



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MONOSODYUM GLUTAMAT İLE İNDÜKLENEN TESTİS
HASARINDA FERULİK ASİT'İN FERTİLİTE ÜZERİNE OLASI
İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN BİYOKİMYASAL VE MORFOLOJİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

ANIL CAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Merve Açikel Elmas

İSTANBUL-2024



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MONOSODYUM GLUTAMAT İLE İNDÜKLENEN TESTİS
HASARINDA FERULİK ASİT'İN FERTİLİTE ÜZERİNE OLASI
İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN BİYOKİMYASAL VE MORFOLOJİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

ANIL CAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Merve Açikel Elmas

İSTANBUL-2024

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.

30/05/2024

Anıl CAN

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, akademik bilgi birikimimi geliştirme fırsatı bulduğum ve araştırma yapma yeteneklerimi derinleştirdiğim bir süreç yaşadım. Bu sürecin her aşamasında bana destek olan, yol gösteren ve motive eden pek çok kişi ve kuruma teşekkür etmek isterim.

Öncelikle, iyi ki tez danışmanım olmuş dediğim çok kıymetli Doç. Dr. Merve Açıklı Elmas'a, yüksek lisans serüvenim boyunca gösterdiği ilgi, sabır, sağladığı değerli katkılar ve istediğim alanda kariyerimi şekillendirmede tüm gerekli yönlendirmeleri sağladığı için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli tecrübeleriyle ve bilgileriyle bu süreçte her zaman gerekli rehberliği sunan, akademik gelişimim için gerekli her imkânda beni destekleyen saygıdeğer anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Serap Arbak'a teşekkürü borç bilirim.

Bilimsel yaklaşımına ve çalışma disiplinine hayranlık duyduğum Dr. Öğr. Üyesi Deniz Yücel'e teşekkürlerimi sunarım.

Biyokimyasal analizlerdeki desteği için Doç. Dr. Meltem Kolgazi'ye teşekkür ederim.

Laboratuvar tecrübelerini en iyi şekilde aktarıp, her ihtiyaç duyduğumda yanımda olup çözüm üreten ve tanıştığım için kendimi çok şanslı hissettiğim değerli Gökçen Özgün'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü zorluğu birlikte aştığımız, dostluğu ve desteği ile bu süreci daha az stresli ve daha keyifli hale getiren Seda Sezer'e içtenlikle teşekkür ederim.

Bu süreçte yanımda olan, desteklerini ve teşviklerini hiç esirgemeyen canım annem Yıldız Can'a, sevgili arkadaşlarım Begüm Özefe ve Mert Altun'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez projesi, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) A grubu Acil Ar-Ge Projesi kapsamında (Proje No: 24147) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
RESİMLER LİSTESİ.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Testisin Histolojisi	6
2.1.1 Ara (İnterstisyel) bağ dokusu.....	7
2.1.2 Seminifer tübüller	7
2.1.3 Spermatogenik hücreler	8
2.1.4 Leydig hücreleri	10
2.1.5 Sertoli hücreleri.....	10
2.1.6 Kan-testis bariyeri.....	12
2.2 Epididimis	13
2.3 Oksidatif Stres	14
2.4 Erkek İnfertilitesi.....	15
2.5 Monosodyum Glutamat ve Erkek Üreme Sistemine Etkileri	16
2.6 Ferulik Asit	18
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1 Gereç.....	20
3.2 Yöntem	20
3.2.1 Deney grupları.....	20
3.2.2 Işık mikroskopik preparasyon	22
3.2.3 Hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması.....	23
3.2.4 Sperm morfolojisi.....	24
3.2.5 ZO-1 immunfloresan boyaması	24
3.2.6 AMH immunfloresan boyaması.....	25
3.2.7 Geçirimli elektron mikroskopik preparasyon	26
3.2.8 Biyokimyasal analizler	27
3.2.8.1 Doku malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) seviye ölçümleri.....	27

3.2.8.2 Doku süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi.....	27
3.2.8.3 Doku total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) ölçümleri	28
3.2.8.4 Oksidatif stres indeksi (OSİ).....	28
3.2.9 İstatistiksel analiz	29
4 BULGULAR	30
4.1 Vücut Ağırlığı	30
4.2 Testis Ağırlığı.....	30
4.3 Testis/Vücut Ağırlığı Oranı.....	31
4.4 Morfolojik Bulgular	32
4.5 Seminifer Tübüllerin Histopatolojik Değerlendirmesi	43
4.6 Seminifer Tübüllerin Epitel Kalınlıkları	43
4.7 ZO-1 İmmünfloresan Bulguları.....	45
4.8 ZO-1 İmmünreaktivite Analizi	49
4.9 AMH İmmünfloresan Bulguları	50
4.10 AMH İmmünreaktivite Analizi.....	54
4.11 Geçirimli Elektron Mikroskopi ile Elde Edilen Bulgular	55
4.12 Biyokimya Bulguları.....	61
5 TARTIŞMA	65
6 SONUÇ.....	71
7 KAYNAKÇA	72
8 EKLER.....	82
EK 1 Etik Kurul Onayı.....	82
9 ÖZGEÇMİŞ.....	84

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
AMH/MIS	Anti-müllerian hormon
AU	Arbitrary unit
AR	Androjen reseptörü
CAT	Katalaz
DAPI	Diamino-2-fenilidol
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
DTNB	5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FA	Ferulik asit
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GATA-1	GATA bağlayıcı faktör-1
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon s-transferaz
HO•	Hidroksil radikali
HPG	Hipotalamo-hipofizer-gonadal
H&E	Hematoksilen ve eozin
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IL-1 β	Interlökin-1 β
IL-6	Interlökin-6
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JAM-3	Bağlantı adezyon molekülü-3
kDa	Kilodalton
KTB	Kan-testis bariyeri
Ld	Lipid damlacıkları
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	Luteinize edici hormon
MDA	Melondialdehit

MSG	Monosodyum glutamat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NOS	Nitrit oksit sentaz
NOX	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
O₂^{•-}	Süperoksit anyonu
OH[•]	Hidroksil radikali
OSİ	Oksidatif stres indeksi
PBS	Fosfat tamponlu salin
PFA	Paraformaldehit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
St	Sertoli hücresi
TAS	Total antioksidan seviye
TCA	Triklorik asit
TEM	Geçirimli elektron mikroskop
TGF- β	Transforme büyüme faktörü- β
TOS	Total oksidan seviye
XO	Ksantin oksidaz
ZO-1	Zonula okludens-1
ZO-2	Zonula okludens-2
ZO-3	Zonula okludens-3

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Testisin şematik görüntüsü (23).....	7
Şekil 2. Spermatogenez aşamaları ve testisteki konumu (36).....	10
Şekil 3. Sertoli hücreleri ve kan-testis bariyerinin şematik görüntüsü (39).....	12
Şekil 4. Reaktif oksijen türleri (ROT) ve oluşum sebepleri (61).	15
Şekil 5. MSG'nin erkek üreme sistemine etki mekanizması (79).	18
Şekil 6. Deney modelinin şematik gösterimi.	21
Şekil 7. Deney gruplarındaki sıçanların haftalık vücut ağırlıkları.	30
Şekil 8. Deney gruplarındaki sıçanların testis ağırlıkları.	31
Şekil 9. Testis ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı.	31
Şekil 10. Seminifer tübüllerin histopatolojik skor grafiği.....	43
Şekil 11. Seminifer tübüllerin epitel kalınlıklarının karşılaştırılması.	44
Şekil 12. ZO-1 immünreaktivite yoğunluğu grafiği.....	49
Şekil 13. AMH immünreaktivite yoğunluğu analizi.	54
Şekil 14. Doku MDA miktarı grafiği.	61
Şekil 15. Doku GSH miktarı grafiği.	62
Şekil 16. Doku SOD miktarı grafiği.	62
Şekil 17. Doku TAS miktarı grafiği.....	63
Şekil 18. Doku TOS miktarı grafiği.....	64
Şekil 19. OSI grafiği.	64

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Kontrol grubuna ait ışık mikrografı.	33
Resim 2. FA grubuna ait ışık mikrografı.	34
Resim 3. MSG grubuna ait ışık mikrografı.	35
Resim 4. MSG+DMSO grubuna ait ışık mikrografı.	36
Resim 5. MSG+FA grubuna ait ışık mikrografı.	37
Resim 6. Kontrol grubuna ait ışık mikrografı.	38
Resim 7. FA grubuna ait ışık mikrografı.	39
Resim 8. MSG grubuna ait ışık mikrografı.	40
Resim 9. MSG+DMSO grubuna ait ışık mikrografı.	41
Resim 10. MSG+FA grubuna ait ışık mikrografı.	42
Resim 11. Kontrol grubuna ait ZO-1 immünfloresan boyaması.	45
Resim 12. FA grubuna ait ZO-1 immünfloresan boyaması.	46
Resim 13. MSG grubuna ait ZO-1 immünfloresan boyaması.	46
Resim 14. MSG+DMSO grubuna ait ZO-1 immünfloresan boyaması.	47
Resim 15. MSG+FA grubuna ait ZO-1 immünfloresan boyaması.	47
Resim 16. Negatif kontrol ve deney gruplarına ait fotomikrograflarda ZO-1 immünreaktivitesi.	48
Resim 17. Kontrol grubuna ait AMH immünfloresan boyaması.	50
Resim 18. FA grubuna ait AMH immünfloresan boyaması.	51
Resim 19. MSG grubuna ait AMH immünfloresan boyaması.	51
Resim 20. MSG+DMSO grubuna ait AMH immünfloresan boyaması.	52
Resim 21. MSG+FA grubuna ait AMH immünfloresan boyaması.	52
Resim 22. Negatif kontrol ve deney gruplarına ait fotomikrograflarda AMH immünreaktivitesi.	53
Resim 23. Kontrol grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.	56
Resim 24. FA grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.	57

Resim 25. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	58
Resim 26. MSG+DMSO grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.	59
Resim 27. MSG+FA grubuna ait geçirimli elektron mikrografi.....	60



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Spermatogonyum tipleri (21,32).....	9
Tablo 2. Testis doku takip basamakları.....	22
Tablo 3. Testis hasarını skorlamak için kullanılan Johnsen skor değerleri.....	24



ÖZET

Monosodyum Glutamat ile İndüklenen Testis Hasarında Ferulik Asit'in Fertilite Üzerine Olası İyileştirici Etkisinin Biyokimyasal ve Morfolojik Yöntemlerle Araştırılması

Bu çalışmada, ferulik asidin monosodyum glutamat (MSG) kaynaklı testis hasarı üzerine muhtemel iyileştirici etkileri histokimyasal, immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak gösterilmesi hedeflendi. Wistar cinsi albino sıçanlar (n:40) 5 deney grubuna; Kontrol, Ferulik asit (FA), Monosodyum glutamat (MSG), Monosodyum glutamat ve dimetil sülfoksit (MSG+DMSO), Monosodyum glutamat ve ferulik asit (MSG+FA) olarak ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara 38 gün boyunca distile su verildi. FA grubundaki sıçanlara 28 gün DMSO verilirken son 10 gün boyunca FA solüsyonu verildi. MSG grubundaki sıçanlara 28 gün boyunca 600 mg/kg MSG; MSG+DMSO grubundaki sıçanlara 28 gün boyunca 600 mg/kg MSG, son 10 gün ise DMSO solüsyonu; MSG+FA grubuna ise 28 gün boyunca 600 mg/kg MSG, deneyin son 10 günü 25 mg/kg FA solüsyonu gavaj yöntemi ile uygulandı. Deney sonunda diseke edilen sıçanlardan alınan testis dokuları morfolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler amacıyla kullanılırken, sperm örnekleri ise epididimis dokusundan toplanarak morfolojik olarak değerlendirildi. MSG grubunda gözlenen morfolojik hasarla beraber ZO-1 ve AMH immünreaksiyonunda azalma gözlemlendi. MSG grubunda sperm morfolojisinde hasar görüldü. Geçirimli elektron mikroskobu düzeyindeki incelemelerde kan-testis bariyerinde ve ince yapı düzeyinde morfolojik hasar izlendi. Biyokimyasal parametrelerden MDA ve TOS seviyelerinde artış, TAS seviyesinde ise düşüş izlendi. Bu çalışma ile kronik düzeyde MSG tüketiminin testiste seminer tübül epitelinde dejenerasyona neden olduğu ve kan-testis bariyerine hasar verdiği belirlendi. MSG+FA grubunda ise ferulik asidin oksidatif dengeyi düzenleyerek, kan-testis bariyerinin bütünlüğüne ve sperm morfolojisine iyileştirici etki sağladığı görüldü.

Anahtar Sözcükler: Monosodyum glutamat (MSG), Ferulik asit (FA), ZO-1, AMH, Kan-testis bariyeri

ABSTRACT

The Investigation of the Putative Ameliorative Effect of Ferulic Acid on Fertility in Monosodium Glutamate-Induced Testicular Damage by Biochemical and Morphological Methods

The aim of this study was to investigate the potential ameliorative effects of ferulic acid on monosodium glutamate (MSG)-induced testicular injury using histochemical, immunohistochemical, ultrastructural and biochemical methods. Wistar albino rats (n:40) were randomly divided into 5 groups as Control, Ferulic acid (FA), Monosodium glutamate (MSG), Monosodium glutamate and dimethyl sulfoxide (MSG+DMSO), Monosodium glutamate and ferulic acid (MSG+FA). Rats in the control group were received distilled water for 38 days. Rats in FA group were received distilled water for 28 days and FA solution for the last 10 days. Moreover, rats in the MSG group received 600 mg/kg MSG solution for 28 days, rats in the MSG+DMSO group received 600 mg/kg MSG for 28 days and DMSO solution for the last 10 days, and MSG+FA group was received 600 mg/kg MSG for 28 days and 25 mg/kg FA solution for the last 10 days of the experiment by gavage method. At the end of the experiment, testis tissues of rats were used for morphological and biochemical evaluations while sperm samples were collected from the epididymis tissue and evaluated morphologically. A decrease in ZO-1 and AMH immunoreaction was observed with the morphologic damage in the MSG group. Moreover, morphological sperm damage was observed in the MSG group. Ultrastructural morphological damage and distrupcion of the integrity of blood-testis barrier were observed in transmission electron microscopy. The biochemical parameters showed an increase in MDA and TOS levels and a decrease in TAS level. In this study, it was concluded that chronic MSG consumption causes degeneration of the seminiferous tubule epithelium and damages the blood-testis barrier. In contrast, the MSG+FA group, ferulic acid regulated the oxidative balance and improved the integrity of the blood-testis barrier and sperm morphology.

Keywords: Monosodium glutamate (MSG), Ferulic acid (FA), ZO-1, AMH, Blood-testis barrier

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Umami olarak tanımlanan tat, 20. Yüzyılın başlarında lezzet açıcı ve iştah arttırıcı olarak tanımlanmıştır. Umami, tuzlu tadı arttırarak, ekşiliği ve acılığı bastırarak yiyeceklerin tadını daha fazla yeme isteği uyandıracak şekilde düzenlemektedir ve serbest amino asitlerde, nükleotidlerde, peptitlerde, organik asitlerde ve bunların türevlerini içeren geniş çaptaki gıdalarda bulunmaktadır (1). İlk tanımlanan umami tat etkeni monosodyum glutamat (MSG)'tır (2). MSG, L-glutamik asitten türetilen ve çeşitli gıda ürünlerinin sıkça içerdiği doğal bir lezzet arttırıcısıdır. MSG, et ve balık gibi yüksek proteinli gıdalarda, parmesan ve rokfor gibi peynirlerde ve domates, mantar, brokoli gibi sebzelerde bulunmaktadır. MSG çoğu işlenmiş gıdada bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerde günlük MSG alımının ortalama 0,3-1,0 g/gün olduğu tahmin edilmektedir (3). Ancak, yapılan insan ve hayvan çalışmalarda çok düşük dozda MSG tüketiminin dahi (örneğin iki hafta boyunca 0,6 ve 1,6 mg/g vücut ağırlığı veya üç hafta boyunca 100-500 mg/kg vücut ağırlığı) zararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (4). Özellikle kronik MSG tüketiminin zararlı etkileri timus, beyin, pankreas, testis, karaciğer ve böbrek gibi farklı organlarda gösterilmiş ve obezite, hipertansiyon, baş ağrısı, nörotoksisite gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (5).

MSG'nin ayrıca oksidatif stresi indükleyerek obeziteye ve karaciğerde toksisiteye sebep olduğu görülmüştür (6). Yapılan bir çalışmada MSG'nin erkek üreme sistemine olan etkisi incelenmiş olup, oksidatif stres nedeniyle sperm parametrelerini etkilediği; FSH, LH, testosteron hormon düzeylerinde anormal değerler ve yapılan histolojik değerlendirmede seminifer tübüllerde ve epididimiste morfolik değişikliklere neden olduğu gözlemlenmiştir (7). MSG ile beslenen sıçanların testis morfolojisinde dejenerasyonla birlikte sperm yapısının da bozulduğu ve ayrıca testis dokularında oksidatif stresi gösteren belirteçlerin arttığı gözlemlenmiştir (8).

Serbest radikallerin antioksidanlar tarafından yeterince nötralize edilememesi kaynaklı oluşan vücuttaki kümülatif hasar sonucu oksidatif stres oluşur ve bu oksidatif hasar, katalaz (CAT), glutatyon S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidanların aktivitelerinden etkilenmektedir (9). Malondialdehit

(MDA); hücre zarı hasarını, reaktif hücrelerdeki oksijen radikali yoğunluğunu ve in vivo serbest radikal metabolizmasını göstermektedir. Oksidatif stresin SOD'un azalması ve MDA'nın artması sonucunda tetiklendiği ve bu durumun hücrelerde hasara ve hatta hücre ölümüne yol açtığı gözlemlenmiştir (10). Ferulik asidin etkili bir reaktif oksijen türleri (ROT) inhibitörü olduğu bilinmektedir (11).

Testiste, seminifer tübül epitelinde, Sertoli hücrelerinin bazolateral membranları arasındaki sıkı bağlantılar ile memeli vücudunda bulunan en sıkı bariyerlerden birisi olan kan-testis bariyeri (KTB) yer almaktadır (12). Dezmozomlar, bazal ektoplazmik özelleşmeler, sıkı ve ara bağlantılar KTB yapısında önemli roller üstlenirler. Sıkı bağlantıları oluşturan moleküllerden biri okludinlerdir ve bunlar arasında en önemli olanlar zonula okludens proteinlerinden zonula okludens-1 (ZO-1), zonula okludens-2 (ZO-2) ve zonula okludens-3 (ZO-3)'tür. 225 kDa'luk bir protein olan ZO-1 sıkı bağlantıların yüzeysel alanlarında yer almaktadır. Hücre iskeleti ile etkileşime girmesinde aktin filamentlerine bağlanması rol oynar. Okludin ZO-1 ve ZO-3 ile, aktin hücre iskeleti ile etkileşim halinde bulunur. ZO-3 proteini, ZO-1 ve okludinin sitoplazmik alanları ile ilişki halindedir (Ross ve Pawlina, 2011). Çeşitli epitel türlerinde bulunmakla birlikte sıçan testisi ve epididimisinde de bulunur. Okludinin KTB'nin düzenlenmesinde ve kontrolünde mühim bir rolü vardır (13).

Anti-müllerian hormon olarak bilinen AMH, müller kanalının gerilemesini indükleyerek fetal cinsiyet farklılaşmasında önemli bir rol oynayan transforme büyüme faktörü β (TGF- β) ailesine ait bir glikoprotein dimeridir (14,15). AMH, fetal ve postnatal testis Sertoli hücrelerinde ve ayrıca yumurtalık granüloza hücrelerinde bulunmaktadır. Cinsiyet farklılaşmasında ve gonadal fonksiyonda oldukça önemli rol oynamaktadır. AMH, Sertoli hücre gelişimi ve nihayetinde fertilitiyi etkilemektedir. AMH konsantrasyonunun Sertoli hücre proliferasyonu ve apoptozunu etkilediği belirtilmektedir (16).

Spermatogenez sürecinde apoptoz en önemli faktörlerden biridir. Apoptoz, spermatogenez sırasında germ hücre sayısını belli bir değerde sınırlayarak germ hücrelerinin Sertoli hücrelerine oranının en uygun seviyede kalmasına yardımcı olur. ROT'ların üretimi spermatozoada sürekli olarak devam eder ve bunun sonucunda oksidatif stres oluşur (16). ROT, DNA çift sarmal kırılmalarına neden olur ve DNA

parçalanması yoluyla fizyolojik olarak programlanmış hücre ölümünü, apoptozu tetikler (17). Fertil ve infertil erkeklerin seminal sıvıları karşılaştırıldığında, infertil erkeklerde oksidatif stresin ve apoptotik hücrelerin arttığı gözlemlenmiştir. ROT seviyesindeki yükseliş sıkı paketlenmemiş kromatin içeren spermatozoonların üretilmesindeki paketlenme sürecinin bozulmasına yol açar ve bu sayede spermatozoonları apoptotik aşamaya sokar (18).

Ferulik asit (4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit) 1866 yılında izole edilmiş ve 1925 yılında kimyasal olarak sentezlenmiştir. Ferulik asit serbest formda bulunabildiği gibi ayrıca bitkilerin hücre duvarında polisakkaritler, glikoproteinler ve hidroksi yağ asitleri gibi moleküller ile birlikte de bulunabilmektedir (17). Ferulik asidin doğal kaynaklarına pirinç, buğday, yulaf, fasulye, kahve tohumları, enginar, fıstık, ıspanak, muz örnek verilebilir (18). Ferulik asidin antioksidan etkisiyle birlikte kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar üzerinde iyileştirici etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (19). Ferulik asit serbest radikallerin oluşumunu bu radikalleri katalize eden enzimleri inhibe ederek engeller ve böylece antioksidan etkisiyle, demir ve bakır gibi metal iyonlarının şelatlanmasını sağlayarak ve lipid peroksidasyonunun önlenmesinde rol oynayarak çeşitli hastalıklar üzerinde iyileştirici etki göstermektedir (11). Ferulik asit ROT oluşumunun engellenmesinde önemli rol oynamaktadır (11). H₂O₂ ile indüklenmiş sıçan vasküler düz kas hücrelerinde oluşturulmuş inflamasyon ve oksidatif stres modelinde ferulik asidin hücre çoğalmasını sağladığı, hücre apoptozunu azalttığı, ayrıca NADPH oksidazın aktive olmasını engelleyerek ROT üretimini azalttığı, NF-kB aktivasyonunu inhibe ederek de iNOS ekspresyonunu ve IL-1 β , IL-6, TNF- α düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (20).

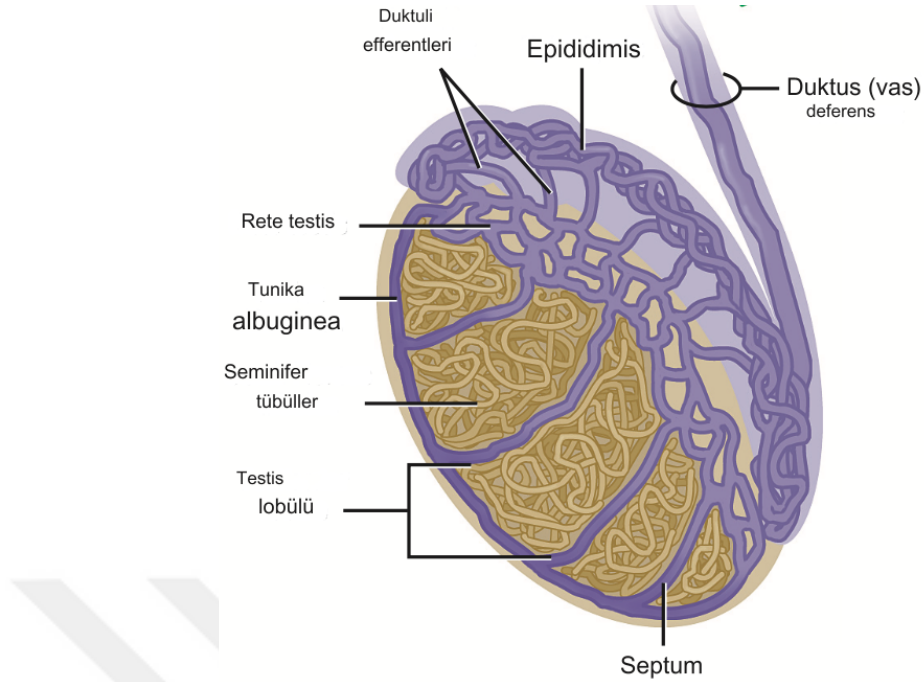
Bu veriler ışığında, projenin konusu monosodyum glutamat tüketimine bağlı testis hasarında oluşan oksidatif hasara karşı antioksidan ve antiinflamatuvar etkili bir ajan olan ferulik asidin erkek infertilitesi üzerindeki tedavi edici etkisinin biyokimyasal, histolojik, immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik teknikler kullanılarak araştırılmasıdır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Testisin Histolojisi

Erkek genital sistemi, bir çift testis, salgı görevi bulunan yardımcı bezler ve çok sayıdaki testis içi ve dışı kanallardan oluşur. Puberte ile tetiklenen spermatogenez ve morfolojik süreçleri içeren spermiyogenez sonrası sperm oluşumu izlenmektedir. Skrotumda bulunan testisler, üç tabakadan oluşan, oldukça kalın bir kapsül ile korunmaktadır. Bu kapsülü dıştan içe doğru, vajinalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza oluşturur. Mediastinum testisi oluşturmak için tunika albuginea kalınlaşır ve testisin iç kısımlarına doğru uzanır. Böylece her bir testisi yaklaşık 250 testiküler lobüle ayırır (Şekil 1). Bu lobüllerin her birinde 1 ile 4 adet kadar yüksek oranda sarmal şekilli seminifer tübül bulunur (21).

Tübüllerin iç kısmında bulunan çok katlı epitele ise seminifer epitel ya da germinal epitel adı verilir (22). Seminifer tübül epitelinin bazal kısmında ise tunika propria adı verilen özelleşmiş bir bağ dokusu bulunur ve myoid hücreleriyle beraber kolajen lifleri de barındırır. Farklı gelişim aşamalarında bulunan spermatogenik hücreler birbirleri üzerinde sıralıdır ve olgunlaşarak tübül lümenine sperm olarak salınırlar (23). Seminifer tübülü çevreleyen yapılar arasında kan damarları, lenfatik damarlar, sinirler ve fibroblastlar bulunur. Ayrıca, seminifer tübüller arasında interstisyel hücreler (Leydig) ve epiteloid hücre kümeleri vardır. Erkek cinsiyet hormonu olarak adlandırılan testosteron, bu hücreler aracılığı ile salgılanmaktadır (23).



Şekil 1. Testisin şematik görüntüsü (23).

2.1.1 Ara ( nterstisyel) bağ dokusu

Testisin interstisyel dokusu, seminifer tübül aralarında bulunup testis fonksiyonlarını, erkeğe özgü farklılaşmayı ve spermatogonezi etkileyen gevşek bağ dokusudur. İnsan seminifer tübülleri, kolajen ve laminin içeren bir bazal membran ile çevrilidir ve onun etrafındaki çok katlı peritübüler myoid hücreleri ile interstisyel dokudan ayrı tutulur (24). Kan damarları, sinir lifleri lenf damarları, immün hücreleri, peritübüler ve Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) bu dokuyu oluşturan yapılardır. Bağ dokusu, seminifer t b llerle beraber kan damarlarına mekanik destek sağlar ve Leydig hücrelerinin lokalizasyonunda rol oynar ve böylece spermatogonezi destekler (25).

2.1.2 Seminifer tübüller

Seminifer tübüller ve interstisyel doku, memeli testislerinde bulunan iki önemli yapıyı oluşturur. Testiste hacimce en büyük alan seminifer tübüllere aittir. Seminifer tübül epiteli, sürekli farklılaşma ve olgunlaşma geçiren spermatogenik hücrelerden ve bazal laminadan lümene kadar uzanmış, düzenli bir şekilde bulunan destekleyici görevindeki Sertoli hücrelerinden oluşur (26).

