



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİFOSAT BAZLI HERBİSİTE MARUZ BIRAKILAN FARELERDE
KOENZİM Q10'IN TESTİS TOKSİSİTESİ ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ**

Veteriner Hekim Kader ÇOBAN ÖZBEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Duygu MUTLUAY KÖSE

BURDUR-2025

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİFOSAT BAZLI HERBİSİTE MARUZ BIRAKILAN FARELERDE
KOENZİM Q10'İN TESTİS TOKSİSİTESİ ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ**

Kader ÇOBAN ÖZBEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Duygu MUTLUAY KÖSE

Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1002-B Hızlı Destek Programı kapsamında (Proje No: 124O671) ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (Proje No: 0999-YL-24) desteklenmiştir.

BURDUR-2025

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Kader Çoban Özbek tarafından *Doç. Dr. Duygu Mutluay Köse* yönetiminde hazırlanan “*Glifosat Bazlı Herbisite Maruz Bırakılan Farelerde Koenzim Q10’in Testis Toksisitesi Üzerine Koruyucu Etkisi*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 21/07/2025

Doç. Dr. Gözde YÜCEL TENKEKİ
Ankara Üniversitesi
Başkan

Doç. Dr. Duygu MUTLUAY
KÖSE
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi
Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Seda YAKUT
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu / /2025 Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan ADANIR
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca yalnızca bilgi ve deneyimiyle değil; anlayışı, sabrı ve içten desteğiyle de her zaman yanımda olan çok kıymetli danışmanım Doç. Dr. Duygu Mutluay'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Akademik gelişimime yön veren katkılarının yanı sıra, bu süreci zorlaştırmak yerine kolaylaştıran yaklaşımı, yapıcı, destekleyici ve sahiplenici tutumu benim için paha biçilmezdi. Annelik sorumluluklarıyla birlikte yürütmek zorunda olduğum bu yoğun dönemde, bana yalnızca akademik değil, insani anlamda da güç veren; varlığıyla yolumu aydınlatan bir danışmandan çok daha fazlasıydı. Kendisine hem bir akademisyen hem de bir insan olarak duyduğum derin minnettarlığı ifade etmek isterim.

Tez çalışmam boyunca akademik bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan Doç. Dr. Gözde Yücel Tenekeci'ye, Doç. Dr. Şükrü Güngör'e, Dr. Öğr. Üyesi Seda Yakut'a ve Araş. Gör. Rüveyda Hilal Akı'ya; yol göstericilikleri, samimi yaklaşımları ve sabırları için gönülden teşekkür ederim.

Varlığını her an yanımda hissettiren, iyi günde kötü günde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım eşim, Veteriner Hekim Burak Mert Özbek'e sonsuz gönül bağımıla teşekkür ederim.

Ve bu yolculuğa en güzel sürpriz olarak katılan, varlığıyla hayatıma bambaşka bir anlam katan canım oğlum Kutay Han Özbek... Hayatımda yeni bir sayfa açarak bu süreci daha da özel kıldığın için minnettarım. Senden aldığım güç, umut ve sevgi sayesinde bu süreci tamamlamak mümkün oldu.

Hepinize kalpten teşekkür ederim.

ETİK BEYAN

“Glifosat Bazlı Herbisite Maruz Bırakılan Farelerde Koenzim Q10’in Testis Toksisitesi Üzerine Koruyucu Etkisi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Duygu Mutluay KÖSE danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kader ÇOBAN ÖZBEK

