



**YETİŞKİN ERKEK SIÇANLARA AKRİLAMİD
UYGULAMASININ KAS VE YAĞ DOKUDA
AROMATAZ GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Sezin DEMİRTAŞ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

Yüksek Lisans Tezi – 2025

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YETİŞKİN ERKEK SIÇANLARA AKRİLAMİD UYGULAMASININ KAS VE
YAĞ DOKUDA AROMATAZ GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Sezin DEMİRTAŞ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Prof. Dr. Cuma MERTOĞLU
Doç. Dr. Ayşe Şebnem ERENLER

Bu Araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje no: TYL-2023-3217) tarafından desteklenmiştir.

MALATYA
2025

KABUL ONAY



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Yetişkin Erkek Sıçanlara Akrilamid Uygulamasının Kas ve Yağ Dokuda Aromataz Gen Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

30/ 01/ 2025

Sezin DEMİRTAŞ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Akrlamidin Kimyası.....	4
2.2. İnsanlarda Akrlamid Maruziyeti.....	6
2.3. Akrlamidin Toksik Etkileri.....	8
2.3.1. Akrlamidin Sinir Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri (Nörotoksisite).....	8
2.3.2. Akrlamidin DNA Üzerindeki Toksik Etkileri (Genotoksisite).....	9
2.3.3. Akrlamidin Üreme Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri (Reprotoksisite).....	10
2.3.4. Akrlamid Kaynaklı Oksidatif Stres ve Oksidatif Doku Hasarı.....	10
2.3.5. Akrlamidin Diğer Toksik Etkileri.....	11
2.4. Erkeklerde Steroid Hormon Sentezi.....	12
2.4.1. Erkeklerde Aromatazın Doku Dağılımı.....	14
2.4.2. Erkeklerde Aromatazın Steroid Hormon Sentezindeki Rolü.....	14
2.4.3. Aromatazın Erkeklerde Testosteron-Östrojen Dengesindeki Rolü.....	15
2.4.4. Erkeklerde Sebebi Bilinemeyen Kısırlıkta Aromatazın Rolü.....	16
2.4.5. Erkeklerde Aromataz Kaynaklı Kısırlıkta Aromataz İnhibitörlerinin Etkisi.....	16
2.4.6. Akrlamidin Steroid Hormon Sentezi Üzerindeki Etkileri.....	17
2.4.7. Akrlamidin Aromataz Gen İfadesi Üzerindeki Etkileri.....	18
2.5. E Vitamini.....	18
2.5.1. E Vitamininin Kimyası.....	19
2.5.2. Akrlamid Kaynaklı Toksisitede E Vitamininin Koruyucu Etkileri.....	20
3. MATERYAL VE METOT.....	24
3.1. Materyaller.....	24
3.1.1. Alet ve Gereçler.....	24
3.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Malzemeler.....	24

3.1.3. Ratların Temini	24
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Çalışma Grubu ve Örnek Seçimi	25
3.2.2. Hayvan Bakımı, Beslenmesi ve Tartılması	26
3.2.3. Hayvanların Yem ve Su Tüketiminin Takibi	26
3.2.4. Akrilamid ile E Vitamini Uygulama Yöntemi, Dozu ve Süresi	26
3.2.5. Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	27
3.2.6. Kas ve Yağ Aromataz Proteinini Düzeylerinin Western-Blot ile Analizi.....	27
3.2.7. Serum Testosteron, Östradiol, FSH, LH Düzeylerinin Analizi	28
3.2.8. İstatistiksel Analizler	33
4. BULGULAR	34
4.1. Grupların Hayvan Ağırlıkları	34
4.2. Grupların Su ve Yem Tüketimleri	35
4.3. Grupların Kas ve Yağ Aromataz Proteinin Western-Blot Sonuçları.....	39
4.4. Grupların Serum Testosteron, Östradiol, FSH ve LH Sonuçları	42
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR.....	61
EKLER	71
EK-1. Özgeçmiş	71
EK-2. Etik Kurul Onayı	72

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin her aşamasında bana değerli görüşleriyle yol gösteren, destekleyen ve akademik çalışma disiplini kazandıran danışman hocam sayın Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreçte bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan destek ve teşviklerini esirgemeyen başta Uzm. Dr. Harun ŐENTÜRK, Doktora Öğrencisi Nurcan GÖKTÜRK, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Asiye CULUM ve değerli çalışma arkadaşlarım Bilal ARI ile Talha BİNGÖL olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarıma ve hocalarıma minnettarım.

Son olarak, her zaman yanımda olan bana sonsuz destek ve moral veren aileme sonsuz teşekkürler. Onların sevgi ve desteği olmadan bu noktaya ulaşmam mümkün olmazdı.

Sezin DEMİRTAŞ

2025

ÖZET

Yetişkin Erkek Sıçanlara Akrilamid Uygulamasının Kas ve Yağ Dokuda Aromataz Gen Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi

Amaç: AKR normalde gıdalarda olmayan ancak yüksek sıcaklıkta pişirilme sonucu oluşan ve günlük hayatta sıkça maruz kaldığımız toksik etkileri olan bir kimyasaldır. CYP19A1 geni tarafından kodlanan Aromataz, androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalize eder. Amacımız, AKR maruziyetinin yetişkin erkek sıçanların kas ve yağ dokularındaki aromataz gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini incelemektir. Ayrıca, bu araştırma, E vitamininin AKR'nin erkek üreme üzerinde neden olduğu toksik etkilere karşı potansiyel koruyucu etkilerini araştırmayı hedeflemiştir.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada, 48 adet 200 ± 20 gr ağırlığında 8 haftalık erişkin erkek Sprague Dawley rat kullanılmıştır. Ratlar 5 gruba ayrılmıştır: Grup 1: Kontrol grubu (8 rat), Grup 2: Mısır yağı grubu (8 rat), Grup 3: E vitamini grubu (8 rat), Grup 4: AKR grubu (12 rat) ve Grup 5: AKR + E vitamini grubu (12 rat). Bu çalışmada tedavi grubu ratlara 56 gün boyunca, içme suyu ile AKR uygulanmış, E vitamini ve mısır yağı ise oral gavaj ile verilmiştir. Tüm grup ratlarının ad-libitum beslenerek yem ve suya sınırsız erişimi sağlanmıştır. 56 günün sonunda ratlardan kan, kas ve yağ doku örnekleri toplanıp uygun şartlarda muhafaza edilmiştir. Doku örneklerinden aromataz gen ekspresyonu, Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Serum numunelerinde ise testosteron, östradiol, FSH ve LH düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Ayrıca çalışma süresince canlı hayvan ağırlıkları ile sıçanların yem ve su tüketimleri haftalık olarak kaydedilmiştir.

Bulgular: Analiz sonuçlarına göre, AKR'nin kas ve yağ aromataz ekspresyonunda belirgin artışlara sebep olduğu ve testosteronu düşürerek, FSH salınımını anlamlı derecede artırdığı ortaya konulmuştur. AKR ile E vitamininin birlikte uygulamasında E vitamini, AKR kaynaklı aromataz artışı ve testosteron düşüşü üzerinde sınırlı düzeyde bir iyileşme sağlayabilmiştir.

Sonuç: Tüm bu sonuçlar, AKR uygulamasının kas ve yağ dokuda aromataz aktivitesini artırarak testosteronun östradiole dönüşümünü hızlandırarak erkek üreme sisteminde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olabileceğini ve bunun sonucunda da erkek ratlarda AKR kaynaklı kısırılığın meydana gelebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, Aromataz, Erkek Sıçan, E Vitamini

ABSTRACT

Investigation of the effect of acrylamide administration on aromatase gene expression in muscle and adipose tissues of adult male rats

Aim: ACR is a chemical with toxic effects that is not naturally found in foods but is frequently encountered in daily life as a result of high-temperature cooking. Aromatase, encoded by the CYP19A1 gene, catalyzes the conversion of androgens into estrogens. Our objective is to investigate the effects of ACR exposure on aromatase gene expression in the muscle and adipose tissues of adult male rats. Additionally, this research aims to explore the potential protective effects of vitamin E against the male reproductive health-damaging impacts caused by ACR.

Material and Method: In this study, 48 adult male Sprague Dawley rats, 8 weeks old and weighing 200 ± 20 g, were used. The rats were divided into 5 groups: Group 1: Control group (8 rats), Group 2: Corn oil group (8 rats), Group 3: Vitamin E group (8 rats), Group 4: ACR group (12 rats), and Group 5: ACR + Vitamin E group (12 rats). In the treatment groups, ACR was administered through drinking water, while vitamin E and corn oil were given via oral gavage for 56 days. The control group was fed ad libitum, with unlimited access to food and water. At the end of the 56 days, blood, muscle, and adipose tissue samples were collected and preserved under appropriate conditions. Aromatase gene expression in tissue samples was analyzed using the Western Blot method. Serum samples were analyzed for testosterone, östradiol, FSH, and LH levels using the ELISA method. Additionally, during the study period, live animal weights and the rats' food and water consumption were recorded weekly.

Results: The analysis results revealed that acrylamide caused significant increases in muscle and adipose aromatase expression and significantly increased FSH secretion while reducing testosterone levels. Treatment with vitamin E partially restored these parameters toward control levels.

Conclusion: All these findings demonstrate the detrimental effects of ACR exposure on the male reproductive system at the molecular level and suggest that ACR may contribute to infertility.

Keywords: Acrylamide, Aromatase, Male Rat, Vitamin E

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-ASA	: 5-Aminosalisilik Asit
AB	: Avrupa Birliği
AI	: Aromataz inhibitörleri
AKR	: Akrilamid
ANOVA	: Analysis of Variance (Varyans Analizi)
BCA	: Bicinchoninic Acid
CAT	: Katalaz
CYP11A1	: Sitokrom p450 11A1 Enzimi
CYP17A1	: Sitokrom p450 17A1 Enzimi
CYP19A1	: Sitokrom P450 19A1 Geni (Aromataz)
CYP2E1	: Sitokrom p450 2E1 Enzimi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECL	: Elektrokemilüminesans
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılayan Hormon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HGP	: Hipotalamik-Hipofiz-Gonadal
HRP	: Horseradish Peroxidase
HSD17B3	: 17β-hidroksisteroid Dehidrojenaz
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
İNÜTF-DEHÜM	: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi
LDLR	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü
LH	: Luteinize Edici Hormon
MAG	: Myelin-Associated Glycoprotein
MBP	: Myelin Basic Protein
MDA	: Malondialdehit

MOG	: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
mRNA	: Mesajcı RNA
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Hidrojenli Formu
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa B
NO	: Nitrik Oksit
O²⁻	: Süperoksit Anyonu
OD	: Optik Dansite
OH	: Hidroksil Radikali
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PVDF	: Polyvinylidene Fluoride
RIPA	: Radioimmunoprecipitation Buffer
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SR-BI	: Scavenger Receptor Class B Type I
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-Alfa
TOS	: Total Oksidan Seviyesi
TRIS HCl	: Tris (Hidroksimetil)Amino Metan Hidroklorür
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Akrilamidin kimyasal yapısı	4
Şekil 2.2. Akrilamid oluşumunda maillard reaksiyonu.....	4
Şekil 2.3. Maillard reaksiyonu ve akrilamid oluşum basamakları.....	5
Şekil 2.4. Leydig hücrelerinde kolesterolden androjenlerin sentezi.	13
Şekil 2.5. Tokoferollerin, tokotrienollerin ve α -tokoferolün (E vitamini) kimyasal yapıları ve in vitro rölatif antioksidan aktivite düzeyleri	20
Şekil 3.1. Testosteron Elisa Standart Eğrisi.....	29
Şekil 3.2 Östradiol Elisa Standart Eğrisi	30
Şekil 3.3 FSH Elisa Standart Eğrisi	32
Şekil 3.4 LH Elisa Standart Eğrisi	33
Şekil 4.1. Sıçanların ortalama vücut ağırlığı.....	35
Şekil 4.2. Sıçan başına ortalama günlük yem tüketimi (gr/ sıçan/ gün).....	37
Şekil 4.3. Sıçan başına ortalama günlük su tüketimi (ml/ sıçan/ gün)	39
Şekil 4.4. Grupların kas aromatazına ait aromataz/beta aktin oranları ve protein bantları (p=0.01545)	41
Şekil 4.5. Grupların yağ aromatazına ait aromataz/beta aktin oranları ve protein bantları (p=0.00396)	42
Şekil 4.6. Grupların FSH, LH, Testosteron, Östradiol sonuçlarının grafiksel gösterimi	46

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. AB Komisyonu'nun 2013/647/EU sayılı tavsiyesine göre gıda maddelerinde AKR için belirlenen indikatif değerler	6
Tablo 4.1. Vücut ağırlıklarının grup bazında hafta karşılaştırmaları	34
Tablo 4.2. Yem tüketiminin grup bazında hafta karşılaştırmaları	36
Tablo 4.3. Su tüketiminin grup bazında hafta karşılaştırmaları	37
Tablo 4.4. Visseral yağ ve Kas Aromataz/beta aktin protein oranları	40
Tablo 4.5. Grupların Testosteron, Östradiol, FSH ve LH sonuçları	44



1. GİRİŞ

Son yıllarda çevresel toksinlerin insan sağlığı üzerindeki etkisine ilişkin endişeler giderek daha fazla öne çıkmıştır. Bu toksinler arasında AKR, çeşitli pişmiş ve işlenmiş gıdalarda yaygın olarak bulunması ve endüstriyel uygulamaları nedeniyle dikkat çekmektedir. AKR'nin hormonal dengeye ve üreme fonksiyonuna etki etme potansiyeline sahip bir endokrin bozucu olduğu tespit edilmiştir. Özellikle endişe verici olan, erkeklerde testosteron ve östrojen düzeyleri arasındaki dengeyi korumak için hayati önem taşıyan bir enzim olan aromataz aktivitesi üzerindeki etkisidir (1).

CYP19A1 geni tarafından kodlanan Aromataz, testosteron gibi androjenlerin başta östradiol olmak üzere östrojenlere dönüşümünü katalize eder. Bu enzimatik süreç üreme fonksiyonunun ve gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, aşırı aromataz aktivitesi, aromatzasyonun hızlanmasına yol açarak seks hormonlarının dengesizliğine neden olabilir. Erkeklerde bu dengesizlik, kısırlık da dahil olmak üzere çeşitli üreme bozukluklarıyla ilişkili bir durum olan testostereona kıyasla östrojen seviyelerinin artmasıyla ortaya çıkabilir (2-5).

Bu araştırmanın amacı, AKR'ye maruz kalmanın yetişkin erkek sıçanların kas ve yağ dokularındaki aromataz gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Bir hayvan modeli kullanarak, AKR'ye maruz kalmaya verilen fizyolojik tepkileri simüle etmeyi ve bunun aromataz aktivitesi üzerindeki etkisini moleküler düzeyde değerlendirmek amaçlanmaktadır. AKR'nin aromataz ekspresyonunu nasıl etkilediğini anlamak, onun bir endokrin bozucu olarak potansiyel rolünü ve erkeklerde üreme fonksiyon bozukluğuna olan etkisini açıklamak için çok önemlidir.

Ayrıca bu çalışma, aromataz ekspresyonunda AKR'nin neden olduğu değişikliklere karşı E vitamininin potansiyel koruyucu etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Güçlü bir antioksidan olan E vitamininin oksidatif stresi azalttığı ve çevresel kirlenmelerin toksik etkilerine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada AKR'nin olumsuz etkilerini önlemede veya tersine çevirmede E vitamini takviyesinin etkinliğini değerlendirerek, endokrin bozucu kimyasallara maruz kalmayla ilişkili üreme fonksiyon bozukluklarını hafifletmeye yönelik yeni koruyucu ve tedavi edici stratejilerin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Genel olarak, bu araştırmanın gerekçesi, çevresel toksinlerin erkek üreme sağlığı üzerindeki etkisini ele alma konusundaki acil ihtiyaçtan kaynaklanmaktadır. Bu araştırmada, AKR'nin aromataz gen ekspresyonunda meydana getireceği muhtemel

değişikliklerin AKR kaynaklı reprotoksik etki mekanizmalarından biri olabileceği düşünülmüş ve AKR uygulamasının erkek sıçanların kas ve yağ dokusu aromataz gen ekspresyonu nasıl etkileyeceği araştırılarak AKRin erkek üreme fonksiyonu üzerindeki toksik etkilerine karşı koruyucu ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Araştırma soruları:

1. AKR'ye maruz kalma, yetişkin erkek sıçanların kas ve yağ dokularındaki aromataz gen ekspresyonunu nasıl etkiler?
2. E vitamini takviyesi AKR'nin aromataz gen ekspresyonu üzerindeki toksik etkilerini ne ölçüde önleyebilir veya tersine çevirebilir?
3. AKR uygulaması sonrası erkek sıçanlarda serum testosteron düzeylerinde meydana gelebilecek ciddi değişikliklerden kaynaklanan reprotoksik etkiye karşı aromataz inhibitörleri bir tedavi seçeneği olabilir mi?

Hipotezler:

1. AKR uygulaması, yetişkin erkek sıçanların hem kas hem de yağ dokularında aromataz gen ekspresyonunu artıracak ve aromataz aktivitesinin artmasına yol açacaktır
2. E Vitamini takviyesi, aromataz gen ekspresyonundaki AKR kaynaklı değişiklikleri, ya yukarı doğru regülasyonu (up regulation) önleyerek ya da etkilerini tersine çevirerek zayıflatacaktır.
3. Yağ dokusundaki yüksek testosteron → östrojen dönüşüm kapasitesi nedeniyle AKR, kas dokusuna kıyasla yağ dokusu aromataz gen ekspresyonu üzerinde daha ciddi değişikliklere neden olabilir.

Bu çalışma birkaç nedenden dolayı büyük önem taşımaktadır:

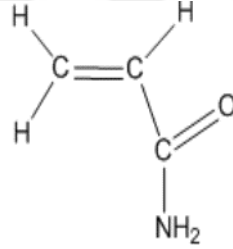
- Beslenme kaynakları ve çevresel kirlenme yoluyla AKR'ye yaygın şekilde maruz kalındığı göz önüne alındığında, bunun erkek üreme sağlığı üzerindeki etkisini anlamak, AKR'ye maruz kalmayı azaltmayı ve üreme sağlığını korumak için önleyici tedbirlerin uygulanmasını amaçlayan düzenleyici politikalara bilgi sağlayabilir.
- Bu çalışma, aromataz ekspresyonunda AKR kaynaklı değişikliklerin altında yatan mekanizmaları açıklayarak, endokrin bozulma ve üreme işlev bozukluğunda yer alan moleküler yolları anlamamıza katkıda bulunabilir.

- AKR toksisitesine karşı potansiyel bir koruyucu önlem olarak E vitamini takviyesinin araştırılması, çevresel kirleticilerin erkek üreme fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletmeye yönelik yeni terapötik stratejiler hakkında değerli bilgiler sağlayabilir.
- Erkek infertilitesinde altta yatan nedenlerin çoğu bilinse de, bunların birçoğunun etkeni ortaya konulamamaktadır. Araştırmamızın sonunda, sıçanlara AKR uygulamasının kas ve yağ dokuda aromataz ekspresyonunu artırdığının tespit edilmesi durumunda:
 1. AKR kaynaklı aromataz ekspresyonunda artışın, AKR'nin reprotoksik etki mekanizmalarından birisi olabileceği,
 2. Erkeklerde kanda testosteron düzeyinin düşmesine bağlı kısırlığın sebeplerinden birisinin de aşırı AKR tüketimi olabileceği ortaya konulmuş olacak ve AKR kaynaklı aromataz artışına bağlı kısırlıkların tedavisinde aromataz inhibitörlerinin tedavi protokolü olarak kullanıma girmesi gündeme gelebilecektir.
- Genel olarak bu araştırma hem bilimsel bilgi hem de halk sağlığı girişimleri üzerinde önemli etkiler yaratma ve sonuçta çevresel zorluklar karşısında erkek üreme sağlığının korunmasına katkıda bulunma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, araştırma sonuçlarının, uluslararası kongrelerde sunulması ve etki değeri yüksek uluslararası bilimsel dergilerde yayımlanması, bu konuyla ilgili literatürdeki eksikliğin giderilmesine katkı sağlayacağını ve bu konuyla ilgili daha ileri düzeyde araştırmaların yapılmasına öncülük edebileceğini umuyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

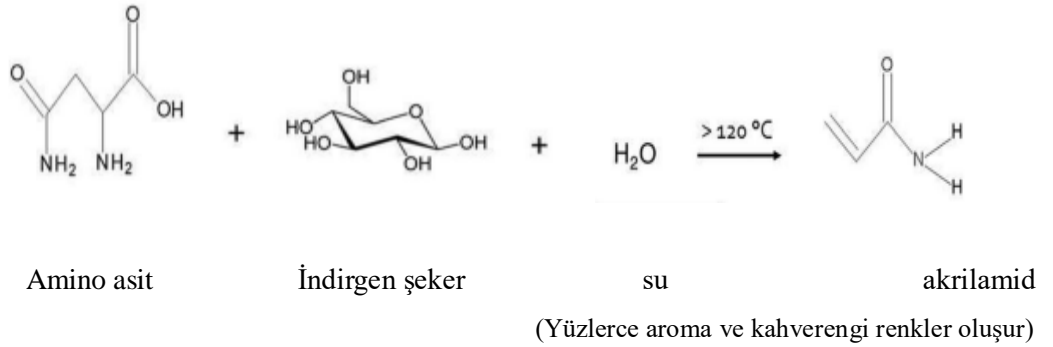
2.1. Akrilamidin Kimyası

AKR (C_3H_5NO), $CH_2=CHCONH_2$ kimyasal formülüne sahip kimyasal bir bileşiktir (Şekil 2.1). Suda oldukça yüksek oranda çözünür, beyaz, kokusuz, kristal bir kimyasaldır. AKR öncelikle endüstriyel uygulamalarıyla, özellikle de atık su arıtma, kozmetik ve kâğıt üretimi dahil olmak üzere çeşitli endüstrilerde uygulamalarda ve bir polimer olan poliakrilamidin üretiminde yaygın olarak kullanılır. Ancak AKR, bazı pişmiş ve işlenmiş gıdalarda bulunması ve insan sağlığını tehdit edici etkileri nedeniyle bilim insanlarının dikkatini çekmektedir.



Şekil 2.1. Akrilamidin kimyasal yapısı

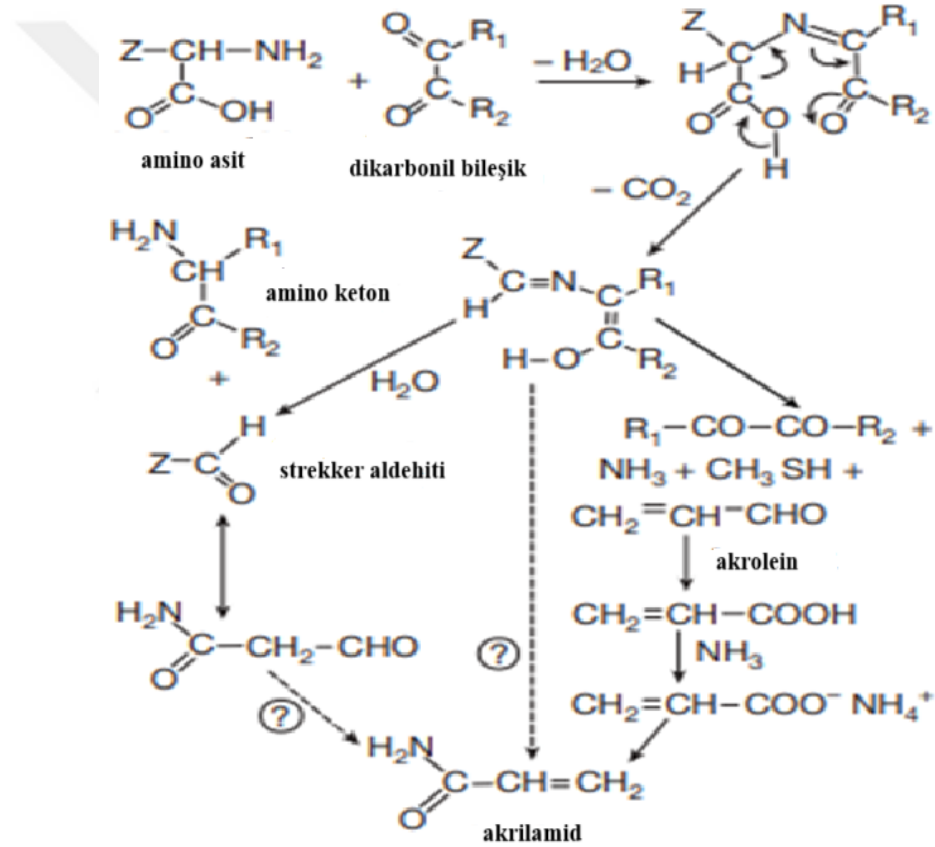
Gıdalarda AKR oluşumu Maillard reaksiyonu olarak bilinen kimyasal bir reaksiyonla gerçekleşir. Bu reaksiyon, kızartma, fırınlama veya kavurma gibi yüksek sıcaklıkta pişirme işlemleri sırasında glukoz ve fruktoz gibi indirgeyici şekerler ile asparajin amino asidi arasında meydana gelir. Maillard reaksiyonu gıdalarda kahverengileşmeye ve lezzet oluşumuna yol açmakta, aynı zamanda AKR dahil olmak üzere çeşitli Maillard reaksiyon ürünlerinin oluşumuyla da sonuçlanmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Akrilamid oluşumunda maillard reaksiyonu.

Nükleofilik amino asit grubu, şekerin reaktif karbonil grubu ile reaksiyona girer ve kahverengi yiyeceklerin karakteristik aromasından sorumlu olan çeşitli moleküllerden oluşan karmaşık bir karışım oluşturur. 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, AKR oluşabilir.

Maillard reaksiyonu sırasında indirgeyici şekerler amino asitlerle, özellikle de asparajin ile reaksiyona girerek bir dizi ara bileşik oluşturur. (Şekil 2.3) Belirli koşullar altında, bu ara ürünler daha ileri reaksiyonlara girer ve sonuçta deaminasyon, dehidrasyon ve siklizasyon reaksiyonlarını içeren bir yolla AKR oluşumuna yol açar. Gıdalarda AKR oluşumunun altında yatan mekanizmalar karmaşıktır ve AKR oluşumu sıcaklık, pH, nem içeriği ve öncüllerin varlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.



