



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MONOSODYUM GLUTAMAT İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA
APOSİNİNİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ**

SALVA ASMA ALGİLANİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap Arbak

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Merve Açıklı Elmas

İSTANBUL- 2022



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MONOSODYUM GLUTAMAT İLE OLUŞTURULAN TESTİS
HASARINDA APOSİNİNİN İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ**

SALVA ASMA ALGİLANİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap Arbak

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Merve Açikel Elmas

İSTANBUL- 2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

06/01/2022

Salva Asma Algilani

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince kıymetli bilgi ve tecrübeleriyle ışık gösteren, alanımızda en iyi şekilde yetiştiren ve ilgisini eksik etmeyen saygıdeğer tez danışmanım ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Serap Arbak'a,

İleride çalışmak istediğim alana göre tez konumu seçmemde yardımcı olan, deney ve tez yazma süresince ihtiyaç duyduğum her an değerli tercrübe ve bilgileri ile daima desteğini gösteren saygıdeğer ikinci tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Merve Açıklak Elmas'a,

Yüksek lisans öğrenimin boyunca derslerimizde değerli bilgilerini aktaran saygıdeğer anabilim dalımız öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Deniz Yücel'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğreniminde tanıştığım, her zaman destek çıkan çok kıymetli ömürlük dostum ve bölüm arkadaşım Begüm Şahin'e ve laboratuvar tecrübelerini daima aktaran, her ihtiyaç duyduğum an ablam gibi yardımlarını esirgemeyen çok değerli büyüğüm Gökçen Özgün'e,

Tez çalışmamın elektron mikroskopik takibi ve görüntü alma kısımlarında gösterdiği destek için Dr. Selçuk Birdoğan'a ve tez içeriğinde yer alan sperm analizlerinde yardımlarından dolayı Dr. Kutay Köroğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli anneciğim Chile Taha'ya, babacığım Dr. Kamran Algilani'ye ve hayatım boyunca her anlamda tam desteğini gösteren kıymetli dayıcığım Agit Geylani'ye ve kocaman aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez projesi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 1002 Hızlı Destek programı (Proje No: 220S350) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTIMA VE SİMGELER LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xviii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 Testis Histolojisi	6
2.1.1 İnterstisyel doku	7
2.1.2 Seminifer tübüller	7
2.1.3 Kan- testis bariyeri.....	9
2.2 Epididimis'in Histolojisi	11
2.3 Testiste Endokrin Faktörler.....	12
2.4 Oksidatif Stres	12
2.5 İnfertilite	13
2.6 Apoptoz	15
2.7 Monosodyum Glutamat	16
2.8 Aposinin	17
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1 Gereç.....	20
3.1.1 Deney grupları.....	20
3.1.2 Testis dokusu ve kan örneklerinin elde edilmesi.....	21
3.2 Yöntem	21
3.2.1 Sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi.....	21

3.2.2 Testis dokusu örneklerinin mikropreparasyonu.....	22
3.2.3 Işık mikroskopu düzeyinde histokimyasal incelemeye yönelik doku preparasyonu	22
3.2.4 Hematoksilen ve eozin boyası.....	23
3.2.5 Periyodik asit- Schiff reaksiyonu.....	24
3.2.6 Masson'un üçlü boyası.....	24
3.2.7 ZO-1 immünhistokimyası.....	25
3.2.8 Okludin immünhistokimyası.....	25
3.2.9 NOX-2 immünhistokimyası.....	26
3.2.10 Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı deoksiüridin trifosfat (dUTP) çentik uçlu etiketleme (TUNEL) immünhistokimyası	27
3.2.11 Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA) immünhistokimyası	28
3.2.12 Geçirimli elektron mikroskopik preparasyon	29
3.3.13 Serum testosteron, FSH ve LH konsantrasyonlarının ölçülmesi.....	29
3.3.14 Doku MDA, GSH ve SOD seviyelerinin ölçülmesi.....	30
3.3.15 İstatistiksel analiz	32
4 BULGULAR	33
4.1 Vücut Ağırlığı	33
4.2 Testis Ağırlığı.....	33
4.3 Testis Ağırlığı/ Vücut Ağırlığı.....	34
4.4 Sperm Morfolojisi, Sayımı ve Motilitesi.....	35
4.5 Morfolojik Bulgular	39
4.6 Seminifer Tübüllerin Histopatolojik Skorlanması.....	48
4.7 Seminifer Tübül Kalınlığı Ölçümü	49
4.8 TUNEL İmmünhistokimyası Bulguları	50
4.9 Apoptotik İndeks Analizi.....	53
4.10 PCNA İmmünhistokimyası Bulguları	54
4.11 Proliferasyon İndeksi Analizi.....	57
4.12 NOX-2 İmmünhistokimyası Bulguları.....	57
4.13 NOX-2 İmmünreaktivite Yoğunluğu Analizi	60
4.14 ZO-1 İmmünhistokimyası Bulguları	60
4.15 ZO-1 İmmünreaktivite Yoğunluğu Analizi	63
4.16 Okludin İmmünhistokimyası Bulguları.....	63

4.17 Okludin İmmünreaktivite Yoğunluğu Analizi	66
4.18 Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları	67
4.19 Serum Testosteron, FSH ve LH Seviyeleri	71
4.20 Doku MDA, GSH, SOD Seviyeleri	73
5 TARTIŞMA	77
6 SONUÇ	84
7 KAYNAKLAR	85
8 EKLER.....	91
EK 1 Etik Kurul Onayı.....	91
9 ÖZGEÇMİŞ.....	93

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

DAB	Diamino benzidin
DAPI	Diamino-2-fenilidol
DER	Düz endoplazmik retikulum
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTNB	5,5'- ditiyobis 2- nitrobenzoik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GA	Glutaraldehit
GSH	Glutasyon
H&E	Hematoksilen ve eozin
KTB	Kan-testis bariyeri
LH	Luteinizan hormon
MDA	Malondialdehit
MOSI	Erkek oksidatif stres infertilitesi
MSG	Monosodyum glutamat
NADPH	Nikotin amid dinükleotid fosfat
NOX	NADPH oksidaz
OS	Oksidatif stres

PAS	Periyodik asit- Schiff
PCNA	Prolifere hücre nükleer antijeni
PFA	Paraformaldehit
PUFAs	Çoklu doymamış yağ asitleri
ROT	Reaktif oksijen türü
SOD	Süper oksit dismutaz
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı deoksiüridin trifosfat (dUTP) çentik uçlu etiketleme
WST	Suda çözünür tetrazolium tuzu
ZO-1	Zonula okludens-1
ZO-2	Zonula okludens-2
ZO-3	Zonula okludens-3

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Testis ve epididimis yapısı (26).	6
Şekil 2. Kan- testis bariyeri (27).	10
Şekil 3. Oksidatif stresin infertilite ile sonuçlanmasının şematik gösterimi (38).	15
Şekil 4. Glutamat yapısı (46).	16
Şekil 5. MSG yapısı (46).	16
Şekil 6. Aposinin yapısı (50).	18
Şekil 7. NOX'un aposinin tarafından inhibisyon mekanizması(23).	19
Şekil 8. Deney modeli şeması.	20
Şekil 9. Deney gruplarındaki sıçanların haftalık vücut ağırlıkları grafiği	33
Şekil 10. Deney gruplarına ait sıçanların testis ağırlığı.	34
Şekil 11. Deney gruplarının testis ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı.....	34
Şekil 12. Deney gruplarına ait sperm sayıları. *** p <0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p <0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺ p <0,01 MSG ile karşılaştırıldığında.	35
Şekil 13. Deney gruplarının sperm motilite yüzdeleri. ** p<0,01 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺ p<0,01 MSG ile karşılaştırıldığında.	36
Şekil 14. Seminifer tübül histopatolojik skor değerleri grafiği. *** p<0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺⁺ p<0,001 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.	49

Şekil 15. Deney gruplarının seminifer tübül epitel kalınlığı. *** p<0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺⁺ p<0,001 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.....	50
Şekil 16. Deney gruplarının apoptotik indeks grafiği. *** p<0,001 ve ** p<0,01 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺⁺ p<0,001 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.....	54
Şekil 17. Deney gruplarının proliferasyon indeksi grafiği. *** p<0,001 ve ** p<0,01 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p<0,001 ve ^a p<0,05 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺⁺ p<0,001 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.....	57
Şekil 18. NOX-2 immünreaktivite yoğunluğu grafiği. * p<0,05 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺ p<0,01 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.	60
Şekil 19. ZO-1 immünreaktivite yoğunluğu grafiği. *** p<0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺⁺ p<0,001 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.	63
Şekil 20. Okludin immünreaktivite yoğunluğu grafiği. *** p<0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺ p<0,01 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.	67
Şekil 21. Serum testosteron seviyesi grafiği. ** p<0,01, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.....	72
Şekil 22. Serum FSH seviyesi grafiği. ** p<0,01, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^a p<0,05 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺ p<0,05 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.....	72
Şekil 23. Serum LH seviyesi grafiği.	73
Şekil 24. Doku GSH seviyesi grafiği. *** p<0,001, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa} p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺ p<0,05 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.	75

Şekil 25. Doku SOD seviyesi grafiği. * $p < 0,05$, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.
^{aa} $p < 0,05$, APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺ $p < 0,05$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında..... 76



RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Kontrol grubunda normal sperm morfolojisi görüldü. Diff-Quik boyaması.	37
Resim 2. APO grubunda normal sperm morfolojisi gözlendi. Diff-Quik boyaması.	37
Resim 3. MSG grubunda bozulmuş morfolojik yapı gösteren spermler: kuyruksuz sperm başı (siyah ok), boyun anomalisi (siyah ok başı) ve kuyruk anomalisi (*). İnsert: Kuyruk anomalisi (*). Diff-Quik boyaması.	38
Resim 4. MSG+APO grubunda normal morfolojiyi (beyaz ok) ve bozulmuş morfolojiyi yansıtan spermler görüldü: kuyruksuz spermin baş yapısı (siyah ok). İnsert: Normal morfolojide spermler (beyaz ok). İnsert: Normal yapıda spermler (beyaz ok) ve kuyruk anomalisi (*). Diff-Quik boyaması.....	38
Resim 5. Kontrol grubunda epididimisin kanal lümeninde çok sayıda sperm (+) görüldü. H&E boyama.	40
Resim 6. APO grubunda epididimisin lümeninde çok sayıda sperm (+) izlendi. H&E boyama.	41
Resim 7. MSG grubunun epididimal kanal lümenlerinde sperm yoğunluğunda azalma (*) gözlendi. İnsert: Sperm yoğunluğunda azalma (*). H&E boyama.	41
Resim 8. MSG+APO grubunda epididimisin kanal lümeninde çok sayıda sperm gözlendi. İnsert: Epididimisin lümeni. H&E boyama.	42
Resim 9. Kontrol grubunda, testis dokusunda normal morfolojiyi yansıtan seminifer tübül organizasyonu (n) germinal epitelde spermatogonyum, spermatosit, spermatidler ve lümeninde spermatozoonlar eşliğinde görüldü. İnsert: Seminifer tübül germinal epiteli. H&E boyama.....	42
Resim 10. APO grubunda, testis dokusunda normal morfolojik yapıda seminifer tübül yapısı (n) ve germinal epitel izlendi. İnsert: Normal morfolojik yapıda seminifer tübül (n). H&E boyama.	43

Resim 11. MSG grubunda dejeneratif seminifer tübüllerin bazal membranlarında vakuolizasyon (siyah ok başı) ve dejeneratif seminifer tübül lümeninde az sayıda spermatozoon gözlemlendi. İncet: Spermatojenik hücre serisinde mitoz bölünme (beyaz ok başı) gözlemlendi. H&E boyama.	43
Resim 12. MSG+APO grubunda normale yakın seminifer tübül (n) morfolojisi gözlemlendi. İncet: Az sayıda seminifer tübül epitelinde hücrelerarası ayrılma alanları (siyah ok) eşliğinde vakuolizasyon izlendi. H&E boyama.	44
Resim 13. Kontrol grubunda düzenli seminifer tübül organizasyonunun yanı sıra tübüllerin bazal membranlarında kuvvetli PAS- pozitif reaksiyon görüldü. İncet: Bazal membranda kuvvetli PAS-pozitif reaksiyon. PAS reaksiyonu.	44
Resim 14. APO grubunda düzenli seminifer tübül organizasyonu ve bazal membranlarda kuvvetli PAS-pozitif reaksiyon gözlemlendi. İncet: Bazal membranda kuvvetli PAS-pozitif reaksiyon. PAS reaksiyonu.	45
Resim 15. MSG grubunda seminifer tübüllerin bazal membranlarında PAS reaksiyonunda azalma görülürken membran yapısında ondülasyonlar (siyah ok) izlendi. İncet: Bazal membranda ayrılmalar (siyah ok). PAS reaksiyonu.....	45
Resim 16. MSG+ APO grubunda seminifer tübüllerin bazal membranlarında Kontrol grubuna yakın oranda PAS-pozitif reaksiyon ve membran yapısı gözlemlendi. İncet: Bazal membranda kuvvetli PAS-pozitif reaksiyon. PAS reaksiyonu.	46
Resim 17. Kontrol grubunda seminifer tübüllerde ve tunika albuginea'da normal bağ dokusu yapılanması görüldü. Masson'un üçlü boyası.	46
Resim 18. APO grubunda seminifer tübüllerde normal bağ dokusu yapılanması görüldü. İncet: Normal yapıda tunika albuginea. Masson'un üçlü boyası.	47
Resim 19. MSG grubunda tunika albuginea'da yağ hücreleri (siyah ok) gözlemlendi. Masson'un üçlü boyası.....	47

Resim 20. MSG+ APO grubunda normale yakın yapıyı yansıtır seminifer tübül morfolojisi ve bağ dokusu yapılanması görüldü. İncet: Normal yapıda tunika albuginea. Masson'un üçlü boyası.	48
Resim 21. Kontrol grubunun seminifer tübül germinal epitelinde az sayıda TUNEL-pozitif hücre izlendi. İncet: TUNEL-pozitif hücre. TUNEL immünhistokimyası.	51
Resim 22. APO grubunun seminifer tübül epitelinde çok az sayıda TUNEL- pozitif hücre (siyah ok) görüldü . İncet: TUNEL-pozitif hücre (siyah ok). TUNEL immünhistokimyası.	51
Resim 23. MSG grubunun seminifer tübül germinal epitelinde çok sayıda TUNEL-pozitif hücre (siyah ok) izlendi. İncet: TUNEL-pozitif hücre (siyah ok). TUNEL immünhistokimyası.	52
Resim 24. MSG + APO grubunun seminifer tübül germinal epitelinde az sayıda TUNEL- pozitif hücre (siyah ok) gözlendi. İncet: TUNEL-pozitif hücre (siyah ok). TUNEL immünhistokimyası.	52
Resim 25. Pozitif kontrol amaçlı boyanan meme dokusu kesitinde çok sayıda TUNEL-pozitif hücreler (siyah ok) izlendi. İncet: TUNEL-pozitif hücre (siyah ok). TUNEL immünhistokimyası.	53
Resim 26. Kontrol grubunda, germinal epitelde çok sayıda koyu kahverengi PCNA-pozitif hücreler (siyah ok) görüldü. İncet: PCNA-pozitif hücre (siyah ok). PCNA immünhistokimyası.	55
Resim 27. APO grubunda, germinal epitelde koyu kahverengi PCNA-pozitif hücreler (siyah ok) görüldü . PCNA immünhistokimyası.	55
Resim 28. MSG grubunda germinal epitelde az sayıda PCNA-pozitif spermatogenik hücre (siyah ok) ve lümende yer yer germinal epitele ait döküntü hücreleri (*) görüldü. PCNA immünhistokimyası.	56
Resim 29. MSG+APO grubunda, germinal epitelde PCNA- pozitif spermatogenik hücreler (siyah ok) görüldü. PCNA immünhistokimyası.	56

Resim 30. Kontrol grubunda seminifer tübül epitelinde NOX-2 pozitif hücreler (A), seminifer tübül epitel hücrelerinde DAPI ile boyanmış hücreler (B) ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırma görüntüsü (C). NOX-2- pozitif bölgeler (beyaz ok). NOX-2 immünhistokimyası.....	58
Resim 31. APO grubunda seminifer tübül epitelinde NOX-2 pozitif hücreler (D), seminifer tübül epitel hücrelerinde DAPI ile boyanmış hücreler (E) ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırma görüntüsü (F). NOX-2- pozitif bölgeler (beyaz ok). NOX-2 immünhistokimyası.....	58
Resim 32. MSG grubu seminifer tübül epitelinde NOX-2 pozitif hücreler (G), seminifer tübül epitel hücrelerinde DAPI ile boyanmış hücreler(H) ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırma görüntüsü (I). Seminifer tübül epiteli adluminal bölgede yoğun NOX-2-pozitivite (beyaz ok). İnsert NOX-2-pozitif bölgeler (beyaz ok). NOX-2 immünhistokimyası.....	58
Resim 33. MSG+APO grubunda seminifer tübül epitelinde NOX-2 pozitif hücreler (J), seminifer tübül epitelinde DAPI ile boyanmış hücreler (K) ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırma görüntüsü (L). Seminifer tübül epiteli bazal ve adluminal bölgede düşük NOX-2- immünpozitivite (beyaz ok). NOX-2 immünhistokimyası..	59
Resim 34. Deney gruplarının tamamında NOX-2 ve DAPI boyanması ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırması(A-L), NOX-2 pozitif hücreler (beyaz ok). Kontrol grubunda (A-C), APO grubunda (D-F), MSG grubunda (G-I), MSG+APO grubunda (J-L). NOX-2 immünhistokimyası.....	59
Resim 35. Kontrol grubunda yaygın ZO-1 -pozitif bölgeler (siyah ok) gözlendi. İnsert: ZO-1- pozitif bölgeler (siyah ok). ZO-1 immünhistokimyası.....	61
Resim 36. APO grubunda yoğun ZO-1 pozitif boyanma (siyah ok) izlendi. İnsert: ZO-1 pozitif boyanan bölgeler (siyah ok). ZO-1 immünhistokimyası.....	61
Resim 37. MSG grubunda zayıf ZO-1 immünreaktivitesi (siyah ok) gözlendi. İnsert: Zayıf ZO-1 immünreaktivite. ZO-1 immünhistokimyası.....	62

Resim 38. MSG+APO grubunda Kontrol grubuna yakın yoğunlukta ZO-1 immünreaktivitesi izlendi. İncet: ZO-1- pozitif bölgeler (siyah ok) . ZO-1 immünhistokimyası.....	62
Resim 39. Kontrol grubunda okludin -pozitif bölgeler (siyah ok) seminifer tübül bazal membranına yakın yerleşimde, koyu kırmızı renkte görüldü. İncet: Okludin- pozitif bölgeler (siyah ok). Okludin immünhistokimyası.....	64
Resim 40. APO grubunda yoğun okludin- pozitif bölgeler (siyah ok) seminifer tübül bazal membranına yakın, koyu kırmızı renkte görüldü. İncet: Okludin- pozitif bölgeler (siyah ok). Okludin immünhistokimyası.....	65
Resim 41. MSG grubunda okludin immünreaktivitesi seyrek bölgelerde (siyah ok) gözlemlendi. İncet:Zayıf okludin immünreaktivitesi (siyah ok). Okludin immünhistokimyası.....	65
Resim 42. MSG+APO grubunda, normale yakın dağılımda okludin-pozitif bölgeler (siyah ok) gözlemlendi. İncet: Okludin-pozitif bölgeler (siyah ok). Okludin immünhistokimyası.....	66
Resim 43. Kontrol grubu elektronmikrografında Sertoli hücresi (St) ince yapısı (x4300). İncet: Lümeninde çok sayıda normal yapıda spermatozoon (s) . İncet: Sertoli hücreleri arasında yer alan sıkı bağlantıların ince yapısı (siyah ok başı) gözlemlendi ...	68
Resim 44. APO grubunda normal ince yapıda Sertoli hücresi (St) . İncet: Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (siyah ok başı). İncet: Normal yapıda spermatozoonlar	69
Resim 45. MSG grubunda germinal epitelde vakuolizasyon (V), lipid damlacıkları (LD) ile Sertoli hücresi (St) gözlemlendi. İncet: Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda ayrılmalar.	70
Resim 46. MSG+APO grubunda normale yakın ince yapıda seminifer tübül germinal epitel organizasyonu ve yer yer lipid damlacıkları (LD) gözlemlendi. İncet: Sertoli hücreleri arasında düzenli yapıda sıkı bağlantılar (siyah ok başı).	71

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Modifiye edilmiş Johnsens'in Histopatolojik Skorlama Parametreleri (52, 53).	23
Tablo 2. MDA analizinde kullanılan çözeltiler.....	30
Tablo 3. GSH analizi çalışma şeması.....	31



ÖZET

Monosodyum Glutamat ile Oluşturulan Testis Hasarında Aposininin İyileştirici Etkisi

Bu çalışmada, monosodyum glutamatın (MSG) testis dokusunda oluşturduğu hasarın ve aposininin iyileştirici etkisinin histokimyasal, immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Sprague Dawley cinsi albino sıçanlar 4 gruba (Kontrol, APO, MSG, MSG+APO) ayrılmıştır. Sıçanlara deney süresi boyunca MSG (120 mg/kg) ve deneyin son 5 günü aposinin (25 mg/kg) solüsyonu verilmiştir. Testis doku örnekleri morfolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler amacıyla, serum örnekleri de biyokimyasal değerlendirmeler amacıyla kullanıldı. Epididimis dokusu da sperm parametrelerini analiz etmek amacıyla kullanıldı. MSG grubunda morfolojik hasar eşliğinde ZO-1 ve okludin immünreaksiyonunda düşüş gözlenirken NOX-2 immünreaksiyonunda artış gözlemlendi. Sperm morfolojisinde hasar, motilitesinde ve sayısında düşüş gözlemlendi. Apoptotik indekste artış görülürken, proliferatif indekste düşüş gözlemlendi. Geçirimli elektron mikroskopik analizde seminifer tübül organizasyonunda ve kan-testis bariyerinde (KTB) dejenerasyon tespit edildi. Testosteron seviyesinde düşüş, FSH seviyesinde ise artış gözlemlendi. MDA seviyesinde artış gözlenirken, SOD ve GSH seviyelerinde düşüş tespit edildi. APO grubunda, tüm değerlendirme kriterleri Kontrol grubuna benzer olarak gözlemlendi. MSG+APO grubunda dejeneratif parametrelerde iyileşme gözlemlendi. Bu çalışmada, MSG tüketiminin testis dokusunda oksidatif stresi arttırdığı, testis morfolojisini bozduğu, apoptozu arttırdığı, hücre proliferasyonunu düşürdüğü ve KTB morfolojisinde dejenerasyona neden olduğu görüldü. Aposininin oluşan morfolojik hasarı ve sperm parametrelerini iyileştirdiği, apoptozu inhibe ettiği ve oksidatif stresi azalttığı gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: Mikroskopi, Monosodyum glutamat (MSG), Aposinin, NOX-2, Kan-testis bariyeri

ABSTRACT

The Healing Effect of Apocynin in Monosodium Glutamate- Induced Testis Damage

In this study, the aim was to examine the detrimental effect of monosodium glutamate (MSG) and healing effect of apocynin on testis tissue by using histological, immunohistochemical, ultrastructural and biochemical methods. Sprague Dawley albino rats were divided into 4 groups (Control, APO, MSG, MSG+APO). MSG (120 mg/kg) was administrated during the experiment and apocynin (25 mg/kg) was administrated in the last 5 days of experiment. Tissue samples were processed for morphological and biochemical investigations whereas serum samples were used for biochemical evaluations. Epididymis was used to analyze sperm parameters. In MSG group, seminiferous tubular damage, decreased occludin and ZO-1 immunoreactivities were observed whereas an increase in NOX-2 immunoreactivity was detected. Motility and number of spermatozoa were low, with damaged morphology. An increase at apoptotic index and a decrease at proliferative index were observed. Based on transmission electron microscopical investigation, deteriorated morphology was detected both in seminiferous tubule and blood-testis barrier (BTB). Testosterone level was decreased and FSH level was increased. While an increase was observed at MDA level, decreased levels of SOD and GSH were detected. In APO group, the mentioned criteria were normal. In MSG+APO group, all the disturbed parameters were ameliorated. Based on the present data, MSG increases the oxidative stress and apoptosis, decreases cell proliferation, causes degeneration in the testicular morphology, as well as in BTB integrity. Apocynin ameliorates the testicular and spermatozoal morphological damage, inhibits apoptosis, and decreases oxidative stress with restored levels of biochemical parameters.

Keywords: Microscopy, Monosodium glutamate (MSG), Apocynin, NOX-2, Blood-testis barrier

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Monosodyum glutamat (MSG), çeşitli gıda ürünlerinde doğal olarak bulunan L-glutamik asitten türetilen ve yaygın olarak kullanılan bir lezzet arttırıcıdır (1). İşlenmiş birçok gıdada bulunan MSG'nin Avrupa'daki gelişmiş ülkelerde günlük ortalama alımı 0.3-1.0 g olarak tahmin edilmektedir (2). Gıda güvenliğini düzenleyici kurumlar, MSG tüketimini güvenli olarak değerlendirmektedirler. Ancak bazı klinik çalışmalarda MSG'nin özellikle kronik kullanımının güvenli olmadığı ortaya konmuştur. Glutamatın fizyolojik fonksiyonları arasında: merkezi sinir sisteminde (MSS) nörotransmitter olarak görev alması ve glutatyon gibi metabolitlerin öncülü olması yer almaktadır (1). Yapılan klinik öncesi çalışmalarda MSG tüketimi ve tümör oluşumları arasında bağlantı olduğu ve MSG'nin oksidatif stresi arttırdığı belirtilmiştir. Uzun süreli MSG kullanımının, erkek üreme sistemini de olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda uzun süreli MSG kullanımının erkeklerde sperm sayısını azalttığı, spermin ve testisin morfolojik yapısını olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (3).

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimi oksidatif stres ve apoptoz oluşumlarını tetiklemektedir. Vücutta antioksidanlar ile serbest radikaller arasındaki dengenin, oksidanlar lehine değişmesi durumu oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (4). Serbest radikaller, reaktif yapıları nedeni ile lipitler, nükleik asitler ve proteinler ile etkileşerek vücuda zararlı etkilerde bulunabilirler (5). Buna bağlı olarak, serbest radikal oluşumundaki artış ve/veya antioksidan savunma sistemindeki yetersizlik sonucu organizmada oksidatif stres gelişir (6). Yapılan çalışmalarda NADPH oksidaz'ın (NOX) ROT'un ana kaynaklarından biri olduğu gösterilmiştir (4). ROT ile oluşturulan oksidatif stresin erkek infertilitesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (7). Erkek üreme sistemindeki aşırı ROT ve oksidatif stres, sperm konsantrasyonunda, motilitesinde ve morfolojisinde olumsuz değişikliklere neden olarak spermelere zarar verir ve semen parametrelerini etkileyerek infertiliteye neden olur (8). ROT, spermdede hem hasarı hem de DNA hasarı oluşturma yolu ile iki şekilde erkek infertilitesine neden olur (9). Oksidatif stres, spermin plazma membranının bütünlüğünü etkiler ve erken kapasitasyonu indükler. Bunun sonucunda spermin fertilizasyon kabiliyeti düşerek, infertilite oluşur (10).

Apocynum cannabinum bitkisinin köklerinden elde edilen aposinin (APO), NADPH oksidaz (NOX) inhibitörü etkisine sahiptir (11). APO'nun anti inflamatuvar etkisi pek çok hücre kültürü ve deneysel hayvan çalışmasında gösterilmiştir (12). Sitozolik bileşenlerin hücre membranına göçüyle NOX aktivasyonu gerçekleşmektedir (13, 14). APO, aktif insan nötrofillerinde NOX aktivitesine etkisi ederek ROT üretiminin seçici bir inhibitörü olarak davranır. Ancak APO fagositoz ya da diğer hücre içi ölüm mekanizmalarını etkilemez (15, 16). NOX izoformları çeşitli hücrelerde eksprese edilir ve çeşitli fizyolojik fonksiyonları bulunur. NOX-2 eozinofil, makrofaj ve nötrofillerde bulunan NOX izoformudur (17).

Spermatogenik hücreler birbirleriyle ve Sertoli hücreleri ile ilişki halindedir. Bu dinamik ilişki sıkı bağlantılar ve ara bağlantılar ile düzenlenir (18). Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar kan-testis bariyerinin, epididimisin epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ise kan-epididim bariyerinin oluşumu ve fonksiyonu açısından önemlidir. Epitel kökenli sıkı bağlantılar, Zonula okludens-1 (ZO-1) ve okludin gibi çoklu integral membran proteinlerini içeren multimoleküler membran özelleşmeleridir (19).

Oksidatif stres, antioksidanların serbest radikallere karşı yetersiz kalma durumudur ve oksidatif hasar, süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzim aktivitesinde ve molekül yapılı antioksidan olan glutatyon (GSH) seviyesinde azalmalar ile şiddetlenir (20). Hücre membran hasarının bir parametresi olan malondialdehit (MDA) reaktif hücrelerdeki oksijen radikali atağı yoğunluğunu ve in vivo serbest radikal metabolizmasını gösterir. Azalan SOD ve artan MDA oksidatif stresi tetikler ve hücrede hasara ve ölüme neden olur (21). Yapılan çalışmalarda, NOX-2'nin ROT'un kaynağı olduğu gösterilmiştir (17, 22). APO güçlü bir NOX-2 inhibitörüdür (23). NOX-2'nin inhibe olması, oksidatif hasara karşı doku hasarının engellenmesinde etkili olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, hipoksi sonucu oluşan testis hasarında NOX-2 aktivasyonunun ve MDA seviyesinin arttığı, GSH seviyesinin ise düştüğü gözlenmiştir. Ancak APO uygulaması ile doku hasarının azaldığı ve ilgili parametrelerde düzelme olduğu gösterilmiştir (24). Yapılan başka bir çalışmada ise, iskemi-reperfüzyon ile oluşturulan testis hasarında MDA seviyesinin arttığı, SOD, GSH ve GSH peroksidaz aktivitesinin azaldığı ve beraberinde dokuda histopatolojik

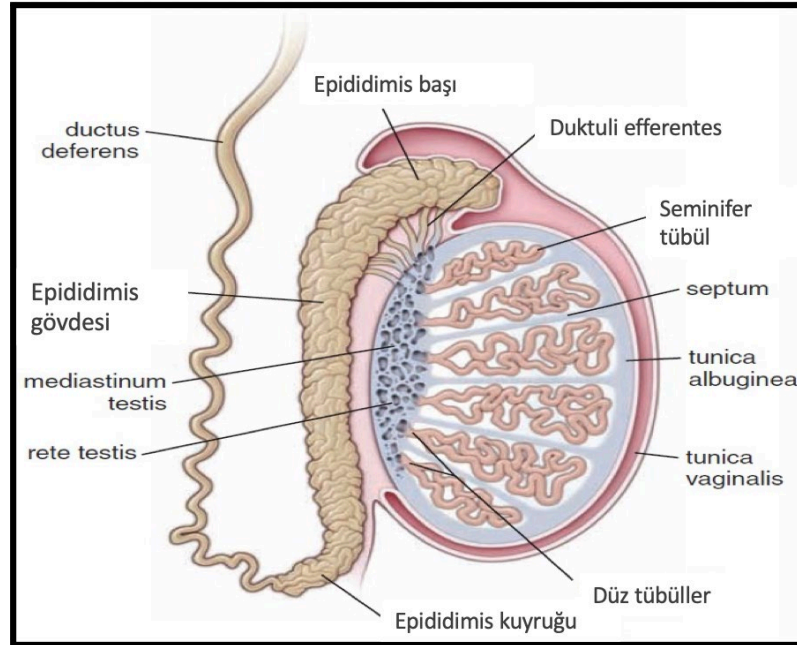
hasar meydana geldiği gözlenmiştir. APO uygulamasının ise bu oksidatif stres parametreleri ve histopatolojik hasar üzerine iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (25).

Çalışmamızda uyguladığımız MSG ile oluşturulan deneysel testis hasarı modelinde, özellikle spermatogenik hücre proliferasyonu, apoptoz, oksidatif stres ve kan-testis bariyeri üzerine MSG'nin dejeneratif etkisi gösterilmiş olup, MSG uygulaması sonucu bozulmuş testis dokusu morfolojisi ve kan- testis bariyeri yapısı üzerine aposininin iyileştirici etkileri histokimyasal immunhistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal yöntemler eşliğinde ilk kez gösterilmiştir. Aposininin kullanımının özellikle erkek infertilitesini önlemeye yönelik ileriki çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Testis Histolojisi

Testisler erkek üreme sisteminin bir parçasıdır. İki temel fonksiyonu, erkek gametlerinin oluşması (spermatogenez) ve cinsiyet hormonlarının sentezlenmesidir (steroidogenez). Erişkin testisler iki adet, oval şekilli, skrotumda vücut kavitesinin dışında yerleşiktir. Testisler tunika albuginea olarak adlandırılan alışılmadık bir şekilde kalın olan sıkı bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Bu kapsülün iç kısmında kan damarları içeren gevşek bağ dokusu tabakası olan tunika vasculosa bulunur. Her bir testisin peritondan gelişmiş seröz kesesi vardır. Bu kese tunika vajinalis olarak isimlendirilir. Tunika vajinalis, tunika albugineayı yan ve ön taraflardan saran iç viseral ve dışta skrotumu döşeyen pariyetal tabakadan oluşur. Testisin arka yüzünde tunika albugine kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Buradan bezin içine giren bağ dokusu uzantıları (septum), testisi bölmelere ya da lobüllere ayırır (Şekil 1). Bu septumlar yaklaşık 250 adet piramidal bölme oluşturur. Her bölmede miktarı 1 ile 4 arasında değişen seminifer tübüller ve interstisyel (Leydig) hücrelerinin bulunduğu gevşek bağ dokusu stroması bulunur. (26).



Şekil 1. Testis ve epididimis yapısı (26).

2.1.1 İnterstisyel doku

Seminifer túbülleri arasında bulunan gevşek bağ dokusuna interstisyel doku denir. Bu doku içerisinde Leydig hücreleri, fibroblast, kan damarları ve lenf damarları ve içerir.

Leydig hücreleri, puberte döneminde poligonal ya da geniş yuvarlak şekilli, çekirdekleri merkezi olmakla birlikte sitoplazmalarında yağ damlacıkları içerir (27). Steroid bir hormon olan testosteron salgırlar. Steroid salgılayan hücreler gibi Leydig hücreleri de eozinofilik özellik katan düz endoplazmik retikulum (DER) içerir. Testosteronun salgılayan enzimler DER ve mitokondri ile ilişkilidir (26).

