

Doğal Koşullarda Elde Edilen Alüminyumun Akkaraman Koçlarında Düşük Dozlarda In Vitro Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkisi

Abdulkadir Kaya¹, Ömer Varışlı¹, Hüsamettin Ekici², Sedat Hamdi Kızıl¹

¹Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kırıkkale/TÜRKİYE

²Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale/TÜRKİYE

Anahtar Kelimeler:

alüminyum
sperma
koç
ısı etkisi
toksikasyon

Key Words:

aluminum
sperm
aries
heat Effect
poisoning

Geliş Tarihi : 20.11.2019
Kabul Tarihi : 25.05.2020
Yayın Tarihi : 29.08.2020
Makale Kodu : 648962

Sorumlu Yazar:
Ö. VARİŞLİ
(omervarisli@kku.edu.tr)

ORCID:
A. KAYA : 0000-0001-7903-4358
Ö. VARİŞLİ : 0000-0002-2777-3586
H. EKİCİ : 0000-0001-6403-737X
SH. KIZIL : 0000-0003-0143-1104

ÖZ

Alüminyum doğada en çok bulunan üçüncü element olması kullanım alanını yaygınlaştırmıştır. Ucuz olması, kolay şekil verilebilmesi, ısıya dayanıklılığı ve parlak yüzey yapısı nedeniyle pişirme ürünü olarak kullanımını tercih edilmektedir. Bu nedenle alüminyum bazlı fırın tepsileri, folyolar ve çaydanlıklar yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak alüminyumun yüksek ısılarla maruz bırakılması yüzeyde kopmalara ve gıdalara alüminyum geçişine neden olmaktadır. Yapılan çalışmada 10 gram alüminyum folyo 1 litre distile su içerisinde 180 °C de 2 saat süreyle tutulmuştur. Böylece normal koşullar altında suya alüminyum geçişi sağlanmıştır. Elde edilen suyun farklı oranlarda buharlaştırılması ile farklı dozlarda alüminyumlu distile su elde edilmiştir. Elde edilen suyun sperma üzerine etkisini incelemek için Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne ait 2 adet Akkaraman koçundan elektro- ejakülatör ile elde edilen sperma kullanılmıştır. Distile su ve farklı oranlardaki alüminyumlu su ile PBS solüsyonu hazırlanmıştır. Deneysel grupları G-1 (kontrol), G-2 (alüminyumlu su) G-3 (%50 konsantre alüminyumlu su) ve G-4 (%75 konsantre alüminyumlu su) olacak şekilde oluşturulmuştur. Sperma 50x10⁶/ml spermatozoa olarak şekilde grup sulandırıcıları ile sulandırıldı ve 37 °C de su banyosunda inkubasyona bırakıldı. Tüm gruplar 0, 2, 4, 6. saatlerde motilite, canlılık ve mitokondriyal membran potansiyeli açısından değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirildi ve gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0,05) Bu çalışma ile alüminyumun düşük dozlarda alımının spermatolojik parametrelere iv vitro olarak doğrudan bir toksik etkisi olmadığı belirlenmiştir. Fakat alüminyumun düşük dozlarda uzun süreli olarak alınmasının toksik etkiye sahip olabileceği değerlendirilmektedir.

The Effect of Aluminum Obtained from Natural Conditions on In Vitro Spermatological Parameters at Low Doses in Akkaraman Rams

ABSTRACT

Aluminum is the third most common element in nature and has expanded its use. It is widely used as a cooking product because it is cheap, easy to shape, heat resistance and glossy surface structure. Therefore aluminum-based oven trays, foils and teapots are widely used. Exposure of aluminum to high temperatures causes micro surface cracking and aluminum migrates to foods. In this study, 10 grams aluminum foil in 1 liter distilled water was boiled at 180 °C for 2 hours, because of realizing aluminum transition to water in under normal conditions. The distilled water including different aluminum doses were obtained by evaporating of which. The semen was obtained from 2 Akkaraman rams by electro-ejaculator. Rams were housed in Kırıkkale University Veterinary Faculty Facilities. PBS solution was prepared with distilled water which has got different amounts of aluminum. The experimental groups were conducted as G-1 (control), G-2 (aluminum water) G-3 (50% concentrated water with aluminum) and G-4 (75% concentrated water with aluminum). Semen was added to the groups as 50x10⁶ / ml spermatozoa. The groups were incubated in a water bath at 37 °C. All groups were evaluated for motility, viability and mitochondrial membrane potential at 0, 2, 4, 6 hours. There was no statistically significant difference between the groups. In this study, it was determined that low doses of aluminum had no direct toxic effect on spermatological parameters in vitro. However, it has been considered that long-term intake of aluminum at low doses may have toxic effects.