Şekil 2.3. Maillard reaksiyonu ve akrilamid oluşum basamakları

AKR'nin bazı pişmiş ve işlenmiş gıdalarda, özellikle de patates ürünleri, ekmek ve kahve gibi karbonhidrat açısından zengin gıdalarda bulunması, potansiyel sağlık riskleri nedeniyle endişelere yol açmıştır. İnsan ve deneysel hayvan çalışmalarında AKR'nin kanserojen etkileri gösterebildiğinin ortaya konulması nedeni ile Uluslararası

Kanser Araştırma Ajansı (IARC) AKR'yi insanlar için olası bir kanserojen olarak sınıflandırmıştır (6-9).

2.2. İnsanlarda Akrilamid Maruziyeti

İnsanlarda AKR'ye maruz kalma, öncelikle diyet alımı, özellikle de pişmiş, kızarmış ve işlenmiş gıdaların tüketimi yoluyla meydana gelir. AKR, karbonhidrat ve amino asit içeren bazı yiyeceklerin 120 °C'nin (248°F) üzerinde kızartma, fırınlama veya kavurma gibi yüksek sıcaklıkta pişirme işlemleri sırasında oluşur. Bu açıdan AKR içeriğinin en yüksek olduğu gıdalar arasında patates ürünleri (ör. patates kızartması, patates cipsi), ekmek, kahvaltılık gevrekler ve kahve yer alır.

Avrupa Birliği (AB) komisyonu çeşitli gıda maddelerindeki AKR içeriği için 2013/647/EU sayılı Komisyon Tavsiyesinde "indikatif değerler" belirlemiştir (Tablo 2.1). Bu indikatif değerlerin belirlenmesinde, yüksek oranda AKR içeren ve insan diyetinde yoğun olarak bulunan gıdalara odaklanılmaktadır. Bu tavsiyeye göre; 'indikatif değerler' güvenlik eşikleri olarak değil, yalnızca bir inceleme ihtiyacını göstermek için öngörülmüştür. AB, bir indikatif değer aşılması durumunda, yalnızca bu değer aşılması nedeniyle değil, durum bazında yapılan sağlam bir risk değerlendirmesine dayanarak uygulama eylemleri ve/veya hızlı uyarı yayınlanması gerektiğini bildirmiştir (10).

Tablo 2.1. AB Komisyonu'nun 2013/647/EU sayılı tavsiyesine göre gıda maddelerinde AKR için belirlenen indikatif değerler

Gıdalar	İndikatif Değer (µg/kg)
Hazır kızartılmış patates	600
Taze patates ve patates hamurundan yapılan patates cipsi	1000
Patates bazlı krakerler	1000
Yumuşak ekmek	
- Buğday bazlı ekmek	80
- Buğday dışındaki ekmekler	150
Kahvaltılık gevrekler (yulaf lapası hariç)	
- Kepek ürünleri ve tam tahıl gevrekleri, patlamış tahıllar	400
- Buğday ve çavdar bazlı ürünler	300
- Mısır, yulaf, spelt (kavuzlu buğday), arpa ve pirinç bazlı ürünler	200
Bisküviler ve gofretler	500
Patates bazlı krakerler hariç krakerler	500

Gıdalar	İndikatif Değer (µg/kg)
Çıtır ekmek	450
Zencefilli kurabiye	1000
Bu kategorideki diğer ürünlere benzer ürünler	500
Kavrulmuş kahve	450
Hazır (çözünür) kahve	900
Kahve ikameleri	
- Tahıl bazlı kahve ikameleri	2000
- Diğer kahve ikameleri	4000
Bebek maması, (işlenmiş tahıl bazlı bebek mamaları hariç)	
- Kuru eriksiz	50
- Kuru erikli	80
Bebekler ve küçük çocuklar için bisküviler ve peksimetler	200
Bebekler ve küçük çocuklar için işlenmiş tahıl bazlı mamalar (bisküviler ve peksimetler hariç)	50

AKR içeren gıdaların alınması sonrası AKR mide-bağırsak kanalından emilebilir ve kan dolaşımı yoluyla tüm vücuda dağılır. İnsanlarda AKR katabolizmasının kesin mekanizmaları tam olarak anlaşılmamasına rağmen, AKR'nin öncelikle karaciğerde sitokrom P450 enzimleri ile, özellikle CYP2E1'i içeren bir süreç yoluyla glisidamid oluşturmak üzere katabolize edildiği bilinmektedir. Glisidamid, AKR'nin genotoksisitesinden ve kanserojenliğinden sorumlu olan birincil metabolit olarak kabul edilir (11)

İnsanların AKR'ye maruz kalması, potansiyel olumsuz sağlık etkileri nedeniyle endişelere yol açmıştır. Bu nedenle, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) AKR'yi insan ve hayvanlar için olası kanserojen sınıfı kimyasallar kategorisine dahil etmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), AKR'nin güvenilir bir şekilde tanımlanabilir bir etki 'eşiği' olmayan kimyasallar grubuna ait olduğunu belirtmektedir. AKR'ye maruz kalan kemirgenlerde tümör oluşumunun gözlenmesi AKR'nin insanlar üzerinde de kanser yapıcı etkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca AKR'nin kanserojenliği ile ilgili olarak, maruziyetin artmasıyla riskin arttığı düşünülmektedir.

AKR'ye maruz kalma, kanserojen potansiyeline ek olarak insanlarda nörotoksisite, genotoksisite, üreme toksisitesi ve gelişimsel toksisite gibi diğer olumsuz sağlık etkileriyle de ilişkilendirilmiştir. Hayvan çalışmalarında, AKR'ye maruz kalmanın sinir hasarı ve motor fonksiyon bozukluğu dahil olmak üzere nörotoksik etkilerini

gösterebildiği rapor edilmiştir. Yüksek oranda AKR'ye maruz kalan erkeklerde üreme sağlığının olumsuz yönde etkilendiğini gösteren araştırma sonuçlarında bulunmaktadır; bunun yanı sıra hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, AKR'ye maruz kalan hayvanlarda sperm kalitesinde ve doğurganlıkta azalma olduğunu göstermektedir (11- 13).

2.3. Akrilamidin Toksik Etkileri

Özellikle yüksek sıcaklıkta pişirme işlemleri sırasında oluşan AKR, bu gıdaları sürekli ve bol miktarda tüketen insanlarda sağlığı bozabilecek derecede önemli toksik etkiler göstermektedir. Bu toksik etkiler arasında nörotoksisite, genotoksisite, reprotoksisiteyi sayabiliriz. Bilim insanları, insanların AKR'nin toksik etkilerinden korunmak için öncelikle bu kimyasala maruz kalmanın en aza indirilmesinin önemli olduğunu vurgulamaktadır.

2.3.1. Akrilamidin Sinir Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri (Nörotoksisite)

AKR'nin, merkezi ve periferik sinir sistemi dokularında hasarlar oluşturarak nörotoksisiteye neden olabilmektedir. AKR kaynaklı nörotoksisitenin birincil mekanizması, AKR'nin en önemli reaktif metaboliti olan glisidamid sinir hücreleri de dahil olmak üzere proteinlere kovalent olarak bağlanarak gerçekleşir. Doku hasarı ve fonksiyon bozukluklarına neden olmasıdır. AKR ve glisidamidin proteinlere bağlanması hücresel düzeyde hasar ve nörotransmisyonun bozulmasına yol açarak merkezi ve periferik sinir sisteminde fonksiyon bozukluklarına ve doku hasarlarına neden olur (14).

Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar, AKR'ye maruz kalmanın, özellikle periferik sinirlerde aksonal dejenerasyon ve demiyelinizasyon ile karakterize sinir hasarına yol açabileceğini göstermiştir. AKR kaynaklı nörotoksisitenin semptomları arasında uyuşma, karıncalanma, güçsüzlük ve bozulmuş koordinasyon gibi duyu ve motor eksiklikler bulunabilir. Şiddetli AKR nörotoksisitesi vakaları, geri dönüşü olmayan sinir hasarına ve nöropatiye yol açabilir. İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalar, özellikle poliakrilamid üretimi gibi AKR'nin kullanıldığı endüstrilerde çalışanlar arasında mesleki olarak AKR'ye maruz kalmayla ilişkili nörotoksik etkilere dair kanıtlar sağlamıştır. AKR'ye maruz kalan insanlarda gözlenen AKR nörotoksisitesinin semptomları nöropatik ağrı, kas zayıflığı ve duyu bozuklukları şeklinde sıralanabilir. Genel olarak AKR kaynaklı nörotoksisite önemli sağlık riskleri oluşturur. Bilim insanları sinir sistemi fonksiyonunu korumak için AKR'ye maruz kalmanın en aza indirilmesinin en önemli tedbir olduğunu ısrarla vurgulamaktadırlar (6).

2.3.2. Akrilamidin DNA Üzerindeki Toksik Etkileri (Genotoksisite)

AKR'nin genotoksisitesi öncelikle DNA ile reaksiyona girerek eklentiler (adduct) oluşturabilen metaboliti glisidamidden kaynaklanır. Bu DNA eklentileri, DNA replikasyonu ve onarım süreçlerine müdahale ederek mutasyonlara ve genomik dengesizliğe yol açabilir. Deneysel çalışmalar, AKR'ye maruz kalmanın, in vitro insan hücreleri ve in vivo hayvan dokuları dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde DNA hasarına neden olabileceğini göstermiştir. AKR'nin genotoksik etkileri karaciğer, beyin, böbrekler ve üreme organları da dahil olmak üzere birçok organda gözlemlenmiştir. AKR'nin genotoksisitesi, potansiyel kanserojen etkileriyle ilgili endişeleri artırmaktadır; çünkü DNA hasarı ve mutasyonlar, kanserin başlatılmasında ve ilerlemesinde anahtar olaylardır (15-17).

AKR'nin, genotoksik etkilerini gösterebilmesi için vücutta metabolize edilerek daha reaktif bir bileşik olan glisidamide dönüşmesi gerekmektedir. Deneysel bir çalışmada, in vitro sistemlerde glisidamide dönüşüm olmadan AKR'nin genotoksik etkilerinin düşük olduğu bulunmuştur. Ancak, bu dönüşümü sağlayan enzimler eklendiğinde, AKR'nin genotoksik etkilerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu araştırmanın sonuçları, AKR'nin genotoksik etkilerini anlamada glisidamid dönüşümünün önemini vurgulamakta ve bu tür kimyasalların laboratuvar ortamında değerlendirilmesi sırasında metabolik süreçlerin dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Bu bulgular, AKR'nin insan sağlığı üzerindeki risklerini değerlendirmek ve uygun gıda güvenliği standartları geliştirmek için önemli bir temel oluşturmaktadır. (18).

İnsan lenfositlerinde (beyaz kan hücreleri) AKR kaynaklı genotoksisitenin incelendiği bir çalışmada comet testi, mikronükleus testi ve DNA-protein çapraz bağları testi gibi biyolojik bazı testler yapılarak elde edilen bulgulara göre,

- AKR'nin belirli konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde DNA hasarına yol açtığı bulunmuştur. Bu hasar, alkali-labile bölgelerde (DNA'nın daha duyarlı olduğu bölgeler) yoğunlaşmıştır.
- Çalışma ayrıca, AKR'nin DNA-protein çapraz bağları oluşturabileceğini ve bu çapraz bağların DNA onarımını etkileyebileceğini göstermektedir.
- AKR, DNA'da oksidatif hasara neden olabilmekte ve bu da hücrelerin genetik materyalini bozabilmektedir.
- Mikronükleus testi, AKR'nin kromozomal hasara yol açabileceğini ve bu hasarın hücrelerin genetik bütünlüğünü tehdit edebileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak, AKR insan lenfositlerinde genotoksik etkilere neden olabileceği ve bu hasarların hücrel süreçler üzerinde olumsuz etkileri meydana getirebileceği söylenebilir. AKR kuvvetle muhtemel genotoksik bir kimyasaldır ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratabilecek potansiyele sahiptir. Buna göre, gıdalarda ve endüstriyel uygulamalarda AKR maruziyetinin potansiyel riskleri vurgulanmakta ve bu tür kimyasalların güvenli kullanımının sağlanması gerektiği önerilmektedir (19).

2.3.3. Akrilamidin Üreme Sistemi Üzerindeki Toksik Etkileri (Reprotoksisite)

AKR'ye maruz kalma, üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilerle ilişkilendirilmiştir; bu durum üreme toksisitesi olarak bilinir. Hayvan çalışmaları, AKR'ye maruz kalmanın hem erkeklerde hem de kadınlarda normal üreme fonksiyonunu ve doğurganlığı bozabileceğini göstermiştir. Erkeklerde AKR'ye maruz kalma, sperm kalitesinin düşmesi, sperm hareketliliğinin azalması ve sperm fonksiyonunun bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, AKR'nin neden olduğu nörotoksisite, hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen düzenlemesini bozarak üreme fonksiyonunu dolaylı olarak etkileyebilir, bu da hormonal dengesizliklere ve testosteron üretiminin azalmasına yol açabilir. Kadınlarda AKR'ye maruz kalma, yumurtalık ağırlığında azalma, östrus sikluslarının bozulması ve doğurganlığın bozulması dahil olmak üzere yumurtalık fonksiyonundaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. AKR kaynaklı genotoksisite, üreme organlarında ve germ hücrelerinde potansiyel olarak DNA hasarına neden olarak üreme sağlığı açısından da risk oluşturabilir. Genel olarak AKR'nin reprotoksik etkileri özellikle üremenin devamını ve fonksiyonunu bozabilmesi nedeni ile üremenin kritik dönemlerinde bu kimyasala maruz kalmanın en aza indirilmesinin önemini vurgulamaktadır (20-22).

2.3.4. Akrilamid Kaynaklı Oksidatif Stres ve Oksidatif Doku Hasarı

AKR'ye maruz kalma, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile vücudun antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik ile karakterize edilen bir durum olan oksidatif stresin indüksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Oksidatif stres proteinler, lipitler ve DNA dahil olmak üzere hücrel bileşenlerde hasara yol açarak oksidatif doku hasarına neden olmaktadır. AKR'nin neden olduğu oksidatif stres, metabolizması ve sonraki hücrel süreçler sırasında ROS üretimi nedeniyle ortaya çıkar. AKR vücutta glisidamide metabolize edilir ve bu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, inflamatuvar

yolların aktivasyonu ve sitokrom P450 enzimlerinin indüksiyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla ROS üretimine yol açabilir.

Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi ROS, hücrel bileşenlere zarar verebilecek oldukça reaktif moleküllerdir. Normal fizyolojik koşullar altında ROS, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerin yanı sıra glutatyon ve C ve E vitaminleri gibi enzimatik olmayan antioksidanlar dahil olmak üzere antioksidan savunma mekanizmaları tarafından dengelenir. Bununla birlikte, aşırı ROS üretimi ve/veya antioksidan savunma kapasitesindeki azalma sonucunda oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres lipitlerde, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasara yol açarak oksidatif doku hasarlanmalarına neden olmaktadır (23-26).

Oksidatif doku hasarı, oksidatif stresin hücrel bileşenlerde neden olduğu yapısal ve fonksiyonel hasarı ifade eder. Oksidatif stresin birincil sonuçlarından biri olan lipit peroksidasyonu, hücre zarlarını ve hücrel fonksiyonu bozabilen lipit peroksitlerin ve diğer reaktif aldehitlerin oluşumuna yol açar. Amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu ve protein çapraz bağlanması da dahil olmak üzere protein oksidasyonu, protein işlev bozukluğuna ve agregat oluşumuna neden olabilir, bu da hücrel süreçlerin bozulmasına ve protein fonksiyonunun kaybına neden olabilir. ROS tarafından indüklenen DNA hasarı mutasyonlara, zincir kopmalarına ve DNA eklenti oluşumuna yol açarak genomik bütünlüğü tehlikeye atabilir ve kanser dahil çeşitli hastalıkların gelişimine neden olabilir (27, 28).

2.3.5. Akrilamidin Diğer Toksik Etkileri

Nörotoksisite, genotoksisite, reprotoksisite, oksidatif stres ve oksidatif doku hasarına ek olarak AKR'ye maruz kalmanın insan sağlığı üzerinde diğer bazı toksik etkilerle de ilişkilendirildiği görülmüştür. Gebelik sırasında AKR'ye maruz kalma, fetal büyümenin baskılanması ve gelişimsel anormallikler dahil olmak üzere gelişimsel toksisiteyle de ilişkilendirilmiştir. Hayvan çalışmaları, doğum öncesi AKR'ye maruz kalmanın, yavrularda doğum ağırlığının azalmasına, iskelet bozukluklarına ve davranışsal anormalliklere yol açabileceğini göstermiştir. Ayrıca AKR, hücrelerde programlı ölüm (apoptoz) süreçlerini tetikleyerek kalp kası hücrelerinin normal gelişimini engelleyebilir ve kardiyovasküler sistemin fonksiyonlarını bozabilir. Genotoksik özelliklere sahip olduğu için DNA hasarına yol açarak kalp ve damarların

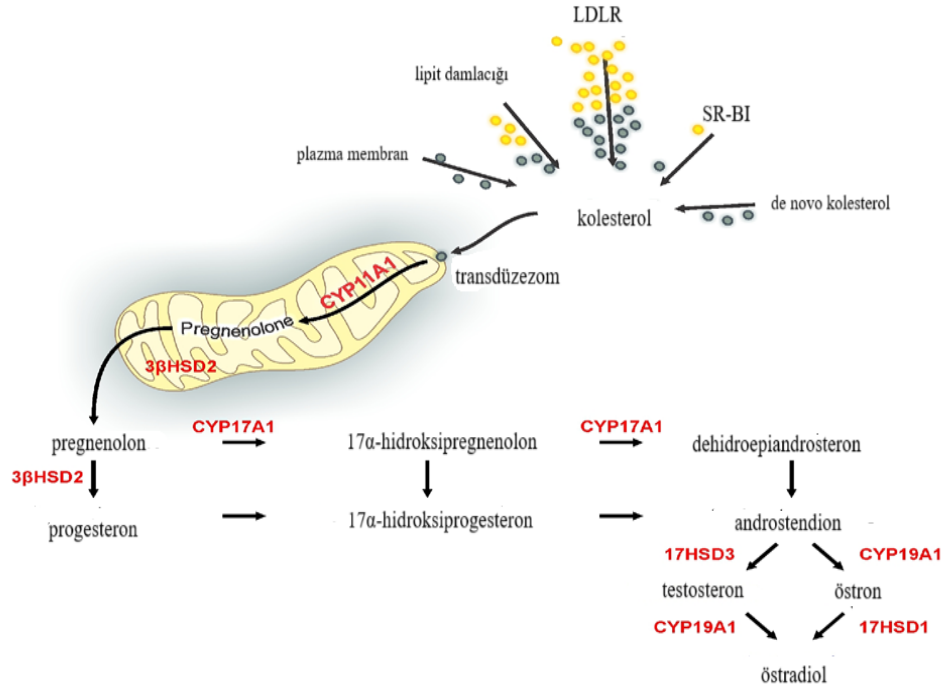
gelişiminde anomalilere neden olabilir. DNA hasarı sonucunda doğumsal kalp defektleri ve damar anomalileri gibi ciddi sağlık sorunları ortaya çıkarabilir (4, 5, 16, 26).

AKR'ye maruz kalan hayvanlarda karaciğer hasarı ve işlev bozukluğunun meydana geldiğini rapor eden çalışmalar, AKR'ye maruz kalmanın hepatotoksisiteye yol açtığını göstermiştir. AKR kaynaklı hepatotoksisite oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve inflamasyonun artması sonucunda meydana gelmekte, karaciğer hasarına ve hepatik fonksiyonun bozulmasına neden olabilmektedir

AKR'nin endokrin bozucu etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda AKR uygulanan hayvanlarda pankreasın alfa ve beta hücrelerinin hasarlandığı ve bunun sonucunda da diyabete zemin oluştuğu gösterilmiştir. Genel olarak AKR'ye maruz kalma karsinogenez, gelişimsel ve üreme toksisitesi ve hepatotoksisite gelişimi dahil olmak üzere insan sağlığı üzerinde çeşitli toksik etkilere neden olabilmektedir. AKR'nin insan sağlığı üzerindeki bu olumsuz etkilerinde korunmak ve bu etkileri azaltabilmek için AKR içeren gıdaların tüketimini kısıtlamak ve/veya gıda işleme tekniklerinin değiştirilmesi yoluyla AKR oluşumunu en aza indirmek gibi önlemlerin alınması öncelikle tavsiye edilmektedir (29-32).

2.4. Erkeklerde Steroid Hormon Sentezi

Erkeklerde steroid hormon sentezi, erkek üreme sağlığında ve genel fizyolojide önemli rol oynayan androjenler (testosteron gibi) ve östrojenler (östradiol gibi) dahil olmak üzere çeşitli hormonların üretimini içerir. Testosteron birincil erkek cinsiyet hormonudur ve ağırlıklı olarak testislerin Leydig hücrelerinde sentezlenir. Testosteronun sentezi, CYP11A1 de dahil olmak üzere çeşitli sitokrom P450 enzimlerini içeren bir dizi enzimatik reaksiyon yoluyla kolesterolün pregnenolon'a dönüştürülmesiyle başlar. Pregnenolon daha sonra 17 alfa-hidroksilaz/17,20-liyaz (CYP17A1) ve 17β-hidroksisteroid dehidrojenaz (HSD17B3) gibi enzimleri içeren sonraki enzimatik adımlar yoluyla testosterona dönüştürülür. Testosteron sentez ve salınımı, luteinizan hormonun (LH) testislerde Leydig hücrelerine bağlanması, testosteron sentezini başlatması ve salgılanmasını uyarması gibi bir dizi reaksiyonların hipotalamus-hipofiz-gonadal eksen tarafından kontrol edilmesi ile düzenlenir. Testosteron sentezinin tüm sentez basamakları Şekil 2.4.'de verilmiştir (33, 34).



Şekil 2.4. Leydig hücrelerinde kolesterolden androjenlerin sentezi.

Östradiol de dahil olmak üzere östrojenler, erkeklerde öncelikle testosteronun aromatzasyonu yoluyla sentezlenir. NADPH sitokrom P450 redüktaz enzimi olan CYP19A1 geni tarafından kodlanan Aromataz, testosteronun östradiole dönüşümünü katalize etmekten sorumlu enzimdir. Aromataz erkeklerde testisler, yağ dokusu, kemik, beyin ve deri gibi çeşitli dokularda eksprese edilir. Aromatzasyona ek olarak östrojenler, erkeklerde bir öncü hormon olan androstenedionun östrona dönüştürülmesi yoluyla da sentezlenebilir ve bu daha sonra östradiole dönüştürülebilir (35, 36).

Erkeklerde steroid hormon sentezi, hipotalamus ve hipofiz bezinden gelen hormonal sinyallerin yanı sıra hedef dokulardaki lokal faktörler de dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksen, testosteron üretiminin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar; hipotalamustan gonadotropin salgılayan hormon (GnRH), hipofizden LH ve folikül uyarıcı hormonun (FSH) salınmasını uyarır. LH, testosteron sentezini uyararak için testislerin Leydig hücrelerine etki ederken, FSH, spermatogenezi desteklemek için Sertoli hücrelerine etki eder (37, 38).

2.4.1. Erkeklerde Aromatazın Doku Dağılımı

CYP19A1 geni tarafından kodlanan Aromataz, testosteron gibi androjenlerin başta östradiol olmak üzere östrojenlere dönüştürülmesinden sorumlu bir enzimdir. Erkeklerde aromataz enzimi, çeşitli dokularda bulunur ve her dokuda farklı oranlarda eksprese edilir. Aromatazın başlıca doku dağılımı şöyledir:

- **Testisler:** Aromataz, özellikle Leydig hücrelerinde ve seminifer tübüllerde eksprese edilir. Bu bölgelerde, testosteronun östrojenlere dönüştürülmesinde rol oynar.
- **Beyin:** Beynin hipotalamus gibi bölgelerinde aromataz aktivitesi vardır ve bu, cinsel davranışların düzenlenmesinde önemlidir.
- **Yağ Dokusu:** Yağ dokusu, erkeklerde östrojen üretiminin ana kaynaklarından biridir.
- **Kemik:** Aromataz kemik dokusunda da bulunur ve kemik yoğunluğunun korunmasına yardımcı olur.
- **Deri:** Aromataz deri dokusunda da eksprese edilir.
- **Kaslar:** Vücutta doku aromatazının sabit olduğu varsayıldığında, androjenlerin östrojenlere dönüşmesiyle oluşan toplam ekstragonadal aromatazının %25-30'u kas dokusundan, %10-15'i ise yağ dokusundan kaynaklanmaktadır.

Aromatazın doku dağılımı, lokal östrojen seviyelerinin düzenlenmesi ve kemik sağlığı, üreme fonksiyonu ve metabolizma gibi fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir (39, 40).

2.4.2. Erkeklerde Aromatazın Steroid Hormon Sentezindeki Rolü

Aromataz, testosteronun östradiole dönüşümünü katalize ederek erkeklerde steroid hormon sentezinde önemli bir rol oynar. Bu enzimatik süreç, cinsel gelişim, üreme fonksiyonu ve kemik metabolizması dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçler için kritik olan androjen ve östrojen seviyeleri arasındaki dengenin korunması için gereklidir. Yağ dokusu ve kemik gibi ekstragonadal dokulardaki aromataz aracılı östrojen sentezi, lokal östrojen üretimine katkıda bulunur ve dokuya özgü fonksiyonları düzenler.

Aromatazın Rolü:

1. **Testosteronun Östrojenlere Dönüşümü:** Testosteron, aromataz enzimi aracılığıyla östradiole dönüştürülür. Bu süreç, erkeklerde östrojen üretiminin ana yoludur.
2. **Cinsel Gelişim ve Üreme:** Aromataz, cinsel farklılaşma ve gelişim için önemlidir. Erkeklerde östrojen seviyelerinin düzenlenmesi, spermatogenez ve üreme sağlığı açısından kritik öneme sahiptir.
3. **Kemik Metabolizması:** Aromataz, kemik dokusunda östrojen üretimini destekleyerek kemik yoğunluğunun korunmasına yardımcı olur. Östrojen, kemik rezorpsiyonunu azaltarak kemik sağlığını korur.
4. **Ekstragonadal Östrojen Sentezi:** Yağ dokusu, beyin, kemik ve kas gibi dokularda yerel östrojen üretimi, aromataz enzimi aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu lokal üretim, dokuya özgü işlevlerin düzenlenmesine katkıda bulunur.
5. **Sağlık ve Hastalık Durumları:** Aromataz aktivitesindeki anormallikler, hormon dengesizliklerine ve buna bağlı çeşitli hastalıklara yol açabilir. Örneğin, fazla östrojen üretimi, jinekomasti gibi durumlara neden olabilir.