2.1.2 Seminifer túbüller

Her bir seminifer túbül yaklaşık 50 cm uzunluğunda, 150 – 250 μm çapındadır. Her bir testiste 250 – 1000 arası seminifer túbül bulunur. Sperm üretiminin olduğu yerdir. Lobüllerdeki túbüller oldukça kıvrımlıdır ve kısa ve dar olan düz túbüller aracılığıyla rete testis denilen mediastinum testise gömülü, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirent yapısına bağlanırlar. Rete testis kanalları, 10 – 20 adet arası duktuli efferentes ile epididimis yapısının baş kısmına bağlanmıştır. Her bir seminifer túbül özelleşmiş, çok katlı bir epitel ile sarılmıştır ve spermatogenik veya germinal epitel olarak adlandırılır. Bazal membran fibröz bağ dokusu ile sarılmıştır. En iç katmanda túbüllerin zayıf bir şekilde kasılmasını sağlayan düz kas hücresi özellikleri gösteren yassı miyoid hücreler bulunur. Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olmak üzere germinal epitel iki çeşit hücre popülasyonundan oluşur (27).

2.1.2.1 Spermatogenik hücreler

Spermatogenik hücreler, spermatogenez olarak adlandırılan bir süreçten geçerek farklılaşmış olgun sperm hücresine dönüşür. Spermatogenez süreci üç fazdan oluşur. Bunlar sırası ile; spermatogonyal faz (spermatositogenez), spermatosit faz (mayoz bölünme) ve spermatid fazdır (spermiyogenez).

Spermatogonyal fazda, sperm kök hücreleri olan spermatogonyumlar mitoz bölünme ile sayılarını çoğaltırlar ve devamında primer spermatositlere dönüşürler. Bu

kök hücreler diploiddir ve seminifer tübüllerin bazal laminasında yerleşiktir. Spermatozonyumlar rutin histolojik preparatlarda çekirdek görünüşlerine göre üç tipi vardır;

- Koyu tip A spermatozonyum, granüllü kromatini olan yoğun bazofilik özellik gösteren oval çekirdeğe sahiptirler. Düzensiz aralıklarla bölünüp ya koyu tip A spermatozonyum olarak diğer bir deyişle kök hücre olarak kalırlar ya da açık tip A spermatozonyuma dönüşürler.
- Açık tip A spermatozonyum, oval çekirdekleriyle ve içeriğinde ökromatin olmasından dolayı açık bir boyanma gösterirler. Çok sayıda mitoz bölünme geçirerek sayılarını arttırlar. Bölünmeler sonucunda ya aynı tipte kalırlar ya da tip B spermatozonyum oluştururlar.
- Tip B spermatozonyum, yuvarlak çekirdekleri ile yoğun kromatinleri vardır. Mitoz bölünmeler geçirerek primer spermatozytlere dönüşürler ve spermatozonyal faz sonlanır.

Spermatozonyal fazda, koyu tip A spermatozonyumlar açık tip A hücrelere dönüşürken yeni oluşan hücreler arası sitoplazmik köprüler oluşur. Bu köprüler spermatozyenez süreci boyunca bulunurlar ve bölünmelerin senkronize olarak devam edebilmesi için çok önemlidirler.

Spermatozyt fazında, diploid olan primer spermatozytler kromozom ve deoksiribonükleik asit (DNA) miktarlarını azaltmak için iki mayoz bölünme geçirirler. Birinci mayoz bölünme sonucu oluşan haploid hücrelere sekonder spermatozyt denir. Sekonder spermatozytler ikinci mayoz geçirerek spermatidleri oluşturur.

Spermiyogenez fazında, spermatidler başka bölünme geçirmeden olgun sperm oluşturmak için farklılaşma geçirirler. Sonucunda yine haploid hücreler oluşur ve bu önemli özellik, spermin oositi döllerken kromozom sayısının korunmasını sağlar. Olgunlaşma sürecinde spermatidler morfolojik değişiklikler geçirirler. Organellerin organizasyonunun değişmesi, flagellum oluşması ve sitoplazma hacminin değişmesi bu değişiklikler arasındadır. Sonuç olarak olgun spermatozoon denilen olgun sperm oluşur. Spermatozoonlar seminifer lümene salınır ve testis kanalları boyunca yolculuğu başlar (26).

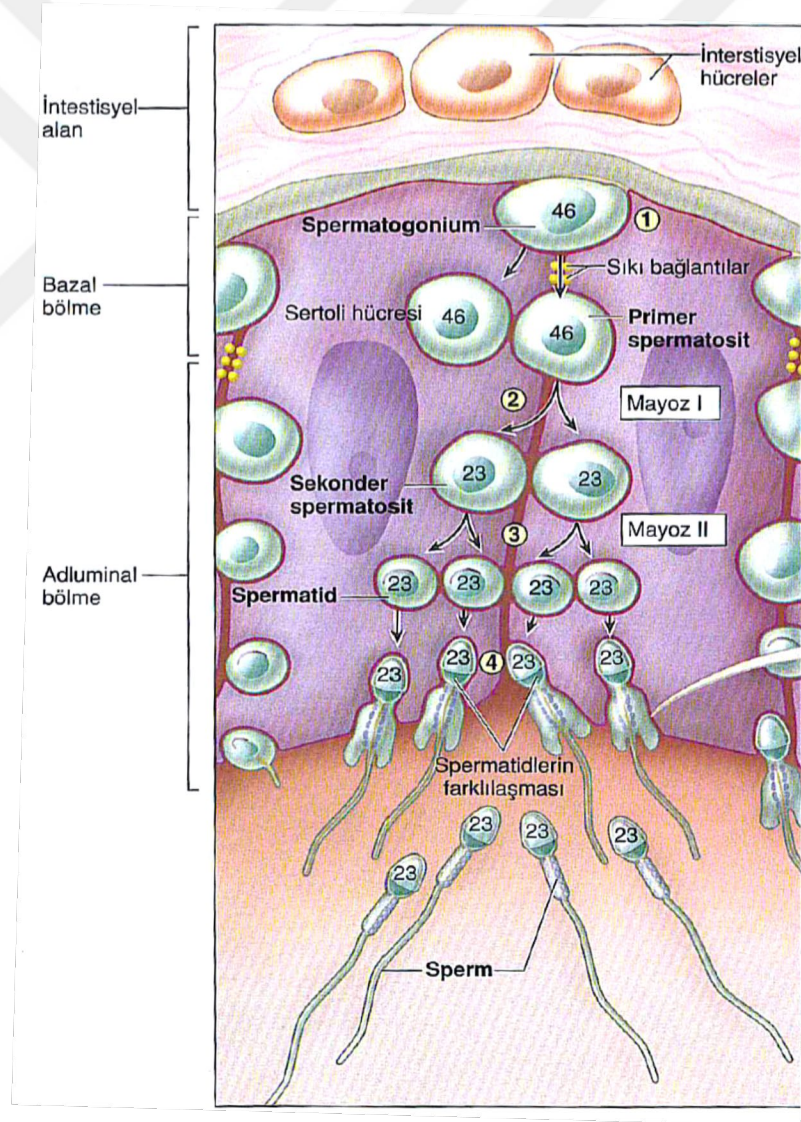
2.1.2.2 Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri sadece seminifer tübüllerde bulunan uzun piramidal veya prizmatik özelleşmiş epitel hücreleridir. Seminifer tübüllerin içini döşer ve spermatogenik hücre serisi bu hücrelerin uzanan yüzeyi ile yakın ilişki içerisinde. Germ hücrelerine fiziksel ve metabolik destek sağlamakla birlikte endokrin ve ekzokrin salgılama da yapar. Bazal laminaya üzerine oturmuş bir yerleşimleri vardır ve lümeneye doğru uzanırlar. Spermatogenezin değişik aşamalarına bağlı olarak değişebilen kompleks şekilleri vardır (28). Her bir Sertoli hücresi 30 – 50 arası bölünmeler geçirip olgunlaşmaya başlayan germ hücrelerini destekler. Rutin preparatlarda bu hücrelerin sınırları belirgin değildir. Çekirdeklerinin üçgen ya da oval şeklinde olması, ökromatik boyanması ve belirgin çekirdekçiklerinin olması Sertoli hücrelerini komşu spermatogenik hücrelerden ayıran özelliklerindedir. Bol miktarda DER, gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda lizozom ve mitokondriyon içerir. Komşu Sertoli hücrelerinin birbirleri ile sıkı bağlantılarla yakın ilişkide olmaları kan- testis bariyeri olarak adlandırılan bir yapıyı oluşturur (27).

2.1.3 Kan- testis bariyeri

Kan-testis bariyeri (KTB), memeli vücudunda bulunan en sıkı bariyerlerden birisidir. Seminifer tübül epitelinde, Sertoli hücrelerinin bazolateral membranları arasındaki sıkı bağlantılar ile bu yapı oluşur. Memeli testislerinde bazal membrana yakın konumlanmıştır. KTB seminifer tübül epitelini bazal bölge ve adluminal (apikal) bölge olmak üzere iki bölüme ayırır. KTB yapısında sıkı bağlantılar, dezmozomlar, bazal ektoplazmik özelleşmeler ve ara bağlantılar bulunur. Okludinler sıkı bağlantıyı oluşturan moleküllerden biridir ve zonula okludens proteinlerinden olan zonula okludens-1 (ZO-1), ZO-2 ve ZO-3 bu yapıya katkı sağlayan önemli proteinlerdendir. ZO-1, 225 kDa'luk bir proteindir ve sıkı bağlantıların yüzeysel bölgelerinde bulunur. Aktin filamentlerine bağlanarak hücre iskeletiyle etkileşime girer. Okludin ZO-1 ve ZO-3 ile aktin hücre iskeleti etkileşim halinde bulunur. ZO-3 proteini, ZO-1 ve okludinin sitoplazmik alanları ile ilişki halindedir (26). Okludin 65 kDa'luk bir proteindir. Sıçan testisi ve epididimisini de içeren farklı tip epitelde bulunur. Sıkı bağlantı bariyerinde yer alan okludin kan-testis bariyerinin regülasyonunda önemli rol oynar (19). Bu bariyerin varlığı sayesinde seminifer tübülleri içerisinde sadece Sertoli

hücreleri ve farklı aşamalarda olan spermatogonik hücreler bulunur. Leydig hücreleri, rezidual makrofajlar ve damarlar interstisyel bölgede bulunur (29). Spermatogonyumlar seminifer tübüllerin bazal bölgesinde yer alır. Bazal bölgede mitoz geçiren hücreler bulunurken, adluminal bölgede mayoz geçiren spermatogonik hücreler bulunur. Bu hücreler mitoz ve mayoz bölünmeleri geçirerek olgunlaşmaya başlayıp, adluminal bölgeye göç ederek lümene doğru yol alırlar. Spermatogonyumlar mitoz bölünme ile primer spermatozite dönüşürken kısa süreliğine bariyerin sıkı bağlantılarını ayırır ve adluminal bölgeye geçer (Şekil 2). İyon değişimini sağlayan ara bağlantılar (gap junction) sıkı bağlantı noktalarının geçici değişikliklere uğramasına yardımcı olur (27) .



Şekil 2. Kan- testis bariyeri (27).

Sertoli hücrelerinin KTB' yi oluşturmasının yanı sıra temel fonksiyonları şu şekildedir:

- KTB ile yeni spermatogenik hücelere karşı otoimmün yanıt oluşturması önlenir ve güçlü bir koruma sağlanır.
- Sertoli hücreleri germ hücrelerinin farklılaşp olgunlaşması için gereken plazma faktörlerini sağlar.
- Yeni üretilen spermin dışarıya taşınabilmesi için gerekli sıvı Sertoli hücreleri tarafından salgılanır.
- Embriyonik gelişim sırasında erkek cinsiyetinin gelişmesi için gerekli olan anti müllerian hormonu salgılar.
- Spermiyogenez sırasında açığa çıkan artık cisimler Sertoli hücrelerinin lizozomları tarafından fagosite edilir (27).

2.2 Epididimis'in Histolojisi

Epididimis, testisin posterior ve superior yüzeyleri boyunca uzanan, hilal şeklinde bir yapıdır. Uzunluğu 7.5 cm'dir. Duktuli efferentes ve epididimis kanalını içerir. Baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölgeden oluşur. Duktuli efferentes baş bölgesini, epididimis kanalı ise gövde ve kuyruk bölgesini oluşturur. Epididimis kanalı çok kıvrımlıdır ve 4 – 6 m arası uzunluktadır. Yeni üretilmiş spermiler, 2 – 4 hafta arası epididimis kanalından geçer ve bu süreçte akrozom olgunlaşır, bağımsız olarak ileri doğru hareket ve fertilizasyon yeteneği kazanır (26).

Epididimis kanalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşenmiştir. İki çeşit hücre vardır. Bunlar; esas hücreler ve bazal hücrelerdir. Bazal hücreler, bazal laminada bulunan yuvarlak ve küçük hücreler olup kanaldaki epitelin kök hücreleridir. Esas hücrelerde ise lümene bakan yüzeylerinde modifiye mikrovilli olan stereosilyalar bulunur. Bu yapılar glikolipid ve glikoprotein salgırlar. Epididimis kanalının epiteli içte ve dışta uzunlamasına düz kas hücre tabakasıyla sarılmıştır. Kuyruk kısmında ise dairesel kas tabakası bulunur. En dışta kan damarları ve bağ dokusundan zengin tunika vajinalis ile çevrilidir (27, 30).

2.3 Testiste Endokrin Faktörler

Spermatogenez sürecinde etkili olan endokrin hormonlar testosteron, luteinizan hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormondur (FSH).

Testosteron, Leydig hücreleri tarafından sentezlenir. Erken fetal hayatta Leydig hücreleri farklılaşarak bu hormonu üretir. Testosteron salgılanması, embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu için gereklidir. Embriyolarda testosteron salgılanması erkek fetüste, gonadların gelişimi için gereklidir. Ergenlik döneminde bu hormonun salgılanması spermatogenez sürecinin başlatılmasında, ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesi ve yardımcı bezlerin salgılama yapmasında görev alır. Yetişkinlik döneminde ise spermatogenez sürecinin sürekliliğinin sağlanmasında rol alır (26).

Hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormonun salınması ile hipofizin ön lobu uyarılır. Uyarılma sonucu FSH ve LH salgılanır. LH, hipofizden salınan bir gonadotropin hormondur. Ergenlik döneminde LH' in üretilmesi ile Leydig hücreleri uyarılır ve testosteron salgılanması başlatılır. Bu hormonlar erkek üreme sisteminde, cinsiyet gelişiminin ve üreme fonksiyonunun devamlılığının sağlanmasında rol alır (31).

2.4 Oksidatif Stres

Süperoksit radikalleri $O_2^{\bullet-}$, hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH^-) ve tekli oksijenler 1O_2 reaktif oksijen türleri (ROT) olarak tanımlanırlar. Biyolojik sistemlerde metabolik yollarda ara ürün olarak açığa çıkarlar. Protein fosforilasyonu, transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu, apoptoz, immün yanıt ve farklılaşma gibi biyolojik süreçler gerekli miktarda ROT sentezine bağlıdır. Hücre içindeki miktarları çok az seviyede olmalıdır. Serbest radikaller ile hücrenin bu radikallerinden kurtulabilme kapasitesi arasında bir dengesizlik başlayınca oksidatif stres (OS) oluşur. ROT üretimi olması gerekenin üstünde bir miktara çıkınca önemli hücresel yapılara zararlı etkileri olmaya başlar. Zarar gören bu hücresel yapılar proteinler, lipidler ve DNA'dır.

ROT üretimi enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla üretilir. Süperoksit radikalleri ($O_2^{\bullet-}$) NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve peroksidazlar tarafından üretilir. Üretimleri gerçekleşince H_2O_2 ve OH^- oluşturan reaksiyonlarda yer alır. İn vivo' da en reaktif serbest radikal türü OH^- 'tır.

Hidroksil radikalının aşırı artışı sonucunda lipid peroksidasyonu gerçekleşir. Bu olay hücre membranına ve lipoproteinlere zarar verir. Bu durumu takiben, hücre için sitotoksik ve mutajenik olan malondialdehit (MDA) ve konjuge dien bileşiklerinin formasyonu başlar. Lipid peroksidasyonu, radikal zincir reaksiyonu olduğu için hızlı bir şekilde ve çok miktarda lipid moleküllerine zarar vererek gerçekleşir. Proteinler de OS sonucu, konformasyonel modifikasyonlar geçirerek zarar görebilir. Bu durum da enzimatik aktiviteyi olumsuz etkiler (32).

ROT'ların çoğunluğu, mitokondriyonlarda hücre solunum esnasında O_2 'nin açığa çıkması ile oluşur. Organellerin, intrinsik ROT savma kapasitelerine sahip olmalarına rağmen mitokondriyonların ürettiği ROT miktarına yetecek miktarda olmadıkları bilinmektedir. Hücreler, enzimler ve düşük ağırlıklı moleküller aracılığıyla ROT ile oluşturulan hücre hasarına karşı savaşırlar. Molekül yapılı antioksidanlardan biri glutatyon (GSH) iken, enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidazdır (32-34).

2.5 İnfertilite

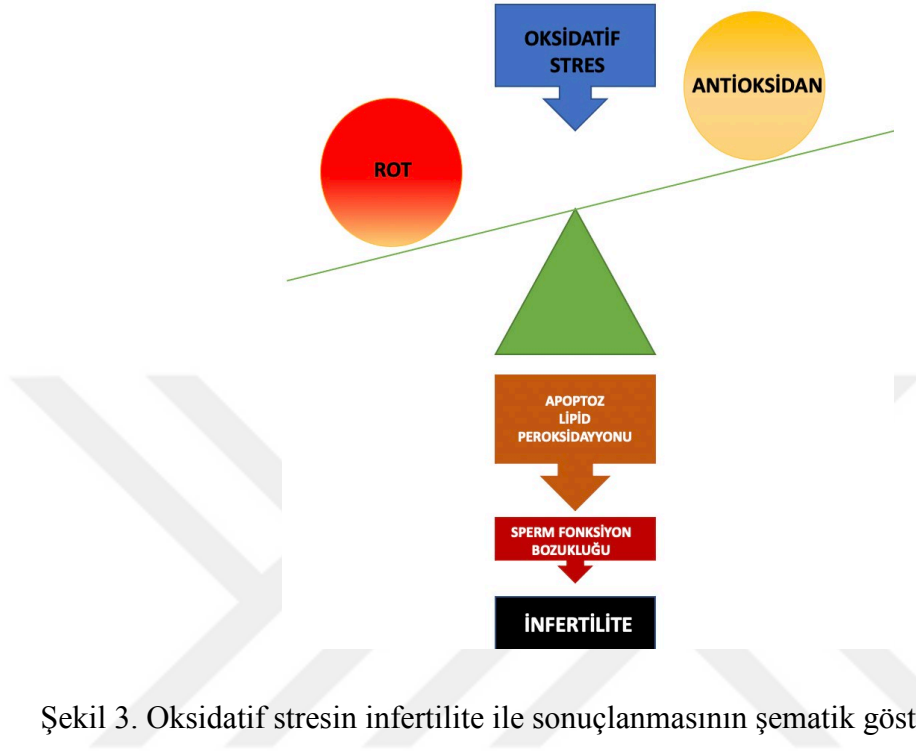
İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre 12 ay boyunca düzenli, korunmasız cinsel ilişki sonucunda gebelik görülemediği durumu ifade eder. İnfertilite dünya çapında ciddi bir soruna dönüşmeye başlamıştır ve üreme bakımından aktif olan yaş grubunun %8-12'si infertiliteden etkilenmektedir (35). Lancet Global Burden of Disease Resource Center tarafından yapılan ve 195 ülkeyi kapsayan bir araştırmada, 1990 ve 2007 yılları arasında infertilite görülme prevalansı kadınlarda yıllık %0.370, erkeklerde ise %0.291 oranında artmıştır (36). Çoklu sebepler ve risk faktörleri erkek infertilitesinin insidansının gittikçe artmasına yol açmaktadır. Bunlar konjenital, sonradan kazanılmış ya da idiopatik sebepler olabilir (35).

Erkek infertilitesi etiyolojisinde, OS'nin önemli bir etken olduğu (Şekil 3) anlaşılmıştır (37). Yapılan bir çalışmada, yıkanmış insan semeninde ROT'ların varlığı kanıtlandıktan sonra birçok çalışmada seminal OS'nin erkek üreme kapasitesinde önemli bir faktör olduğu kanıtlanmıştır. ROT üretimi artınca hücre membranında lipid peroksidasyonu, mitokondriyon ve nukleus DNA fragmentasyonu ve apoptoz gerçekleşir. Bunların gerçekleşmesi ile sperm parametreleri ve erkek fertilitesi olumsuz etkilenir(38-41). Az miktarda ROT sperm hücrelerinin normal fizyolojik fonksiyonlarında, spermatogenezde ve kapasitasyon, akrozom reaksiyonu gibi fertilizasyon için gerekli olan aşamaların sorunsuz bir şekilde gerçekleşmesi için gereklidir. Ancak miktar açısından antioksidan seviyesini geçtiğinde üreme kapasitesini negatif yönde etkileyebilir. Bir başka çalışmada, idiopatik infertil erkeklerin %83,8'inde yüksek OS olduğu tespit edilince, erkek oksidatif stres infertilitesi (MOSİ) terimi ortaya atılmıştır (37). Otuz yedi milyon idiopatik infertil olan erkeği etkileyen MOSİ'de, yüksek OS'nin yanı sıra semen özelliklerinde de değişiklikler gözlenmektedir (35).

Spermatozoonun plazma zarı, akışkanlık sağlayan oldukça yüksek miktarlarda çoklu-doymamış yağ asitleri (PUFAs) içermektedir. Bu özelliğinden dolayı spermatozoonlar OS'ye çok duyarlı olabilmektedir. ROT'lar, PUFAs' a saldırıp radikal zincir reaksiyonu denilen bir döngü başlatır. Bu döngü, PUFAs'ın konjuge olmayan çift bağlı gruplarının ROT'ların elektrofilik saldırılarına uğramasından oluşur. Bunun sonucunda MDA oluşur. MDA bir OS belirteçidir. Proteinlerdeki pozitif yüklü hidrofilik aminoasitlerle reaksiyona girerek mitokondriyonlarda regülasyon bozukluğuna yol açar ve mitokondriyon iç zarında da OS'ye yol açar (42).

Birçok faktör MOSİ' ye yol açabilir. Ancak seminal plazmadaki OS' nin en önemli kaynağı lökosit ve olgunlaşmamış spermatozoondan kaynaklanmaktadır. Spermiyogenez sırasında olgunlaşmakta olan spermatozoon sitoplazmasının fazlası Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Ancak bu sürecin duraklaması sonucunda olgunlaşmamış spermatozoon orta parçasında sitoplazma fazlalığı oluşmaya başlar. Bunun sonucunda da aşırı ROT üretimi başlar. Biriken sitoplazma nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) formasyonuna yol açar. NADPH, ROT oluşumunu iki yolak ile yapar. Birincisi, zar bağımlı NADPH-oksidad enzimi oksijeni süperoksit

anyonu oluşturmak için kullanır. Bu anyon, devamında da daha reaktif olan hidrojen peroksit ortaya çıkar. İkinci yolakta ise NADPH dehidrogenaz ROT oluşumunda rol alır (42).



Şekil 3. Oksidatif stresin infertilite ile sonuçlanmasının şematik gösterimi (38).

İnfertilite teşhisinde, hormon testleri yapmakta önemli bir aşamadır. İlk aşamada testosteron ve FSH testleri yapılmaktadır. Total testosteron seviyesi düşük olduğu takdirde LH testide yapılmaktadır (35).

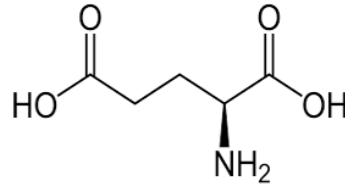
2.6 Apoptoz

Çok hücreli canlılarda, mitoz ile ortaya çıkan yeni hücre sayısı ile hasarlı hücre sayısı arasındaki homeostatik dengeyi sağlamak için devamlı bir döngü vardır. Bu süreç hücre ölüm yolları ile kontrol edilir. Apoptoz, genetik kontrollü bir programlı hücre ölümüdür. Oluşan zararlı olma potansiyeli olan hücreleri ya da ömrünü doldurmuş, işlevi olmayan hücreleri ortadan kaldırmak için normal koşullarda gerçekleşebilen bir süreçtir. İnsan vücudunda günde yaklaşık 1×10^9 hücre apoptoza uğrar. Birçok hücre ölüm yolağından biri olan apoptoz enzim bağımlı biyokimyasal bir süreçtir. Bu süreç çevre dokulara minimum zarar verecek şekilde gerçekleştirilir (43). Bu yolakta, hücre kendi nükleer DNA'sını, nükleer ve sitoplazmik proteinleri

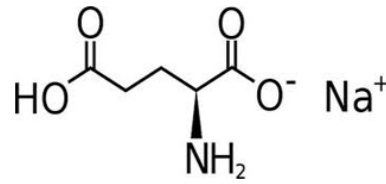
yıkıma uğratacak enzimleri aktive eder. Yıkıma uğrayan hücreden çıkan apoptotik fragmentler fagositoz ile fagosite edilir (44). Apoptoz, spermatogenez süreci için oldukça önemlidir. Spermatogenez sürecinde germ hücre popülasyonunu sınırlar ve germ hücrelerinin Sertoli hücrelerine oranının optimal düzeyde tutulmasını sağlar. Spermatozoonda ROT' lar devamlı olarak üretilir ve OS oluşturur (45). ROT' lar çift zincirli DNA kırılmalarını indükler ve DNA fragmentasyonu sonucu fizyolojik programlı hücre ölümü olan apoptoz tetiklenir (38).

2.7 Monosodyum Glutamat

Monosodyum glutamat (MSG), dünya çapında lezzet arttırıcı olarak kullanılan glutamik asitin sodyum tuzu türevidir. Genellikle beyaz toz halindedir. MSG aminoasitler ile aynı temel yapıya sahiptir. Bir amin grubu (-NH₃) ve karboksilik grup (-COO-) yerine karboksilat iyonuna sahiptir. Hemen hemen glutamat ile aynı kimyasal yapısı vardır. Tek farkları MSG' de karboksilik zincirde bulunan hidrojen atomu yerine sodyum atomu vardır (Şekil 4 ve 5) (46).



Şekil 4. Glutamat yapısı (46).



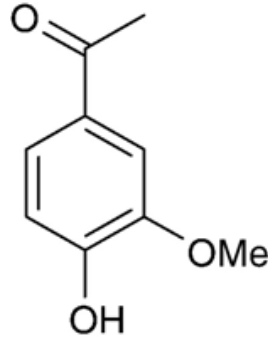
Şekil 5. MSG yapısı (46).

MSG, dilde bulunan dört temel tat olan ekşi, tatlı, tuzlu, acı dışında beşinci tat olan 'Umami' tarafından algılanır (1). Yapılan bir çalışmada, insan dilinde Umami bölgesinde özel glutamat tadı reseptörleri olduğu keşfedilmiştir (47). Umami Japoncada lezzetli tat anlamına gelmektedir ve 1909 yılında Japon Profesör Kikunea

İkeda tarafından keşfedilmiştir (46). Keşfedildiğinden bu yana, önce Asya daha sonra Avrupa ve Amerika'da yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. MSG birçok işlenmiş gıdaya katkı madde olarak ilave edilmektedir. Bazen bu gıdalar MSG ambalajda içindikiler kısmına etiketlenmeden satılmaktadır (48). Avrupa ülkelerinde, insanlarda günlük MSG alımı ortalama 0,3- 1 gram olarak belirlenmiştir. Birçok ülkede gıda güvenliği ile ilgili düzenlemeler yapan kurumlar MSG' yi tüketmek için güvenli bir ürün olarak tanımlamaktadır. Fakat araştırmacılar endojen glutamatın birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynadığı bilgisinden yola çıkarak kronik olarak tüketilmesinin klinik öncesi ve klinik araştırmalar eşliğinde ne kadar güvenli olduğunu sorgulamışlardır (1). Araştırmalar sonucu MSG'nin OS'yi indüklediği, obeziteye ve karaciğerde toksisiteye yol açtığı gözlemlenmiştir (46). MSG'nin erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, OS artışına paralel olarak sperm parametrelerinin olumsuz olarak etkilendiği, testosteron, FSH ve LH hormon düzeylerinde dengesizlik ve seminifer tübüllerde ve epididimis morfolojisinde değişiklikler gözlemlenmiştir (48).

2.8 Aposinin

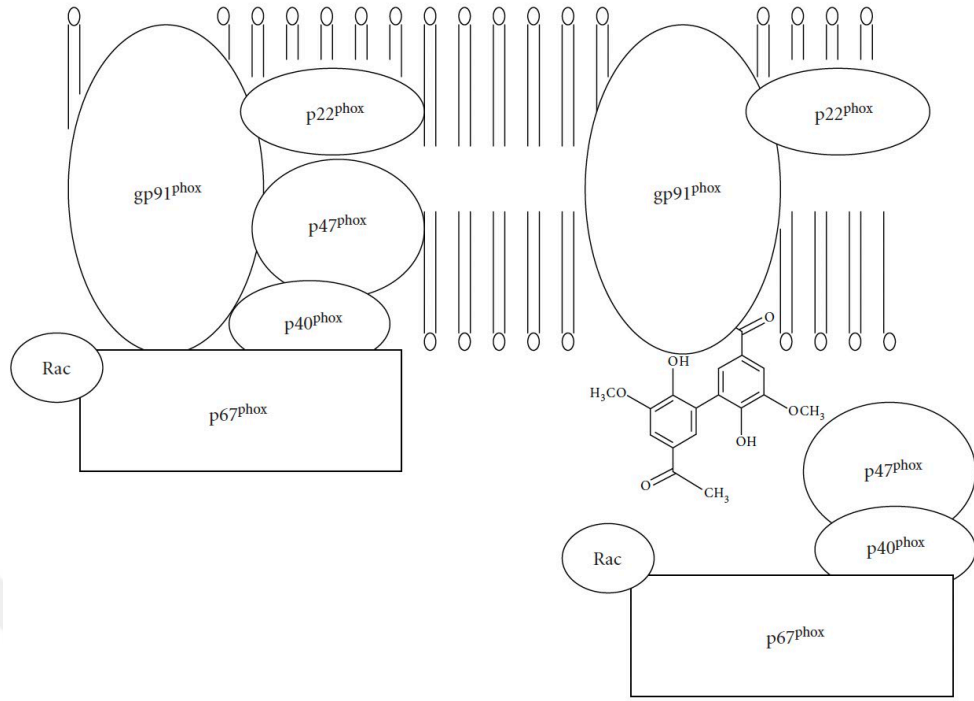
Aposinin (4- hidroksi- 3- metoksiasetofenon, acetovanillone) (şekil 6), ilk olarak *Apocynum* türlerinden izole edilmiştir (49).1883 yılında Schmiedeberg tarafından keşfedilmiştir ve *Apocynum cannabinum* (Kanada keneviri) bitkisinin köklerinden elde edilmiştir. Bu bitkinin özleri halk arasında iyileştirici madde olarak kullanılmıştır (49). 1971 yılında, Himalaya bölgesinde yetişen *Picrorhiza kurroa* kökünün özünden yapılan izolasyon sonucunda bu bitkinin immünomodulator bileşenlerinden olduğu keşfedilmiştir ve tanımlanmıştır. Aposinin molekül ağırlığı 166.7 olan bir asetofenondur ve su ile kristalizasyonu sonucu diken görünümlü bir yapı oluşturur. Erime sıcaklığı 115 °C 'dir (23).



Şekil 6. Aposinin yapısı (50).

Picrorhiza'dan ekstrakte edilen aposininin hiçbir yan etkisi olmadığı bildirilmiştir. Uzun süreli hayvan deneylerinde de zararlı yan etkiler göstermediği için, güvenilir bir madde olarak kabul edilmektedir. Aposininin çeşitli in vitro ve deneysel hayvan modellerinde güçlü bir antioksidan ve anti-inflamatuvar etkisi olduğu gözlemlenmiştir (49). NADPH-oksidaz (NOX) enzimi ROT üretiminden sorumludur. Bu enzimin inhibisyonu, birçok hastalığın tedavisinde kullanılmak için ilgi çekici bir terapötik hedef olabilmektedir (23). Yapılan bir çalışmada aposininin, aktive olmuş nötrofil ve eozinofillerde NOX enzimi tarafından üretilen süperoksite karşı eşsiz bir inhibitör etkisi olduğu gözlemlenmiştir (15). Aposininin NOX inhibitörü olma özelliğiyle birçok inflamatuvar hastalıkta terapötik ajan olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (23). Nötrofil oksidatif patlamanın ve nötrofil aracılı oksidatif hasarın indirgenmesi aposininin in vitro anti-inflamatuvar etkileri arasında olduğu gözlenmiştir (51).

Aposinin, hücre membranında bulunan NOX kompleksinin iki kritik sitozolik komponentinin hücre içi translokasyonunda inhibitör etki gösterir (13). NOX'un yapısında iki membrana bağlı komponent (gp91phox ve p22phox), üç sitozolik komponent (p67phox, p47phox ve p40phox) ve düşük molekül ağırlıklı G proteini (rac1 ya da rac21) bulunur (Şekil 7) (50). Sitozolik komponent olan p47phox'un membrana göçü fonksiyonel NOX kompleksin oluşumunda kritik bir aşamadır. Aposinin, p47phox'un membrana göçünü bloke ederek NOX tarafından O_2^- salınımını engeller (11).



Şekil 7. NOX'un apocynin tarafından inhibisyon mekanizması (23).

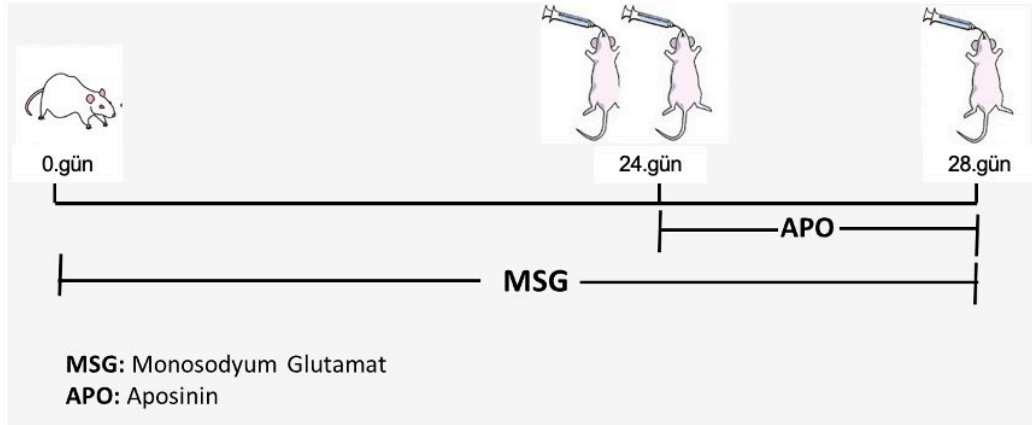
3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

DeneySEL çalışma kapsamında Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (ACU- HADYEK) onay alındı (HDK-2020/39). Bu çalışmada Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezinden (ACU- DEHAM) alınan 32 adet, 8 haftalık, Sprague Dawley erkek albino sıçanlar kullanıldı. Deney süresince $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve standart aydınlık/karanlık (12/12 saat) döngüsü sağlayan kafeslerde tutulan sıçanlar standart hayvan yemi ile 28 günlük deney süresi boyunca ad libitum beslendi.

