkları çalışmada deney grubundaki hayvanlara 28 gün süreyle 40 ppm arsenik uygulamışlardır. Deney grubundaki sıçanlardan izole edilen Leydig hücrelerinde StAR ve Cyp11a1 genlerinin ekspresyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiği tespit edilmiştir.

60 gün boyunca 4 ve 8 mg/kg akrilamid uygulanmış sıçanlardan elde edilen testis dokularıyla yapılan bir çalışmada StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 VE HSD3B genlerinin ifade düzeylerine bakılmıştır. Deney sonucunda, 8 mg/kg dozunda StAR ve Cyp11a1 genlerinin ifade düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Cyp17a1 ve HSD3B genlerinin mRNA seviyelerinde ise bir etki görülmemiştir (Camacho ve diğ.,2012).

Bu tez çalışmasında 0.1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarında akrilamide 24 saat süreyle maruz bıraktığımız TM3 Leydig hücrelerinde deney sonunda StAR geni ifade düzeyinde her iki grupta da kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmesi Camacho ve diğ. (2012) yılında yaptıkları çalışma ile de paralellik göstermektedir. StAR geninin ekspresyonundaki bu artış GATA-4 ve Nur77 transkripsiyon faktörlerinin gen anlatımındaki artan akrilamid dozuna bağlı artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir. Steroidogenik yolda mitokondriye taşınan kolesterolden pregnenolon oluşturulmasında görevli Cyp11a1 geninin ifade düzeyinde 0.1 mM AA grubundaki artış da Camacho ve diğ. (2012) yaptığı çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Pregnenolonun progesterona çevrilmesinde görevli HSD3B geni, oluşan progesteronu androstenedione dönüştüren Cyp17a1 ve steroidogenik yolda son basamakta androstenediondan testosteron oluşmasını sağlayan HSD17B genlerinin ifade düzeylerinde 24 saatin sonunda 0.1 mM akrilamid uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı bir düşüş görülmektedir. Akrilamidin sadece düşük dozunda görülen HSD3B, HSD17B ve Cyp17a1 genlerinin ifade düzeyindeki azalış, Yang ve diğ. (2005b) akrilamidin düşük dozunda gördükleri testosteron seviyesindeki düşüşün, bu genlerin ifade düzeyindeki değişiklikler sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışması akrilamidin TM3 Leydig hücre canlılığını azalttığını ve serbest testosteron miktarını olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Akrilamid maddesinin steroidogenik yolak üzerindeki etkilerine bakıldığında StAR proteinin gen ifadesini arttırdığını; ancak mitokondri dışında işlev gören steroidogenik enzimlerin gen ifade düzeylerinde 0.1 mM dozunda kontrol grubuna göre anlamlı düşüslere neden olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar akrilamidin Cyp11a1, HSD3B ve HSD17B genlerinin ifade seviyesini düşürerek testosteron biyosentezini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Yüksek doz akrilamide maruz kalan gruplarda HSD3B ve HSD17B genlerinin mRNA düzeylerindeki artışın ise özellikle GATA-4 transkripsiyon faktörünün 2 mM AA grubundaki artıştan kaynaklandığı düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak akrilamidin steroidogenik gen anlatımında değişikliklere neden olarak testosteron biyosentezini olumsuz yönde etkilediği düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Abramsson-Zetterberg L., Wong L., Ilback N.G., 2005, Acrylamide tissue distribution and genotoxic effects in a common viral infection in mice, *Toxicology* 1;211(1-2):70-6.
- Achermann J.C., Meeks J.J., Jameson J.L., 2001, Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 20;185(1-2):17-25.
- Adedara I.A., Nanjappa M.K., Farombi E.O., Akingbemi B.T., 2014, Aflatoxin B1 disrupts the androgen biosynthetic pathway in rat Leydig cells, *Food and chemical toxicology*, 65:252-9.
- Awad E.M., Abdel-Rahman E.S., Hassan S.A., 1998, Acrylamide toxicity in isolated rat hepatocytes, *Toxicology in vitro*, 12:699-704.
- Bielinska M., Seehra A., Toppari J., Heikinheimo M., Wilson D.B., 2007, GATA-4 is required for sex steroidogenic cell development in the fetal mouse. *Developmental Dynamics*, 236:203-213.
- Budavari S, O'Neil M.J., Smith A., Heckelman P.E., 1989, The Merck Index, Merck & Co Rahway, New Jersey, 127.
- Bustin S.A., 2000, Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of molecular endocrinology*, 25:169-193.
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W., 2005, Quantitative real-time RT-PCR – a perspective, *Journal of Molecular Endocrinology*, 34:597-601.
- 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*, 1; 211(2):135-43.
- Carere A., 2006, Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review, *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 42(2):144-155.
- Chen X., Zhou Q.H., Leng L., Chen X., Sun Z.R., Tang N.J., 2013, Effects of di(n-butyl) and monobutyl phthalate on steroidogenesis pathways in the murine Leydig tumor cell line MLTC-1, *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(2):332-8.
- Christensen A.K., 2007, *History of Leydig cell Research*, Contemporary Endocrinology: The Leydig Cell in Health and Disease In: Payne A. H., Hardy M. P. (ed.), Part 1 Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 3-33.