GİRİŞ

Alüminyumun oral olarak alımının uzun yıllar boyunca toksik etkiye sahip olamayacağı görüşü ve insanların alüminyuma maruziyetinin düşük olduğu düşüncesi ile toksik etkisi hakkında detaylı bir çalışma yapılmamıştır (1). Alüminyumun ucuz mal edilmesi, geri dönüştürülebilir olması, yumuşak ve

kolay işlenebilmesi sebebiyle sanayi ve gıda sektöründe yaygın kullanım alanı bulmuştur. Alüminyum saklama kapları, alüminyum folyolar, alüminyum teneke kutular, fast food ürünlerinde kullanılması ile 21. Yüzyılda gıda ile teması en fazla kullanılan metal haline gelmiştir (2). Gıdaların saklanması, özellikle pişirme ürünü olarak kullanılan alüminyum kapların yüksek ısıya maruz kalması sebebiyle içinde bulundurduğu gıdaya yoğun

olarak alüminyum geçişi olabilmektedir. Alüminyum emilimi pişirilen gıdanın asidik veya bazik karaktere sahip olması ile daha fazla olmaktadır (3, 4). Yapılan çalışmalar günlük alüminyum alımının 2 ila 3 miligram arasında değiştiğini bireysel farklılıklar göz önünde bulundurulduğunda 10 miligram kadar olan alüminyum alımını olabilmektedir (5,6). Alüminyuma özellikle serbest element olarak değil farklı bileşikler halinde maruz kaldığı belirlenmiştir. Alüminyum laktat, alüminyum klorür, alüminyum hidroksit gibi farklı alüminyum bileşiklerinin etki derecesi de birbirlerinden farklı olmaktadır. Özellikle gıda yolu ile alüminyum alınımı düşük dozlar halinde ve uzun süreli (kronik) etkilere sebep olmaktadır (7). Yüksek veya düşük doz alüminyum alımlarının akut ve kronik dönemde etkileri değişkenlik göstermektedir (8). Yapılan çalışmalarda alüminyum alımı sinir sistemi, dolaşım ve üro-genital olmak üzere birçok sisteme olumsuz etkisi bulunmaktadır (9, 10, 11). Alınan alüminyum beyin, kalp, böbrek ve kemik dokuda birikime sebep olmaktadır (12). Kronik olarak alüminyuma maruz kalmanın böbrek ve beyin dokuda morfolojik değişimlere sebep olduğu gösterilmiştir (13). Üreme üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada ratlarda gebelik döneminde 20mg/kg subkutan alüminyum klorürün aborta ve fetal anomalilere sebep olmaktadır. Erkek ratlarda 4.3 mg/kg subkutan veya intratestüküler alüminyum klorür enjeksiyonları testislerde ağırlık kaybı, paransim dokusunun proliferasyonuna ve sperm canlılığının azalmasına sebep olduğu gösterilmiştir (14). Ayrıca erkek tavşanlarda sperm parametrelerine olan etkisini incelemek amacıyla 10 mM ve 15mM oranlarında Alüminyum klorit in vitro olarak tavşan spermasında motilite ve sperm canlılığının azalmasına sebep olmuştur. (15). Fakat doğal şartlarda alüminyumun maruziyeni sitümüle edip androlojik etkilerini inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Bu amaçla alüminyuma doğal maruziyet koşulları simüle edilerek, alüminyumun koç spermasına etkisi in vitro olarak incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Alüminyumun Elde Edilmesi

Gıdaların pişirilmesinde yaygın olarak kullanılan alüminyum folyo alüminyum kaynağı olarak kullanılmıştır. 10 gram alüminyum folyo parçalanarak 1 litre distile su içerisine atıldı. Alüminyum folyolu distile su, 180 °C de etüv içerisinde 2 saat kaynatılarak alüminyum folyolar süzülür ve 0.22 µm lik membran filtrelerden geçirildi. Daha sonra elde edilen su %50 ve %75 oranında buharlaştırılarak farklı dozlarda alüminyum içeren su elde edildi.