3.1.1 Deney grupları

Bu çalışmada dört deney grubu oluşturuldu (Şekil 8).



Şekil 8. Deney modeli şeması.

Deney grupları;

Kontrol grubu (K) (n=8): Bu grubu oluşturan, sıçanlara 28 gün boyunca 1 ml distile su gavaj yolu ile verildi

Aposinin grubu (APO) (n=8): Bu gruptaki sıçanlara 24. günden itibaren gavaj yoluyla 5 gün boyunca 25 mg/kg dozunda %8'lik dimetil sülfoksit (DMSO) (Katalog No: WAK-DMSO-70, Wak- Chemie, Germany) ile hazırlanan aposinin (Katalog No: sc-203321, Santa Cruz, California, U.S.A.) verildi.

Monosodyum glutamat grubu (MSG) (n=8): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca gavaj yolu ile distile suda hazırlanan 120 mg/kg dozunda MSG (Katalog No: G1626, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) verildi.

Monosodyum glutamat ve aposinin grubu (MSG + APO) (n=8): Bu gruptaki sıçanlara 28 gün boyunca 120 mg/kg dozunda distile suda hazırlanan MSG solüsyonu verildi. Bu grubu oluşturan sıçanlara 24.günden itibaren 25 mg/kg dozunda %8'lik DMSO'da hazırlanan aposinin solüsyonu verildi.

Deneye başlamadan önce ve deney süresi boyunca her hafta sıçan ağırlıkları ölçüldü. Ayrıca, diseksiyon sırasında tüm gruplardan çıkarılan testislerin ağırlıkları belirlendi.

3.1.2 Testis dokusu ve kan örneklerinin elde edilmesi

Tüm gruplarda deney hayvanlarının diseksiyonu, 28 günlük deney süresinin bitiminde ketamin (0.9 cc/kg) ve ksilazin (0.9cc/kg) ile derin anestezi altında gerçekleştirildi. Biyokimyasal değerlendirmeler için kalpten kan alındı ve sol testisin yarısı kullanıldı. Mikroskopik incelemeler için sol testisin geriye kalan yarısı ve sağ testis kullanıldı. Epididimis dokusu sperm sayımı ve sperm morfolojisinin incelenmesi için alındı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Sperm sayımı, motilitesi ve morfolojisi

Sıçanların sol epididimis örnekleri disekte edilmelerini takiben Hepses tampon solüsyonu eklenmiş Earle's Balanced Salts solüsyonu içerisine alındı. Semen incelemesi yapmak için epididimis dokusu küçük parçalara ayrıldı. Oluşan doku-sıvı karışımı tüplere alınarak (5 ml) çöktürme işlemi uygulandı. Dokuları beş dakika çöktürme işleminden sonra süpernatant kısmı alındı. Gradient yöntemi kullanılarak 18 dakika 1800 devir/dakikada santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Örneğin 0,5 ml'lik kalan kısmının üzerine, 2 ml'lik sperm yıkama medyumu eklenerek 10 dakika 2000 devir/dakikada santrifüj edildikten sonra süpernatantı atıldı. Elde kalan pellete 0,3 ml

fertilizasyon medyumunu eklendi. Ardından Makler sayım kamarasına bir damla damlatılıp, 100 karedeki tüm sperm sayıldıktan sonra bir milyon ile çarpıldı. Kalan sperm örneği semen yayma yöntemi ile ince bir katman olacak bir şekilde yayarak kurutuldu. Hücrelerin fiksasyonu ve dehidrasyonu için etanol kullanıldı. Örnekler Diff- Quik boyası (GCC Diagnostics, U.K.) ile boyandı. Her preparatta 100 sperm seçilerek baş, boyun ve kuyruk anomalilerine bakıldı.

3.2.2 Testis dokusu örneklerinin mikropreparasyonu

Sıçanlardan alınan testis dokuları histokimyasal incelemeler için Bouin solüsyonu ile tespit edildi. İmmünohistokimyasal incelemeler için testis dokularının fiksasyonu %4'lük paraformaldehit (PFA) ile gerçekleştirildi. Geçirimli elektron mikroskopik incelemeler için testis doku örnekleri %2,5'luk PBS tamponlu glutaraldehit (GA) solüsyonu ile fikse edildi.

3.2.3 Işık mikroskopu düzeyinde histokimyasal incelemeye yönelik doku preparasyonu

Diseksiyon sonrası sıçanlardan alınan testis ve epididimis dokuları histolojik incelemeler amacıyla Bouin solüsyonu ile 2 gün fikse edildi. İmmünohistokimya uygulamalarında kullanılmak amacıyla dokular %4'lük PFA ile 72 saat süresince fikse edildi. Fiksasyonu takiben dokular, yükselen etanol serisi (%70, %90, %96, %100) ile dehidratasyon ve akabinde ksilenle saydamlaştırma aşamalarından geçirildi (Thermo Citadel 2000, Massachusetts, U.S.A.). Dokular daha sonra sıvı parafine gömüldü (Thermo Histostar, Massachusetts, U.S.A.). Rotary mikrotom (Thermo- Shandon™ Finesse™ ME+, Massachusetts, U.S.A.) ile 5 µm kalınlığında alınan parafin kesitler sıcak su banyosuna aktarıldı ve histolojik boyamalar için lamlara alındı. Kesitlere, genel histolojik değerlendirme için hematoksilen ve eozin (H&E) boyası uygulandı. Bazal membrandaki değişiklikleri göstermek için periyodik asit- Schiff (PAS) reaksiyonu ve ayrıca bağ dokudaki değişiklikleri göstermek için de Masson'un üçlü boyası uygulandı.

3.2.4 Hematoksilen ve eozin boyası

Parafine gömülen doku bloklarından 5 µm kalınlığında testis ve epididimis kesitleri alındıktan sonra kesitler sıcak su banyosuna aktarıldı. Kesitlere genel histolojik değerlendirme için hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması uygulandı. H&E boyaması için ilk olarak lamlar ksilende deparafinizasyon aşaması için 40 dakika bekletildi. Daha sonra rehidratasyon aşamasından geçirmek için 10'ar dakika azalan konsantrasyonda etanol serisinden (%100, %90, %70) geçirildi. Alkol serisinden sonra kesitler Mayer'in hematoksilen solüsyonunda (J.T Baker, Pennsylvania, U.S.A.) 5 dakika bekletildi. Doku kesitleri daha sonra akar suda bekletildi. Akar sudan alınan dokular 1 dakika %70 etanolde bekletildi. Bir sonraki aşamada dokular sırası ile 1'er dakika olmak üzere eozinde (Histoplus™), %90 ve %100 etanolde bekletildi. Son aşamada kesitler bir dakika ksilende bekletilip son olarak entellan ile kapatıldı. Işık mikroskopunda (Zeiss A1 Axio Scope, Germany) incelenen H&E ile boyanan testis kesitlerinde seminifer tübüller, "Modifiye edilmiş Johnsen'in histopatolojik skorlama parametreleri (52, 53)" bazında skorlandı (Tablo 1). Ayrıca Image J (1.44 software N.I.H.-U.S.A.) programı kullanılarak tüm kesitlerde 100 adet seminifer tübülün epitel kalınlığı ölçüldü.

Tablo 1. Modifiye edilmiş Johnsen'in Histopatolojik Skorlama Parametreleri (52, 53).

10	Tam spermatogenez
9	Hafif bozulmuş spermatogenez, çok sayıda geç spermatid, epitel organizasyonunda bozukluk
8	Her tübül lümeninde 5'ten az spermatozoa, az sayıda geç spermatid var
7	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, çok sayıda erken spermatid var
6	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid var
5	Spermatozoa veya spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
4	Spermatozoa veya spermatid yok, birkaç spermatosit var
3	Yalnızca spermatogonyumlar var
2	Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var
1	Seminifer tübül içerisinde hiç hücre yok

3.2.5 Periyodik asit- Schiff reaksiyonu

Seminifer tübüllerin bazal membranlarındaki değişiklikleri tespit etmek için testis kesitlerine periyodik asit- Schiff (PAS) reaksiyonu uygulandı. Kesitler ilk olarak yarım saat ksilende bekletildi. Daha sonra azalan konsantrasyonda 10'ar dakika etanol serilerinden geçirildi ve distile suda çalkalandı. Bir sonraki aşamada kesitler periyodik asit solüsyonunda (Katalog No: 8222880100, Merck, New York, U.S.A.) 20 dakika bekletildi. Bu aşamayı takiben akar suda 5 dakika bekletilen kesitler tekrar distile suda çalkalandı. Çalkalama aşamasından sonra sırası ile Schiff reaktifinde 20 dakika ve sülfüroz asit solüsyonunda (Merck, New York, U.S.A.) 12 dakika bekletilen kesitler tekrar akar su ve distile sudan geçirildikten sonra Mayer'in hematoksileni (J.T Baker, Pennsylvania, U.S.A.) ile 5 dakika boyunca zıt boyama uygulandı. Akar su ve distile sudan geçirilen kesitler 5'er dakika dehidratasyon aşaması için yükselen konsantrasyonda etanol serisinden geçirildi. Kesitler son olarak ksilen aşamasından geçirildikten sonra entellan ile kapatılıp ışık mikroskobu ile incelendi (Zeiss A1 Axio Scope, Germany).

3.2.6 Masson'un üçlü boyası

Testis dokusundaki bağ doku değişikliklerini tespit etmek amacıyla kesitlere Masson'un üçlü boyası uygulandı. Birinci adımda kesitler 40 dakika ksilenden ve 10'ar dakika azalan konsantrasyonda etanol serisinden geçirildi. Kesitler Bouin solüsyonu içerisine alınıp 1 saat 56°C'de etüvde bekletildi. Akarsuda bekletildikten sonra 10 dakika Weigert'in demirli hematoksileninde (Merck, New York, U.S.A.) tutuldu. Tekrar akarsu aşamasından sonra kesitler distile suda çalkalandı. On dakika Beibrich Scarlet-asit fuksin solüsyonunda bekletildikten sonra kesitler distile suda çalkalandı. Fosfomolibdik asit- fosfotungistik asit solüsyonunda (Katalog No: 79560, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) 10 dakika bekletildikten sonra doku kesitleri 5 dakika anilin mavisi solüsyonunda (Katalog No: B8563, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) bekletildi. Distile suda çalkalandıktan sonra %1'lik asetik asit solüsyonunda (Katalog No: 33209, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) bekletilen kesitler sırası ile distile su ve yükselen konsantrasyonda etanol serisinden geçirildi. En son aşamada kesitler ksilenden geçirildikten sonra entellan ile kapatılıp ışık mikroskobu ile incelendi (Zeiss A1 Axio Scope , Germany).

3.2.7 ZO-1 immünohistokimyası

KTB'de sıkı bağlantı proteinlerinden olan ZO-1 yoğunluğundaki değişimi gözlemlemek için kesitlere okludin immünohistokimyası uygulandı. Beş µm kalınlığında pozitif şarjlı lamlara alınan PFA ile fikse edilen testis kesitleri bir gece 56°C etüvde bekletildi. Kesitlerde 30 dakika bekletildikten sonra kesitler 10'er dakika azalan konsantrasyonda etanol (%100, %96) serilerinde bekletildi. Daha sonra kesitler endojen enzim blokajı amacıyla metanol ile hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda (Sigma-Aldrich, U.S.A.) 20 dakika bekletildi. Çeşme suyu ve distile su ile yıkandıktan sonra kesitler etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) tamponunda (Sigma-Aldrich, U.S.A.) 200 W' de mikrodalgada ısıtıldı. Oda ısısında 30 dakika soğumaya bırakılan kesitler 3 defa 5'er dakika PBS' te bekletilmeyi takiben 10 dakika %10 tamponlu keçi serumunda (Invitrogen, USA) blokaj amacıyla bekletildi. Kesitler %1'lik BSA-PBS-Triton X-100 solüsyonu ile 1:100 oranında dilüe edilmiş tavşan anti-ZO-1 primer antikorunda (Life Technologies, CA, U.S.A.) +4°C'de 1 gece boyunca nemli odacıkta bekletildi. PBS' te 3 defa 5'er dakika bekletildikten sonra 1:1000 oranında dilüe edilmiş biotin ile işaretlenmiş keçi anti-tavşan sekonder antikor (Katalog No:65-6140, Invitrogen, U.S.A) kesitlerin üstüne damlatılıp 37°C etüve konuldu. PBS'te 3 defa 5 dakika bekletildikten sonra kesitlerin üstüne streptavidin-horseradish peroksidaz (Invitrogen, U.S.A.) damlatılıp 20 dakika bekletildi. PBS' te yıkandıktan sonra AEC single/plus kromojeni (Abcam, Cambridge, U.K.) damlatılıp 15 dakika bekletilen kesitler distile su ile çalkalanıp Keiser gliserolu ile kapatıldı. Kesitler ışık mikroskopu ile incelenerek görüntülendi (Zeiss A1 Axio Scope, Oberkochen, Germany). ZO-1 immünoreaktivite boyanma yoğunluğu Image J (1.44 software, National Institutes of Health) programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.8 Okludin immünohistokimyası

KTB'de sıkı bağlantı proteinlerinden olan okludin yoğunluğundaki değişimi gözlemlemek için kesitlere okludin immünohistokimyası uygulandı. Bir gece boyunca 56°C'de bekletilen kesitler sırası ile deparafinizasyon, dehidrasyon ve endojen enzim blokajı aşamalarından geçirildikten sonra yıkama işlemlerinden geçirilmiştir. Plastik şale içerisinde mikrodalgada 200 W' de EDTA (Sigma- Aldrich, U.S.A.) tamponu içinde ısıtıldıktan sonra soğumaya bırakılmıştır. Kesitler 3 defa 5'er dakika PBS' te

bekletildikten sonra bloklama amacıyla 10 dakika %10 tamponlu keçi serumunda (Invitrogen, U.S.A.) bekletildi. Kesitlere 1:150 oranında %1'lik BSA-PBS-Triton X-100 solüsyonu dilüe edilmiş tavşan anti- Okludin primer antikoru (Katalog No:71-1500, Invitrogen, U.S.A.) mikropipet yardımıyla damlatıldı. Kesitler bir gece nemli odacıkta +4°C'de bekletildi. PBS'te 3 defa 5'er dakika yıkandıktan sonra 1:1000 oranında dilüe edilmiş biotin ile işaretlenmiş keçi anti-tavşan sekonder antikor (Katalog No:65-6140, Invitrogen, U.S.A.) kesitlerin üstüne damlatılıp yarım saat 37°C etüvde bekletildi. PBS'te 3 defa 5 dakika bekletildikten sonra kesitlerin üstüne streptavidin-horseradish peroksidaz (Invitrogen, U.S.A.) damlatılıp 20 dakika bekletildi. Kesitler PBS' te yıkandıktan sonra 15 dakika AEC single/plus kromojeninde (Abcam, Cambridge, U.K.) tutuldu. Distile su ile çalkalanmayı takiben Keiser gliserolu damlatılarak lamel ile kesitlerin üstü kapatıldı. Kesitler ışık mikroskopu ile incelenerek görüntülendi (Zeiss A1 Axio Scope, Oberkochen, Germany). Okludin immünreaktivite boyanma yoğunluğu Image J (1.44 software, National Institutes of Health) programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.9 NOX-2 immünhistokimyası

Dokudaki NOX-2 immünreaktivite yoğunluğunu belirlemek için kesitlere NOX-2 immünhistokimyası uygulandı. Yüzde 4'lük PFA (Merck, New York, U.S.A.) ile fikse edilen pozitif şarjlı lamlara alınmış doku kesitleri bir gece 56°C etüvde bekletildi. Kesitler daha sonra yarım saat ksilende, 10'ar dakika saf etanolde ve %96'lık etanolde bekletildi. Bir sonraki aşamada kesitler 20 dakika metanol ile dilüe edilmiş %3'lük hidrojen peroksitte (Sigma-Aldrich, U.S.A.) bekletildi. Yıkama aşamasından geçirildikten sonra kesitler EDTA tamponu (Sigma-Aldrich, U.S.A.) içerisinde mikrodalgada ısıtıldı. Soğumaya bırakılan kesitler daha sonra PBS ile yıkandı. %10 tamponlu keçi serumunda blokaj için (Invitrogen, U.S.A.) 10 dakika bekletildikten sonra 1:100 oranında %1'lik BSA- PBS-Triton-X-100 solüsyonu ile dilüe edilmiş tavşan anti-NOX-2 primer antikorida (Katalog No: NBP2-41291, Novus, Bio-Thecne, Minnesota, U.S.A.) nemli oda içerisinde +4°C'de 24 saat bekletildi. PBS ile yıkama işleminden geçirilen kesitler, 1:1000 oranında dilüe edilmiş floresan işaretli keçi anti-tavşan sekonder antikoru (Katalog No: A32740, Invitrogen, U.S.A.) ile nemli odacıkta yarım saat 37°C etüvde bekletildi. Kesitler son kez PBS ile yıkama

işleminde geçirildikten sonra 4'6- Diamino-2-fenilidol (DAPI) içeren gliserol (Katalog No:188804, Abcam, Cambridge, U.K.) ile kapatıldı. Kesitler floresan ataşmanlı mikroskop ile incelenerek görüntülendi (Zeiss A1 Axio Scope, Oberkochen, Germany). Fotoğraflanan kesitlerdeki ışımaya yoğunluğu, bütünleşik ışımaya (integrated density) değeri Image J (1.44 software, National Institutes of Health) programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.10 Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı deoksiüridin trifosfat (dUTP) çentik uçlu etiketleme (TUNEL) immünohistokimyası

Pozitif şarjlı lama alınmış 5µm kalınlığındaki testis dokusu kesitlerine, TUNEL-pozitif apoptotik hücre sayısını ve apoptotik indeksi belirlemek için TUNEL immünohistokimyası üretici firmanın (ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Kit, S7101, Millipore) verdiği kit ile kullanım kılavuzuna göre uygulanmıştır. Apoptotik indeks hesaplanması için her kesitte rastgele 20 adet seminifer tübül seçildi. Seçilen tübüllerde 3 veya daha fazla TUNEL- pozitif hücre bulunduran tübül sayısının toplam seminifer tübül sayısına oranlanmasıyla apoptotik indeks hesaplandı. Yarım saat ksilende bekletilen kesitler, saf etanolde 2 defa 5'er dakika bekletildi. Kesitler daha sonra %95 etanolde ve %70 etanolde 5'er dakika bekletildi. PBS' te 5 dakika bekletildikten sonra kesitler sitrat tamponun içerisinde 20 dakika boyunca 200 W mikrodalgada ısıtıldı. Yarım saat soğumaya bırakıldıktan sonra oda ısısında 15 dakika Proteinaz K (20µg/ml) doku kesitleri üzerine damlatıldı. Kesitler distile suda 2'şer defa 2 dakika yıkandı ve PBS ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitte 5 dakika bekletildi. PBS'te beş dakika yıkandıktan sonra kesitlerin üzerine 10µl dengeleyici tampon konuldu. Kesitler plastik lamellerle kapatılıp oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Plastik lameller kaldırılıp 10µl Tdt enzimi damlatıldı ve plastik lameller tekrar kapatıldı. Nemli odacıkta 37°C etüvde 1 saat inkübe edildi. Plastik lameller kaldırılarak durdurma-yıkama tamponu damlatılıp tekrar kapatıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. PBS ile 3 defa 1'er dakika yıkandıktan sonra kesitlerin üzerine 13 µl Anti-digoksinin damlatıldı ve tekrar plastik lamellerle kapatıldı. Yarım saat oda ısısında inkübe edildikten sonra 4 defa ikişer dakika PBS'te yıkandı. Kesitlerin çevresi dikkatlice kurutulduktan sonra 13 µl 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) solüsyonu damlatıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip renk değişimi gözlemlendikten sonra kesitler distile su ile çalkalandı. Zıt

boyama yapmak amacıyla kesitler Mayer' in hematoksilen solüsyonunda (J.T Baker, Pennsylvania, U.S.A.) bir dakika bekletildi. Distile suda 3 defa 10 saniye yıkandıktan sonra kesitler %96 alkolde 2 defa 2'şer dakika bekletildi. Kurutulan kesitler entellan ile kapatıldı. Kesitler ışık mikroskopu ile incelenerek görüntülendi (Zeiss A1 Axio Scope, Oberkochen, Germany).

3.2.11 Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA) immünohistokimyası

Proliferatif hücre sayısını ve proliferasyon indeksinin belirlenmesi için kesitlere PCNA immünohistokimyası uygulandı. Pozitif şarjlı lamlara alınmış 5µm kalınlığındaki kesitler bir gece 37 °C etüvde bekletildi. Kesitler daha sonra ksilende 30 dakika bekletildikten sonra saf etanolde ve %96'lık etanolde 10 dakika bekletildi. Metanol ile dilüe edilmiş %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda (Sigma-Aldrich, U.S.A.) kesitler endojen enzim blokajı için 20 dakika bekletildi. Çeşme suyu ve distile suda çalkalandıktan sonra antijen geri kazanımı için plastik şale içerisindeki EDTA tamponunda (Sigma-Aldrich, U.S.A.) 20 dakika 200 W mikrodalgada kesitler ısıtıldı ve o da sıcaklığında yarım saat soğutmak için bekletildi. PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra kesitler blokama solüsyonunda (Invitrogen, U.S.A.) 10 dakika bekletildi. Daha sonra 1: 50 oranında sulandırılan tavşan anti-PCNA (Novus, U.S.A.) primer antikorunda bir gece boyunca +4'te nemli odacık içerisinde bekletilen kesitler 3 defa 5 'er dakika PBS ile yıkandı. 1:500 oranında dilüe edilmiş biyotin ile işaretlenmiş keçi anti-tavşan sekonder antikor (Invitrogen, U.S.A.) kesitlere damlatılıp yarım saat nemli odacık içerisinde 37°C etüvde bekletildi. Kesitlere streptoavidin peroksidaz (Invitrogen, U.S.A.) damlatılıp 10 dakika bekletildi. PBS ile 3 defa 2 dakika yıkandıktan sonra kesitler 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromojeninde (1 ml DAB substrat + 30 µl DAB kromojen) 5 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra %70'lik etanole bandırılıp çıkartılan kesitler zıt boyama için Mayer'in hematoksilen solüsyonunda 1 dakika bekletildi. Musluk suyu ile çalkalandıktan sonra kesitler distile su ile çalkalandı ve ikişer dakika %96'lık etanol ve saf etanolden geçirildi. Kesitler daha sonra gliserin jel ile kapatıldı. Proliferasyon indeksi belirlenmesi için her bir kesitte 20 tane tübülde PCNA pozitif hücre sayısı toplam hücre sayısına bölündü. Kesitler ışık mikroskopu ile incelenerek görüntülendi (Zeiss A1 Axio Scope, Oberkochen, Germany).

3.2.12 Geçirimli elektron mikroskopik preparasyon

Geçirimli elektron mikroskopi düzeyinde inceleme amacı ile için alınan testis dokusu örnekleri %2,5'lük 0,1 M PBS tamponlu (pH 7,2) glutaraldehit fiksatif (Katalog No: A0589, PanReach AppliChem, Chicago, IL, U.S.A.) içerisinde 4 °C'de 4 saat fikse edildi. Tamponla yıkamadan sonra, dokulara %1'lik osmiyum tetroksit ile 1 saat postfiksasyon (Katalog No:19134, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, U.S.A.) uygulandı. Dokular yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidre edildi ve propilen oksitten geçirilerek (Katalog No: 82320, Sigma-Aldrich, U.S.A.) Epon 812'ye gömüldü. 60 °C'deki etüvdeki polimerizasyonu takiben ultramikrotomda (Leica, EM UC7, Germany) alınan yarı ince kesitler (1 µm) toluidin mavisi (Sigma-Aldrich, U.S.A.) ile boyanarak yer tespiti yapıldı. 60 nm kalınlığındaki ultra ince kesitler ise bakır gridler üzerine alınarak %2'lik uranil asetat ve kurşun sitrat solüsyonları ile kontrastlandı. Gridler geçirimli elektron mikroskopunda (THERMO FISHER SCIENTIFIC TALOS L 120C , The Netherlands) incelenerek fotoğraflandı.

3.3.13 Serum testosteron, FSH ve LH konsantrasyonlarının ölçülmesi

Serumda biyokimyasal analizler için dekapitasyonun hemen öncesinde kalpten alınan kan örnekleri, antikoagülan maddesi bulunmayan kuru vakumlu tüplere aktarıldı. Otuz dakika oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından 4000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Ayrılması sağlanan serum örnekleri -20°C'de muhafaza edildi. Analizler, Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı.

Serum testosteron, FSH ve LH seviyelerinin belirlenmesi amacıyla ticari olarak satın alınan "Bioassay Technology Laboratory" markalı "Rat testostosterone ELISA kit", "Rat FSH ELISA kit" ve "Rat LH ELISA kit" kullanılarak serum testosteron, FSH ve LH konsantrasyonları ölçüldü. Kit prosedürüne uygun olarak yapılan işlemlerin ardından oluşturulan standart grafikler kullanılarak örneklerdeki testosteron, FSH ve LH konsantrasyonları belirlendi. Sonuçlar testosteron için; nmol/L olarak, FSH ve LH için mIU/L olarak verildi.

3.3.14 Doku MDA, GSH ve SOD seviyelerinin ölçülmesi

Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan testis dokusu, PBS tamponu (137 mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) ile yıkanarak tartıldı ve ependorf tüplere konularak -80° C' de ölçümler yapılana kadar saklandı. Biyokimyasal ölçümler yapılacağı gün -80'den çıkarılan dokular soğuk 150 mM KCl çözeltisiyle homojenize edilerek %10'luk doku homojenatı hazırlandı.

Doku malondialdehit (MDA) seviyelerinin ölçülmesi: Lipit peroksidasyonun göstergesi olan MDA seviyelerinin tayini için ticari olarak satın alınan kit kullanıldı. (Elabscience, U.S.A.) Metodun prensibi, lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin renk şiddetinin 532 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan reaktifler

R1, R2 ve R3

50 µmol/L 1,1',3,3' tetraetoksipropan (standart stok solüsyonu)

Deneyin yapılışı: Kit prosedürüne göre hazırlanan çözeltiler aşağıdaki çalışma tablosunda belirtildiği şekilde deney tüplerine eklendikten sonra çözeltilerin karışması için iyice vortekslendi. Tüpler kaynar suda (en az 95 °C) 1 saat bekletildi; akan çeşme suyunda soğutuldu ve 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pembe renkli süpernatantların absorbanları 532 nm'de okundu ve 1,1',3,3' tetraetoksipropanla hazırlanan standart grafiğinden yararlanılarak nmol/gr doku cinsinden MDA düzeyleri bulundu.

Tablo 2. MDA analizinde kullanılan çözeltiler.

	Numune	Standart	Kör
Homojenat	20 µl	20 µl	20 µl
R1	20 µl	20 µl	200 µl
R2	600 µl	600 µl	600 µl
R3	200 µl	200 µl	-
%50 glasiyel asetik asit	-	-	200 µl

Doku Glutasyon (GSH) seviyesinin ölçülmesi: GSH hücre, doku ve organ sistemlerinin bütünlüğünün yapısal ve fonksiyonel olarak korunmasında antioksidan bir molekül olarak rol almaktadır. Testis dokularında GSH analizi, Beutler metoduna göre yapıldı (54). Metodun prensibi, analiz tüpünde bulunan GSH'nin 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girerek sarımsı renk vermesi ve oluşan bu rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmasına dayanmaktadır.

Deneyin Yapılışı: Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4 °C'de, 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta %10'luk TCA çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve tekrar 3000 rpm'de, +4 °C'de, 20 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Açık renkli süpernatant numuneleri GSH analizinde kullanıldı.

Kullanılan Reaktifler:

% 10'luk triklor asetik asit

% 1'lik trisodyum sitrat

% 0.4'lük 5,5'-DTNB

0.3 molar disodyum hidrojen fosfat

Aşağıdaki tabloda belirtilen çalışma şemasına göre deney tüpleri hazırlanarak çözeltilerin iyice karışması için tüpler vortekslendi. Oda ısısında 5 dakika bekletilen numunelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve glutasyon standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{mol/ gr}$ doku cinsinden GSH düzeyleri bulundu.

Tablo 3. GSH analizi çalışma şeması.

	Numune	Kör
%10'luk Homojenat	500 μl	-----
Na ₂ HPO ₄ (0,3M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 μl	500 μl

Tablo 3 GSH analizi çalışma şeması (devam)

Distile su	-----	500
------------	-------	-----

Doku Süperoksit (SOD) aktivitesinin ölçülmesi: SOD aktivitesi, WST (water-soluble tetrazolium salt) reaksiyonuna dayanan "Sigma SOD Determination Kit (Cat. No:19160)" ile belirlendi.

Deneyin Yapılışı: Kit protokolünde belirtilen ve aşağıda ayrıntılı olarak yazılan işlemler uygulanarak testis SOD aktivite tayini yapıldı.

- 1) 4 tüp alınarak örnek, kör 1, kör 2 ve kör 3 olarak etiketlendi.
- 2) 20 µl örnek, tüm örnek ve kör 2 kuyucuklarına eklendi ve 20 µl dH₂O kör 1 ve kör 3 kuyucuklarına eklendi.
- 2) 200 µl WST solüsyonu tüm kuyucuklara eklenerek karıştırıldı.
- 3) 20 µl Dilüsyon Buffer tüm kör 2 ve kör 3'lere eklendi.
- 4) 20 µl Enzim Çalışma Solüsyonu tüm kör 1'lere eklendi ve karıştırıldı.
- 5) 37 °C'de 20 dk. inkübe edildikten sonra 450nm'de absorbans değerleri okundu.
- 7) SOD aktivitesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı.

$$(\% \text{ İnhibisyon Oranı}) = \frac{[(A \text{ Kör 1} - A \text{ Kör 3}) - (A \text{ örnek} - A \text{ Kör 2})]}{(A \text{ Kör 1} - A \text{ kör 3})}$$

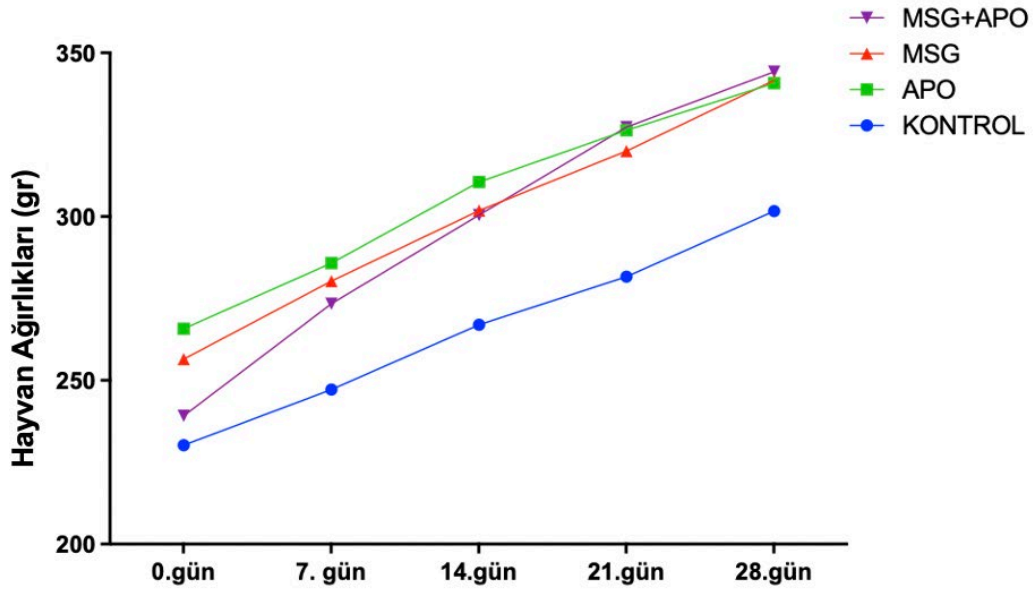
3.3.15 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Graph-Pad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı ile yapıldı. İstatistiksel analizler için One-Way veya Two Way ANOVA yöntemi, karşılaştırma analizleri için de Tukey testi kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4 BULGULAR

4.1 Vücut Ağırlığı

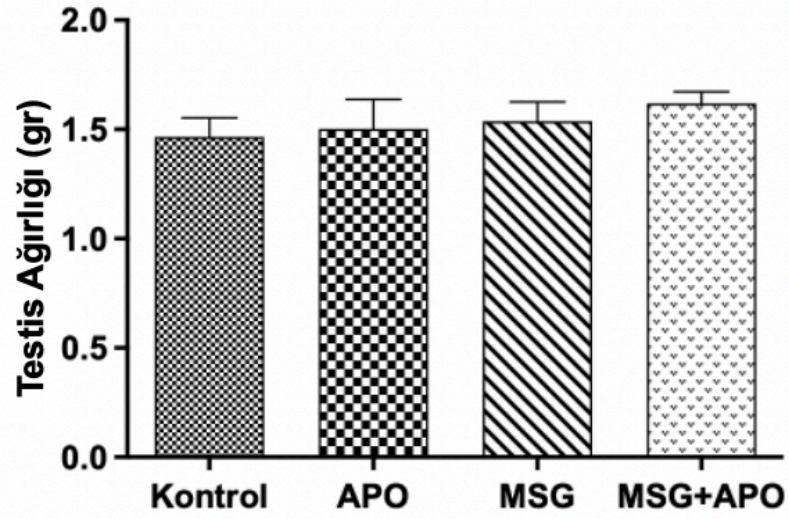
Haftalık vücut ağırlığı tartım sonuçlarına göre sıçan ağırlıklarının, Kontrol grubunda $301,7 \pm 46,63$ gr, APO grubunda $340,8 \pm 32,8$ gr, MSG grubunda $341,7 \pm 17,63$ gr, MSG+APO grubunda $344,2 \pm 17,23$ gr olduğu görüldü. Sıçan ağırlıkları deney grupları bazında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (Şekil 9).



Şekil 9. Deney gruplarındaki sıçanların haftalık vücut ağırlıkları grafiği

4.2 Testis Ağırlığı

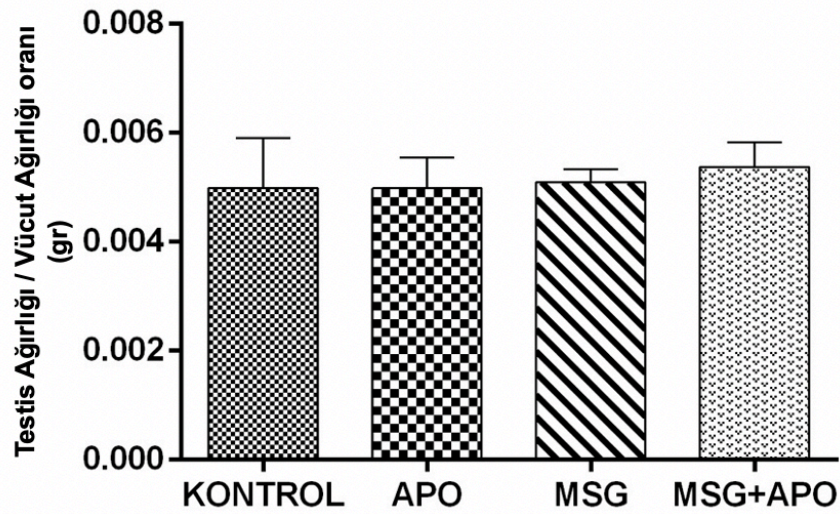
Testis ağırlıkları; Kontrol grubunda $1,4 \pm 0,08$ gr, APO grubunda $1,5 \pm 0,13$ gr, MSG grubunda $1,5 \pm 0,08$ gr, MSG+APO grubunda ise $1,6 \pm 0,05$ gr olarak belirlendi. Deney grupları arasında testis ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 10).