Tarih: 21/07/2025

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Üreme Sistemi	4
2.1.1. Erkek Genital Sistem	4
2.1.2. Testisin Yapısı (Anatomisi)	5
2.1.3. Testisin Histolojisi	6
2.1.3.1. Tubulus Seminiferis Kontortus	7
2.1.3.2. Kan-Testis Bariyeri	8
2.1.3.3. Spermatogenezis	9
2.1.3.3.1. Spermatogenik Siklus Dönemleri	11
2.1.3.3.2. Proliferasyon (Mitoz / Spermatositogenezis)	15
2.1.3.3.3. Mayoz	16
2.1.3.3.4. Farklılaşma (Spermiyogenezis)	16
2.1.4. İntersitisyel Doku	17
2.1.5. Leydig Hücreleri	18
2.1.5.1. Testosteron	19
2.1.6. Spermatogenezisin Hormonal Kontrolü	19
2.1.7. Spermatozoonun Yapısı (Anatomisi)	20
2.1.7.1. Sperm Şekil (Morfoloji) Bozuklukları	22
2.1.7.2. Baş Yapısı Bozuklukları	23
2.1.7.3. Gövde Yapısı Bozuklukları	24
2.1.7.4. Kuyruk Yapısı Bozuklukları	25
2.1.8. Eşey Hücrelerini İleten Yollar	26
2.1.8.1. Tubulus Seminiferus Rektus	26
2.1.8.2. Rete Testis	27
2.1.8.3. Epididimis	27
2.1.8.4. Duktus Deferens	28
2.1.9. İlk Spermatogenik Dalga	28
2.1.10. Sperm Hareket (Motilite) Bozuklukları	29
2.2. Glifosat'ın Kimyasal Yapısı, Kaynakları ve Farmakolojik Özellikleri	30
2.2.1. Roundup	33
2.2.2. Glifosat'ın Etki Şekli	34
2.2.3. Glifosat'ın Erkek Genital Sistem Üzerine Etkileri	35
2.2.4. Glifosat'ın Oksidatif Stres Üzerine Etkileri	36
2.3. Koenzim Q10 (CoQ10)'in Kimyasal Yapısı, Kaynakları ve	

Farmakolojik Özellikleri	39
2.4 NF- κ B /TLR4 Yolaklarının Histolojik Etkileri	41
2.5. Nrf2/HO-1/Keap1 Yolağının Testiküler Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri	43
3. GEREÇ ve YÖNTEM	46
3.1. Gereçler	46
3.1.1. Kullanılan Hayvan Materyali	46
3.1.2.Çalışmada Kullanılan Maddelerin Hazırlanması, Doz Seçimi ve Uygulama Grupları	47
3.1.2.1. Glifosat Maddesinin Hazırlanması ve Doz Seçimi	47
3.1.2.2 Koenzim Q10 (CoQ10) Maddesinin Hazırlanması ve Doz seçimi	48
3.1.2.3 Uygulama Gruplar ve Doz Seçimi	49
3.2. Yöntemler	49
3.2.1. Vücut ve Testis Ağırlıkları İle Histolojik ve Histopatolojik İnceleme Prosedürleri	49
3.2.2. İmmünohistokimya	51
3.2.3. Biyokimyasal Analizler İçin Testiküler Doku Homojenizasyonu	51
3.2.4. Testiküler Dokuda Lipid Peroksidasyonu, Oksidatif Stres ve Antioksidan Kapasite Ölçümleri	52
3.2.5 Western Blot Analiz Yöntemi	52
3.2.6. Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi ve Akım (Flow) Sitometrisi Analizleri	53
3.2.7. Serum Hormonlarının Kantitatif Analizi	54
3.2.8. İstatistiksel Analizler	54
4. BULGULAR	55
4.1. Vücut Ağırlığı, Mutlak ve Relatif Testis Ağırlığı Bulguları	55
4.2. Histopatolojik Değişikliklere İlişkin Bulgular	56
4.3. Oksidatif Stres Belirteçleri İlişkin Bulgular	61
4.4. Nrf2/Keap1/HO-1 Sinyal Yolağına Ait Bulgular	62
4.5. NF- κ B/TLR4 Sinyal Yolağına Ait Bulgular	66
4.6. Apoptoz Belirteçlerine İlişkin Bulgular	66
4.7. Serum LH ve Testosteron Değerlerine Ait Bulgular	66
4.8. Sperm Parametreleriyle İlişkili Bulgular	67
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	75
7. KAYNAKÇA	76
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Memeli testis ve epididimisin kesitsel anatomik yapısı	7
Şekil 2.2.	Spermatogenezisin fazları	10
Şekil 2.3.	Spermatogenez döngüsü	15
Şekil 2.4.	Normal morfolojiye sahip fare spermlerinin mikroskopik görüntüsü	22
Şekil 2.5.	Sperm yapı bozuklukları	23
Şekil 2.6.	Normal ve anormal sperm yapıları	24
Şekil 2.7.	Sperm yapı bozuklukları görünüşleri	26
Şekil 2.8.	Glifosat'ın etki şekli	31
Şekil 2.9.	Glifosat'ın mikrobiyal mekanizması	32
Şekil 4.1.	Testiküler histopatolojik bulgular	58
Şekil 4.2.	Testis dokusunda immünohistokimyasal yöntemle belirlenmiş olan ki-67 ekspresyonu ve histopatolojik değişiklikler	60
Şekil 4.3.	Deney grupları arasında oksidatif denge ile üreme hormonu düzeylerinin karşılaştırılması	62
Şekil 4.4.	Deney gruplarında oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyleri	63
Şekil 4.5.	Testis dokusunda immünohistokimyasal boyama yöntemiyle belirlenmiş olan nrf2 ekspresyonu	65
Şekil 4.6.	Glifosat grubu fare spermalarında görülen anomaliler	68
Şekil 4.7.	Glifosat grubundaki farelerden alınan sperm örneklerinde canlı ve ölü spermatozoonların mikroskopik görünümü, eosin-nigrosin boyası	69