Solüsyonların Hazırlanması

Elde edilen alüminyumlu su dozları Kırıkkale Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan ICP-OIS cihazı ile içerdiği alüminyum miktarı belirlendi. Bu sular kullanılarak PBS (Phosphate Buffer Saline, Moleküler Formül: $Cl_2H_3K_2Na_3O_8P_2$, Katolog no: P4417-50TAB, Sigma-Aldrich) hazırlandı. Böylece deney grupları; Grup-1: Distile su ile hazırlanmış PBS, Grup-2: Alüminyumlu su ile hazırlanmış PBS, Grup-3: %50 buharlaştırılmış alüminyumlu su ile hazırlanmış PBS, Grup-4: %75 buharlaştırılmış alüminyumlu su ile hazırlanmış PBS olarak oluşturuldu. Solüsyonlar kullanılıncaya kadar +4 °C saklandı.

Spermanın Elde Edilmesi ve Deneme Prosedürü

Sperma elde etmek için Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesine ait 2 adet Akkaraman koçu kullanıldı. Koçlardan haftada bir kez elektro-ejakülatör ile alınan sperma pooling yapıldıktan sonra Thoma lamı ile yoğunluğu tespit edildi. Her grup için 50×10^6 /ml spermatozoon olacak şekilde sulandırıcı grupları ile sulandırıldı. Örnekler 37 °C su banyosunda bekletilerek spermatolojik değerlendirmeler 0., 2., 4. ve 6. saatlerde gerçekleştirildi.

Motilite Tayini

Gruplar ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskop ile 20X büyütmede subjektif olarak gözlemlendi. Toplamda 3 farklı alanda spermatazoa hareket kabiliyeti yönünden incelenip motilite oranı yüzde olarak belirlendi.

Canlılık Tayini

Floresan ataçmanlı (Leica DM I LED FLUO; Leica, Germany) mikroskop kullanılarak SYBR-14 ve PI (Live-Dead Sperm Viability Lit L-7011; Invitrogen, Eugene, OR, USA) floresan boyalar ile boyama yapıldı. Spermalar $1-2 \times 10^6$ /ml olacak şekilde seyreltikten sonra 50 µl sulandırılmış sperma ependorf tüplere konuldu, üzerine 1 µM içeren 10 µl SYBR-14 eklenip 10 dk beklendi. Solüsyon içerisine, 5 µM içeren 5 µl PI eklenip 5 dk sonra 3 µl Hancock solüsyonu ile reaksiyon durduruldu. 3 µl örnek lam üzerine konarak lamel kapatıldı, 200 spermatozoa sayıldı. PI ile boyanıp ve kırmızı floresan yayanlar ölü kabul edildi. SYBR-14 ile boyanıp ve yeşil flourasan yayanlar canlı olarak kabul edildi (16).

Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP)

Bu amaçla JC-1 floresan boyası (M34152, Molecular Probes Inc.) kullanıldı. Spermalar $1-2 \times 10^6$ /ml olacak şekilde seyreltikten sonra 300 µl sulandırılan sperma üzerine 10 µl JC-1 (0.75 µg) eklendi ve 37 °C de inkubatörde 30 dk inkube edildi ve 3 µl Hancock solüsyonu ile reaksiyon durduruldu. Leica DM I LED FLUO; Leica, Germany floresan ataçmanlı mikroskop kullanılarak spermalar boyun bölgesinde turuncu renk gösterenler yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahip olarak ve boyun bölgesinde yeşil floresan renk gösterenler düşük mitokondriyal membran potansiyeline sahip olarak değerlendirildi. Toplamda 200 adet spermatozoon sayıldı ve yüksek mitokondriyal membran potansiyeli yönünden yüzde olarak belirlendi (17).

İstatistik Analiz

Elde edilen bulgular SPSS 23 (IBM) programı kullanılarak analiz edildi. Gruplar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki fark Post-Hoc Tukey analiz yöntemi sınıflandırıldı.