Şekil 10. Deney gruplarına ait sıçanların testis ağırlığı.

4.3 Testis Ağırlığı/ Vücut Ağırlığı

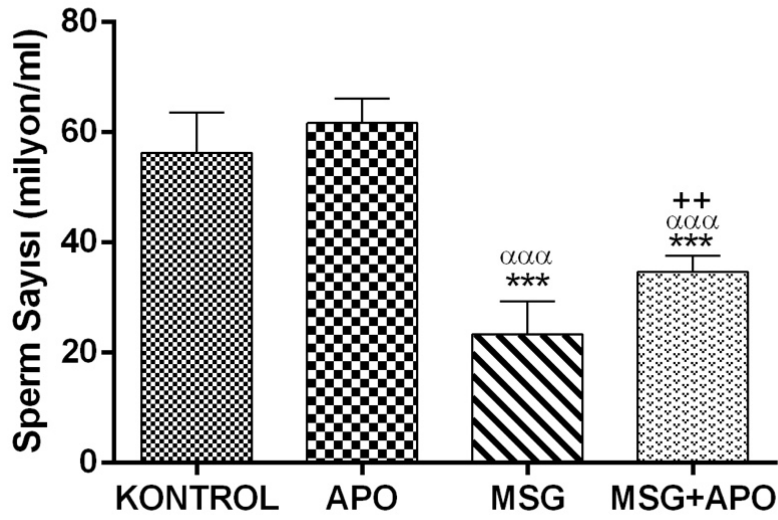
Deney gruplarının testis ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranları; Kontrol grubunda $0,0049 \pm 0,0009$ gr, APO grubunda $0,0049 \pm 0,0005$ gr, MSG grubunda $0,005 \pm 0,0002$ gr, MSG +APO grubunda ise $0,005 \pm 0,0004$ gr'di. MSG grubunun testis ağırlığı /vücut ağırlığı oranının diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu gözlenmekle beraber bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi. Testis ağırlığı /vücut ağırlığı oranında deney grupları arasında istatistiksel anlamda bir fark gözlenmedi (Şekil 11).



Şekil 11. Deney gruplarının testis ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı.

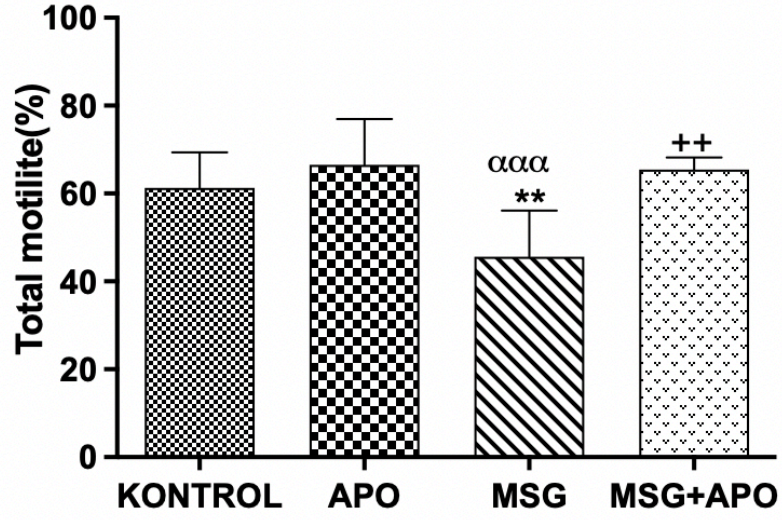
4.4 Sperm Morfolojisi, Sayımı ve Motilitesi

Kontrol grubunda sperm sayısı $56,33. 10 \pm 7,2. 10$ milyon/ml, APO grubunda $61,6. 10 \pm 4,5. 10$ milyon/ml, MSG grubunda $23,33. 10 \pm 5,9.10$ milyon/ml, MSG+APO grubunda $34,6.10 \pm 2,8.10$ milyon/ml olarak belirlendi. MSG grubu ve MSG+APO grubu, Kontrol grubu ve APO grubu ile karşılaştırıldığında sperm sayısında anlamlı derecede (sırası ile, $***p<0,001$, $^{aaa}p<0,001$) düşüş olduğu gözlemlendi. MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise sperm sayısında anlamlı ($^{++}p<0,01$) artış olduğu görüldü (Şekil 12).



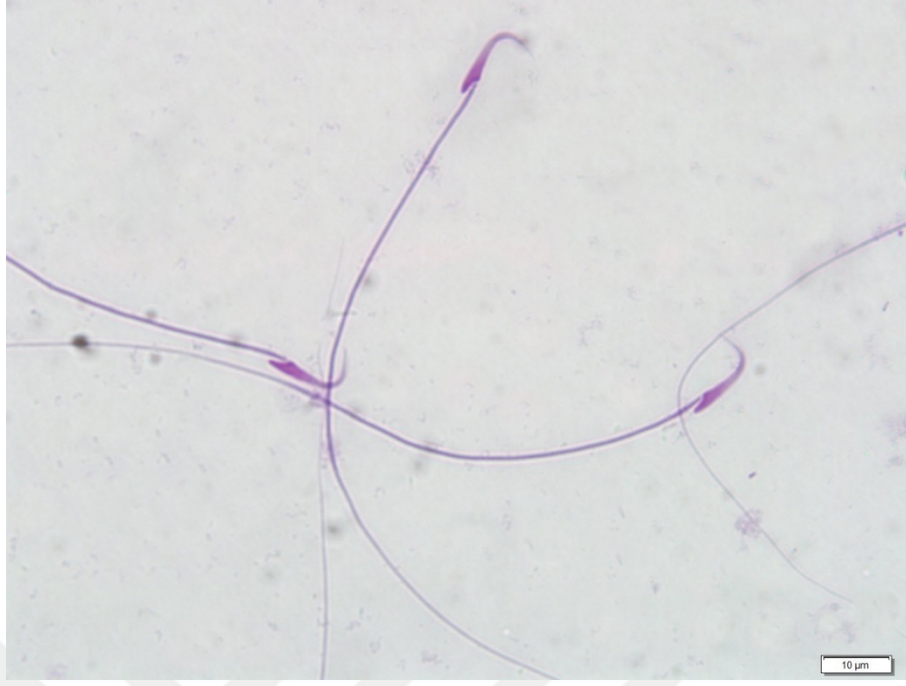
Şekil 12. Deney gruplarına ait sperm sayıları. $***p <0,001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $^{aaa}p <0,001$ APO grubu ile karşılaştırıldığında. $^{++}p <0,01$ MSG ile karşılaştırıldığında.

Kontrol grubu total sperm motilitesi $61,62 \pm 8,1$, APO grubu $66,58 \pm 10,41$, MSG grubu $45,6 \pm 10,56$, MSG+APO grubunda ise $65,49 \pm 2,69$ olarak belirlendi. MSG grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sperm motilitesinde istatistiksel olarak azalma ($^{**}p<0,01$) olduğu gözlemlendi. MSG grubu APO grubu ile karşılaştırıldığında ilgili kriterde anlamlı derecede ($^{aaa}p<0,001$) azalma görüldü. MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise sperm motilitesinde anlamlı derecede ($^{++}p<0,01$) artış olduğu görüldü (Şekil 13).

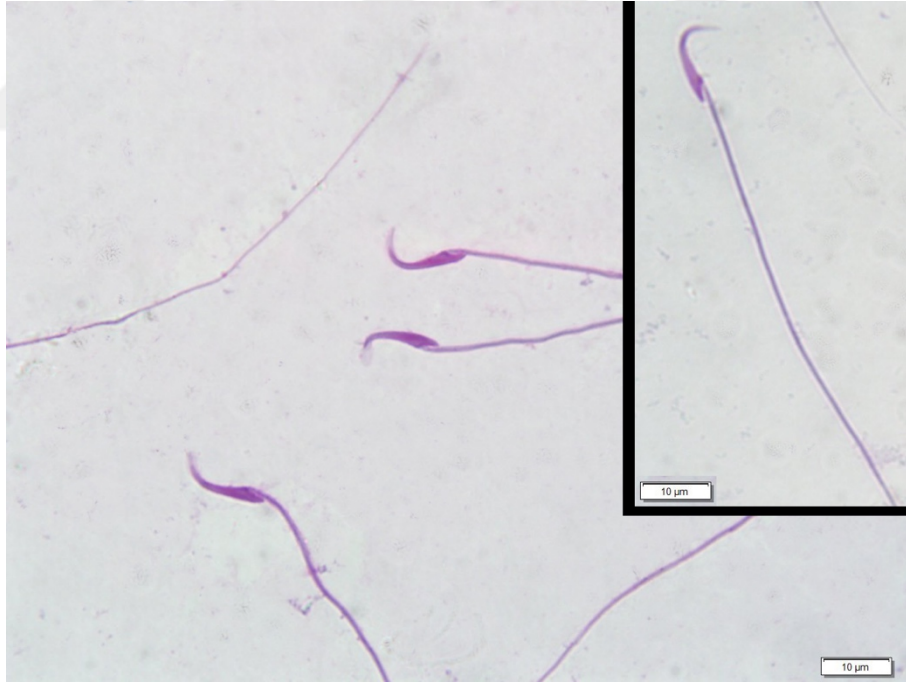


Şekil 13. Deney gruplarının sperm motilite yüzdeleri. **p<0,01 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa}p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺p<0,01 MSG ile karşılaştırıldığında.

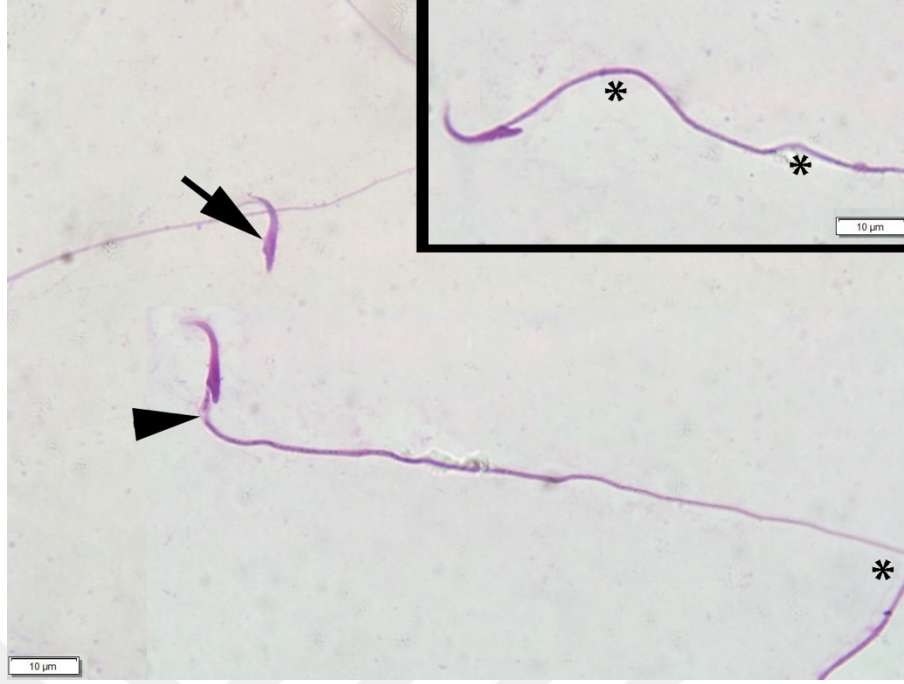
Kontrol grubu ve APO grubuna ait sperm örneklerinde çok sayıda normal morfolojiye sahip sperm gözlemlendi (Resim 1, Resim 2). MSG grubunda normal morfolojiye sahip sperm sayısında azalma gözlenirken; baş, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip çok sayıda sperm görüldü (Resim 3). MSG+APO grubunda normal morfolojiye sahip spermle beraber baş ve kuyruk hasarına sahip az sayıda sperm gözlemlendi (Resim 4).



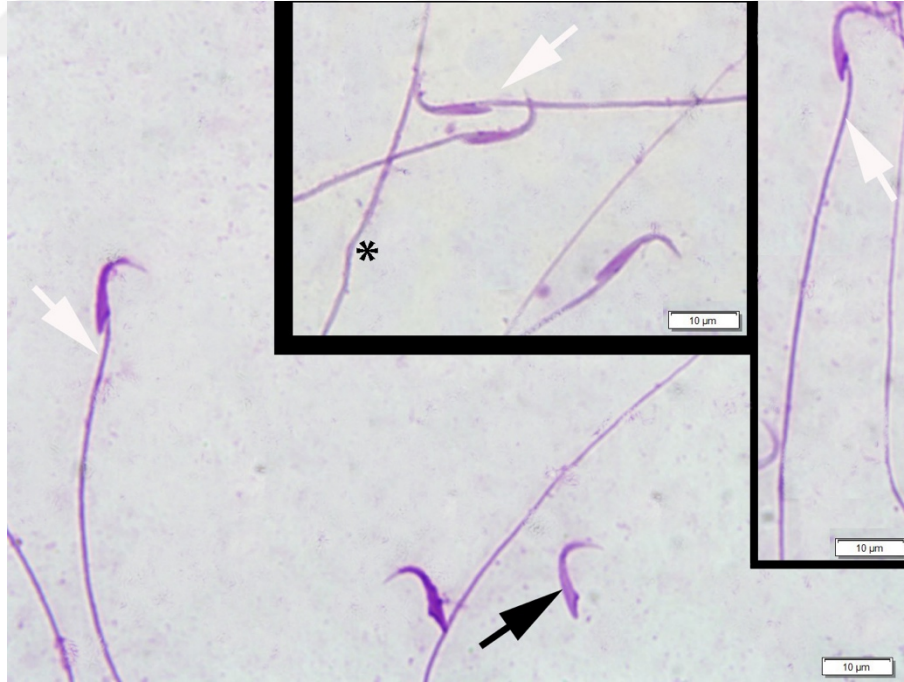
Resim 1. Kontrol grubunda normal sperm morfolojisi görüldü. Diff-Quik boyaması.



Resim 2. APO grubunda normal sperm morfolojisi gözlemlendi. Diff-Quik boyaması.



Resim 3. MSG grubunda bozulmuş morfolojik yapı gösteren sperm: kuyuksuz sperm başı (siyah ok), boyun anomalisi (siyah ok başı) ve kuyruk anomalisi (*). İnet: Kuyruk anomalisi (*). Diff-Quik boyaması.



Resim 4. MSG+APO grubunda normal morfolojiyi (beyaz ok) ve bozulmuş morfolojiyi yansıtan sperm görüldü: kuyuksuz sperm baş yapısı (siyah ok). İnet: Normal morfolojide sperm (beyaz ok). İnet: Normal yapıda sperm ve kuyruk anomalisi (*). Diff-Quik boyaması

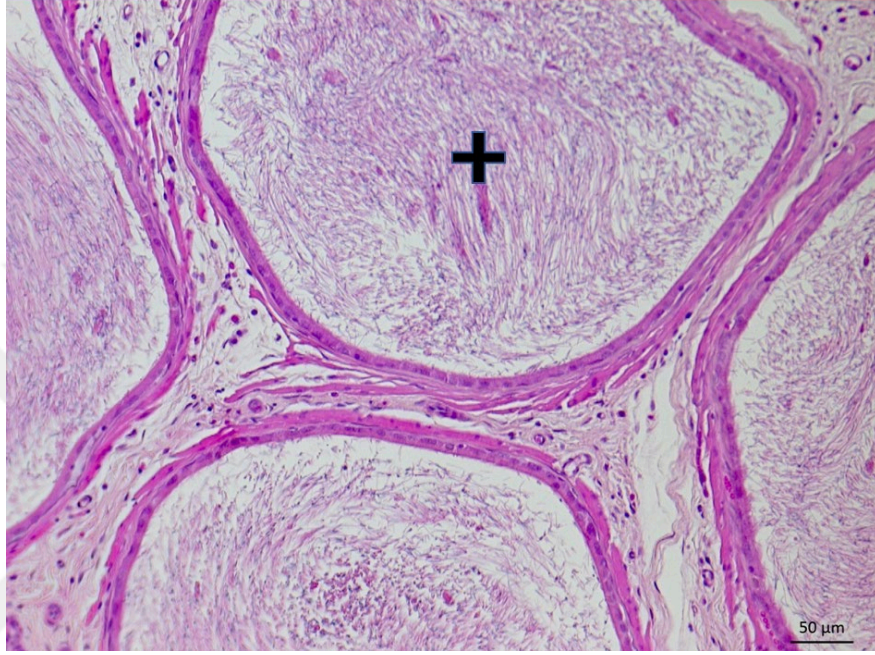
4.5 Morfolojik Bulgular

Epididimis kesitleri ışık mikroskopik düzeyde incelemeler için H&E ile boyandı. Kontrol grubu ve APO grubunda epididimal kanalların spermatozoa ile dolu olduğu gözlemlendi (Resim 5 ve 6). MSG grubunda ise epididimal kanalda Kontrol ve APO gruplarına göre daha az sayıda spermatozoa olduğu görüldü (Resim 7). MSG+APO grubuna ait kesitlerde epididimal kanallardaki spermatozoa sayısının MSG grubuyla karşılaştırıldığında daha fazla olduğu gözlemlendi (Resim 8).

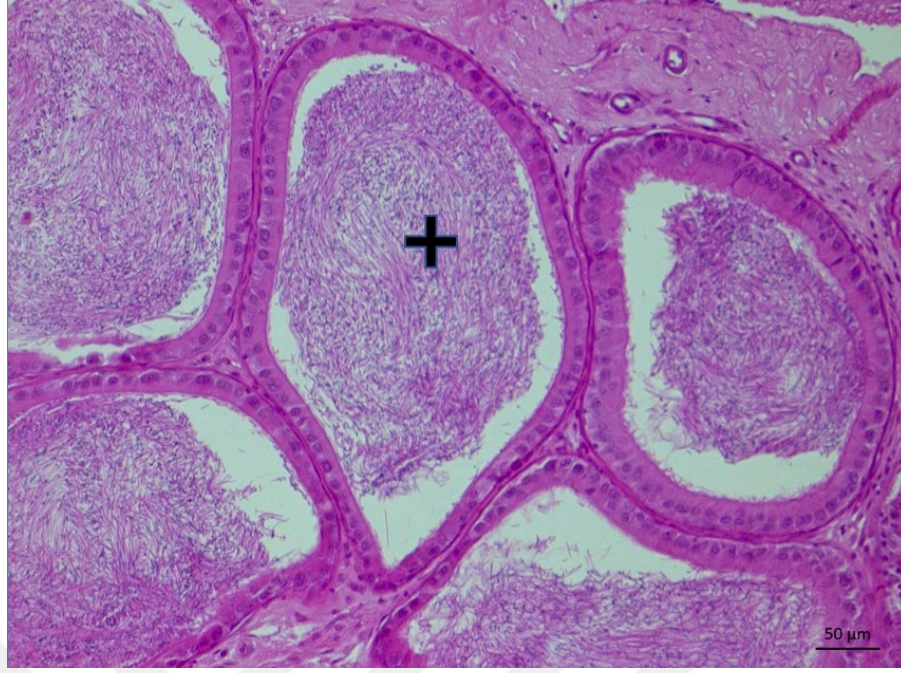
Testis dokusunun ışık mikroskopik düzeyde H&E boyası ile yapılan incelemelerinde Kontrol grubunda düzgün seminifer tübül organizasyonu gözlemlendi. Germinal epitelde spermatogenik hücre serisine ve seminifer tübül lümenlerinde spermatozoonlara rastlandı (Resim 9). APO grubunda da Kontrol grubu ile benzer testis morfolojisi izlendi (Resim 10). MSG grubunda germinal epitel organizasyonunda bozukluklar gözlemlendi. Harabiyet bulguları gösteren seminifer tübüllerin bazal kompartmanında vakuolizasyona, tübül lümeninde ise döküntü hücrelerine rastlandı (Resim 11). MSG+APO grubunda normal testis dokusu organizasyonu gözlenmesinin yanı sıra az sayıda dejenere olmuş seminifer tübüllere rastlandı. Seminifer tübüllerin lümenlerinde çok sayıda spermatozoon gözlenirken bazı tübüllerin lümeninde de spermatogenik seriye ait döküntü hücreleri mevcuttu. Az sayıda seminifer tübülün bazal membranlarında yer yer vakuolizasyon gözlemlendi (Resim 12).

Seminifer tübüllerin bazal membranlarındaki değişiklikleri gözlemek amacıyla testis dokusu kesitlerine PAS reaksiyonu uygulandı. Kontrol grubu ve APO grubunun kesitlerinde düzgün bazal membran ve seminifer tübül morfolojisi ve kuvvetli PAS-pozitif reaksiyon görüldü (Resim 13 ve 14). MSG grubunda PAS-pozitif reaksiyonda azalma ve bazı seminifer tübüllerin bazal membranlarında bozulma olduğu görüldü (Resim 15). MSG+APO grubunda ise PAS-pozitif reaksiyonunun Kontrol grubuna yakın olduğu ve seminifer tübül bazal membranlarının normale yakın morfolojide olduğu gözlenirken az sayıda tübülde bazal membran ayrılmaları gözlemlendi (Resim 16).

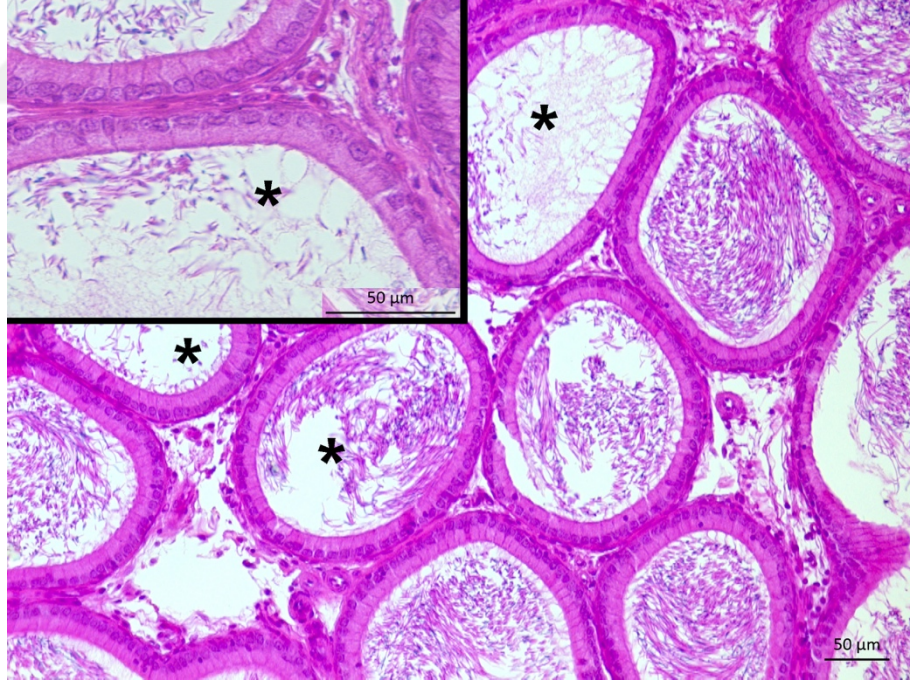
Testis dokusundaki interstisyel bağ doku değişikliklerini gözlemlemek için kesitler Masson'un üçlü boyası ile boyandı. Bağ dokusu yapılanması açısından gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmedi. MSG grubu kesitlerinde tunika albuginea'da yağ hücreleri oluşumu gözlenirken diğer gruplarda bu durum gözlenmedi. (Resim 17, 18, 19 ve 20).



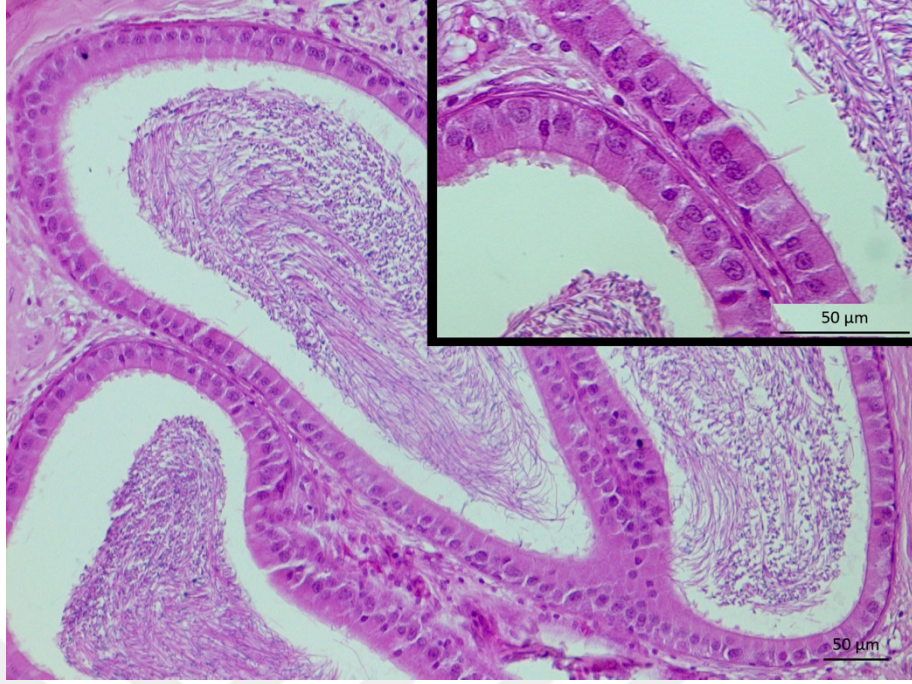
Resim 5. Kontrol grubunda epididimisin kanal lümeninde çok sayıda sperm (+) görüldü. H&E boyama.



Resim 6. APO grubunda epididimis lümeninde çok sayıda sperm (+) izlendi. H&E boyama.



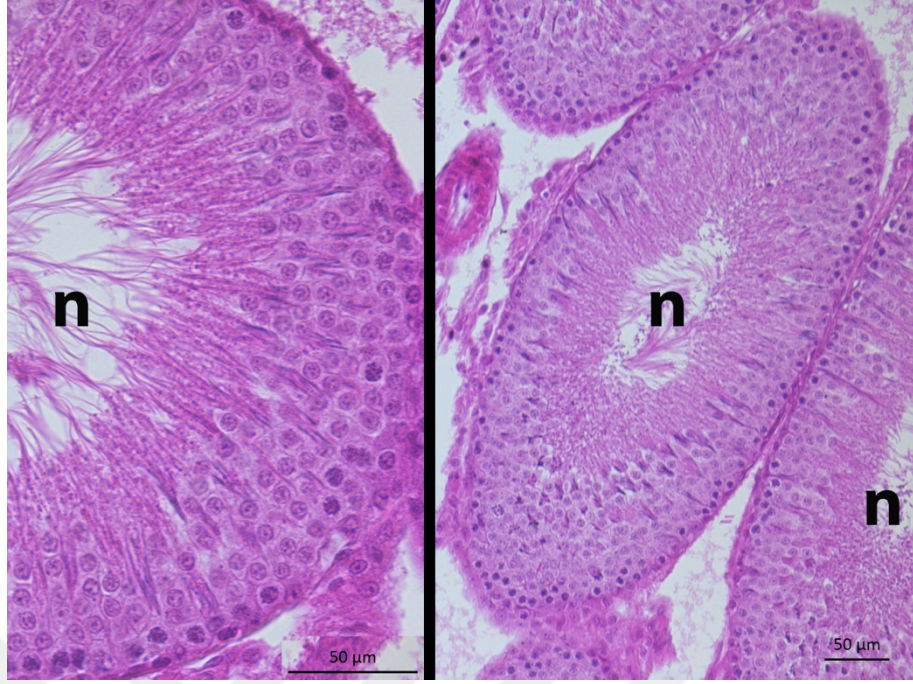
Resim 7. MSG grubunun epididimal kanal lümenlerinde sperm yoğunluğunda azalma (*) gözlendi. İncet: Sperm yoğunluğunda azalma (*). H&E boyama.



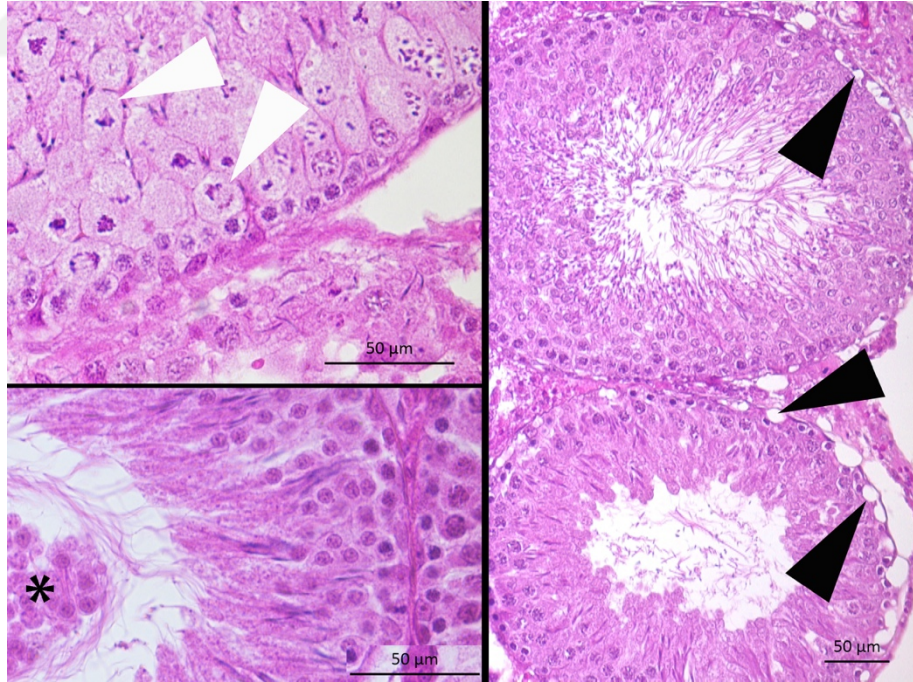
Resim 8. MSG+APO grubunda epididimisin kanal lümeninde çok sayıda sperm gözlemlendi. İncet: Epididimisin lümeni. H&E boyama.



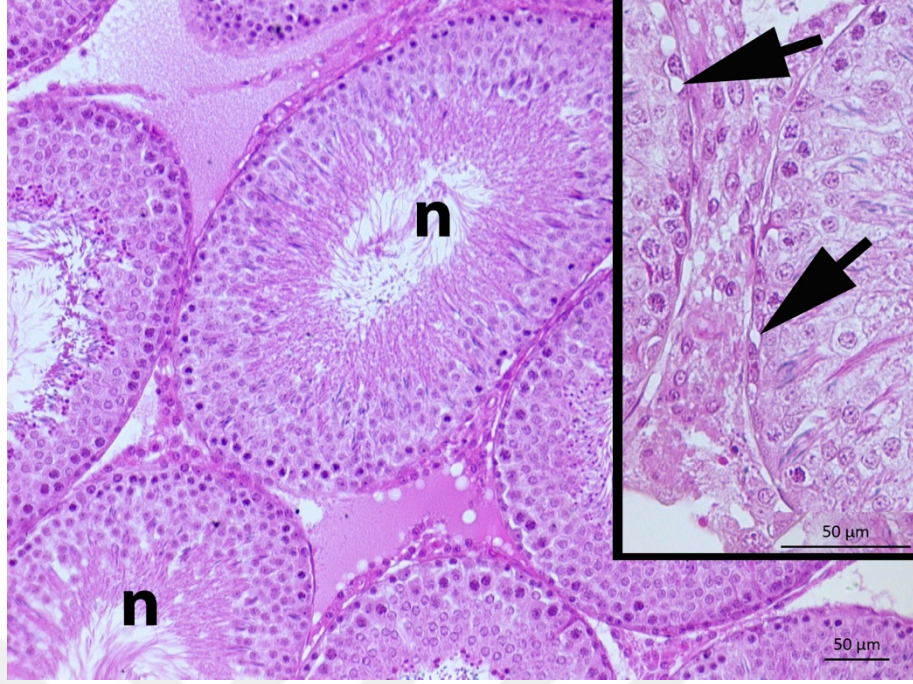
Resim 9. Kontrol grubunda, testis dokusunda normal morfolojiyi yansıtan seminifer tübül organizasyonu (n) germinal epitelde spermatogonyum, spermatozoidler ve lümeninde spermatozoonlar eşliğinde görüldü. İncet: Seminifer tübül germinal epiteli. H&E boyama.



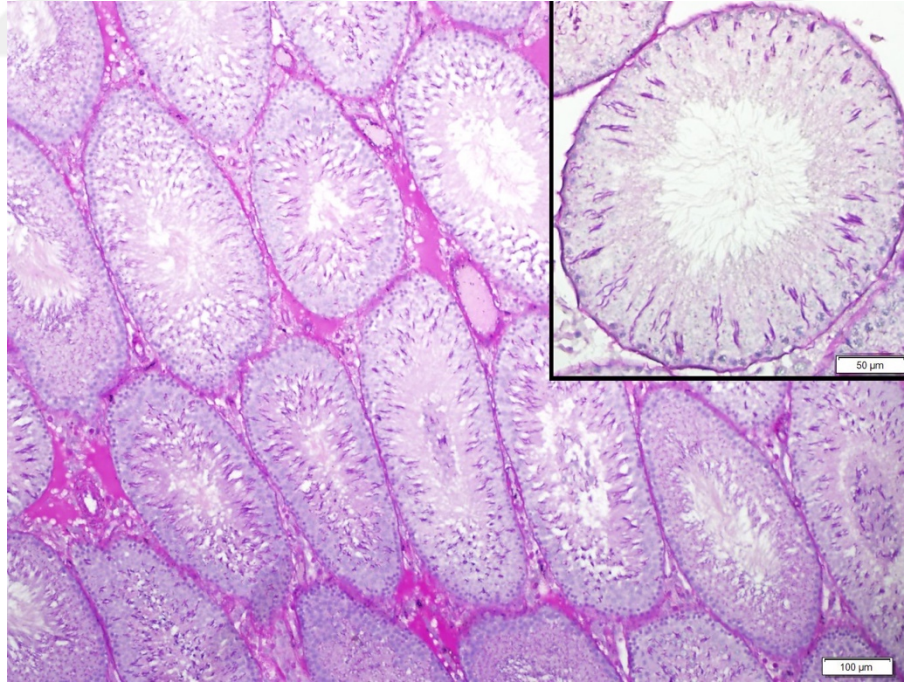
Resim 10. APO grubunda, testis dokusunda normal morfolojik yapıda seminifer tübül yapısı (n) ve germinal epitel izlendi. İncet: Normal morfolojik yapıda seminifer tübül (n). H&E boyama.