Seminifer tübüllerin her biri yaklaşık 50-60 cm uzunluğunda ve kıvrımlıdır. Çapları ortalama 200  m olmakla beraber tübüllerin hepsi u  uca eklendiğinde boyu yaklaşık 600 metreyi bulmaktadır. Seminifer tübülü oluşturan yapılardan peritübüler doku yaklaşık 80  m kalınlığında ve bir diğer yapısı olan germinal epitel ise yaklaşık 8  m kalınlığındadır. T b lleri döşeyen çok katlı germinal epitel (seminifer epitel) Sertoli hücreleri ve farklı gelişim aşamalarındaki spermatogenik hücrelerden meydana gelir. Bu hücreler sıkı bağlantılarla birbirine bağlıdır. Tübüllerin çok katlı epitel yapısı spermatogenik hücrelerden kaynaklanmaktadır (27).

2.1.3 Spermatogenik hücreler

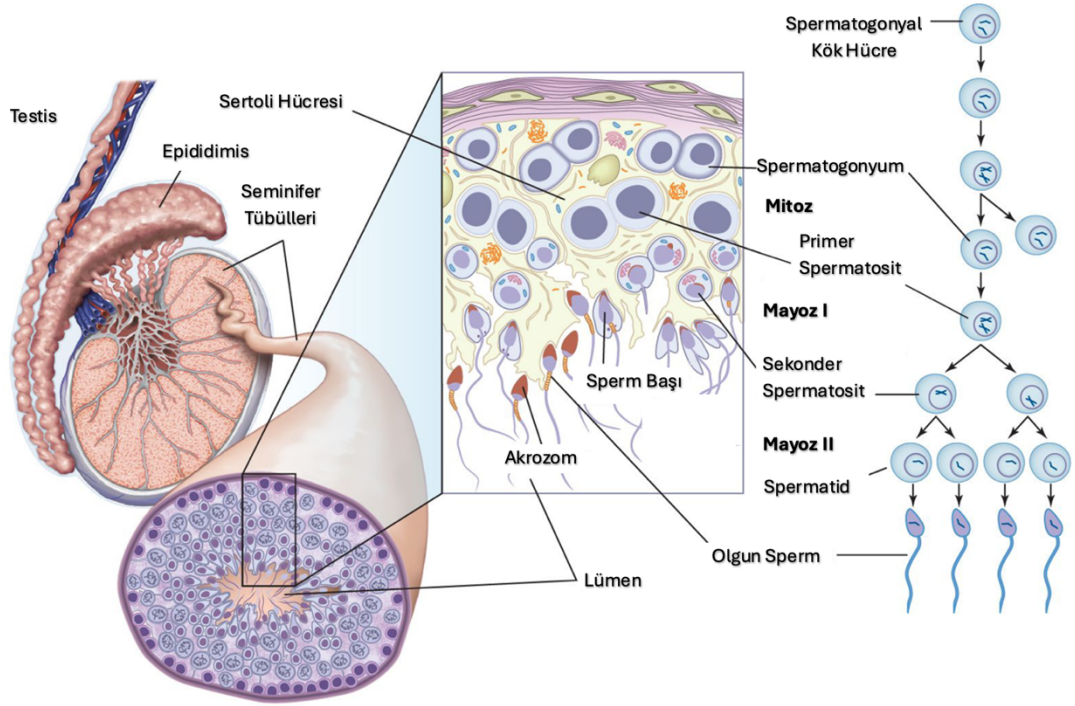
Tübül epitelinde farklı gelişim aşamalarında olan yerleşik durumdaki hücrelere spermatogenik hücreler denir. Hücreler her zaman bazal laminadan apikal taraftaki seminifer tübül lümenine doğru farklılaşırlar (28). Spermatogonyum hücre bölünmeleriyle spermatositlere farklılaşır, sonrasında mayoz bölünme yoluyla ilerleyerek spermatidleri ve nihayetinde spermi oluşturur (29). Erken embriyonik dönemde, primordial germ hücrelerinden köken alırlar (30). Spermatogenez, spermatogonyumlardan spermin geliştiği süreç olarak tanımlanır (21). Seminifer tübüllerin bazal membranın hemen üzerinde yerleşik spermatogenetik hücreler bölünüp sayılarını arttıırırlar ve farklılaşarak primer spermatositleri oluştururlar. Diğer canlı türlerinde spermatogenik hücre tiplerinin sayısı değişse de insanda spermatogonyumlar nükleus morfolojilerine göre (Tablo 1)   e ayrılırlar (31,32). Farklı spermatogonyum türleri, spermatogonyal kök hücre popülasyonunu korumak ve yetişkinlik döneminde sperm üretiminin devamlılığını sağlamak için gereklidir. Spermatogonyumların kendini yenilemesi ve farklılaşması arasındaki dengenin bozulması, spermatogonyal fazın bozulmasına ve infertiliteye sebep olabilir (33).

Tablo 1. Spermatogonyum tipleri (21,32).

Koyu Tip A Spermatogonyum	Kök hücre kaynağı olarak kalırlar. Nükleusları yoğun bazofilik boyanır.
Açık Tip A Spermatogonyum	Bölünüp çoğalarak aynı tipte kalırlar ya da Tip B spermatogonyumları oluştururlar. Nükleusları soluk bazofilik boyanır.
Tip B Spermatogonyum	Testisteki primer spermatositlerin oluşması için mitotik bölünmeye giderler. Yuvarlak nükleusludurlar.

Bir sonraki aşamada ise primer spermatositler mayoz geçirerek hem kromozom sayılarını hem de DNA miktarlarını azaltırlar. Bu şekilde oluşan haploid hücreler ikincil spermatosit olarak adlandırılır (21). Daha sonrasında ikincil spermatositler, ikincil mayotik bölünmeye uğrayarak spermatidleri meydana getirirler. Spermatogenez ilerledikçe hücreler seminifer tübülün bazal membranından uzaklaşır ve tübül lümenine yaklaşmış olurlar. Böylelikle, tübülün belli bir tabakasında spesifik bir hücre türü gözlemlenebilir. Lümene yakın kısımda bulunan spermatidler, birbirleri arasında sitoplazmik köprülerini burada kaybederler ve sperme farklılaşırlar. Spermatogonik kök hücrelerden olgun bir sperm oluşması insanda 65 gün sürmektedir (34).

Spermatogenezin son adımı ise sperm hücresinin farklılaşarak olgunlaşmasını sağlayan spermiyogenezdir. Memeli haploid spermatidi, olgun sperme hiç benzemezler, yuvarlak şekillidir. Spermiyogenezin ilk aşaması golgi kompleksinden akrozomal vezikül oluşumudur. Sperm çekirdeğini örtecek şekilde akrozomal kep (başlık) oluşur. Çekirdeğin akrozomal kep oluşumu sırasında rotasyonu ile birlikte kep seminifer tübülün bazal membranına bakacak şekilde yerleşir. Böylece spermatidin diğer tarafındaki sentriyolden flagellum oluşmaya başlar ve lümene doğru uzanır. Son aşamaya gelindiğinde çekirdek yoğun bir hal alır, düzleşir ve yoğunlaşır, kalan fazla sitoplazma hücreden atılır ve mitokondri flagellumun tabanında halka benzeri yapı oluşturur (34,35).



Şekil 2. Spermatogenez aşamaları ve testisteki konumu (36).

2.1.4 Leydig hücreleri

İnterstisyel bağ dokuda mast hücresi, makrofaj ve fibroblastlarla beraber bulunan Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) androjen üretiminin ana kaynaklarından. Salınan androjenler, seminifer tübüllere ve interstisyel alandaki kan damarlarına geçerler ve hipotalamo-hipofizer-gonadal (HPG) aksın kontrolüyle Sertoli hücreleri ve peritübüler myoid hücrelerine bağlanıp spermatogenetik hücrelerin sinyal yollarının kontrolüne katılırlar (37).

Bu hücreler yuvarlak ya da poligonal morfoloji gösterirler ve eozinofilik hücrelerdir. Hüresel özellik olarak steroid sentezlediğinden Leydig hücrelerinde çokça lipid damlacığının bulunması karakteristik özelliği olarak görülür. Ayrıca Leydig hücrelerindeki bir diğer karakteristik özellik de çubuk şeklinde sitoplazmik kristallerden oluşan Reinke kristallerinin bulunmasıdır. Reinke kristallerinin yoğunluğu histopatolojik değerlendirmelerde tanısal amaçla kullanılmaktadır (21).

2.1.5 Sertoli hücreleri

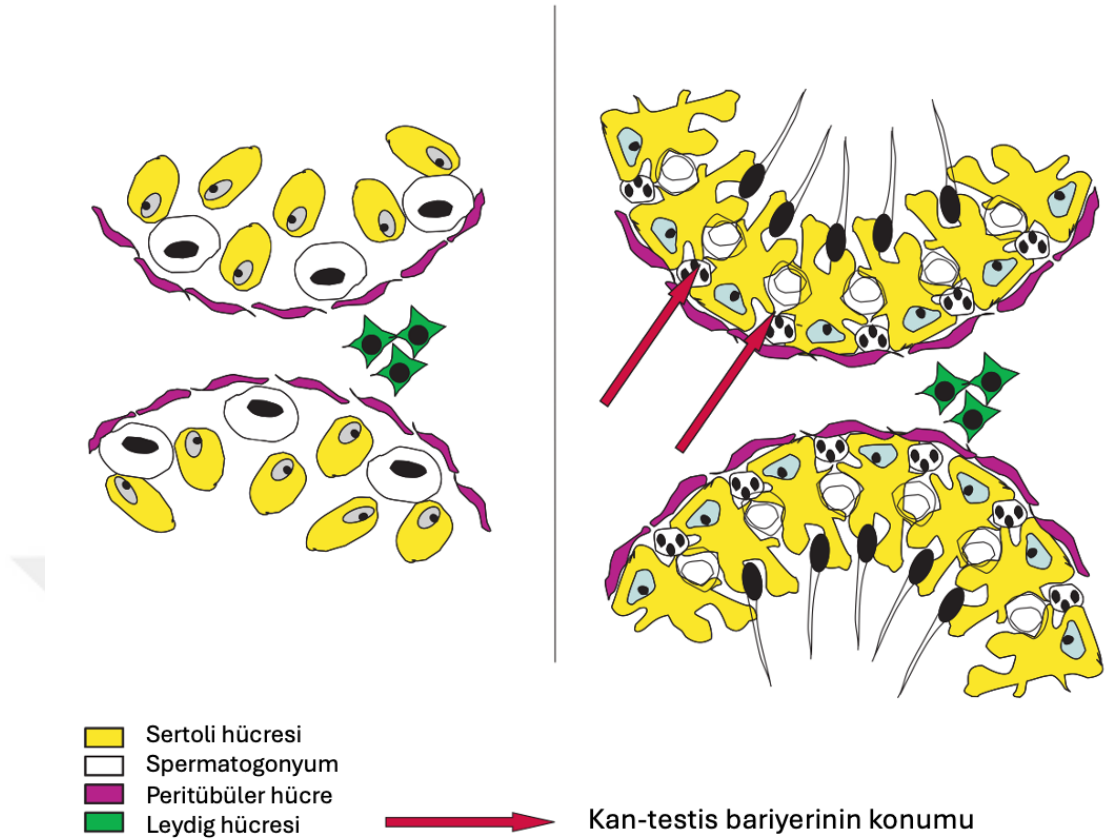
Seminifer tübülün çok katlı epitelinin bazal membrana yerleşik olan Sertoli hücreleri, tübül lümenine kadar uzanırlar ve spermatogenetik hücrelerin hepsini

destek hücreleri olarak çevrelerler. Sertoli hücrelerinin birden fazla şekli olmakla beraber genelde uzun ve prizmatik şekillidirler. Bunun yanı sıra sitoplazmaları soluk asidofilik boyanır ve hücrenin bazal kısmına daha yakın olan ökromatik nukleusları üçgen veya yuvarlak şekillidir. Spermatogenetik hücrelerin aralarında sınır çizen çokça lateral uzantıları bulunmaktadır. Işık mikroskobu ile incelendiklerinde Sertoli hücre sınırlarının belirlenmesi oldukça zordur. Elektronik mikroskobu ile incelendiğinde hücreler arası bağlantı kompleksleri, düz endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondri, lipid damlacıkları, belirgin golgi kompleksi, lizozom ve iyi gelişmiş nükleolusu görülmektedir (21).

Ergenlik dönemine yaklaşılmaya beraber Sertoli hücrelerinde çeşitli morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler görülür. Genişlemiş ve üç parça halindeki nükleolus, KTB oluşumu, androjen reseptörü (AR) ve GATA Bağlayıcı Faktör-1 (GATA-1) ekspresyonları Sertoli hücresinde görülen belirgin özellikler olarak sayılabilir. Nihayetinde Sertoli hücreleri, spermatogenezi desteklemektedir (38).

Sertoli hücrelerinin temel fonksiyonları şu şekildedir:

- Sertoli hücreleri, olgun spermatozoanın oluşması için destekleyici bir çevre yaratır.
- İki Sertoli hücresi arasındaki bağlantı kompleksi seminifer epiteli bazal ve adluminal olmak üzere iki ayrı epitelyal bölüme ayırır.
- Sertoli hücreleri, bağlantı kompleksleriyle beraber, KTB'yi de burada oluşturur. KTB'nin oluşumu ile, spermatogenetik hücreler immün sistemden korunmuş olurlar.
- Spermilerin transfer edilmesini kolaylaştıran bir sıvı üretir.
- Androjen bağlayan protein sentezi ile yüksek miktarda testosteron içeren bir mikroçevrenin devamlılığını sağlar (39,40).



Şekil 3. Sertoli hücreleri ve kan-testis bariyerinin şematik görüntüsü (39).

2.1.6 Kan-testis bariyeri

KTB, insan testisinde 11-12 yaşlarında oluşurken, sıçanlardaysa doğum sonrası dönemde 17. ve 21. gün aralığında meydana geldiği bilinmektedir (41). KTB ilk olarak fizyolojik fonksiyonu ile ilişkili olarak farklı maddelerin plazmadan rete testise geçişi analiz ederek tanımlanmıştır (42). Komşu Sertoli hücreleri arasında ve özelleşmiş bir bağlantı kompleksinden oluşan KTB, germinal epiteli bazal ve adlüminal bölümlere ayırır. KTB yapısında sıkı bağlantılar, ara bağlantılar (gap junctionlar, oluklu bağlantılar), ektoplazmik özelleşmeler ve desmozomlar olmak üzere farklı bağlantı özelleşmelerini içerir (21). KTB spermatogenez sürecinde gelişmekte olan spermatogenik hücreler ile doğrudan etkileşir. Seçici geçirgen olması nedeniyle spermatogenez için gerekli en uygun ortamı oluşturur ve spermatogonenik hücrelerin gelişimi ve olgunlaşması için eşsiz bir mikroçevre oluşturur (43). Sertoli hücrelerinde bağlantı proteinlerinin sentezlenmesinde anormallik olduğunda, spermatogenik hücrelerdeki mayoz bölünmelerde ve hücre

farklılaşmalarında sorunlar ortaya çıkar ve sonuç olarak sperm üretimi azalır (44). KTB, seminifer tübüllerdeki gelişmekte olan hücreleri otoimmün cevaptan korumak amacıyla tübülün hem bazal hem de adluminal kompartmanını tübülün geri kalanından ayırır (45). Böylece hücreler kan yolu ile gelebilecek olan zararlı maddelerden de korunmuş olurlar. İzolasyon görevinin dışında, bu kompartmanlar arasında biyomolekül, iyon ve elektrolit hareketlerini kontrol eder ve tübül mikroçevresini korur (46). Yaşlanma, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunun azalmasını tetikler ve KTB'nin bütünlüğünde bozulmalara neden olur. Böylece yaşa bağlı olarak spermatogenez etkilenebilir (47).

Sıkı bağlantılar, KTB'yi oluşturan en önemli yapılardan bir tanesidir. Komşu Sertoli hücreleri kendi aralarında oluşturdukları bu bariyer ile hücrelerarası alana alınacak molekülleri seçerler (46). KTB'de bulunan bu sıkı bağlantıların vücutta diğer epitel hücreleri arasında bulunan sıkı bağlantılara göre sahip olduğu en büyük avantaj ise, bazal membrana çok yakın konumda bulunmalarıdır (48). Sıkı bağlantılar iki farklı bölgenin ortaklaşa çalışması ile faaliyet gösterir. İlk bölge, komşu hücrelerdeki aynı moleküle bağlanarak hücrelere mekanik olarak adhezyon sağlayan okludin, klaudin protein grubu ve hücre adhezyon molekülleri içeren bir transmembran bölgesidir. Diğer bölge ise, zonula okludens proteinlerini hem sıkı bağlantı yapısına bağlayan hem de hücre iskeletine entegre eden moleküllerden oluşan sıkı bağlantıların periferik bölgesidir(48).

Zonula okludens-1 (ZO-1), zonula okludens-2 (ZO-2) ve zonula okludens-3 (ZO-3), membranla ilişkili guanilat kinaz protein grubuna dahildirler ve Sertoli hücreleri tarafından üretilirler. Zonula okludens protein ailesi, sinyal iletim yollarının düzenlenmesi, membran bütünlüğü ve geçirgenliğinin sağlanması, hücrelerin farklılaşması ve polarizasyonunu kontrol etmekle görevlidir (49).

2.2 Epididimis

Epididimis oldukça segmentli bir organ olsa da temel olarak duktuli efferentes ve duktus epididimisten oluşur. Testisin arka tarafı boyunca uzanan yaklaşık 7-8 cm uzunluğundaki epididimisi çoğu kaynak baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölüme ayırır (21). Duktuli efferentes ve duktus epididimisin etrafında kan damarlarından ve kas hücrelerinden zengin bir sıkı bağ dokusu vardır. 4-6 metre

uzunluğunda, kıvrımlı morfolojideki bir kanal olan duktus epididimis, gövde ve kuyruk kısmı boyunca bulunur ve uzunluğuna rağmen çokça kıvrım yaparak dar bir kısma yerleşmiştir. Baş kısmında ise *duktuli efferentes* bulunmaktadır (21,50).

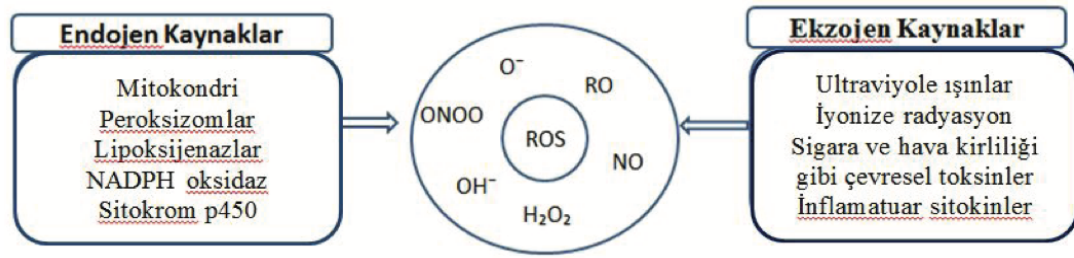
İnsan epididimisi, spermin olgunlaşması, depolanması ve taşınmasında çok önemli rol oynar. Esas hücreler, bazal hücreler ve apikal hücreler dahil olmak üzere farklı hücre tiplerini içeren epiteli steriosilyumlu yalancı çok katlı prizmatik epiteldir. Uzun prizmatik esas hücrelerinde luminal yüzeyde çok sayıda uzun stereosilyumlar bulunmaktadır (22). Esas hücreler epididimal sıvının üretiminden sorumluyken bazal hücreler ise destek sağlar ve epitelyal hücreler, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilmemiş rezidüel cisimcikleri ve kanalda hasara uğramış spermleri de fagosite eder. *Duktus epididimis*, spermin kanal boyunca iletilmesini sağlayan düz kas tabakaları ile sarılıdır (51). Spermler buradan geçerken olgunlaşırlar ve hareket kabiliyetiyle beraber dölleme yeteneği de kazanırlar (22,52). Sterosilya uzunluğu, epitel hücrelerinin uzunluğu, kas kalınlığı, lümen ve tüp çapları gibi parametreler insan epididimisinde diğer hayvanlardan farklıdır (53).

2.3 Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumu ile enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşur (54). Çevresel faktörler ve sağlıksız yaşam tarzları insanlarda oksidatif stresi etkileyebilir (55). ROT miktarının artmasına yaşanan çevreden dolayı zarar verici ajanlara maruz kalma, antioksidan mekanizmalarındaki hatalara ve sınırlı onarım özellikleri örnek verilebilir. Oksidatif stres altında üretilen ROT, lipidler, şekerler, proteinler ve DNA gibi tüm hücresel birimlere hasar verir. Bu sebeple kontrolsüz ROT artışını önlemek için hücreler çeşitli savunma mekanizmaları oluşturmuştur (54,55).

Tüm hücre çeşitlerindeki en büyük ROT kaynağı mitokondridir. Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) esas olarak mitokondriyal elektron taşıma zinciri seviyesinde üretilir ve süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülebilir veya dismutasyona uğrayabilir (56). Örneğin, demir ve bakır iyonları gibi geçiş metal iyonlarının varlığında H_2O_2 , oldukça reaktif olan hidroksil radikalini ($HO^{\bullet}$) yaratabilir. Reaktif türler ayrıca ksantin oksidaz (XO), nitrik oksit sentazlar (NOS) ve NADPH oksidaz (NOX) tarafından enzimatik olarak da üretilir (56).

Lipid peroksidasyonu genel olarak oksidanların karbon-karbon ikili bağları içeren lipidlere, özellikle de çoklu doymamış yağ asitlerine saldırdığı bir aşama olarak tanımlanabilir (57). Lipid peroksidasyonu, hücrede sitotoksik ve mutajenik etki gösterebilir. Bu süreç, oksidasyon ürünleri sebebiyle çeşitli patolojiler ve hastalık durumları ile ilişkilendirilmiştir. Oksidasyon ürünleri malondialdehit (MDA) gibi reaktif aldehytleri içerir. Bu aldehytler DNA'lar ve proteinler ile bağ oluşturabilir ve işlev değişikliklere sebep olabilir (58). Total oksidan seviyesi (TOS) genel oksidan durumunu temsil ederken, total antioksidan seviye (TAS) genel antioksidan durumu gösterir. Oksidatif stres indeksi (OSI) olarak adlandırılan bu oran (TOS/TAS), oksidatif stresi gösteren bir belirteç olarak kabul edilir (59). Antioksidan sistem, özellikle glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) hücreleri lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerinden korumada çok önemli rol oynar (60).



Şekil 4. Reaktif oksijen türleri (ROT) ve oluşum sebepleri (61).

2.4 Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesi, bir erkeğin üreme sistemini etkileyen çeşitli faktörlerden dolayı çocuk sahibi olamadığı bir durumdur. Erkek infertilitesi, çiftlerin yaklaşık %15'ini etkileyen önemli bir sorundur ve infertilite vakalarının %50'ye yakını erkek kaynaklı yaşanmaktadır (62). Gebe kalamama durumu çift için stresli olabilir, kimi durumlarda tedavi mümkün olamasa da, erkek kaynaklı infertilite durumunda erkeğe çeşitli tedavi yöntemleri uygulanabilmektedir (62,63).

İnfertilite değerlendirmesindeki aşamalardan ilk ve en önemlisi semen analizidir (64). Semen analizi, infertilitede erkek faktörünün etkisini tanımlamaya yardımcı olur. Erkekler infertilite tanısı konulurken, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterleri göz önünde tutulup semen analizi sonuçları değerlendirilerek tanı konulur. Erkek

infertil hastalara bakıldığında genelde semende bir veya daha fazla anomali görülür (65).

Artan ROT üretimi ve azalan antioksidanlar ile karakterize edilen oksidatif stres, yapılan birçok çalışma ile erkek infertilitesinde kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir (66). Çevresel faktörler, aşırı fiziksel egzersiz, antioksidan eksiklikleri, immün bozukluklar, genetik hastalıklar gibi durumlar oksidan/antioksidan dengesini değiştirebilir. Araştırmalar, oksidatif stresi ve oksidasyon biyobelirteçlerini klinik olarak değerlendirmenin oksidatif stresle ilişkili erkek infertilitesine yönelik yeni tedavileri yöntemleri geliştirilmesinde önemli olduğunu belirtmektedir (63).

Döllenme, sperm matürasyonu, hiperaktivasyon, kapasitasyon, spermin akrozomal reaksiyonu gibi aşamalarda ROT'un çok önemli olduğu bilinmektedir (67). Ancak, ROT üretimi arttığında çekirdek ve mitokondride deoksiribonükleik asit (DNA) parçalanması, hücresel membranda lipid peroksidasyonu ve nihayetinde apoptoz görülebilir ve bunun sonucunda sperm hareketliliğinde bozulmalara, sperm canlılık oranlarının düşmesine ve dölleme yeteneklerinin değişmesine neden olur (66).

Spermatozoanın plazma membranı, membran akışkanlığını ve spesifik bağlanmaları sağlayan çokça doymamış yağ asitleri içerir (68). Bununla birlikte, buradaki yağ asitlerinin metillenebilirliği yüksek olduğundan, bu durum spermi oksidatif hasara karşı savunmasız bırakır. Spermde lipid peroksidasyonu, ROT'ların sperm plazma membranında bulunan lipidlere saldırıp radikal zincir reaksiyonu denilen bir süreç başlatıp zarar vermesini ifade eder (67). Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikalleri ($OH^{\bullet}$) gibi ROT'lar sperm membranındaki çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşime girerek lipid peroksitlerin ve diğer reaktif lipid ara ürünlerini ortaya çıkartır. Perokside olmuş lipidlerin oluşturduğu zincir reaksiyonun sonucunda MDA ürünü oluşur. MDA, spermdeki peroksidasyon hasarının ölçülmesinde bir oksidatif stres biyobelirteci olarak kullanılır (69).

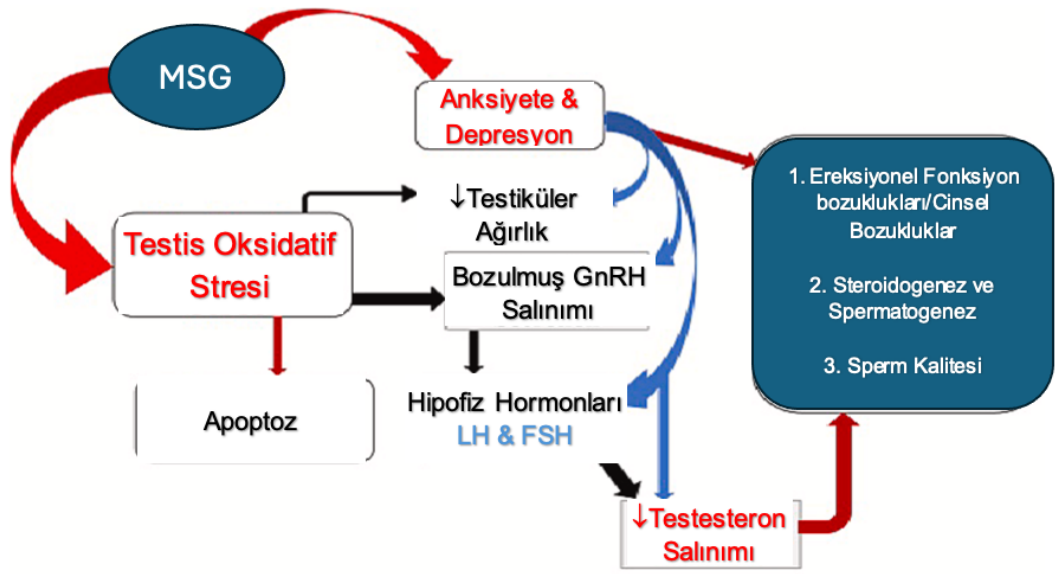
2.5 Monosodyum Glutamat ve Erkek Üreme Sistemine Etkileri

Monosodyum glutamat (MSG), gıda endüstrisinde ürünlerin aromalarını geliştirerek "umami" olarak adlandırılan 5. tat duyusunu uyarmak için çokça yaygın

olarak kullanılan bir L-glutamik asit türevidir (70). MSG'nin uzun yıllar boyunca sadece Asya mutfağında kullanılmış olsa da, şu anda tüm dünyada en çok kullanılan katkı maddesidir (71). MSG, Avrupa Birliği tarafından E621 gıda koduyla lisanslanmıştır ve piyasada paketli gıdaların üstlerindeki etiketlerde bu kodla veya MSG, glutamat, monosodyum glutamat olarak bulunmaktadır (72). MSG'nin ayrıca iştah açıcı etkisi de bulunmaktadır. Genellikle çorbalara, güveçlere, tavada kızartmalara, turşulara ve atıştırmalıklara eklenmektedir (73). Doğal olarak, proteinden zengin bitkisel ve hayvansal çeşitli ürünlerde bulunur. Domates, havuç, bezelye, ceviz gibi bitkisel kökenli; parmesan peyniri, yumurta, tavuk, sığır ve domuz eti gibi hayvansal kökenli gıdalar için önemli bir yapı taşıdır. MSG, tuzdan tat alma duyusunu en üst düzeye çıkarırken kendi tadını belli etmemesiyle bilinir (74). Kimyasal formülü $C_5H_8NNaO_4$ ve moleküler kütlesi 169,11 g/mol'dür. İlk olarak 1908'de Japon kimyager Kikunae Ikeda, deniz yosunu özünden MSG'yi elde etmiştir (75). Glutamik asit ise umaminin asıl kaynağı olarak tanımlanmıştır. L-glutamik asidin ise MSG ile karşılaştırıldığında tek başına hafif bir umami tadı oluşturduğu düşünülmektedir. Esterleşme veya amid oluşumu gibi diğer kimyasal değişiklikler, umami tadının azalmasına etki eder (3,75).