Erkeklerde aromatazın rolü, hormon dengesi, üreme sağlığı ve genel fizyolojik süreçler açısından büyük önem taşır. Bu nedenle, aromatazın düzenlenmesi ve aktivitesi, sağlık açısından dikkatle izlenmesi gereken bir faktördür (36, 41, 42).

2.4.3. Aromatazın Erkeklerde Testosteron-Östrojen Dengesindeki Rolü

Aromataz, erkeklerde testosteronun östrojene dönüşümünü sağlayan bir enzimdir. Bu enzim, testosteronu östradiole, yani aktif bir östrojen formuna dönüştürür. Erkeklerde aromatazın rolü, vücutta östrojen üretimini dengelemektir. Aromataz aktivitesi tarafından düzenlenen testosteron ve östrojen seviyeleri arasındaki denge, erkek üreme sağlığı ve genel refahı için çok önemlidir. Testosteron, erkeklerde birincil cinsiyet hormonu olarak bilinirken, östrojen de düşük miktarda olsa bile erkek sağlığı için gereklidir. Östrojen, kemik yoğunluğunun korunması, cinsel işlevler ve sperm üretimi gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynar. Çoğunlukla, değişen aromataz aktivitesinden kaynaklanan testosteron-östrojen dengesinin düzensizliği hormonal dengesizliklere yol açabilir. Vücuttaki östrojen seviyelerinin aşırı yüksek olması, erkeklerde jinekomasti (göğüs büyümesi), kısırlık, cinsel isteksizlik, sperm üretiminde azalma ve metabolik bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli sağlık sorunlarına yol açabilir. Öte yandan, aromataz aktivitesinin düşük olması östrojen eksikliğine, bu da kemik yoğunluğunun azalmasına,

sperm üretiminin azalmasına, sperm kalitesini düşmesine ve diğer östrojenle ilgili sağlık sorunlarına yol açabilir.

Özetle, aromataz enzimi, erkeklerde testosteron-östrojen dengesinin sağlanmasında kritik bir rol oynar. Bu dengenin bozulması hem testosteron hem de östrojen seviyelerini etkileyerek çeşitli sağlık sorunlarına yol açabilir. Aromataz inhibitörleri bazen aromataz artışı kaynaklı erkek kısırlığı veya hormona duyarlı kanserler gibi durumlarda östrojen seviyelerini modüle etmek için kullanılır (43-46).

2.4.4. Erkeklerde Sebebi Bilinemeyen Kısırlıkta Aromatazın Rolü

Erkeklerde sebebi bilinmeyen kısırlık (idiyopatik infertilite), belirli bir neden saptanamayan, ancak sperm üretimi veya fonksiyonu ile ilgili problemlerden kaynaklanan bir durumdur. Aromataz enzimi, bu bağlamda önemli bir rol oynayabilir. Aromataz enzimi, testosteronu östradiole dönüştüren bir enzimdir. Erkeklerde normal düzeyde östrojen, üreme sağlığı için gereklidir; ancak aşırı aromataz aktivitesi, östrojen seviyelerinin gereğinden fazla artmasına yol açabilir. Bu durum, testosteron seviyelerinin düşmesine neden olarak hormonal bir dengesizlik yaratır. Hormonal denge bozulduğunda, sperm üretimi ve kalitesi olumsuz etkilenebilir. Artan östrojen seviyeleri, sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisi gibi semen parametrelerinde olumsuz değişikliklere yol açabilir. Bu da erkeklerde kısırlığın nedeni olabilir. Erkeklerde sebebi bilinmeyen kısırlıkta aromatazın rolünün anlaşılması, üreme sonuçlarını iyileştirmeye yönelik, hedefe yönelik tedavi protokollerinin geliştirilmesi açısından önemlidir (47-49).

2.4.5. Erkeklerde Aromataz Kaynaklı Kısırlıkta Aromataz İnhibitörlerinin Etkisi

Erkeklerde aromataz kaynaklı kısırlık, aromataz enziminin aşırı aktivitesine bağlı olarak testosteronun aşırı miktarda östradiole dönüştürülmesi sonucunda ortaya çıkar. Bu durum, testosteron seviyelerinin düşmesine ve östrojen seviyelerinin artmasına yol açar, bu da sperm üretimini ve kalitesini olumsuz etkileyebilir. Aromataz inhibitörleri (AI), bu hormonal dengesizliği düzeltmek amacıyla kullanılan bir tedavi yöntemidir. Aromataz inhibitörleri, aromataz enziminin aktivitesini baskılar ve testosteronun östradiole dönüşümünü azaltır. Bu ilaçlar, vücutta testosteron seviyelerini artırırken östrojen seviyelerini düşürür, böylece testosteron/östrojen dengesi yeniden sağlanır. Bu dengenin sağlanması, sperm üretimi ve fonksiyonunu iyileştirerek kısırlık tedavisinde etkili olabilir. Aromataz inhibitörleri, testosteronun daha az östradiole dönüşmesini sağlar, bu

da kan dolaşımında serbest testosteron seviyelerinin artmasına neden olur. Yüksek testosteron seviyeleri, spermatogenez sürecini destekler ve sperm üretimini artırabilir. Aromataz inhibitörlerinin bir başka etki mekanizması ise hipofiz bezinden LH ve FSH salgılanmasını artırabilir. Ancak bu ilaçların kullanımı, dikkatli bir şekilde izlenmelidir ve genellikle bir üroloji veya endokrinoloji uzmanı tarafından yönlendirilmelidir. Uzun süreli kullanımda yan etkiler oluşabileceğinden, tedavi süreci boyunca düzenli olarak hormon seviyeleri ve semen analizleri yapılması gerektiği vurgulanmıştır (44, 49-51).

2.4.6. Akrilamidin Steroid Hormon Sentezi Üzerindeki Etkileri

AKR'ye maruz kalmanın, testosteron ve östrojen üretimi de dahil olmak üzere steroid hormon sentezini bozduğu gösterilmiştir. Steroid hormon sentezinde AKR'nin neden olduğu değişikliklerin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır ancak AKR'nin hormon üretimi veya metabolizmasında yer alan bazı enzimatik basamakları etkilemesi olabileceği düşünülmektedir. AKR tarafından steroid hormon sentezinin düzenlenmesinin bozulması, erkeklerde üreme bozukluklarına, kısırlığa ve diğer hormonal dengesizliklere neden olabilir.

AKR'nin steroid hormon sentezi üzerindeki etkileri üzerine yapılan çalışmalar, AKR'nin bazı enzimatik süreçleri bozarak hormon üretimini baskılayabileceğini göstermiştir. Özellikle, kolesterolün steroid hormonlara dönüşümünde rol oynayan enzimlerin aktivitesini azaltabilir. Bazı çalışmalar, AKR'nin testosteron seviyelerini düşürebileceğini göstermektedir. Bu durum, testislerdeki Leydig hücrelerinin zarar görmesi veya hormon sentezi ile ilgili enzimlerin inhibisyonu yoluyla olabilir. Düşük testosteron seviyeleri, erkek üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratabilir, örneğin sperm üretimi azalabilir. AKR'nin östrojen ve diğer steroid hormonlar üzerindeki etkileri hakkında daha az çalışma olsa da genel olarak steroidogenezi (steroid hormon üretim süreci) olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu durum, östrojen sentezinin ve/veya hormonal dengenin bozulmasına neden olabilir. AKR'ye maruz kalma, hücrelerde oksidatif strese yol açarak hücresel fonksiyonları bozabilir, bu da hormon dengesizliklerine, üreme fonksiyonlarında bozulmaya ve hatta fetal gelişim sırasında hormon düzeylerinde bozulmalara neden olabilir. Bu etkiler, uzun vadeli sağlık sorunlarına neden olabilir (52-55).

2.4.7. Akrilamidin Aromataz Gen İfadesi Üzerindeki Etkileri

AKR'ye maruz kalma, aromataz gen ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir ve bu da aromataz aktivitesinde ve östrojen üretiminde değişikliklere yol açmaktadır. Aromataz gen ekspresyonunun AKR kaynaklı modülasyonu, transkripsiyonel (mRNA sentezi) ve/veya translasyonel (mRNA'nın proteine dönüşümü) seviyede meydana gelebilir ve epigenetik mekanizmaları veya hücrel sinyal yollarındaki değişiklikleri içerebilir. AKR'nin aromataz gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin anlaşılması, AKR kaynaklı üreme toksisitesi ve erkeklerde hormonla ilişkili bozukluklardaki rolünün aydınlatılması için önemlidir.

AKR'nin, aromataz gen ifadesi üzerinde doğrudan bir etkisi olabilir. Bu etki, dokulara bağlı olarak değişebilir. Örneğin, bazı çalışmalarda AKR'nin aromataz gen ifadesini baskıladığı ve bu nedenle östrojen üretiminde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Bunun aksine, bazı dokularda AKR'nin aromataz ifadesini artırabileceği ve bu durumun östrojen seviyelerinde artışa neden olabileceği de öne sürülmüştür. AKR'nin aromataz gen ifadesi üzerindeki etkilerinin altında yatan biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, oksidatif stresin bu süreçte önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. AKR, hücrel oksidatif stresi artırarak, aromataz geninin düzenlenmesini etkileyebilir. AKR, aromataz gen ifadesi üzerinde potansiyel olarak bozucu etkiler yaratabilir ve bu da hormon dengesizliklerine ve üreme sağlığı üzerinde olumsuz sonuçlara yol açabilir. Ancak bu alanda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır, çünkü aromataz gen ifadesi üzerindeki etkiler, dokulara ve bireysel biyolojik faktörlere bağlı olarak değişebilir. Özellikle çevresel maruziyetin etkilerini anlamak ve bu bilgileri halk sağlığı açısından değerlendirmek önemlidir (4, 5).

2.5. E Vitamini

Yağda çözünen bir antioksidan olan E vitamini, tokoferoller ve tokotrienolleri içeren bir bileşik grubudur. E vitamini antioksidan etki ile hücreleri serbest radikallerin ve ROS'un neden olduğu oksidatif hasardan korumada çok önemli bir rol oynar. E vitamini ayrıca antiinflamatuvar özelliklere sahiptir ve bağışıklık fonksiyonu, cilt sağlığı ve nörolojik fonksiyonlarda da rol oynar.

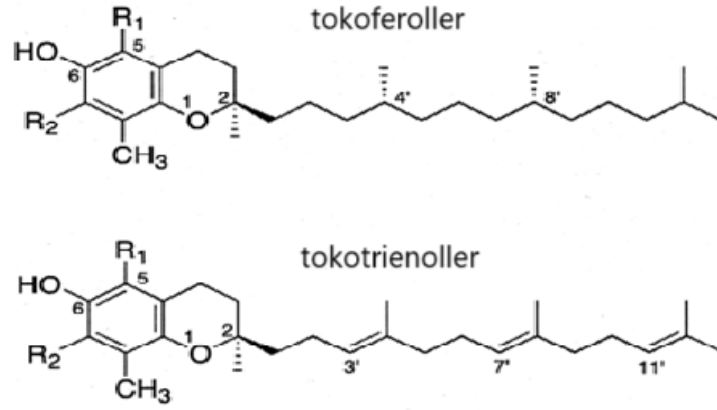
E vitamininin keşfi, yaklaşık yüz yıl önce, kolayca oksitlenebilen domuz yağı içeren gıdalarla beslenen gebe sığanlarda fetal reabsorbsiyonu önlemek için, diyetlerine E vitamini eklenmesiyle gerçekleşmiştir. İnsan diyetinde, bitkilerin sentezlediği peroksil

radikali süpürücü olan 8 farklı E vitamini molekülü bulunur. Ancak insan vücudu biyolojik aktivite açısından karaciğerde en az yıkıma uğrayarak vücutta en fazla kalan formu olan α -tokoferolü tercih eder. Bu tercih α -tokoferol transfer proteininin plazmayı α -tokoferol açısından daha da zenginleştirmesi ile α -tokoferol olmayan formların metabolizması arasındaki kombinasyona bağlıdır. Bu sebeple α -tokoferol transfer proteinindeki herhangi bir genetik defekt insan sağlığı için, E vitamini eksikliği açısından hayati öneme sahiptir (56).

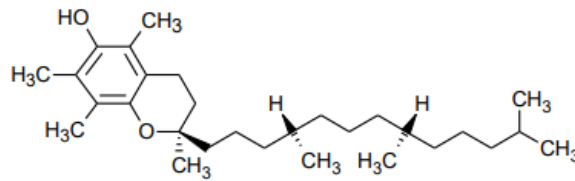
2.5.1. E Vitamininin Kimyası

E vitamini, dört tokoferol (alfa, beta, gama ve delta) ve dört tokotrienol (alfa, beta, gama ve delta) dahil olmak üzere, yağda çözünebilir bir grup bileşiği kapsar. Bu bileşikler bir kromanol halkası ve bir fitil yan zincirinden oluşur. Tokoferoller ve tokotrienoller arasındaki fark, yan zincirlerinin yapısında bulunmaktadır: Tokoferoller doymuş bir fitil yan zincirine sahipken, tokotrienoller üç çift bağa sahip doymamış bir izoprenoid yan zincire sahiptir. E vitamininin antioksidan aktivitesi öncelikle hidrojen atomlarını lipid peroksil radikallerine vermesi, böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırma ve hücre zarlarını oksidatif hasardan koruma yeteneğine atfedilir.

Alfa-tokoferol, lipidler oksitlendiğinde meydana gelen reaktif oksijen türlerinin üretimini engelleyen yağda çözünen önemli bir antioksidandır. Alfa-tokoferolü bu kadar etkili bir antioksidan yapan şey, peroksil radikaliyle son derece hızlı reaksiyona girmesidir; o kadar hızlı ki, peroksil radikalının başka reaksiyonlara girmesine izin vermez. Alfa-tokoferol, bilinen en güçlü yağda çözünen antioksidandır. E vitamini, lipid peroksidasyonunda oluşan lipid radikalleri ile reaksiyona girerek hücre zarlarını oksidasyondan korur. Serbest radikal ara ürünlerini uzaklaştırarak oksidasyonun devamını engeller. Oksitlenmiş alfa tokoferoksil radikalleri askorbat (C vitamini) veya retinol (A vitamini) gibi antioksidanlarla indirgenerek tekrar aktif forma geri döndürülebilir. Bunların sonucunda alfa tokoferolün bir antioksidan olarak işlevinin yansırı önemli hücre sinyalizasyon özellikler göstererek gen düzenleyici aktivitelere de sahip olduğu kanısına varılmıştır. Diğer E vitamini izoformlarına kıyasla alfa-tokoferolün en yüksek biyoyararlanıma sahip olması, bu biyomolekülün nisbeten kapsamlı araştırmalara konu olmasına neden olmuş ve bu durum literatürde çok sayıda referansla yansıtılmıştır. Tokoferollerin, tokotrienollerin ve alfa-tokoferolün kimyasal yapıları ve in vitro antioksidan aktivite düzeyleri Şekil 2.5'te verilmiştir (57, 58).



tokoferol/ tokotrienol	R ₁	R ₂	rölatif antioksidan aktivite(%) in vitro
α-	CH ₃	CH ₃	100
β-	CH ₃	H	71
γ-	H	CH ₃	68
δ-	H	H	28



Alfa-tokoferol (E vitamini)

Şekil 2.5. Tokoferollerin, tokotrienollerin ve α-tokoferolün (E vitamini) kimyasal yapıları ve in vitro rölatif antioksidan aktivite düzeyleri

2.5.2. Akrilamid Kaynaklı Toksisitede E Vitamininin Koruyucu Etkileri

AKR, özellikle yüksek sıcaklıkta pişirilmiş gıdalarda (örneğin kızartılmış patates, kahve, cips) oluşabilen potansiyel olarak zararlı bir kimyasal bileşiktir. AKR'nin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri, sinir sistemi toksisitesi, kanserojenik etkiler ve

genetik hasar gibi çeşitli toksikolojik sonuçları içerir. Bu nedenle, AKR'nin toksik etkilerini azaltacak veya önleyecek stratejiler geliştirmek büyük bir önem taşımaktadır.

E vitamininin AKR'nin neden olduğu toksisitelere karşı koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. AKR'ye maruz kalma, ROS'un oluşması nedeniyle oksidatif strese ve oksidatif doku hasarına yol açabilir. Bir antioksidan olarak E vitamini, ROS'u temizleyebilir ve lipid peroksidasyonunu önleyebilir, böylece AKR'nin neden olduğu oksidatif stresi ve oksidatif doku hasarlarını azaltabilir. Ek olarak, E vitamini yüksek derecede antiinflamatuvar olması nedeni ile AKR kaynaklı inflamasyonu azaltabilir ve/veya engelleyebilir. AKR, DNA'ya zarar verebilir ve genetik mutasyonlara yol açabilir. E vitamini, gen düzenleyici aktivitesi ve antioksidan etkisi ile DNA'nın oksidatif hasarını azaltarak genetik stabilitenin korunmasına yardımcı olabilir. Ek olarak E vitamini AKR'nin oksidatif stres aracılı nörotoksik etkilerine karşı sinir hücrelerini oksidatif stresten koruyarak nöroprotektif bir rol oynayabilir.

Deneysel çalışmalarda, AKR ve metabolitlerinin karaciğer ve böbrek hasarı yaptığı oksidatif stres, inflamasyon ve apoptotik belirteçlerdeki değişim analiz edilerek teyit edilmiştir. Bu süreçte E vitamininin AKR'nin neden olduğu hasarlara karşı potansiyel bir koruyucu ve etkileri hafifletici ajan olarak etki gösterdiği vurgulanmıştır. Hayvan ve hücre kültürü üzerinde yapılan araştırmalarda, E vitamininin AKR kaynaklı toksisiteyi azaltmada potansiyel bir koruyucu ajan olduğu gösterilmiştir. Ancak, bu bulguların insanlar üzerinde de geçerli olup olmadığını belirlemek için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır (59, 60).

2.5.3 Akrilamid Kaynaklı Reprotoksisitede E Vitaminin Koruyucu Etkileri

Uzun süre AKR'ye maruz kalma, üreme fonksiyonu ve doğurganlığın bozulması da dahil olmak üzere reprotoksik etkilerle ilişkilendirilmiştir. E vitamininin AKR kaynaklı üremeye karşı koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir. E vitamini, reaktif oksijen türlerini temizleyerek ve oksidatif stresi azaltarak, üreme organlarının bütünlüğünün korunmasına yardımcı olabilir ve sperm kalitesi, sperm hareketliliği ve erkek üreme fonksiyonunun diğer yönlerinde AKR'nin neden olduğu hasara karşı koruma sağlayabilir. Ek olarak, E vitamini inflamatuvar yolakları ve hormonal dengeyi düzenleyerek AKR kaynaklı reprotoksisiteye karşı koruyucu etkilerini daha da güçlendirebilir.

AKR'nin hormonal dengeyi bozabileceği ve bu durumun üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceği bilinmektedir. E vitamini, hücre zarlarını ve hormon

sentezi için gerekli olan enzimleri koruyarak hormonal dengeyi sürdürebilir ve AKR'nin bu denge üzerindeki zararlı etkilerini hafifletebilir. AKR maruziyetinin, embriyo gelişimini ve dolayısıyla gebeliği olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir. E vitamini, embriyo gelişiminde kritik öneme sahip hücreleri oksidatif strese karşı koruyarak, gebeliği destekleyebilir ve AKR'nin olumsuz etkilerini azaltabilir.

Çeşitli hayvan araştırmalarında, E vitamininin AKR kaynaklı reprotoksisiteye karşı koruyucu etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmalar genellikle sperm parametreleri, testis ağırlığı ve histolojik analizler gibi üreme sağlığına dair çeşitli ölçümler üzerinde yapılmıştır. E vitamininin AKR ile tetiklenen oksidatif stres kaynaklı hücresel ve doku hasarını azalttığı, böylece üreme sağlığını koruyabileceği gösterilmiştir (5, 61-64).

2.5.4. E vitamininin Aromataz Gen İfadesi Üzerindeki Etkileri

Güçlü bir antioksidan olan E vitamininin, steroid hormon sentezinde ve üreme sağlığında önemli bir rol oynayan aromataz gen ekspresyonu üzerindeki potansiyel etkileri araştırılmıştır. Araştırmalar, E vitamininin antioksidan özellikleri yoluyla aromataz gen ekspresyonunu modüle edebileceğini öne sürmektedir. Oksidatif stres, aromataz ekspresyonunu kontrol edenler de dahil olmak üzere gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan hücresel sinyal yollarını bozabilir. E vitamini, ROS'u temizleyerek ve oksidatif stresi azaltarak, aromataz gen ekspresyonunun normal düzenlenmesinin korunmasına yardımcı olabilir. Çalışmalar, lipid peroksidasyonunun, insan plasentadaki aromataz aktivitesini inhibe ettiğini ve bunun da östrojen üretimini olumsuz etkilediğini göstermektedir. Bununla birlikte E vitamini lipid peroksidasyonunu kontrol altına alarak plasentada koruyucu etkiler göstermiştir.

Çeşitli çalışmalar, E vitamininin çeşitli hücre tipleri ve dokularda aromataz gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini bildirmiştir. Örneğin, meme kanseri hücrelerinde, E vitamininin aromataz aktivitesini inhibe ettiği ve potansiyel olarak aromataz gen ifadesinin down regülasyonu yoluyla östrojen sentezini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, E vitamininin anti inflamatuvar özellikleri de aromataz gen ekspresyonu üzerindeki etkilerine katkıda bulunabilir. İnflamasyon aromataz ekspresyonunu uyarak östrojen sentezinin artmasına neden olabilir. İnflamasyonu baskılayarak, E vitamini dolaylı olarak aromataz gen ekspresyonunu ve östrojen üretimini aşağı doğru düzenleyebilir.

Genel olarak, E vitamininin aromataz gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin altında yatan kesin mekanizmalar daha fazla araştırmayı gerektirirken, mevcut kanıtlar E

vitamini takviyesinin aromataz aktivitesini ve östrojen seviyelerini düzenlemeye yardımcı olabileceğini ve üreme sağlığı ve hormonla ilişkili bozukluklar için potansiyel etkileri olabileceğini düşündürmektedir (5, 65, 66).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Alet ve Gereçler

Çalışmamızın deneysel aşamalarında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında bulunan alet ve gereçlerden yararlanılmıştır. Bunlar; Homojenizatör, vorteks, manyetik karıştırıcı, santrifüjler, otomatik pipetler, hassas terazi, mikropleyt yıkayıcı ve okuyucu, pH metre, su banyosu, -70 °C derin dondurucu, buz makinası, SDS-PAGE elektroforez ve western-blot için kullanılan gereçlerdir.

3.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Malzemeler

Çalışmamızda ELİSA yöntemi kullanılarak yapılan analizler için, Elabscience marka Rat LH ELISA Kiti, Rat E2 (Östradiol) ELISA kiti, Rat Total Testosterone ELISA Kiti ve Rat FSH ELISA kitleri kullanılmıştır.

Western blot analizleri için, Rat Spesifik Aromataz primer antikor, ECL Western Blotting Substrate, Bisakrilamid, Tris HCl, Tris Base, Glisin, Metanol, Skim milk powder (yağsız süt tozu), proteaz inhibitör coctail powder, BCA Protein Assay Kit, PBS Tablet gibi kimyasallar kullanılmıştır.

Sıçanlara uygulanan kimyasal maddeler; Akrilamid (Sigma A8887) ve E vitamini (α -Tocopherol; Sigma T3251).

3.1.3. Ratların Temini

İNönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığı'nın (HADYEK) 2022/14-4 nolu kararı ile onaylanan araştırmamız için gerekli olan 48 adet 200 ± 20 gr ağırlığında 8 haftalık erişkin Sprague Dawley erkek ratlar, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden (İNÜTF-DEHÜM) temin edilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Çalışma Grubu ve Örnek Seçimi

Gruplar arası (Kontrol, Mısır yağı, AKR, E-vitamini, AKR + E-vitamini) farklılık için %95 güven düzeyinde ($\alpha=0.05$) ve %80'lik güç ile ($\beta=0.20$) karşılaştırılması için etki büyüklüğü 0,52 olarak değerlendirildiğinde her bir grup için minimum dahil edilmesi gereken rat sayısının örneklem büyüklüğü 8 olarak belirlenmiştir. AKR'nin toksik özelliğinden dolayı AKR uygulanan gruplarda kayıp yaşanma ihtimali bulunmaktadır. Araştırma süresince, bu gruplarda grup başına olması gereken örneklem büyüklüğünün altına düşmemesi için AKR uygulanan gruplarda rat sayısı 12 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada 48 adet 8 haftalık ve ortalama 200 ± 20 gr ağırlığında Sprague Dawley erkek rat 5 gruba ayrılarak kullanılmıştır. Ratlar, İNÜTF-DEHÜM'de, 56 gün süreyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamın sağlandığı ve aspiratörlerle sürekli havalandırılan $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 'lik odalarda tutuldular. Deney süresi boyunca ad libitum beslendiler.

Grup 1 (Kontrol grubu: K): Bu gruptaki 8 adet yetişkin erkek rat, her bir kafeste 4 rat olacak şekilde 2 ayrı kafese alındı 56 gün boyunca normal yem ve su ile ad-libitum olarak beslendi. Bu süre sonunda ratlar dekapite edilip kas ve yağ dokuları ile kan numuneleri alınarak biyokimyasal analizler için -70°C derin dondurucuda saklandı.

Grup 2 (Mısır yağı grubu: MY): Bu gruptaki 8 adet yetişkin erkek rat, her bir kafeste 4 rat olacak şekilde 2 ayrı kafese alındı 56 gün boyunca 0.5 ml mısır yağı oral gavaj yoluyla uygulandı. Bu süre sonunda ratlar dekapite edilip kas ve yağ dokuları ile kan numuneleri alınarak biyokimyasal analizler için -70°C derin dondurucuda saklandı.

Grup 3 (AKR grubu: AKR): Bu gruptaki 12 adet yetişkin erkek rat her bir kafeste 4 rat olacak şekilde 3 ayrı kafese alındı 56 gün boyunca 10 mg/kg konsantrasyonda AKR içme suyu ile uygulandı. Bu süre sonunda ratlar dekapite edilip kas ve yağ dokuları ile kan numuneleri alınarak biyokimyasal analizler için -70°C derin dondurucuda saklandı.

Grup 4 (E vitamini grubu: E Vit.): Bu gruptaki 8 adet yetişkin erkek rat her bir kafeste 4 rat olacak şekilde 2 ayrı kafese alındı 56 gün boyunca günlük olarak 100 mg/kg E vitamini, 0.5 ml mısır yağı içinde çözülerek oral gavaj yoluyla uygulandı. Bu süre sonunda ratlar dekapite edilip kas ve yağ dokuları ile kan numuneleri alınarak biyokimyasal analizler için -70°C derin dondurucuda saklandı.