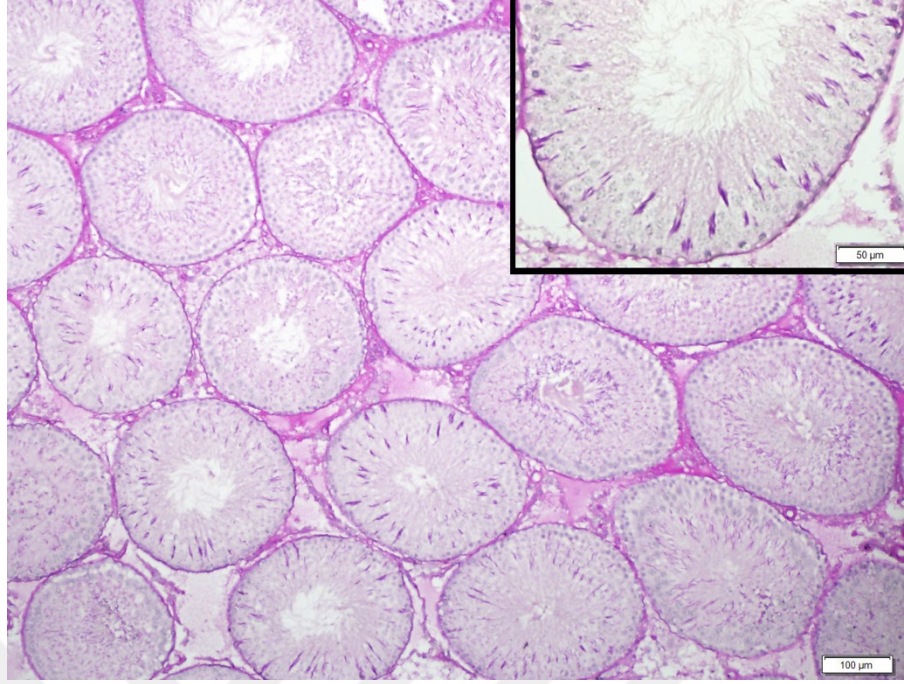
Resim 11. MSG grubunda dejeneratif seminifer tübüllerin bazal membranlarında vakuolizasyon (siyah ok başı) ve dejeneratif seminifer tübül lümeninde az sayıda spermatozoon gözlendi. İncet: Spermatojenik hücre serisinde mitoz bölünme (beyaz ok başı) gözlendi. H&E boyama.



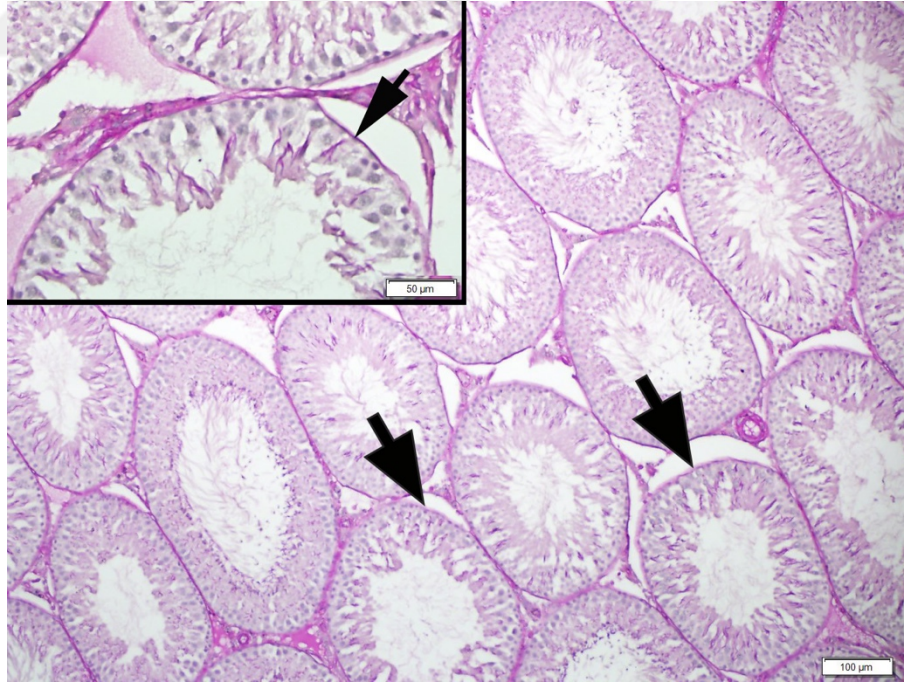
Resim 12. MSG+APO gurubunda normale yakın seminifer tübül (n) morfolojisi gözlendi. İnet: Az sayıda seminifer tübül epitelinde hücrelerarası ayrılma alanları (siyah ok) eşliğinde vakuolizasyon izlendi. H&E boyama.



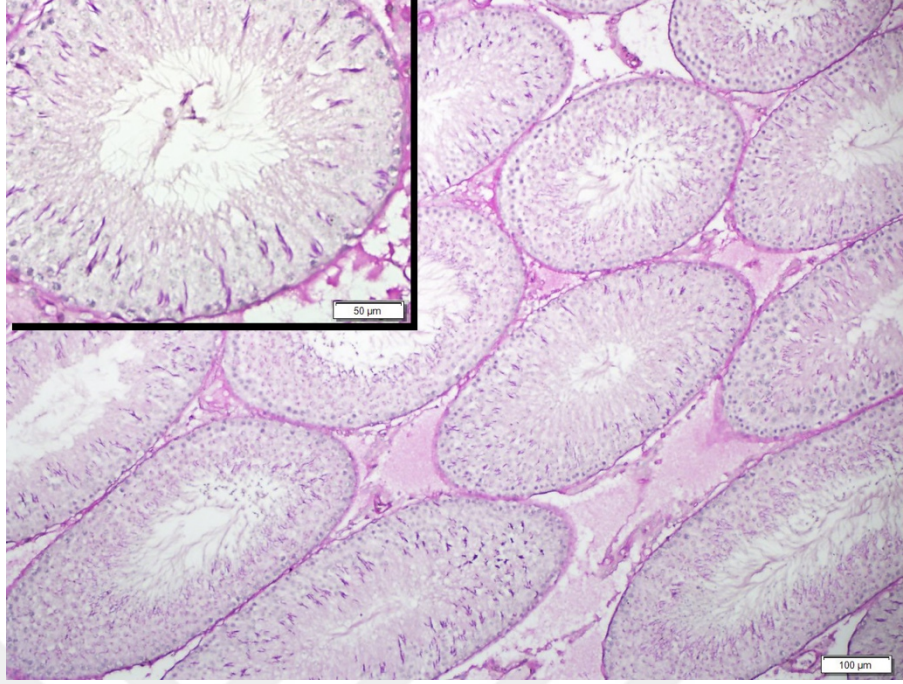
Resim 13. Kontrol grubunda düzenli seminifer tübül organizasyonunun yanı sıra tübüllerin bazal membranlarında kuvvetli PAS- pozitif reaksiyon görüldü. İnet: Bazal membranda kuvvetli PAS-pozitif reaksiyon. PAS reaksiyonu.



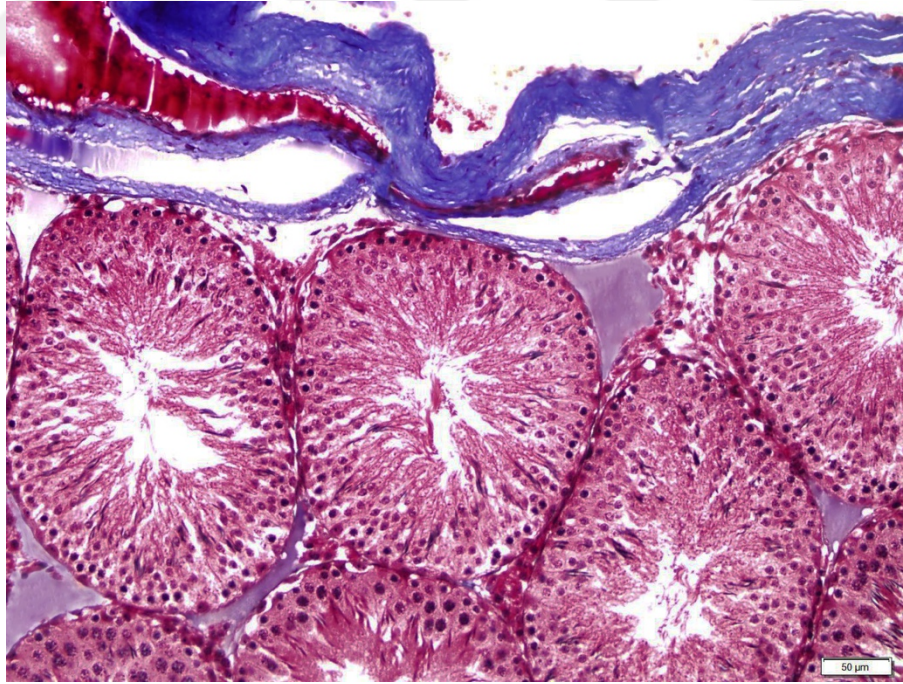
Resim 14. APO grubunda düzenli seminifer tübül organizasyonu ve bazal membranlarda kuvvetli PAS-pozitif reaksiyon gözlemlendi. İnet: Bazal membranda kuvvetli PAS-pozitif reaksiyon. PAS reaksiyonu.



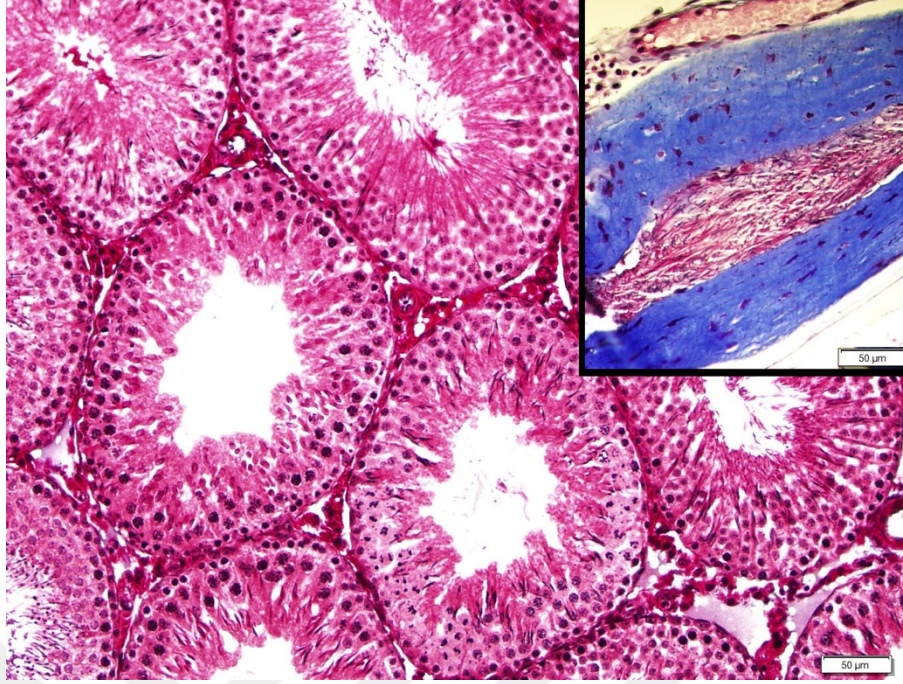
Resim 15. MSG grubunda seminifer tübüllerin bazal membranlarında PAS reaksiyonunda azalma görülürken membran yapısında ondülasyonlar (siyah ok) izlendi. İnet: Bazal membranda ayrılmalar (siyah ok). PAS reaksiyonu.



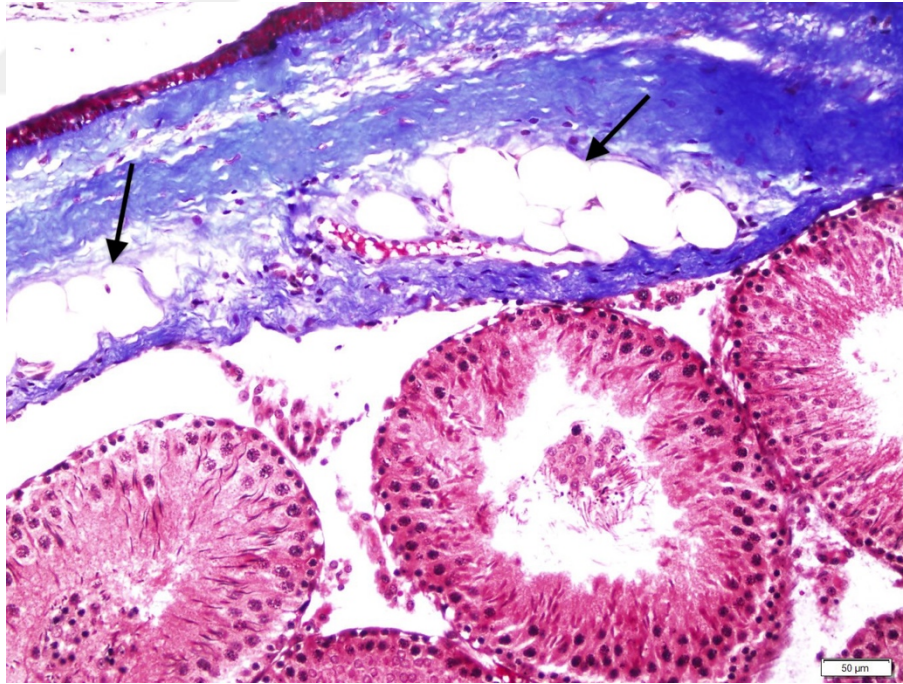
Resim 16. MSG+ APO grubunda seminifer tübüllerin bazal membranlarında Kontrol grubuna yakın oranda PAS-pozitif reaksiyon ve membran yapısı gözlemlendi. İncet: Bazal membranda kuvvetli PAS-pozitif reaksiyon. PAS reaksiyonu.



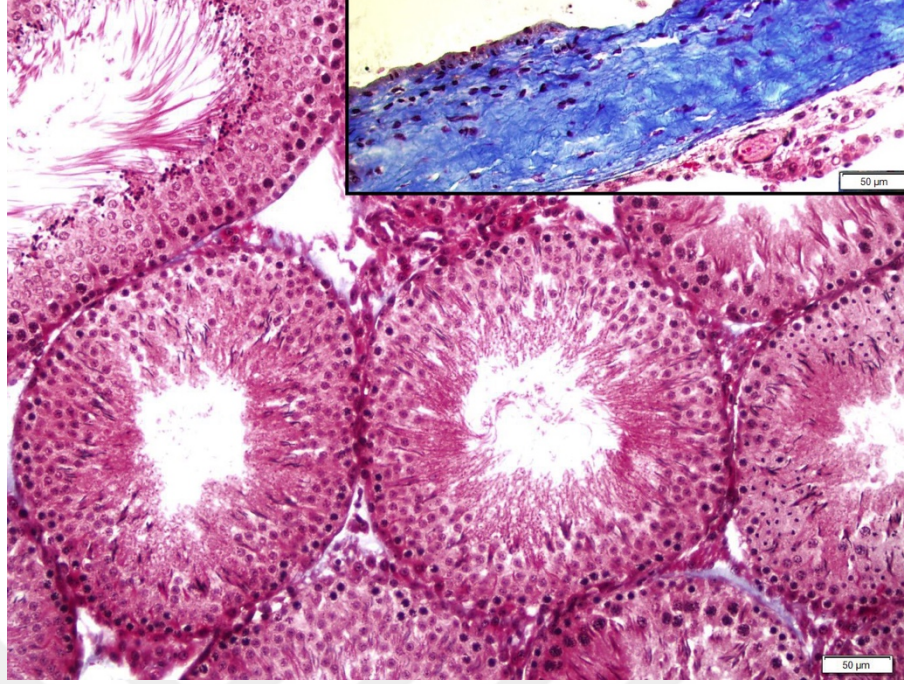
Resim 17. Kontrol grubunda seminifer tübüllerde ve tunika albuginea'da normal bağ dokusu yapılanması görüldü. Masson'un üçlü boyası.



Resim 18. APO grubunda seminifer tübüllerde normal bağ dokusu yapılanması görüldü. İnet: Normal yapıda tunika albuginea. Masson'un üçlü boyası.



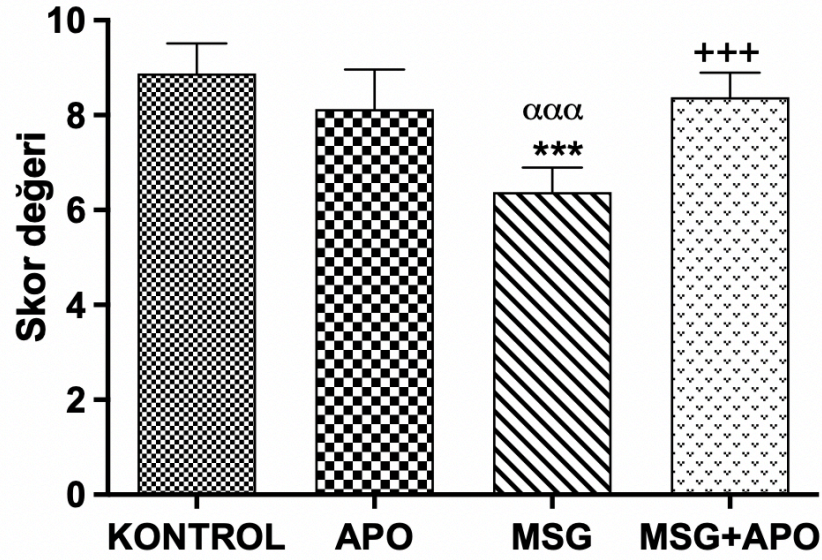
Resim 19. MSG grubunda tunika albuginea'da yağ hücreleri (siyah ok) gözlendi. Masson'un üçlü boyası.



Resim 20. MSG+ APO grubunda normale yakın yapıyı yansıtır seminfer tübül morfolojisi ve bağ dokusu yapılanması görüldü. İncet: Normal yapıda tunika albuginea. Masson'un üçlü boyası.

4.6 Seminfer Tübüllerin Histopatolojik Skorlanması

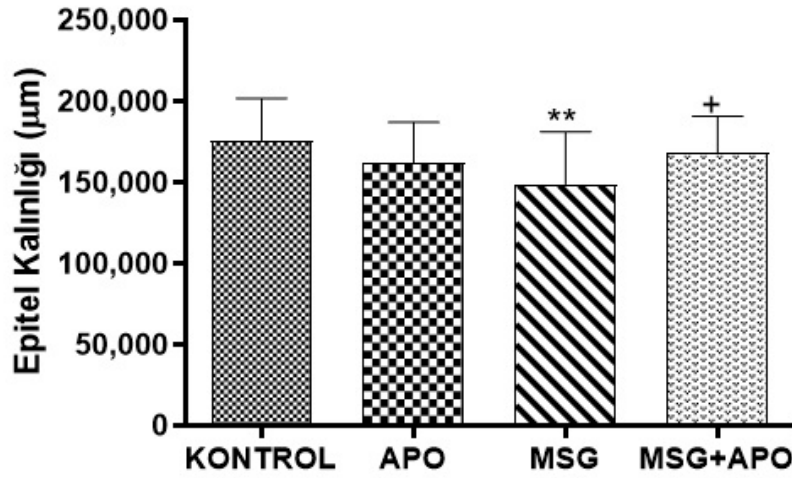
Seminifer tübüllerin modifiye Johnsen histopatolojik skorlama kriterlerine göre değerlendirilmesinde skorlar; Kontrol grubunda $8,8 \pm 0,6$, APO grubunda $8,1 \pm 0,8$, MSG grubunda $6,3 \pm 0,5$, MSG+APO grubunda $8,3 \pm 0,5$ olarak belirlendi. MSG grubu, Kontrol ve APO grupları ile karşılaştırıldığında histopatolojik skorunda anlamlı derecede (sırası ile, $***p < 0,001$, $^{aaa}p < 0,001$) düşüş olduğu gözlemlendi. MSG+APO grubu, MSG grubu ile karşılaştırıldığında skor değerinin anlamlı derecede ($^{+++}p < 0,001$) arttığı görüldü (Şekil 14).



Şekil 14. Seminifer tübül histopatolojik skor değerleri grafiği. *** $p < 0,001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ APO grubu ile karşılaştırıldığında. $+++p < 0,001$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

4.7 Seminifer Tübül Kalınlığı Ölçümü

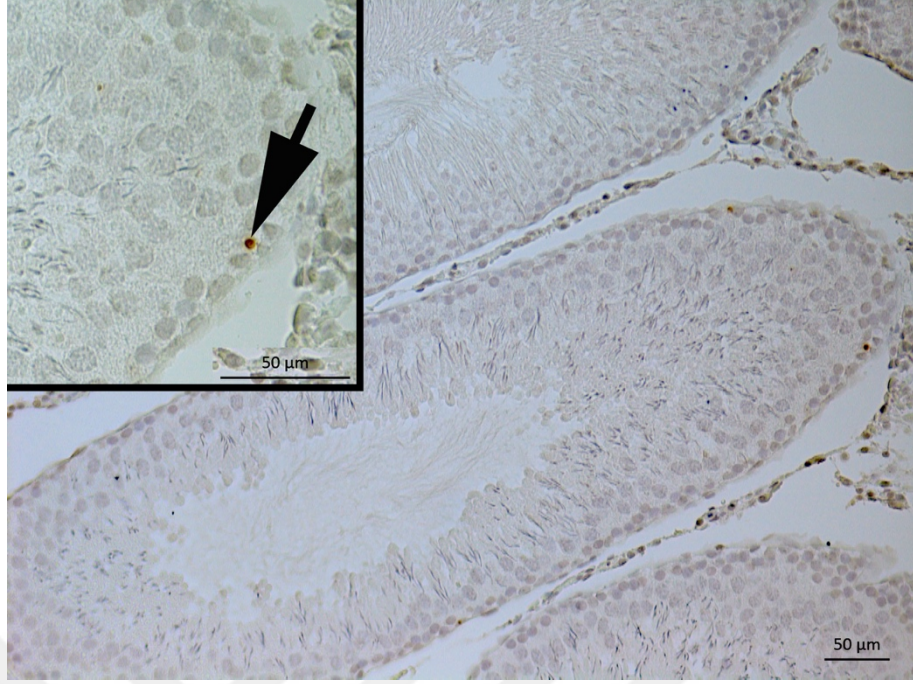
Kontrol grubunda seminifer tübül kalınlığı $150 \pm 22,47 \mu\text{m}$, APO grubunda $153,3 \pm 18,05 \mu\text{m}$, MSG grubunda $81,2 \pm 20,28 \mu\text{m}$, MSG+APO grubunda ise $126,2 \pm 25,17 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. MSG grubu, Kontrol ve APO grubu ile karşılaştırıldığında seminifer tübül kalınlığında anlamlı derecede (sırası ile, *** $p < 0,001$, $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$) düşüş olduğu belirlendi. MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise seminifer tübül epitel kalınlığında anlamlı derecede artış ($+++p < 0,001$) olduğu gözlemlendi (Şekil 15).



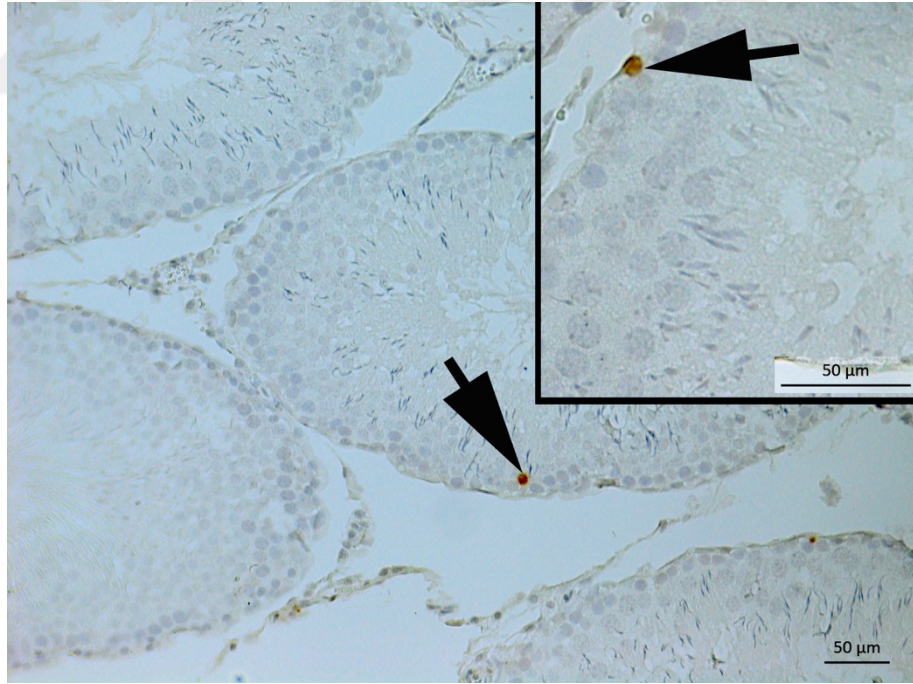
Şekil 15. Deney gruplarının seminifer tübül epitel kalınlığı. ***p<0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aaa}p<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺⁺p<0,001 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

4.8 TUNEL İmmünohistokimyası Bulguları

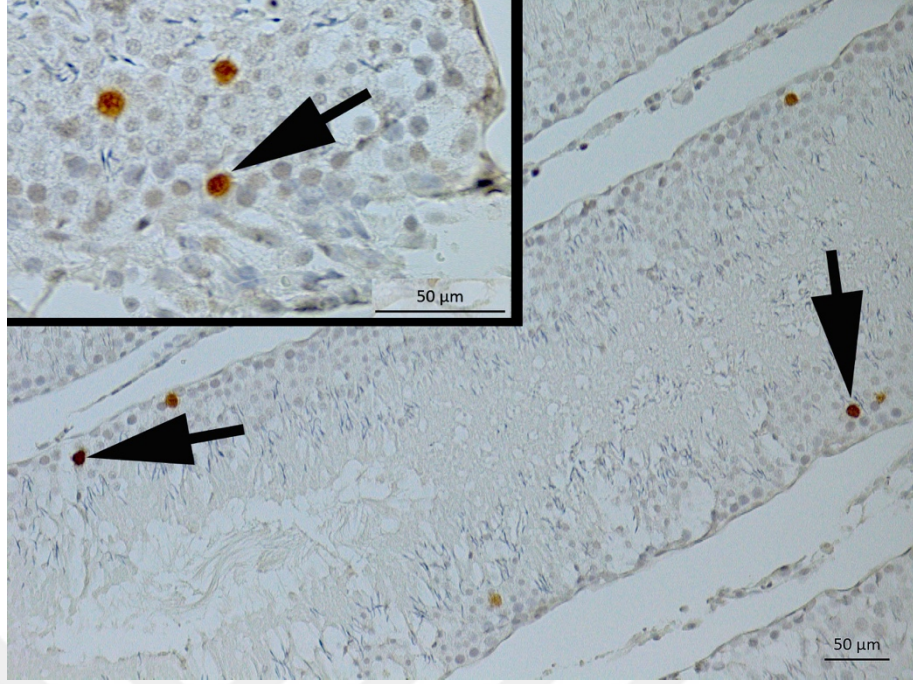
Bütün gruplarda TUNEL-pozitif hücreler koyu kahverengi olarak görüldü. Kontrol grubu ve APO grubunda, 3 ve daha fazla TUNEL- pozitif hücre içeren seminifer tübül sayısının az olduğu gözlemlendi (Resim 21 ve 22). MSG grubu, Kontrol grubu ve APO grubu ile karşılaştırıldığında 3 ve daha fazla sayıda TUNEL- pozitif hücre içeren seminifer tübül sayısında artış görüldü. (Resim 23). MSG+ APO grubunda ise MSG grubu ile karşılaştırıldığında 3 ve daha fazla TUNEL- pozitif hücre içeren seminifer tübül sayısının daha az olduğu tespit edildi (Resim 24). TUNEL immünboyanmasının kontrolü, kit içeriğinde bulunan sıçan meme dokusuna ait pozitif kontrol kesitin kullanılması ile sağlandı (Resim 25).



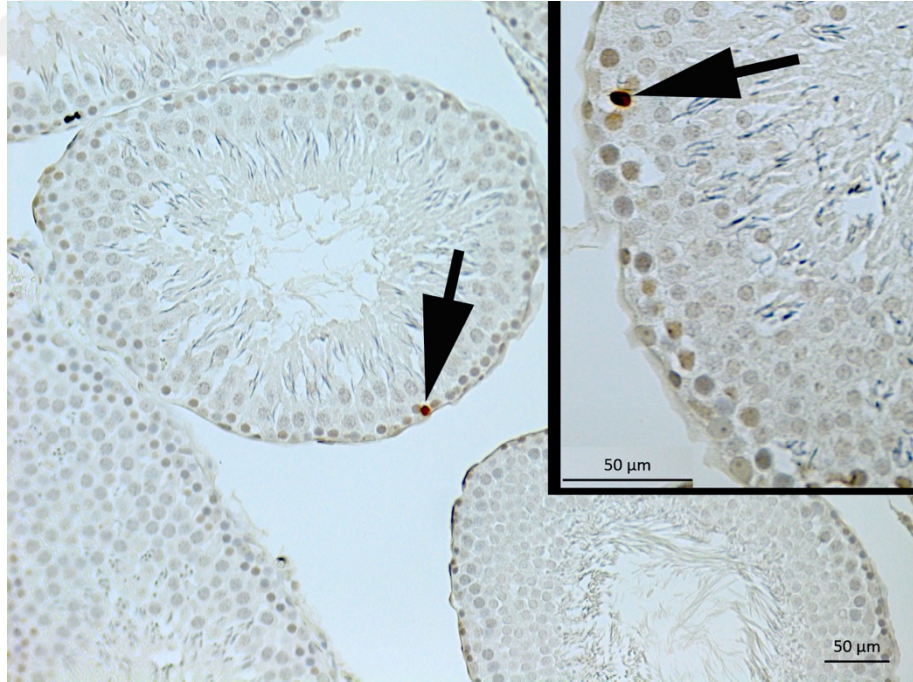
Resim 21. Kontrol grubunun seminifer tübül germinal epitelinde az sayıda TUNEL- pozitif hücre izlendi. İncet: TUNEL-pozitif hücre. TUNEL immünhistokimyası.



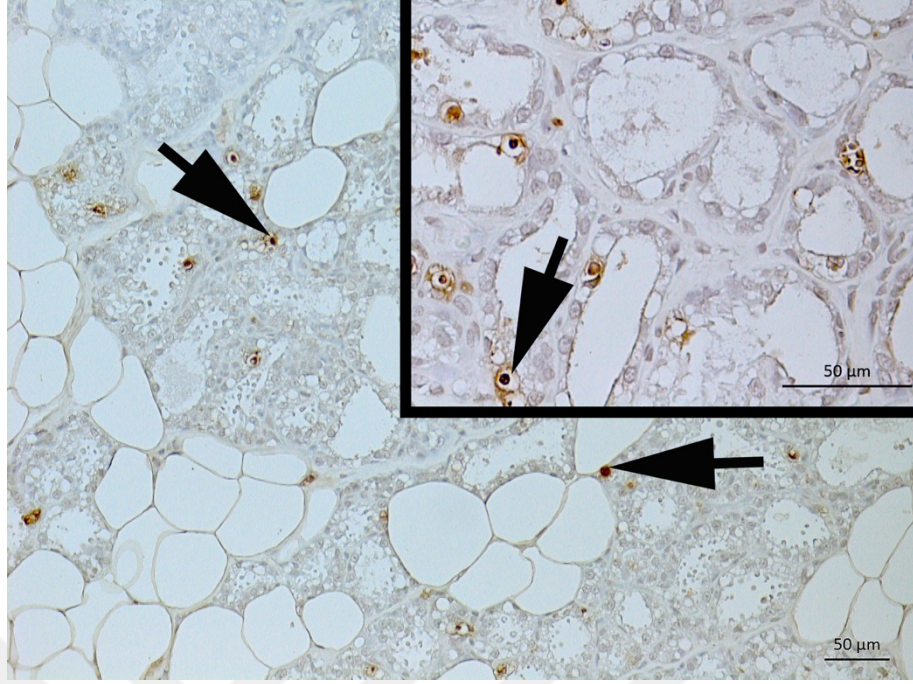
Resim 22. APO grubunun seminifer tübül epitelinde çok az sayıda TUNEL- pozitif hücre (siyah ok) görüldü . İncet: TUNEL-pozitif hücre (siyah ok). TUNEL immünhistokimyası.



Resim 23. MSG grubunun seminifer tübül germinal epitelinde çok sayıda TUNEL-pozitif hücre (siyah ok) izlendi. İncet: TUNEL-pozitif hücre (siyah ok). TUNEL immünhistokimyası.



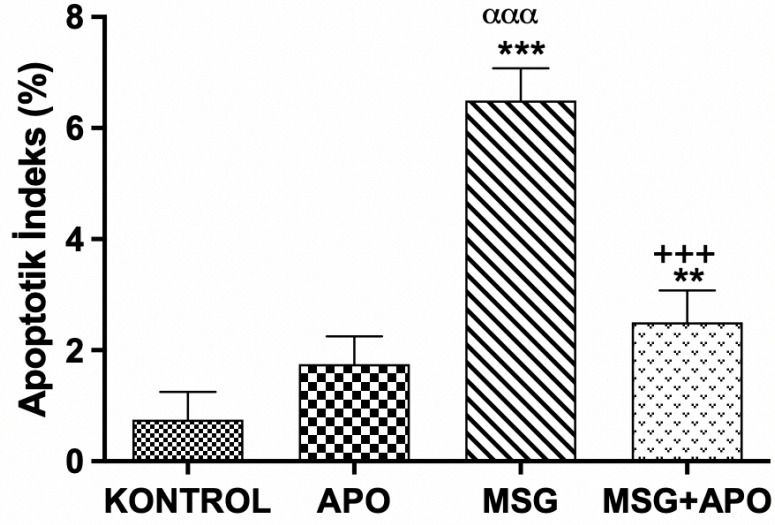
Resim 24. MSG + APO grubunun seminifer tübül germinal epitelinde az sayıda TUNEL- pozitif hücre (siyah ok) gözlemlendi. İncet: TUNEL-pozitif hücre (siyah ok). TUNEL immünhistokimyası.



Resim 25. Pozitif kontrol amaçlı boyanan meme dokusu kesitinde çok sayıda TUNEL-pozitif hücreler (siyah ok) izlendi. İncet: TUNEL-pozitif hücre (siyah ok). TUNEL immünhistokimyası.