BULGULAR

Hazırlanan alüminyumlu su içerisinde bulundurduğu alüminyum miktarı açısından ICP-OIS ile belirlendi ve gruplar arasında alüminyum miktarı açısından fark bulundu (Tablo 1).

Gruplar zamana göre motilite, canlılık ve mitokondriyal

Tablo 1. Zamana bağlı olarak alüminyumun sperm motilitesi üzerine etkisi**Table 1.** Time-dependent effect of aluminum on sperm motility

Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	İstatistiki
(Distile su)				Önem
0.28 µg/L	75.13 µg/L	91.49 µg/L	200.4 µg/L	*

* Aynı satırdaki veriler arasında $p < 0.05$ düzeyinde istatistiki farkı gösterir

* It shows a statistical difference of $p < 0.05$ between the data in the same row

membran potansiyeli yönünden değerlendirilmiştir. Motilite verileri yönünden gruplar arasında bir farklılık tespit edilememiştir ($p > 0.05$) ancak 2 saat sonra gözlenen hızlı motilite düşüşü yaşanmıştır (Tablo 2). Canlılık analizi sonucu gruplar arasında bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$, Tablo 3). Canlılık ile benzer şekilde mitokondriyal membran potansiyeli analizi sonucu da gruplar arasında bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$, Tablo 4). Ancak motilite de gözlenen hızlı kayıp canlılık ve MMP'inde rastlanmamıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tablo 2. Zamana bağlı olarak alüminyumun sperm motilitesi üzerine etkisi**Table 2.** Time-dependent effect of aluminum on sperm motility

Motilite	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Önem Derecesi
n=6					
0. saat	70.00±4.56	76.25±2.39	76.25±3.14	75.00±3.53	-
2. saat	48.75±2.39	50.00±2.04	56.25±3.14	52.50±2.50	-
4. saat	23.75±3.14	22.50±5.20	30.00±3.53	22.50±2.50	-
6. saat	1.25±1.25	1.25±1.25	2.5±2.5	1.25±1.25	-

Veriler, ortalama değer ±SEM dir. Aynı satırdaki işaretler istatistiksel olarak anlamsızdır ($P > 0.05$)

Data are mean ± SEM. Signs on the same line are statistically insignificant ($P > 0.05$)

Tablo 3. Zamana bağlı olarak alüminyumun canlılık üzerine etkisi**Table 3.** Time-dependent effect of aluminum on sperm viability

Canlılık	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Önem Derecesi
n=6					
0. saat	70.65±6.04	71.12±1.65	59.12± 2.53	76.57±1.97	-
2. saat	66.55±2.94	61.45±5.77	58.62±3.50	65.30±6.87	-
4. saat	64.42±4.53	58.72±5.78	59.65±4.84	57.22±4.53	-
6. saat	61.10±2.27	55.55±4.84	66.65±2.97	60.27±4.50	-

Veriler, ortalama değer ±SEM dir. Aynı satırdaki işaretler istatistiksel olarak anlamsızdır. ($P > 0.05$)

Data are mean ± SEM. Signs on the same line are statistically insignificant ($P > 0.05$).

Tablo 4. Zamana bağlı olarak alüminyumun mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi**Table 4.** Time-dependent effect of aluminum on mitochondrial membrane potential

Membran Potansiyeli	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Önem Derecesi
n=6					
0. saat	56.76±8.22	56.15±5.67	53.20±3.71	76.87±2.65	-
2. saat	48.40±8.47	52.43±11.74	53.30±4.16	61.07±6.98	-
4. saat	57.37±10.73	58.06±6.87	57.22±5.61	61.28±2.75	-
6. saat	53.10±7.30	57.65±5.53	65.02±1.60	64.06±2.01	-

Veriler, ortalama değer ±SEM dir. Aynı satırdaki işaretler istatistiksel olarak anlamsızdır. ($P > 0.05$)

Data are mean ± SEM. Signs on the same line are statistically insignificant ($P > 0.05$).