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Deney gruplarına ait uygulama protokolü ve deneysel işlem basamakları.	48
Tablo 3.2.	Cosentino histolojik skörlama sistemi.	51
Tablo 4.1.	Gruplara göre testis ve vücut ağırlığı parametreleri.	56
Tablo 4.2.	Deney gruplarına göre cosentino histolojik skörlama dağılımı.	57
Tablo 4.3.	CoQ10 uygulamasının sperm konsantrasyonu, plazma zarı bütünlüğü ve sperm morfolojisi üzerine etkileri.	69
Tablo 4.4.	CoQ10 uygulamasının mitokondriyal ros seviyeleri, akrozom bütünlüğü, sperm canlılığı ve motilitesi üzerine etkileri	70

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
AB	Avrupa birliği
ABD	Amerika birleşik devletleri
ABP	Androjen bağlayıcı hormon
ADI	Kabul edilebilir günlük alım miktarı
AMH	Anti-müllerian hormon
AMPA	Aminometil-fosfonik asit
AOEL	Kabul edilebilir maruz kalma düzeyi
ATP	Adenozin trifosfat
KAT	Katalaz
CoQ10	Koenzim q10
DNA	Deoksiribonükleik asit
E2	Endokrin hormonu
EDC	Endokrin bozucu kimyasallar
EDCs	Endokrin sistemi bozan kimyasallar
EFSA	Avrupa gıda güvenliği otoritesi
EPA	Amerika çevre koruma ajansı
EPSPS	5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentetaz
FAO	Birleşmiş milletler gıda ve tarım örgütü
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GBH	Glifosat bazlı herbisitler
GDO	Genetiği değiştirilmiş organizma
GLY	Glifosat
GNRH	Gonadotropin-releasing hormon
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
H&E	Hematoksilin-eozin
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HOST	Hipo-ozmotik şişme testi
HPG	Hipotalamus-hipofiz-gonad
IARC	Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
InsI3	İnsülin benzeri 3 hormon
IV	İntravenöz

Kg	Kilogram
L	Litre
LD50	Ortalama öldürücü doz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	Lüteinleştirici hormon
LPO	Lipid peroksidasyonu
MAKÜ	Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
MitoSOX	Mitokondriye çzğü süperoksit belirteci
MRL	Maksimum kalıntı limiti
m-RNA	Mesajcı ribonukleik asit
MTA	Mutlak testis ağırlığı
NMDA	N-metil-d-aspartat
NOAEL	Hiçbir yan etkinin gözlenmediği düzey
NR1D1	Nükleer reseptör geni
OSI	Oksidatif stres indeksi
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PAS	Periodik asit schiff
Pg	Progesteron
PMAI	Sperm plazma membranı ve akrozom bütünlüğü
POEA	Polioksietilen donyağı amini
ppm	Milyonda bir
R	Roundup
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SD	Sprague dawley sıçanı
SKOV-3	Overian kanser hücresi
SOD	Süperoksit dismutaz
SVA	Son vücut ağırlığı
TAS	Toplam antioksidan seviyesi
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
TOB	T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı
TOS	Toplam oksidan seviyesi
TÜİK	Türkiye istatistik kurumu
WHO	Dünya sağılık örgütü