4.9 Apoptotik İndeks Analizi

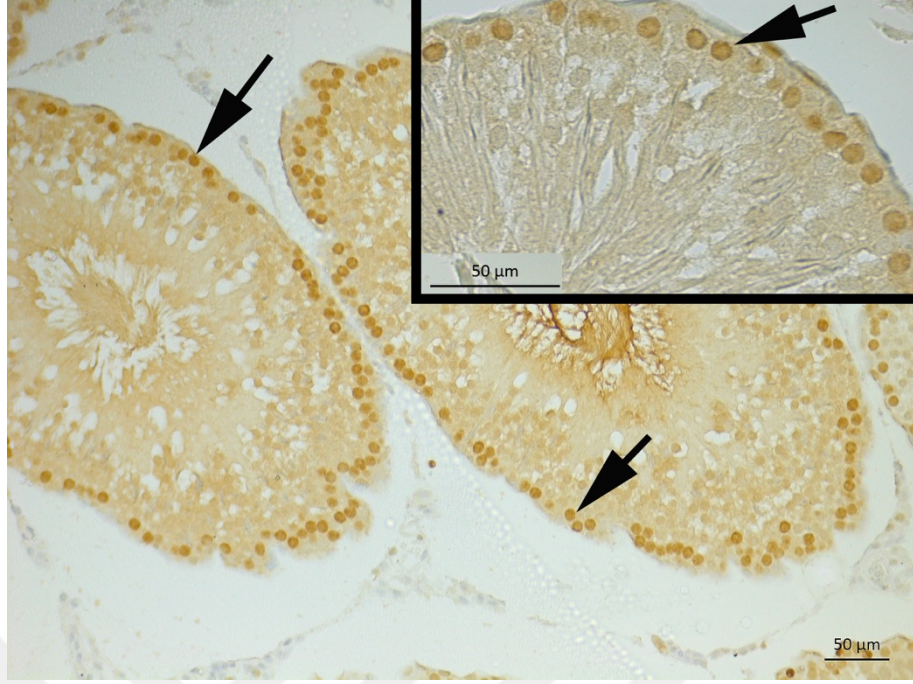
Apoptotik indeks Kontrol grubunda $0,75 \pm 0,5$, APO grubunda $1,75 \pm 0,5$, MSG grubunda $6,5 \pm 0,5$ ve MSG+APO grubunda ise $2,5 \pm 0,5$ olarak belirlendi. MSG grubu ve MSG+APO grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede (sırası ile $***P < 0,001$, $**p < 0,01$) artış olduğu görüldü. MSG grubu APO grubu ile karşılaştırıldığında da anlamlı derecede ($^{aaa}p < 0,001$) artış gözlemlendi. MSG +APO grubu, MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı derecede ($^{+++}p < 0,001$) düşüş gözlemlendi (Şekil 16).



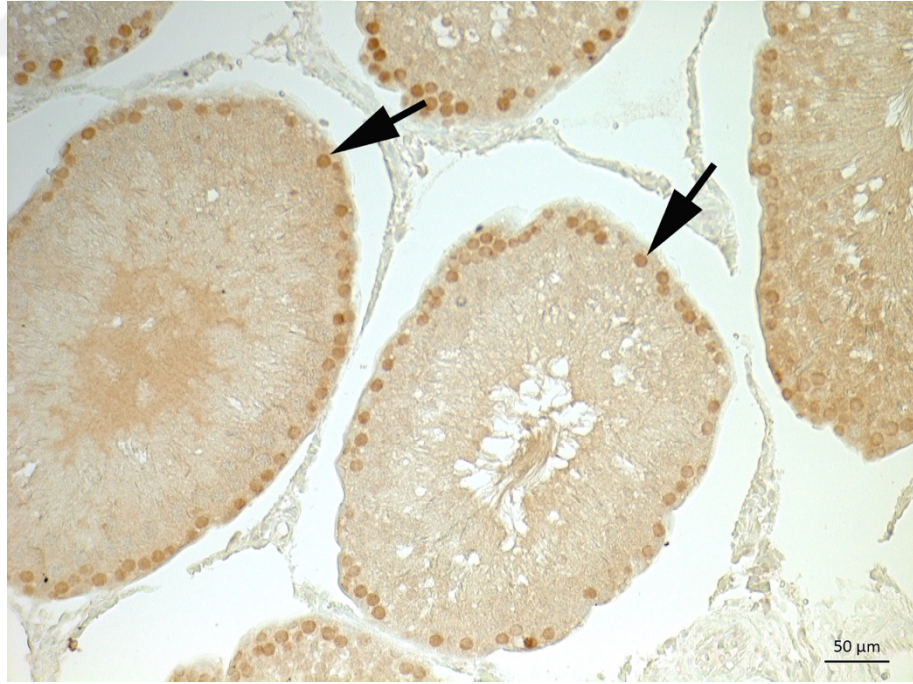
Şekil 16. Deney gruplarının apoptotik indeks grafiği. *** p<0,001 ve **p<0,01 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. αααp<0,001 APO grubu ile karşılaştırıldığında. +++p<0,001 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

4.10 PCNA İmmünohistokimyası Bulguları

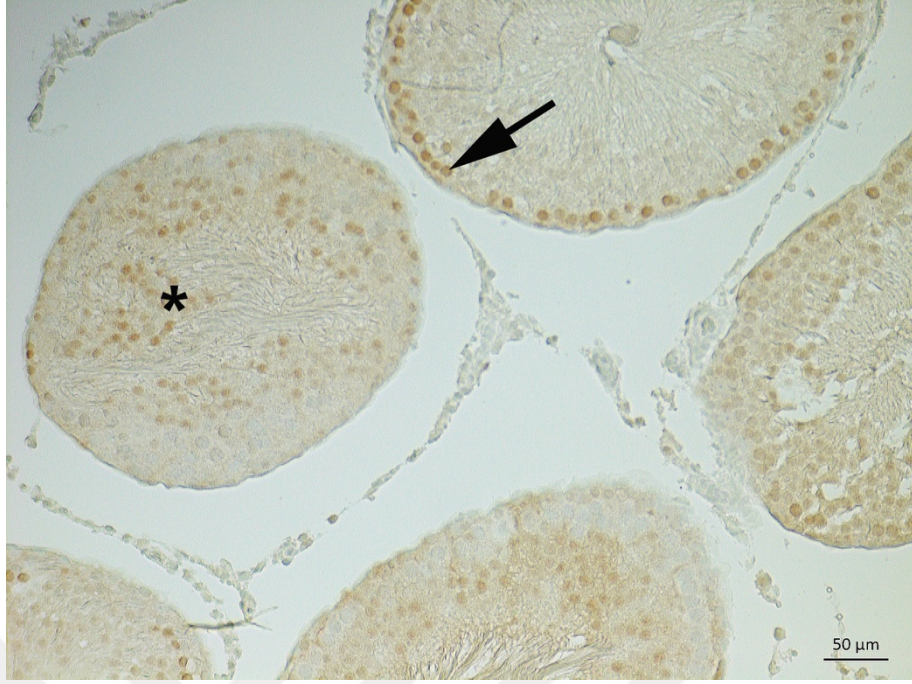
Deney gruplarına ait doku kesitlerine PCNA immünohistokimyası uygulaması sonrası kesitlerde PCNA-pozitif hücreler koyu kahverengi olarak gözlemlendi. Kontrol grubunda ve APO grubunda çok fazla sayıda spermatogenik hücre serisine ait hücrelerde PCNA-pozitif reaksiyon gözlemlendi (Resim 26 ve 27). MSG grubunda ise PCNA-pozitif spermatogenik hücre sayısında düşüş gözlemlendi (Resim 28). MSG+APO grubunda ise MSG grubu ile karşılaştırıldığında PCNA-pozitif spermatogenik hücre sayısında artış gözlemlendi (Resim 29).



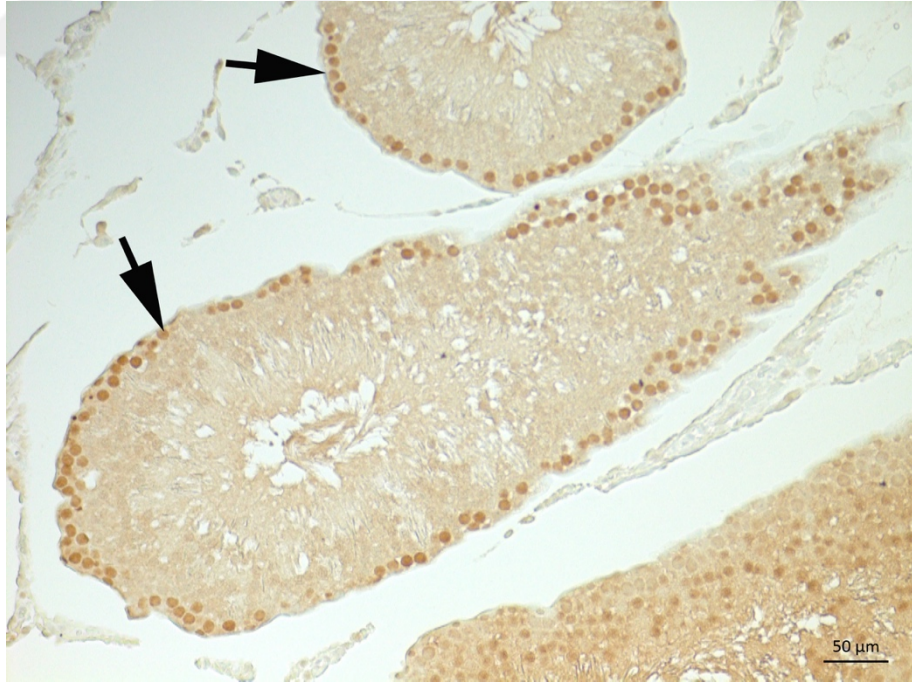
Resim 26. Kontrol grubunda, germinal epitelde çok sayıda koyu kahverengi PCNA-pozitif hücreler (siyah ok) görüldü. İnet: PCNA-pozitif hücre (siyah ok). PCNA immünohistokimyası.



Resim 27. APO grubunda, germinal epitelde koyu kahverengi PCNA-pozitif hücreler (siyah ok) görüldü. PCNA immünohistokimyası.



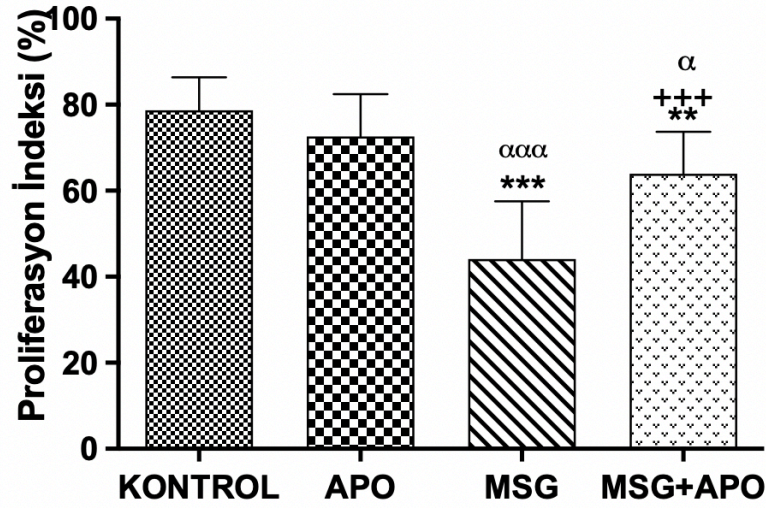
Resim 28. MSG grubunda germinal epitelde az sayıda PCNA-pozitif spermatogenik hücre (siyah ok) ve lümende yer yer germinal epitele ait döküntü hücreleri (*) görüldü. PCNA immünohistokimyası.



Resim 29. MSG+APO grubunda, germinal epitelde PCNA- pozitif spermatogenik hücreler (siyah ok) görüldü. PCNA immünohistokimyası.

4.11 Proliferasyon İndeksi Analizi

Proliferasyon indeksi Kontrol grubunda $78,67 \pm 7,68$, APO grubunda $72,63 \pm 9,8$, MSG grubunda $44,15 \pm 13,42$, MSG+APO grubunda $63,93 \pm 9,77$ idi. MSG grubu ve MSG+APO grubu, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyon indeksinde anlamlı azalma (sırası ile $***p<0,001$, $**p<0,01$) olduğu gözlemlendi. MSG ve MSG+APO grupları APO grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyon indeksinde anlamlı azalma (sırası ile $^{aaa}p<0,001$, $^ap<0,05$) olduğu izlendi. MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise proliferasyon indeksinde anlamlı bir artış ($^{+++}p<0,001$) vardı (Şekil 17).

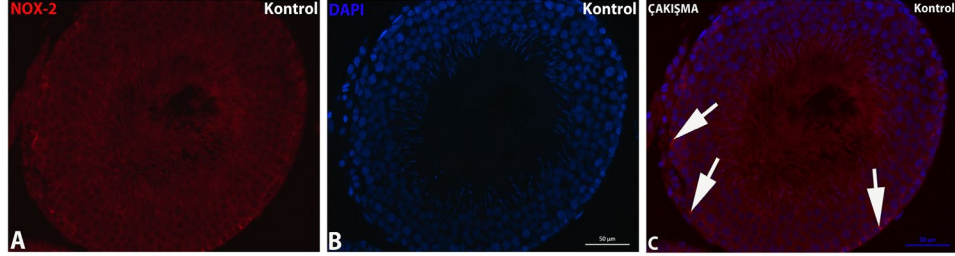


Şekil 17. Deney gruplarının proliferasyon indeksi grafiği. $***p<0,001$ ve $**p<0,01$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $^{aaa}p<0,001$ ve $^ap<0,05$ APO grubu ile karşılaştırıldığında. $^{+++}p<0,001$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

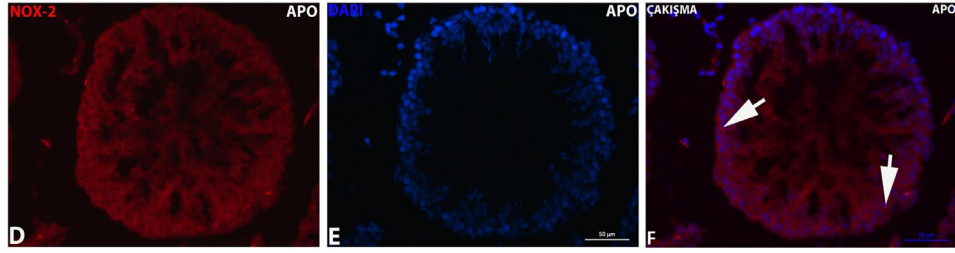
4.12 NOX-2 İmmünohistokimyası Bulguları

NOX-2 immünohistokimya uygulaması sonucunda seminifer tübül germinal epitelinde NOX-2-pozitif hücreler parlak kırmızı renkte izlendi. Spermatogenik hücre nükleusları DAPI ile maviye boyandı. NOX-2 ve DAPI görüntüleri çakıştırılıp (ÇAKIŞMA) NOX-2 pozitif hücreler gösterildi. Gruplar karşılaştırıldığında en yoğun immünopozitivite MSG grubunda görülürken (Resim 32I, Resim 34), MSG+APO

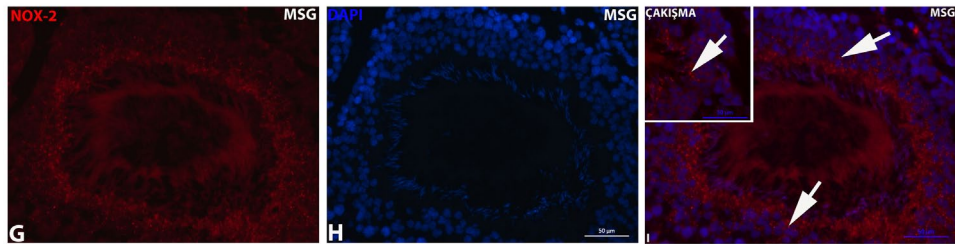
grubunda immünpozitivitede azalma gözlemlendi (Resim 33L, Resim 34). Kontrol ve APO grubunda da zayıf NOX-2 immünpozitivitesi izlendi (Resim 30C, Resim 31F, Resim 34.)



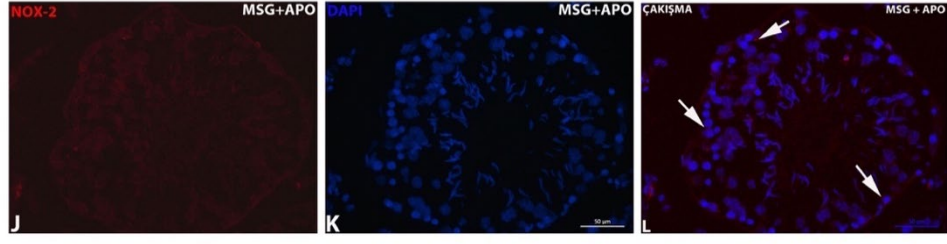
Resim 30. Kontrol grubunda seminifer tübül epitelinde NOX-2 pozitif hücreler (A), seminifer tübül epitel hücrelerinde DAPI ile boyanmış hücreler (B) ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırma görüntüsü (C). NOX-2- pozitif bölgeler (beyaz ok). NOX-2 immünhistokimyası.



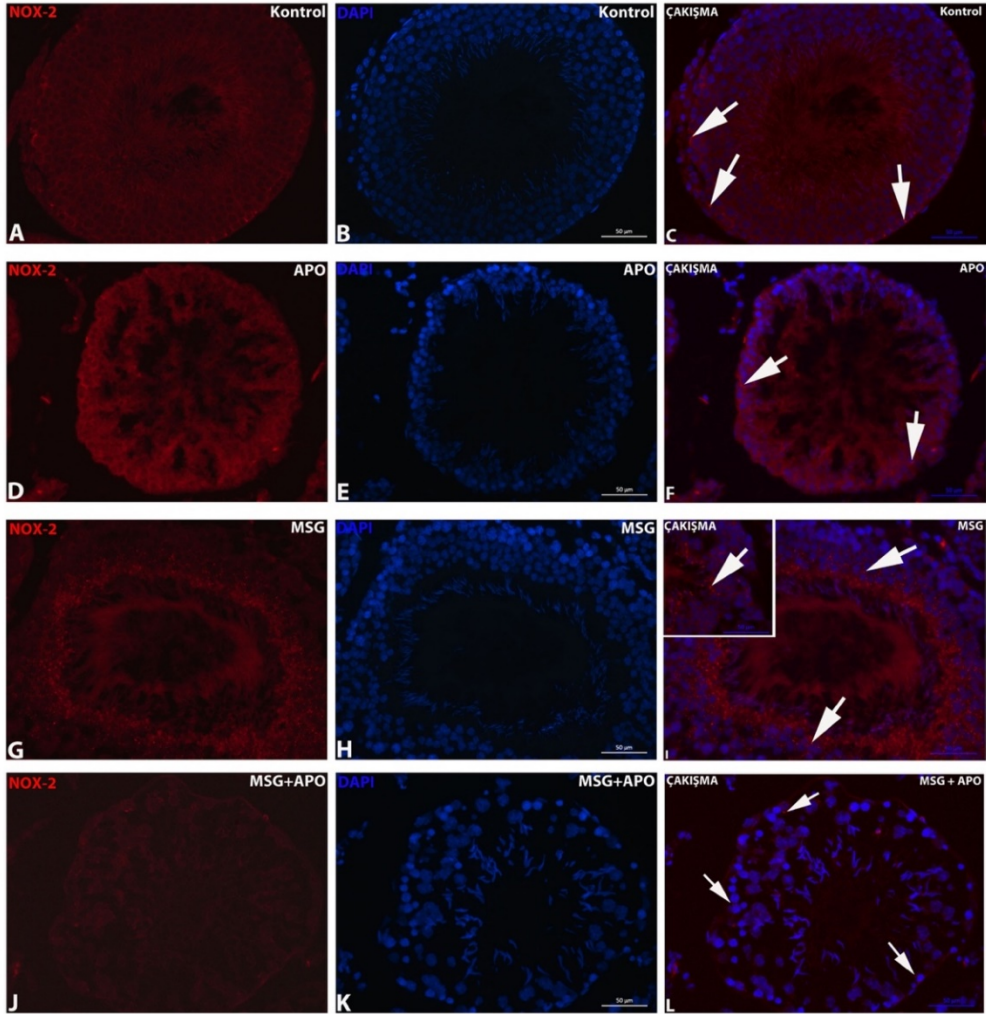
Resim 31. APO grubunda seminifer tübül epitelinde NOX-2 pozitif hücreler (D), seminifer tübül epitel hücrelerinde DAPI ile boyanmış hücreler (E) ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırma görüntüsü (F). NOX-2- pozitif bölgeler (beyaz ok). NOX-2 immünhistokimyası.



Resim 32. MSG grubu seminifer tübül epitelinde NOX-2 pozitif hücreler (G), seminifer tübül epitel hücrelerinde DAPI ile boyanmış hücreler(H) ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırma görüntüsü (I). Seminifer tübül epiteli adluminal bölgede yoğun NOX-2-pozitivite (beyaz ok). İnset NOX-2-pozitif bölgeler (beyaz ok). NOX-2 immünhistokimyası



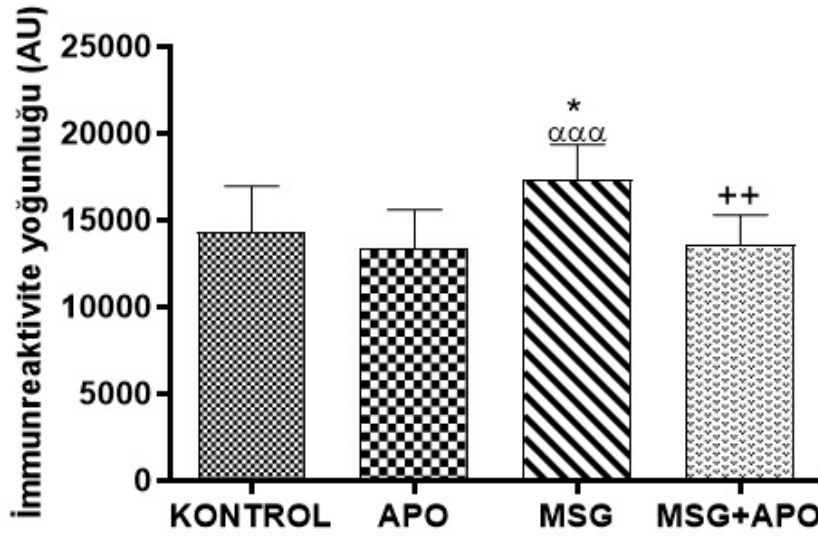
Resim 33. MSG+APO grubunda seminifer tübül epitelinde NOX-2 pozitif hücreler (J), seminifer tübül epitelinde DAPI ile boyanmış hücreler (K) ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırma görüntüsü (L). Seminifer tübül epiteli bazal ve adluminal bölgede düşük NOX-2- immunpozitivite (beyaz ok). NOX-2 immünohistokimyası.



Resim 34. Deney gruplarının tamamında NOX-2 ve DAPI boyanması ve iki immunfloresan boyamanın çakıştırması (A-L), NOX-2 pozitif hücreler (beyaz ok). Kontrol grubunda (A-C), APO grubunda (D-F), MSG grubunda (G-I), MSG+APO grubunda (J-L). NOX-2 immünohistokimyası.

4.13 NOX-2 İmmünreaktivite Yoğunluğu Analizi

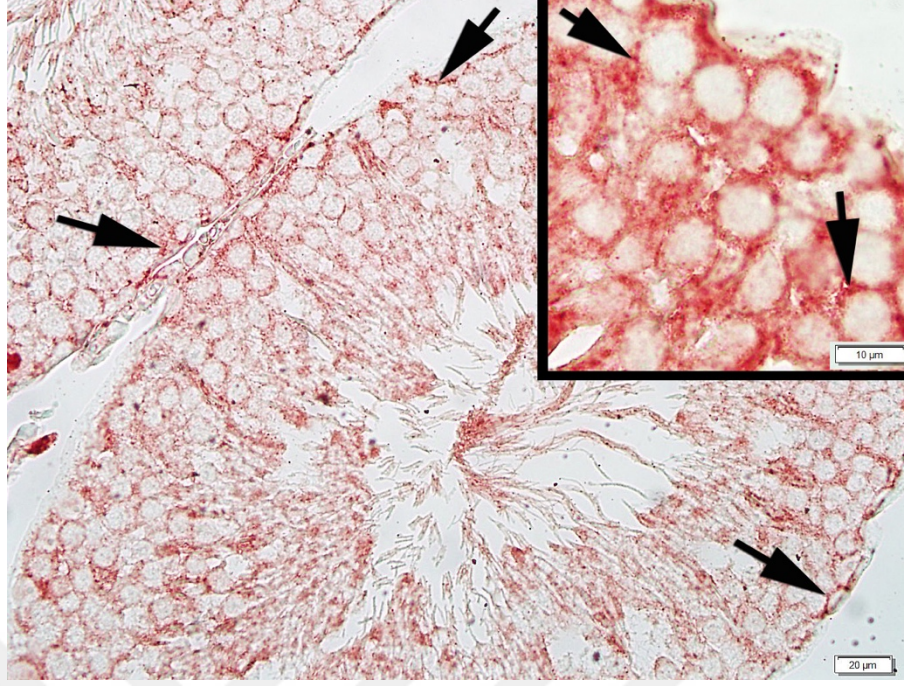
NOX-2 immünreaktivite yoğunluğu Kontrol grubunda 14.281 ± 2.675 AU, APO grubunda 13.339 ± 2260 AU, MSG grubunda 17.362 ± 2012 AU, MSG+APO grubunda 13.568 ± 1.731 AU' dır. Kontrol grubu ve APO grubu ile karşılaştırıldığında immünreaktivite yoğunluğunda MSG grubunda anlamlı bir artış (sırası ile $*p<0,05$, $^{aaa}p<0,001$) olduğu gözlemlendi. MSG+APO grubu, MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir azalma ($^{++}p<0,01$) izlendi (Şekil 18).



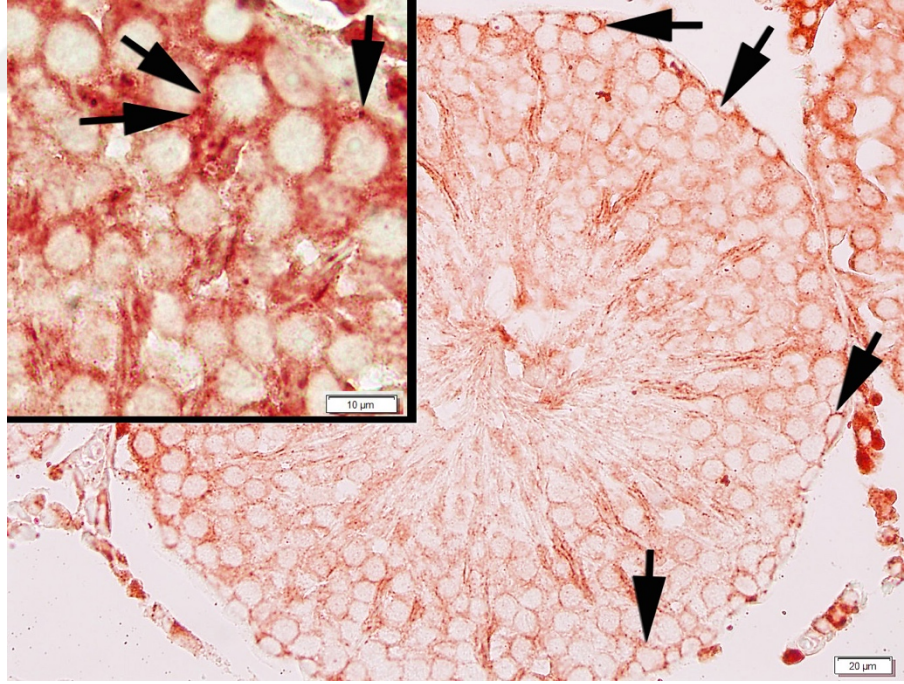
Şekil 18. NOX-2 immünreaktivite yoğunluğu grafiği. $*p<0,05$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $^{aaa}p<0,001$ APO grubu ile karşılaştırıldığında. $^{++}p<0,01$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

4.14 ZO-1 İmmünohistokimyası Bulguları

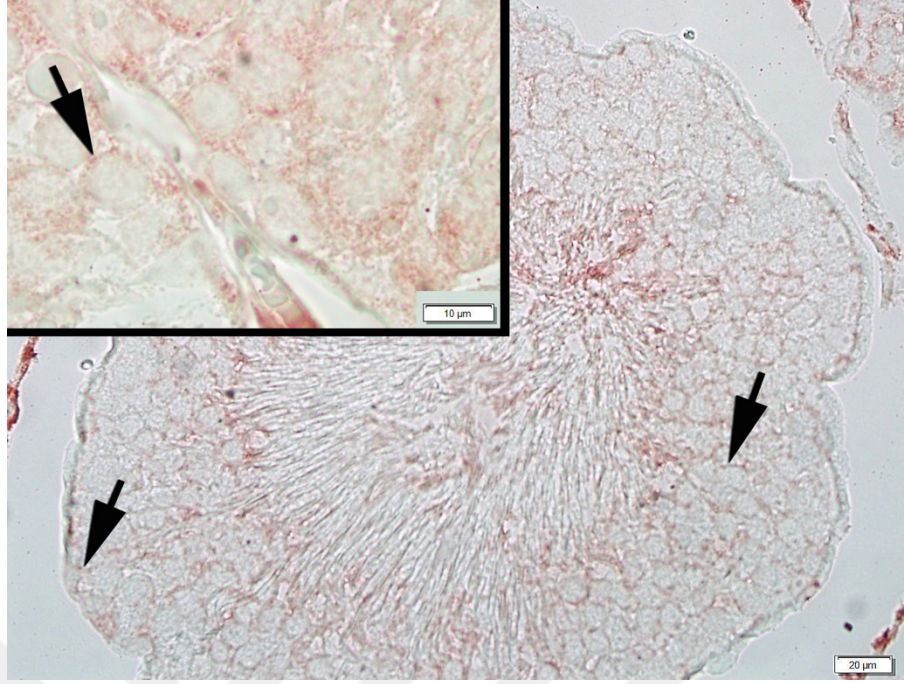
ZO-1 immünohistokimyası uygulaması sonrası seminifer tübül germinal epitelinde yer alan Sertoli hücrelerinin bazolateral sitoplazmasında ZO-1- immün pozitif bölgeler koyu kırmızı renkte gözlemlendi. ZO-1 immünreaktivite yoğunluğu Kontrol grubunda (Resim 35) ve APO grubunda (Resim 36) en yüksek iken, MSG grubunda immünreaktivite yoğunluğunda ve dağılımında azalma gözlemlendi (Resim 37). MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise ZO-1 pozitif bölgelerde artış gözlemlendi (Resim 38).



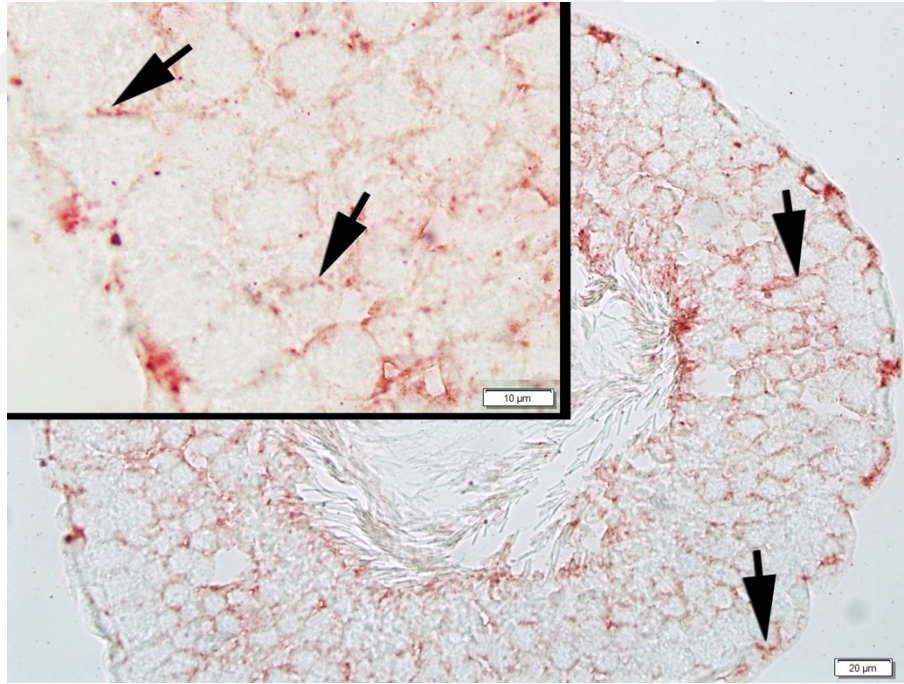
Resim 35. Kontrol grubunda yaygın ZO-1 -pozitif bölgeler (siyah ok) gözlemlendi. İncet: ZO-1- pozitif bölgeler (siyah ok). ZO-1 immünhistokimyası.



Resim 36. APO grubunda yoğun ZO-1 pozitif boyanma (siyah ok) izlendi. İncet: ZO-1 pozitif boyanan bölgeler (siyah ok). ZO-1 immünhistokimyası.



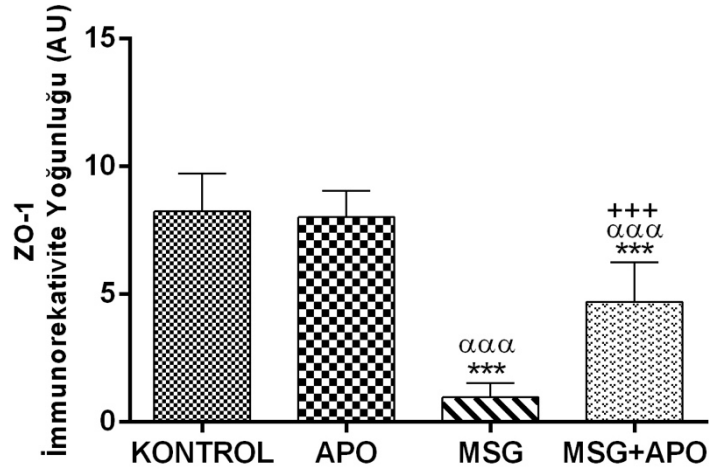
Resim 37. MSG grubunda zayıf ZO-1 immünreaktivitesi (siyah ok) gözlemlendi. İnceleme: Zayıf ZO-1 immünreaktivite. ZO-1 immünhistokimyası.



Resim 38. MSG+APO grubunda Kontrol grubuna yakın yoğunlukta ZO-1 immünreaktivitesi izlendi. İnceleme: ZO-1- pozitif bölgeler (siyah ok) . ZO-1 immünhistokimyası.