Gelişmiş ülkelerde kişi başına günlük ortalama MSG alımının 0,3-1,0 g aralığında olduğu tahmin edilmektedir, ancak bu miktar bireyin tüketim tercihlerine bağlı olarak değişebilmektedir (76). Elde edilen verilere göre, MSG verilen hayvan gruplarında insülin direnci ve glukoz intoleransının daha fazla olduğu görülmüş olup, bu durumun obezite ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür. MSG, serumdaki serbest yağ asitlerini, trigliseritleri, insülini ve adiposit farklılaşmasına katkıda bulunan çeşitli genlerin ifadesini artırmıştır (77).

MSG'nin vücutta çeşitli fonksiyonları bozduğu ve erkek üreme sistemine zarar verdiği hakkında çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (78). Çalışmalar, MSG'nin erkek üreme sistemine hasar verdiği, sıçanlarda testosteron ve sperm konsantrasyonunu azalttığı, serum gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), luteinize edici hormon (LH), testosteron ve kolesterol seviyelerini azalttığını göstermiştir. Ayrıca, MSG'nin testiste apoptozu tetiklediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (79).



Şekil 5. MSG'nin erkek üreme sistemine etki mekanizması (79).

2.6 Ferulik Asit

Ferulik asit (4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit, FA) bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik asit grubuna dahildir ve birbirinden farklı biyolojik ürünlerin ikincil metabolitleridir (80). Bitkilerde nadiren saf halde bulunur. Kimyasal yapısına göre üç farklı gruba ayrılabilir. Sinnamik ve benzoik asit türevleri, hidroksil ve metoksi grup sayıları ve konumlarına göre değişirken fenolik asit türevleri ise benzersiz yapılarıyla dikkat çeker (81). İnsan vücudunda metabolizasyonu ve bağırsaklardan emilimi kolaydır (82). Ferulik asidin fizyolojik birçok işlevi belirlenmiştir. Antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve anti-kanser özellikleriyle öne çıkmaktadır. FA sperm canlılığı ve hareketliliği üzerinde etkilidir (83). Ferulik asit, gıda ve kozmetik endüstrilerinde bu yararlarından dolayı sıklıkla kullanılmaktadır (84).

FA yapısal karakteri gereği güçlü bir serbest radikal tutucudur ve serbest radikal oluşumunu katalize eden enzimleri inhibe edebilir ve böylece güçlü antioksidanlar sınıfında yer alır (18). Bir çalışmada, streptozotosin ile diyabet indüklenen hayvanlara FA uygulanması sonucu serum glukoz miktarının düştüğü belirlenmiştir. FA, güçlü antioksidan özellikleriyle pankreasta streptozotosin kaynaklı serbest radikalleri nötralize edilmesine ve toksisitenin azaltılmasına katkı sağlar. Ayrıca, lipoprotein (LDL) oksidasyonunu önler ve kolesterolün karaciğere alımını ve

parçalanmasını kolaylaştırır. Sonuç olarak, FA çokça tedavi edici özellikler göstermekte ve bağışıklık sistemimize katkıda bulunabilmektedir. Yapılan çalışmalar, düzenli FA alımının çeşitli oksidatif stresle ilgili problemlere karşı önemli ölçüde koruma sağlayabileceği fikrini desteklemektedir (85).



3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Bu çalışma dahilinde Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi (ACU-DEHAM)'nden alınan genç yetişkin (7 haftalık) 160-200 g aralığında 40 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Hayvan deneylerini gerçekleştirebilme kapsamında Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ACU-HADYЕК)'ndan onay alındı (ACU-HADYЕК 2022/72).

3.2 Yöntem

3.2.1 Deney grupları

İstatistiksel olarak anlamlı sonuç elde etmek için, her çalışma grubu için %80 güç, 0.05 istatistiksel anlamlılık ve 0.6 etki büyüklüğünde ANOVA güç analizi kullanıldı ve her çalışma grubu için 8 sıçan gerektiği belirlendi. Bu çalışmada 5 deney grubu oluşturuldu (Şekil 1). Tüm hayvanlar 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsünde, ortalama oda sıcaklığı 22 ± 2 °C'de, ayrı ayrı havalandırılan kafeslerde standart hayvan yemi tüketerek ad libitum beslendi. Deney gruplarındaki sıçanlar çalışmanın başında Kontrol, Ferulik asit (FA), Monosodyum glutamat (MSG), Monosodyum glutamat ve dimetil sülfoksit (MSG+DMSO), Monosodyum glutamat ve ferulik asit (MSG+FA) gruplarına rastgele olacak şekilde yerleştirildi. Hayvan ağırlıkları deney başından itibaren düzenli olarak her gün ölçüldü. MSG grubu 28. günde izofluran anestezi altında, Kontrol, FA, MSG + DMSO ve MSG + FA grupları ise 38. günde izofluran anestezi altında diseke edildi. Biyokimyasal değerlendirmelerde kullanılmak amacıyla kalpten kan alındı. Dekapitasyon sonrası tüm deney gruplarında bulunan sıçanların testis ağırlıkları kaydedildi. Mikroskopik ve biyokimyasal değerlendirmeler için testis dokuları diseke edildi. Epididimiste bulunan spermier ise morfolojik değerlendirme yapmak amacıyla üzere alındı.

Oluşturulan deney grupları;

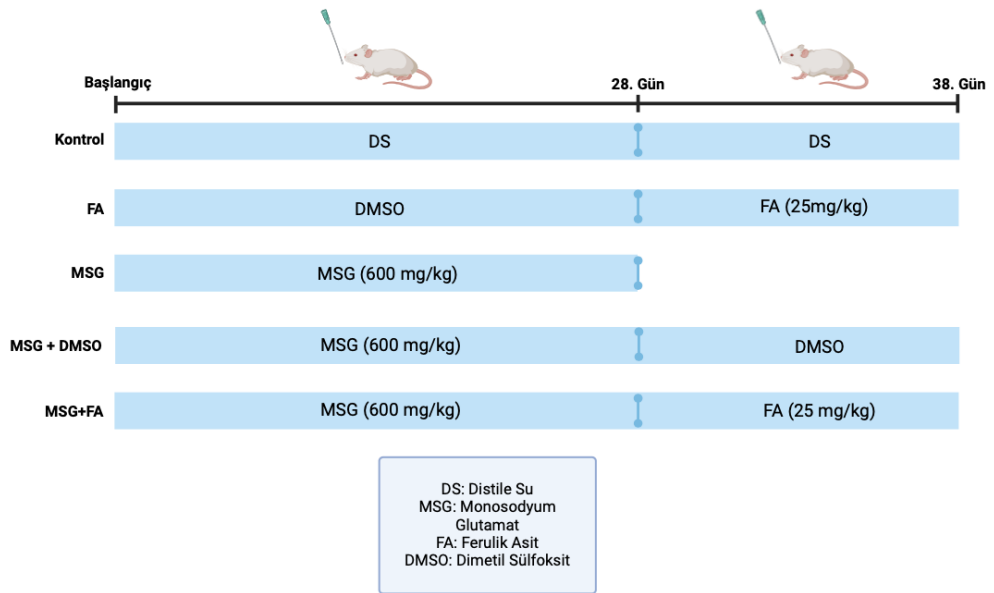
Kontrol grubu (K): Bu gruptaki sıçanlara (n=8) 38 gün boyunca günlük olarak 1 ml distile su gavaj yöntemi kullanılarak verildi.

Ferulik asit grubu (FA): Bu gruptaki sıçanlara (n=8) 28 gün boyunca 1 ml %80'lik DMSO gavaj yöntemi ile verildikten sonra, 10 gün boyunca %80'lik dimetil sülfoksit (DMSO) (Katolog No: WAK-DMSO-50, Wak-Chemie, Germany) içinde çözülmüş ferulik asit (Katalog No: 128708, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A) solüsyonu verildi (86).

Monosodyum glutamat grubu (MSG): Bu gruptaki sıçanlara (n=8) distile su ile hazırlanan 600 mg/kg dozunda MSG (Katolog No: G1626, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A) oral gavaj yöntemi ile 28 gün boyunca verildi (87).

Monosodyum glutamat ve dimetil sülfoksit grubu (MSG + DMSO): Bu gruptaki sıçanlara (n=8) 28 gün boyunca 600 mg/kg dozunda MSG gavaj yöntemi ile verilmesinden itibaren, 10 gün boyunca %80'lik DMSO yine gavaj yöntemi ile verildi (17).

Monosodyum glutamat ve ferulik asit grubu (MSG + FA): Bu gruptaki sıçanlara (n=8) 28 gün boyunca 600 mg/kg dozunda MSG gavaj ile uygulandıktan sonra, %80'lik DMSO ile hazırlanan 25 mg/kg ferulik asit (Katalog No: 128708, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A) solüsyonu 10 gün boyunca verildi (17,88).



Şekil 6. Deney modelinin şematik gösterimi.

3.2.2 Işık mikroskopik preparasyon

Diseksiyon sonrası sıçanlardan alınan testis dokusu histolojik incelemeler amacıyla %10'luk nötral tamponlu formalin (Katalog No: HT501128, Sigma Aldrich, Burlington, MA, U.S.A.) solüsyonu ile 72 saat fikse edildi. İmmünohistokimyasal incelemeler için ise %4'lük paraformaldehit (PFA) ile 72 saat boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonrasında dokular bir gece akar su altında bekletildi. Bunun ardından aşağıdaki tabloda belirtilen basamaklar esas alınarak doku takip işlemi gerçekleştirildi (Thermo Eprexia Citadel 2000, Massachusetts, U.S.A.) (Tablo 2).

Tablo 2. Testis doku takip basamakları.

Basamak	Süre
%70 etil alkol	1 saat
%80 etil alkol	1 saat
%90 etil alkol	1 saat
%96 etil alkol	1 saat
%100 etil alkol	1 saat
%100 etil alkol	1 saat
%100 etil alkol	1 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Parafin	12 saat
Parafin	3 saat

Testis dokuları, doku takibi sonrası parafine gömüldü (Thermo Histostar, Massachusetts, U.S.A.). Daha sonra, rotary mikrotom (Thermo- Shandon™ Finesse™ ME+, Massachusetts, U.S.A.) kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alınıp morfolojik değerlendirmelerde kullanılması amacıyla lamlara alındı. Kesitlere

hematoksilen-eozin boyaması yapıldı. Dokudaki ZO-1 ve AMH immünreaktivite seviyelerini belirlemek için gerekli immünohistokimyasal protokoller uygulandı.

3.2.3 Hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması

Hematoksilen ve eozin boyaması için 5 µm kalınlığında Apes (3-aminopropil trietoksisilan) kaplı lamlara alınan testis dokuları 37°C etüvde bekletildi. Ertesi gün, deparafinizasyon için kesitler ksilen içinde 30 dakika tutuldu. Daha sonra örnekler azalan alkol serisinden (%100, %90, %70) onar dakika tutularak geçirildi. Alkol serisi ardından örnekler distile suda birkaç kez çalkalandı. Ardından Mayer'in hematoksilen boyasında (Bio Optica, Milano, Italy) 6 dakika bekletildi. Bekletmenin ardından kesitler akarsu altında 10 dakika bırakıldı, akarsudan sonra birkaç kez distile suya daldırıp çıkarmanın ardından 2 dakika eosin solüsyonunda (Katalog No: HST-EOA-0500, Histoplus, İstanbul, Türkiye) bekletildi. Dokular sırasıyla artan alkol serilerinden geçirilip dokudaki suyun uzaklaşması sağlandıktan sonra ksilen serisinde tutulup entellan ile kapatıldı. Hazırlanan H&E boyalı örnekleri incelemek ve görüntülemek için ışık mikroskobu (Zeiss A1 Axio Scope, Germany) kullanıldı. Histopatolojik değerlendirme Modifiye Johnsen skorlaması kullanılarak yapıldı (89,90). Ayrıca, Image J (1.54 software, National Institutes of Health) analiz programı kullanılarak tüm deney gruplarına ait kesitlerdeki 100 seminifer tübülün epitel kalınlığı ölçüldü.

Tablo 3. Testis hasarını skorlamak için kullanılan Johnsen skor değerleri.

Johnsen Skoru	Açıklama
10	Tam spermatogenez var
9	Epitelde ve spermatogenezde hafif bozukluk ve birçok geç spermatid var
8	Tübül başına 5'ten az spermatazoa ve birkaç geç spermatid var
7	Spermatazoa ve geç spermatid yok, çokça erken spermatid var
6	Spermatazoa ve geç spermatid yok, azca erken spermatid var
5	Spermatazoa ve spermatid yok, çokça spermatosit var
4	Spermatazoa ve spermatid yok, birkaç spermatosit var
3	Sadece spermatogonyumlar var
2	Sadece Sertoli hücreleri var, germinal hücre yok
1	Seminifer tübül epiteli yok

3.2.4 Sperm morfolojisi

Diseksiyon sırasında alınan epididimisler bistüri yardımı ile parçalanarak PBS (pH 7.4) özeltisinde dilüe edilerek spermler lam üzerine yayma yöntemi kullanılarak alındı. Kesitler oda ısısında kurutulup metanol ile fikse edildi. Kesitlere daha sonra H&E boyaması uygulandı (91). Boyama sonrası kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskobu (Zeiss A1 Axio Scope, Germany) ile 40x ve 100x büyötmelerde fotoğraflandı.

3.2.5 ZO-1 immunfloresan boyaması

Pozitif yüklü lamlara alınan, 5 µm kalınlığında, %4 PFA ile fikse edilen parafin doku kesitleri immünfloresan uygulamalar için kullanıldı. Pozitif kontrol olarak deney gruplarının kontrol grubuna ait dokuların kesitleri kullanıldı. Ayrıca, tüm immünfloresan uygulamalarında negatif kontrol uygulandı. Bu amaçla sadece

kesitlere primer antikor yerine antikor dilüent solüsyonu damlatılarak immünfloresan boyama işlemi yapıldı. %4 PFA ile fikse edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler ksilen içerisinde deparafinizasyon amacıyla 40 dakika bekletildi. Daha sonra azalan alkol serisinden (%100, %96) geçirildi. Daha sonra kesitler Tris-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) solüsyonunda (pH 9, 1x) 20 dakika 100 Watt'da mikrodalga fırında ısıtıldı. Kesitlerin 20 dakika oda sıcaklığında bırakılıp soğuması sağlandıktan sonra 3 kez beşer dakika fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisinde yıkandı ve bloklama için 1 saat %5'lik keçi serumunda bekletildi. Primer antikor olarak kesitlere tavşan anti-ZO-1 (Katalog No: Pb9234, Boster, California, U.S.A) antikoru 1:50 dilüe edilerek uygulandı. Tüm kesitler +4°C'de bir gecelik inkübasyonda tutulduktan sonra, 3 kez beşer dakika PBS ile yıkandı. Sonrasında kesitler karanlıkta 1:500 dilüe floresan konjuge keçi anti-tavşan sekonder antikor (Katalog No: 35552, DyLight™ 488, Invitrogen, U.S.A) damlatılarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Tüm kesitler 3 kez beşer dakika PBS ile yıkandıktan sonra 4'-6-Diamino-2-fenilidol (DAPI) içeren kapatma solüsyonu (Katalog No: ab104139, Abcam, Cambridge, U.K.) damlatılarak lamel ile kapatıldı. Kesitler konfokal mikroskobu (Zeiss LSM 700, Oberkochen, Germany) ile incelenip fotoğraflandı. Fotoğraflardaki ışımaya yoğunluğu Image J (1.54 software, National Institutes of Health) programı kullanılarak hesaplandı (92).

3.2.6 AMH immünfloresan boyaması

Testis dokusundaki AMH lokalizasyonu belirlemek amacıyla kesitlere AMH immünhistokimyası uygulandı. Pozitif kontrol olarak deney gruplarının kontrol grubuna ait dokuların kesitleri kullanıldı. Ayrıca tüm immünfloresan uygulamalarında negatif kontrol uygulandı. Bu amaçla sadece kesitlere primer antikor yerine antikor dilüent solüsyonu damlatılarak immünfloresan boyama işlemi yapıldı. %4 PFA ile fikse edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler ksilen içerisinde deparafinizasyon amacıyla 40 dakika bekletildi. Daha sonra azalan alkol serisinden (%100, %96) geçirildi. Tris-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) solüsyonunda (pH 9, 1x) 20 dakika 100 Watt'da mikrodalga fırında ısıtıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında bırakılıp soğuması sağlandıktan sonra 3 kez beşer dakika PBS çözeltisinde yıkandı. Bloklama işlemi için örnekler 1 saat boyunca %5'lik keçi serumunda bekletildi. Kesitlere tavşan anti-AMH (Katalog No: 14461-1-AP, Proteintech, Illinois, U.S.A)

antikoru bloklama solüsyonu içinde 1:100 dilüe edilerek uygulandı. Tüm kesitler + 4°C'de bir gecelik inkübasyonda tutulduktan sonra, 3 kez beşer dakika PBS ile yıkandı. Sonrasında 1:500 dilüe floresan konjuge keçi anti-tavşan sekonder antikoru (Katalog No: 35552, DyLight™ 488, Invitrogen, U.S.A) kesitlere uygulanarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Tüm kesitler 3 kez beşer dakika PBS ile yıkandıktan sonra 4'6- Diamino-2-fenilidol (DAPI) içeren kapatma solüsyonu (Katalog No: ab104139, Abcam, Cambridge, U.K.) damlatılarak lamel ile kapatıldı. Kesitler konfokal mikroskobu (Zeiss LSM 700, Oberkochen, Germany) ile incelenip fotoğraflandı. Fotoğraflardaki ışımaya yoğunluğu Image J (1.54 software, National Institutes of Health) programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.7 Geçirimli elektron mikroskopik preparasyon

Geçirimli elektron mikroskopik analiz amacıyla alınan testis dokusu örnekleri %2,5'luk 0,1 M PBS tamponlu (pH 7,2) glutaraldehit fiksatif (Katalog No: G5257, Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.) içerisinde +4 °C'de 4 saat boyunca fikse edildi. Örnekler PBS ile 15 dakika boyunca yıkandıktan sonra %1'lik osmium tetroksit (Katalog No:19134, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, U.S.A.) ile 1 saat boyunca post-fikse edildi. Örnekler yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidre edildi ve propilen oksitten (Katalog No: 82320, Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.) geçirilerek Epon 812'ye (Katalog No:45345, Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.) gömüldü. Polimerizasyon işlemi için etüvde 60 °C'de 1 gün bırakıldıktan sonra oluşan epon bloklardan ultramikrotomda (Leica, EM UC7, Germany) yarı ince kesitler (1 µm) alınıp toluidin mavisi (Katalog No: 198161, Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.) ile boyanarak dokunun neresinde bulunduğu belirlendi. Ultra ince kesitler 60 nm kalınlığında alınıp bakır gridler üzerinde uranyless (Katalog No:22409, EMS, Hatfield, PA, U.S.A.) ile kontrastlandı. Örnekler geçirimli elektron mikroskopunda (Thermo Fischer Scientific Talos L 120C, The Netherlands) incelenerek fotoğraflandı.

3.2.8 Biyokimyasal analizler

3.2.8.1 Doku malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) seviye ölçümleri

Oksidan hasarın bir göstergesi olan MDA düzeyini ölçmek için doku örnekleri ağırlıklarının 10 katına denk gelen miktarda %10'luk triklorik asit (TCA) solüsyonu ile karıştırılarak, homojenizasyonu takiben 3000 rpm, 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılıp 10000 rpm'de 8 dakika daha santrifüj edildi ve $1.56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak lipid peroksidasyon düzeyi MDA cinsinden spektrofotometrik ölçümle belirlendi. Tüm ölçümler gram doku başına nanomol (nmol/g) olarak ifade edildi (93).

Endojen antioksidan GSH düzeyini ölçmek için doku örnekleri ağırlıklarının 10 katı kadar %10'luk TCA eklenerek her bir tüp 30 saniye boyunca homojenize edildikten sonra 3.000 rpm, 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantların içinden 2 ml alınıp plastik tüplere konularak tekrardan 9000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Her biri 250 µl olacak şekilde doku homojenizatları uzun cam tüplere konularak üzerlerine 1000 µl Na_2HPO_4 ve 125 µl 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) (40 mg DTNB + %1 sodyum sitrat) eklendi. Ardından tüpler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda folyo ile sarılmış şekilde bekletildi. Oluşan rengin ışık şiddeti değişimi spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu. GSH miktarı spektrofotometrik olarak absorbans 412 nm'de ölçülerek belirlendi. Elde edilen GSH miktarı µmol/g doku olarak ifade edildi (93).

3.2.8.2 Doku süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

Süperoksit dismutaz (SOD), hücresel enerji üretimi sırasında üretilen zararlı serbest radikallerin nötralize edilmesinde kritik bir rol oynar. Bu enzim, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene parçalanmasını veya dismutasyonunu hızlandırmaktadır. Doku örnekleri 1/9 oranında (0,1 gr doku: 0,9ml 140 mmol. lık KCl) Potasyum klorür tamponu ile homojenize edildikten sonra 7000 rpm +4°C de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj ardından SOD seviyesi ticari kit (Relassay, Türkiye) kullanılarak otoanalizör (Mindray-BS400) yardımı ile kolorimetrik yöntemle ölçüldü. Değerler U/ml cinsinden ifade edildi.

Bu testte, süperoksit radikalleri üretmek için ksantin ve ksantin oksidaz kullanıldı. Bu radikaller daha sonra spesifik bir boya olan 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenyltetrazolium klorid ile reaksiyona girerek kırmızıya dönüşmesine sebep olurlar. SOD aktivitesinin derecesi, bu renk değişimini engelleme kabiliyeti ile doğru orantılıdır (94).

3.2.8.3 Doku total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) ölçümleri

TAS seviyesi ticari olarak satın alınan ELISA kiti (Katalog No: RL0017, Relassay, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Bütün örnekler için eşit miktarda doku kullanıldı. 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit radikal katyonu (ABTS) kullanıldı. Konsantrasyonlarına ve antioksidan kapasitelerine göre antioksidanlar ABTS'yi renksizleştirir ve bu değişim 660 nm'de spektrofotometrede absorbans değişimi olarak ölçüldü. Test, geleneksel olarak bir E vitamini analogu olan Trolox eşdeğeri olarak adlandırılan kararlı bir antioksidan standart çözeltisi ile kalibre edildi. (95).

TOS seviyesi ticari olarak satın alınan ELISA kiti (Katalog No: RL0024, Relassay, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Bütün örnekler için eşit miktarda doku kullanıldı. Test, asiditesi yüksek ortamda ve çeşitli oksidan türleri olduğunda demir iyonunun ferrik iyon oksidasyonuna ve ferrik iyonun ksilenol turuncu (o-kresosülfonftalein-3,3-bis(sodyum metiliminodiasetat)) ile ölçülmesine dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, doku örneğinde bulunan toplam oksidan molekül seviyesine bağlıdır. Test hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$) cinsinden ifade edildi. (96).

3.2.8.4 Oksidatif stres indeksi (OSİ)

Total oksidan seviye (TOS) düzeylerinin total antioksidan seviye (TAS) düzeylerine oranının yüzde derecesi, oksidatif stres indeksi (OSİ) olarak hesaplanmakta ve oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Birim olarak Arbitrary Units (AU) ile ifade edildi.

3.2.9 İstatistiksel analiz

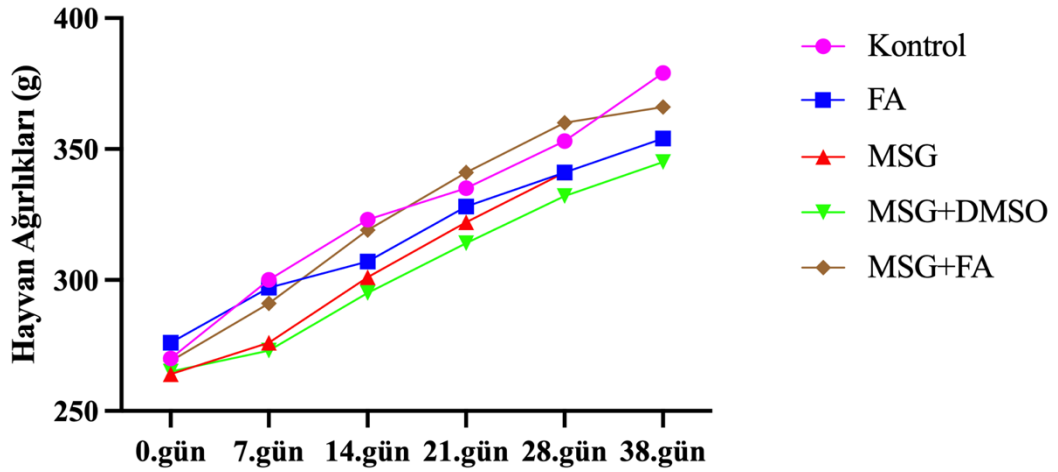
İstatistiksel analizler Graph-Pad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programıyla yapıldı. Veri analizlerinde one-way ANOVA yöntemi ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı, $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4 BULGULAR

4.1 Vücut Ağırlığı

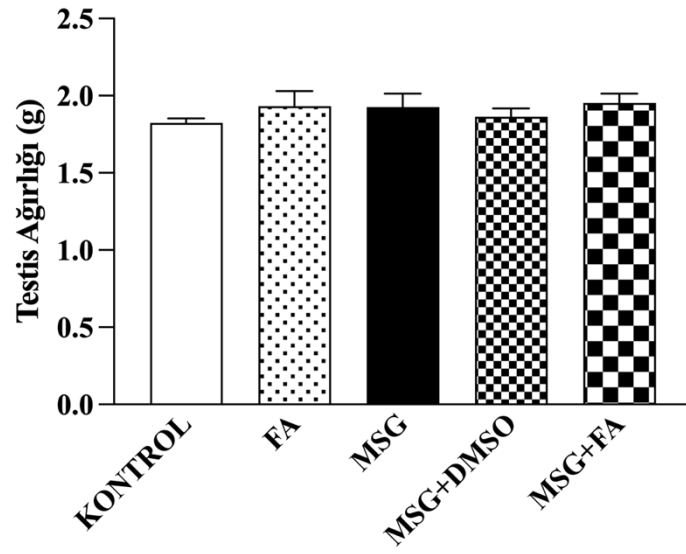
Tüm sıçanların vücut ağırlığı günlük olarak tartıldı. Kontrol grubundaki sıçanların ortalama ağırlığı $327,3 \pm 14,9$ g olarak belirlenirken sıçan ağırlıkları FA grubunda $317,2 \pm 11,9$ g, MSG grubunda $297,4 \pm 16,6$ g, MSG+DMSO grubunda $300 \pm 15,7$ g, MSG+FA grubunda ise $321,7 \pm 17,7$ g olduğu görüldü. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında, sıçan ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 7).



Şekil 7. Deney gruplarındaki sıçanların haftalık vücut ağırlıkları.