ÖZET

Farelerde Glifosat Bazlı Herbisit Maruziyeti: Koenzim Q10'un Testis Toksisitesi Üzerindeki Koruyucu Etkisi

En yaygın kullanılan glifosat bazlı herbisit (GBH) olan Roundup, etkin bileşeni olarak glifosat (GLY) içerir ve bu çalışmada GBH'ye bağlı üreme toksisitesini modellemek amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, GLY kaynaklı testiküler ve sperm hasarına karşı Koenzim Q10'un (CoQ10) koruyucu rolünü araştırmak; özellikle oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz yolları üzerine etkilerini incelemektir. Kırk iki adet erişkin erkek ICR fare beş gruba ayrıldı: kontrol (herhangi bir uygulama yapılmadı), sham, CoQ10 (200 mg/kg-VA/gün), GLY (Roundup-500 mg/kg-VA/gün) ve GLY+CoQ10 (Roundup-500 mg/kg-VA/gün + CoQ10-200 mg/kg-VA/gün). Tüm uygulamalar oral yolla 35 gün boyunca gerçekleştirildi. Histopatolojik, immünohistokimyasal (Ki-67, Nrf2), biyokimyasal (MDA, GSH, TAS, TOS, OSI), hormonal (testosteron, LH) ve moleküler (Western blot: Nrf2, Keap1, HO-1, TLR4, NF-κB, Bax, Bcl-2) analizler yapıldı. Ayrıca konvansiyonel ve fonksiyonel sperm parametreleri de değerlendirildi. GLY'nin testis ağırlığında azalmaya ve histolojik hasara neden olduğu, ancak bu olumsuz etkilerin CoQ10 uygulamasıyla iyileşme gösterdiği belirlenmiştir. GLY uygulaması, oksidatif stres belirteçlerini artırmış (↑MDA, TOS, OSI; ↓GSH, TAS), buna karşılık CoQ10 tedavisi redoks dengesini anlamlı şekilde yeniden sağlamıştır. GLY, Nrf2/Keap1/HO-1 antioksidan yolunu baskımlarken, CoQ10 bu yolu yeniden aktive etmiştir. GLY ile uyarılan TLR4/NF-κB aracılı inflamatuvar sinyal yolu CoQ10 uygulamasıyla baskılanmıştır. Ayrıca, GLY apoptozu tetiklemiş (↑Bax, ↓Bcl-2), CoQ10 ise bu süreci tersine çevirmiştir. GLY, sperm motilitesi, canlılığı ve zar bütünlüğünü azaltırken, CoQ10 bu parametreler üzerinde iyileştirici etkiler göstermiştir. Hormon analizlerinde, GLY grubunda testosteron seviyeleri düşerken, LH seviyelerinde artış gözlenmiş; CoQ10 ise testosteron seviyelerini normale yaklaştırmış ve LH düzeylerini kısmen dengelemiştir. Sonuç olarak, CoQ10'un, GLY kaynaklı testiküler toksisiteyi oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz mekanizmalarını modüle ederek hafiflettiği ve erkek üreme sağlığının korunmasında terapötik bir potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Glifosat, Koenzim Q10, Nrf2/Keap1/HO-1 Yolağı, Oksidatif Stres, Sperm Kalitesi, Testis Toksisitesi

ABSTRACT

Glyphosate-based herbicide exposure in rats: protective effect of coenzyme q10 on testicular toxicity