Grup 5 (AKR + E vitamini grubu: AKR+E Vit.): Bu gruptaki 12 adet yetişkin erkek rat her bir kafeste 4 rat olacak şekilde 3 ayrı kafese alındı 56 gün boyunca 10 mg/kg konsantrasyonda AKR içme suyu ile ve 100 mg/kg E vitamini oral gavajla verildi. Bu süre sonunda ratlar dekapite edilip kas ve yağ dokuları ile kan numuneleri alınarak biyokimyasal analizler için -70 °C derin dondurucuda saklandı.

56 günün sonunda ratlardan kas ve yağ doku örnekleri toplanarak aromataz gen ekspresyonu Western Blot yöntemi ile analiz edildi. Serum numunelerinde ise testosteron, östradiol, FSH ve LH düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü.

3.2.2. Hayvan Bakımı, Beslenmesi ve Tartılması

İNÜTF-DEHÜM' den temin edilen 8 haftalık ve ortalama 200 ± 20 gr ağırlığında 48 adet Sprague Dawley erkek rat 56 gün süreyle aydınlık-karanlık döngüsüne sahip (12:12 saat) sabit bir sıcaklık ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) ve nem oranında ($50 \pm 10\%$) barındırıldı, standart kemirgen yemiyle beslenerek suya serbest erişime izin verildi. Deneye başlamadan önce ratların günlük ne kadar su tükettiği hayvan başına hesaplandı. Hayvanların vücut ağırlığı tartımları haftalık düzenli olarak yapıldı. Deney sonunda kesim günü gruplardaki tüm hayvanların vücut ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Kontrol ve deney grupları arasındaki ortalama vücut ağırlığı farkı istatistiksel olarak hesaplandı.

3.2.3. Hayvanların Yem ve Su Tüketiminin Takibi

Her grupta bulunan ratların ne kadar yemle beslendikleri haftalık olarak ölçülerek ortalama hayvan başına tükettikleri yem miktarı hesaplandı.

AKR verilen gruplardaki (AKR ve AKR+E Vit.) hayvanların su takibi 3 günde bir olacak şekilde yapıldı ve AKR ölçümleri yeniden hesaplanarak suyu değiştirildi. Vücut ağırlıklarındaki artış veya azalış su içme miktarını değiştireceğinden, AKR gruplarına verilen 10 mg/kg konsantrasyonunu korumak gerektiği için üç günde bir su tüketim takibi yapılmıştır.

3.2.4. Akrilamid ile E Vitamini Uygulama Yöntemi, Dozu ve Süresi

AKR (Acrylamide; Sigma A8887), ratlara 56 gün boyunca her gün 10 mg/kg canlı ağırlık konsantrasyonda olacak şekilde içme suyunda çözülerek uygulandı. 10 mg/kg dozu, genellikle orta-yüksek doz olarak kabul edilir ve özellikle uzun vadeli maruziyetlerde toksik etkilere neden olabilecek bir seviyedir. (10, 52, 67). AKR'nin hayvanlara 56 gün boyunca verilmesi, üreme sistemi üzerindeki etkilerini değerlendirmek

için belirli nedenlere dayanır. Bu süre seçimi hem hayvanların üreme döngüleri hem de toksik etkilerin ortaya çıkma süresi açısından önemlidir. Ratlarda yaklaşık olarak 56 gün tam bir spermatogenez döngüsünü kapsar (68).

AKR gruplarındaki ratların içme suyu 3 günde bir olmak üzere AKR konsantrasyonu yeniden hesaplanarak tazelandı

E vitamini (α -Tocopherol; Sigma T3251), ratlara 56 gün boyunca her gün 100 mg/kg canlı ağırlık konsantrasyonda olacak şekilde oral gavaj yolu ile 0.5 ml mısır yağı içinde çözülerek uygulandı. Hayvanların kilo takibine göre haftalık E vitamini konsantrasyonu bozulmayacak şekilde 0.5 ml mısır yağı içinde çözülerek verilmiştir (69)

3.2.5. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

56 gün beslenmenin sonunda ratlara 10 mg ksilazin/40 mg ketamin (i.p) anestezisi altında laparotomi yapıldı, intrakardiyak yolla kanlar jelli tüplere alınarak +4°C de 4000g de 10 dk. santrifüj edilip serumlar elde edildi ve daha sonra çalışılmak üzere -20 °C de muhafaza edildi. Bu işlemlerden sonra tüm ratlar dekapite edilip kas (gastrokinemus) ve yağ doku (visseral yağ) numuneleri alındı. Numunelerin fazla kanı serum fizyolojik ile temizlendi, kurulandı, paketlenip zaman kaybetmeden sıvı azota konuldu ve analiz gününe kadar -70 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.6. Kas ve Yağ Aromataz Proteini Düzeylerinin Western-Blot ile Analizi

Deney gruplarına ait kas ve yağ dokuları 1 mM PMSF ve proteaz inhibitör koktaili içeren RIPA tamponunda homojenize edildi ve BCA kiti (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit) ile protein ölçümü yapıldı. Western-blot ile analiz edilecek olan her gruptan örnekler eşit miktarda (~35 µg) protein, SDS-PAGE jelinde kuyucuklara yüklendi ve elektriksel gerilim uygulanarak proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı. Daha sonra jeldeki proteinler PVDF membrana transfer edildi ve aromataz proteini western-blot yöntemi ile görünür hale getirildi.

Proteinlerin SDS-PAGE elektroforezinde yürütülmesi: Kas ve yağ numunelerinin ekstraksiyonu ile elde edilen protein örnekleri poliakrilamid jele yüklendi. Protein yüklenmesinden hemen sonra sisteme DC elektrik verildi. Protein bandlarının jelin stoklama kısmının sonuna kadar yürütülmesi için 50 Volt gerilim uygulandı. Protein bandlarının jelin stoklama (%5 lik) kısmından ayırma (%12 lik jel) kısmına geçişi sonrası, gerilim 100 Volt'a çıkarılıp 2 saat yürütüldü. Brom fenol mavisi ayırma jelinin alt ucuna ulaşınca gerilim kesilip jel tanktan çıkartıldı.

Proteinlerin jelden PVDF membrana semi-dry transferi: Transfer için önce jel tanktan çıkartıldı ve tarak kısımları kesilip atıldı. Daha sonra jel hazır olarak aldığımız membranın üzerine konulup üzeri kapatıldı. Ufak rulo ile hava kabarcığı kalmaması için üzerinden tek yöne doğru geçirildi. Daha sonra transfer cihazının kasetine membran altta kalacak şekilde yerleştirildi. Trans-Blot turbo cihazı hazır jel kullanımı için uygun programda çalıştırıldı ve 7-10 dk içerisinde jelden proteinlerin membrana aktarılması gerçekleştirildi.

PVDF membranın Bloklanması: Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi sonrası membran 1.5 saat %5 süt tozu ve %0.1 Tween 20 içeren PBS çözeltisinde (bloklama çözeltisi) çalkalanarak inkübe edildi. Bloklama işleminin sonunda membran, %0,1 Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile 3 defa yıkandı.

PVDF membranın birincil antikor ile inkübasyonu: Membran, anti-rat aromataz birincil antikoruna içeren bloklama çözeltisine alındı, +4 °C'de bir gece düşük çalkalama ile inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda membran 3 kez %0.1 Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika yıkandı. Yıkama sonunda, membrana bağlanmamış olan anti-rat aromataz antikorları uzaklaştırılmış oldu.

PVDF membranın ikincil antikor ile inkübasyonu: Membranın yıkanarak bağlanmayan birincil antikorun uzaklaştırılması sonrası, bloklama çözeltisine ilave edilen HRP bağlı ikincil antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda membran 3 kez %0.1 Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkandı ve bağlanmamış olan ikincil antikorlar PVDF membrandan uzaklaştırıldı.

PVDF membranın ECL ile inkübasyonu ve aromataz bandlarının görüntülenmesi: İkincil antikora bağlı bulunan horseradish peroksidaz enzimi, elektrokemilüminisans (ECL) çözeltisi içinde bulunan substratı katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan lüminol ışımaya yol açar. Bu ışımaya, DNR Biochemi (DNR Bio-imaging system, İsrail) görüntüleme cihazında protein bandları şeklinde görüntülenir. Kaydedilen bantlar, ImageJ Analysis Software (Version 1.53e, USA) programı ile analiz edilerek protein yoğunlukları değerlendirildi. Rölatif değerlendirme β -aktin'e (housekeeping protein) göre yapılmıştır

3.2.7. Serum Testosteron, Östradiol, FSH, LH Düzeylerinin Analizi

Serum testosteron, östradiol, FSH, LH, düzeyleri, ticari ELISA kitleri (Elabscience) kullanılarak mikroplyt okuyucu ile (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader, BioTek Instruments, USA) analiz edildi.

Testosteron analiz prosedürü

Kuyucukların Hazırlanması: Diye edilmiş standartlar, kör ve numune için kuyucuklar belirlendi. Her kuyucuğa standart, kör ve numuneden 50 µL eklendi. Ardından, her kuyucuğa 50 µL HRP Konjugat çalışma çözeltisi eklendi. Plaka kapatıcı ile kapatıldı ve 37°C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

Yıkama: Her kuyucuktaki çözelti boşaltıldı, her kuyucuk mikrolaka yıkayıcı ile 350 µL yıkama tamponuyla yıkandı. Bu işlem toplamda 3 kez tekrarlandı. Yıkama adımlarından sonra test şeritleri hemen kullanıldı.

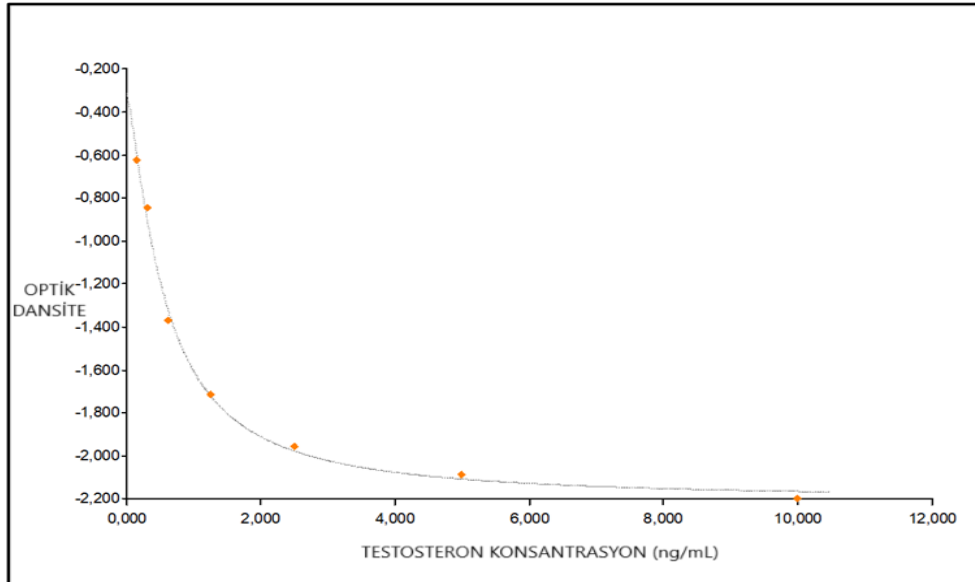
Substrat Eklenmesi: Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklendi ve plaka yeni bir kapatıcı ile kapatıldı. Plaka, ışık geçirmeyen bir ortamda 37°C’de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi. Not: Reaksiyon süresi renk değişikliğine göre kısaltılabilir veya uzatılabilir, ancak 30 dakikayı aşmamalıdır. Mikrolaka okuyucu önceden 15 dakika ısıtılmalıdır.

Durdurucu Çözelti Eklenmesi: Her kuyucuğa 50 µL durdurucu çözeltisi eklendi.

Not: Durdurucu çözeltinin eklenmesi, substrat çözeltisinin eklenme sırasıyla aynı şekilde yapılmalıdır.

Optik Yoğunluğun (OD) Ölçülmesi: Kuyucukların optik yoğunluk değerleri, mikrolaka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda hemen ölçüldü.

Testosteron için elde edilen standart eğrisi şekil 3.1’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Testosteron Elisa Standart Eğrisi

Östradiol analiz prosedürü

Kuyucukların Hazırlanması: Dilue standartlar, kör ve numune için kuyucuklar belirlendi. Her kuyucuğa, 50 µL standart, kör ve numune çözeltisi eklendi. (Tüm numune ve standartların çift örnekle çalışılması önerilir. Numune seyreltme oranları ön deneyler veya teknik destek önerileri ile belirlenmelidir). Ardından, her kuyucuğa 50 µL HRP Konjugat çalışma çözeltisi eklendi. Plaka kapaticıyla kapatıldı. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

Yıkama: Kuyucuklardaki çözeltiler boşaltıldı. Her kuyucuk mikrolaka yıkayıcıda 350 µL yıkama tamponuyla yıkandı. Bu işlem toplamda 3 kez tekrarlandı. Yıkama adımlarından sonra test şeritleri hemen kullanıldı.

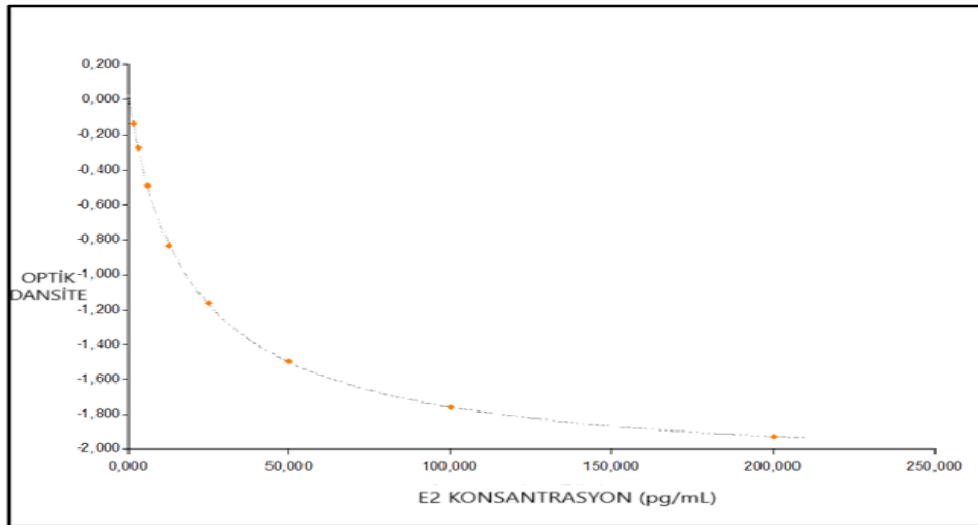
Substrat Eklenmesi: Her kuyucuğa 90 µL substrat çözeltisi eklendi ve plaka yeni bir kapaticıyla kapatıldı. Plaka, ışık geçirmeyen bir ortamda 37°C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi.

Not: Renk değişimine göre reaksiyon süresi kısaltılabilir veya uzatılabilir, ancak 30 dakikayı aşmamalıdır. Optik yoğunluk ölçümünden önce mikrolaka okuyucu yaklaşık 15 dakika ısıtılmalıdır.

Durdurucu Çözelti Eklenmesi: Her kuyucuğa 50 µL durdurucu çözeltisi eklendi. **Not:** Durdurucu çözeltinin eklenmesi, substrat çözeltisinin eklenme sırasına göre yapılmalıdır.

Optik Yoğunluk (OD) Ölçümü: Her kuyucuk için optik yoğunluk (OD) değeri, mikrolaka okuyucusunda 450 nm dalga boyunda hemen ölçüldü.

Östradiol için elde edilen standart eğrisi şekil 3.2' de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Östradiol Elisa Standart Eğrisi

FSH Analiz Prosedürü

Numunelerin Hazırlanması: Dilue standartlar, kör (blank) ve numuneler için kullanılacak kuyucuklar belirlenir. Her bir kuyucuğa 100 µL standart, kör ve numuneler eklendi. Standartlar için çift çalışma yapıldı. Mikro ELISA plakası kapatma filmi ile kapatıldı. 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.

Biotinlenmiş Antikor Çözeltisi Eklenmesi: Her kuyucuktaki sıvı boşaltıldı, ancak yıkama yapılmadı. Ardından her kuyucuğa 100 µL Biotinile Antikor çözeltisi eklendi. Plaka kapatılıp 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Yıkama İşlemi: Her kuyucuktaki çözelti boşaltıldı, her kuyucuk mikrolaka yıkayıcı ile 350 µL yıkama tamponuyla yıkandı. Bu işlem toplamda 3 kez tekrarlandı. Yıkama adımlarından sonra test şeritleri hemen kullanıldı.

HRP Konjugatı Eklenmesi: Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çözeltisi eklendi. Plaka yeni bir kapakla kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

Yıkama (Tekrarlama): kuyucuklar boşaltıldı ve 3. adımda olduğu gibi 3 kez yıkama işlemi tekrarlandı.

Substrat Reaktif Eklenmesi: Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktif eklendi. Plaka yeni bir kapakla kapatıldı ve 37°C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi. Plaka ışıktan korundu.

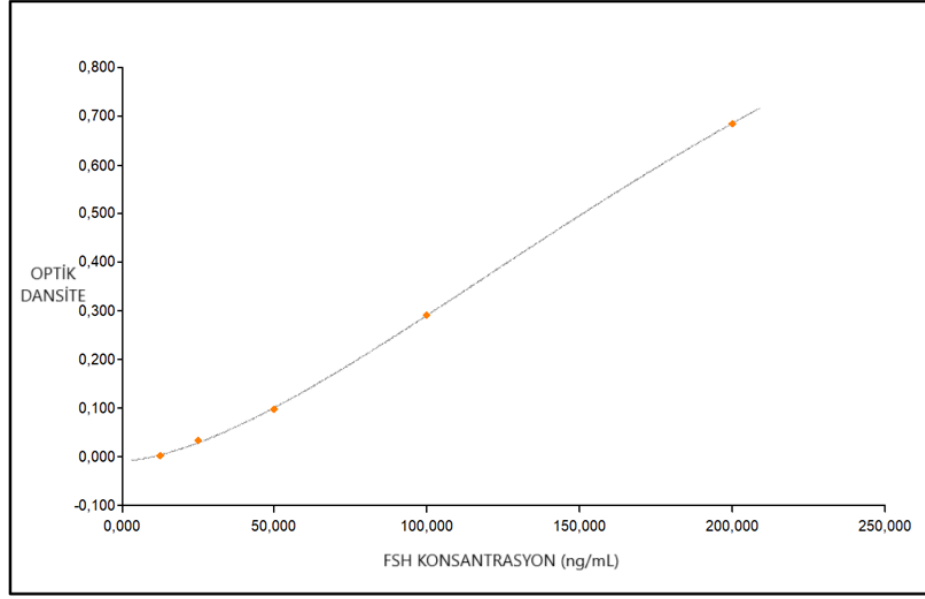
Not: Renk değişikliğine bağlı olarak reaksiyon süresi 30 dakikayı geçmemek şartıyla kısaltılabilir veya uzatılabilir. Optik yoğunluk ölçümünden önce mikrolaka okuyucu yaklaşık 15 dakika önceden ısıttık.

Reaksiyonun Durdurulması: Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi.

Not: Durdurucu çözeltinin eklenmesi, substrat çözeltisinin eklenme sırasıyla aynı şekilde yapılmalıdır.

Optik Yoğunluğun Ölçülmesi: Mikrolaka okuyucu kullanarak her kuyucuktaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda hemen ölçüldü.

FSH için elde edilen standart eğrisi şekil 3.3' te gösterilmiştir.



Şekil 3.3 FSH Elisa Standart Eğrisi

LH Analiz Prosedürü

Numunelerin Hazırlanması: Dilue standartlar, kör (blank) ve numuneler için kullanılacak kuyucuklar belirlenir. Her bir kuyucuğa 100 µL standart, kör ve numuneler eklendi. Standartlar için çift çalışma yapıldı. Mikro ELISA plakası kapatma filmi ile kapatıldı. 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.

Biotinlenmiş Antikor Çözeltisi Eklenmesi: Her kuyucuktaki sıvı boşaltıldı, ancak yıkama yapılmadı. Ardından her kuyucuğa 100 µL Biotinile Antikor çözeltisi eklendi. Plaka kapatılıp 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Yıkama İşlemi: Her kuyucuktaki çözelti boşaltıldı, her kuyucuk mikrolaka yıkayıcı ile 350 µL yıkama tamponuyla yıkandı. Bu işlem toplamda 3 kez tekrarlandı. Yıkama adımlarından sonra test şeritleri hemen kullanıldı.

HRP Konjugatı Eklenmesi: Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çözeltisi eklendi. Plaka yeni bir kapakla kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

Yıkama (Tekrarlama): kuyucuklar boşaltıldı ve 3. adımda olduğu gibi 3 kez yıkama işlemi tekrarlandı.

Substrat Reaktif Eklenmesi: Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktif eklendi. Plaka yeni bir kapakla kapatıldı ve 37°C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi. Plaka ışıktan korundu.

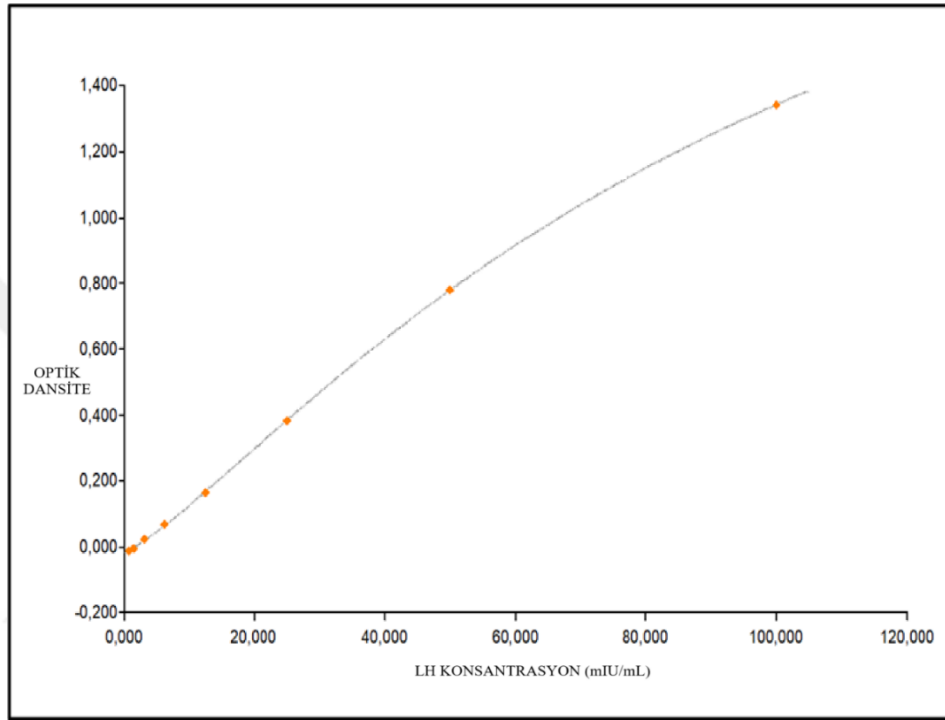
Not: Renk değişikliğine bağlı olarak reaksiyon süresi 30 dakikayı geçmemek şartıyla kısaltılabilir veya uzatılabilir. Optik yoğunluk ölçümünden önce mikrolaka okuyucu yaklaşık 15 dakika önceden ısıttık.

Reaksiyonun Durdurulması: Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi.

Not: Durdurucu çözeltinin eklenmesi, substrat çözeltisinin eklenme sırasıyla aynı şekilde yapılmalıdır.

Optik Yoğunluğun Ölçülmesi: Mikroplaka okuyucu kullanarak her kuyucuktaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda hemen ölçüldü.

LH için elde edilen standart eğrisi şekil 3.4' de gösterilmiştir.



Şekil 3.4 LH Elisa Standart Eğrisi

3.2.8. İstatistiksel Analizler

Çalışmada kullanılan sayısal değişkenler aritmetik ortalama \pm standart sapma veya ortanca (çeyreklikler arası genişlik) şeklinde özetlenmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Bağımsız grupların karşılaştırmalarında tek-yönlü varyans analizi veya Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Bu analizler sonrası ikili karşılaştırmalar Conover, Tukey ve Tamhane's T2 testleri ile yapılmıştır. Tekrarlı ölçümlerin karşılaştırmaları ise Friedman testi ile yapılmıştır. Friedman testi sonrası ikili karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon testi ile yapılmıştır. $p \leq 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir. Analizlerde IBM SPSS Statistics 27 yazılımı ile Python 3.12 'de pandas, matplotlib, numpy ve scipy kütüphaneleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Grupların Hayvan Ağırlıkları

Deneyin başlangıcından itibaren haftada 1 kere olmak üzere 56 gün boyunca hayvan ağırlıkları tartıldı. Grup bazında haftalık ortalama canlı ağırlıkları ve istatistiki anlamlılıkları Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’ de verildi.

Tablo 4.1’de, kontrol grubunda, ilk haftadan son haftaya kadar sürekli bir artış görülmektedir. Bu, kontrol grubunda zamanla düzenli bir büyüme olduğunu gösterir. Mısır yağı grubunda da benzer şekilde ağırlık artışı gözlenmektedir; ancak diğer gruplara göre başlangıç ve son hafta ağırlıkları biraz daha yüksek olabilir. E vitamini verilen grupta da haftalar ilerledikçe ağırlık artışı görülmektedir. Özellikle son haftalarda ağırlık artışı diğer gruplarla paraleldir. AKR ve AKR+E grupları için benzer bir artış eğilimi gözlemlendi, ancak AKR+E grubunda ağırlık artışı biraz daha yüksek bulundu. Tüm gruplar için Friedman testi uygulandı ve sonuçlar her bir grup için $p < 0.001$ olarak verildi. Haftalar arasındaki ağırlık değişimleri istatistiksel olarak anlamlıdır. Başka bir deyişle, zamanla ağırlık artışı her grup için istatistiksel olarak belirgin bir fark yarattı. Ancak farklı gruplar arasında büyüme hızlarında bazı farklılıklar olabileceği düşünülmelidir.