4.2 Testis Ağırlığı

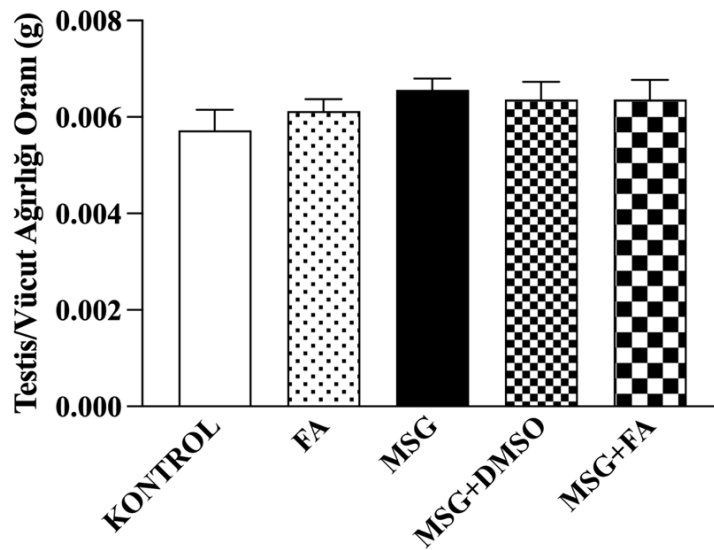
Testis ağırlıkları; Kontrol grubunda $1,4 \pm 0,02$ g, FA grubunda $1,93 \pm 0,09$ g, MSG grubunda $1,92 \pm 0,08$ g, MSG+DMSO grubunda $1,86 \pm 0,05$ g, MSG+FA grubunda ise $1,95 \pm 0,05$ g olarak belirlendi. Testis ağırlıkları deney grupları arasında karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 8).



Şekil 8. Deney gruplarındaki sıçanların testis ağırlıkları.

4.3 Testis/Vücut Ağırlığı Oranı

Deney gruplarının testis ağırlıkları vücut ağırlıklarına oranlandığında, kontrol grubunda $0,0057 \pm 0,0004$ g, FA grubunda $0,0061 \pm 0,0002$ g, MSG grubunda $0,0065 \pm 0,0002$ g, MSG+DMSO grubunda $0,0063 \pm 0,0003$ g, MSG+FA grubunda ise $0,0063 \pm 0,0004$ g olduğu görüldü. Oranlar gruplar arası karşılaştırıldığında ise MSG grubunun testis/vücut ağırlığı oranının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmekle beraber bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 9).



Şekil 9. Testis ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı.

4.4 Morfolojik Bulgular

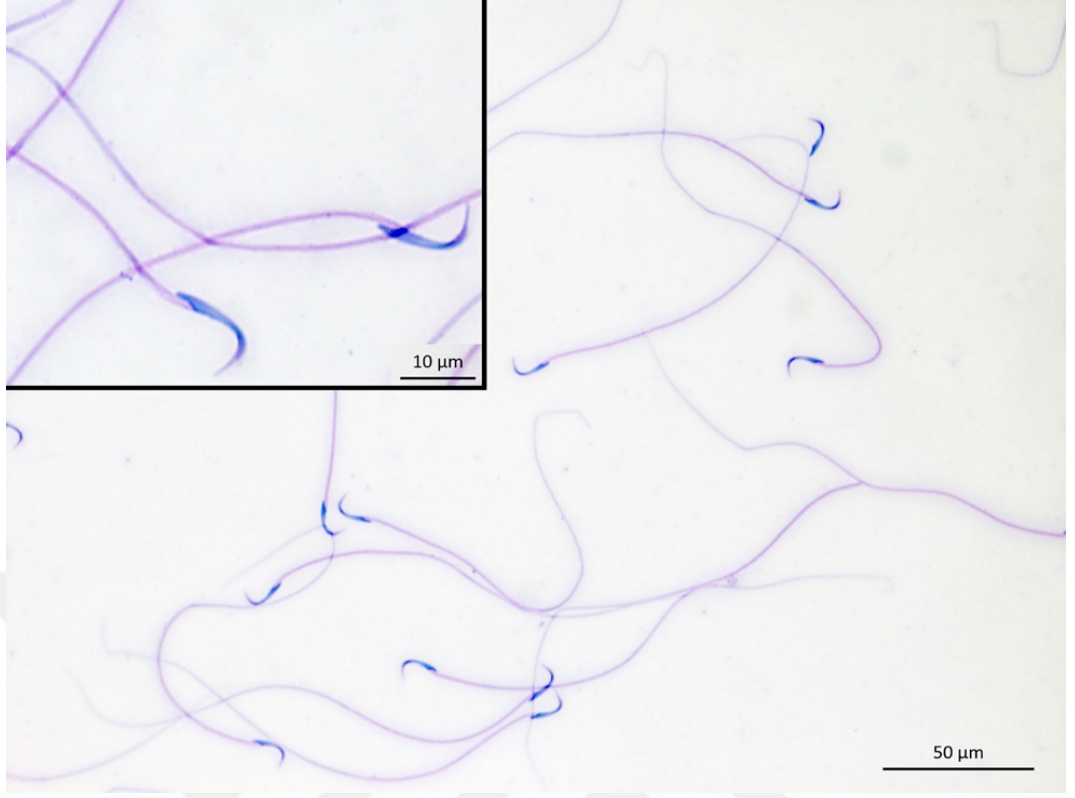
Sperm morfolojileri ışık mikroskopik düzeyde incelendi. Kontrol grubu ve FA grubunda normal morfolojide bulunan çok sayıda sperm gözlemlendi (Resim 1, Resim 2). MSG grubunda ise normal morfolojiye sahip sperm daha az sayıda gözlemlenirken baş, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip çok sayıda sperm görüldü (Resim 3). MSG+DMSO grubunda MSG grubu ile benzer şekilde baş, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip çokça spermelere rastlandı (Resim 4). MSG+FA grubunda normal morfolojiye sahip spermelerin yanı sıra, baş ve kuyruk anomalileri bulunan spermelere daha az rastlandı (Resim 5).

Testis dokusu morfolojisi ışık mikroskopik düzeyde incelendiğinde kontrol grubunda normal morfolojide bağ dokusu ve Leydig hücrelerine rastlandı. Seminifer epitelde farklı gelişim aşamalarındaki spermatogenik hücrelere ve seminifer tübül lümenlerinde spermatozoonlara rastlandı (Resim 6). FA grubunun testis morfolojisi kontrol grubu ile benzer olduğu görüldü (Resim 7). MSG grubunda ise dejeneratif tübüllerde artış, bazı seminifer tübüllerin bazal kompartmanında vakuolizasyon, bazal membranlarda düzensizlik, tübül epitelinde yer yer dejenerasyon ve lümende çokça döküntü hücreleri görüldü (Resim 8). MSG+DMSO grubunda ise MSG grubu ile benzer sonuçlara rastlandı (Resim 9). MSG+FA grubunda genel olarak normal morfoloji izlenmesine karşın, bazı tübüllerde germinal epitelde düzensizliklere ve lümende döküntü hücrelerine rastlandı. Seminifer tübüllerin lümenlerinde çok sayıda spermatozoon gözlemlendi. Az sayıda seminifer tübülün bazal membranlarında yer yer vakuolizasyon gözlemlendi (Resim 10).



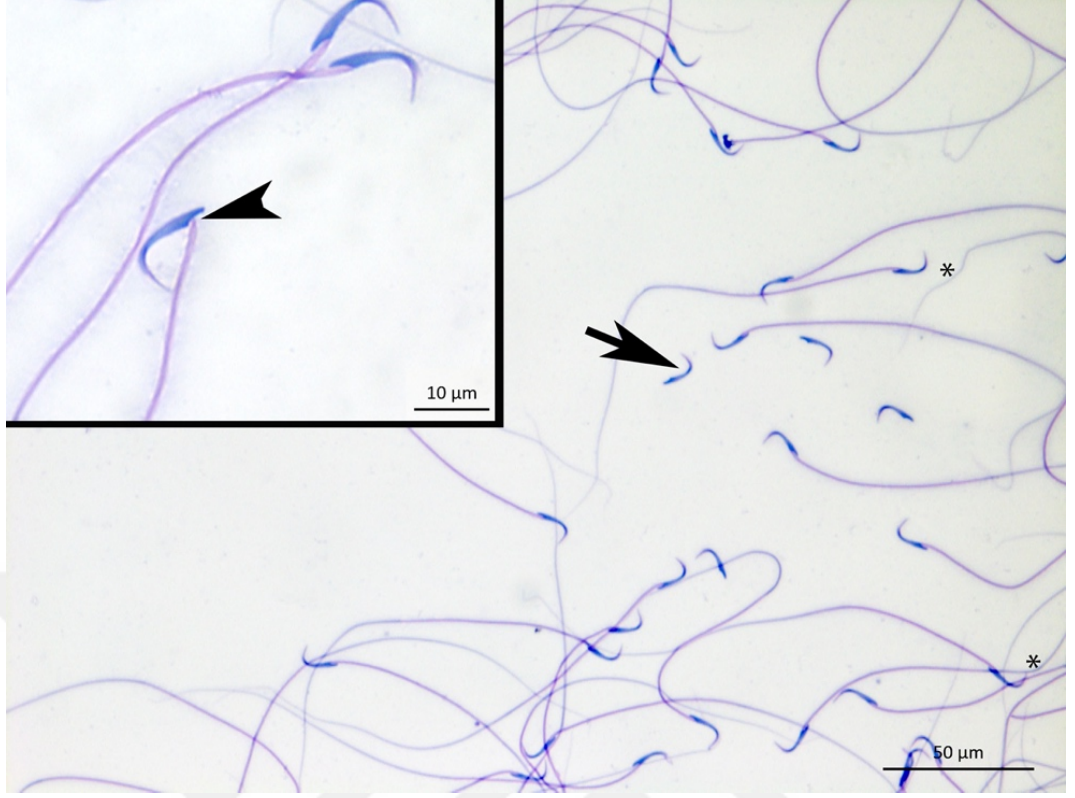
Resim 1. Kontrol grubuna ait ışık mikrofrafı.

Kontrol grubunda normal sperm morfolojisi izlendi (40x). İncet: Normal morfolojide spermier (100x). H&E boyaması.



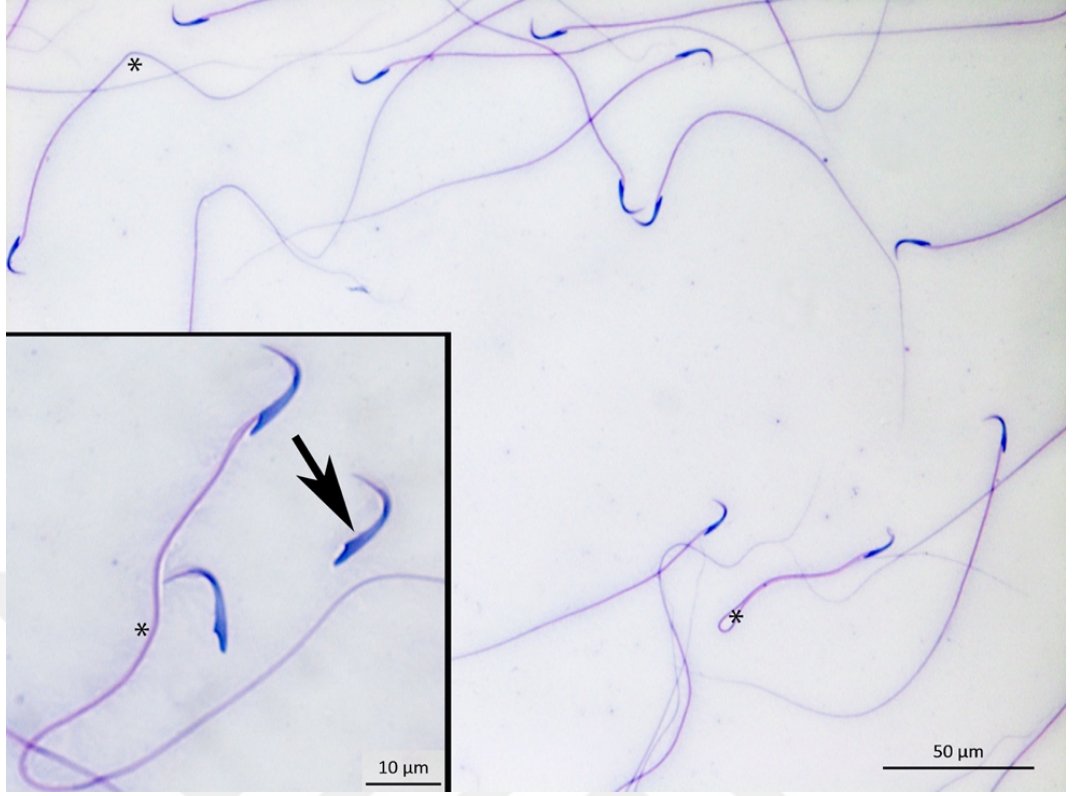
Resim 2. FA grubuna ait ışık mikrosafı.

FA grubunda normal morfolojide spermier izlendi (40x). İnet: Normal morfolojiye sahip spermier (100x). H&E boyaması.



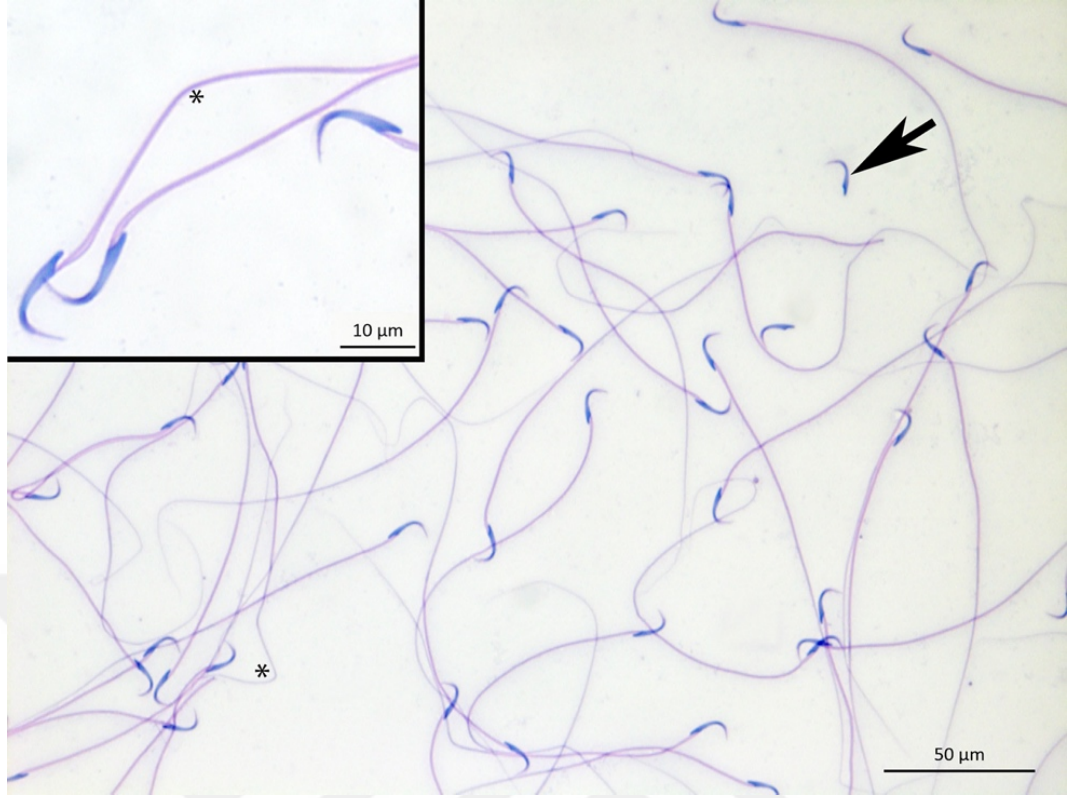
Resim 3. MSG grubuna ait ışık mikrosafı.

MSG grubunda bozuk morfolojide çok sayıda sperm gözlendi. Kuyruk anomalisi, sadece sperm başı (siyah ok) ve kuyruk morfolojisinde dejenerasyonlar (*) (40x). İncet: Normal morfolojiye sahip spermilerin yanı sıra boyun anomalisi (siyah ok başı) (100x). H&E boyaması.



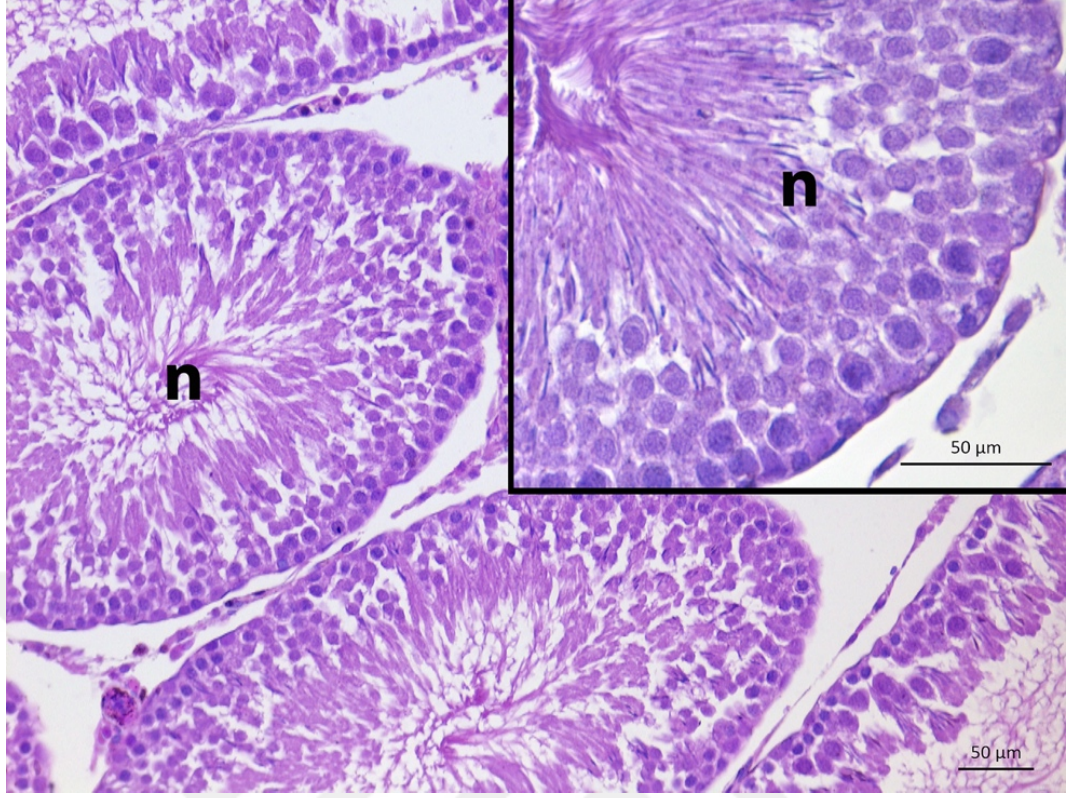
Resim 4. MSG+DMSO grubuna ait ışık mikrosafı.

MSG+DMSO grubunda çok sayıda spermde morfolojik hasar izlendi (40x). İnet: Spermelerde kuyruk anomalisi, sadece sperm başı (siyah ok) ve kuyruk morfolojisinde dejenerasyonlar (*) (100x). H&E boyaması.



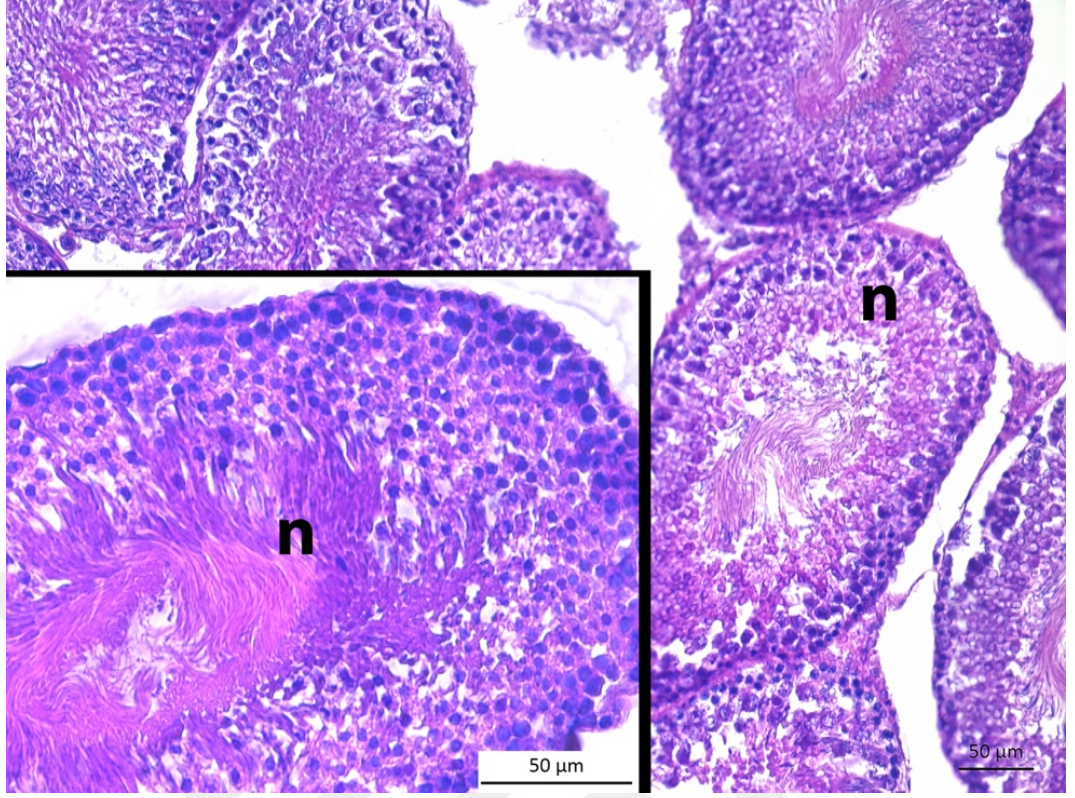
Resim 5. MSG+FA grubuna ait ışık mikrosafı.

MSG+FA grubunda normal morfolojiye sahip spermere daha sık izlendi. Normal morfolojiye sahip spermelerin yanı sıra kuyruk anomalisine sahip spermere de rastlandı (40x). Kuyruk anomali, sadece sperm başı (siyah ok), kuyruk morfolojisinde dejenerasyonlar (*) İnsert: Çok sayıda normal morfolojiye sahip sperm yanında yer yer kuyruk anomali (*) (100x). H&E boyaması.



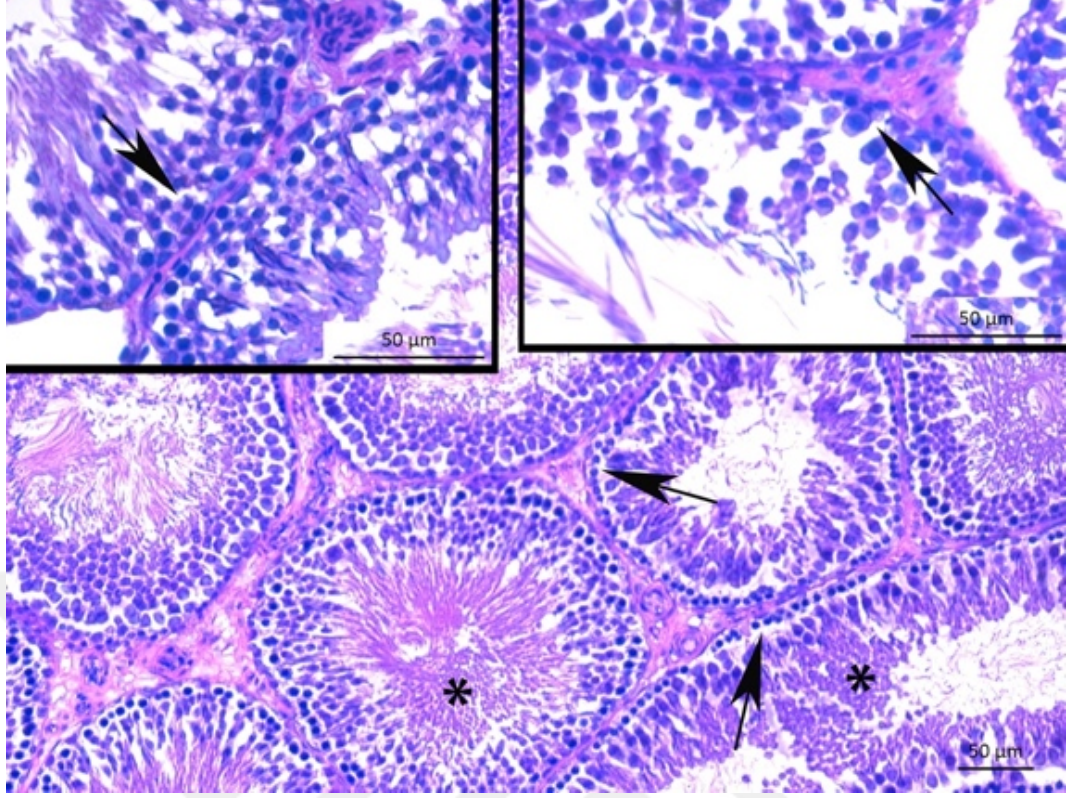
Resim 6. Kontrol grubuna ait ışık mikrografı.

Kontrol grubunda normal morfolojide (n) seminifer tübüller izlendi (20x). İncet: Normal morfolojide seminifer tübül epiteli (40x). H&E boyaması.



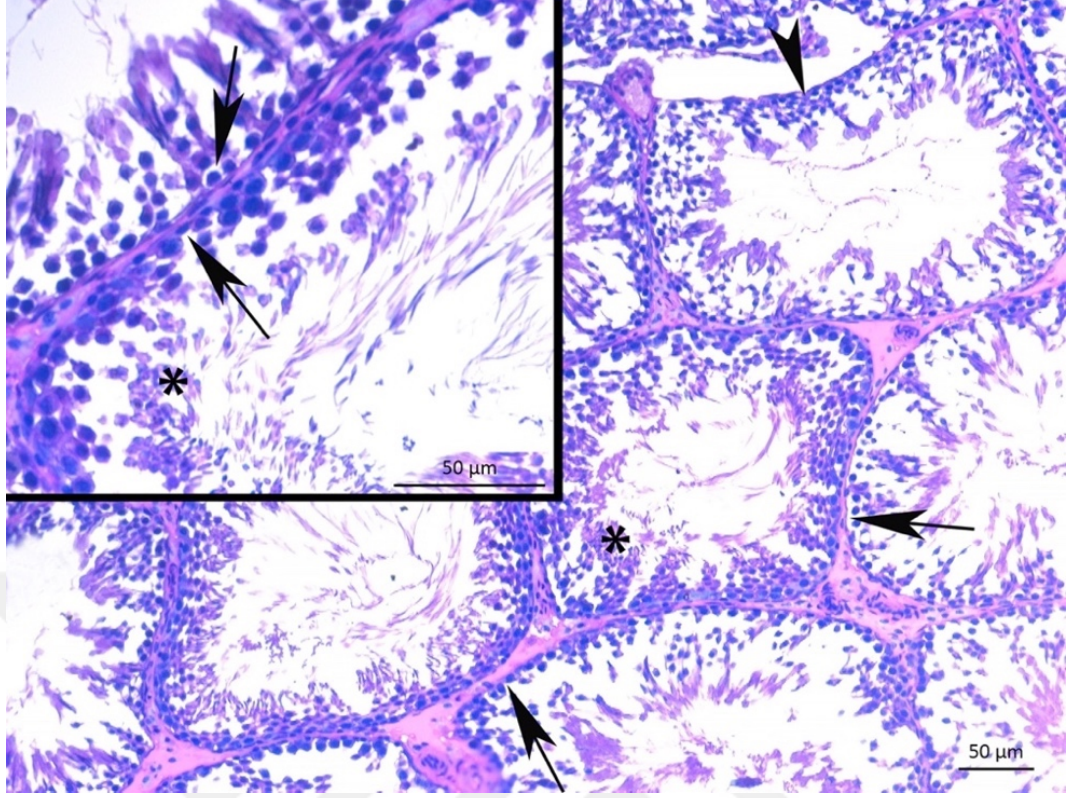
Resim 7. FA grubuna ait ışık mikrosafı.

FA grubunda kontrol grubu ile benzer morfolojide seminifer tübüller izlendi (20x).
 nset: Normal morfolojideki (n) seminifer tübül (40x). H&E boyaması.