Bu çalışmada, G-1, G-2, G-3 ve G-4 gruplarında alüminyum miktarı şu şekilde tespit edilmiştir; 0.28 µg/L, 75.13 µg/L, 91.49 µg/L ve 200.4 µg/L. Türkiye de içme sularında tavsiye edilen alüminyum miktarı 50 µg/L, izin verilen azami alüminyum miktarı 200 µg/L, Dünya Sağlık Örgütü ise bu oranı maksimum 100 µg/L olarak belirlemiştir (18). Özellikle yemek pişirmede yaygın olarak kullanılan alüminyum kapların ve folyoların kullanımı ile vücuda normalden fazla miktarlarda alüminyum alımı olmaktadır. Yapılan bir araştırmada alüminyum folyo sarılarak pişirilen sığır etinin 59.83 – 220.20 mg/kg arasında alüminyum içerdiğini göstermektedir. Sıcaklık değeri arttıkça ve pişirme süresi uzadıkça alüminyum emilimi de artış göstermektedir (20). Ayrıca asidik ortam alüminyumun gıdaya geçişini artırmaktadır. Yapılan başka bir çalışmada ise alüminyumun mide ve bağırsaklardan emilimi asidik ortamda daha fazla artmaktadır (21). Alüminyumun toksik etkisi küçümsenemeyecek kadar fazladır. İngiltere'nin Camelford şehrinde 1988 yılında yanlışlıkla 20 ton alüminyum sülfatın içme

suyuna karışması sonucu 20.000 kişi zehirlenmiştir. Nehirlerde kitlesel olarak balık ölümleri görülmüştür. Bu olay İngiltere tarihinin en büyük kitlesel zehirlenmesi olarak tarihe geçti. Akut olarak etkilenen insanlarda diyare, kusma, mide krampları, ülseratif deri döküntülerine sebep olmuştur. Yapılan incelemeler birçok insanda nörolojik etkiye sebep olacak yoğunlukta beyin dokuda alüminyum birikimlere sebep olduğunu göstermiştir. Şehirde günümüzde bile binlerce insan bu olay yüzünden tekerlekli sandalyeye muhtaç ve hafıza problemi yaşamaktadır (22, 23). Günümüzde yaygın

olarak kullandığımız alüminyum gerek hayvanlar gerekse bizleri zehirlemektedir. Alüminyuma uzun süreli maruziyetin androlojik etkisini inceleyen bir çalışma oral olarak 120 gün boyunca su ile verilen alüminyum trikloritinin androlojik hormonları baskıladığı ve androjenik reseptörler ve içeriği mRNA oranını düşürdüğü böylece testisin gelişimi, üreme fonksiyonlarının kaybına ve hormonal bozukluğa sebep olduğunu göstermiştir (24).

Yaptığımız çalışmada zamana bağlı olarak motilite, canlılık ve mitokondriyal membran potansiyeli arasında gruplar arası bir farklılık meydana gelmemiştir ($p > 0.05$). Ancak motilitede 4. saatten sonra gözlenen yüksek motilite kaybının spermatolojik kaliteden kaynaklı olacağını düşündürmüştür. 4. saatte grup-1, 2, 3 ve 4 de sırasıyla % 23.75±3.14, %22.50±5.20, % 30.00±3.53 ve 22.50±2.50 motilite tespit edilirken, 6. saatte %1.25±1.25, %1.25±1.25, %2.5±2.5 ve