- Claus A., Carle R., Schieber A., 2008, Acrylamide in cereal products: A review, *Journal of Cereal Science*, 47: 118-113.
- Doerge D.R., Young J.F., McDaniel P., Twaddle N.C., Churchwell M.I., 2005 Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208:199-209.
- Ehlers A., Lenze D., Broll H., Zagon J., Hummel M., Lampen A., 2013, Dose dependent molecular effects of acrylamide and glycidamide in human cancer cell lines and human primary hepatocytes, *Toxicology Letters*, 217(2):111-20.
- Exon J.H., 2006 A review of the toxicology of acrylamide. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B Critical Reviews*, 9(5):397-412.
- Feng Y., Yin J., Jiao Z., Shi J., Li M., Shao B., 2012, Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats, *Toxicology letters*, 211(2):201-9.
- Fennell T.R., Sumner S.C.J., Snyder R.W., Burgess J., Spicer R., Bridson W.E., Friedman M., 2005 Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in human. *Toxicological Sciences*, 85:447-59.
- Friedman M., 2003, Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide: A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16):4504-4526.
- Gnessi L., Fabbri A., Spera G., 1997, Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis: an integrated system with hormones and local environment, *Endocrine Reviews*, 18(4): 541-609
- Hales D.B., 2002, Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis *Journal of Reproductive Immunology*, 57: 3-18.
- Hardy P.M., Chen G., Ge R., 2008, *The Role of Leydig cell in spermatogenic function*, Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, In: Cheng C.Y. (ed.), Chapter 14, Landes Bioscience and Springer Science Business Media, 255-269.
- Horstman K.A., Naciff J.M., Overmann G.J., Foertsch L.M., Richardson B.D., Daston G.P., 2012, Effects of Transplacental 17-Ethinyl Estradiol or Bisphenol A on the Development Profile of Steroidogenic Acute Regulatory Protein in the Rat Testis. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 95(4):318-25.
- Hu Y., Dong C., Chen M., Lu J., Han X., Qiu L., Chen Y., Qin J., Li X., Gu A., Xia Y., Sun H., Li Z., Wang Y., 2013, Low-dose monobutyl phthalate stimulates steroidogenesis through steroidogenic acute regulatory protein regulated by SF-1, GATA-4 and C/EBP-beta in mouse Leydig tumor cells. *Reproductive biology and endocrinology*, 11:72.
- IARC, 1994, Acrylamide In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, *International Agency for Research on Cancer*, 60:389-433.

- Karagöz A., 2009, Acrylamide and its presence in foods, *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 8(2): 187-192.
- Khalil W.K.B., Ahmedb H.H., Aly H.F., Eshaka M.G., 2014, Toxicological Effects of Acrylamide on Testicular Function and Immune Genes Expression Profile in Rats, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 24(1):143-151.
- Koyama N., Sakamoto H., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Hayashi M., Matsufuji H., Yamagata K., Masuda S., Kinae N., Honma M., 2006, Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutation research*, 603(2):151-8.
- Lala D.S., Rice D.A., Parker K.L., 1992, Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the Mouse homolog of fushi tarazu-factor 1. *Molecular Endocrinology*, 6:1249-1258.
- Latchman D.S., 2008, *Families of DNA Binding Transcription Factors*, Eukaryotic transcription factors In: Latchman D.S. (ed.), Chapter 4, Academic Press Elsevier, New York, 96-154.
- LaVoie H.A., 2003, The role of GATA in mammalian reproduction, *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 228(11):1282-90.
- Liu Q., Wang Y., Gu J., Yuan Y., Liu X., Zheng W., Huang Q., Liu Z., Bian J., 2014, Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression, *Toxicology in vitro*, 28(4):647-56.
- Liu Q., Wang Y., Gu J., Yuan Y., Liu X., Zheng W., Huang Q., Liu Z., Bian J., 2014, Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression, *Toxicology in vitro*, 28(4):647-56.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method, *Methods*, 25, 402-408.
- LoPachin, R.M., 2002, The role of fast axonal transport in acrylamide pathophysiology: Mechanism or epiphenomenon? *Neurotoxicology* 23: 253-257.
- Luo X., Ikeda Y., Parker K.L., 1994, A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation, *Cell*, 77:481-490.
- Lysiak J.J., Kirby J.L., Tremblay J.J., Woodson R.I., Reardon M.A., Palmer L.A., Turner T.T., 2009, Hypoxia-Inducible Factor-1 α Is Constitutively Expressed in Murine Leydig Cells and Regulates 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Promoter Activity, *Journal of andrology*, 30(2):146-56.