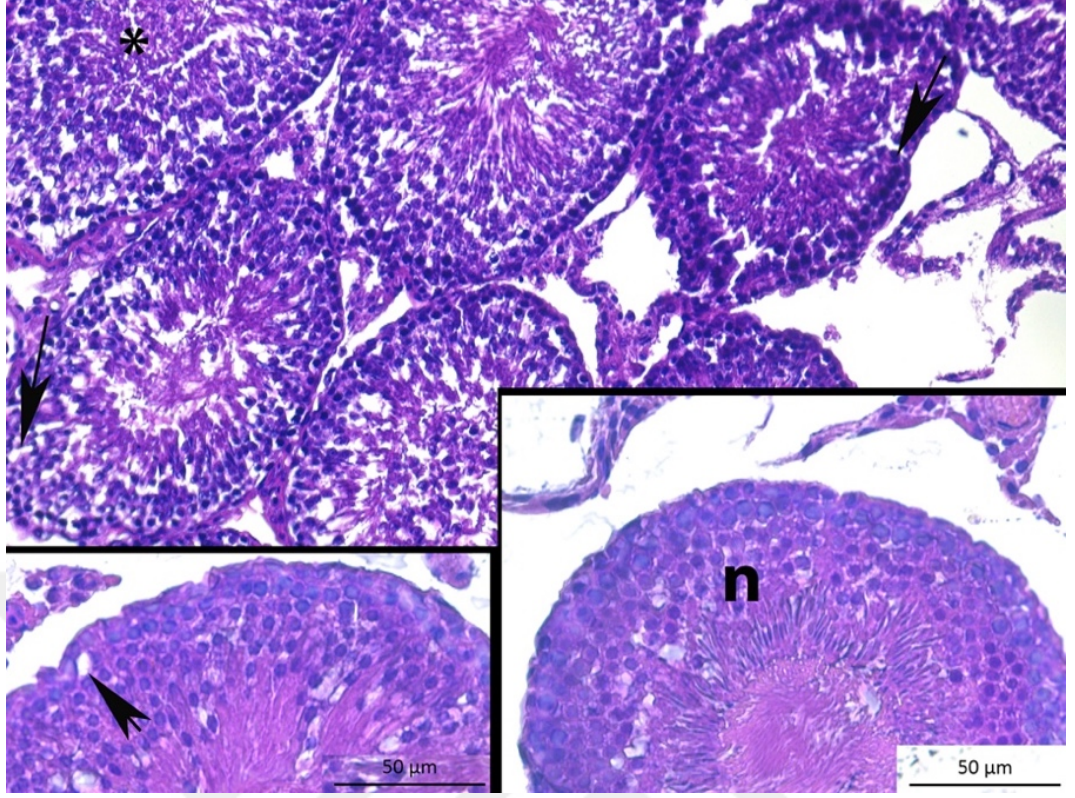
Resim 8. MSG grubuna ait ışık mikrofrafı.

MSG grubunda seminifer tübüllerin basal kompartmanında spermatogenik epitelden yer yer ayrılmalar (siyah ok) ve dejenere olmuş seminifer tübüllerin lümeninde az sayıda spermatozoon görüldü. Ayrıca seminifer tübül lümenlerinde çok sayıda döküntü hücreleri (*) izlendi (20x). İnset: Seminifer tübül epitelinde yer yer dejenerasyon (siyah ok) (40x). H&E boyaması.



Resim 9. MSG+DMSO grubuna ait ışık mikrosafı.

MSG+DMSO grubu MSG grubu ile benzer morfolojide izlendi. Seminifer túbül lúmenlerinde yer yer döküntü hücreleri (*) izlenirken bazı túbüllerin túbül morfolojisinde bozulma (ok başı), ve túbül epiteline yer yer dejenerasyon gözlendi (ok) (20x). İnsset: Seminifer túbül epiteline yer yer dejenerasyon (ok) ve túbül lúmenlerinde döküntü hücreleri (*) (100x). H&E boyaması.

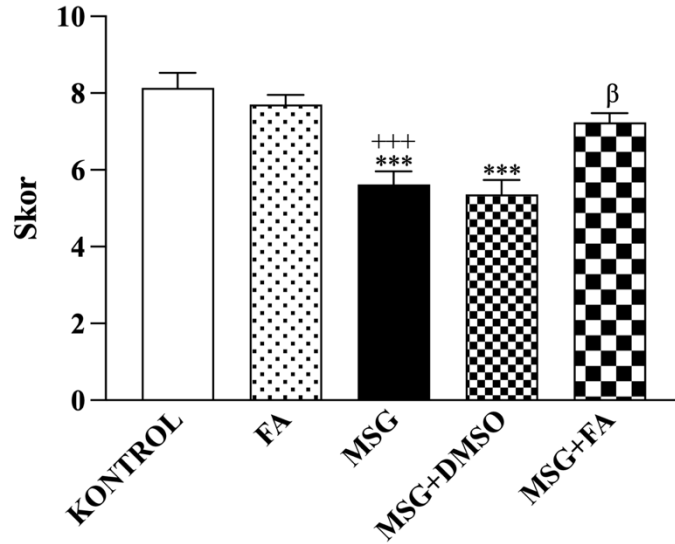


Resim 10. MSG+FA grubuna ait ışık mikrofrafı.

MSG+FA grubunda çok sayıda normal morfolojide tübül (n) izlendi. Bazı tübül epitellerinde yer yer dejenerasyonlar (siyah ok) gözlendi (20x). İnet: Germinal epitelde yer yer vakuol oluşumları (ok başı) izlenirken, çok sayıda normal (n) morfolojide tübüller (40x). H&E boyaması.

4.5 Seminifer Tübüllerin Histopatolojik Değerlendirmesi

Modifiye edilmiş Johnsen'in histopatolojik skorlama kriterlerine göre değerlendirilen tübüllerin skor değerleri; Kontrol grubunda $8,1 \pm 0,3$, FA grubunda $7,7 \pm 0,2$, MSG grubunda $5,6 \pm 0,3$, MSG+DMSO grubunda $5,3 \pm 0,3$, MSG+FA grubunda $7,2 \pm 0,2$ olarak belirlendi. Kontrol grubu ve FA grubu ile karşılaştırılan MSG grubunda (sırası ile, $***p<0,001$, $+++p<0,001$) histopatolojik skorda anlamlı derecede düşüş belirlendi. MSG+DMSO grubu, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında skor değerinin yine anlamlı derecede ($***p<0,001$) azaldığı görüldü. Tedavi grubu olan MSG+FA grubu, MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise, skor değerinin histopatolojik olarak anlamlı derecede ($\beta p<0,05$) arttığı belirlendi (Şekil 10).



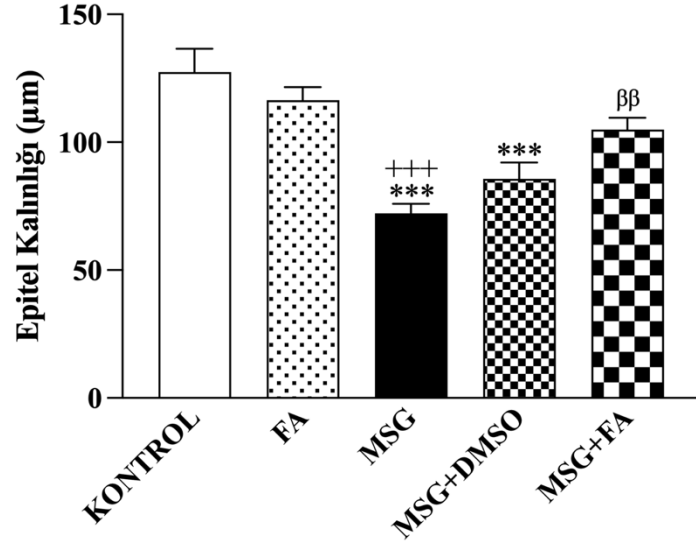
Şekil 10. Seminifer tübüllerin histopatolojik skor grafiği.

$***p<0,001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $+++p<0,001$ FA grubu ile karşılaştırıldığında. $\beta p<0,05$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

4.6 Seminifer Tübüllerin Epitel Kalınlıkları

Seminifer tübüllerin epitel kalınlıkları ölçülerek deney grupları arasında karşılaştırıldı. Kontrol grubunda $127,5 \pm 9,6 \mu\text{m}$ FA grubunda $116,4 \pm 5,1 \mu\text{m}$, MSG grubunda $72,2 \pm 8,1 \mu\text{m}$, MSG+DMSO grubunda $85,6 \pm 6,3 \mu\text{m}$, MSG+FA grubunda $104,9 \pm 10,3 \mu\text{m}$ olarak belirlendi. MSG ve MSG+DMSO gruplarının epitel kalınlığı, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede

(^{***}p<0,001) düşüş olduğu görüldü. Benzer şekilde MSG grubu FA grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede (⁺⁺⁺p<0,001) düşüşe rastlandı. MSG+FA grubu, MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise epitel kalınlığında anlamlı derecede (^{ββ}p<0,01) artış görüldü (Şekil 11).

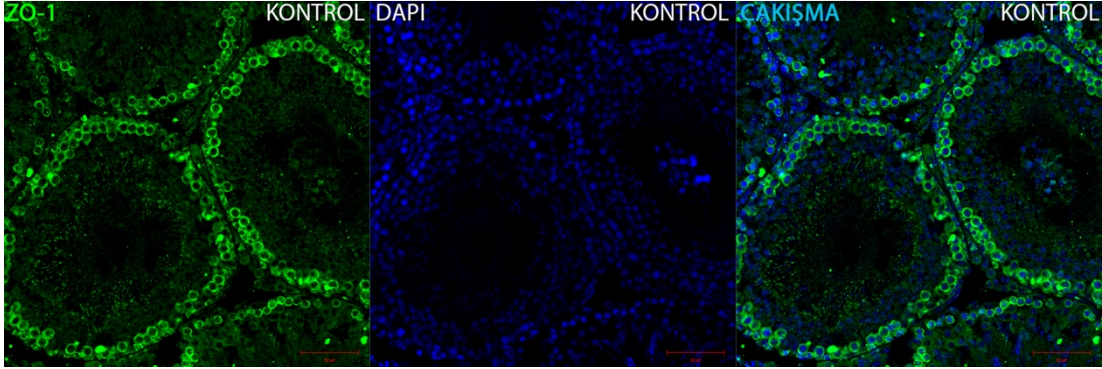


Şekil 11. Seminifer tübüllerin epitel kalınlıklarının karşılaştırılması.

^{***}p<0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. ⁺⁺⁺p<0,001 FA grubu ile karşılaştırıldığında. ^{ββ}p<0,01 MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

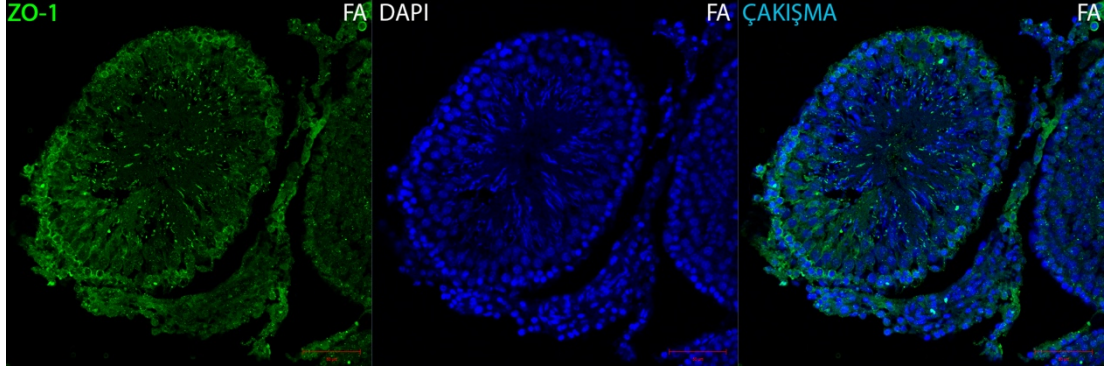
4.7 ZO-1 İmmünfloresan Bulguları

ZO-1 immünfloresan uygulamasının ardından seminifer tübül germinal epitelinde yer alan komşu Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantıları arasında ZO-1 immün pozitif bölgeler yeşil renkte izlendi. ZO-1 immünreaktivite yoğunluğu, kontrol grubunda (Resim 11) ve FA grubunda (Resim 12) yüksek iken, MSG grubunda immünreaktivite yoğunluğunda ve dağılımında azalma gözlemlendi (Resim 13). MSG+DMSO grubunda ise MSG grubu ile benzer sonuçlar görüldü (Resim 14). MSG+FA grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise ZO-1 immünreaktivitesinde artış gözlemlendi (Resim 15). Negatif kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılmasına ait fotomikrograflarda ZO-1 immünreaktivite sonuçları izlendi (Resim 16).



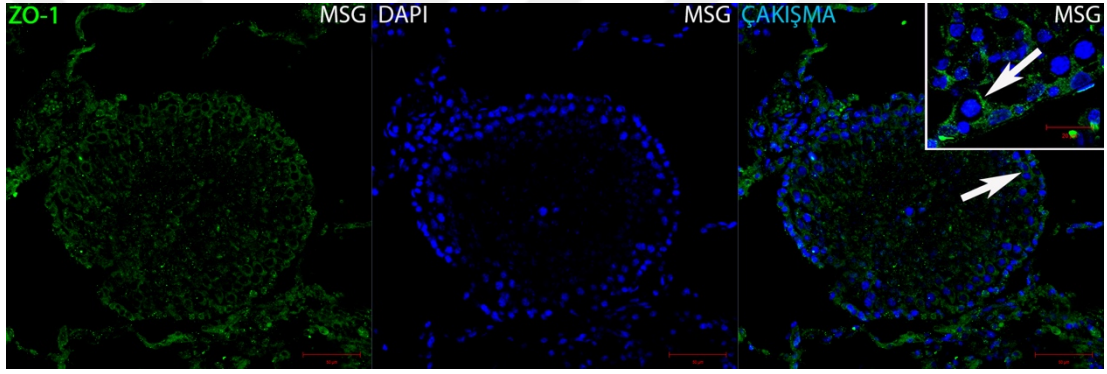
Resim 11. Kontrol grubuna ait ZO-1 immünfloresan boyaması.

Kontrol grubu germinal epitelinde çok sayıda ZO-1 pozitif hücre (parlak yeşil). DAPI (mavi) ile boyanmış nükleuslar. İki boyamanın çakışmış görüntüsü (20x).



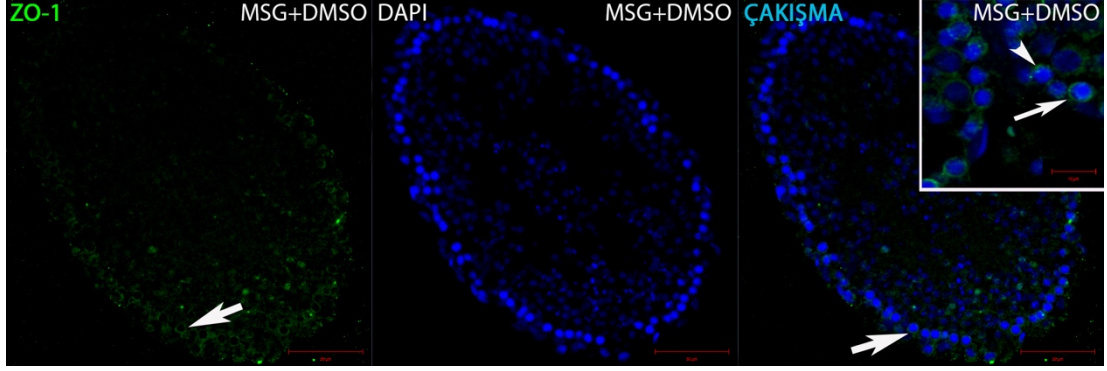
Resim 12. FA grubuna ait ZO-1 immü floresan boyaması.

FA grubu tübül epitelinde çok sayıda ZO-1 pozitif hücreler (parlak yeşil). DAPI (mavi) ile boyanmış nükleuslar. İki boyamanın çakışmış görüntüsü (20x).



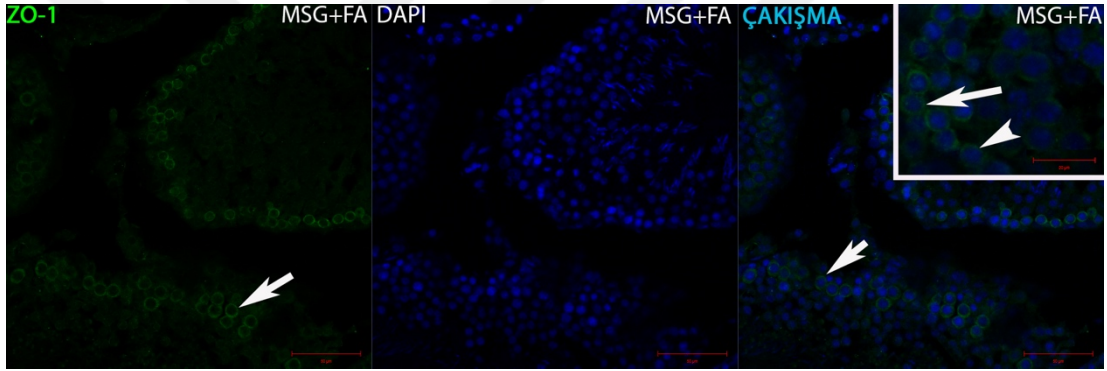
Resim 13. MSG grubuna ait ZO-1 immü floresan boyaması.

MSG grubu seminifer tübül epitelindeki daha az sayıda ZO-1 pozitif hücre (parlak yeşil). DAPI (mavi) ile boyanmış nükleuslar. İki boyamanın çakışmış görüntüsü (20x). İncelet: ZO-1 pozitif hücreler (ok), (40x).



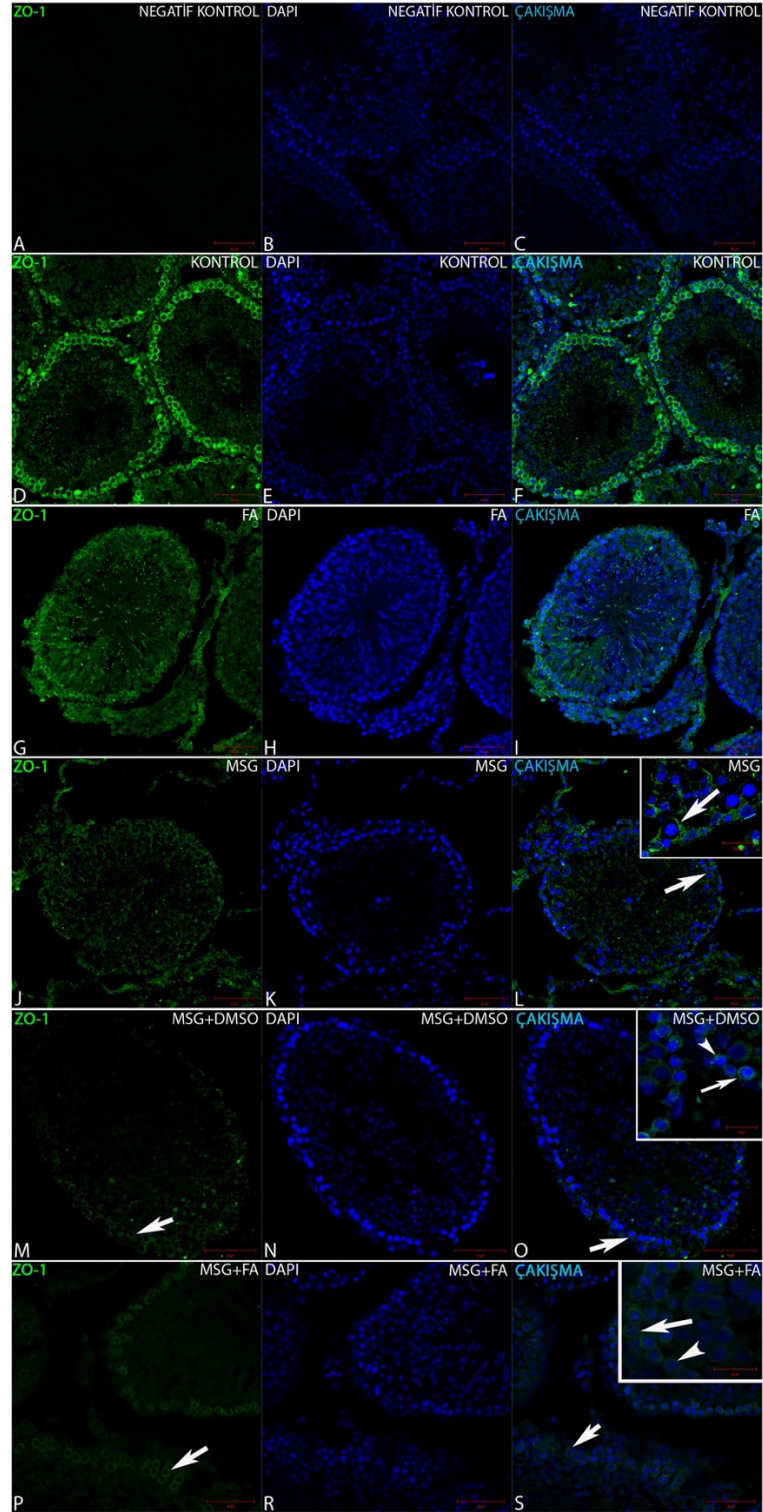
Resim 14. MSG+DMSO grubuna ait ZO-1 immünfloresan boyaması.

MSG+DMSO grubu tübül epitelinde az sayıda ZO-1 pozitif hücre (parlak yeşil). DAPI (mavi) ile boyanmış nükleusları. İki boyamanın çakışmış görüntüsü (20x). İnset: ZO-1 pozitif hücreler (ok) ve ZO-1 pozitivitesi düşük hücreler (ok başı), (40x).



Resim 15. MSG+FA grubuna ait ZO-1 immünfloresan boyaması.

MSG+FA grubu tübül epitelinde ZO-1 pozitif hücreler (parlak yeşil, ok). DAPI (mavi) ile boyanmış nükleuslar. İki boyamanın çakışmış görüntüsü (20x). İnset: Seminifer tübül epitelinde ZO-1 pozitif hücreler (ok) ve ZO-1 immünreaktivitesi az olan hücreler (ok başı), (40x).

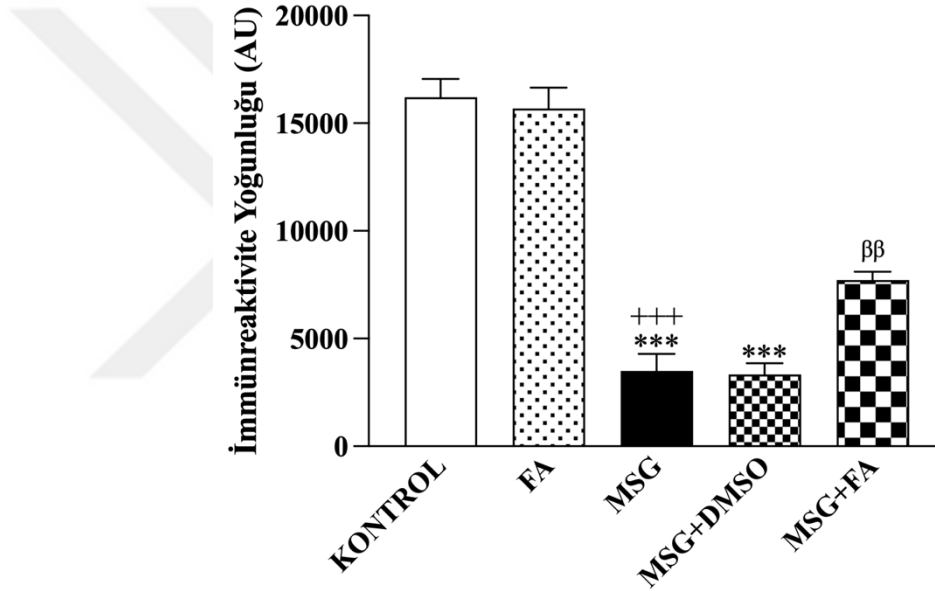


Resim 16. Negatif kontrol ve deney gruplarına ait fotomikrograflarda ZO-1 immünreaktivitesi.

Negatif Kontrol (A-C), Kontrol (D-F), FA (G-I), MSG (J-L), MSG+DMSO (M-O), MSG+FA (P-S) gruplarının ZO-1, DAPI ve iki görüntünün çakışması (A-S). ZO-1 pozitivitesi (beyaz ok). ZO-1 pozitivitesinde azalma (ok başı).

4.8 ZO-1 İmmünreaktivite Analizi

ZO-1 immünreaktivite yoğunluğu analizi yapıldığında değerler Kontrol grubunda $16,202 \pm 853$ AU, FA grubunda $15,681 \pm 978$ AU, MSG grubunda $3,494 \pm 799$ AU, MSG+DMSO grubunda $3,330 \pm 533$ AU, MSG+FA grubunda $7,715 \pm 394$ AU olarak ölçüldü. Kontrol grubu ve FA grubu ile karşılaştırıldığında immünreaktivitede MSG grubunda anlamlı bir düşüş (sırasıyla $***p<0,001$, $+++p<0,001$) olduğu belirlendi. MSG+FA grubu, MSG grubu ile karşılaştırıldığında ($\beta\beta p<0,01$) immünreaktivite yoğunluğunda anlamlı derecede artış olduğu ölçüldü (Şekil 12).

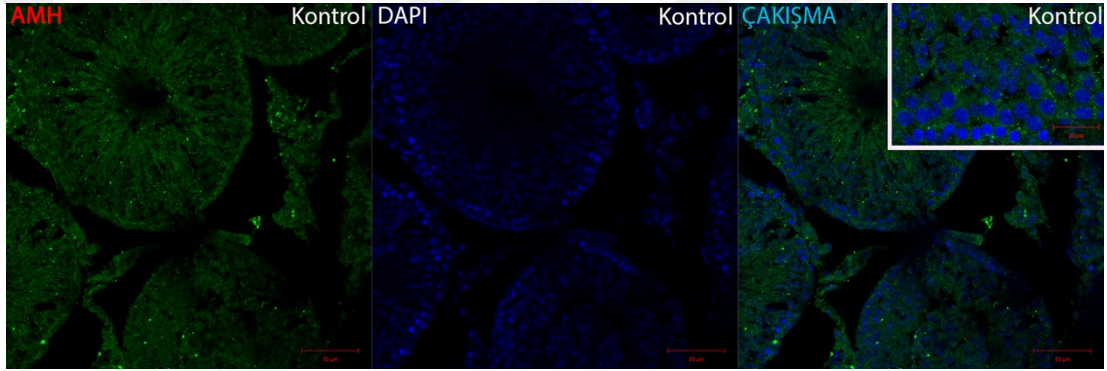


Şekil 12. ZO-1 immünreaktivite yoğunluğu grafiği.

$***p<0,001$ Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $+++p<0,001$ FA grubu ile karşılaştırıldığında. $\beta\beta p<0,01$ MSG grubu ile karşılaştırıldığında.

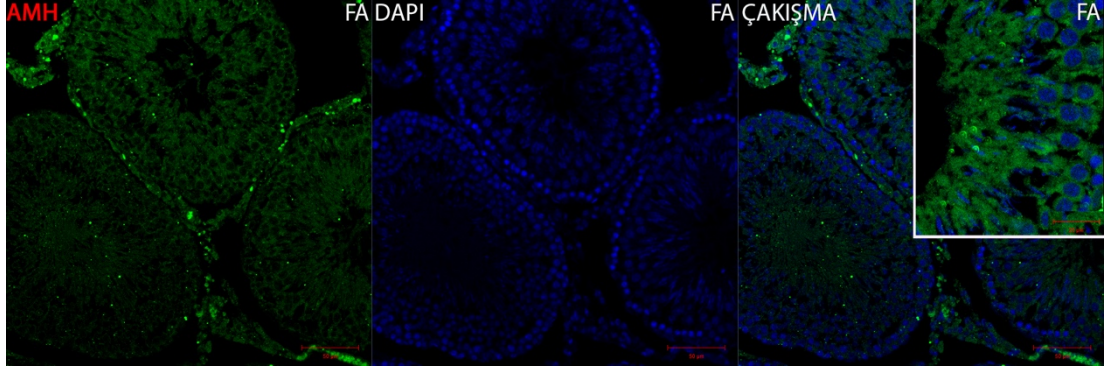
4.9 AMH İmmünfloresan Bulguları

AMH immünfloresan yoğunluğu analizi yapıldığında immünreaktivite dağılımının Kontrol grubunda (Resim 17) ve FA grubunda (Resim 18) benzer seviyelerde olduğu görüldü. MSG grubunda ise immünreaktivite dağılımında düşüş izlendi (Resim 19). MSG+DMSO grubunda da MSG grubu ile benzerlik görüldü (Resim 20). MSG+FA grubu MSG grubu ile karşılaştırıldığında ise AMH dağılımında artış gözlemlendi (Resim 21). Negatif kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılmasına ait fotomikrograflarda AMH immünreaktivite sonuçları izlendi (Resim 22). Ancak bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı değerlendirildi.