Tablo 4.1. Vücut ağırlıklarının grup bazında hafta karşılaştırmaları

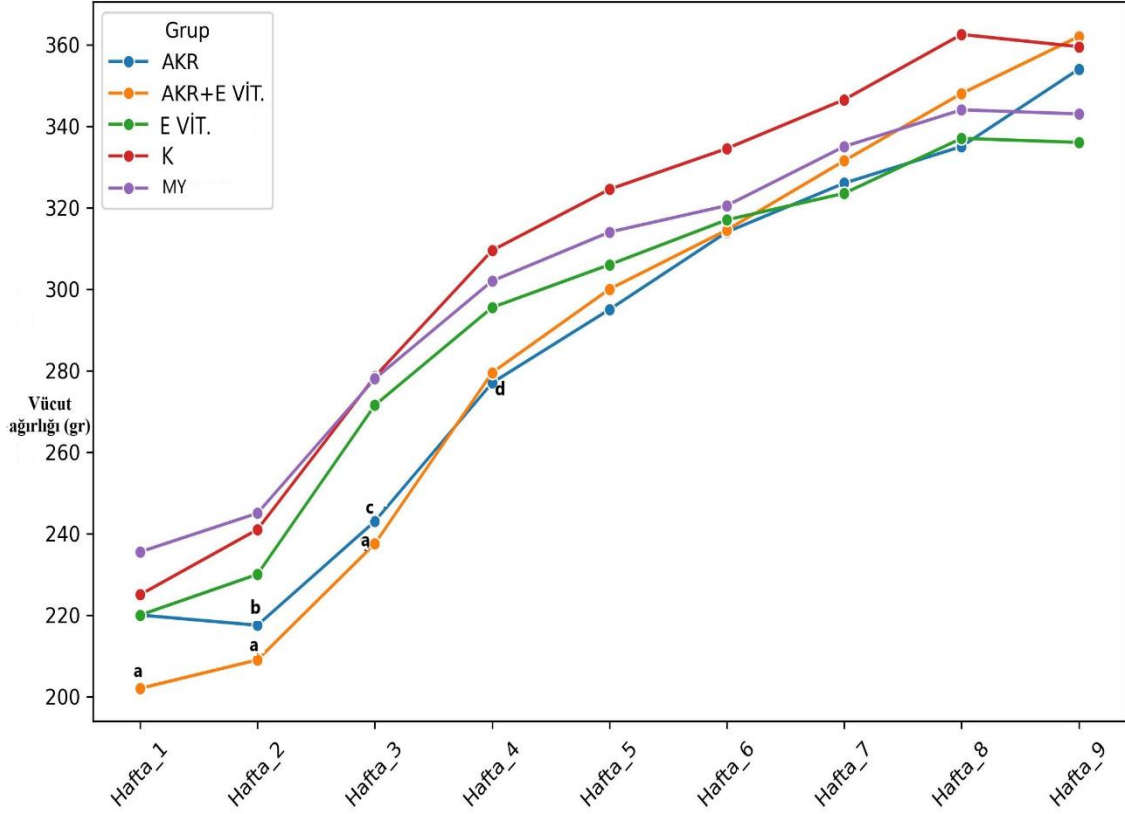
Grup	Hafta									p
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
K	225 (10)	241 (9)	279 (12)	310 (27)	325 (29)	335 (23)	347 (28)	363 (27)	360 (26)	<0.001
MY	236 (33)	245 (32)	278 (34)	302 (34)	314 (33)	321 (37)	335 (33)	344 (43)	343 (41)	<0.001
E Vit.	220 (33)	230 (36)	272 (44)	296 (64)	306 (47)	317 (67)	324 (54)	337 (61)	336 (69)	<0.001
AKR	220 (21)	218 (26)	249 (46)	282 (47)	300 (31)	315 (46)	329 (40)	342 (50)	358 (39)	<0.001
AKR+EVit.	202 (17)	209 (18)	237 (16)	276 (30)	296 (44)	314 (59)	330 (56)	344 (53)	361 (61)	<0.001

Değişkenler ortanca (çeyreklikler arası genişlik) şeklinde özetlendi.

Şekil 4.1’de haftalara göre gruplar arası vücut ağırlığındaki istatistiki anlamlılık Kruskal-Wallis H ve post hoc Conover testleri ile değerlendirildi ($p < 0.05$).

1., 2. ve 3. haftalarda AKR+E Vit. grubu; K, MY, E Vit. grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. 2. hafta’da AKR grubu; MY grubuna göre anlamlı olarak düşük

bulundu. 3. hafta'da AKR grubu; K, MY, E Vit. grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. 4. hafta'da AKR grubu; K grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Farklılık olan haftalar harflendirme ile belirtildi.



- a: AKR+E Vit. grubu; K, MY, E Vit. grubuna göre farklıdır.
b: AKR grubu; MY grubuna göre farklıdır.
c: AKR grubu; K, MY, E Vit. grubuna göre farklıdır.
d: AKR grubu; K grubuna göre farklıdır.

Şekil 4.1. Sıçanların ortalama vücut ağırlığı.

4.2. Grupların Su ve Yem Tüketimleri

Hayvanların yem ve içme suyuna ulaşımaları sınırsız olarak uygulandı. Gruplardaki bütün hayvanlar standart kemirgen pellet yemi ile beslendi. Yem ve su tüketimleri haftada bir takip edilip kayıt altına alınarak hayvanların 6-7 hafta boyunca ortalama ne kadar yem ve su tükettikleri hesaplanarak tablo haline getirildi (Tablo 4.2 ve 4.3).

Tablo 4.2. Yem tüketiminin grup bazında hafta karşılaştırmaları

Grup	Hafta							p
	1	2	3	4	5	6	7	
K	27 (1)	28 (1)	27 (0)	29 (0)	27 (0)	26 (2)	26 (1)	<0.001
MY	26 (4)	28 (1)	26 (1)	27 (1)	27 (1)	25 (0)	26 (1)	<0.001
E Vit.	27 (5)	26 (1)	25 (2)	26 (5)	26 (1)	25 (2)	26 (3)	0.716
AKR	19 (6)	23 (4)	25 (3)	28 (2)	28 (3)	27 (1)	25 (2)	<0.001
AKR+E Vit.	20 (6)	24 (5)	23 (4)	25 (5)	27 (2)	25 (2)	22 (7)	<0.001

Değişkenler ortanca (çeyreklikler arası genişlik) şeklinde özetlendi.

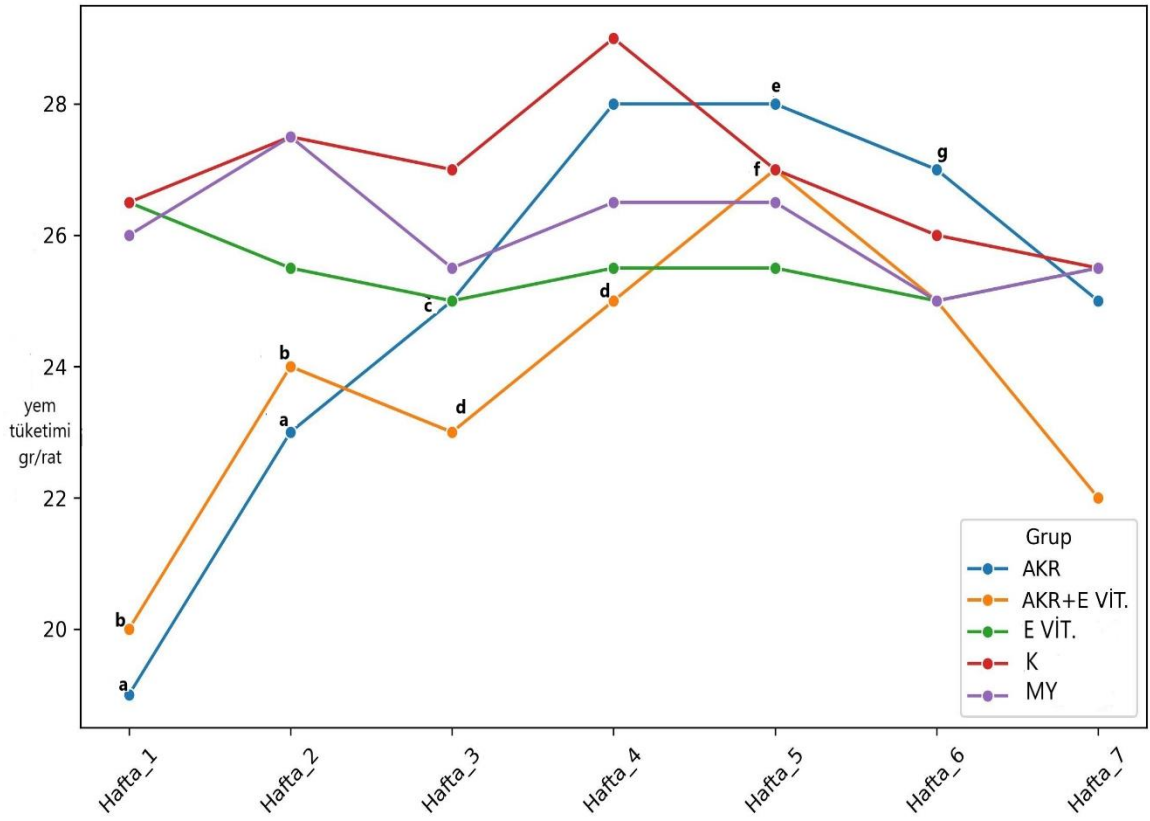
Çalışmada yem tüketimi, haftalar boyunca farklı gruplarda ölçüldü ve veriler ortanca (çeyrekler arası genişlik) şeklinde sunuldu. İstatistiksel analiz Friedman testiyle yapıldı ve gruplar içindeki zamanla değişim anlamlılık düzeyleri değerlendirildi.

K ve MY gruplarında yem tüketimi genel olarak istikrarlıdır. Bu gruplar deneysel müdahalelere maruz kalmadığından, yem tüketimindeki minimal değişimler normal büyüme süreçlerine bağlanabilir.

E vitamini grubunda, Friedman testi sonucuna göre yem tüketimi değişimi anlamlı değildir ($p = 0.716$). Bu, E vitamini uygulamasının yem tüketimini stabilize edebileceğini veya değişime neden olmadığını düşündürebilir. E vitamini verilen gruplarda (E Vit. ve AKR+E Vit.), yem tüketiminde genel olarak daha stabil bir eğilim gözlemlendi.

AKR grubunda yem tüketimi başlangıçta düşüktür ve haftalar boyunca artış gösterse de bu artış stabil değildir. Toksik madde, hayvanların yem tüketimini olumsuz yönde etkilemiş olabilir.

Şekil 4.2’de haftalara göre gruplar arası günlük rat başına tüketilen yem miktarındaki istatistiksel anlamlılık Kruskal-Wallis H ve post hoc Conover testleri ile değerlendirildi ($p < 0.05$). 1. hafta’da, AKR ve AKR+E.vit. grupları, K, MY, E vit. gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu. 2. hafta’da, AKR ve AKR+E.vit. grupları, K, MY, E vit. gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu. 3. Hafta’da, AKR ve AKR+E.vit. grupları, K grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. 4. hafta’da, AKR+E vit. grubu, K grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. 5. hafta’da, AKR grubu, K, MY, E vit., AKR+E vit. gruplarına göre ve AKR+E vit grubu, AKR ve E vit. grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. 6. Hafta’da, AKR grubu, MY, E vit., AKR+E vit. grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu.



- a:** AKR grubu; K, MY, E vit. gruplarına göre farklıdır.
b: AKR+E.vit grubu; K, MY, E vit. gruplarına göre farklıdır.
c: AKR; K grubuna göre farklıdır.
d: AKR+E.vit. grubu; K grubuna göre farklıdır.
e: AKR grubu; K, MY, E vit., AKR+E vit. gruplarına göre farklıdır.
f: AKR+E vit grubu; AKR ve E vit. grubuna göre farklıdır.
g: AKR grubu; MY, E vit., AKR+E vit. grubuna göre farklıdır.

Şekil 4.2. Sıçan başına ortalama günlük yem tüketimi (gr/ sıçan/ gün)

Su tüketimi, her grup için haftalık olarak ölçüldü ve ortanca ile çeyrekler arası genişlik verildi. İstatistiksel analiz Friedman testi ile yapıldı ve gruplar içinde zamanla değişimin anlamlılık düzeyleri belirlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Su tüketiminin grup bazında hafta karşılaştırmaları

Grup	Hafta						p
	1	2	3	4	5	6	
K	48 (8)	48 (10)	49 (8)	50 (6)	49 (8)	51 (8)	<0.001
MY	48 (5)	46 (2)	46 (0)	47 (2)	46 (0)	49 (5)	0.007
E	45 (3)	46 (1)	45 (5)	46 (2)	46 (0)	47 (7)	0.321
AKR	40 (6)	44 (9)	48 (8)	51 (10)	54 (16)	56 (16)	<0.001
AKR+EVit.	42 (16)	41 (15)	43 (11)	49 (11)	50 (10)	53 (11)	<0.001

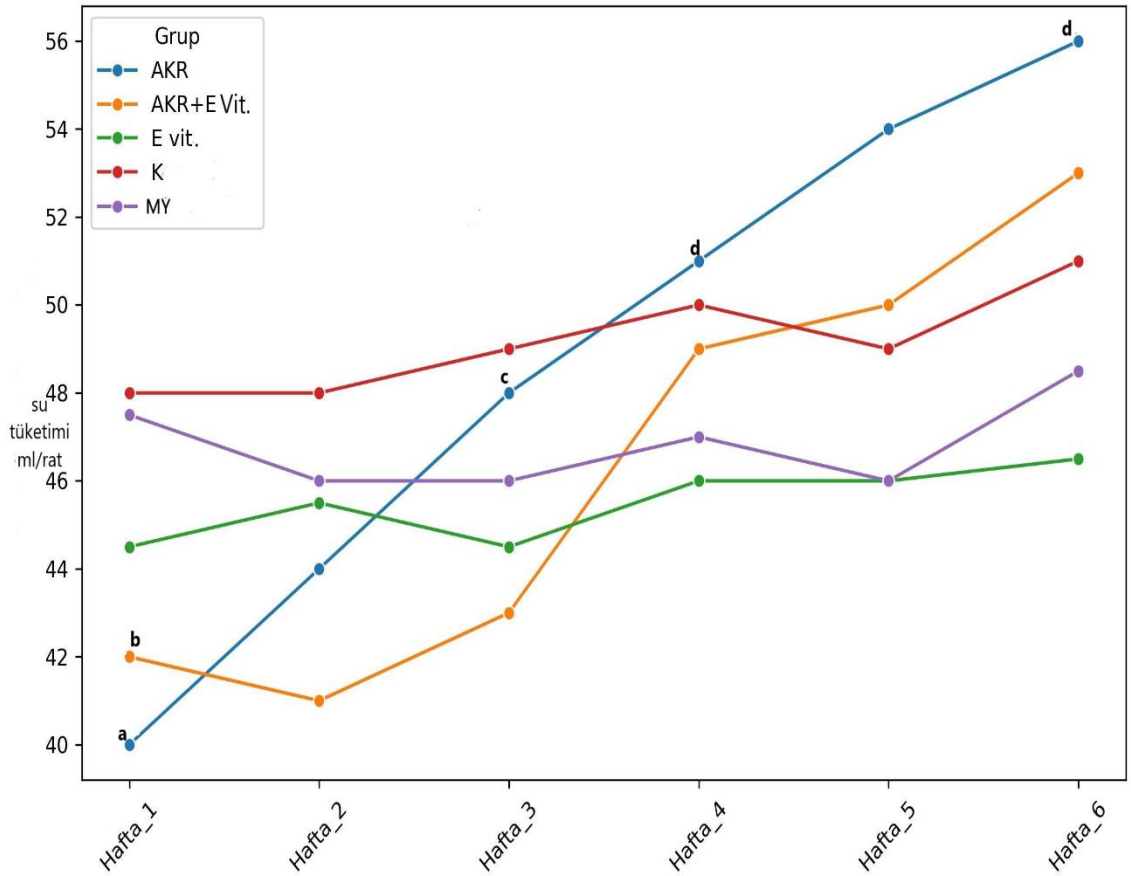
Değişkenler ortanca (çeyreklikler arası genişlik) şeklinde özetlendi.

K ve MY gruplarında su tüketimi nispeten sabit kaldı. Mısır yağının su tüketimi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı görülmektedir.

AKR grubunda su tüketimi başlangıçta 40 (6) gibi düşük bir seviyededir, ancak haftalar ilerledikçe 56 (16) seviyesine kadar arttığı gözlemlendi. Friedman testi sonucuna göre değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). Bu durum, toksik maddenin metabolik stres yaratarak su tüketimini artırdığını gösterebilir. Toksik etki, hayvanların su ihtiyacını artırmış olabilir.

AKR+E Vit. grubunda su tüketimi başlangıçta 42 (16) olarak başladı ve haftalar ilerledikçe 53 (11) seviyesine kadar yükseldi. Ancak artış AKR grubuna kıyasla daha dengeli görünmektedir. Friedman testi sonucuna göre değişim anlamlıdır ($p < 0.001$), ancak E vitamini toksik maddenin neden olduğu su tüketimindeki dalgalanmaları bir miktar dengelemiş olabilir. E vitamini verilen gruplarda (E Vit. ve AKR+E Vit.), su tüketimi nispeten daha dengeli kaldı. Özellikle E grubunda değişikliklerin anlamlı olmaması ($p = 0.321$), E vitamininin metabolik dengeyi koruyabildiğini göstermektedir.

Şekil 4.3' te haftalara göre gruplar arası günlük rat başına tüketilen su miktarındaki istatistiksel anlamlılık Kruskal-Wallis H ve post hoc Conover testleri ile değerlendirildi ($p < 0.05$). 1.hafta'da AKR ve AKR+E vit. grupları, K ve MY gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu. 3. hafta'da AKR grubu, MY, E vit. ve AKR+E vit. gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. 4. Hafta' da AKR grubu, E vit. grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. 6. hafta'da AKR grubu, E vit. grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.



- a:** AKR, K ve MY gruplarına göre farklıdır.
b: AKR+E vit. K ve MY gruplarına göre farklıdır
c: AKR grubu, MY, E vit. ve AKR+E vit. gruplarına göre farklıdır.
d: AKR grubu, E vit. grubuna göre farklıdır.

Şekil 4.3. Sıçan başına ortalama günlük su tüketimi (ml/ sıçan/ gün)

4.3. Grupların Kas ve Yağ Aromataz Proteinin Western-Blot Sonuçları

Grupların kas ve yağ dokularından ekstrakte edilen aromataz ve beta aktin proteinleri western-blot ile analiz edildi ve birbirine oranlanarak Tablo 4.4'teki sonuçlar elde edildi.

Analiz sonuçları, AKR'nin, visseral yağ dokusunda aromataz ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırdığı yönündedir ($p = 0.00396$). AKR grubu diğer bütün gruplara göre anlamlı olarak arttı (0.033). E vitamini grubu (0.017), kontrol grubuna (0.008) göre artmış bir ekspresyon gösterdi. Ancak bu artış AKR grubuna kıyasla daha düşüktür. AKR + E vitamini grubunda aromataz düzeyi (0.014) olarak ölçüldü ve kontrol seviyesine kısmen ulaştı.

AKR'nin, kas dokusunda da aromataz ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırdığı saptandı (p=0.01545). Değerler incelendiğinde, AKR (1.158) ve AKR + E (1.259) gruplarının kas aromataz ekspresyonunda en yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir. K (0.372) ve E vitamini (0.323) grupları AKR ve AKR+E Vit. gruplarına göre farklıdır. Aromataz ekspresyonunun AKR gruplarında anlamlı derecede arttığı tespit edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Visseral yağ ve Kas Aromataz/beta aktin protein oranları

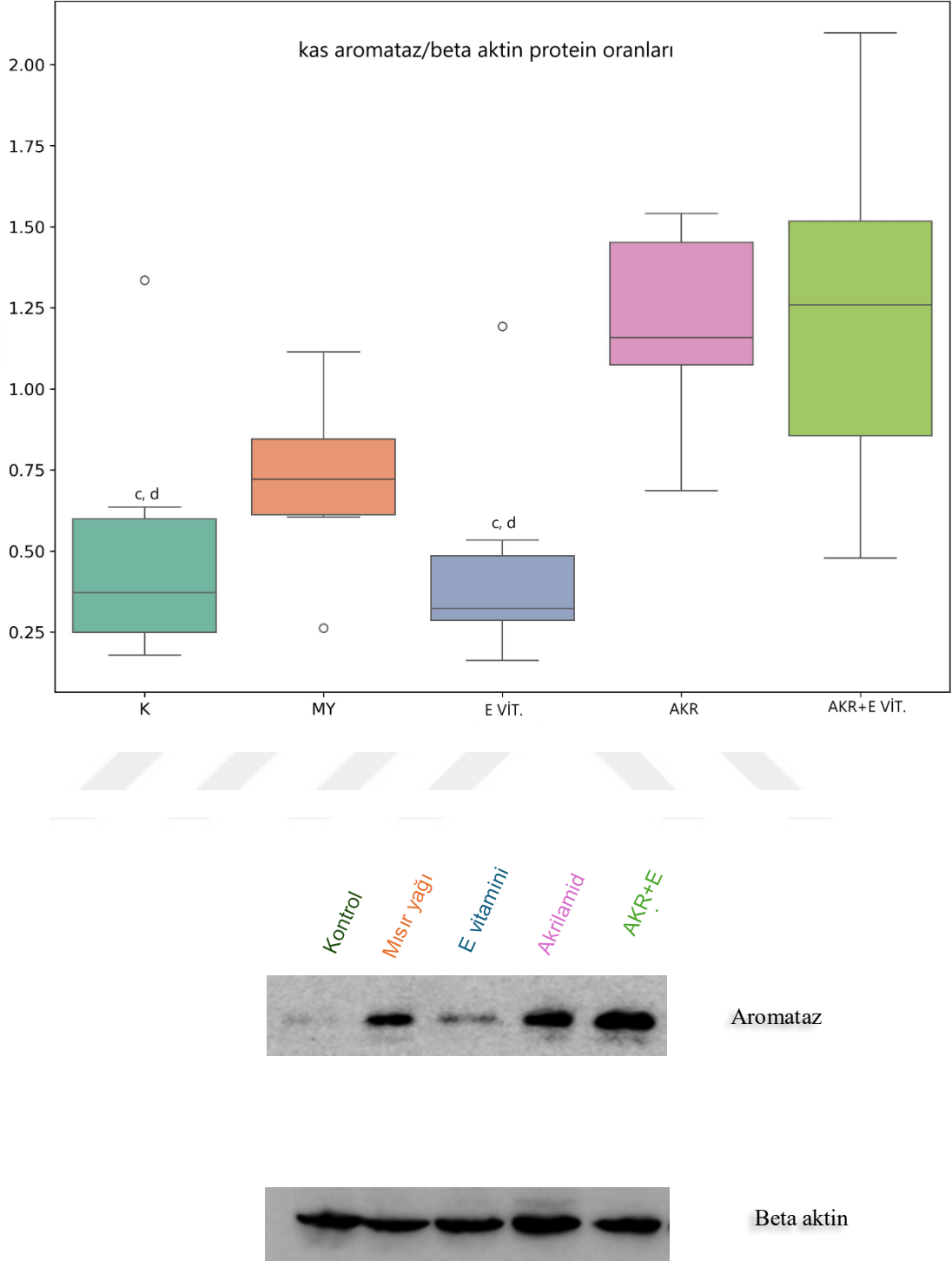
Grup	Visseral yağ aromataz*	Kas aromataz**	Test
K	0.008 (0.01)	0.372 (0.856) ^{cd}	Kruskal-Wallis H test
MY	0.013 (0.016)	0.721 (0.437)	
E Vit.	0.017(0.011) ^c	0.323 (0.449) ^{cd}	
AKR	0.033 (0.025) ^{abcd}	1.158 (0.579)	
AKR+Evit.	0.014 (0.012)	1.259 (1.018)	
p	0.00396	0.01545	

Değişkenler ortanca, (çeyreklikler arası genişlik) şeklinde özetlenmiştir.

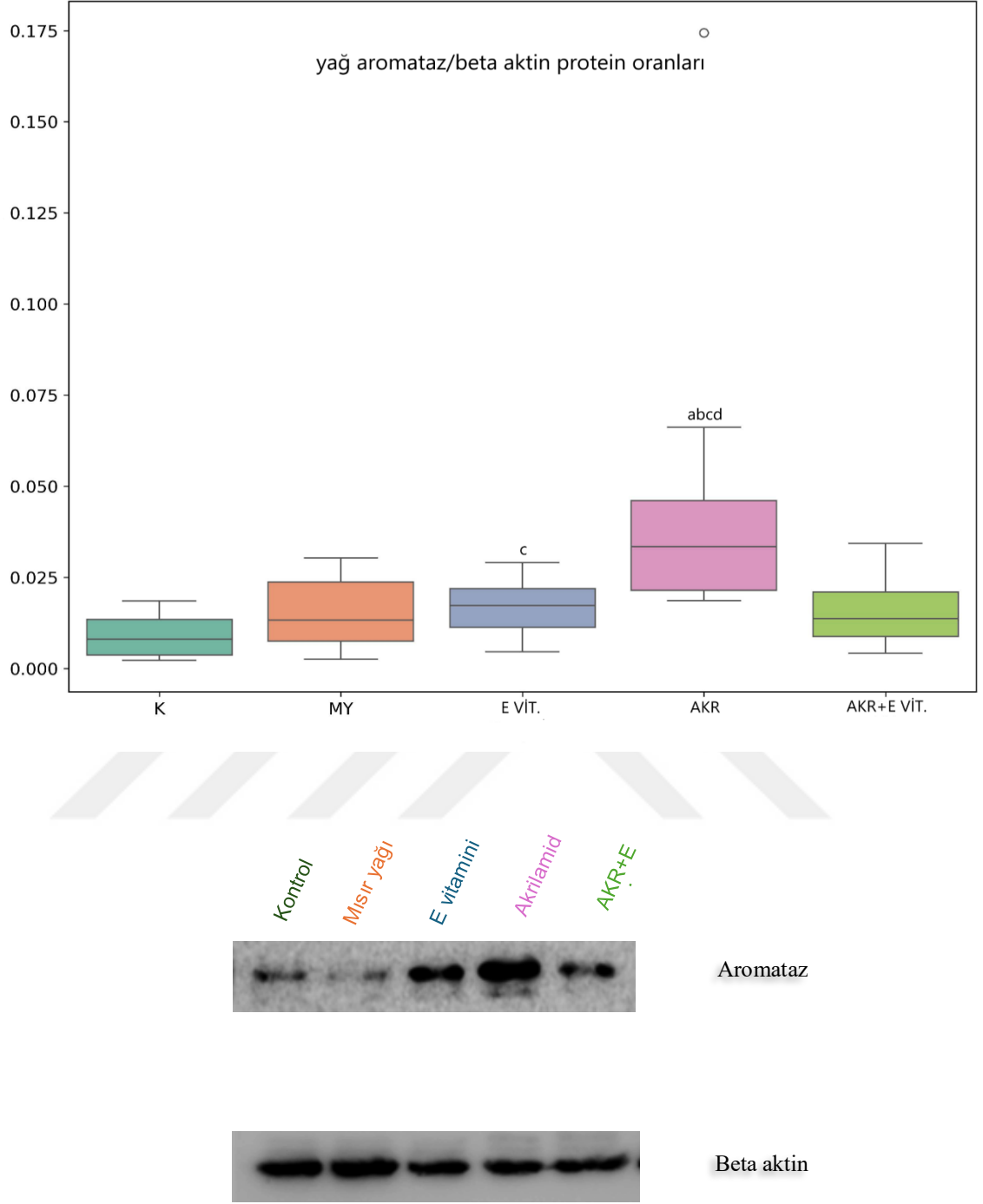
*: a: AKR+E vit. grubuna göre farklıdır, b: E vit. grubuna göre farklıdır, c: K grubuna göre farklıdır
d: MY grubuna göre farklıdır

** : a: MY grubuna göre farklıdır, b: E vit. grubuna göre farklıdır, c: AKR grubuna göre farklıdır,
d: AKR+E vit. grubuna göre farklıdır.