- Ma Y., Shi J., Zheng M., Liu J., Tian S., He X., Zhang D., Li G, Zhu J., 2011, Toxicological effects of acrylamide on the reproductive system of weaning male rats, *Toxicology and Industrial Health*, 27(7):617-27.
- Manna P.R., Wang X.J., Stocco D.M., 2003, Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression *Steroids*, 68(14):1125-34.
- Matzkin M.E., Yamashita S., Ascoli M., 2013, The ERK1/2 pathway regulates testosterone synthesis by coordinately regulating the expression of steroidogenic genes in Leydig cells, *Molecular and cellular endocrinology*, 6;370(1-2):130-7.
- Mazen N.F., Elnegris H.B., 2012, Role of coenzyme Q10 in testicular damage induced by acrylamide in weaned albino rats: a histological and immunohistochemical study, *Egyptian Journal of Histology*, 36(1):164-174.
- Mei N., Hu J., Churchwell M.I., Guo L., Moore M.M., Doerge D.R., Chen T., 2008, Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells, *Food and Chemical Toxicology*, 46(2):628-36.
- Mossman T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55–63.
- Mottram D.S., Wedzicha B.L., Dodson A.T., 2002, Food chemistry: acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419:448-449.
- Parzefall W., 2008, Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*, 46:1360-1364.
- Payne A.H., Youngblood G.L., 1995, Regulation of Expression of Steroidogenic Enzymes in Leydig Cells, *Biology of Reproduction*, 52:217-225.
- Pedreschi F, Mariotti M.S., Granby K., 2014, Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15;94(1):9-20.
- Pingarilho M., Oliveira N.G., Martins C., Gomes B.C., Fernandes A.S., Martins V., Labilloy A., de Lima J.P., Rueff J., Gaspar J.F., 2013, Induction of sister chromatid exchange by acrylamide and glycidamide in human lymphocytes: Role of polymorphisms in detoxification and DNA-repair genes in the genotoxicity of glycidamide, *Mutation research*, 752(1-2):1-7.
- Pourentezari M., Talebi A., Abbasi A., Khalili M.A., Mangoli E., Anvari M., 2014, Effects of acrylamide on sperm parameters, chromatin quality, and the level of blood testosterone in mice, *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 12(5):335-342.
- Renshan Ge M.D., Hardy M.P., 2007, *Regulation of Leydig Cell During Pubertal Development*, Contemporary Endocrinology: The Leydig Cell in Health and

- Disease In: Payne A. H., Hardy M. P. (ed.), Part 3, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 55-71.
- Sakamoto J, Kurosaka Y, Hashimoto K., 1988, Histological changes of acrylamide-induced testicular lesions in mice, *Experimental and Molecular Pathology*, 48(3):324-34.
- 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):201-5.
- Schettgen T., Weiss T., Drexler H., Angerer J., 2003, A first approach to estimate the inter-nal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *International Journal Hygiene Environmental Health*, 206:9–14.
- Sickles, D.W., Stone, J.D., Friedman, M.A., 2002, Fast axonal transport: A site of acrylamide neurotoxicity? *Neurotoxicology* 23, 223-251.
- Smith E.A., Pruen, S.L., Oehme, F.W., 1996, Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light and pH, *Ecotoxicology and Environmentak Safety*, 35:121-135.
- Song C.H., Gong E.Y., Park Js, Lee K., 2012, Testicular steroidogenesis is locally regulated by androgen via suppression of Nur77, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1;422(2):327-32.
- Sörgel F., Weissenbacher R., Kinzing-Schippers M., Hofmann A., Illauer M., Skott A., Landersdorfer C., Acrylamide: Increased Concentrations in hommemade food and first evidince of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans, *Chemotherapy*, 48: 267-274.
- Sriraman V., Sairami M.R., Rao A.J., 2003, Evaluation of relative roles of LH and FSH in regulation of differentiation of Leydig cells using an ethane 1,2-dimethylsulfonate-treated adult rat model, *Journal of Endocrinology*, 176: 151-161.
- Stadler R., Blank I., Varga N., Robert F., Hau J.,Guy P. A., 2002, Acrylamide from Maillard reaction products, *Nature*, 419:449-450.
- Stadler R.H., Scholz G., 2004, Acrylamide: an update on current knowledge in analysis levels in food, mechanism of formation, and potential strategies of control. *Nutrition Reviews*, 62:449-67.
- Stocco D.M., 2000, Intramitochondrial cholesterol transfer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1486(1):184-97.
- Tareke E1, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M., 2002, Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs, *Journal of Agriculturel and Food Chemistry*, 14;50(17):4998-5006.