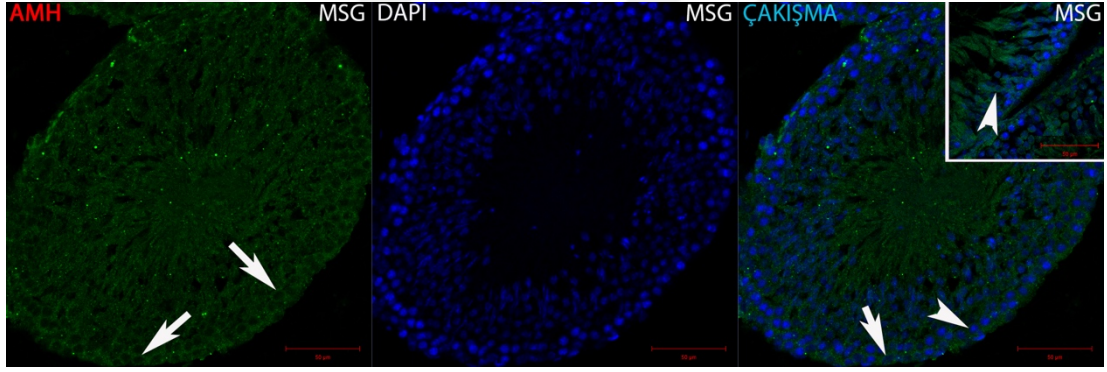
Resim 17. Kontrol grubuna ait AMH immünfloresan boyaması.

Kontrol grubunun seminifer tübül epitelinde AMH pozitif hücreler (yeşil). DAPI (mavi) ile boyanmış hücreler. İki boyamanın çakışmış görüntüsü (20x). İncelet: AMH pozitif hücreler (40x).



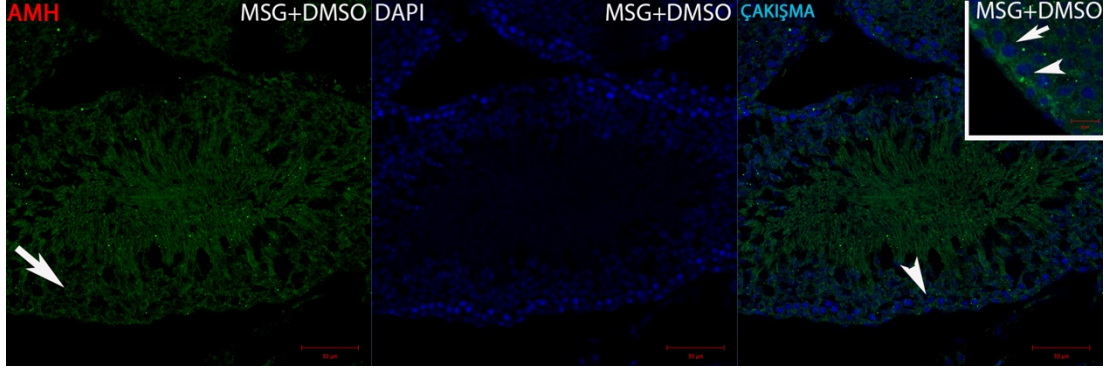
Resim 18. FA grubuna ait AMH immü floresan boyaması.

FA grubu tübül epitelinde AMH pozitif hücreler (yeşil). DAPI (mavi) ile boyanmış hücre nükleusları. İki boyamanın çakışmış görüntüsü (20x). İncek: epitelde AMH pozitif hücreler (40x).



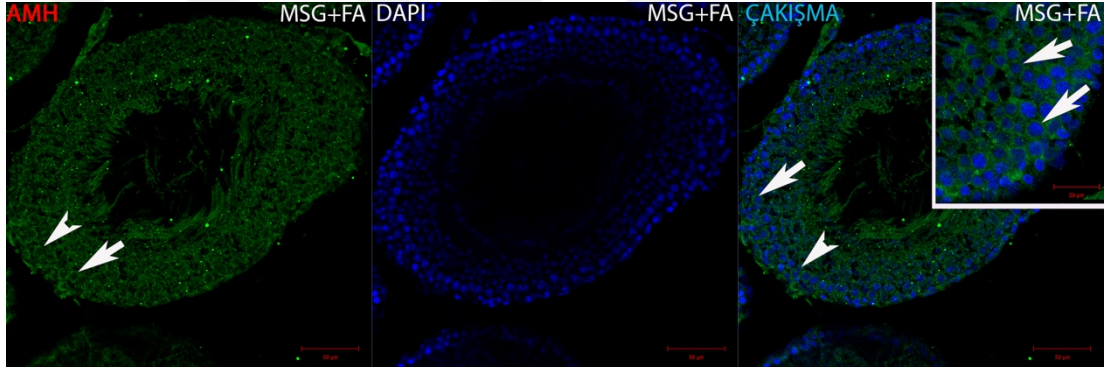
Resim 19. MSG grubuna ait AMH immü floresan boyaması.

MSG grubu seminifer tübül epitelindeki AMH pozitif hücreler (yeşil, ok). DAPI (mavi) ile boyanmış hücre nükleusları. İki boyamanın çakışmış görüntüsü (20x). İncek: AMH pozitif hücreler (ok), yer yer AMH pozitivitesinde azalma (ok başı) (40x).



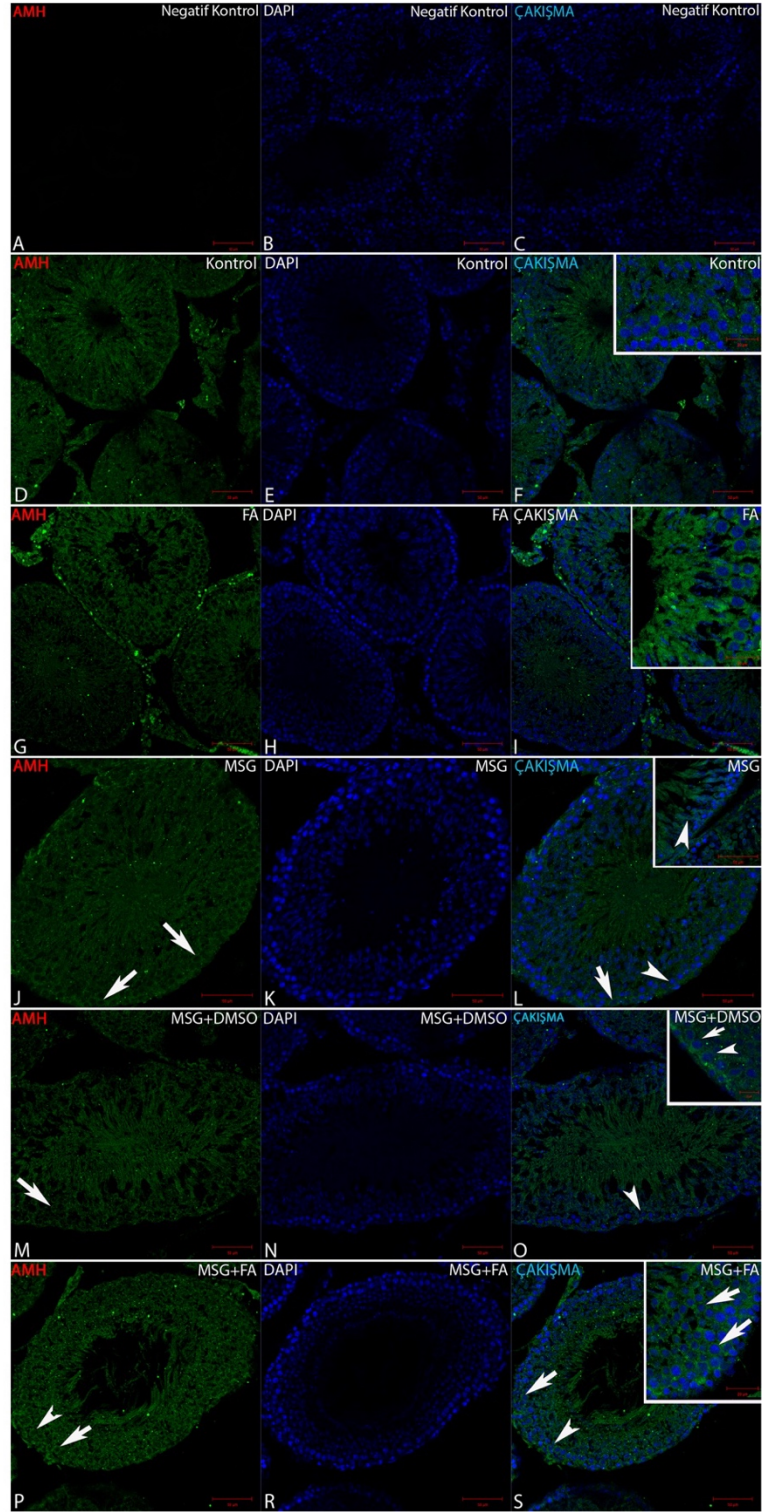
Resim 20. MSG+DMSO grubuna ait AMH immü floresan boyaması.

MSG+DMSO grubu tübül epitelinde AMH pozitif hücreler (yeşil, ok). DAPI (mavi) ile boyanmış hücreler. İki boyamanın çakışmış görüntüsü (20x). İnet: AMH pozitif hücreler (ok), yer yer AMH pozitivitesinin düşük olduğu hücreler (ok başı) (40x).



Resim 21. MSG+FA grubuna ait AMH immü floresan boyaması.

MSG+FA grubu tübül epitelinde AMH pozitif hücreler (yeşil, ok). DAPI (mavi) ile boyanmış hücreler. İki boyamanın çakışmış görüntüsü. İnet: AMH pozitif hücreler (ok), AMH pozitivitesinin düşük olduğu hücreler (ok başı) (40x).

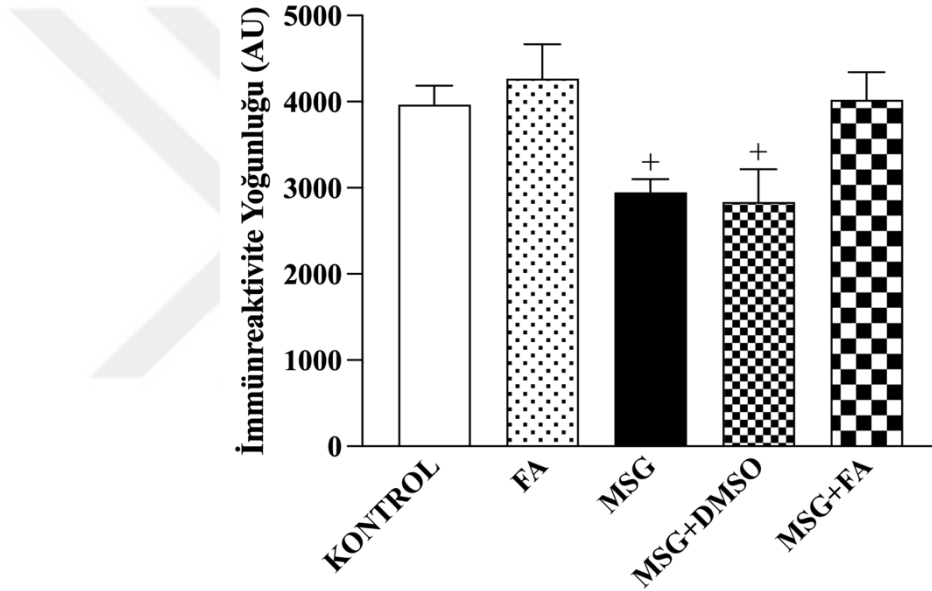


Resim 22. Negatif kontrol ve deney gruplarına ait fotomikrograflarda AMH immünreaktivitesi.

Negatif Kontrol (A-C), Kontrol (D-F), FA (G-I), MSG (J-L), MSG+DMSO (M-O), MSG+FA (P-S) gruplarının AMH, DAPI ve iki görüntünün çakışması (A-S). AMH pozitifitesi (beyaz ok). AMH pozitifitesinde azalma (ok başı).

4.10 AMH İmmünreaktivite Analizi

AMH immünreaktivite yoğunluğu analizi yapıldığında değerler, Kontrol grubunda $3,966 \pm 220$ AU, FA grubunda $4,268 \pm 397$ AU, MSG grubunda $2,948 \pm 150$ AU, MSG+DMSO grubunda $2,834 \pm 380$ AU, MSG+FA grubunda $4,020 \pm 321$ AU olarak ölçüldü. MSG ve MSG+DMSO grupları, FA grubuyla karşılaştırıldıklarında immünreaktivite yoğunluğunda azalma olduğu gözlemlendi ($^+p<0,05$). MSG+FA grubu ise MSG ve MSG+DMSO gruplarına göre immünreaktivite yoğunluğunda artış görüldü. Ancak bu artış, istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 13).

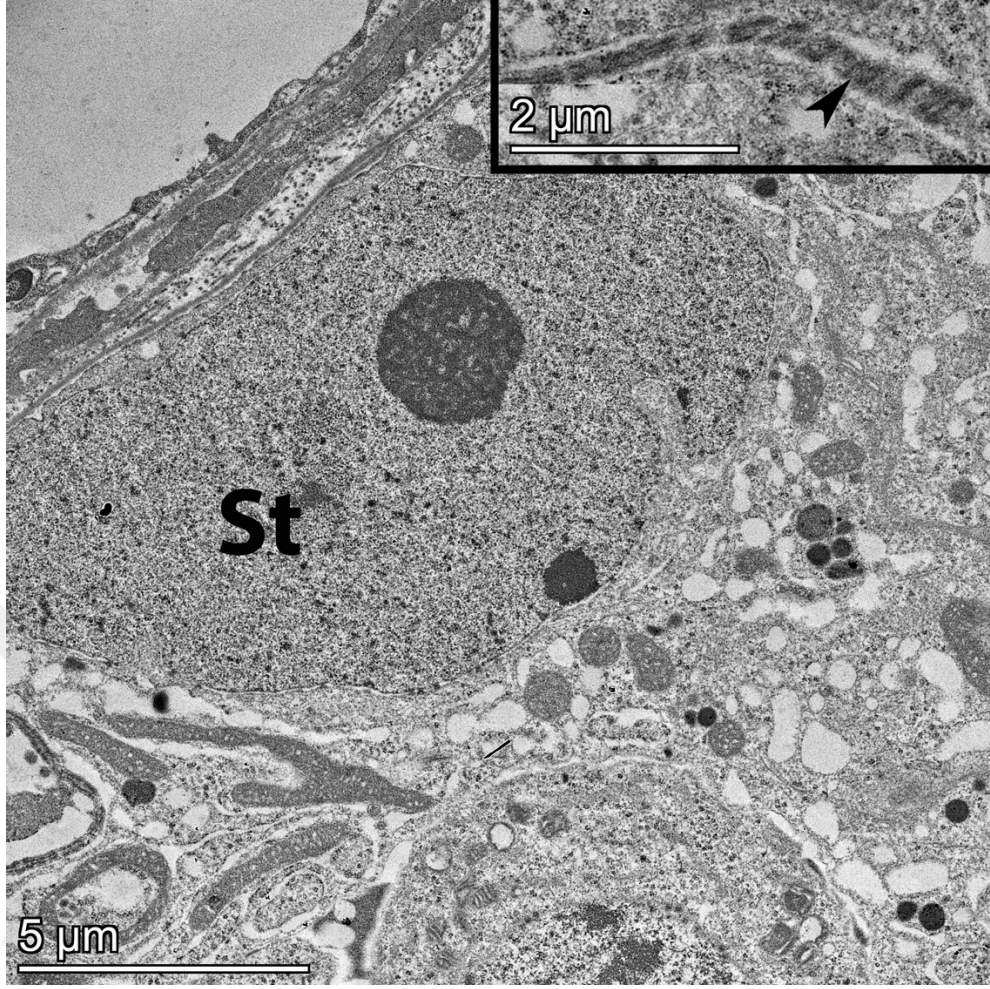


Şekil 13. AMH immünreaktivite yoğunluğu analizi.

$^+p<0,05$ FA grubu ile karşılaştırıldığında.

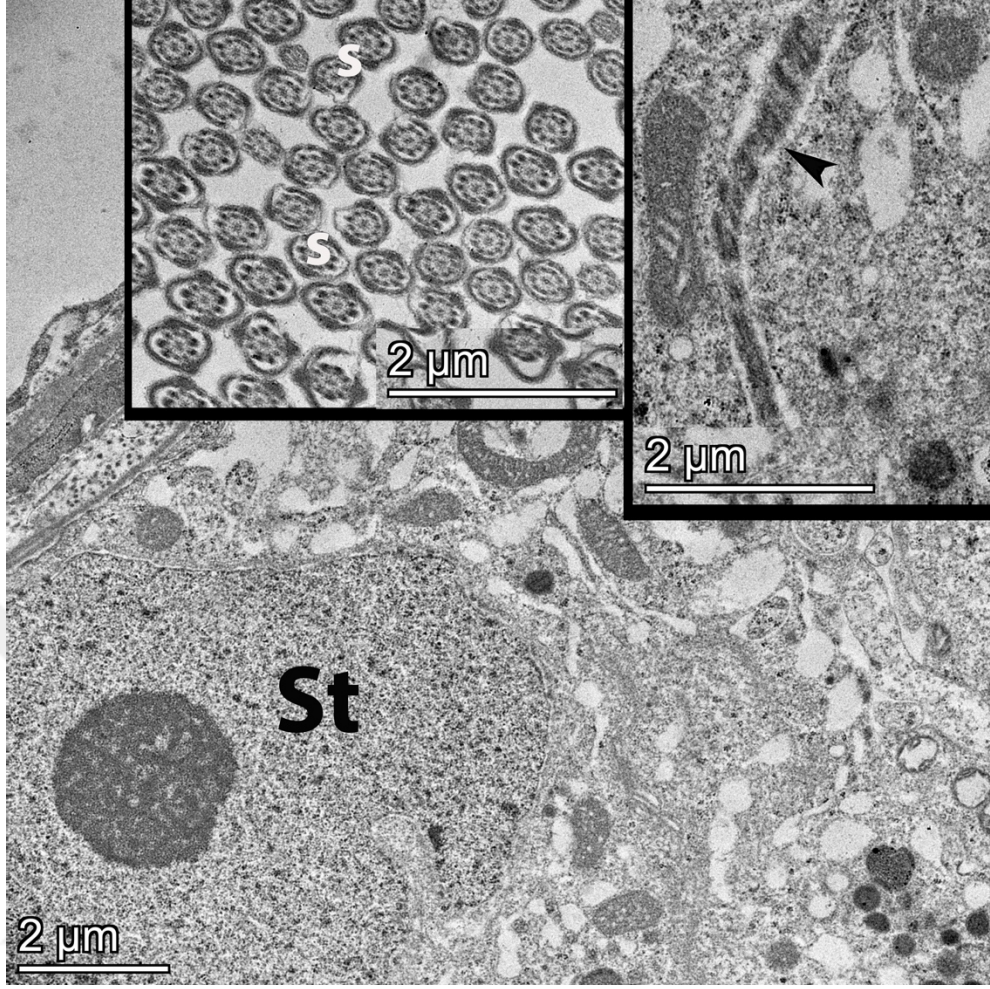
4.11 Geçirimli Elektron Mikroskopi ile Elde Edilen Bulgular

Geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde Kontrol grubuna ait kesitlerde, seminifer tübüllerin epitelinde, spermatogenik seriye ait hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin morfolojisinin ince yapı düzeyinde de normal olduğu gözlemlendi. Ayrıca, Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı morfolojisinin de normal olduğu izlendi (Resim 23). FA grubunda da ince yapı düzeyinde seminifer epitel, Kontrol grubuna benzer morfolojide izlendi (Resim 24). MSG grubunda ise sitoplazmada yer yer vakuol oluşumları, lipid damlacıkları ve Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda dejenerasyon gözlemlendi (Resim 25). MSG+DMSO grubunda ise MSG grubu ile benzer şekilde sitoplazmada çok sayıda lipid damlacığı, sıkı bağlantılarda dejenerasyon, yer yer vakuol oluşumları izlendi (Resim 26). MSG+FA grubunda ise seminifer tübül epitelinde iyileşme olduğu görüldü. Bu kapsamda, sitoplazmada daha az sayıda ve daha küçük boyutta lipid damlacığı görülürken sıkı bağlantı morfolojisinde iyileşme gözlemlendi (Resim 27).



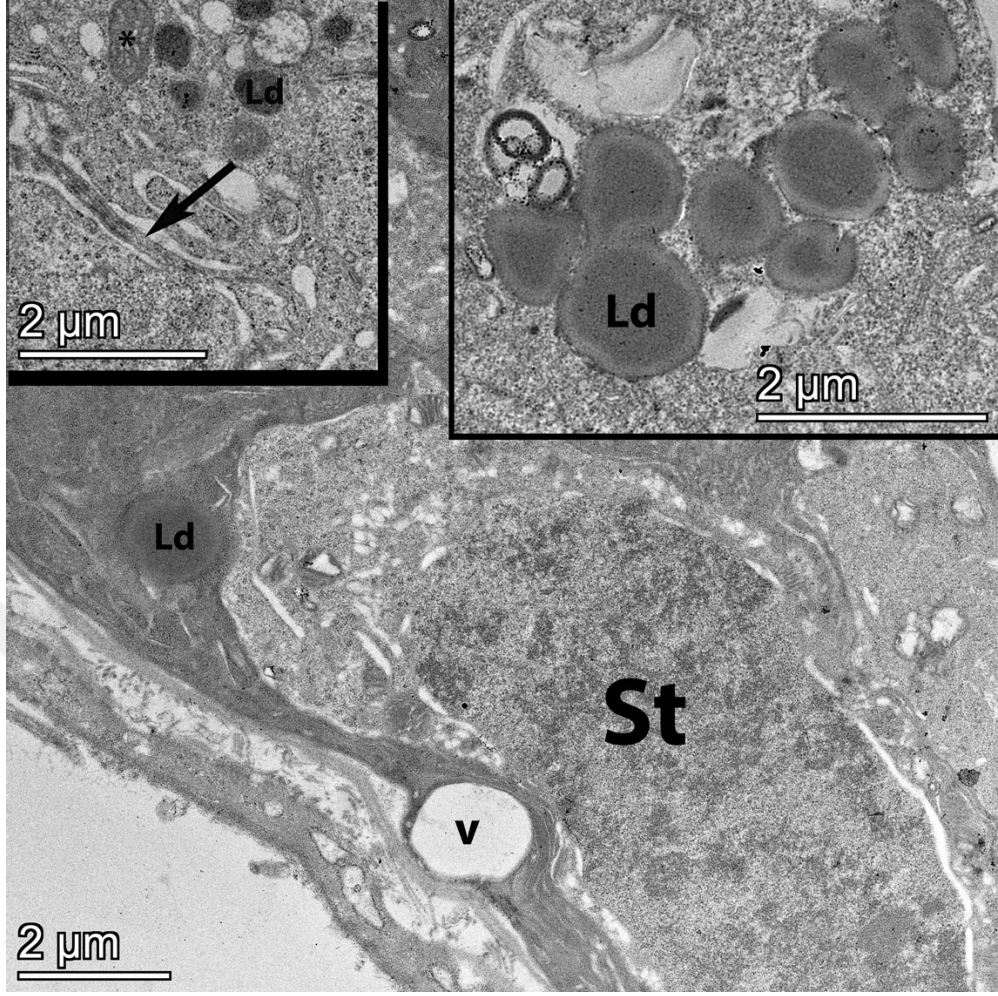
Resim 23. Kontrol grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

Kontrol grubu elektron mikrografında düzenli morfolojide seminifer tübül epiteli. St: Sertoli hücresi, ok başı: normal morfolojide sıkı bağlantı. İnset: Normal sıkı bağlantı morfolojisi (siyah ok başı).



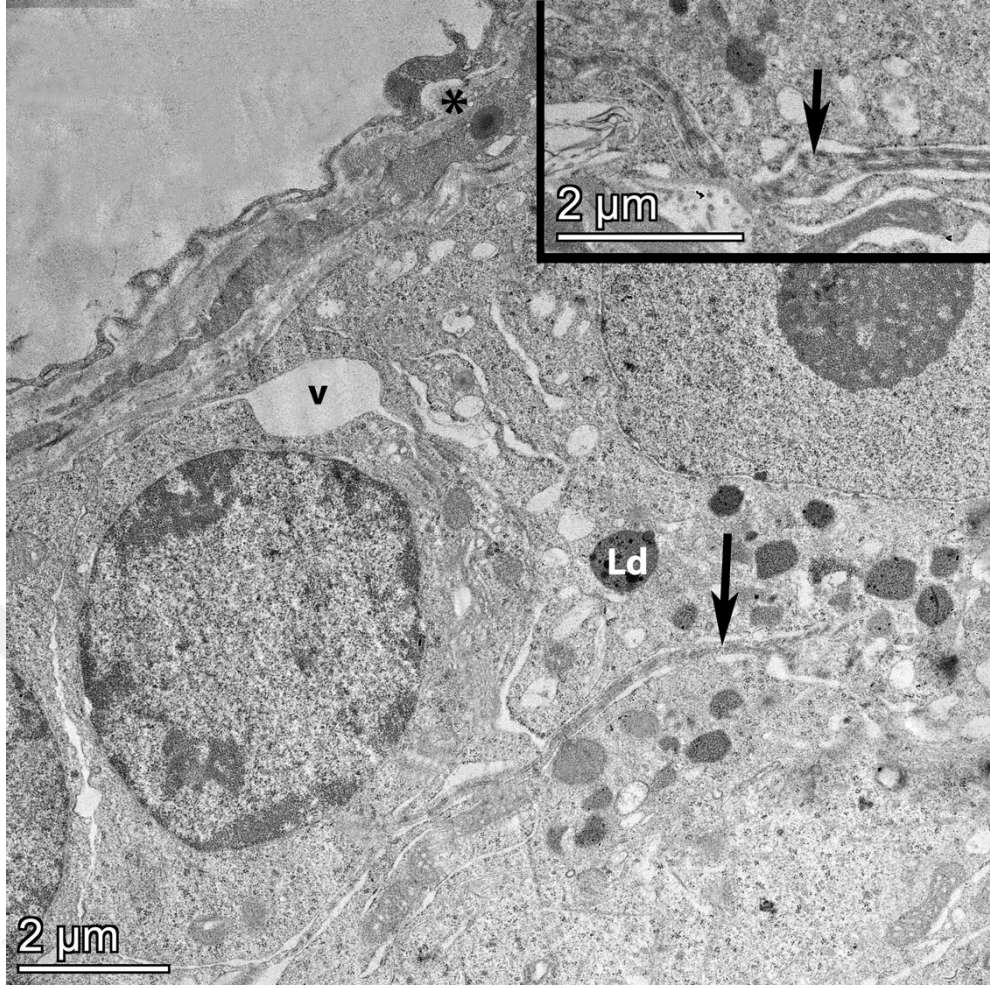
Resim 24. FA grubuna ait geçirimli elektron mikrografı.

FA grubu elektron mikrografında ince yapıda normal morfolojide seminifer tübül epiteli. St: Sertoli hücresi, S: spermatozoon, ok başı: normal morfolojide sıkı bağlantı. İncet: Normal morfolojide sıkı bağlantı (siyah ok başı). İncet: Lümeninde çok sayıda normal morfolojide spermatozoon (S).