Roundup, the most widely used glyphosate-based herbicide (GBH), contains glyphosate (GLY) as its main active ingredient and was used in this study to model GBH-induced reproductive toxicity. This study aimed to investigate the protective role of Coenzyme Q10 (CoQ10) against GLY-related testicular and sperm damage, focusing on oxidative stress, inflammation, and apoptosis pathways. Forty-two adult male ICR mice were divided into five groups: control (no treatment), sham, CoQ10 (200 mg/kg-BW/day), GLY (Roundup-500 mg/kg-BW/day), and GLY+CoQ10 (Roundup-500 mg/kg-BW/day + CoQ10-200 mg/kg-BW/day). All treatments were administered orally for 35 days. Histopathological, immunohistochemical (Ki-67, Nrf2), biochemical (MDA, GSH, TAS, TOS, OSI), hormonal (testosterone, LH), and molecular (Western blot: Nrf2, Keap1, HO-1, TLR4, NF- κ B, Bax, Bcl-2) analyses were conducted. Conventional and functional sperm parameters were also assessed. GLY reduced testicular weight and disrupted histoarchitecture, which was ameliorated by CoQ10. GLY increased oxidative stress markers ($\uparrow$ MDA, TOS, OSI; $\downarrow$ GSH, TAS), while CoQ10 significantly restored redox balance. GLY suppressed the Nrf2/Keap1/HO-1 antioxidant pathway; CoQ10 reactivated it. TLR4/NF- κ B inflammatory signaling was upregulated by GLY and downregulated by CoQ10. GLY induced apoptosis ($\uparrow$ Bax, $\downarrow$ Bcl-2), which was reversed by CoQ10. Sperm motility, viability, and membrane integrity declined with GLY but improved with CoQ10. Hormonal analysis showed reduced testosterone and elevated LH in the GLY group; CoQ10 normalized testosterone and partially corrected LH levels. In conclusion, CoQ10 mitigated GLY-induced testicular toxicity by modulating oxidative stress, inflammation, and apoptosis, highlighting its therapeutic potential for male reproductive protection.

Keywords: Glyphosate, Coenzyme Q10, Testicular toxicity, Oxidative stress, Sperm quality, Nrf2/Keap1/HO-1 pathway

1. GİRİŞ

Ülkemizde yetiştirilen tarım ürünlerini ekonomik açıdan olumsuz etkileyen yaklaşık beş yüz hastalık etmeni oluşturabilen zararlı ve yabancı otlar bulunmaktadır. Bu yabancı otlar, kültür bitkileriyle rekabet edip verim kayıplarına neden olmaktadır. Verim kayıplarını minimize etmek için yaygın olarak kullanılan zirai mücadele yöntemi tarım ilaçlarının, yani pestisitlerin kullanımıdır. Pestisitler, genel olarak tarım ürünlerinin veya hayvansal gıdaların üretimi, hasatı, depolanması ve taşınması sırasında ürünlere zarar veren böcekleri, yabancı otları, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları kontrol etmek veya bu zararların önlenmesine yardımcı olmak için kullanılan kimyasal maddeler veya madde karışımını ifade eder (Kurtoglu, 2020).

Son yıllarda, tarımda kullanılan geniş spektrumlu bir herbisit olan ve N-(fosfonometil) glisin olarak da bilinen Glifosat (GLY) yaklaşık 100 yabancı ot türüne ve yaklaşık 60 tür çok yıllık ot türüne karşı etkili olması sebebiyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. GLY ilk kez kimyager Henry Martin tarafından 1950'de aminoasit glisin türeviden sentezlenmiş olup, sadece yirmi yıl sonra John Franz (Monsanto) tarafından herbisit formülasyonlarında kullanılmıştır (Muñoz ve ark., 2021). Glifosat bazlı herbisitler (GBH) arasında en bilineni, Monsanto tarafından üretilen Roundup® (R)'tir (Serra ve ark., 2021). Bu bileşikler Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere uzun yıllar boyunca güvenli olduğu varsayılarak kullanılmıştır (EFSA, 1993). GLY'nin bitkiler üzerinde kullanıldıktan sonra toprakta ve suda bulunmaya devam etmektedir (Muñoz ve ark., 2021). Birçok çalışma, R gibi GBH'lerin uygulandığı topraklarda yetiştirilen bitkilerde (Shumilina ve ark., 2020; Singh ve ark., 2020), suda birikme yeteneği olduğunu ve buradan gıda zinciri aracılığıyla hayvan dokularına geçişini göstermiştir (van Bruggen ve ark., 2018; Carles ve ark., 2019). Glifosat, insan idrar örneklerinde (genellikle 4 µg/L'den daha az) bulunmuş, örneğin ABD gibi tarımda daha yaygın kullanıldığı ülkelerde yaşayan popülasyonlarda daha yüksek (7,6 µg/L) konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Gıda yoluyla veya mesleki maruziyet yoluyla insanlar dışında, çiftlik hayvanları, balıklar, vahşi yaşam da GLY tehdidi ile karşı karşıyadır. (Verderame ve ark., 2022).