Grupların kas ve yağ doku aromataz ve beta aktin protein bandları Şekil 4.4. ve 4.5.'de verildi.



Şekil 4.4. Grupların kas aromatazına ait aromataz/beta aktin oranları ve protein bantları
($p=0.01545$)



Şekil 4.5. Grupların yağ aromatazına ait aromataz/beta aktin oranları ve protein bantları (p=0.00396)

4.4. Grupların Serum Testosteron, Östradiol, FSH ve LH Sonuçları

FSH düzeyleri arasında gruplar arasında anlamlı fark vardır (p<0.001). Kontrol grubu, mısır yağı (MY), E vitamini ve AKR gruplarına göre daha düşük FSH düzeyine

sahiptir. AKR grubu en yüksek FSH düzeyine sahip olup, bu artış AKR'nin toksik etkisinin bir göstergesi olabilir. AKR grubunda FSH düzeyinin artması, bu toksik maddenin hipofiz-gonad eksenini üzerindeki olumsuz etkisine işaret edebilir. AKR + E vitamini grubu FSH düzeylerinde bir miktar azalma gösterse de değerler hâlâ kontrol grubundan yüksektir. Bu, E vitamininin koruyucu etkisinin sınırlı da olsa var olduğunu düşündürmektedir.

LH düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Testosteron düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. AKR grubunda kontrol grubuna göre testosteron düzeylerinde bir düşme meydana geldi, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum, AKR'nin testosteron üretimini baskılayarak ya da aromataz aktivitesini artırarak testosteron→östradiol dönüşümünü uyardığını düşündürmektedir. AKR + E vitamini grubunda AKR grubuna göre, testosteron seviyelerinde bir artış meydana gelmedi. Bu durum, E vitamini uygulamasının AKR kaynaklı testosteron düzeylerindeki azalış üzerinde ciddi bir koruyucu etkisinin olmadığını göstermektedir.

Östradiol düzeylerinde de gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Ancak, AKR grubu, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek östradiol seviyesine sahiptir. Bu artış, AKR'nin hormonal denge üzerinde bozucu bir etki yarattığını gösteren bir bulgu olabilir. AKR + E vitamini grubunda, östradiol seviyeleri AKR grubuna yakın seyretmekte olup, bu durum, E vitamini uygulamasının AKR kaynaklı östradiol düzeylerindeki artış üzerinde ciddi bir koruyucu etkisinin olmadığını göstermektedir.

Genel olarak değerlendirmek gerekirse, AKR, özellikle FSH seviyelerini artırırken testosteron düzeylerini düşürdü, bu durum AKR'nin gonadal fonksiyonları kısmen etkileyebileceğini düşündürmektedir. LH ve östradiol düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunmamakla birlikte, AKR grubunda östradiol düzeylerinde gözlemlenen artışın AKR'nin hormon dengesini bozabileceğini göstermektedir.

E vitamini, AKR'nin neden olduğu FSH artışını bir miktar azalttı, ancak testosteron düzeylerindeki düşüşü tam olarak engelleyemedi. Bu sonuçlar, E vitamininin bir antioksidan olarak AKR'nin reprotoksik etkilerini tamamen önleyemese de kısmen azaltabileceğini göstermektedir. Gruplarda ölçülen serum FSH, LH, testosteron ve östradiol sonuçları Tablo 4.5.'de ve grafiksel gösterimi Şekil 4.6.'da verildi.

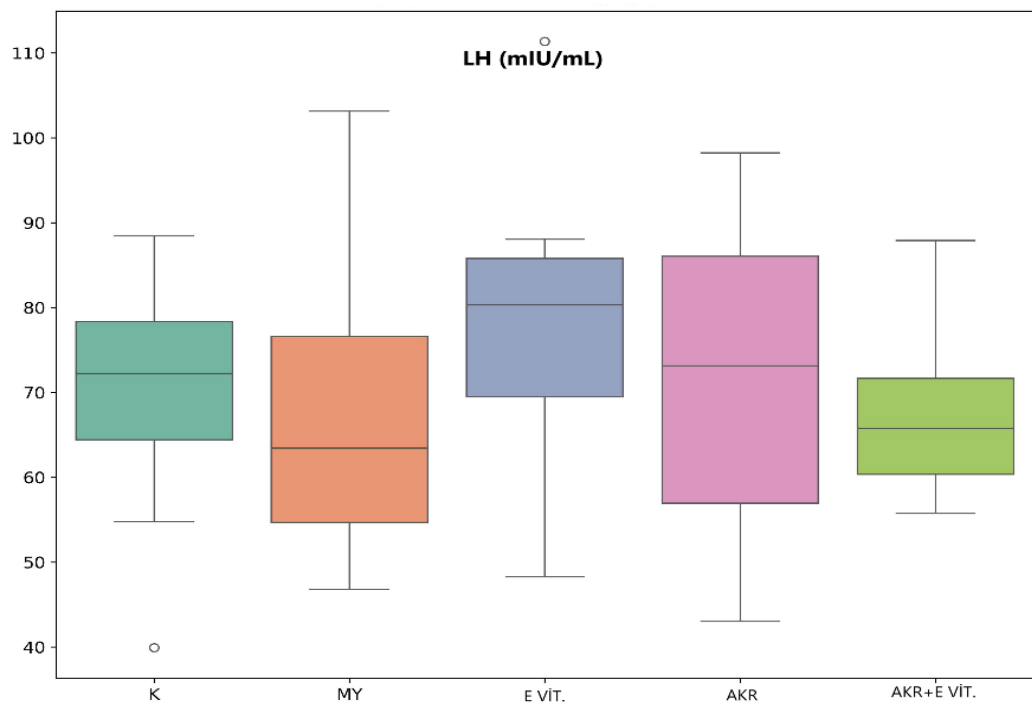
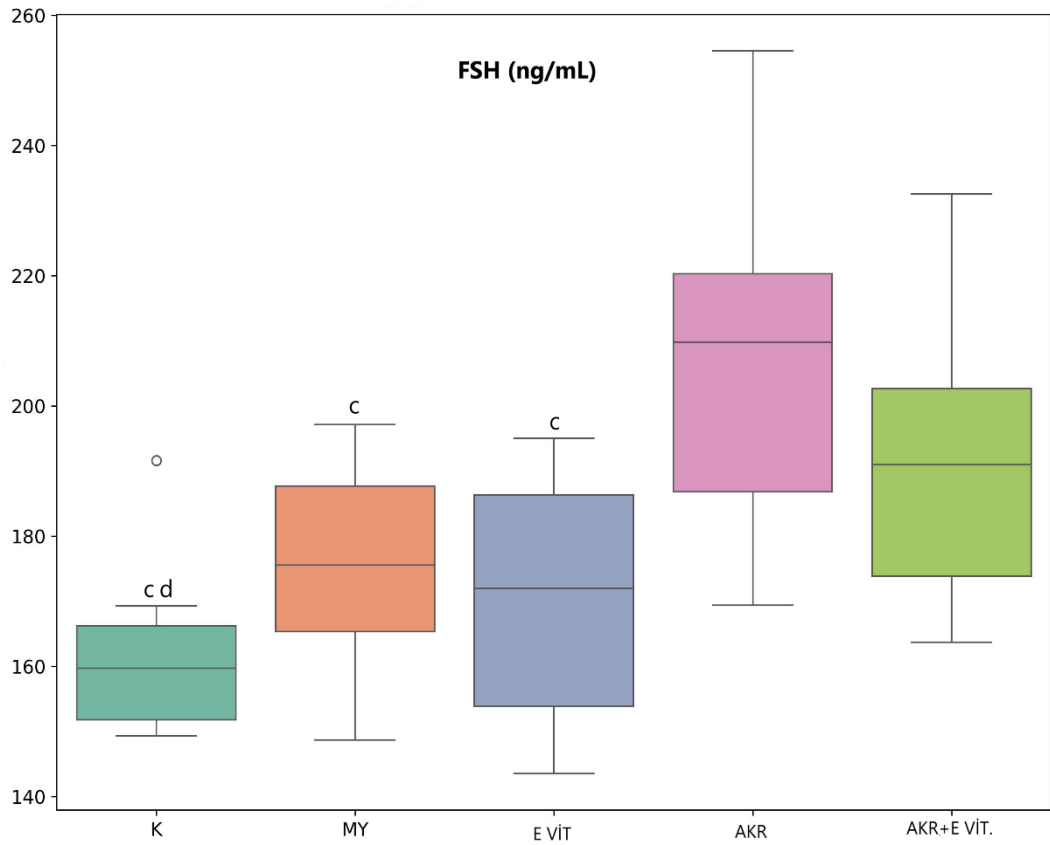
Tablo 4.5. Grupların Testosteron, Östradiol, FSH ve LH sonuçları

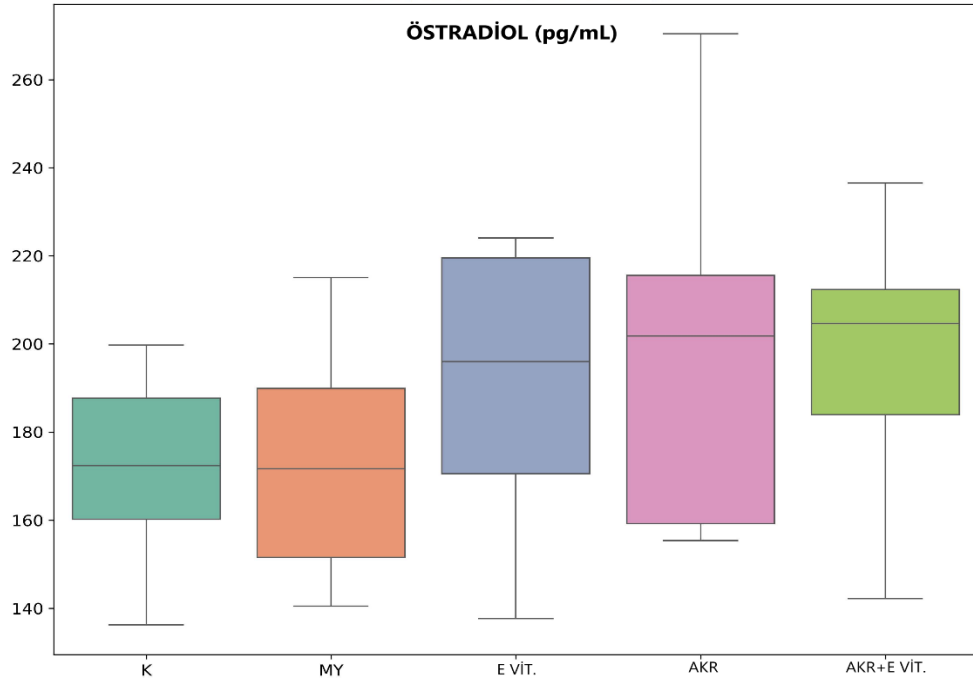
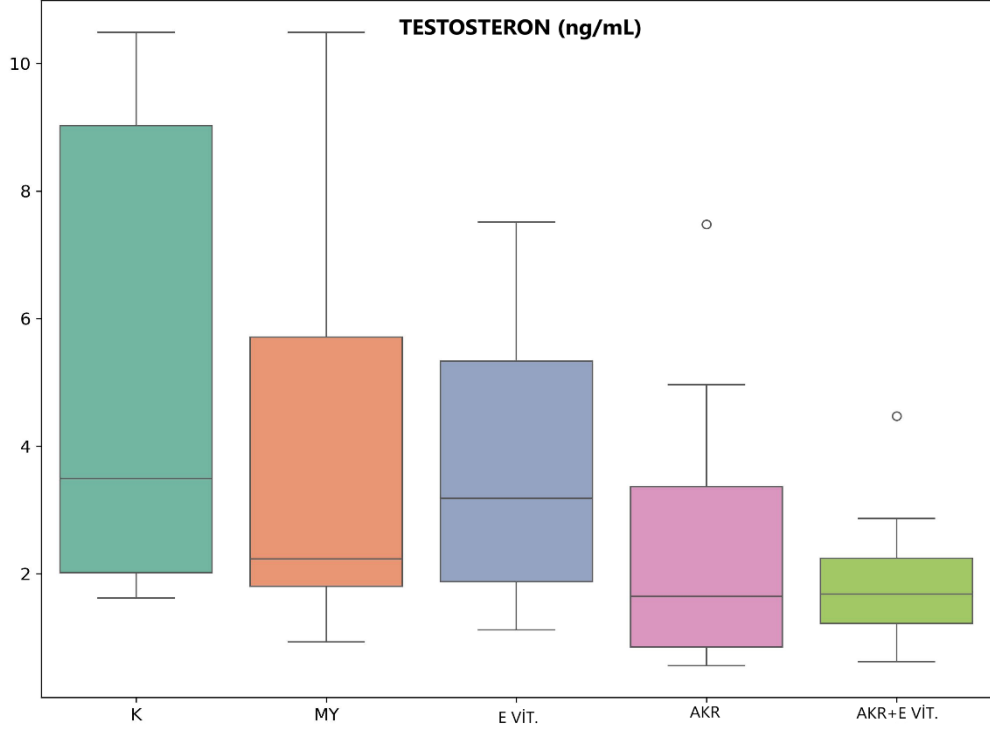
Grup	FSH (ng/mL) *	LH (mIU/mL) *	Testosteron (ng/mL) **	Östradiol (pg/mL) *
K	162.126 ± 14.2 ^{cd}	69.568 ± 15.897	3.488 (6.89)	172.01 ± 22.902
MY	174.774 ± 17.277 ^c	67.416 ± 18.516	2.229 (3.787)	174.434 ± 28.431
E Vit.	169.994 ± 19.272 ^c	78.644 ± 20.101	3.181 (3.455)	191.63 ± 30.785
AKR	205.9 ± 26.211	70.894 ± 18.418	1.641 (2.514)	197.493 ± 40.362
AKR+EVit.	191.319 ± 19.576	67.81 ± 10.135	1.68 (1.021)	196.367 ± 32.038
Test	Tek-yönlü ANOVA	Tek-yönlü ANOVA	Kruskal-Wallis H test	Tek-yönlü ANOVA
p	<0.001	0.67448	0.11139	0.3171

*: Değişkenler 'aritmetik ortalama ± standart sapma' şeklinde özetlendi.

** : Değişkenler 'ortanca, (çeyreklikler arası genişlik) şeklinde özetlendi.

FSH için; a: MY grubuna göre farklıdır, b: E vit. grubuna göre farklıdır, c: AKR grubuna göre farklıdır, d: AKR+E vit. grubuna göre farklıdır.





Şekil 4.6. Grupların FSH, LH, Testosteron, Östradiol sonuçlarının grafiksel gösterimi

5. TARTIŞMA

İnfertilite, 12 ay veya daha uzun süre düzenli korunmasız ilişkidenden sonra klinik bir gebeliğe ulaşılamaması olarak tanımlanan bir hastalıktır. Rapor edilen yaygınlık tahminleri farklı metodolojilere bağlı olarak büyük farklılıklar gösterse de küresel tahminler 48.5 ila 72.4 milyon çiftin infertiliteye sahip olduğunu göstermektedir. WHO'nun verilerine göre, dünya genelinde her altı kişiden biri (yaklaşık %17) yaşamları boyunca infertilite sorunu yaşamaktadır (70). Araştırmalar, erkeklerde infertilite vakalarının %20-30'unu tek başına oluşturduğunu ve çiftlerin %50'sinin infertilite sorunlarının erkeğe bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, çiftlerin yaklaşık %25'inde infertilite nedeni açıklanamamaktadır (idiopatik infertilite). Erkek infertilitesiyle ilişkili hastalıklar arasında obezite, hipogonadotropik hipogonadizm, üreme sistemi enfeksiyonları ve çeşitli sistemik rahatsızlıklar öne çıkmaktadır. Ayrıca, sağlıksız yaşam tarzı alışkanlıkları, özellikle sigara içme ve alkol tüketimi, erkek üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Çevresel faktörler (gıda, su, hava ile alınan toksik maddeler) de erkek üreme fonksiyonu üzerinde önemli rol oynamaktadır. Çevresel endokrin bozucular, testis hipoplazisi sendromu gibi üreme fonksiyonunu etkileyen durumlara neden olabilir ve üreme fonksiyonu hem doğrudan hem de epigenetik mekanizmalar aracılığıyla bozabilir. Bu etkiler, sperm, yumurta ve embriyolarda hasarlara neden olarak üreme fonksiyonunu bozabilir ve sonraki nesillerde uzun vadeli sorunlara yol açabilir (71, 72).

AKR, belirli sıcaklıklarda ya da UV ışığına maruz kaldığında poliakrilamide dönüşen bir polimerdir ve kozmetik ürünler, cilt kremleri, gıda ambalajları, kâğıt üretimi, metal işleme ve tekstil sektörü gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca gübrelerde, tütün ürünlerinde ve plastiklerde bulunabilir. Bir sigara dumanındaki toplam AKR miktarının yaklaşık 1 µg veya daha fazla olduğu tespit edilmiştir. AKR, vücuda cilt teması (örneğin kozmetikler), yutulma veya solunum (örneğin sigara dumanı yoluyla) gibi yollarla girebilir. Küçük moleküler yapısı ve hidrofilik özellikleri nedeniyle, teorik olarak tüm dokulara pasif bir şekilde nüfuz edebilir ve kanser gelişimini tetikleme potansiyeline sahiptir. Bunun yanı sıra, karbonhidrat ve amino asit içeren yiyecekler yüksek sıcaklıklarda işlenmeye maruz kaldığında da AKR oluşabilir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'ne (EFSA) göre, gıdalardaki AKR seviyeleri ürüne göre 30 µg/kg ile 4700 µg/kg arasında değişmektedir. Yüksek asparajin içeren ürünler, örneğin kuşkonmaz, kakao

çekirdekleri ve tahıllar, insanların AKR'ye maruz kalmasının başlıca kaynakları arasında yer almaktadır (4, 73-77).

AKR (ACR, CH₂=CH-CONH₂), insan sağlığına zararlı etkileri nedeniyle grup 2A kanserojen olarak sınıflandırılmış bir kimyasaldır. Bu madde, kâğıt, plastik, tütün ürünleri ve atık su arıtımı gibi alanlarda yaygın olarak kullanılır. İsveç Ulusal Gıda İdaresi, tahıl ürünleri ve patates gibi gıdaların 120 °C üzerindeki sıcaklıklarda pişirilmesi sırasında yüksek miktarda AKR oluşabildiğini rapor etmiştir. İnsanlar bu maddeye cilt teması, solunum veya sindirim yoluyla da maruz kalabilirler. Tüketildiğinde, AKR genellikle gastrointestinal sistemden emilir ve kan yoluyla vücut dokularına taşınır. Ayrıca glutatyon S-transferaz (GST) AKR glutatyonla konjuge ederek veya sitokrom P450 (CYP450) enzimi tarafından glisidamide dönüştürülerek metabolize edilir. AKR maruziyeti nörotoksisite, genotoksisite, kanserojenite, hepatotoksisite, immüntoksisite ve üreme toksisitesi ile ilişkilendirilmiştir (78).

AKR maruziyeti, özellikle nörotoksik etkileriyle dikkat çeker. Kas güçsüzlüğü, hareket bozuklukları (ataksi) ve merkezi veya periferik sinir sistemindeki akson hasarları bu etkiler arasında yer alır. AKR'nin kan-beyin bariyerini aşabildiği ve kan-testis bariyerine (BTB) kısa sürede ulaştığı tespit edilmiştir. Yüksek doz maruziyet (100-200 mg/kg) ölümcül olabilirken, düşük dozların uzun süreli etkileri nöropatiye yol açabilir. AKR, PI3K/AKT/mTOR yolu ve NF-κB (nükleer faktör kappa B) gibi inflamatuvar mekanizmalar üzerinden karaciğer ve böbrek toksisitesine neden olabilir. AKR'nin erkek üreme sistemi üzerinde, oksidatif stres yoluyla sperm sayısı, hareketliliği, morfolojisi ve kalitesini olumsuz etkilediği belirlenmiştir. AKR'nin hormonal etkileri değişkenlik göstermektedir. Araştırmalarda düşük doz AKR'nin testosteron seviyelerini artırdığı, ancak daha yüksek dozlarda hem testosteron hem de FSH ve LH gibi hormon seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir. Kadınlarda progesteron, östradiol ve FSH gibi hormonlarda dögüsel dalgalanmalar içeren değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir. AKR ve glisidamid, DNA hasarı, kromozomal anormallikler ve mikronükleus oluşumuna yol açabilir. Ancak, E vitamini gibi antioksidanların bu hasarları azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir. Antioksidanlar, oksidatif stresin neden olduğu hücresel zararları azaltarak sperm fonksiyonlarının korunmasına yardımcı olabilir (10, 14, 58, 79-84).

AKR'nin hayvan üreme sistemi üzerinde meydana getirdiği hasarlayıcı etkiler konusunda çok sayıda araştırma yapılmış ve elde edilen sonuçlar veri tabanlarında makale olarak yayımlanmıştır. Özellikle erkek sıçanlarda yapılan deneysel çalışmalarda, AKR'nin testiküler dokuda oksidatif stresin artışına, germ hücre hasarına, apoptotik

süreçlerin tetiklenmesine ve böylece spermatogenezde belirgin bozulmalara neden olduğu rapor edilmiştir. Bu durum, testislerin endokrin fonksiyonları yanında üreme potansiyelini de zayıflatmakta, sonuç olarak fertilité üzerinde olumsuz bir etki oluşturmaktadır. Bu süreçte, AKR'nin dokusal metabolizma ve sinyal iletim yollarına müdahale ederek aromataz gibi kilit enzimlerin gen ekspresyonu üzerinde dolaylı veya doğrudan etkilerde bulunulabilir. Böylece, testis, kas ve yağ dokusu arasındaki hormonal denge ve enzimatik aktivitelerin değişmesi, erkek üreme sağlığının yanı sıra genel metabolik homeostazı da etkileyebilmektedir. Özellikle son yıllarda artan deneysel veriler, AKR'nin hem endokrin sistem modülasyonuna hem de üreme hücrelerinin yapısal ve işlevsel bütünlüğüne zarar verdiğini göstermektedir (83, 85).

Aromataz, testosteronu östradiole ve androstenedionu östrona dönüştüren bir sitokrom P-450 enzimidir. Aromataz, kadın üreme sistemi ve yağ dokusunun yanı sıra testis, karaciğer ve beyin gibi diğer dokularda da bulunur. Aromataz, başlıca testislerin Leydig ve Sertoli hücrelerinde lokalizedir ve ayrıca germ hücre tümörlerinde de yoğun olarak bulunmaktadır (86).

Memeliler, kuşlar, amfibiler, sürüngenler ve balıklarda aromataz, birçok dokuda ifade edilir ve bu, yerel olarak üretilen östrojenlerin çeşitli organların ve süreçlerin farklılaşmasında, düzenlenmesinde ve üreme fonksiyonunun normal işleyişinde hayati bir rol oynadığını gösterir. Östradiolün yerel üretimini önemi, aromatazın dokuya özgü ifadesine yol açan evrimsel stratejilerle vurgulanmaktadır. Bu strateji, yerel sinyaller kullanarak alternatif promotorları zamanında ve hücreye özgü bir şekilde aktive eder. Bu, östrojen etkilerinin dolaşımdaki steroid konsantrasyonunu etkilemeden küçük bir hücre grubuna sınırlandırılmasını sağlar. Bu mekanizmalar olmadan, östradiolün kemik kütlelerinin korunması, sinir dokuyu koruması, sperm üretimi ve olgunlaşması, nöral plastisite ve adipogenez gibi birbirinden çok farklı süreçlerdeki rolü mümkün olamazdı. Bu sinyallerin anlaşılması büyük önem taşımaktadır çünkü bu, östrojen bağımlı bozuklukların tedavisi ve östrojenin dokuya özgü işlevlerinin iyileştirilmesi için paha biçilemez terapötik fırsatlar sunar. Örneğin, osteoblastlara özgü aromataz indükleyicilerinin geliştirilmesi, sistemik yan etkiler olmadan kemik kütlelerini artırmanın bir yolunu sağlayabilir. Benzer stratejiler, beyinde ve testislerde östrojen üretimini artırmak için kullanılabilir. Öte yandan, tümörlerde kullanılan aromataz promotorunun farmakolojik olarak inhibe edilmesi, östradiolün çoğalma etkisini sınırlamak ve tümör gerilemesini teşvik etmek için büyük fayda sağlayabilir; bu da steroidin normal dokulardaki fizyolojik fonksiyonunu etkilemez (39, 87).