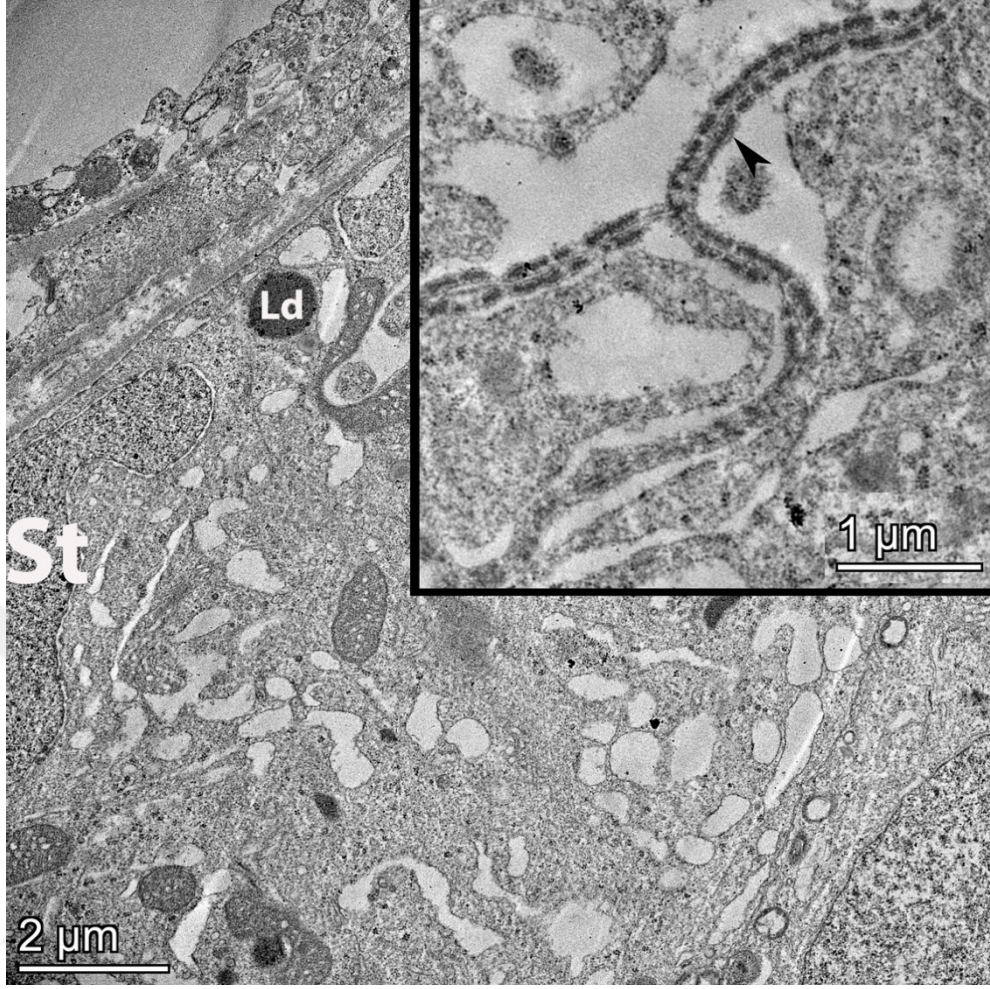
Resim 25. MSG grubuna ait geçirimli elektron mikrofrafı.

MSG grubu elektron mikrofrafında ince yapıda bozulmuş seminifer tübül morfolojisi. Sertoli hücresi sitoplazmasında vakuolizasyon (v), çok sayıda farklı boyutlarda Lipid damlası (Ld) ve sıkı bağlantılarda yer yer bozulma (ok). St: Sertoli hücresi, Ld: Lipid damlacığı. İnet: Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda yer yer bozulma (siyah ok) ve sitoplazmada çok sayıda lipid damlası (Ld). *: Mitokondri kristallerinde hasar.



Resim 26. MSG+DMSO grubuna ait geçirimli elektron mikrofrafı.

MSG+DMSO grubu elektron mikrofrafında bozulmuş epitel morfolojisi. Sitoplazmada yer yer vakuol (v) oluşumları ve çok sayıda farklı boyutta lipid damlacıkları (Ld). Ayrıca, bazal membranda hasar (*) ve ince yapı düzeyinde bozulmuş sıkı bağlantı (ok) morfolojisi. V: Vakuol, Ld: Lipid damlacığı. İncet: Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda dejenerasyon (siyah ok).

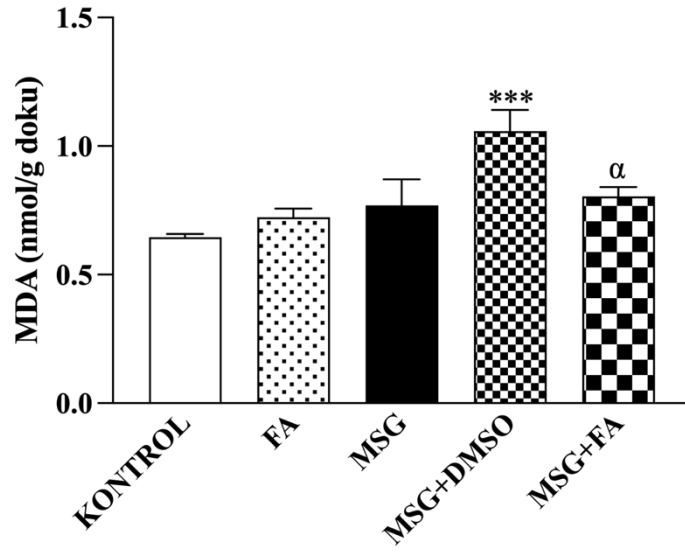


Resim 27. MSG+FA grubuna ait geçirimli elektron mikrofrafı.

MSG+FA grubunda ince yapı düzeyinde morfolojide iyileşme. Sitoplazmada lipid damlacıklarının sayı ve boyutlarının küçüldüğü izlendi. Ayrıca, sıkı bağlantılarda ince yapının normale yakın morfoloji. St: Sertoli hücresi, Ld: Lipid damlacığı. İncet: İnce yapı düzeyinde sıkı bağlantılarda normale yakın morfoloji (ok başı).

4.12 Biyokimya Bulguları

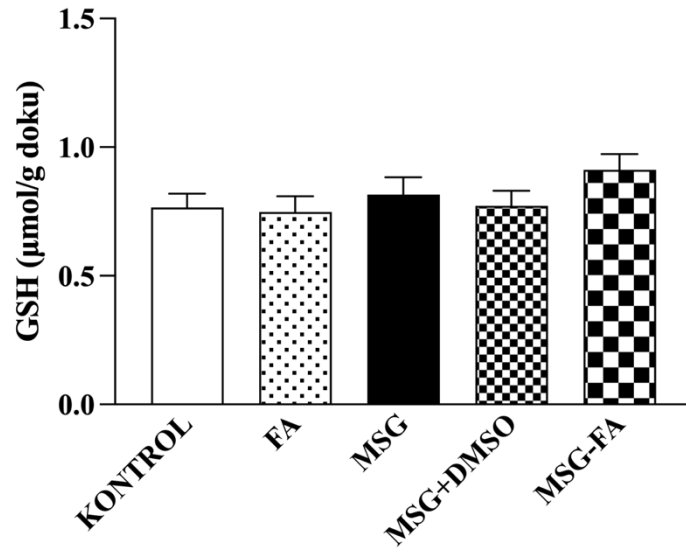
Kontrol grubunda doku MDA miktarı $0,64 \pm 0,01$ nmol/g, FA grubunda $0,72 \pm 0,03$ nmol/g, MSG grubunda $0,76 \pm 0,10$ nmol/g, MSG+DMSO grubunda $1,05 \pm 0,08$ nmol/g, MSG+FA grubunda ise $0,80 \pm 0,03$ nmol/g olarak belirlendi. MSG+DMSO grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA miktarında anlamlı (** $p < 0,001$) artış izlendi. MSG+FA grubu, MSG+DMSO grubu ile karşılaştırıldığında ise bu değerde anlamlı ($^{\alpha}p < 0,05$) azalma izlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Doku MDA miktarı grafiği.

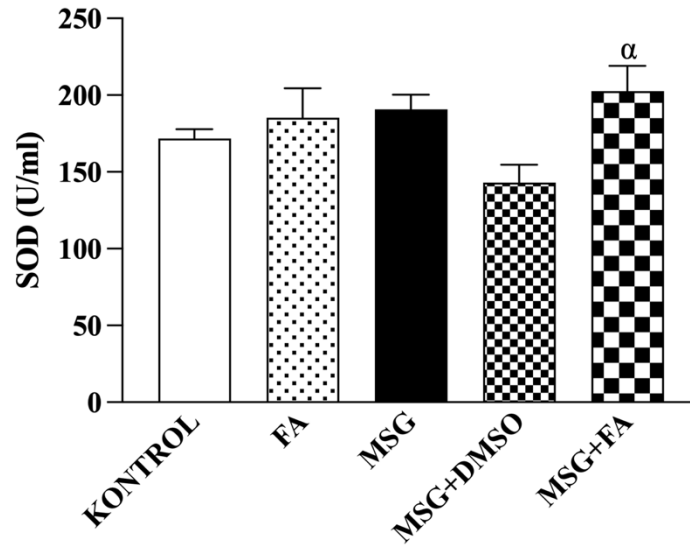
*** $p < 0,001$, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. $^{\alpha}p < 0,05$, MSG+DMSO grubu ile karşılaştırıldığında.

Kontrol grubunda doku GSH miktarı $0,76 \pm 0,05$ μ mol/g, FA grubunda $0,74 \pm 0,06$ μ mol/g, MSG grubunda $0,81 \pm 0,06$ μ mol/g, MSG+DMSO grubunda $0,77 \pm 0,05$ μ mol/g, MSG+FA grubunda ise $0,91 \pm 0,06$ μ mol/g olarak belirlendi. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında ise istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmedi (Şekil 15).



Şekil 15. Doku GSH miktarı grafiği.

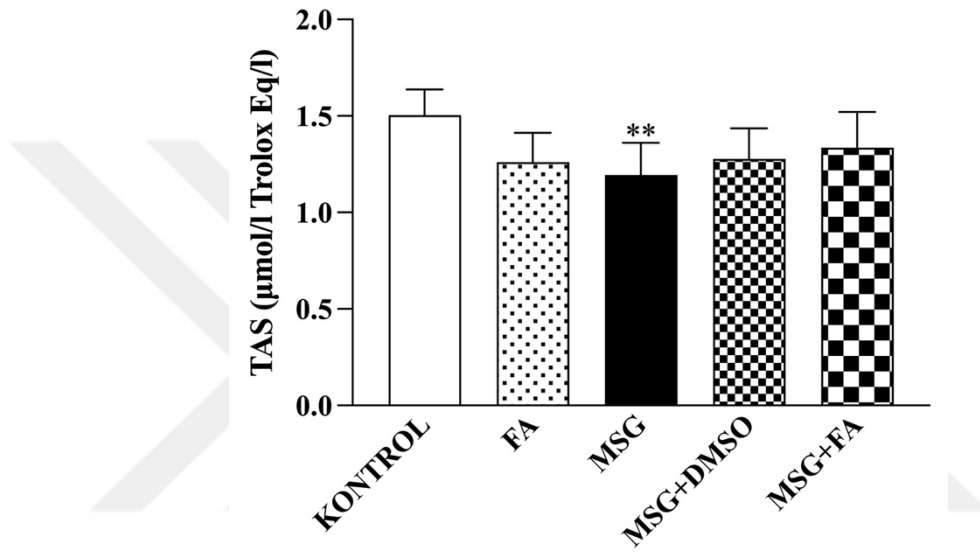
Kontrol grubunda doku SOD miktarı $171,8 \pm 6$ U/ml, FA grubunda $185,3 \pm 19,2$ U/ml, MSG grubunda $190,7 \pm 9,7$ U/ml, MSG+DMSO grubunda $142,9 \pm 11,8$ U/ml, MSG+FA grubunda ise $192,7 \pm 51,3$ U/ml olarak belirlendi. MSG+FA grubu, MSG+DMSO grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede ($^a p < 0,05$) artma izlendi (Şekil 16).



Şekil 16. Doku SOD miktarı grafiği.

^a $p < 0,05$, MSG+DMSO grubu ile karşılaştırıldığında.

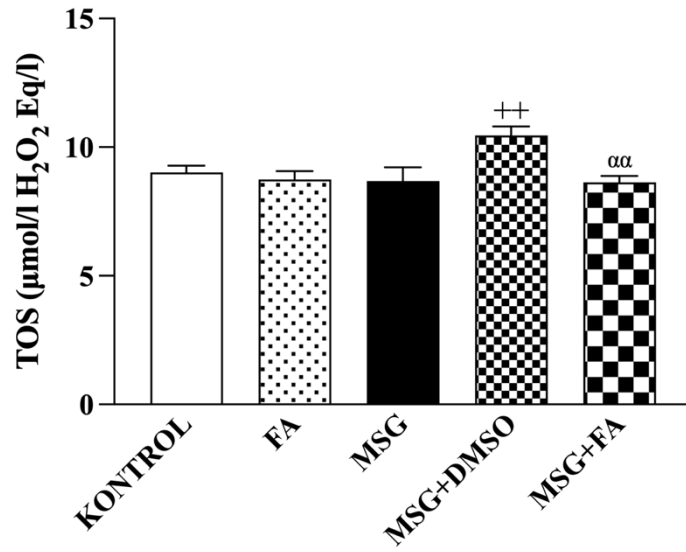
Kontrol grubunda doku TAS miktarı $1,5 \pm 0,13 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$, FA grubunda $1,26 \pm 0,15 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$, MSG grubunda $1,19 \pm 0,16 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$, MSG+DMSO grubunda $1,27 \pm 0,15 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$, MSG+FA grubunda ise $1,33 \pm 0,18 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$ olarak ölçüldü. MSG grubu, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TAS miktarında anlamlı derecede ($**p<0,01$) azalma izlendi. (Şekil 17).



Şekil 17. Doku TAS miktarı grafiği.

$**p<0,01$, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

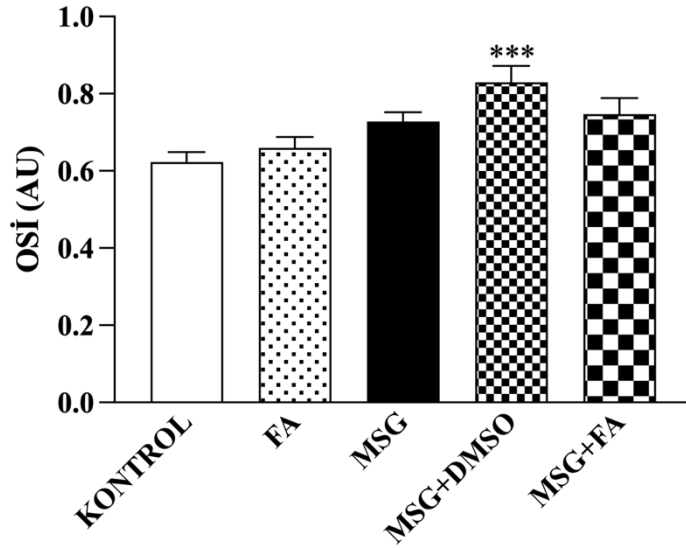
Kontrol grubunda doku TOS miktarı $9,02 \pm 0,26 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$, FA grubunda $8,73 \pm 0,33 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$, MSG grubunda $8,68 \pm 0,53 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$, MSG+DMSO grubunda $10,46 \pm 0,34 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$, MSG+FA grubunda ise $8,63 \pm 0,24 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/l}$ olarak belirlendi. MSG+FA grubu, MSG+DMSO grubu ile karşılaştırıldığında TOS miktarında anlamlı derecede ($^{aa}p<0,01$) azalma izlendi. MSG+DMSO grubu, FA grubu ile karşılaştırıldığında ise TOS miktarında anlamlı derecede ($^{++}p<0,01$) artma görüldü (Şekil 18).



Şekil 18. Doku TOS miktarı grafiği.

⁺⁺p<0,01, FA grubu ile karşılaştırıldığında. ^{αα}p<0,01, MSG+DMSO grubu ile karşılaştırıldığında.

Kontrol grubunda doku OSİ miktarı $0,62 \pm 0,02$ AU, FA grubunda $0,69 \pm 0,02$ AU, MSG grubunda $0,72 \pm 0,02$ AU, MSG+DMSO grubunda $0,83 \pm 0,04$, MSG+FA grubunda ise $0,74 \pm 0,04$ AU olarak hesaplandı. MSG+DMSO grubu, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede (^{***}p<0,001) artma izlendi (Şekil 19).



Şekil 19. OSİ grafiği.

^{***}p<0,001, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

5 TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, MSG ile indüklenen testis hasarına karşı FA'nın potansiyel iyileştirici etkisinin araştırılması hedeflendi. Bu amaç doğrultusunda, bu çalışmada histolojik, immünohistokimyasal, geçirimli elektron mikroskopik ve biyokimyasal yöntemler kullanıldı. MSG grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tübüllerin epitel kalınlığında azalma, tübül lümenlerinde çok sayıda döküntü epitel hücresi, germinal epitelde yer yer hasar ve sperm morfolojisinde bozukluklar görüldü. Sıkı bağlantı proteini olan ZO-1'in yoğunluğunun MSG grubunda azaldığı görüldü. AMH dağılımında ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Geçirimli elektron mikroskopik bulgulara ise seminifer tübüllerin organizasyonunda bozukluklara ve Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda geçirgenlik kaybına işaret eden, bariyer bütünlüğünün bozulduğunu gösteren ince yapı düzeyinde morfolojik bozukluklara rastlandı. MSG'nin oksidatif stres parametrelerinde değişikliğe neden olduğu görüldü. MSG'nin oksidatif stres belirteçlerinden MDA seviyesinde artışa neden olduğu, TAS seviyesi azalttığı ve TOS seviyesinde artışa neden olduğu gözlemlendi. MSG uygulaması sonucu oluşan testis hasarında FA'nın belirtilen tüm parametreler bazında iyileştirici etkisinin olduğu gözlemlendi.

Gıda güvenliği düzenleyici kurumları MSG tüketiminin güvenli olduğunu düşünse de bazı klinik öncesi ve klinik çalışmalar glutamatın fizyolojik mekanizmalar ile ilişkilendirildiğinden, MSG'nin kronik olarak tüketimi ile ilgili bilimsel çalışmalar sürdürülmektedir (97). MSG sonucu oluşan fizyolojik komplikasyonlar arasında hipertansiyon, obezite, gastrointestinal problemler, nörolojik sorunlar ve üreme fonksiyonlarının bozulması bulunmaktadır. MSG'nin etkisi doz seviyesine, nasıl uygulandığına ve kronik maruziyete bağlıdır (97). MSG tüketimi; pankreastaki beta hücre kütlelerinde azalma, oksidatif strese artış, insülin hassasiyetinde azalma gibi diyabetik belirteçlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur (75). Pankreas üzerinde yapılan bir çalışmada MSG'nin lipaz ve amilazın aktivitesinde değişikliklere ve pankreatik asinüslerde fizyolojik değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (98). Bir başka çalışmada ise kronik düzeyde MSG verilen sıçanların karaciğerlerinde hepatositlerin hücre morfolojilerinde bozulmalar, santral venlerde genişlemeyle beraber parçalanmış kırmızı kan hücreleri ve genel olarak

karaciğerde atrofi ve dejenerasyona rastlandığı bildirilmiştir (99). Yüksek dozda MSG tüketiminin kardiyovasküler hastalık riskini arttırdığı ve bağırsak florasına hasar verdiği fareler üzerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (100). Literatürdeki çalışmalar, MSG'nin erkek üreme sistemi üzerine de odaklanmaktadır. Bu etkilere örnek olarak, spermatogenetik hücreler üzerine yarattığı toksik etkiyle beraber spermelerde morfolojik anomali, canlı olan sperm sayısında azalma ve toplamda düşük sperm sayısı, testis dokusunda oksidatif belirteçlerde artış ve seminifer tübül yapılarında morfolojik bozukluklar, testosteron ve FSH, LH gibi gonadotropin hormon seviyelerinde dengesizlikler MSG'nin erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri olarak görülmektedir (78). Başka bir MSG ve testis üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, seminifer tübül yapısının bozulduğu ve germinal epitel kalınlığının azalmasıyla beraber testis morfolojisinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir (101). Çalışmamızda da MSG grubu ile diğer deney grupları karşılaştırıldığında spermatogenik hücrelerde morfolojik hasar, seminifer tübüllerde vakuolizasyonla birlikte gözlenen dejenerasyon ve germinal epitel kalınlığında azalma görüldü. MSG+FA grubunda ise MSG grubuna göre epitel kalınlığında artış ve germinal epitel morfolojisinde iyileşme, tübül lümeninde çok sayıda sperm izlendi.

MSG'nin iştah açıcı özelliğiyle beraber yeme alışkanlıklarında değişiklikler yarattığı ve obeziteye sebep olabileceği belirtilmektedir(72). MSG ile vücut ağırlığının ilişkisini gösteren, Çinli yetişkinler ile yapılan bir kohort çalışmasında, fiziksel aktivitelerin ve total kalori alımının takip edildiği durumda MSG tüketiminin vücut kitle indeksi ile pozitif ilişkisinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kilolu insanlarda MSG tüketiminin yaygın olduğu saptanmıştır (102). Yapılan bir başka çalışmada da MSG verilen sıçanların kilolarında artış gözlenmiş ve bu durum obezite ile ilişkilendirilmiştir (103). Çalışmamız dahilinde her gün ağırlık ölçümü yaptığımız sıçanlarda deney grupları arasında karşılaştırma yaptığımızda hayvan ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. MSG'nin testis üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmada, testis ağırlığının MSG grubunda kontrol grubuna göre azaldığı belirtilmiştir (104). Bu çalışmada testis/vücut ağırlığı oranları incelendiğinde MSG grubunun testis/vücut ağırlığı oranının diğer deney grupları ile

benzer olduğu ve istatistiksel olarak deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlendi.

Sperm sayısı ve morfolojilerinin MSG ile indüklenen testis hasarı ile ilişkilendirildiği çalışmalarda, MSG'nin sperm konsantrasyonunda azalmaya, anormal sperm sayısında artışa sebep olduğu gösterilmiştir (104–107). Kurşun toksisitesi ile ilişkili olarak kurşun ile indüklenen testis hasar modeli oluşturulmuş bir çalışmada, FA'nın sperm üzerindeki iyileştirici etkileri incelendiğinde oksidatif stres belirteçleri üzerinde iyileştirici etki yaptığı, lipid peroksidasyonunu azalttığı, sperm konsantrasyonu, canlılık ve hareketlilik gibi parametreler üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (108). Bu çalışmada da deney grupları arasındaki sperm morfolojileri incelendiğinde MSG grubuna ait sıçanların spermelerinde baş, kuyruk ve boyun morfolojisini etkileyen anomaliler görülürken MSG+FA grubunda belirtilen anomalili spermelere daha az rastlandığı ve çok sayıda normale yakın morfolojide sperm bulunduğu gözlemlendi.

Ferulik asit; antioksidan, antiinflamatuvar, antidiyabetik gibi birçok fizyolojik etki gösteren bir antioksidandır (81). Ferulik asidin karmaşık antioksidan aktivitesi, esas ROT'un oluşumunun engellenmesine ve serbest bulunan radikallerin nötralizasyonuna dayanır (81). Oksidatif strese maruz kalmak, sperm nükleusunda kromatine negatif etki ederek spermatogenez sürecinde aksaklıklara yol açar ve spermelerin apoptoza girmesine neden olur (109). FA'nın oral takviye olarak kullanıldığı bir çalışmada, diyabetik ergen sıçanların testis ve karaciğerinde oksidatif stres biyobelirteçleri üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (110). Başka bir çalışmada ise FA takviyesinin diyabet durumunda kalp, karaciğer ve pankreasta oksidatif stres parametreleri üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (111). DeneySEL bir başka çalışmada da ferulik asidin, diyabet sonrası oluşan testis hasarında, oksidatif stresi parametreleri üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (112). Kadmiyum klorür kullanılarak oluşturulmuş testis hasarında, sıçanlardaki bozulmuş hormonal seviyelerdeki değişiklikler üzerinde FA'nın apoptotik ve inflamatuvar hasarda iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (113). Ferulik asidin dondurulmuş-çözülmüş sperm üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmalarda ise ferulik asidin koruyucu olarak kullanılmasıyla sperm hareketliliği, fonksiyonel membran ve akrozom bütünlüğü gibi parametrelerin iyileştiği

gözlendi (114,115). Çalışmamız dahilinde ferulik asidin potansiyel iyileştirici ajan olarak kullanımının, testis dokusundaki ROT seviyesi üzerinde olumlu etki sağlayarak testis ve sperm düzeyinde histopatolojik bozuklukların iyileştirilmesine katkı sağladığı düşünülmektedir.

KTB, spermatogenetik hücrelerin desteklenmesinde ve dış çevreye karşı korunmasında kritik rol oynar ve fertilité üzerinde çok büyük öneme sahiptir (116). KTB'nin bozulması, germ hücrelerinin apoptozuna yol açarak infertiliteye sebep olabilir (117,118). Sıkı bağlantıların en önemli proteinlerinden olan kladin ve okludin proteinleri ve zonula okludens (ZO) proteinlerinden olan ZO-1, ZO-2, ZO-3 tarafından hücre iskeletine bağlanırlar (119). Testosteron, yetişkin sıçan Sertoli hücrelerinde ZO-1 ve immünglobülin ailesine dahil olan bağlantı adezyon molekülü-3 (JAM-3) gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu artırarak KTB'nin oluşumu ve korunmasına katkıda bulunur (120). Yetişkin insan testisinde ZO-1, Sertoli hücrelerinin bazal membranının yakınında görülürken genetiği değiştirilmiş farelerle yapılan bir çalışmada ZO-1'in Sertoli hücrelerinin apikal alanında az miktarda bulunduğu ve bazal alanda neredeyse varlık gösteremediği bildirilmiştir (121). Bu çalışmada da MSG grubunda Sertoli hücreleri arasındaki ZO-1 protein dağılımının, Kontrol grubundakilere göre daha az yoğun olduğu görülmüştür. ZO-1 sıkı bağlantıları, diğer çalışmalarda da görüldüğü gibi Kontrol grubunda seminifer tübül bazal membranına yakın konumda ve Sertoli hücrelerinin tüm yan yüzeylerinde düzenli olarak görülürken MSG grubunda neredeyse hiç yoğunluk gösterememiş ve dağınık olarak zayıf lokalizasyon göstermiştir. MSG+FA grubunda ise ZO-1 dağılımının MSG grubuna göre artmış olduğu görülmüştür. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlenmiştir.

Anti-müllerian hormon (AMH) fetal dönem Sertoli hücrelerinin biyobelirtecidir (122). Yetişkinlerdeki spermatogenik hücre sayısı, perinatal gelişim aşamasında üretilen Sertoli hücrelerinin sayısı ile ilişkilidir (122). Serum AMH, özellikle inmemiş testis durumu olan erkek çocuklarda, testis dokusunun varlığının en yararlı göstergesidir (123). Kriptorşidizmlili erkek çocuklarda serum AMH seviyeleri fonksiyonel Sertoli hücrelerinin miktarının belirlenmesinde önemli bir rol taşır (123). Serum AMH miktarı çocukluk döneminde yüksektir ancak ergenlik döneminde azalır (124). AMH, yetişkinlerde Leydig hücre farklılaşması ve fonksiyonelliğine etki eder

(125). KTB'nin ortaya çıkması ve germinal epitelde mayozun başlamasıyla AMH ekspresyonundaki azalma aynı zamana denk gelir (125). Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron, insanlarda AMH üretimini azaltır. Erkeklerde, yetişkinlikteki serum AMH miktarı ergenlik öncesi döneme göre 10-20 kat daha azdır fakat aynı dönemdeki kadın serum AMH miktarına göre yine de iki kat daha fazladır (125). Bir çalışmada, AMH eksikliği olan erkek farelerin normal spermatogenez geçirdiği gösterilirken AMH'yi fazla sentezleyen transgenik erkek farelerde bozulmuş Leydig hücre gelişimi ve işlevi gözlenmiştir (126). Başka bir çalışmada, kemoterapi uygulaması sonrası oluşan testis hasarının belirlenmesinde AMH'nin biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini sorgulamıştır (127). Kemoterapiden sonra insan ve fare serum AMH seviyesinin ve fare testisi dokusu AMH seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir (127). Bir başka çalışmada, akrilamid maruziyeti sonrası AMH seviyesinde değişiklik olduğu gösterilmiştir (128). Literatürde monosodyum glutamatın AMH seviyesi üzerindeki etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, testis AMH dağılımının testis hasarı sonrası FA ile potansiyel iyileştirme etkisinin nasıl değiştiğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında, MSG ile oluşmuş hasar sonrası ve FA'nın bu hasar üzerindeki etkisi ile ilişkili olarak MSG grubu, FA grubu ile karşılaştırıldığında AMH protein dağılımının azaldığı ($p<0,05$), MSG+FA grubunda ise immünreaktivitede artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir.