4.15 ZO-1 İmmünreaktivite Yoğunluğu Analizi

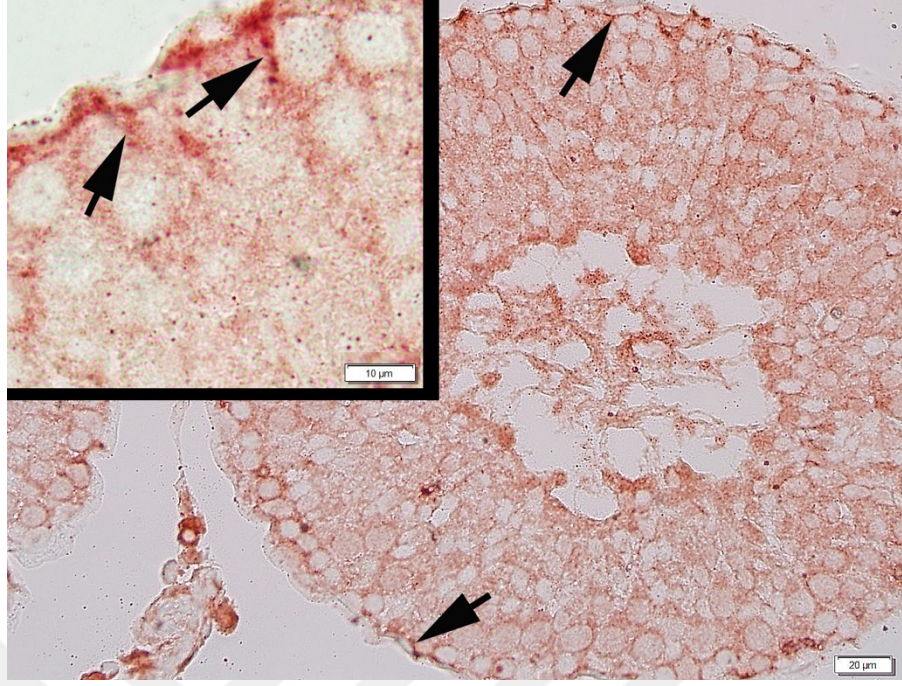
ZO-1 immünreaktivitesi yoğunluğu Kontrol grubunda $8,23 \pm 1,48$ AU, APO grubunda $8,06 \pm 1,04$ AU, MSG grubunda $0,97 \pm 0,5$ AU, MSG+APO grubunda ise $4,71 \pm 1,54$ AU olarak belirlendi. Kontrol grubu ve APO grubu ile karşılaştırıldığında immünreaktivite yoğunluğunda MSG grubunda anlamlı azalma (sırası ile $***p < 0,001$, $^{aaa}p < 0,001$) olduğu gözlemlendi. MSG+APO grubu, Kontrol grubu ve APO grubu ile karşılaştırıldığında aynı şekilde anlamlı derecede (sırası ile $***p < 0,001$, $^{aaa}p < 0,001$) azalma gözlemlendi. MSG+ APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise immünreaktivite yoğunluğunda anlamlı derecede ($^{+++}p < 0,001$) artış belirlendi (Şekil 19).



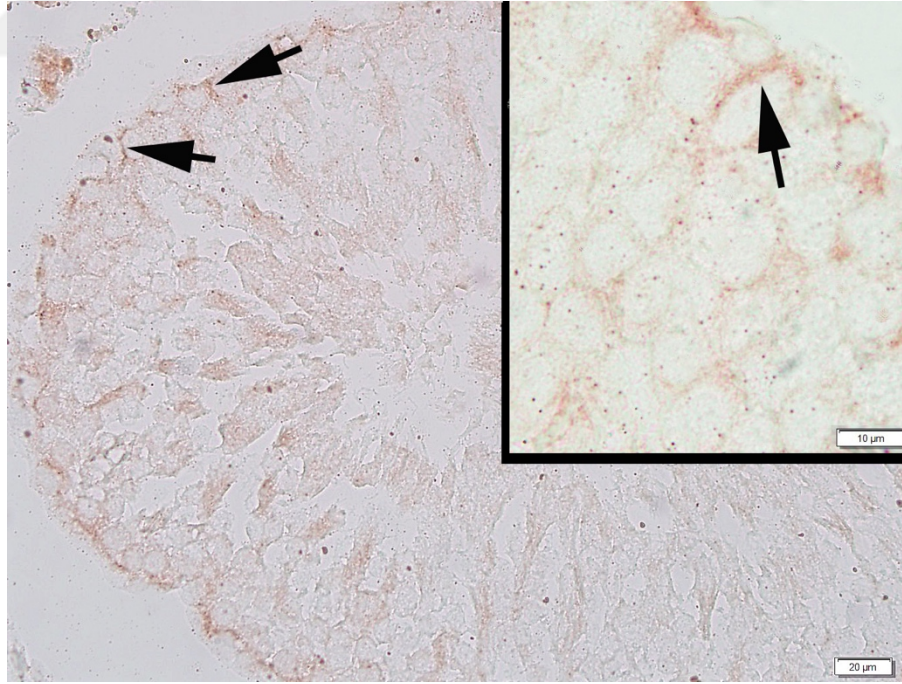
Şekil 19. ZO-1 immünreaktivite yoğunluğu grafiği. $***p < 0,001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $^{aaa}p < 0,001$ APO grubu ile karşılaştırıldığında. $^{+++}p < 0,001$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

4.16 Okludin İmmünohistokimyası Bulguları

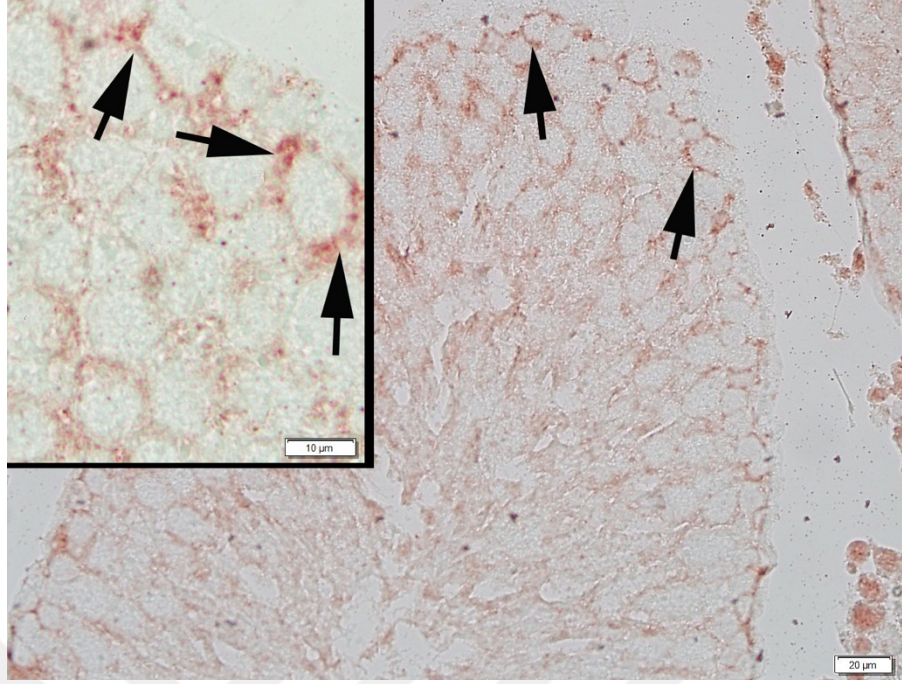
Okludin immünohistokimyası uygulaması sonucunda okludin immünreaktivitesinin olduğu bölgeler koyu kırmızı renkte gözlemlendi. Okludin immünreaktivitesi Kontrol grubu (Resim 39) ve APO grubunda (Resim 40) çok sayıda seminifer tübüldeki Sertoli hücrelerinin bazolateralinde yoğun şekilde gözlenirken, MSG grubunda okludin immünreaktivitesinde düşüş ve dağılımında yer yer düzensizlikler olduğu gözlemlendi (Resim 41). MSG+APO grubunda yer yer zayıf



Resim 40. APO grubunda yoğun okludin- pozitif bölgeler (siyah ok) seminifer tübül bazal membranına yakın, koyu kırmızı renkte görüldü. İncet: Okludin- pozitif bölgeler (siyah ok). Okludin immünhistokimyası.



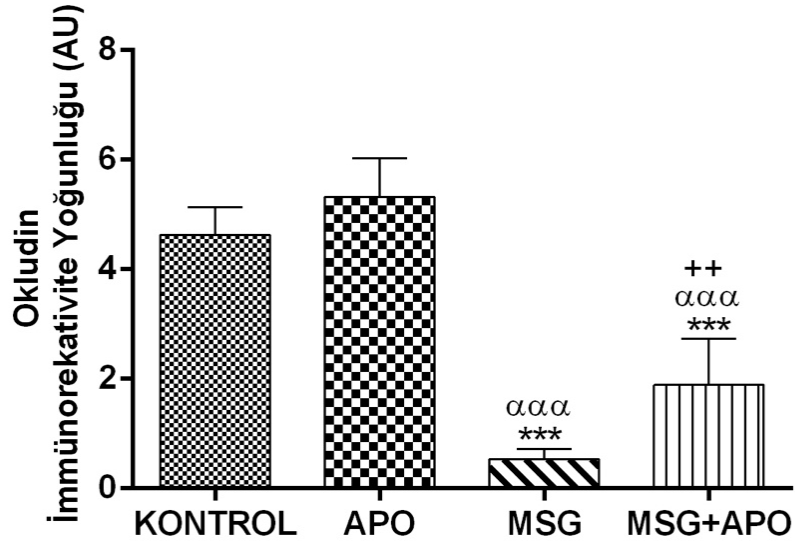
Resim 41. MSG grubunda okludin immünreaktivitesi seyrek bölgelerde (siyah ok) gözlemlendi. İncet: Zayıf okludin immünreaktivitesi (siyah ok). Okludin immünhistokimyası.



Resim 42. MSG+APO grubunda, normale yakın dağılımda okludin-pozitif bölgeler (siyah ok) gözlemlendi. İncet: Okludin-pozitif bölgeler (siyah ok). Okludin immünohistokimyası.

4.17 Okludin İmmünoreaktivite Yoğunluğu Analizi

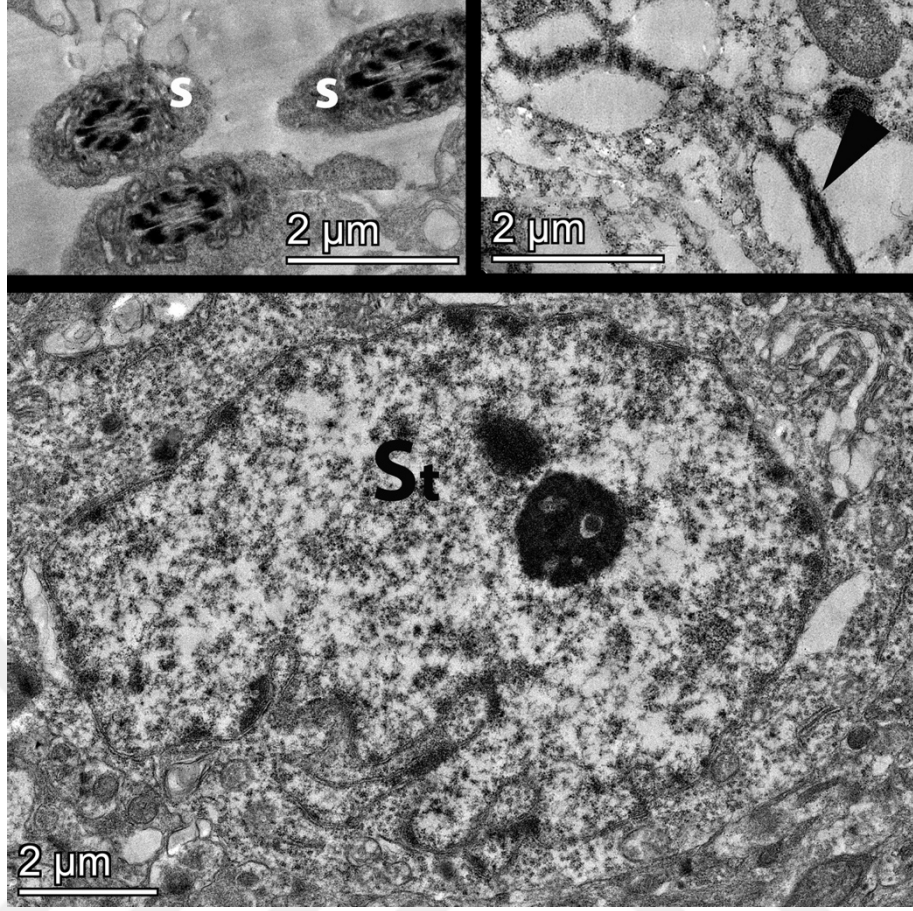
Okludin immünoreaktivitesi yoğunluğu Kontrol grubunda $4,633 \pm 0,499$ AU, APO grubunda $5,324 \pm 0,7$ AU, MSG grubunda $0,538 \pm 0,179$ AU, MSG+APO grubunda ise $1,89 \pm 0,83$ AU olarak belirlendi. Kontrol grubu ve APO grubu ile karşılaştırıldığında immünoreaktivite yoğunluğunda MSG grubunda anlamlı (sırası ile $^{***}p < 0,001$, $^{aaa}p < 0,001$) bir azalma olduğu gözlemlendi. MSG+APO grubu, Kontrol grubu ve APO grubu ile karşılaştırıldığında aynı şekilde anlamlı derecede (sırası ile $^{***}p < 0,001$, $^{aaa}p < 0,001$) azalma gözlemlendi. MSG+ APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise okludin immünoreaktivitesinde anlamlı derecede ($^{++}p < 0,01$) artış gözlemlendi (Şekil 20).



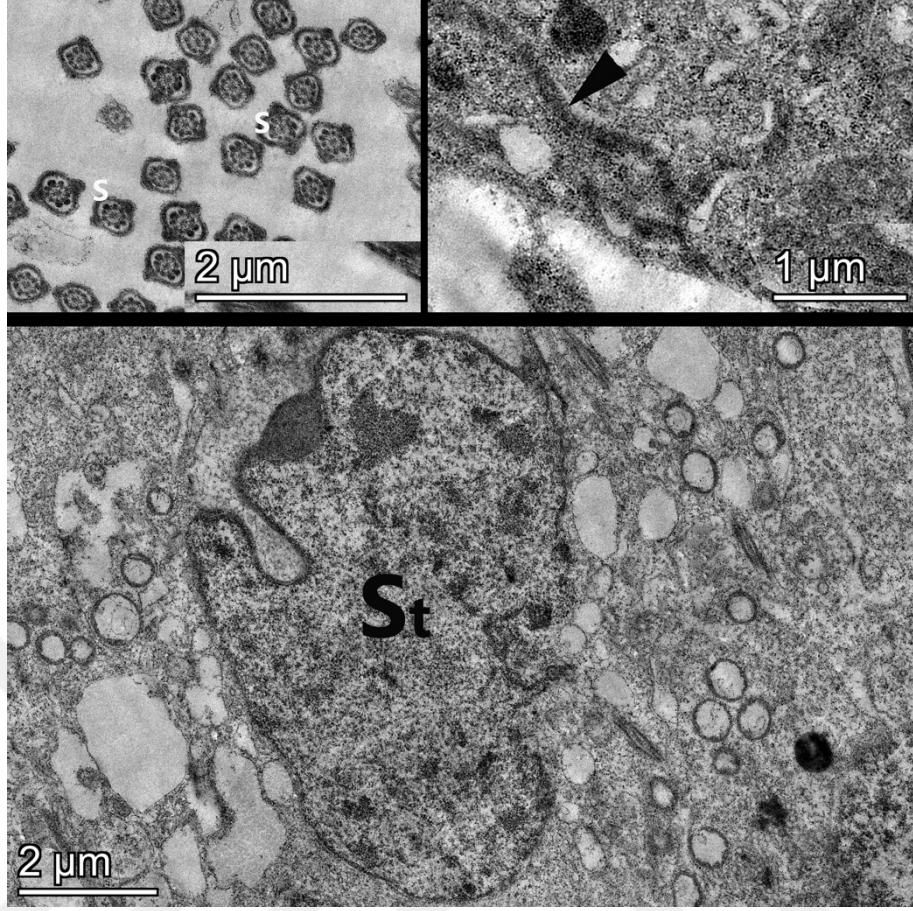
Şekil 20. Okludin immünoreaktivite yoğunluğu grafiği. *** $p < 0,001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $^{aaa}p < 0,001$ APO grubu ile karşılaştırıldığında. $^{++}p < 0,01$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

4.18 Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları

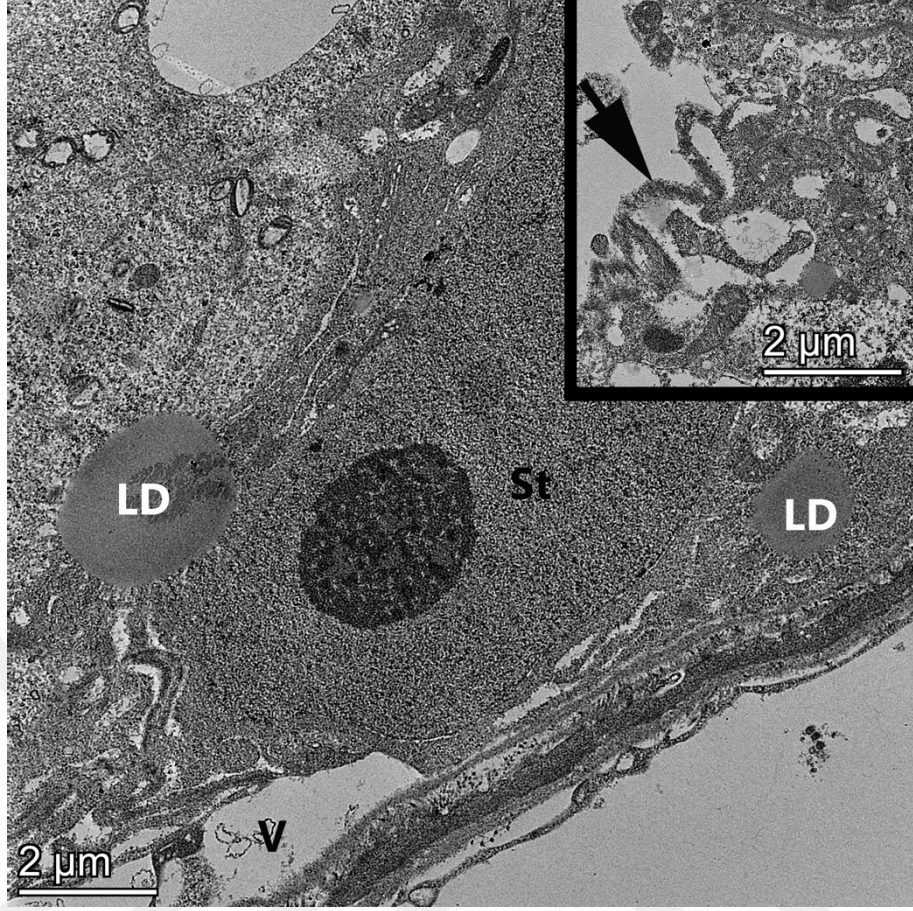
Geçirimli elektron mikroskopu düzeyindeki incelemelerde Kontrol grubunda normal ince yapıyı yansıtır şekilde seminifer tübül germinal epiteli, Sertoli hücresi ve Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantılar ve spermatozoonlar gözlemlendi (Resim 43). APO grubunda da Kontrol grubuna benzer şekilde germinal epitel normal ince yapıyı yansıtmaktaydı. (Resim 44). MSG grubunda ise seminifer tübülün germinal epitelinde vakuolizasyon, lipid damlacıkları ve Sertoli hücreleri arasındaki bağlantılarda ayrılmalar dejenerasyonu yansıtan bulgular arasındaydı (Resim 45). MSG+APO grubunda ise seminifer tübül ince yapısında normale yakın gözlenirken yer yer lipid damlacıkları izlendi (Resim46).



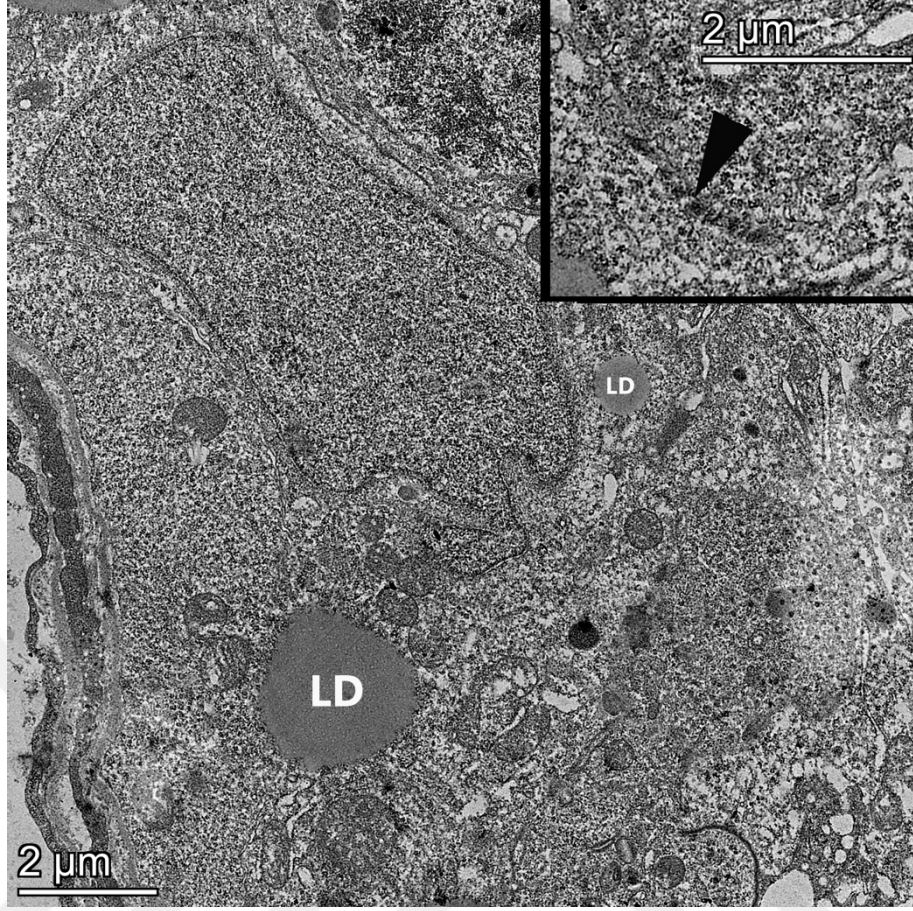
Resim 43. Kontrol grubu elektronmikrografında Sertoli hücresi (St) ince yapısı (x4300). İnet: Lümeninde çok sayıda normal yapıda spermatozoon (s) . İnet: Sertoli hücreleri arasında yer alan sıkı bağlantıların ince yapısı (siyah ok başı) gözlemlendi .



Resim 44. APO grubunda normal ince yapıda Sertoli hücresi (St) . İnet: Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (siyah ok başı). İnet: Normal yapıda spermatozoonlar .



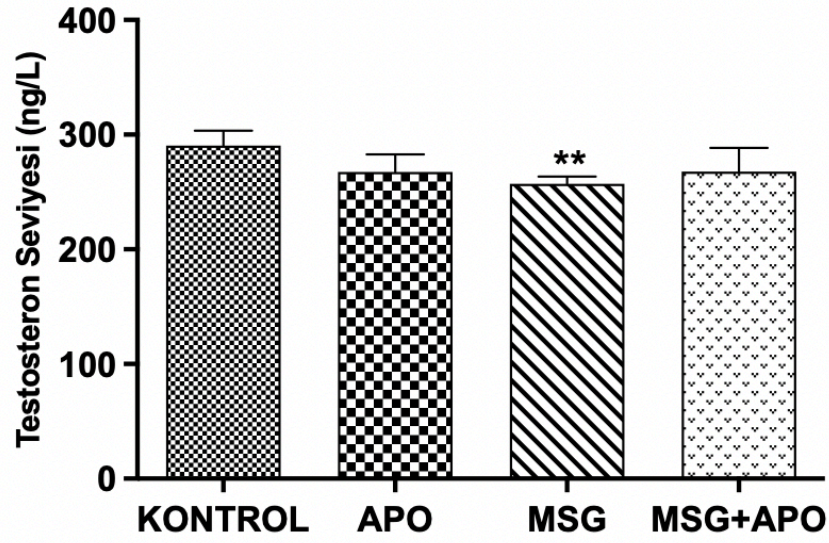
Resim 45. MSG grubunda germinal epitelde vakuolizasyon (V), lipid damlacıkları (LD) ile Sertoli hücresi (St) gözlendi. İnet: Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda ayrılmalar.



Resim 46. MSG+APO grubunda normale yakın ince yapıda seminifer tübül germinal epitel organizasyonu ve yer yer lipid damlacıkları (LD) gözlemlendi. İnset: Sertoli hücreleri arasında düzenli yapıda sıkı bağlantılar (siyah ok başı).

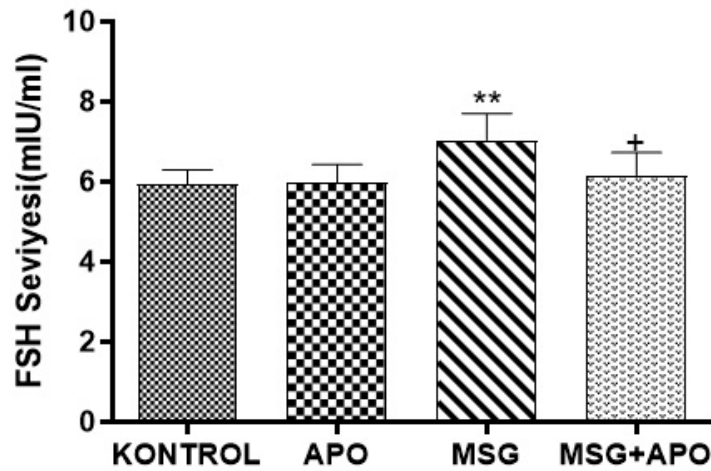
4.19 Serum Testosteron, FSH ve LH Seviyeleri

Serumda testosteron seviyesi; Kontrol grubunda $290,4 \pm 12,97$ ng/L, APO grubunda $267,5 \pm 15,22$ ng/L, MSG grubunda $257,2 \pm 6,4$ ng/L ve MSG+APO grubunda $267,9 \pm 20,57$ ng/L idi. MSG grubu testosteron seviyesinde Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede (** $p < 0,01$) azalma olduğu gözlemlendi. MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında testosteron seviyesinde artış izlenmekle beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 21).



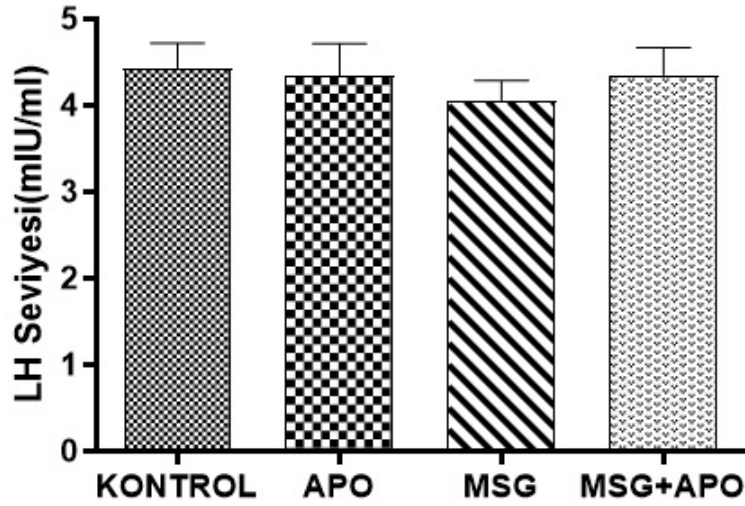
Şekil 21. Serum testosteron seviyesi grafiği. **p<0,01, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Serumda FSH seviyesi; Kontrol grubunda $5,94 \pm 0,3$ mIU/ml, APO grubunda $5,99 \pm 0,4$ mIU/ml, MSG $7,04 \pm 0,6$ mIU/ml grubunda , MSG+APO grubunda ise $6,16 \pm 0,5$ mIU/ml idi. MSG grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında FSH değerinde anlamlı derecede artış (**p<0,01) görülürken, APO grubu ile karşılaştırıldığında da FSH seviyesinde anlamlı derecede artış olduğu görüldü (^ap<0,05). MSG+APO grubu MSG ile karşılaştırıldığında anlamlı düşüş (⁺p<0,05) görüldü (Şekil 22).



Şekil 22. Serum FSH seviyesi grafiği. **p<0,01, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^ap<0,05 APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺p<0,05 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

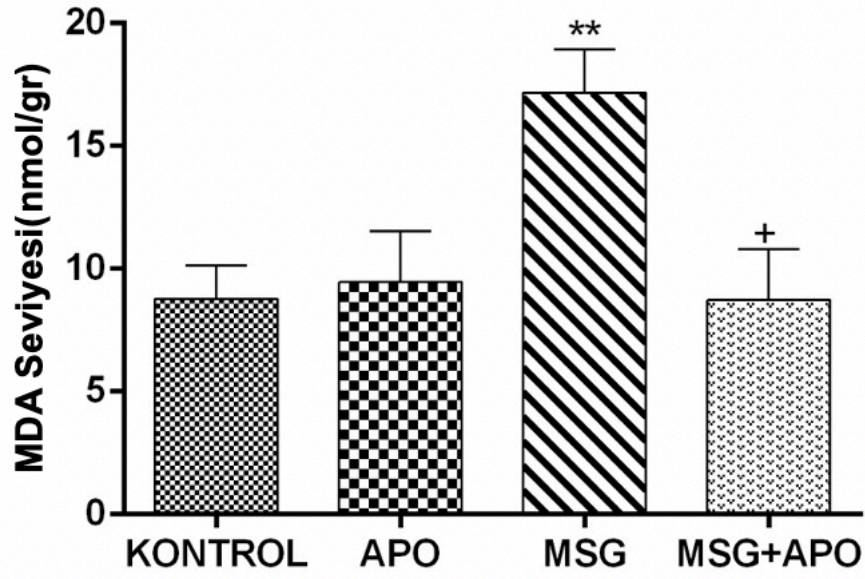
Serumda LH seviyesi; Kontrol grubunda $4,37 \pm 0,2$ mIU/ml, APO grubunda $4,34 \pm 0,36$ mIU/ml, MSG grubunda $4,05 \pm 0,23$ mIU/ml , MSG+APO grubunda ise $4,3 \pm 0,3$ mIU/ml idi. MSG grubu LH seviyesinde düşüş olduğu ve MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında LH seviyesinde artış gözlenmesine rağmen, LH seviyesinde deney grupları arasında istatistiksel anlamda fark görülmedi (Şekil 23).



Şekil 23. Serum LH seviyesi grafiği.

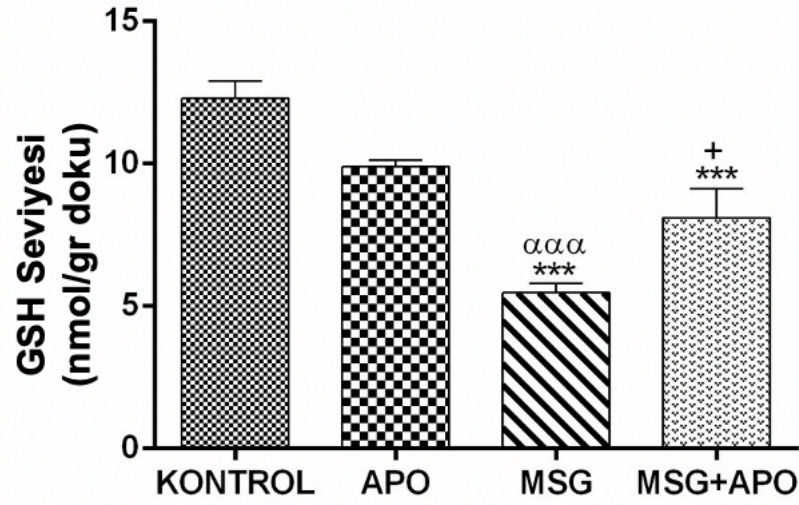
4.20 Doku MDA, GSH, SOD Seviyeleri

Doku MDA seviyesi Kontrol grubunda $8,7 \pm 1,3$ nmol/gr doku, APO grubunda $9,4 \pm 2,05$ nmol/gr doku, MSG grubunda $17,7 \pm 1,7$ nmol/gr doku, MSG+APO grubunda ise $8,7 \pm 2,08$ nmol/gr doku olarak belirlendi. MSG grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyesinde anlamlı derecede ($***p < 0,01$) artış gözlemlendi. MSG+ APO grubu ,MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise bu değerde anlamlı derecede ($^+p < 0,05$) azalma gözlemlendi (Şekil 24).



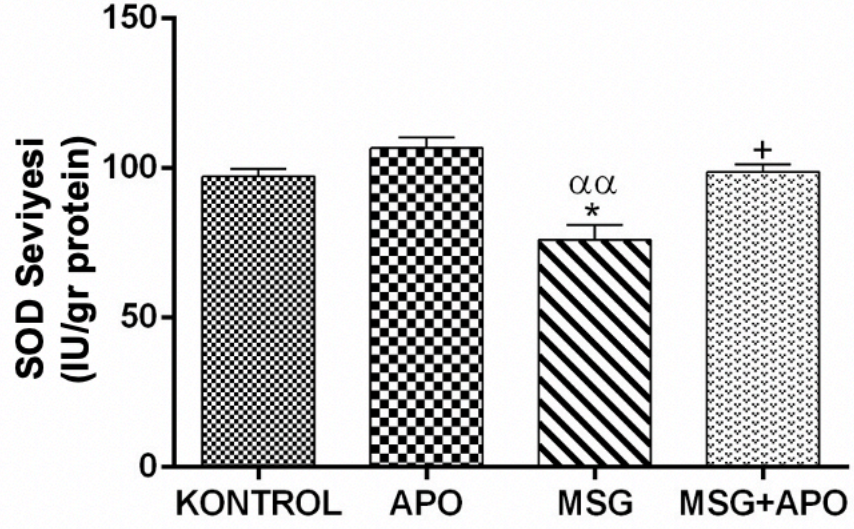
Şekil 24. Doku MDA seviyesi grafiği. **p<0,01, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. +p<0,05 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

Doku GSH seviyesi Kontrol grubunda $12,3 \pm 0,6$ nmol/gr, APO grubunda $9,8 \pm 0,5$ nmol/gr, MSG grubunda $5,4 \pm 0,3$ nmol/gr, MSG+APO grubunda ise $8,1 \pm 1,01$ nmol/gr olarak belirlendi. MSG grubu Kontrol grubu ve APO grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede (sırası ile ***p<0,001, ^{aaa}p<0,001) düşüş gözlemlendi. MSG+ APO grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede (**p<0,001) düşüş, MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı derecede (+p<0,05) artış gözlemlendi (Şekil 25).



Şekil 25. Doku GSH seviyesi grafiği. *** $p < 0,001$, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $^{aaa}p < 0,001$ APO grubu ile karşılaştırıldığında. $^{+}p < 0,05$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

Doku SOD seviyesi Kontrol grubunda ($97,25 \pm 2,61$ IU/gr protein), APO grubunda ($106,7 \pm 3,66$ IU/gr protein), MSG grubunda ($76,03 \pm 5,02$ IU/gr protein), MSG+APO grubunda ise ($98,73 \pm 2,56$ IU/gr protein) olarak belirlenmiştir. MSG grubu Kontrol grubu ve APO grupları ile karşılaştırıldığında SOD seviyesinde anlamlı derecede (sırası ile $^{*}p < 0,01$, $^{aa}p < 0,05$) düşüş gözlemlendi. MSG+ APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise SOD seviyesinde anlamlı derecede ($^{+}p < 0,05$) artış izlendi (Şekil 26).