Çalışmamızda, AKR uygulamasının erkek sıçanlarda hormonal dengenin yanı sıra kas ve yağ dokularındaki aromataz gen ekspresyonu üzerinde anlamlı etkiler yarattığı tespit edilmiştir. Visseral yağ ve kas dokularında aromataz gen ekspresyonu belirgin bir artış göstermiş, bu da AKR'nin testosteronun östrojenlere dönüşüm hızını artırarak hormonal dengesizliklere neden olabileceğini ortaya koymuştur. Bu değişiklik, özellikle hipofiz-gonadal eksenin işleyişi üzerinde bozucu etkilerle ilişkilendirilmiş ve FSH düzeylerinde artış ile testosteron seviyelerinde düşüş olarak yansımıştır. Bununla birlikte, LH ve östradiol düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiş, ancak AKR uygulamasının östradiol seviyelerinde bir artış eğilimi oluşturduğu dikkati çekmiştir. Bu sonuçlar, AKR'nin özellikle testosteron sentezini ve hormonal dengeyi etkileyerek üreme sağlığını olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir. E vitamini uygulaması, AKR'nin neden olduğu bu toksik etkileri kısmen hafifletmiştir. Visseral yağ dokusundaki aromataz ekspresyonu E vitamini ile bir miktar azalırken, testosteron seviyelerindeki düşüşün tamamen önlenemediği, ancak FSH düzeylerindeki artışın hafifletildiği gözlenmiştir. E vitamini, özellikle metabolik stres ve hormonal bozulma üzerinde dengeleyici bir rol oynamış, ancak bu etkiler toksik hasarı tamamen ortadan kaldırmaya yeterli olmamıştır. Bunun yanı sıra E vitamini yağda çözünen güçlü bir antioksidan olması sebebiyle, AKR sebebiyle yağ dokusunda tespit edilen aromataz ekspresyonundaki artışı önemli ölçüde geri çevirebilmiştir. Bu bulgular, AKR'nin yağ dokusunda daha belirgin toksik etkiler oluşturduğunu ve bu dokunun hormonal dengenin düzenlenmesindeki kritik rolünü vurgulamaktadır. Çalışmamız, AKR'nin endokrin üreme sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koyarken, E vitamininin koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir.

Erkek kemirgenlerde yüksek doz akut AKR maruziyeti, azalmış üreme performansı ve baskın ölümcüllükle sonuçlanmaktadır. Ancak, insan maruziyetini daha iyi yansıtan düşük dozda kronik maruziyetin üreme üzerindeki etkileri hala belirsizdir. İnsanların diyetle AKR tüketimi, vücut ağırlığı başına günde ortalama 1–4 µg olarak tahmin edilmektedir. Bu maruziyeti simüle etmek için, Katen ve ark. (88) erkek farelere, 6 ay boyunca içme suyu ile sürekli olarak AKR (1 µg/ml) vermiştir; bu, insan dozu olarak vücut ağırlığı başına günde 10.5 µg'ye eşdeğerdir. Bu maruziyet protokolü, spermatozoada DNA hasarını artırmıştır, ancak genel doğurganlıkta eş zamanlı bir azalmaya yol açmamıştır. Bununla birlikte, AKR'ye maruz kalan babaların erkek yavrularında, doğrudan toksik maddeye maruz kalmamalarına rağmen spermatozoada önemli ölçüde artmış DNA hasarı tespit edilmiştir. Ayrıca, AKR'ye maruz kalan farelerde

ve en önemlisi onların yavrularında, spermatozoidlerde CYP2E1 proteininin seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Bu önemlidir çünkü CYP2E1, AKR'nin zararlı bir metaboliti olan glisidamide dönüşümünden sorumlu olan tek enzimdir. Bu değişen ifade şeklinin epigenetik değişikliklerden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Ek olarak, F0 (ilk nesil) ve F1 (ikinci nesil) farelerin germ hücrelerinin DNA'sında oksidatif adductların arttığı gözlemlenmiştir; bunun, artmış CYP2E1 seviyelerinin bir yan ürünü olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu nedenle, erkek farelerin düşük doz kronik AKR maruziyeti, yavrular üzerinde sonuçlar doğurmakta ve insan popülasyonu üzerindeki AKR maruziyetinin etkileri ile çok nesilli maruziyetlerin birikmiş etkileri konusunda endişe yaratmaktadır.

AKR içeren gıdaların erkek üreme sistemi üzerindeki toksik etkileri giderek daha fazla araştırılmaktadır. Wang ve ark. (67) çalışmasında, 8 hafta oral yolla 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarda, AKR maruziyetinin erkek sıçanlarda testis gelişimi, sperm rezervleri ve testosteron düzeyleri üzerinde olumsuz etkilere yol açtığı gösterilmiştir. AKR uygulaması, germ hücrelerinde kayıplara, Leydig hücrelerinde hiperplaziye ve seminifer tübüllerde yapısal bozulmalara neden olmuştur. Ayrıca sperm rezervlerinde anlamlı azalmalar gözlenirken, bizim bulgularımızın aksine testosteron seviyelerinde artış kaydetmişlerdir. Yüksek testosteron seviyeleri, normal hormon geri besleme mekanizmasının bozulduğuna ve AKR'nin testis içi hücreler ile iletişimde aksamlara yol açtığına işaret etmektedir. Seminifer tübüllerde gözlenen yapısal bozukluklar, kan-testis bariyerinin bütünlüğünü zedeleyerek, sperm gelişimi için gerekli mikro çevrenin dengesini bozmaktadır. Tüm bu mekanizmalar, AKR'nin erkek fertilitesine olan olumsuz etkilerini birden fazla biyolojik yol üzerinden gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, AKR'nin yüksek sıcaklıklarda işlenmiş karbonhidrat içeren gıdalarla alımının erkek fertilitesi üzerindeki potansiyel risklerini vurgulamaktadır.

Yang ve ark. (89) erkek sıçanlara dört hafta boyunca sırasıyla 0, 5, 15, 30, 45 veya 60 mg / kg / gün dozlarında oral gavaj ile AKR uygulamıştır. Bu çalışmanın sonuçları, AKR uygulamasının erkek üreme sistemi üzerinde moleküler düzeyde toksik etkiler yarattığını göstermektedir. Testis dokularındaki gen ekspresyon profili değişiklikleri, AKR'nin sperm üretimi ve testis fonksiyonları üzerinde ciddi olumsuz etkiler yarattığını ortaya koymaktadır. AKR, morfolojik sperm kusurlarına ve kauda epididimiste azalmış sperm konsantrasyonuna neden olmuştur. Serum testosteron seviyesi ve Leydig hücre canlılığı da doza bağlı olarak azalmış ve bu da spermatogenezin azalmasına neden olmuştur. Seminifer tübüllerde AKR ile indüklenen çok çekirdekli dev hücrelerin oluşumu ve vakuolasyon gibi histopatolojik lezyonlar ve çok sayıda apoptotik hücre

izlenmiştir. cDNA mikroarray analizi, AKR uygulanan gruptan (60 mg / kg / gün) elde edilen testislerde testis fonksiyonları, apoptoz, hücrel redoks, hücre büyümesi, hücre döngüsü ve nükleik asit bağlanması ile ilgili genlerin yukarı / aşağı regüle olduğunu ortaya koydu. AKR toksisitesinin, Leydig hücre ölümünü arttırdığı ve gen ekspresyon seviyelerini bozduğu, sperm kusurlarına ve sıçan testisinde apoptoz dahil olmak üzere çeşitli anormal histopatolojik lezyonlara katkıda bulunduğu görülmektedir. Bu çalışmada serum testosteron seviyeleri 15 mg/kg/gün AKR dozunda dahil, bundan daha yüksek dozlarda da anlamlı olarak düşmeye başlamıştır. Bizim çalışmamızda buna paralel olarak 10 mg/kg/gün dozda AKR uygulamasında testosteron seviyelerinde genel bir düşme görülür fakat testosteron düzeyindeki bu düşüş istatistiki olarak anlamlı değildir. Gen ekspresyonu açısından çalışmamızda, AKR'nin visseral yağ ve kasta aromataz gen ekspresyonunu önemli derecede artırdığı ve bunun sonucunda da testosteronun östradiole dönüşümündeki hormonal dengenin bozulduğu ortaya konmuştur. Bu, FSH'nin anlamlı olarak artışına ve buna bağlı olarak testosteron seviyesinin düşüşü ile östradiolün de artışına neden olmuştur.

Mahmood ve ark. (90) yaptığı araştırmada 8 hafta boyunca sıçanlara 2, 10 ve 30 mg/kg AKR uygulanmış ve ovaryumda dozla orantısız olarak ovaryan folikül sayısında azalma, atretik folikül oluşumu ve ovaryumda küçülme görülmüştür. Saleh ve ark. (21) yaptığı çalışmada, düşük doz (0.4 µg/g, 60 ila 90 gün boyunca) AKR'nin oral yoldan uygulanmasının erkek ve dişi sıçanlarda üreme dokularında yapısal değişiklikler ve fonksiyon bozukluklarına neden olduğu rapor edilmiştir. AKR verilen erkek sıçanların testislerinde olgun sperm içeren seminifer tübüllerin sayısında azalma ve sperm germ hücre katmanlarında dejeneratif değişiklikler tespit edilmiştir. Dişi sıçanlarda ise AKR'nin, kistik yumurtalık değişikliklerine, zona pellucida, granüloza hücreleri ve oositlerde dejeneratif değişikliklere, implantasyon sonrası kayıplara, tam süreli fetüs sayısında azalmaya, rezorpsiyon bölgelerinde nekrotik fetal doku ve amniyotik hücrelerde vakuolizasyona sebebiyet verdiği tespit edilmiştir. Bu bulgular, AKR'nin hem erkek hem de dişi üreme sisteminde ciddi toksik etkilere neden olduğunu göstermektedir.

Ma ve ark. (91) yaptığı deneysel araştırmada, AKR uygulamasının süttten kesilmiş erkek sıçanların üreme sistemi üzerindeki toksikolojik etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu araştırmada, AKR'nin özellikle gelişmekte olan erkek sıçanlarda neden olduğu üreme toksisitesinin mekanizmaları araştırılmıştır. Bu çalışmada, annelerine çeşitli dozlarda (0, 5, 15 veya 30 mg / kg/gün) AKR uygulanan 3 haftalık süttten kesilen erkek Sprague-Dawley sıçan yavrularında, AKR'in üreme toksisitesine neden olduğu gözlenmiştir.

Sonuçlar, sütten kesilen erkek sıçanların gıda mevcudiyeti ve üreme organı indekslerinin azaldığını göstermiştir. Serumdaki FSH ve testosteron seviyeleri artarken, serumdaki LH azalmış olarak bulunmuştur. AKR uygulamasından sonra sütten kesilen sıçanlarda histopatolojik lezyonlar ve anormal spermiler gözlenmiştir. Araştırmacılar, bulgulara dayanarak, AKR'nin yetişkin erkek hayvanlarda meydana getirdiği reprotoksisiteden ziyade, sütten kesilen erkek sıçanlar veya insanlar üzerinde yapılacak AKR kaynaklı toksikolojik çalışmalara daha fazla yoğunlaşılması gerektiğine dikkat çekmişlerdir. Bizim çalışmamızda AKR grubunda serum testosteron değerleri düşük, FSH değerleri yüksek ve LH seviyelerinde ise herhangi bir değişme olmamıştır. Bu durum, sütten yeni kesilmiş erkek sıçanlar ile yetişkin erkek sıçanlar arasındaki cinsel olgunluğa ulaşma farkları, doz farklılıkları ile maruziyet süresine bağlanabilir.

Aldawood ve ark. (92) yaptığı bir çalışmada, gebelikte AKR uygulamasının nesiller arası yumurtalık fonksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deneylede, gebelik döneminde (6. günden doğuma kadar) Wistar albino sıçanlara 2.5, 10 ve 20 mg/kg/gün AKR uygulanmıştır. AKR'ye maruz kalan annelerin yavrularında (AF1), yumurtalıklarda histopatolojik değişiklikler, foliküllerde kist oluşumu, oosit vakuolizasyonu ve granüloza hücrelerinde pyknoz (yoğunlaşma) gibi bozukluklar tespit edilmiştir. Ayrıca, hücre ölümü (apoptoz) markırlarının düzeyinin önemli oranda arttığı gözlenmiştir. F1 dişi yavru farelerde östradiol ve IGF-1 seviyelerinde belirgin bir azalma kaydedilmiş ve bu durum CYP19A1 (Aromataz) gen ekspresyonunun ve protein seviyesinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. AKR'ye maruz kalan annelerin ikinci nesil yavrularında (AF2), erken yumurtalık yaşlanması belirtileri saptanmıştır. Östradiol, progesteron seviyeleri, CYP19A1 gen ekspresyonunun artışıyla birlikte yükselmiştir. Çalışma, AKR'nin nesiller arası üreme sağlığını olumsuz etkileyebileceğini ve bu etkilerin özellikle yumurtalık yaşlanmasını hızlandırabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca bu çalışma, endokrin bozucuların nesiller arası etkilerinde epigenetik mekanizmaların önemli bir rol oynayabileceğini öne sürmektedir. Özellikle, CYP19A1 gibi yumurtalık gelişimiyle ilişkili biyomarkırların, DNA metilasyon durumunun incelenmesi, gelecekteki araştırmalar için önemli bir odak noktası olarak belirtilmiştir. Ayrıca bu makale AKR'nin aromataz gen ekspresyonuna etkilerinin incelenmesinde ilk çalışmalardan biri olması açısından önemlidir. Bizim çalışmamızda da AKR'nin hormonal denge üzerindeki bozucu etkileri incelenmiş olup, Aldawood ve ark. ikinci nesil sıçanlarda ortaya çıkan gen ekspresyonundaki değişikliklere paralel şekilde bulgular ortaya konulmuştur. Aldawood ve ark. çalışması nesiller arası epigenetik etkileri

inceleyerek, AKR'nin uzun vadeli sonuçlarına dikkat çekmektedir. Bu iki çalışma birlikte değerlendirildiğinde, çevresel toksinlere karşı multidisipliner koruyucu stratejilerin geliştirilmesi gerekliliği açıkça görülmektedir.

Shipa ve ark. (93) *Petroselinum crispum* (maydanoz) metanolik ekstraktının erkek sıçanlarda AKR'nin neden olduğu üreme disfonksiyonu üzerindeki koruyucu etkilerini incelemiştir. 40 sıçan üzerinde yapılan çalışmada tedavi gruplarına 8 hafta boyunca 10 mg/kg AKR ve 100 mg/kg *P. crispum* özütü verilmiştir. NF- κ B, kinesin proteinleri ve steroidogenez yollarındaki etkiler, inflamasyon ve oksidatif stres incelenmiştir. AKR, testosteron seviyelerini düşürmüş, testislerde MDA seviyelerini artırmış, SOD aktivitesini azaltmış ve sperm parametrelerini bozmuştur. Ancak FSH ve LH seviyelerini etkilememiştir. Ayrıca AKR, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) seviyelerinde artışa, steroidogenez düzenleyen proteinlerin (STAR ve P450scc) seviyelerinde ise azalmaya yol açmıştır. Histopatolojik incelemeler de AKR'nin seminifer tübüller üzerinde olumsuz etkiler yarattığını göstermiştir. Ayrıca NF- κ B P65 ekspresyonunu artırmış, kinesin motor proteininin ekspresyonunu ise azaltmıştır. *P. crispum* özütü tedavisi, oksidatif stresin ve inflamatuvar yolların düzenlenmesine yardımcı olarak sperm parametrelerini iyileştirmiş ve gen ekspresyonlarını normalleştirmiştir. Ayrıca, testis histolojik parametrelerini iyileştirerek NF- κ B P65 ekspresyonunu ve kinesin seviyelerini normale döndürmüştür. Sonuç olarak, *P. crispum*, AKR kaynaklı üreme toksisitesine karşı koruyucu etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında gen ekspresyonu açısından AKR'nin farklı hedef dokularda bile olsa zararlı etkilerini kanıtlar niteliktedir. Bunun yanı sıra iki çalışmada da testosteron seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Buna karşın bizim çalışmada FSH düzeyini anlamlı bir şekilde yükselten AKR, Shipa ve ark. yaptığı çalışmada ise FSH düzeyi AKR uygulamasından etkilenmemiştir. Ancak iki çalışmada LH seviyelerinde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir.

AKR'nin testis dokusunda oluşturduğu hasar, özellikle spermatogenez ve hormon salgısı üzerinde belirgin değişimlere yol açmaktadır. Bu süreçte gonadotropinler arasında FSH, testiküler bozulmalara karşı daha duyarlı ve erken yanıt veren bir gösterge niteliği taşımaktadır. Literatürde, testis dokusunda oluşan yapısal ve fonksiyonel hasarların inhibin B salınımını azalttığı, böylece negatif geri bildirim mekanizmasının zayıflaması nedeniyle hipofiz bezinden FSH salınımının arttığı rapor edilmektedir (94). Özellikle AKR'nin neden olduğu oksidatif stres, germ hücre kaybı ve apoptotik süreçler, testiküler homeostazın bozulmasına ve dolayısıyla FSH düzeylerinin yükselmesine yol

açabilmektedir. Bu durum, FSH'nin testosteron gibi diğer hormon parametrelerine göre daha belirgin ve anlamlı bir değişim göstermesine zemin hazırlamaktadır. Dolayısıyla, çalışmamızda FSH düzeylerinde saptanan istatistiksel anlamlılık, AKR'nin üreme sistemine yönelik toksik etkilerinin erken ve hassas bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Nitekim yapılan diğer araştırmalar da testiküler hasarın ilk aşamalarında FSH seviyelerindeki artışın belirgin olduğunu ortaya koymakta, bu parametrenin AKR maruziyetinin üreme fonksiyonları üzerindeki olumsuz sonuçlarını yansıtmakta önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadır (95- 97).

Bhuiyan ve ark. (98) yaptığı araştırmada 50 erkek fareye 90 gün boyunca AKR, C vitamini ve 5-ASA (5-aminosalisilik asit) farklı dozlarda uygulanmıştır. AKR'ye maruz kalan erkek farelerde C vitamini ve 5-ASA'nın üreme sistemi üzerindeki koruyucu etkileri incelenmiştir. Bu çalışma, AKR'in erkek üreme sistemi üzerindeki toksik etkilerini azaltmada antioksidanların ve anti-inflamatuar ajanların potansiyelini değerlendirmiştir. Bu araştırmada, AKR'ye maruz kalan farelerde serum testosteron seviyesindeki düşüşün, AKR'nin hipotalamik-hipofiz-gonadal aks üzerindeki bozucu etkisinden veya AKR kaynaklı ROS üretimindeki artış yoluyla oksidatif strese ve oksidatif doku hasarından kaynaklanabileceğine işaret edilmiştir. Bununla birlikte, C vitamini ve 5-ASA'nın birlikte uygulanması ile testosteron seviyelerinin eski haline dönmesini sağlamıştır. C vitamini ve 5-ASA oksidatif stresi azaltmış, testis dokusundaki hücresel hasarı önlemiş ve sperm kalitesini iyileştirmiş ve anti-inflamatuar özellikleri sayesinde, AKR kaynaklı inflamasyonu baskılamıştır. Bizim çalışmamızda ise E vitamini, AKR'nin yağ dokusunda neden olduğu aromataz ekspresyonundaki artışı kısmen de olsa tedavi edebilmiştir. Bunun en önemli nedeni, E vitamininin yağda çözünen güçlü bir antioksidan olması olabilir.

Üremiş ve ark. (99) AKR'nin beyindeki miyelin gelişimi üzerindeki toksik etkilerini moleküler düzeyde incelemek ve E vitamininin bu zararlı etkiye karşı nöroprotektif (sinir koruyucu) etkisini araştırmayı amaçlamıştır. Araştırma, 40 gebe sıçanın 4 gruba ayrılmasıyla başlamış ve emzirme döneminden sonra her gruptan yavru sıçanlar (dişi ve erkek) ile devam edilmiştir. AKR uygulamasının ardından bilişsel fonksiyonu değerlendirmek için Su Labirenti testi uygulanmıştır. Miyelin yıkımı ve yeniden oluşumu seviyelerini değerlendirmek için MBP, MAG ve MOG proteinleri ve mRNA düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca, miyelin ve glial hücre dejenerasyonu immünohistokimya ve elektron mikroskobu analizi ile incelenmiştir. Sonuçlar, AKR uygulamasının miyelinle ilgili proteinlerin (MBP, MAG ve MOG) mRNA ve protein

seviyelerini azalttığını göstermiştir. Bu bulgular histopatolojik, immünohistokimyasal ve mikroskopik incelemelerle doğrulanmıştır. E vitamini uygulamasının ise AKR'nin bu olumsuz etkilerini iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Bu araştırma, AKR'nin gebelik, emzirme ve sonrasında miyelin yıkımına neden olarak miyelinle ilişkili nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca, E vitamininin AKR'nin neden olduğu toksisiteye karşı güçlü bir nöroprotektif vitamin olarak miyelinizasyonu desteklediği anlaşılmıştır. Ek olarak çalışmada dişi ve erkek yavruların haftalık canlı ağırlık, yem ve su tüketimleri değerlendirilmiştir. Hem dişi hem de erkek sıçanlarda en yüksek yem ve su tüketimi, vitamin E gruplarında gözlemlenmiştir. Dişi ve erkek sıçanlarda en düşük yem ve su tüketimi ise tüm haftalarda AKR grubunda tespit edildi. AKR + E vitamini grubunda, AKR grubuna kıyasla yem ve su tüketiminde artış gözlemlenmiştir.

Bizim çalışmamızda ise bu bulguların aksine su tüketiminde en yüksek artış hızı AKR grubunda bulunmuştur. Araştırmacılar AKR'nin sistemik toksisite, nörotoksisite ve kanserojenite potansiyelini vurgularken, oral yolla verilen AKR'nin uzun vadede organ hasarına neden olabileceğine dikkat çekmişlerdir. Akrilamidin bu özelliklerinden dolayı inflamatuvar yanıtın önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (10, 100, 101). Bu durum, toksik maruziyet sonucu oluşan vücuttaki metabolik yükün özellikle su-elektrolit dengesini bozarak metabolik stresin su tüketiminde artışa yol açabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda AKR'in sıçanlarda doku ve hormon düzeylerinde toksik etkiler yarattığı tespit edilmiştir. Visseral yağ ve kas dokularında, aromataz gen ekspresyonunun anlamlı ($p=0.003$) şekilde arttığı (0.033), E vitamini uygulamasının (0.014), kontrol seviyelerine (0.008) yaklaştırarak sınırlı bir iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, E vitamininin hormonal denge üzerinde koruyucu etkiler sağlayabileceğini ve AKR'nin zararlı etkilerini hafifletmedeki potansiyel rolünü göstermiştir. Ayrıca, hormonal dengenin korunmasında E vitamininin etkisini vurgulayarak, üreme sağlığını destekleyecek antioksidan stratejiler için yeni perspektifler sunmaktadır.

Birçok obezogen ve endokrin bozucunun, adiposit farklılaşmasını artırma ve obezite ile ilişkili hastalıklara olan etkileri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Örneğin, tipik bir çevresel hormon ve endokrin bozucu olan bisfenol A'nın (BPA), obeziteyi indükleyebildiği ve lipid birikimini artırabildiği bulunmuştur (102, 103). Endokrin bozucuların, vücut ağırlığının düzenlenmesinde etkili olduğu ve obezogenik özellikler taşıdığına dair kanıtlar artmaktadır. Bu kimyasallar arasında yer alan AKR, obezogenik etkileri üzerinde araştırmalar yapılan önemli bir bileşiktir (104). AKR, bazı hormonların

normal aktivitelerini bozduğu için bir endokrin bozucu olarak sınıflandırılmıştır (105). Bizde bulgularımıza dayanarak üreme sisteminin kilit enzimlerinden olan aromataz aktivitesini yukarı yönde regüle ederek endokrin sistemi bozduğuna dair kanıtlar elde ettik. Birçok çalışma, fast food ve abur cubur gıdalardan kaynaklanan AKR'nin fetüsler ve küçük çocuklar için ölümcül olabileceğini, ayrıca AKR ile beslenen sıçanların serumunda glukoz, kolesterol ve trigliserid seviyelerinin arttığı rapor etmiştir (106, 107). Ayrıca, AKR'nin kansere neden olabileceği ve sinir sistemini bozabileceği bilinmektedir (108, 109). Ancak, AKR'nin obezite üzerindeki etkisi ve etki mekanizması henüz çözülememiştir. Lee ve Pyo (110) yaptığı çalışmada, AKR'nin adipogenez üzerindeki etkileri araştırılmış ve AKR'nin obeziteyi teşvik eden adiposit farklılaşmasını artırdığı tespit edilmiştir. Çalışmada, AKR'nin lipit damlacıklarının birikimini artırdığı ve adipogenik transkripsiyon faktörleri olan PPAR γ , C/EBP α ve C/EBP β 'nin ekspresyonunu yukarı yönde düzenlediği gösterilmiştir. Ayrıca, AMPK-ACC yolunu baskımlarken, MAPK sinyal yolunu aktive ederek lipit metabolizması ve adiposit farklılaşması süreçlerini etkilediği bildirilmiştir. Bu bulgular, AKR'nin çevresel bir endokrin bozucu ve obezojen olarak etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda, AKR'nin sıçanlarda visseral yağ ve kas dokusunda aromataz gen ekspresyonunu artırarak testosteron seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir. Lee ve Pyo'nun çalışmasında obeziteye neden olan mekanizmalar arasında adipogenik transkripsiyon faktörlerinin düzeyinde artış ve lipit metabolizmasının bozulması ön plandayken, bizim çalışmamızda gen ifadesindeki olumsuz etkilerden kaynaklı hormonal dengenin bozulması ve bunun üreme sağlığı üzerindeki etkilerinin ortaya konulması ön planda tutulmuştur. Bununla birlikte, her iki çalışmada AKR'nin hedef dokularda belirgin hasarlar oluşturabileceği ve oksidatif stresi artırarak hormonal etki mekanizmalarını bozabileceği sonucuna varmıştır.

Üremiş ve ark. 2. araştırmasında (5), AKR'nin üreme sistemi üzerindeki toksik etkileri ve E vitamininin bu etkileri azaltmadaki rolünü incelemiştir. Çalışma, AKR'nin testis dokusunda aromataz gen ekspresyonunu artırarak testosteron seviyelerinde düşüşe ve oksidatif strese neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, sperm parametrelerinde bozulmalar, testis ve epididim ağırlıklarında azalma gibi reproduktif toksisite göstergeleri tespit edilmiştir. E vitamini ise AKR'nin neden olduğu bu olumsuz etkileri önemli ölçüde hafifletmiş, sperm morfolojisini iyileştirmiş ve hormonal dengeyi restore etmiştir. Bizim çalışmamızda, bu çalışmayla uyumlu olarak, AKR'nin sıçanların visseral yağ ve kas dokularında aromataz gen ekspresyonunu artırdığı ve testosteron seviyelerinde belirgin bir düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Her iki çalışmanın sonuçları, AKR'nin aromataz

gen ekspresyonunu artırarak testosteronun östrojene dönüşümünü hızlandırdığı ve hormonal dengesizliklere neden olduğunu göstermektedir. Ancak, Üremiş ve ark. çalışması, testis dokusuna odaklanarak bu mekanizmanın sperm parametreleri ve testiküler histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkilerini detaylı bir şekilde ortaya koymuştur. Her iki çalışmadan çıkan sonuç AKR'nin, aromataz gen ekspresyonunu testis, karaciğer, yağ ve kas dokularında anlamlı derecede arttırıp, üreme sistemine kesin olarak zarar verdiğini kanıtlamıştır. Ayrıca Üremiş ve ark.nın araştırması, AKR'nin aromataz gen ekspresyonu üzerindeki muhtemel etkilerini araştırmak üzere yapılan ilk araştırma ve yayımlanan ilk makale olmuştur.