Koenzim Q10 (CoQ10), tüm dokularda sentezlenen bir 1,4-benzoquinone bileşimidir (Crane ve ark., 2001). CoQ10, ökaryot hücrelerin mitokondrisinde yoğunlaşmış bir bileşiktir ve burada elektron taşıma zincirinde anahtar bir element olarak işlev görerek enerji üretiminde rol oynayan önemli bir faktördür. CoQ10 takviyesinin, kalp hastalığı ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisi ve önlenmesinde faydaları olduğu gösterilmiştir (El-Khadragy ve ark., 2020). Ayrıca, CoQ10, oksijen bazlı radikallerle etkileşime girerek lipid peroksidasyonunun başlamasını ve bimoleküler hasarı önleyerek antioksidan etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Bonakdar ve Guarneri, 2005). Bu faydalar, CoQ10'un belgelenmiş antioksidan ve anti-enflamatuar özellikleri ile ilişkilidir. CoQ10, doğal olarak seminal sıvıda bulunur ve semenin birkaç temel özelliğini artırmada merkezi bir rol oynar. CoQ10 eksikliği, bozulmuş sperm parametreleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, infertil erkeklerde tedavi amaçlı birkaç çalışmada kullanılmıştır. Sperm yoğunluğunu, sperm motilitesini, sperm morfolojisini ve sperm sayısını artırmaktadır. İdiopatik oligoastenoteratozoospermia hastalığına sahip bireylerde yapılan bir çalışma, CoQ10'un sperm konsantrasyonunu ve motilitesini artırma yeteneğini ve bunun antioksidan kapasite ve enzimatik antioksidan aktivite artışı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (El-Khadragy ve ark., 2020). Ayrıca, araştırmacılar CoQ10'ın erkek üreme sistemleri üzerinde antiapoptotik bir etkisi olabileceğini bildirmişlerdir (Erol ve ark., 2010).

Bu projede, glifosat maruziyetinin erkek üreme sistemi üzerindeki zararlı etkileri deneysel olarak değerlendirilmiş; bu bağlamda testis dokusu, sperm parametreleri, hormonal denge, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz mekanizmaları çok yönlü analizlerle incelenmiştir. Aynı zamanda, güçlü bir antioksidan bileşik olan CoQ10, glifosat kaynaklı bu olumsuz biyolojik süreçleri ne ölçüde modüle edebileceği araştırılmıştır. Çalışma kapsamında, Nrf2/Keap1/HO-1 antioksidan savunma yolu ile TLR4/NF- κ B inflammatuar sinyal yolunun Glifosat ve CoQ10 etkileşimleriyle nasıl düzenlendiği, histopatolojik, immünohistokimyasal, biyokimyasal, hormonal ve moleküler düzeyde ayrıntılı olarak ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar, CoQ10'un glifosat kaynaklı testiküler hasarı anlamlı ölçüde hafiflettiğini ve sperm kalitesi ile hormonal denge üzerinde koruyucu etkiler

gösterdiğini ortaya koyarak, bu maddenin erkek üreme sağlığının korunmasında potansiyel bir ajan olabileceğini göstermiştir. Bu araştırma, yüksek lisans tezinin temelini oluşturan testiküler toksisite, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz üzerine kurulu hipotezinin doğrulandığını ortaya koymakta; aynı zamanda CoQ10'un terapötik etkilerinin anlaşılmasına katkı sunmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üreme Sistemi

2.1.1. Erkek Genital Sistem

Erkek üreme sistemi, iç yapılar (testisler, epididimis, vas deferens, prostat) ve dış yapılar (skrotum ve penis) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bu yapılar, spermin oluşumu, depolanması ve döllenme için ejakülasyonu desteklemek amacıyla yoğun damar ağına, birçok beze ve kanala sahiptir. Ayrıca erkek gelişimi için önemli androjenlerin üretilmesine katkıda bulunurlar (Tiwana ve Leslie, 2023).