- Trainer T.D., 1995, *Testes and Excretory Duct System*, Histology for Pathologists, In: Mills S.E. (ed.), Chapter 37, Raven Press, Philadelphia.
- Tremblay J.J., 2007, *Transcription Factors as Regulators of Gene Expression During Leydig Cell Differentiation and Function*, Contemporary Endocrinology: The Leydig Cell in Health and Disease In: Payne A.H., Hardy M.P. (ed.), Part 4, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 333-345.
- Tremblay J.J., Viger R.S., 2003, Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85(2-5):291-8.
- Tyl R.W., Friedman M.A., 2003, Effects of acrylamide on rodent reproductive performance, *Reproductive Toxicology*, 17(1):1-13.
- Tyl R.W., Friedman M.A., 2003, Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reproductive Toxicology*, 17:1-13.
- United States Environmental Protection Agency, 2007, Toxicological Review Of Acrylamide, *Environmental Protection Agency*, 79-06-1.
- Viger R.S., Guittot S.M., Anttonen M., Wilson D.B., Heikinheimo M., Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease, *Molecular Endocrinology*, 22(4):781-98.
- Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, Shi F., 2009, Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats, *Reproductive Toxicology*, 29(2):225-30.
- Wei Q., Li J., Li X., Zhang L., Shi F., 2014, Reproductive Toxicity in acrylamide treated female mice, *Reproductive Toxicology*, 46:121-128.
- William H.W., Jing C., 2005, FSH and Testosterone Signaling in Sertoli Cells, *Reproduction*, 130:15-28
- Wilson M.D., 2001, Prospects for research for disorders of the endocrine system, *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 7;285(5):624-7.
- Wong M.L., Medrano J.F., 2005, Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*, 39(1): 75.
- Yang H.J., Lee S.H., Jin Y., Choi J.H., Han C.H., Lee M.H., 2005a, Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *Journal of Veterinary Science*, 6:103-9.
- Yang H.J., Lee S.H., Jin Y., Choi J.H., Han D.U., Chae C., Lee M.H., Han C.H., 2005b, Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile, *Reproductive Toxicology*, 19(4):527-34.

- Yassa H.A., George S.M., Refaiy Ael. R., Moneim E.M., 2012, Camellia sinensis (green tea) extract attenuate acrylamide induced testicular damage in albino rats, *Environmental toxicology*, 29(10):1155-61.
- Ye L., Su Z.J., Ge R.S., 2011, Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes, *Molecules*, 16(12), 9983-10001.
- Zhang Y., Ge R., Hardy M.P., 2008, Androgen-forming stem Leydig cells: identification, function and therapeutic potential, *Disease markers*, 24(4-5):277-286.
- Zirkin B.R., Chen H., 2000, Regulation of Leydig Cell Steroidogenic Function During Aging1, *Biology of Reproduction*, 63:977-981.
- Zödl B., Schmid D., Wassler G., Gundacker C., Leibetseder V., Thalhammer T., Ekmekcioglu C., 2007, Intestinal transport and metabolism of acrylamide, *Toxicology*, 232:99-108.
- Zyzak D., Sanders R.A., Stojanovic M., Tallmadge D.H., Ebehart L., Ewald D.K., 2003, Acrylamide formation mechanism in heated foods, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51:4782-4787.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Nebahat Yıldızbayrak
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	24 Ekim 1991, Üsküdar
Telefon	0536 9873412
E-mail	nebahat.yb@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyoloji Anabilim Dalı / Zooloji Programı	2015
Lisans	İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2013
Lise	Özel Çamlıca Bilfen Lisesi	2009

Makaleler / Bildiriler

Orta Yılmaz B., Yıldızbayrak N., Erkan M., “Acrylamide and Glycidamide can effect Leydig and Sertoli cell viability, oxidative damage and apoptosis in vitro” 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prag, CEK CUM., 24-28 Ağustos 2014, pp.136-137.