Şekil 26. Doku SOD seviyesi grafiği. *p<0,05, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ^{aa}p<0,05, APO grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺p<0,05 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

5 TARTIŞMA

Bu çalışmada, MSG ile oluşturulan testis hasarında artmış histopatolojik skor eşliğinde seminifer tübül epitel kalınlığında azalma, sayıca azalmış spermatozoonlarda harabiyet olduğu görüldü. MSG uygulamasına bağlı olarak, germinal epitelde spermatogenik hücrelerde dejenerasyon ve seminifer tübüllerin lümeninde çok sayıda hücre döküntüleri olduğu gözlemlendi. Spermatogenik hücre proliferasyonu MSG grubunda daha az gözlenirken apoptotik hücrelerin ise daha fazla olduğu görüldü. MSG grubunda kan-testis bariyeri sıkı bağlantı proteinlerinden ZO-1 ve okludinin dağılımında azalma görüldü. MSG'nin ayrıca, oksidatif stres belirteçlerinde değişikliğe neden olduğu görüldü. Bu grupta, ROT sentezinde görev alan NOX-2 proteinin dağılımında artış olduğu görüldü. Geçirimli elektron mikroskopik incelemelerde ince yapı düzeyinde hasarlı seminifer tübül organizasyonu ve sıkı bağlantı yapılarında ayrılmalar görüldü. Hormon değerlerinden testosteron ve LH seviyesinin azaldığı, FSH seviyesinin arttığı, oksidatif stres parametrelerinden MDA seviyesinin arttığı, GSH ve SOD seviyesinin ise azaldığı görüldü. Biyokimyasal analizler, mikroskopik ve immünohistokimyasal incelemeler sonucunda APO uygulamasının, MSG uygulaması sonucu oluşan hasar üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu gözlemlendi.

MSG, glutamik asidin sodyum tuzlu halidir. Lezzet arttırmak amacı ile kullanılan MSG, yaklaşık yüz yıldır kullanılmaktadır. MSG paketli işlenmiş gıdalara eklenmektedir ve evde pişirilen yemeklerde de kullanılmaktadır. Günümüzde dünya çapında en yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddesidir. Ancak bazı işlenmiş gıda paketlerinin "İçindekiler" etiketinde içeriğinde MSG bulundurduğu bilgisine yer verilmemektedir (55). Gıda güvenliğini sorgulayan kurumlarca, MSG tüketiminin güvenli olduğu düşünülmektedir. Fakat organ sistemleri üzerinde herhangi bir hasar oluşturup oluşturmadığı dünya çapında halen araştırılmaktadır (1). Yapılan bazı klinik öncesi çalışmalarda MSG tüketiminin birçok organ sistemleri üzerinde toksik etkileri olabileceği gösterilmiştir. Bu toksik etkiler, karaciğer, böbrek ve üreme sistemi üzerinde gözlenmiştir (3). Yapılan bir başka çalışmada ise MSG'nin pankreatik hücre sayısında düşüşe ve pankreasta kanamaya yol açtığı gözlenmiştir (56). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada, MSG'nin ovaryumda ve oositler üzerinde zararlı etki göstererek

infertiliteye yol açabileceği belirtilmektedir (57). MSG'nin böbrekler üzerindeki etkisi de başka bir çalışmada araştırılmış olup, hasar oluşturduğu gösterilmiştir (58). Bir başka çalışmada MSG'nin testisler üzerinde toksik etkisi olduğu ve cinsiyet hormonlarında dengesizlik oluşturduğu gösterilmiştir (59). Yapılan benzer bir çalışmada, MSG verilen sıçanların testis dokularında oksidatif stres (OS) belirteçlerinde artış ve testis morfolojisinde bozulma olmasının yanında sperm morfolojisinin ve kalitesinin de negatif yönde etkilendiği gösterilmiştir (60). Literatürde bulunan çalışmalarda MSG'nin testis morfolojisinde dejenerasyona neden olduğu, ayrıca cinsiyet hormonlarından testosteron üzerinde negatif etkisi olduğu gözlenmiştir (48, 61). Deneysel olarak oluşturulan testis hasar modellerinde, hasar grubunda seminifer tübül germinal epitelinin kalınlığında azalma olduğu gösterilmiştir (62, 63). Başka bir çalışmada da MSG ile oluşturulan testis hasar modelinde seminifer tübül epiteli kalınlığının azaldığı gösterilmiştir (64). Çalışmamızda da MSG grubunda diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında seminifer tübül germinal epitelinin kalınlığında azalma olduğu, MSG+APO grubunda ise MSG grubu ile karşılaştırıldığında epitel kalınlığında normal düzeye yakın bir artış olduğu gözlendi.

MSG'nin iştah açıcı özelliği olduğu ve bu sebeple yeme miktarında artış ile obeziteye yol açabileceği belirtilmektedir (65). Literatürde epidemik obezitenin hızla artışında MSG tüketiminin bir risk faktörü olup olamayacağı ile ilgili soru işaretleri oluşmuştur. Çinli yetişkinler arasında yapılan bir açık- kohort çalışmasında, MSG kullananların vücut kitle indeksinin MSG kullanmayanlar ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu gösterilmiştir (55). Yapılan diğer deneysel çalışmalarda da MSG verilen sıçanların kilosunun arttığı ve obeziteye yatkınlık oluşturduğu gözlenmiştir (66, 67). Ancak çalışmamızda deney süresince her hafta ağırlıkları tartılan sıçanlarda, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

MSG ile oluşturulan deneysel testis hasar modelleri incelendiğinde, bir çalışmanın MSG grubunda testis ağırlıklarında Kontrol grubuna göre bir düşüş olduğunu gözlemişlerdir (48, 64). Ancak çalışmamızda testis ağırlığı /vücut ağırlığı oranları incelendiğinde, MSG grubunda diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranının azaldığı görülmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

MSG'nin sperm konsantrasyonuna olan etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, MSG'nin sperm canlılık oranında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (48, 61, 64). Deneysel olarak oluşturulan testis hasar modelinde, aposininin, sperm parametreleri üzerindeki iyileştirici etkisinin araştırıldığı çalışmada ise hasar grubuna göre aposinin uygulanan iyileştirme grubunda sperm konsantrasyonunda artış olduğu gözlenmiştir (68). Bizim çalışmamızda da sperm sayıları deney grupları arasında karşılaştırıldığında MSG grubunda sperm sayısının en düşük olduğu gözlenirken, MSG+APO grubunda ise MSG grubu ile karşılaştırıldığında sperm sayısında istatistiksel olarak artış olduğu görüldü.

Aposinin, NOX enziminin inhibitörü olan bir antioksidandır. NOX, ROT üretiminden sorumlu olup gereğinden fazla üretilmesi OS'ye yol açmaktadır (23). Yapılan deneysel hayvan çalışmalarında aposinin kullanımının güvenli olduğu belirtilmekte ve bir çok in vivo ve in vitro deney modellerinde güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi olduğu vurgulanmaktadır (49). Yapılan bir çalışmada, aposininin deneysel hipertansiyon modelinde oluşan vasküler hasarı ve yapısal değişiklikleri iyileştirdiği gösterilmiştir (11). Deneysel testis hasarı bazındaki çalışmalarda da aposininin OS'yi azalttığı gözlenmiştir (25, 69). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları ile oluşturulan deneysel testis hasar modeli çalışmalarında da aposininin iyileştirici etkisi vurgulanmıştır. Bu çalışmalarda aposininin antioksidan özelliği eşliğinde apoptotik hücre sayısında azalmaya yol açıp, testosteron hormonu seviyesinde ise artışa neden olduğu gözlenmiştir (68, 70). Oksidatif stresin sperm fonksiyon bozukluğuna yol açtığı ve böylelikle erkek infertilitesi etiyojisinin etkenlerinden birisi olduğu bilinmektedir. OS sonrası oluşan spermatozoon hasarı infertil erkeklerin %30-80'ini etkilemektedir (71). NOX ailesindeki enzimler hücreSEL ROT sentezinden sorumludurlar ve aposinin bir NOX inhibitörüdür (72). Yapılan deneysel testis hasarı çalışmasında, aposinini iyileştirici ajan olarak kullanmışlardır. Çalışmada NOX-2 immünfloresan boyaması sonrası testis hasarı grubunda en yüksek immünreaktivite gözlenirken, aposinin uygulanan grupta NOX-2 immünpozitif hücre sayısında düşüş olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada en düşük immünpozitif reaksiyonun ise Kontrol grubu ve aposinin grubunda olduğu vurgulanmıştır (68). Testis dokusu deneysel hasar modellerinde, NOX-2 proteininin miktar ve dağılımının araştırıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır. NOX-2'nin OS belirteci

olarak kullanıldığı çalışmamızda NOX-2 immunfloresan boyaması sonuçlarına göre immünreaktivite MSG grubunda en yüksek seviyede iken, MSG+APO grubunda MSG grubuna göre immünreaktivite seviyesinde azalma olduğu gözlemlendi. En düşük immünreaktivite gösteren gruplar olan APO grubu ve Kontrol grubu arasında ise anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Apoptoz, doku homeostazisi için gerekli olan programlı hücre ölümüdür (73). Fizyolojik olarak ROT'lar apoptoz süreci için gereklidir. Embriyonik erken gelişim sürecinde, apoptoz spermatogonyal kök hücre havuzunun oluşumunda rol oynayan önemli bir biyolojik süreçtir. Bu süreç erkek fertilitatesinin temelini oluşturmaktadır (74). Apoptozun regülasyonu, germ hücrelerinin gelişimi, diferansiyasyonu ve fonksiyonunda kritik bir faktördür (71). Oksidatif strese yol açan faktörlere maruz kalmak, spermatozoonda kromatinin yapısını negatif yönde etkileyerek spermatogenezi olumsuz yönde etkiler (75). İnfertil erkekler, fertil erkekler ile karşılaştırıldığında seminal sıvılarında daha yüksek oksidatif strese ve apoptotik hücreye sahip oldukları belirlenmiştir. ROT'ların artışı kromatinin paketlenmesinde olumsuz etki oluşturarak sıkı paketlenmemiş kromatine sahip spermatozoonlar üretilmesine yol açar ve spermatozoonların apoptotik sürece girmesine sebep olur (76). Bu durum erkek infertilitesinde önemli bir rol oynar (71). Testisin deneysel hasar modeli çalışmalarında apoptotik hücre sayısının hasarlı testis dokusunda arttığı, aposininin ise bu sayıyı düşürdüğü ve iyileştirici etkisinin olduğu gözlenmiştir (68, 70). Yapılan bir deneysel testis hasarı çalışmasında, NOX ile indüklenen oksidatif stresin oluşturduğu DNA hasarı üzerinde aposininin iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (77). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde MSG grubunda apoptotik indeks artarken proliferatif indeksin düştüğü gözlemlendi. MSG+ APO grubunda ise artmış olan apoptotik indeksin azaldığı, proliferatif indeksin ise arttığı izlendi.

Kan-testis bariyeri gelişmekte olan germ hücrelerini dış çevreye karşı korur ve germ hücrelerinin bölünmeler geçirip gelişmesine destek sağlayacak ortamı sağlar. Bu nedenle fertilitate açısından çok büyük öneme sahiptir (78-80). Seminifer tübüllerde bulunan özelleşmiş epitel hücreleri olan Sertoli hücreleri sıkı bağlantılar ile kan-testis bariyerinin temelini oluşturmaktadırlar. Kan-testis bariyeri sıkı bağlantılara ek olarak bazal ektoplazmik özelleşmeler, ara bağlantılar ve dezmozomlardan oluşur (81).

Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarında oluşan bir hasar spermatogenik hücre göçünü bloke ederek erkek infertilitesine yol açabilir (82). Okludin, ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 kan-testis bariyerinin sıkı bağlantılarında bulunan moleküller olup ZO proteinleri okludin proteinlerini hücre iskeletinde aktine bağlar (83). Yapılan bir çalışmada, okludin-knockout fare modelinde spermatogenezin negatif yönde etkilendiği ve atrofik seminifer tübüllerin oluştuğu gözlenmiştir (84, 85). Ayrıca ZO-1 ve ZO-2- knockout farelerin erken embriyonik dönemde öldükleri saptanmıştır (86). Literatür verilerine paralel bulgular olarak, çalışmamızda ZO-1 ve okludin immünreaktivitesinin Kontrol grubu ve APO gruplarında en yüksek düzeyde olduğu, MSG grubunun ise anlamlı derecede düşük immünreaktivite gösterdiği gözlemlendi. MSG+APO grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta ZO-1 ve okludin immünreaktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Yapılan deneysel testis hasar modeli çalışmalarında geçirimli elektron mikroskopik düzeydeki incelemelerde, testis germinal epitel hücrelerinde dejenerasyon, lipid damlacıkları (60, 87) ve kan-testis bariyerini oluşturan sıkı bağlantı yapılarında ayrılmalar gözlenmiştir (88). Çalışmamızda da geçirimli elektron mikroskopik düzeydeki incelemelerde Kontrol grubu ve APO grubunda normal testis seminifer tübül ince yapısı gözlenirken, MSG grubunda testis germinal epitelinde vakuolizasyon, lipid damlacıkları ve kan-testis bariyerini oluşturan sıkı bağlantılarda ayrılmalar belirgindi. MSG+APO grubunda ise belirtilen hasar parametreleri düzeyinde aposininin iyileştirici etkisinin olduğu görüldü.

Hipotalamik-pituiter-gonadal (HPG) aksisi erkek üreme sisteminin gelişimi ve olgunlaşması ile ilgili süreçlerde anahtar rol oynar. Hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), LH ve FSH gibi cinsiyet hormonları olarak adlandırılan gonadotropinlerin salgılanmasını sağlar (89). FSH, intragonadal testosteron üretimini ve spermatogenez sürecinin sürdürülmesinde etkindir. LH, erkek genital sisteminin gelişimini ve cinsiyet belirlenmesi sürecini Leydig hücrelerini stimüle ederek sağlamaktadır. Bu uyarılma ile Leydig hücreleri gerekli düzeyde testosteron salgılar. Uygun testosteron seviyesi negatif feed-back mekanizması yoluyla GnRH aktivitesi ile kontrol edilir (90). Bu mekanizma ile HPG aksisi kontrollü bir şekilde çalışır (89, 91). HPG aksisinin dengesinde bozulma, üreme fonksiyonunu

olumsuz etkiler ve hipogonadizm gibi klinik sendromları beraberinde getirebilir (92). Yapılan bazı popülasyon bazlı çalışmalarda cinsiyet hormonlarının sperm morfolojisi, konsantrasyonu ve motilitesini etkilediği gösterilmiştir. Yapılan subfertil çiftleri içeren bir çalışmada, LH seviyesi ile sperm motilitesi ve morfolojisi arasında ters ilişki olduğu gözlenmiştir (93). İnsan örnekleri üzerine yapılan bir çalışmada FSH seviyesinin sperm konsantrasyonu ile negatif korelasyon gösterdiği, ancak testosteron hormonu ile bir ilişkisi olmadığı tespit edilmiştir (94). Bir başka çalışmada ise MSG verilen sıçanların sperm motilitesi ve konsantrasyonunda azalma olduğu gözlenirken, LH hormon seviyelerinde düşüş olduğu gözlenmiştir (48).Yapılan çalışmalarda MSG'nin testosteron hormon düzeyi ve sperm konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu vurgulanmıştır (59, 60). Çalışmamızda, APO grubunda FSH, LH ve testosteron seviyeleri Kontrol grubu ile benzer seviyede iken MSG grubuna ait sıçanlarda testosteron hormonunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi. MSG grubunda ayrıca FSH hormon seviyesindeki anlamlı artış dikkati çekti. MSG+APO grubunda ise FSH değerinin MSG grubuna kıyasla daha düşük seviyede olduğu tespit edildi. MSG grubunda LH hormonunda düşüş gözlenmekle birlikte deney grupları arasında LH hormonu açısından istatistiksel anlamda bir fark görülmedi. Çalışmamızın sonucunda, MSG uygulamasının, FSH, LH ve testosteron seviyelerini etkileyerek HPG aksisinin çalışma mekanizmasını bozup testis morfolojisini, sperm konsantrasyonunu, motilitesini ve morfolojisini negatif yönde etkilediği, aposinin uygulamasının ise MSG etkisi ile bozulmuş testosteron, FSH ve LH seviyelerini normale yakın seviyeye çektiği ve hormonal seviyelerdeki bu düzelmenin morfolojik parametreleri de etkilediği gözlemlendi.

SOD, hücreleri internal ve eksternal süperoksit iyonlarının hasarına karşı koruyan önemli bir enzimdir (95). MDA, lipid peroksidasyonu esnasında serbest radikaller tarafından oluşturulan bir aldehit olup, hücre membran hasarını ve oksijen radikallerinin reaktif hücreler üzerine etkisinin şiddetini gösteren bir indikatördür. SOD' un azalması ve MDA'nın artması, oksidatif stresin tetiklenmesine ve dolayısıyla hücre hasarına ve ölümüne sebep olabilir (21). GSH, hücrede hidrojen peroksit gibi ROT'ların redüksiyonunda rol oynar (96). NOX, ROT kaynağıdır ve aposinin bir NOX inhibitörüdür (72). MSG ile oluşturulan deneysel testis hasarı çalışmalarında, testis dokusundaki MDA seviyesi MSG etkisi ile artarken SOD seviyesinde düşüş

gözlendi (48, 59, 60, 97). Bir diğerk çalışmada MSG kullanımının testis dokusunda GSH seviyesinde de azalmaya yol açtığı belirlenmiştir (48). Aposininin iyileştirici ajan olarak kullanıldığı bir çalışmada ise testis hasar grubunda aposininin doku hasarına bağılı olarak artmış olan MDA seviyesini düşürdüğü, azalmış GSH ve SOD seviyelerini ise yükselttiği gösterilmiştir (68). Çalışmamızda testis dokusunun biyokimyasal parametreler eşliğinde incelenmesi sonucu literatürdeki benzer çalışmalardaki sonuçları destekler nitelikte bulgular elde edildi. MSG grubunda dokuda GSH ve SOD seviyeleri düşerken, MDA seviyesinin ise yükseldiği gözlemlendi. MSG+APO grubunda ise testis dokusunda SOD ve GSH seviyeleri artarken MDA düzeyinde azalma gözlemlendi.



6 SONUÇ

MSG ile oluşturulan deneysel testis hasarı bazlı çalışmamızda MSG'nin etkisi ile seminifer tübül dejenerasyonunu yansıtan histopatolojik skorda artış olduğu; seminifer tübül proliferatif indekste azalmanın yanı sıra apoptotik indekste artış olduğu izlendi. Ayrıca bu grupta spermatozoon sayısında azalmanın yanı sıra spermatozoon morfolojisinde harabiyet bulguları belirgindi. MSG etkisi ile kan-testis bariyeri sıkı bağlantı proteinlerinden ZO-1 ve okludinin dağılımında azalma ve oksidatif stres belirteçlerinde artış görüldü. Bu grupta ayrıca ROT sentezi ile ilişkili NOX-2 proteinin dağılımında artış olduğu izlendi. Geçirimli elektron mikroskopik düzeydeki incelemelerde de seminifer tübül ve sıkı bağlantı yapılarında ince yapı düzeyinde harabiyet ve ayrılmalar görüldü. MSG etkisi ile testis dokusunda testosteron seviyesinin azaldığı, FSH seviyesinin arttığı, ayrıca oksidatif stres parametrelerinden MDA seviyesinin arttığı, GSH ve SOD seviyesinin ise azaldığı görüldü. Çalışmamızı oluşturan diğer deney grubunda MSG uygulaması sonrası ve beraberliğinde uygulanan APO uygulamasının MSG etkisi ile bozulmuş mikroskopik ve biyokimyasal parametrelerde normale yakın seviyeleri sağladığı belirlendi. APO uygulamasının ROT'ların oluşumunun ve HPG aksisinin düzenlenmesinde rol oynayarak; proliferatif ve apoptotik indeks arasındaki dengeyi sağlayarak; kan-testis bariyer bütünlüğünü koruyarak oksidatif strese yol açan MSG ile oluşan testis hasarının iyileşmesine katkıda bulunduğu sonucuna varıldı. APO'nun ayrıca MSG etkisi ile azalmış olan spermatozoon sayısında ve motilitesinde belirgin artışa neden olduğu belirlendi.

Çalışmamızda MSG ile oluşturulan deneysel testis hasarı modelinde, MSG'nin dejeneratif etkisi gösterilmiş olup APO'nun iyileştirici etkileri histokimyasal immunhistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal, yöntemler eşliğinde ilk kez gösterilmiştir. Aposinin uygulamasının erkek infertilitesini önlemeye yönelik gelecekteki çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

7 KAYNAKLAR

- 1.Zanfirescu A, Ungurianu A, Tsatsakis AM, Nitulescu GM, Kouretas D, Veskoukis A, et al. A review of the alleged health hazards of monosodium glutamate. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2019;18(4):1111-34.
- 2.Beyreuther K, Biesalski HK, Fernstrom JD, Grimm P, Hammes WP, Heinemann U, et al. Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. *Eur J Clin Nutr.* 2007;61(3):304-13.
- 3.Kayode OT, Rotimi DE, Kayode AAA, Olaolu TD, Adeyemi OS. Monosodium Glutamate (MSG)-Induced Male Reproductive Dysfunction: A Mini Review. *Toxics.* 2020;8(1).
- 4.Büyüksulu N, Yiğitbaşı T. Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. 2015.
- 5.Sezer K, Keskin M. Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *FÜ Sağ Bil Vet Dergisi.* 2014;28(1):49-56.
- 6.Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-26.
- 7.Hamada A, Sharma R, du Plessis SS, Willard B, Yadav SP, Sabanegh E, et al. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis-based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress. *Fertil Steril.* 2013;99(5):1216-26 e2.
- 8.Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clin Pathol.* 2007;7:6.
- 9.Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2014;29(1):32-58.
- 10.Velando A, Torres R, Alonso-Alvarez C. Avoiding bad genes: oxidatively damaged DNA in germ line and mate choice. *Bioessays.* 2008;30(11-12):1212-9.
- 11.Virdis A, Gesi M, Taddei S. Impact of apocynin on vascular disease in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2016;87:1-5.
- 12.Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, Brambilla M, Caiani A, Tremoli E, et al. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(2):156-65.
- 13.Peters EA, Hiltermann JT, Stolk J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1442-7.
- 14.Smit HF, Kroes BH, van den Berg AJ, van der Wal D, van den Worm E, Beukelman CJ, et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of *Picrorhiza scrophulariiflora*. *J Ethnopharmacol.* 2000;73(1-2):101-9.
- 15.Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11(1):95-102.
- 16.Johnson DK, Schillinger KJ, Kwait DM, Hughes CV, McNamara EJ, Ishmael F, et al. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium.* 2002;9(3):191-203.

17. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313.
18. Erkanli Senturk G, Ersoy Canillioglu Y, Umay C, Demiralp-Eksioglu E, Ercan F. Distribution of Zonula Occludens-1 and Occludin and alterations of testicular morphology after in utero radiation and postnatal hyperthermia in rats. *Int J Exp Pathol.* 2012;93(6):438-49.
19. Contuk G, Orun O, Demiralp-Eksioglu E, Ercan F. Morphological alterations and distribution of occludin in rat testes after bilateral vasectomy. *Acta Histochem.* 2012;114(3):244-51.
20. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003;91 Spec No:179-94.
21. Jia YF, Feng Q, Ge ZY, Guo Y, Zhou F, Zhang KS, et al. Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. *BMC Urol.* 2018;18(1):42.
22. Connell BJ, Saleh MC, Khan BV, Saleh TM. Apocynin may limit total cell death following cerebral ischemia and reperfusion by enhancing apoptosis. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(12):3063-9.
23. Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:106507.
24. Zhang GL, Dai DZ, Zhang C, Dai Y. Apocynin and raisanberine alleviate intermittent hypoxia induced abnormal StAR and 3beta-HSD and low testosterone by suppressing endoplasmic reticulum stress and activated p66Shc in rat testes. *Reprod Toxicol.* 2013;36:60-70.
25. Ozbek O, Altintas R, Polat A, Vardi N, Parlakpinar H, Sagir M, et al. The protective effect of apocynin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol.* 2015;193(4):1417-22.
26. Ross MH, Pawlina W, Lippincott W, Wilkins. *Histology : a text and atlas.* Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2015.
27. Mescher A. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Fourteenth Edition.* 2015.
28. Jégou B, Rolland AD. Sertoli Cell. In: Skinner MK, editor. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition).* Oxford: Academic Press; 2018. p. 24-7.
29. Mao B, Yan M, Li L, Yan Cheng C. Blood-Testis Barrier. In: Skinner MK, editor. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition).* Oxford: Academic Press; 2018. p. 152-60.
30. Sullivan R, Legare C, Lamontagne-Proulx J, Breton S, Soulet D. Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology.* 2019;7(5):748-57.
31. Gurung P, Yetiskul E, Jialal I. *Physiology, Male Reproductive System.* StatPearls. Treasure Island (FL)2021.
32. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763.
33. Goutzourelas N, Orfanou M, Charizanis I, Leon G, Spandidos DA, Kouretas D. GSH levels affect weight loss in individuals with metabolic syndrome and obesity following dietary therapy. *Exp Ther Med.* 2018;16(2):635-42.
34. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
35. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, et al. Male infertility. *Lancet.* 2021;397(10271):319-33.

36. Sun H, Gong TT, Jiang YT, Zhang S, Zhao YH, Wu QJ. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(23):10952-91.
37. Agarwal A, Parekh N, Panner Selvam MK, Henkel R, Shah R, Homa ST, et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health*. 2019;37(3):296-312.
38. Takeshima T, Usui K, Mori K, Asai T, Yasuda K, Kuroda S, et al. Oxidative stress and male infertility. *Reprod Med Biol*. 2021;20(1):41-52.
39. Agarwal A, Mulgund A, Sharma R, Sabanegh E. Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. *Syst Biol Reprod Med*. 2014;60(4):206-16.
40. Agarwal A, Sharma RK, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM, Alshahrani S, et al. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:33.
41. Yumura Y, Iwasaki A, Saito K, Ogawa T, Hirokawa M. Effect of reactive oxygen species in semen on the pregnancy of infertile couples. *Int J Urol*. 2009;16(2):202-7.
42. Agarwal A, Rana M, Qiu E, AlBunni H, Bui AD, Henkel R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia*. 2018;50(11):e13126.
43. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
44. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA. Robbins basic pathology. Philadelphia: Elsevier; 2018.
45. Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2015;31(3):309-19.
46. Airaodion AI, Ogbuagu EO, Osemwowa EU, Ogbuagu U, Esonu CE, Agunbiade AP, et al. Toxicological Effect of Monosodium Glutamate in Seasonings on Human Health. *Glob J Nutri Food Sci* 2019;1(5).
47. Kurihara K. Umami the Fifth Basic Taste: History of Studies on Receptor Mechanisms and Role as a Food Flavor. *Biomed Res Int*. 2015;2015:189402.
48. Jubaidi FF, Mathialagan RD, Noor MM, Taib IS, Budin SB. Monosodium glutamate daily oral supplementation: study of its effects on male reproductive system on rat model. *Syst Biol Reprod Med*. 2019;65(3):194-204.
49. Simonyi A, Serfozo P, Lehmidi TM, Cui J, Gu Z, Lubahn DB, et al. The neuroprotective effects of apocynin. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:2183-93.
50. Hougee S, Hartog A, Sanders A, Graus YM, Hoijer MA, Garssen J, et al. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*. 2006;531(1-3):264-9.
51. Simons JM, Hart BA, Ip Vai Ching TR, Van Dijk H, Labadie RP. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(3):251-8.

52. Gozen A, Demiryurek S, Taskin A, Ciralik H, Bilinc H, Kara S, et al. Protective activity of ischemic preconditioning on rat testicular ischemia: effects of Y-27632 and 5-hydroxydecanoic acid. *J Pediatr Surg.* 2013;48(7):1565-72.
53. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970;1(1):2-25.
54. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-8.
55. He K, Du S, Xun P, Sharma S, Wang H, Zhai F, et al. Consumption of monosodium glutamate in relation to incidence of overweight in Chinese adults: China Health and Nutrition Survey (CHNS). *Am J Clin Nutr.* 2011;93(6):1328-36.
56. Boonnate P, Waraasawapati S, Hipkaeo W, Pethlert S, Sharma A, Selmi C, et al. Monosodium Glutamate Dietary Consumption Decreases Pancreatic beta-Cell Mass in Adult Wistar Rats. *PLoS One.* 2015;10(6):e0131595.
57. Eweka A, Om'iniabohs F. Histological studies of the effects of monosodium glutamate on the ovaries of adult wistar rats. *Ann Med Health Sci Res.* 2011;1(1):37-43.
58. Sharma A. Monosodium glutamate-induced oxidative kidney damage and possible mechanisms: a mini-review. *J Biomed Sci.* 2015;22:93.
59. Hamza RZ, Al-Harbi MS. Monosodium glutamate induced testicular toxicity and the possible ameliorative role of vitamin E or selenium in male rats. *Toxicol Rep.* 2014;1:1037-45.
60. Hamza RZ, Al-Baqami NM. Testicular protective effects of ellagic acid on monosodium glutamate-induced testicular structural alterations in male rats. *Ultrastruct Pathol.* 2019;43(4-5):170-83.
61. Iamsaard S, Sukhorum W, Samrid R, Yimdee J, Kanla P, Chaisiwamongkol K, et al. The sensitivity of male rat reproductive organs to monosodium glutamate. *Acta Med Acad.* 2014;43(1):3-9.
62. Utomo B, Daningtia NR, Yuliani GA, Yuniarti WM. Effects of a standardized 40% ellagic acid pomegranate (*Punica granatum L.*) extract on seminiferous tubule histopathology, diameter, and epithelium thickness in albino Wistar rats after heat exposure. *Vet World.* 2019;12(8):1261-5.
63. Ulfanov O, Cil N, Adiguzel E. Protective effects of vitamin E on aluminium sulphate-induced testicular damage. *Toxicol Ind Health.* 2020;36(4):215-27.
64. Nosseir NS AM, Ebaid HM., A Histological and Morphometric Study of Monosodium Glutamate Toxic Effect on Testicular Structure and Potentiality of Recovery in Adult Albino Rats. *Research Journal of Biology.* 2012;2(2).
65. Chakraborty SP. Patho-physiological and toxicological aspects of monosodium glutamate. *Toxicology mechanisms and methods.* 2019;29(6):389-96.
66. Bahadoran Z, Mirmiran P, Ghasemi A. Monosodium Glutamate (MSG)-Induced Animal Model of Type 2 Diabetes. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:49-65.
67. Hernandez Bautista RJ, Mahmoud AM, Konigsberg M, Lopez Diaz Guerrero NE. Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and anti-obesity medicinal plants. *Biomed Pharmacother.* 2019;111:503-16.

- 68.Koroglu KM, Cevik O, Sener G, Ercan F. Apocynin alleviates cisplatin-induced testicular cytotoxicity by regulating oxidative stress and apoptosis in rats. *Andrologia*. 2019;51(4):e13227.
- 69.Sener TE, Yuksel M, Ozyilmaz-Yay N, Ercan F, Akbal C, Simsek F, et al. Apocynin attenuates testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*. 2015;50(8):1382-7.
- 70.Kavram Sarihan K, Yardimoglu Yilmaz M, Eraldemir FC, Yazir Y, Acar E. Protective effects of apocynin on damaged testes of rats exposed to methotrexate. *Turk J Med Sci*. 2020;50(5):1409-20.
- 71.Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2017;14(8):470-85.
- 72.Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*. 2014;76:208-26.
- 73.Pena-Blanco A, Garcia-Saez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*. 2018;285(3):416-31.
74. Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB. Apoptosis in the germ line. *Reproduction*. 2011;141(2):139-50.
- 75.Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010;365(1546):1501-15.
- 76.Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2011;13(1):36-42.
- 77.Al-Saleh F, Khashab F, Fadel F, Al-Kandari N, Al-Maghrebi M. Inhibition of NADPH oxidase alleviates germ cell apoptosis and ER stress during testicular ischemia reperfusion injury. *Saudi J Biol Sci*. 2020;27(8):2174-84.
- 78.Miller SR, Cherrington NJ. Transepithelial transport across the blood-testis barrier. *Reproduction*. 2018;156(6):R187-R94.
- 79.Stanton PG. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;59:166-73.
- 80.Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev*. 2006;213:66-81.
- 81.Mruk DD, Cheng CY. An in vitro system to study Sertoli cell blood-testis barrier dynamics. *Methods Mol Biol*. 2011;763:237-52.
- 82.Lui WY, Lee WM, Cheng CY. Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *Endocrinology*. 2001;142(5):1865-77.
- 83.Zhu M, Lu J, Shen J, Fei L, Chen D. A 22-amino-acid peptide regulates tight junctions through occludin and cell apoptosis. *PeerJ*. 2020;8:e10147.
- 84.Gerber J, Heinrich J, Brehm R. Blood-testis barrier and Sertoli cell function: lessons from SCCx43KO mice. *Reproduction*. 2016;151(2):R15-27.
- 85.Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 2000;11(12):4131-42.
- 86.Xu J, Anuar F, Ali SM, Ng MY, Phua DC, Hunziker W. Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility. *Mol Biol Cell*. 2009;20(20):4268-77.

87. He X, Sun Z, Manthari RK, Wu P, Wang J. Fluoride altered rat's blood testis barrier by affecting the F-actin via IL-1alpha. *Chemosphere*. 2018;211:826-33.
88. Kolbasi B, Bulbul MV, Karabulut S, Altun CE, Cakici C, Ulfer G, et al. Chronic unpredictable stress disturbs the blood-testis barrier affecting sperm parameters in mice. *Reprod Biomed Online*. 2021;42(5):983-95.
89. Corradi PF, Corradi RB, Greene LW. Physiology of the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in the Male. *Urol Clin North Am*. 2016;43(2):151-62.
90. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*. 2017;20(5):476-94.
91. Salonia A, Rastrelli G, Hackett G, Seminara SB, Huhtaniemi IT, Rey RA, et al. Paediatric and adult-onset male hypogonadism. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):38.
92. Rey RA, Grinspon RP, Gottlieb S, Pasqualini T, Knoblovits P, Aszpis S, et al. Male hypogonadism: an extended classification based on a developmental, endocrine physiology-based approach. *Andrology*. 2013;1(1):3-16.
93. Zhao W, Jing J, Shao Y, Zeng R, Wang C, Yao B, et al. Circulating sex hormone levels in relation to male sperm quality. *BMC Urol*. 2020;20(1):101.
94. Keskin MZ, Budak S, Zeyrek T, Celik O, Mertoglu O, Yoldas M, et al. The relationship between serum hormone levels (follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, total testosterone) and semen parameters. *Arch Ital Urol Androl*. 2015;87(3):194-7.
95. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):344-56.
96. Oestreicher J, Morgan B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport (1). *Biochem Cell Biol*. 2019;97(3):270-89.
97. Hamza RZ, Diab AEA. Testicular protective and antioxidant effects of selenium nanoparticles on Monosodium glutamate-induced testicular structure alterations in male mice. *Toxicol Rep*. 2020;7:254-60.

8 EKLER

EK 1 Etik Kurul Onayı



EK 1 Etik Kurul Onayı (devam)



9 ÖZGEÇMİŞ