KTB morfolojisini ince yapı düzeyinde incelemek amacıyla elektron mikroskopisi sıklıkla kullanılmaktadır (42). Geçirimli elektron mikroskobu seviyesinde incelemeler sonucu, testis hasar modeli uygulanan çalışmalarda, testis seminifer tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon, sıkı bağlantı morfolojik bütünlüğünde bozulmalar ve sitoplazmada lipid damlacıkları izlenmiştir (129,130). Çalışmamızda, Kontrol ve FA grubunda ince yapı düzeyinde normal testis seminifer tübül morfolojisi izlenirken MSG grubunda seminifer tübül epitelinde vakuolizasyon ve spermatogonik epitelde yer yer harabiyet, sitoplazmada lipid damlacıkları ve KTB'yi oluşturan sıkı bağlantılarda ince yapı düzeyinde geçirgenlik kaybına işaret eden morfolojik bozukluklar belirgindi. MSG+APO grubunda ise belirtilen hasar parametreleri üzerinde aposininin iyileştirici etkisinin olduğu görüldü.

SOD, süperoksit radikallerinin oksijen ve hidrojen peroksit parçalanmasını katalize ederek hücrelerin oksidatif stres sonucu oluşacak hasara karşı korumayı hedefler (131). MDA, serbest radikaller nedeniyle lipid peroksidasyonu sürecinde üretilen bir aldehittir ve hücre zarı hasarını gösterir (57). Azalan SOD ve artan MDA oksidatif stresi tetikleyerek hücre hasarına ve apopozaya yol açabilir (10). GSH, hücreleri oksidatif hasardan koruyan çok önemli bir antioksidandır (131). TAS ve TOS seviyeleri, antioksidan ve oksidan durumun arasındaki dengeyi göstermek amacıyla kullanılan önemli bir belirteçlerdir (132). OSI, oksidatif stres ölçümüyle insanların sağlık veya hastalık durumlarını belirlemek amacıyla en çok kullanılan indekslerden bir tanesidir (133). MSG ile oluşturulan testis hasarı çalışmalarında, doku MDA seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (101,129,134). Ferulik asidin iyileştirici ajan olarak kullanıldığı bir çalışmada testis hasar grubunda ferulik asidin MDA seviyesini düşürdüğü, GSH seviyesini ise değiştirmedikleri gösterilmiştir (135). MSG ile oluşturulan hasar çalışmasında OSI'nin hasar gruplarında arttığı gözlenmiştir (136). Çalışmamızda, testis dokusunda biyokimyasal parametrelerden MDA, GSH, SOD ve OSI'nin literatürdeki çalışmalar ile paralel olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada da MSG grubunda dokuda MDA seviyesi yükselirken GSH seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olmadığı gözlemlendi. Dizosilpin (MK-801) ile oluşturulan testis hasarı çalışmasında testis dokusunda TOS seviyesinin diğer gruplara göre fazla olduğu, TAS seviyesinin ise düşük olduğu görülmüştür (137). Alfa lipoik asidin, metotreksat ile indüklenen testis hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini araştıran bir çalışmada, antioksidan seviyelerine etki ederek testis hasarını azalttığı bildirilmiştir (138). Çalışmamızda, mevcut literatür ile benzer şekilde MSG grubunda kontrol grubuna göre TAS seviyesinde azalma, MSG+FA grubunda ise MSG+DMSO grubuna kıyasla TOS seviyesinde azalma olduğu izlendi.

6 SONUÇ

MSG ile indüklenen hasar modeli kullandığımız bu çalışmada, MSG grubunda seminifer tübül epitelinde dejenarasyon ve tübül epitel kalınlığında azalma görüldü. MSG'nin etkisi dahilinde incelenen spermelerde morfolojik hasar gözlemlendi. MSG'nin KTB sıkı bağlantı proteinlerinden olan ZO-1'in dağılımını olumsuz etkilediği görüldü. AMH ekspresyon ve dağılımında ise; MSG'nin AMH ekspresyonunun azalmasında etkili olabileceği düşünüldü. Geçirimli elektron mikroskopik düzeydeki değerlendirmelerde de ince yapı düzeyinde sıkı bağlantı morfolojisinde, geçirgenliğin bozulduğuna işaret eden morfolojik değişiklikler ve seminifer tübül organizasyonunda bozukluklara rastlandı. MSG'nin oksidatif stres biyobelirteçlerindeki etkilerine bakıldığında, MDA seviyesinin arttığı, GSH seviyesinin istatistiksel anlamlı olarak değişmediği, TAS seviyesinin azaldığı, TOS seviyesinin ise arttığı saptandı. MSG uygulaması sonucu oluşan testis hasarında mikroskopik ve biyokimyasal parametreler düzeyinde FA'nın iyileştirici etkisinin olduğu gözlemlendi.

Literatürdeki benzer MSG ile indüklenen testis hasarı çalışmaları ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda MSG'nin testis dokusu üzerinde oluşturduğu hasar üzerinde, FA'nın çalışmamızda uygulanan doz miktarı dahilinde oksidatif parametreler düzeyinde oksidatif hasarı azalttığı, testis ve sperm morfolojisindeki morfolojik bozukluklar üzerinde iyileştirici etki yaptığı düşünülmektedir. Güçlü bir antioksidan olan ferulik asidin erkek infertilite tedavilerine yönelik yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayabileceğini düşünülmektedir.

7 KAYNAKÇA

1. Stańska K, Krzeski A. The umami taste: from discovery to clinical use. *Otolaryngol Pol.* 2016; 70(4):10–15.
2. Wang W, Zhou X, Liu Y. Characterization and evaluation of umami taste: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2020; 127.
3. Zanziurescu A, Ungurianu A, Tsatsakis AM, Nițulescu 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):1111–1134.
4. Banerjee A, Mukherjee S, Maji BK. Worldwide flavor enhancer monosodium glutamate combined with high lipid diet provokes metabolic alterations and systemic anomalies: An overview. *Toxicol Rep.* 2021; 8:938–961.
5. Hajihasani MM, Soheili V, Zirak MR, Sahebkar A, Shakeri A. Natural products as safeguards against monosodium glutamate-induced toxicity. *Iran J Basic Med Sci.* 2020; 23(4):416.
6. Ogbuagu EO, Airaodion AI, Okoroukwu VN, Ogbuagu U. Hyperglycemic and hypocholesterolemic effect of monosodium glutamate in Wistar rats. *International Journal of Research and Reports in Hematology.* 2019; 2(2):115–121.
7. 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.
8. 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.
9. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003; 91(2):179–94.
10. 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 Urology* 2018; 18(1).
11. Li D, Rui YX, Guo SD, Luan F, Liu R, Zeng N. Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life Sci.* 2021; 284.
12. Stanton PG. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 59:166–173.
13. Contuk G, Orun O, Demiralp-Ekşioğlu E, Ercan F. Morphological alterations and distribution of occludin in rat testes after bilateral vasectomy. *Acta Histochem.* 2012; 114(3):244–251.

14. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*. 1986; 45(5):685–698.
15. Josso N, Cate RL, Picard JY, Vigier B, Di Clemente N, Wilson C, et al. Anti-müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog Horm Res*. 1993; 48(1):1–59.
16. Rehman Z ur, Worku T, Davis JS, Talpur HS, Bhattarai D, Kadariya I, et al. Role and mechanism of AMH in the regulation of Sertoli cells in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017; 174:133–140.
17. Gupta A, Singh AK, Loka M, Pandey AK, Bishayee A. Ferulic acid-mediated modulation of apoptotic signaling pathways in cancer. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2021; 125:215–257.
18. Kumar N, Pruthi V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. 2014; 4(1):86–93.
19. Mancuso C, Santangelo R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem Toxicol*. 2014; 65:185–195.
20. Cao YJ, Zhang YM, Qi JP, Liu R, Zhang H, He LC. Ferulic acid inhibits H₂O₂-induced oxidative stress and inflammation in rat vascular smooth muscle cells via inhibition of the NADPH oxidase and NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol*. 2015; 28(2):1018–1025.
21. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas: with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2011.
22. Mescher A. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 14th edition. New York: McGraw Hill; 2016.
23. Eroschenko VP, Di Fiore MSH. *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
24. Heinrich A, DeFalco T. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology*. 2020; 8(4):903–914.
25. Dharani P, Kumary SU, Sundaram V, Joseph C, Ramesh G. Morphology of the interstitial tissue of active and resting testis of the Guinea Fowl. *Int. J. Morphol*. 2017; 35.
26. Matsumoto AM, Bremner WJ. Testicular Disorders. In *Williams Textbook of Endocrinology*. Amsterdam: Elsevier; 2015, 694–784.
27. Houda A, Nyaz S, Mohamed, Sobhy B, Hussein, Bosilah A, et al. Seminiferous tubules and spermatogenesis. *male reproductive anatomy*. 2022.
28. Meistrich ML, Hess RA. Assessment of Spermatogenesis Through Staging of Seminiferous Tubules. *New Jersey: Humana Press*; 2013, 299–307.

29. McLean DJ, Friel PJ, Johnston DS, Griswold MD. Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol Reprod.* 2003; 69(6):2085–2091.
30. Ohta H, Wakayama T, Nishimune Y. Commitment of fetal male germ cells to spermatogonial stem cells during mouse embryonic development. *Biol Reprod.* 2004; 70(5):1286–1291.
31. Ehmecke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(3):275–282.
32. De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Human Reproduction.* 1998; 13:1–8.
33. Waheeb R, Hofmann MC. Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. *Int J Androl.* 2011; 34(4):296–305.
34. Gilbert SF. *Developmental Biology.* 6th edition. Massachusetts: Sinauer Associates; 2000.
35. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 59:10–26.
36. Britannica, The Editors of Encyclopaedia (Ed). Spermatogenesis (Internet). *Encyclopedia Britannica*; 2024 (cited 2024 March 20). <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>
37. Zhou R, Wu J, Liu B, Jiang Y, Chen W, Li J, et al. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2019; 76(14):2681–2695.
38. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, et al. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2014; 29:66–75.
39. Petersen C, Söder O. The Sertoli Cell-A Hormonal Target and “Super” Nurse for Germ Cells That Determines Testicular Size. *Horm Res.* 2006; 66(4):153–161.
40. Thumfart KM, Mansuy IM. What are Sertoli cells? Historical, methodological, and functional aspects. *Andrology.* 2023; 11(5):849–859.
41. Cheng CY, Mruk DD. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nature Reviews Endocrinology.* 2010; 6(7):380–395.
42. Luaces JP, Toro-Urrego N, Otero-Losada M, Capani F. What do we know about blood-testis barrier? current understanding of its structure and physiology. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11.
43. Yan Cheng C, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev.* 2012; 64(1):16–64.
44. Yi WEI, Xiang-Liang T, Yu Z, Bin L, Lian-Ju S, Chun-lan L, et al. DEHP exposure destroys blood-testis barrier (BTB) integrity of immature testes through excessive ROS-mediated autophagy. *Genes Dis.* 2018; 5(3):263–274.

45. Washburn RL, Dufour JM. Regulation of complement by Sertoli cells may contribute to the immune protective environment within the blood-testis barrier. *Tissue Barriers*. 2023.
46. Yan Cheng C, Mruk DD. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacol Rev*. 2012; 64(1):16-64.
47. Paul C, Robaire B. Impaired function of the blood-testis barrier during aging Is preceded by a decline in cell adhesion proteins and GTPases. *PLoS One*. 2013;8(12):84354.
48. Pérez CV, Sobarzo CM, Jacobo PV, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Denduchis B, et al. Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions. *Biol Reprod*. 2012; 87(5):1–12.
49. Ündağ İ. Expression of Zonula Occludens-1 and Claudin-1 proteins in Japanese Quails Testis. *Veterinary Sciences and Practices*. 2023; 12(2):58–64.
50. Avellar MCW, Hinton BT. Epididymis. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. 2nd edition. Massachusetts, Academic Press; 2019. 807–813.
51. Kempinas WDG, Klinefelter GR. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*. 2014; 4(2):e979114.
52. Bedford JM. The status and the state of the human epididymis. *Human Reproduction*. 1994; 9(11):2187–2199.
53. Sullivan R, Légaré C, Lamontagne-Proulx J, Breton S, Soulet D. Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology*. 2019; 7(5):748–757.
54. Griendling KK, Camargo LL, Rios FJ, Alves-Lopes R, Montezano AC, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension. *Circ Res*. 2021; 128(7):993–1020.
55. Aseervatham GSB, Sivasudha T, Jeyadevi R, Arul Ananth D. Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans-an overview. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2013; 20(7):4356–4369.
56. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017.
57. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014.
58. Nam TG. Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicol Res*. 2011; 27(1):1-6.
59. Klisic A, Kavaric N, Vujcic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Kotur-Stevuljevic J, Ninic A. Total oxidant status and oxidative stress index as indicators of increased Reynolds risk score in postmenopausal women. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020; 24(19):10126–10133.

60. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019.
61. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, et al. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *Medical Journal of Süleyman Demirel University*. 2019; 26(3):362–369.
62. Leslie SW, Soon-Sutton TL, Khan MA. Male Infertility. *StatPearls*. Treasure Island; 2024.
63. Mannucci A, Argento FR, Fini E, Coccia ME, Taddei N, Becatti M, et al. The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility. *Front Mol Biosci*. 2021; 8.
64. Barbăroşie C, Agarwal A, Henkel R. Diagnostic value of advanced semen analysis in evaluation of male infertility. *Andrologia*. 2021; 53(2).
65. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril*. 2006;85(3):629-634.
66. 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.
67. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008; 14(3):243–258.
68. Díaz R, Torres MA, Bravo S, Sanchez R, Sepúlveda N. Determination of fatty acid profile in ram spermatozoa and seminal plasma. *Andrologia*. 2016; 48(6):723–726.
69. Akhigbe RE, Collodel G, Du Plessis SS, Ae SDA. Oxidative stress and male infertility: evidence from a research perspective. *Frontiers in Reproductive Health*. 2022; 4.
70. Kurihara K. Umami the fifth basic taste: history of studies on receptor mechanisms and role as a food flavor. *Biomed Res Int*. 2015.
71. 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):1328–1336.
72. Pekmezekmek A. Monosodyum glutatın fizyolojik etkileri. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2023; 18(1):191–198.
73. Appaiah KM. monosodium glutamate in foods and its biological effects. *Ensuring Global Food Safety*. 2010; 217–226.
74. Muazzam M Sheriff Sr, Abusabah HH, Sindi HB, Alaidrous AO, Moemen AH, Alshalawi SF, et al. A Study on the awareness and perceptions regarding monosodium glutamate and its potential health effects amongst the urban population of Saudi Arabia. *Cureus*. 2023; 15(12).

75. Kayode OT, Bello JA, Oguntola JA, Kayode AAA, Olukoya DK. The interplay between monosodium glutamate (MSG) consumption and metabolic disorders. *Heliyon*. 2023; 9(9).
76. Geha RS, Beiser A, Ren C, Patterson R, Greenberger PA, Grammer LC, et al. Review of alleged reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study. *J Nutr*. 2000; 130(4):1058-1064.
77. Husarova V, Ostatnikova D. Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: A Review. *JMED Research*. 2013:1–12.
78. Kayode OT, Rotimi DE, Kayode AAA, Olaolu TD, Adeyemi OS. Monosodium glutamate (MSG)-induced male reproductive dysfunction: A mini review. *Toxics*. 2020; 8(1):7.
79. Oluwole DT, Ebiwonjumi OS, Ajayi LO, Alabi OD, Amos V, Akabi G, et al. Disruptive consequences of monosodium glutamate on male reproductive function: A review. *Curr Res Toxicol*. 2024; 6:100148.
80. Al-Btoush HA, Al-Sha'er MA. In silico evaluation of ferulic acid based multifunctional conjugates as potential drug candidates. *Med Chem*. 2024; 20(2):232–244.
81. Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztejn H. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018; 31(6):332–336.
82. Poquet L, Clifford MN, Williamson G. Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metab Dispos*. 2008; 36(1):190–197.
83. Zheng RL, Zhang H. Effects of Ferulic Acid on Fertile and Asthenozoospermic Infertile Human Sperm Motility, Viability, Lipid Peroxidation, and Cyclic Nucleotides. *Free Radic Biol Med*. 1997 Jan 1;22(4):581–6.
84. Ou S, Kwok KC. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J Sci Food Agric*. 2004; 84(11):1261–1269.
85. Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr*. 2007; 40(2):92–100.
86. Mónica FZ, Reges R, Cohen D, Silva FH, De Nucci G, D'Ancona CAL, et al. Long-term administration of BAY 41-2272 prevents bladder dysfunction in nitric oxide-deficient rats. *Neurourol Urodyn*. 2011; 30(3):456–460.
87. Banerjee A, Das D, Paul R, Roy S, Das U, Saha S, et al. Mechanistic study of attenuation of monosodium glutamate mixed high lipid diet induced systemic damage in rats by *Coccinia grandis*. *Sci Rep*. 2020 ;10(1).
88. Kelainy EG, Ibrahim Laila IM, Ibrahim SR. The effect of ferulic acid against lead-induced oxidative stress and DNA damage in kidney and testes of rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019; 26(31):31675–31684.

89. 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.
90. 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):1565–1572.
91. Dibal NI, Garba SH, Jacks TW. Morphological Assessment of Epididymal Sperm in Wistar Rats Using Different Histological Stains. *Acta Veterinaria Eurasia*. 2020; 46(3):132–137.
92. Terryn C, Sellami M, Fichel C, Diebold MD, Gangloff S, Le Naour R, et al. Rapid method of quantification of tight-junction organization using image analysis. *Cytometry Part A*. 2013; 83(2):235–241.
93. Cilingir S, Acikel-Elmas M, Arbak S, Kolgazi M. Ferulic acid attenuates pancreaticobiliary duct occlusion-induced inflammation in both pancreas and liver. *Inflammopharmacology*. 2023; 31(2):997–1008.
94. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*. 2010; 5(1):51.
95. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004; 37(4):277–285.
96. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005; 38(12):1103–1111.
97. Chakraborty SP. Patho-physiological and toxicological aspects of monosodium glutamate. *Toxicol Mech Methods*. 2019; 29(6):389–396.
98. Abdulsalam H, Adamu S, Sambo SJ, Chiroma MA, Gadzama JJ, Mohzo DL, et al. Monosodium glutamate-induced changes on plasma markers of pancreatic function in adult male Wistar rats. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*. 2018;16(2):21–27.
99. Eweka A, Igbigbi P, Ucheya R. Histochemical Studies of the Effects of Monosodium Glutamate on the Liver of Adult Wistar Rats. *Ann Med Health Sci Res*. 2011 Jun 28;1(1):21.
100. Xu J, Tang M, Liu Y, Xu J, Xu X. Safety assessment of monosodium glutamate based on intestinal function and flora in mice. *Food Science and Human Wellness*. 2022; 11(1):155–164.
101. Kianifard D, Shoar SMM, Karkan MF, Aly A. Effects of monosodium glutamate on testicular structural and functional alterations induced by quinine therapy in rat: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*. 2021; 19(2):167.

102. He K, Zhao L, Daviglus ML, Dyer AR, Van Horn L, Garside D, et al. Association of monosodium glutamate intake with overweight in Chinese adults: the INTERMAP study. *Obesity*. 2008; 16(8):1875-1880.
103. Bahadoran Z, Mirmiran P, Ghasemi A. Monosodium glutamate (MSG)-induced animal model of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol*. 2019; 1916:49–65.
104. Kumar A, Vinodini N, Gowda M, Hegde KS, Damodara K. Role of ascorbic acid in monosodium glutamate mediated effect on testicular weight, sperm morphology and sperm count, in rat testis. *Article in Journal of Chinese Clinical Medicine*. 2008; 3:1-5.
105. Eniola K, Omotoso O, Kadir RE, Omotoso GO, Balogun TJ, Oyewopo AO. Effects of monosodium glutamate on semen quality and the cytoarchitecture of the testis of adult Wistar rats. *International Journal of Biomedical and Health Sciences*. 2011;7(1):39-46.
106. 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.
107. Das RS, Ghosh SK. Long term effects of monosodium glutamate on spermatogenesis following neonatal exposure in albino mice-a histological study. *Nepal Med Coll J*. 2010;12(3):149–153.
108. Hasanein P, Fazeli F, Parviz M, Roghani M. Ferulic acid prevents lead-induced testicular oxidative stress and suppressed spermatogenesis in rats. *Andrologia*. 2018;50(1).
109. Shaha C, Tripathi R, Prasad Mishra D. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010; 365(1546):1501.
110. Thyagaraju BM, Muralidhara. Ferulic acid supplements abrogate oxidative impairments in liver and testis in the streptozotocin-diabetic rat. *Zoolog Sci*. 2008; 25(8):854–860.
111. Hilary S, Mohamed O, Platat C, Qureshi MA, Kizhakkayil J, Al-Meqbaali F, et al. Supplemental ferulic acid does not affect metabolic markers and improves some oxidative damage parameters in diabetic rats. *Heliyon*. 2023;9(6).
112. Roy S, Metya SK, Rahaman N, Sannigrahi S, Ahmed F. Ferulic acid in the treatment of post-diabetes testicular damage: relevance to the down regulation of apoptosis correlates with antioxidant status via modulation of TGF- β 1, IL-1 β and Akt signalling. *Cell Biochem Funct*. 2014; 32(1):115–124.
113. Kassab RB, Lokman MS, Daabo HMA, Gaber DA, Habotta OA, Hafez MM, et al. Ferulic acid influences Nrf2 activation to restore testicular tissue from cadmium-induced oxidative challenge, inflammation, and apoptosis in rats. *J Food Biochem*. 2020 ; 44(12).

114. Pei Y, Yang L, Wu L, He H, Geng G, Xu D, et al. Combined effect of apigenin and ferulic acid on frozen-thawed boar sperm quality. *Anim Sci J*. 2018 Jul 1;89(7):956–65.
115. Koçak G, Yıldız C. The effects of ferulic acid, tryptophan, and L-glutamine on the cryopreservation of mouse spermatozoa. *Biopreserv Biobank*. 2023.
116. Fidan B, Liman N.. Memeli testisinde kan-tTestis bariyeri'nin bileşenleri ve üreme ile ilişkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2023; 20(2):141–151.
117. Mruk DD, Cheng CY. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. *Endocr Rev*. 2015; 36(5):564.
118. 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):1865–1877.
119. Jianliang X, Anuar F, Ali SM, Mei YN, Phua DCY, Hunziker W. Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility. *Mol Biol Cell*. 2009; 20(20):4268–4277.
120. Kabbesh H, Riaz MA, Jensen AD, Scheiner-Bobis G, Konrad L. Long-term maintenance of viable adult rat Sertoli cells able to establish testis barrier components and function in response to androgens. *Cells*. 2021; 10(9),2405.
121. Schimenti KJ, Feuer SK, Griffin LB, Graham NR, Bovet CA, Hartford S, et al. AKAP9 is essential for spermatogenesis and Sertoli cell maturation in mice. *Genetics*. 2013; 194(2):447–457.
122. Xu HY, Zhang HX, Xiao Z, Qiao J, Li R. Regulation of anti-Müllerian hormone (AMH) in males and the associations of serum AMH with the disorders of male fertility. *Asian J Androl*. 2019; 21(2):109.
123. Rey RA, Grinspon RP. Anti-Müllerian hormone, testicular descent and cryptorchidism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024; 15.
124. Cate RL, di Clemente N, Racine C, Groome NP, Pepinsky RB, Whitty A. The anti-Müllerian hormone prodomain is displaced from the hormone/prodomain complex upon bivalent binding to the hormone receptor. *J Biol Chem*. 2022; 298(1).
125. Edelsztein NY, Valeri C, Lovaisa MM, Schteingart HF, Rey RA. AMH regulation by steroids in the mammalian testis: underlying mechanisms and clinical implications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13.
126. Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing müllerian inhibiting substance. *Nature*. 1990; 345(6271):167–170.

127. Levi M, Hasky N, Stemmer SM, Shalgi R, Ben-Aharon I. Anti-Müllerian hormone is a marker for chemotherapy-induced testicular toxicity. *Endocrinology*. 2015; 156(10):3818–3827.
128. Chu PL, Liu HS, Wang C, Lin CY. Association between acrylamide exposure and sex hormones in males: NHANES, 2003–2004. *PLoS One*. 2020; 15(6).
129. Sarhan NR. The ameliorating effect of sodium selenite on the histological changes and expression of Caspase-3 in the testis of monosodium glutamate-treated rats: light and electron microscopic study. *J Microsc Ultrastruct*. 2018; 6(2):105-115.
130. 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):170–183.
131. Pan J, He H, Su Y, Zheng G, Wu J, Liu S, et al. GST-TAT-SOD: cell permeable bifunctional antioxidant enzyme—a potential selective radioprotector. *Oxid Med Cell Longev*. 2016.
132. Koksall M, Oğuz E, Baba F, Ali EM, Ciftci H, Demir ME, et al. Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012; 16(5):582-588.
133. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM. Oxidative stress indexes for diagnosis of health or disease in humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2019.
134. 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; 1:1037–1045.
135. Saçık U, Çavdar Z, Ural C, Ersoy N, Özoğul C, Erbil G. Effect of ferulic acid on testicular damage caused by torsion-detorsion in rats. *Biotechnic & Histochemistry*. 2023; 98(2):77–85.
136. Emmanuel NS, Tanko Y, Bako IG, Mohammed A. Assessment of systemic oxidative stress biomarkers and serum electrolytes in lactating Wistar rats following oral administration of monosodium L-glutamate (MSG). *Dutse Journal of Pure and Applied Sciences (DUJOPAS)*. 2020; 6(4):131–138.
137. Turkmen R, Akosman MS, Demirel HH. Protective effect of N-acetylcysteine on MK-801-induced testicular oxidative stress in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 109:1988–1993.
138. Pinar N, Çakırca G, Özgür T, Kaplan M. The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 97:1486–1492.

8 EKLER

EK 1 Etik Kurul Onayı



SAYI: HDK-2022/72
KONU: ACU-HADYЕК 2022/72 sayılı başvurunuz

09.11.2022

Sn. Dr. Öğretim Üyesi Merve Açikel ELMAS

ACU-HADYЕК 2022/72 sayılı “ **Monosodyum Glutamat ile İndüklenen Testis Hasarında Ferulik Asit’in Fertilite Üzerine Olası İyileştirici Etkisinin Biyokimyasal ve Morfolojik Yöntemlerle Araştırılması** ” isimli projeniz Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun **10.11.2022** tarihli **11.** toplantısında incelenmiş ve **etik açıdan uygun bulunmuştur.**

2022/72 sayılı karar ektedir.

EK 1 Etik Kurul Onayı (devam)



ACIBADEM
MEHMET ALİ AYDINLAR
ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (ACU-HADYEK) KARAR FORMU

BAŞVURU TARİHİ: 09.11.2022	KARAR TARİHİ: 09.11.2022		
BAŞVURU SAYISI: 2022/72	KARAR SAYISI: 2022/72		
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD'dan Dr.Öğretim Üyesi Merve Açıknel ELMAS'ın yürütücüsü olduğu "Monosodyum Glutamat ile İndüklenen Testis Hasarında Ferulik Asit'in Fertilite Üzerine Olası İyileştirici Etkisinin Biyokimyasal ve Morfolojik Yöntemlerle Araştırılması" isimli proje başvurusu ACU-HADYEK'in "09.11.2022" tarih ve "11" sayılı toplantısında görüşülmüş ve etik açıdan ☒ Uygun ☐ Düzeltmesi Gerekir ☐ Koşullu Olarak Uygun ☐ Uygun Değil olarak değerlendirilmiştir.			
Kurul Üyesi	İmza	Karara Katılıyorum	Karara Katılmıyorum
Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan)			()
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan V.)			()
Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman			()
Prof. Dr. Halime KENAR			()
Doç. Dr. Devrim Öz Arslan			()
Doç. Dr. Emel TİMUÇİN			()
Dr. Öğr. Üyesi Elif KESKİNÖZ			()
Dr. Öğr. Üyesi Melis YAVUZ			()
Dr. Öğr. Üyesi Gözde ARITICI ÇOLAK			()
Dr. Öğr. Üyesi Perinur BOZAYKUT EKER			()
Vet. Hek. Samed Özer			()
Sabiha TURGUT GENÇ			()
İpek YÜKSEL			()

9 ÖZGEÇMİŞ