%1.25±1.25 elde edilmiştir. Daha önce kısa süreli yaptığımız çalışmalarda (20) koç spermasının 96. saat önemli motilite kaybı yaşanmadan ulaştığını tespit edildi. Ancak bu çalışmada gerek elektro-ejekülatoörle sperma alınması ve gerekse PBS sulandırıcı ile sulandırılıp 37 °C’de inkübasyonun hızlı motilite kaybına yol açtığını düşündürmektedir. Aynı düşüş canlılık ve MMP’de yaşanmamıştır. Motilite ile canlılık verileri arasında uyumsuzluk, spermatozoaların canlı olmasına rağmen hareket kabiliyetlerini büyük ölçüde yitirmelerinden kaynaklanmıştır. Mikroskopik bakıda spermatozoaların büyük kısmının sadece hareket etmeden titredığı tespit edilmiştir. Bunda alüminyumun toksik etkisinde etkili olmuş olabilir. Çalışmada kontrol grubu ile alüminyum gruplar arasından bir fark oluşmamasında suya geçen alüminyum düzeyinin 75-200 µg/L seviyelerin olması etkili olmuş olabilir. Bu değerler içme suyu için kabul edilebilir (200 µg/L) değerler içerisinde yer almaktadır. Özellikle Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre bir kişi günde 1mg/kg dozunda alüminyum alımı yapabildiği ve yapılan bir araştırmada alüminyum folyo sarılarak pişirilen sığır etinin 59.83 – 220.20 mg/kg arasında alüminyum içermesi yanında elde ettiğimiz alüminyumlu su değerleri çok düşük kalmaktadır. Sonuç olarak sperma düşük miktarlarda alüminyuma maruz kalmıştır. Fakat alüminyumun beyin, kan, kemik ve üreme organlarında yaptığı birikimi düşünürsek uzun süreli alüminyum alımının sperm kalitesini düşürebileceğini öngörebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Alfrey, A. C. (1985). Gastrointestinal absorption of aluminum. *Clinical nephrology*, 24, S84-7.
2. Domingo, J. L., Gomez, M., Llobet, J. M., Del Castillo, D., & Corbella, J. (1994). Influence of citric, ascorbic and lactic acids on the gastrointestinal absorption of aluminum in uremic rats. *Nephron*, 66(1), 108-109.
3. Bassioni, G., Mohammed, F. S., Al Zubaidy, E., & Kobrsi, I. (2012). Risk assessment of using aluminum foil in food preparation. *Int. J. Electrochem. Sci*, 7(5), 4498-4509.
4. Greger, J. L., Goetz, W., & Sullivan, D. (1985). Aluminum levels in foods cooked and stored in aluminum pans, trays and foil. *Journal of Food Protection*, 48(9), 772-777.
5. WHO (World Health Organization), “Safety evaluation of certain food additives and contaminants”, WHO Food additives Series 46. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2001).
6. Macrae, R., Robinson, R. K., & Sadler, M. J. (1993). *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, Academic Press, London.
7. Greger, J. L. (1993). Aluminum metabolism. *Annual review of nutrition*, 13(1), 43-63.
8. Krasovskii, G. N., Vasukovich, L. Y., & Chariev, O. G. (1979). Experimental study of biological effects of leads and aluminum following oral administration. *Environmental health perspectives*, 30, 47-51.
9. Domingo, J. L. (1995). Reproductive and developmental toxicity of aluminum: a review. *Neurotoxicology and teratology*, 17(4), 515-521.
10. Yousef, M. I., Kamel, K. I., El-Guendi, M. I., & El-Demerdash, F. M. (2007). An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants. *Toxicology*, 239(3), 213-223.
11. Varisli, O., Agca, C., & Agca, Y. (2015). Influence of extenders and cooling rates on epididymal sperm of Lewis rat strain. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 62(1), 57-62.
12. Varisli, O., Scott, H., Agca, C., & Agca, Y. (2013). The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm. *Cryobiology*, 67(2), 109-116.
13. İçme Suyu Temin Edilen Suların Kalitesi ve Arıtılması Hakkında Yönetmelik. 2019/6/ Temmuz. Resmi Gazete(Sayı:30823) Erişim Adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/07/20190706-8.htm>.
14. World Health Organization. (2003). Atrazine in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality (No. WHO/SDE/WSH/03.04/32). World Health Organization.
15. Ekanem, E. J., et al. (2009). Determination of aluminium in different sources and its contribution to daily dietary intake in Nigeria. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(8), 944-948.
16. Bassioni, G., Mohammed, F. S., Al Zubaidy, E., & Kobrsi, I. (2012). Risk assessment of using aluminum foil in food preparation. *Int. J. Electrochem. Sci*, 7(5), 4498-4509.
17. Altmann, P., Cunningham, J., Dhanesha, U., Ballard, M., Thompson, J., & Marsh, F. (1999). Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. *Bmj*, 319(7213), 807-811.
18. Ewardson, J. (1992). The Camelford incident. In *Second International Conference on Aluminum and Health* (pp. 61-64).
19. Zhu, Yanzhu, et al. (2012). Suppressive effects of aluminum trichloride on the T lymphocyte immune function of rats. *Food and chemical toxicology*, 50(3-4), 532-535.
20. Varisli, O., Taskin, A., & Akyol, N. (2018). Effects of different extenders and additives on liquid storage of Awassi ram semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 42(4), 230-242.