Erdemli ve ark. (64) yürüttüğü bir çalışmada, 30 gebe rata 8 hafta boyunca 10 mg/kg/ gün AKR, 100 mg/kg/gün E vitamini uygulanmıştır. Amaç, hamilelik sırasında AKR maruziyetinin erkek yavruların testisleri üzerindeki olumsuz etkilerini değerlendirmek ve bu etkilerin E vitamini kullanılarak önlenip önlenemeyeceğini araştırmaktır. Annelerine AKR uygulanmış 8 haftalık yavru sıçanlardan elde edilen veriler, AKR uygulanan grupta diğer gruplara kıyasla MDA, TOS ve E2 seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış, GSH, TAS, SOD, CAT, NO, testosteron, progesteron, FSH ve LH seviyelerinde ise istatistiki olarak anlamlı bir azalma olduğunu göstermiştir. Ancak, Vitamin E uygulanan grubun testis dokularında, kontrol grubuna kıyasla GSH, SOD, CAT, TAS, NO, testosteron, progesteron, FSH ve LH seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. AKR grubunda artan MDA, TOS ve E2 seviyelerinin AKR + E grubunda daha düşük olduğu ve AKR grubunda azalan SOD, CAT, GSH, TAS, testosteron, progesteron, FSH ve LH seviyelerinin AKR + E grubunda daha yüksek olduğu, kontrol grubuna yakın değerlere ulaştığı bulunmuştur. Sonuç olarak, AKR'nin toksik etkilerinin, özellikle üreme sisteminde oksidatif stres ve hücrel hasar yoluyla ortaya çıktığı vurgulanmıştır. Bu sonuçlara paralel olarak bizde AKR'nin gen ekspresyonunu etkileyerek üreme sistemi hormonlarının düzeyini ve dengesini bozduğu sonucuna ulaştık. Buna karşın bizim araştırmamızda AKR uygulanan grupta, FSH seviyeleri anlamlı olarak artarken, Erdemli ve ark. Çalışmasında ise FSH düzeyi düşük bulunmuştur. Testosteron seviyelerinin ise her iki çalışmada da azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca güçlü bir antioksidan olan E vitamininin AKR kaynaklı oksidatif stres üzerinde azaltıcı etki gösterdiği vurgulanmıştır. İki çalışmada da E vitamininin AKR kaynaklı hasarı kısmen önleyebildiğini gösterilmiştir. Bunun nedeni, E vitamininin serbest radikalleri etkisiz hale getirebilme yeteneğidir. Ancak E vitamininin koruyucu etkisinin sınırlı olması nedeni ile AKR kaynaklı hasarlar tam olarak giderilemez, bu nedenle AKR

kaynaklı hasarları tamamen önleyebilecek ve tedavi edebilecek yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır.

Bu çalışmanın birkaç önemli sınırlılığı bulunmaktadır. Öncelikle, araştırma yalnızca erişkin erkek Sprague-Dawley ratlar üzerinde yürütülmüş olup, elde edilen sonuçların insan fizyolojisine doğrudan genellenmesi güçtür. Bu durum, türler arası fizyolojik farklar ve metabolik parametrelerin farklılık göstermesi nedeniyle, verilerin klinik uygulamalara aktarılmasında temkinli yaklaşılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, çalışmada belirli bir doz ve süre boyunca AKR ve E vitamini uygulamaları incelenmiş olup, farklı dozların, maruziyet sürelerinin veya diğer besinsel/diyet faktörlerinin etkileri kapsam dışında bırakılmıştır. Ayrıca, elde edilen bulgular endokrin sistemin gen ekspresyonu ve hormon düzeyleri ile ilgili temel veriler sunmakla birlikte, AKR'nin aromataz gen ekspresyonunu hangi spesifik hücresel mekanizmalar aracılığıyla etkilediğini tam olarak aydınlatmamaktadır. Örneğin, nöral, immün veya vasküler sistemle etkileşimler ya da hücre içi sinyal yollarının detaylı incelenmesi bu çalışma kapsamında mümkün olmamıştır. Bu faktörlerin ötesinde, deneysel koşulların kontrollü laboratuvar ortamında sağlanmış olması, çevresel ve davranışsal değişkenlerin etkilerinin araştırılması açısından kısıtlılıklar doğurmaktadır. Son olarak, çalışma popülasyonunun nispeten sınırlı sayıda denekle yürütülmüş olması, istatistiksel güç ve etki büyüklüklerinin daha geniş kapsamlı genellemeler yapılmasını sınırlandırmaktadır. Bu sınırlılıkların farkında olarak, gelecekte daha geniş örneklem grupları, farklı doz ve süre uygulamaları, çok yönlü biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik analizler, insan verileriyle karşılaştırma ve uzun dönem takip çalışmalarıyla elde edilen sonuçların daha kapsamlı bir temelde yorumlanması hedeflenmelidir. Böylelikle, bu çalışmadan elde edilen bulguların translasyonel değeri artacak, AKR'nin endokrin sistem üzerindeki etkilerinin daha bütüncül bir yaklaşımla anlaşılması sağlanabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, yetişkin erkek sıçanlarda uzun süreli AKR maruziyetinin üreme endokrin dengesi ve aromataz gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini detaylı biçimde ortaya koymuştur. Araştırma bulguları, AKR'nin visseral yağ ve kas dokularında aromataz gen ekspresyonunu belirgin biçimde artırdığını, bu artışın da serum testosteron seviyelerinde azalmaya, FSH düzeylerinde ise artışa neden olabileceğini göstermektedir. Bu durum, AKR'nin üreme ekseninde kritik bir yere sahip olan hormonların üretim, salgılanma ve metabolizma süreçlerini olumsuz yönde etkilediğini, dolayısıyla erkek üreme fizyolojisine yönelik potansiyel bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Araştırmamızın sonuçları, AKR uygulamasının yağ ve kas dokularında aromataz gen ekspresyonunu arttırarak erkek üreme hormonlarının sentezini ve dengesini, üreme sağlığını olumsuz yönde etkileyebileceğini, E vitamininin ise bu süreçte sınırlı bir iyileştirici etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, çevresel ve besinsel yoldan alınan AKR'nin olası endokrin bozucu etkilerinin kapsamlı bir biçimde değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Aynı zamanda araştırmamızın sonuçları gerek deneysel tasarımın genişletilmesi gerek insan verileriyle korelasyon kurulması gerekse farklı doz, süre ve beslenme alışkanlıklarının incelenmesiyle daha zengin bir veri tabanı oluşturmayı teşvik etmektedir. Bizim bu araştırmamız, AKR'nin erkek üreme fizyolojisi üzerindeki olası bozucu etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesine, olası etkili koruyucu ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesine ve gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalara zemin hazırlamıştır. Bu konuda yapılacak olan daha kapsamlı araştırmaların sonuçlarının, AKR'nin üreme sağlığı üzerindeki potansiyel toksik etki ve tehditlerinin mekanizma/meکانizmalarının daha iyi anlaşılmasını, etkili koruyucu ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesini ve insan sağlığına yönelik politikaların oluşturulmasını sağlayabileceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Yıldızbayrak N. Akrilamidin TM3 leydig hücrelerinde steroidogenik genlerin ifade düzeyine etkisi [Yüksek Lisans Tezi], İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2015.
2. Rochira V, Carani C. Aromatase deficiency in men: a clinical perspective. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(10):559-68.
3. Gennari L, Merlotti D, Nuti R. Aromatase activity and bone loss. *Adv Clin Chem.* 2011;54:129-64.
4. Arafah M, Aldawood N, Alrezaki A, Nahdi S, Alwasel S, Mansour L, et al. Prenatal exposure to acrylamide differently affected the sex ratio, aromatase and apoptosis in female adult offspring of two subsequent generations. *Physiol Res.* 2023;72(1):59-69.
5. Üremiş MM, Gültekin S, Üremiş N, Şafak T, Çiğremiş Y, Gül M, et al. Protective role of vitamin E against acrylamide-induced testicular toxicity from pregnancy to adulthood: insights into oxidative stress and aromatase regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2024;397(2):829-41.
6. Koszucka A, Nowak A, Nowak I, Motyl I. Acrylamide in human diet, its metabolism, toxicity, inactivation and the associated European Union legal regulations in food industry. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020;60(10):1677-92.
7. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Acrylamide: A cooking carcinogen? *Chem Res Toxicol.* 2000;13(6):517-22.
8. Yıldız O, Şahin H, Kara M, Aliyazıcıoğlu R, Tarhan Ö, Kolaylı S. Maillard reaksiyonları ve reaksiyon ürünlerinin gıdalardaki önemi. *Akademik Gıda.* 2010;8(6):44-51.
9. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature.* 2002;419(6906):448-9.
10. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on acrylamide in food. *Efsa Journal.* 2015; 13(6): 4104.
11. National Toxicology Program (NTP). NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of acrylamide (CAS No. 79-06-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed and drinking water studies). U.S. Department of Health and Human Services; 2012; 12-5917.

12. Hagmar L, Törnqvist M, Nordander C, Rosén I, Bruze M, Kautiainen A, et al. Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand J Work Environ Health*. 2001;219-26.
13. Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S, Groopman J. Dietary acrylamide and human cancer: a systematic review of literature. *Nutr Cancer*. 2014;66(5):774-90.
14. LoPachin RM. The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2004;25:617–30.
15. Besaratinia A, Pfeifer G.P. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(13):1023-9.
16. Baum M, Fauth E, Fritzen S, Herrmann A, Mertes P, Merz K, et al. Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutat Res*. 2005;580(1-2):61-9.
17. European Food Safety Authority (EFSA), Benford D, Bignami M, Chipman JK, Ramos Bordajandi L. Assessment of the genotoxicity of acrylamide. *EFSA J*. 2022;20(5): e07293.
18. Koyama N, Yasui M, Oda Y, Suzuki S, Satoh T, Suzuki T, et al. Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ Mol Mutagen*. 2011; 52:11-19.
19. Blasiak J, Gloc E, Wozniak K, Czechowska A. Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *Chem Biol Interact*. 2004;149(2-3):137-149.
20. Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han CH, Lee MH. Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *J Vet Sci*. 2005;6(2):103-9.
21. ALKarim S, ElAssouli S, Ali S, Ayuob N, ElAssouli Z. Effects of low dose acrylamide on the rat reproductive organs structure, fertility and gene integrity. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2015;4(3):179-187.
22. Ahmed MM, Hammad AA, Orabi SH, Elbaz HT, Elweza AE, Tahoun EA, et al. Reproductive injury in male rats from acrylamide toxicity and potential protection by earthworm methanolic extract. *Animals (Basel)*. 2022;12(13):1723.
23. Yousef MI, El-Demerdash FM. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*. 2006;219(1-3):133-141.
24. Catalgol B, Özhan G, Alpertunga B. Acrylamide-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Hum Exp Toxicol*. 2009;28(10):611-7.

25. Acaroz U, Ince S, Arslan-Acaroz D, Gurler Z, Kucukkurt I, Demirel H, et al. The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food Chem Toxicol.* 2018;118:745-752.
26. Huang M, Jiao J, Wang J, Xia Z, Zhang Y. Characterization of acrylamide-induced oxidative stress and cardiovascular toxicity in zebrafish embryos. *J Hazard Mater.* 2018;347:451-60.
27. Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Şehirli AÖ, Demiralp E, Şener G, Omurtag GZ. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep.* 2012; 39:4589-96.
28. Tozan-Beceran A, Şehirli A, Eksioğlu-Demiralp E, Şener G, Omurtag G. Melatonin protects against acrylamide induced oxidative tissue damage in rats. *Marmara Pharmaceutical Journal.* 2012;16(3):213-21.
29. Wei Q, Li J, Li X, Zhang L, Shi F. Reproductive toxicity in acrylamide-treated female mice. *Reprod Toxicol.* 2014; 46:121-8.
30. Rahbardar MG, Farmad HC, Hosseinzadeh H, Mehri S. Protective effects of selenium on acrylamide-induced neurotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2021;24(8):1041-9.
31. Stošić M, Matavulj M, Marković J. Effects of subchronic acrylamide treatment on the endocrine pancreas of juvenile male Wistar rats. *Biotech Histochem.* 2018; 93(2):89–98.
32. Ünlügenç AT. Sağlık & Bilim 2023: Beslenme-III, 1. Baskı. İstanbul, Efe Akademi Yayınları, 2023:93.
33. Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod.* 2018;99(1):101-11.
34. Chung JY, Brown S, Chen H, Liu J, Papadopoulos V, Zirkin B. Effects of pharmacologically induced leydig cell testosterone production on intratesticular testosterone and spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2020;102(2):489-98.
35. Bulun SE. Aromatase and estrogen receptor alfa deficiency. *Fertil Steril.* 2014;101(2):323-9.
36. Cooke PS, Nanjappa MK, Ko C, Prins GS, Hess RA. Estrogens in male physiology. *Physiol Rev.* 2017; 97(3):995-1043.
37. Handa RJ, Weiser MJ. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Front Neuroendocrinol.* 2014;35(2):197-220.

38. Acconcia F, Marino M. Steroid hormones: synthesis, secretion, and transport. *Principles of Endocrinology and Hormone Action*. 2018;1-31.
39. Stocco C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids*. 2012;77(1-2):27-35.
40. Longcope C, Pratt JH, Stephen HS, Fineberg SE. Aromatization of androgens by muscle and adipose tissue in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978;46(1):146-52.
41. Simpson ER. "Sources of estrogen and their importance." *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;86(3-5):225-30.
42. Haverfield JT, Ham S, Brown KA, Simpson ER, Meachem SJ. Teasing out the role of aromatase in the healthy and diseased testis. *Spermatogenesis*. 2011;1(3):240-9.
43. Korani M. Aromatase inhibitors in male: A literature review. *Medicina Clínica Práctica*. 2023;6(1):100356.
44. Sayyad NB, Sabale PM, Umare MD, Bajaj KK. Aromatase inhibitors: development and current perspectives. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2022;56.311-20.
45. Gregoriou O, Bakas P, Grigoriadis C, Creatsa M, Hassiakos D, Creatsas G. Changes in hormonal profile and seminal parameters with use of aromatase inhibitors in management of infertile men with low testosterone to estradiol ratios. *Fertil Steril*. 2012;98(1):48-51
46. Chin KY, Ima-Nirwana S. Sex steroids and bone health status in men. *Int J Endocrinol*. 2012;(1):208719.
47. Tahmasbpour E, Balasubramanian D, Agarwal AA. Multi-faceted approach to understanding male infertility: Gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31:1115-37.
48. Hayes FJ, DeCruz S, Seminara SB, Boepple PA, Crowley WF Jr. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(1), 53-8
49. Raman JD, Schlegel PN. "Aromatase inhibitors for male infertility." *J Urol*. 2002;167(1):624-9.
50. Akça KT, Demirel MA, Süntar I. The role of aromatase enzyme in hormone related diseases and plant-based aromatase inhibitors as therapeutic regimens. *Curr Top Med Chem*. 2022;22(3):229-46.

51. Del Giudice F, Busetto GM, De Berardinis E, Sperduti I, Ferro M, Maggi M, et al. A systematic review and meta-analysis of clinical trials implementing aromatase inhibitors to treat male infertility. *Asian J Androl.* 2020;22(4):360-7.
52. Hamdy SM, Bakeer HM, Eskander EF, Sayed ON. Effect of acrylamide on some hormones and endocrine tissues in male rats. *Hum Exp Toxicol.* 2012;31(5):483-91.
53. Matoso V, Bargi-Souza P, Ivanski F, Romano MA, Romano RM. Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food Chem.* 2019; 283:422-30.
54. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. "Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs." *J Agric Food Chem.* 2002;50(17):4998-5006.
55. Semla M, Goc Z, Martiniaková M, Omelka R, Formicki G. Acrylamide: a common food toxin related to physiological functions and health. *Physiol Res.* 2017;66(2):205-17.
56. Netscher T. Synthesis of vitamin E. *Vitam Horm.* 2007; 76:155-202.
57. Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(1):7-30.
58. Orucha R, Prymeb IF, Holmsenb H. The fat soluble antioxidant vitamin E: Its metabolism, and biological and physiological significance. *Global Journal of Biochemistry.* 2011;2(1).
59. Üremiş N, Üremiş MM, Gül M, Özsoy EN, Türköz Y. Protective effects of vitamin E against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity from fetal development to adulthood: Insights into Akt/NF- κ B and Bcl-xL/Bax signaling pathways. *Toxicology.* 2024; 502:153729.
60. Kopańska M, Batoryna M, Banaś-Ząbczyk A, Błajda J, Lis MW. The effect of α -tocopherol on the reduction of inflammatory processes and the negative effect of acrylamide. *Molecules.* 2020;27(3):965.
61. Rahangadale S, Jangir BL, Patil M, Verma T, Bhandarkar A, Sonkusale P, et al. Evaluation of protective effect of vitamin E on acrylamide induced testicular toxicity in wister rats. *Toxicol Int.* 2012;19(2):158.
62. Salwa MO, Mohamed AD, Noha A. Effect of acrylamide on ovaries of female albino rats and possible protective role of vitamin E. *The Medical Journal of Cairo University.* 2020;88: 2177-82.

63. Anvari M, Talebi AR, Mangoli E, Shahedi A, Ghasemi MR, Pouretezari M. Effects of acrylamide in the presence of vitamin E on sperm parameters, chromatin quality, and testosterone levels in mice. *Clin Exp Reprod Med.* 2020;47(2):101-7.
64. Erdemli Z, Erdemli ME, Turkoz Y, Gul M, Yigitcan B, Gozukara Bag H. The effects of acrylamide and Vitamin E administration during pregnancy on adult rats testis. *Andrologia.* 2019;51(7): e13292.
65. Milczarek R, Sokołowska E, Hallmann A, Kaletha K, Klimek J. NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation inhibit aromatase activity in human placental microsomes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;110(3-5):230-5.
66. Samare-Najaf M, Zal F, Safari S. Primary and secondary markers of doxorubicin-induced female infertility and the alleviative properties of quercetin and vitamin E in a rat model. *Reprod Toxicol.* 2020; 96:316-26.
67. Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, et al. Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reprod Toxicol.* 2010;29(2):225-30.
68. França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod.* 1998;59(6):1371-7.
69. Başpınar Saticı G, Dirican EK, Kalender Y. Ratlarda Bendiocarb'ın Sebep Olduğu Testikular Toksikite Üzerine Vitamin C ve E'nin Koruyucu Rolü. *Iğdır Üniv. Fen Bil Enst. Der.* 2022;12(4):1985-94.
70. Njagi P, Groot W, Arsenijevic J, Dyer S, Mburu G, Kiarie J. Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low- and middle-income countries: a systematic review. *Hum Reprod Open.* 2023;2023(2): hoad007.
71. Huang B, Wang Z, Kong Y, Jin M, Ma L. Global, regional and national burden of male infertility in 204 countries and territories between 1990 and 2019: An analysis of global burden of disease study. *BMC Public Health.* 2023;23(1);2195.
72. Foster WG. Endocrine disruptors and development of the reproductive system in the fetus and children: Is there cause for concern? *Can J Public Health.* 1998; S37-41:41-6.
73. Aldawood N, Alrezaki A, Alanazi S, Amor N, Alwasel S, Sirotkin A, et al. Acrylamide impairs ovarian function by promoting apoptosis and affecting reproductive hormone release, steroidogenesis and autophagy-related genes: An in vivo study. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020; 197:110595.

74. Żyzelewicz D, Nebesny E, Oracz J. Acrylamide- formation, physicochemical and biological properties. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*. 2010; 3:415-27.
75. Moldoveanu SC, Gerardi AR. Acrylamide analysis in tobacco, alternative tobacco products, and cigarette smoke. *Journal of Chromatographic Science*. 2011; 49:234-42.
76. Szczerbina T. Acrylamide as probable carcinogen in food. *Kosmos*. 2005; 54:367-72.
77. EFSA. Results on the monitoring of acrylamide levels in food. *EFSA Scientific Report*. *EFSA J*. 2009; 7:2-26.
78. Arusoğlu G. Akrilamid Oluşumu ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Akademik Gıda*. 2015;13(1):61-7.
79. Ariseto AP, Vicente E, Ueno MS, Tfouni SA, Furlani RP, Figueiredo TL, et al. Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. *Food Addit Contam*. 2007;24(3):236-41.
80. Kito K, Ishihara J, Yamamoto J, Hosoda T, Kotemori A, Takachi R, et al. Variations in the estimated intake of acrylamide from food in the Japanese population. *Nutr J*. 2020; 19:1–9.
81. Maan AA, Anjum MA, Khan MKI, Nazir A, Saeed F, Afzaal M, et al. Acrylamide formation and different mitigation strategies during food processing—a review. *Food Reviews International*. 2022;38(1):70–87.
82. Sumner SC et al. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol*. 1999;12(11):1110-6
83. Tyl RW, Friedman MA. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod Toxicol*. 2003;17(1):1–13
84. Zamani E, Shaki F, AbedianKenari S, Shokrzadeh M. Acrylamide induces immunotoxicity through reactive oxygen species production and caspase-dependent apoptosis in mice splenocytes via the mitochondria-dependent signaling pathways. *Biomed Pharmacother*. 2017; 94:523–30.
85. Mokhlis HA, Rashed MH, Saleh IG, Eldeib MG, El-Husseiny AA, Khidr EG, et al. Hydrogen sulfide alleviates acrylamide-induced testicular toxicity in male rats. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 2023;15(1):41-51.
86. Schlegel PN. Aromatase inhibitors for male infertility. *Fertil Steril*. 2012;98(6):1359-62.

87. Cepa M, Correia-da-Silva G, Da Silva EJT. et al. New steroidal aromatase inhibitors: Suppression of estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and induction of cell death. *BMC Cell Biol.* 2008; 9:41.
88. Katen AL, Chambers CG, Nixon B, Roman SD. Chronic acrylamide exposure in male mice results in elevated DNA damage in the germline and heritable induction of CYP2E1 in the testes. *Biol Reprod.* 2016;95(4):86-1-15.
89. Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han DU, Chae C, et al. Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reprod Toxicol.* 2005;19(4):527-34.
90. Mahmood SAF, Amin K, Rahman HS, Othman HH. The pathophysiological effects of acrylamide in Albino Wistar rats. *International Journal of Medical Research & Health Sciences.* 2016; 5:42-8.
91. Ma Y, Shi J, Zheng M, Liu J, Tian S, He X, et al. Toxicological effects of acrylamide on the reproductive system of weaning male rats. *Toxicol Ind Health.* 2011;27(7):617-27.
92. Aldawood N, Jalouli M, Alrezaki A, Nahdi S, Alamri A, Alanazi M, et al. Fetal programming: In utero exposure to acrylamide leads to intergenerational disrupted ovarian function and accelerated ovarian aging. *Aging (Albany NY).* 2022;14(17):6887-904.
93. Shipa AME, Kahilo KA, Elshazly SA, Taher ES, Nasr NE, Alotaibi BS, et al. Protective effect of *Petroselinum crispum* methanolic extract against acrylamide-induced reproductive toxicity in male rats through NF- κ B, kinesin, steroidogenesis pathways. *Reprod Toxicol.* 2024;126:108586.
94. Andersson AM, Petersen JH, Jørgensen N, Jensen TK, Skakkebæk NE. Serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels as tools in the evaluation of infertile men: significance of adequate reference values from proven fertile men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2873–9.
95. Ramaswamy S, Marshall GR, McNeilly AS, Plant TM. Dynamics of the follicle-stimulating hormone (FSH)-inhibin B feedback loop and its role in regulating spermatogenesis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by unilateral orchidectomy. *Endocrinology.* 2000;141(1):18–27
96. Chu PL, Liu HS, Wang C, Lin CY. Association between acrylamide exposure and sex hormones in males: NHANES, 2003-2004. *PLoS One.* 2020;15(6): e0234622.

97. Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, et al. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(7):2496-501.
98. Bhuiyan ME J, Hossain MG, Saha A, Islam MK, Bari FY, Khan MA, et al. Protective roles of vitamin C and 5-aminosalicylic acid on reproduction in acrylamide intoxicated male mice. *Saudi J Biol Sci.* 2023;30(8):103738.
99. Üremiş MM, Üremiş N, Gül M, Gül S, Çiğremiş Y, Durhan M, Türköz Y. Acrylamide, applied during pregnancy and postpartum period in offspring rats, significantly disrupted myelination by decreasing the levels of myelin-related proteins: MBP, MAG, and MOG. *Neurochem Res.* 2004;49(3):617-35.
100. Davuljigari CB, Ekuban FA, Zong C, Fergany AAM, Morikawa K, Ichihara G. Nrf2 Activation Attenuates Acrylamide-Induced Neuropathy in Mice. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(11): 5995.
101. Rice JM. The carcinogenicity of acrylamide. *Mutat Res.* 2005;580(1-2):3-20.
102. Vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, Angle BM, Taylor JA. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;354(1-2):74-84.
103. Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;304(1-2):55-62.
104. Büyükdere Y, Mutlu AA. Diyetteki Endokrin Bozucular Arasında Bir Obezogen: Akrilamid. *Beslenme ve Diyet Dergisi,* 2023;51(1):79-85
105. Amato AA, Wheeler HB, Blumberg B. Obesity and endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Connect.* 2021;10(2), R87–R105.
106. Allam AA El-Ghareeb AW Abdul-Hamid M, Bakery AE, Gad M, Sabri M. Effect of prenatal and perinatal acrylamide on the biochemical and morphological changes in liver of developing albino rat. *Arch Toxicol.* 2023;97(9):2497.
107. Rawi SM, Marie M-AS, Fahmy SR, El-Abied SA. Hazardous effects of acrylamide on immature male and female rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2012;6(18):1367-86.
108. Kuperman AS. Effects of acrylamide on the central nervous system of the cat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1958;123(3):180-92.

109. Hashimoto K, Aldridge WN. Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochem Pharmacol.* 1970;19(9):2591-604.
110. Lee HW, Pyo S. Acrylamide induces adipocyte differentiation and obesity in mice. *Chem Biol Interact.* 2019; 298:24-34.



EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Onayı