Erkek üreme sistemi, sperm üreterek bu spermleri dışı üreme kanalına transfer etme işlevini yerine getirir. Her iki testiste de oldukça kıvrımlı ve küçük yapıdaki sperm kanalcıkları, yani seminifer tübülleri bulunur. Bu kanalcıklar, beyindeki hipofiz bezinden salgılanan Folikül Uyarıcı Hormonun (FSH) etkisiyle sperm hücrelerini üretir.

FSH, özellikle seminifer tübüllerde bulunan Sertoli hücrelerini uyarak sperm hücrelerinin gelişimini ve olgunlaşmasını destekler. Ancak sperm üretimi yalnızca FSH etkisiyle gerçekleşmez. Bu süreç için ayrıca Luteinize Edici Hormonun (LH) da gerekli olduğu bilinmektedir.

LH, testislerdeki Leydig hücrelerini uyarak testosteron salgılanmasını sağlar ve testosteron, spermatogenezin devamı için temel bir hormon olarak görev yapar. Sonuç olarak, spermatogenez süreci FSH ve LH'nin eşgüdümlü etkileriyle düzenlenir (Kantarci ve ark., 2012). Spermatozoonlar, düz kas hücrelerinin kasılması ve genital kanal bezlerinin salgılanmasıyla dışarı iletilir. Genital kanal ve yardımcı bezlerin salgıları aynı zamanda spermatozoonları beslemektedir (Junqueira ve ark., 2006).

2.1.2. Testisin Yapısı (Anatomisi)

Testislerin şekli, türler arasında değişiklik göstermektedir. Fare, rat, tavşan ve kobaylarda testisler genel olarak oval bir yapıya sahiptir. Bu yapının tavşanlarda yanlardan basık, kobaylarda dolgun ve fare ile ratlarda ise yuvarlağa yakın olduğu bildirilmiştir (Gren, 1966; Cooper ve Schiller 1976). Fare ve ratlarda doğum sırasında karın boşluğunda bulunan testisler, doğumdan 4 ila 6 hafta sonra skrotal keseye iner. Skrotum, preputium ile anüs arasında yer almakta olup, bu türlerde canalis inguinalis ömür boyu açık kaldığından testisler genellikle vücut boşluğunun arka kısmına ve idrar kesesinin iki yanına çekilmiş durumdadır. Testislerin konumu, çevresel sıcaklık, hayvanın yatma pozisyonu ve üreme işlevi gibi faktörlere bağlı olarak karın, kasık veya skrotal bölgede olabilir (Gren 1963; Chiasson 1994). Tavşanlarda ise testis, doğumdan yaklaşık 10 ila 12 hafta sonra penisin önünde yer alan skrotuma iner. Skrotum, penisin her iki yanında ve bacakların arasında bulunur. Bu türde testisin uzun eksenini vücut eksenine hafif bir eğim gösterir (McLaughlin ve Chiasson 1990). Kobaylarda ise testis, bacaklar arasında, penisin ön-dış kısmında ve tavşanlara göre daha önde konumlanır (Cooper ve Schiller 1976).

Testis, anatomik olarak iki yüz ve iki kenardan oluşur. Dışa bakan yüze facies lateralis, içe bakan yüze facies medialis denir. Testisin kenarlarından biri dışbükey olup "margo liber" olarak adlandırılırken, epididimis korpusunun yapıştığı kenar "margo epididymalis" olarak bilinir. Testisin iki ucu bulunur; epididimisin kuyruğuna temas eden uca "extremitas caudata", baş kısmına temas eden uca ise "extremitas capitata" adı verilir (Dursun, 2005; König ve Liebich, 2018).

Testis ağırlığı, hayvanın türü, ırkı, gelişim dönemi ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Örneğin, tavşanlarda testis ağırlığının vücut ağırlığına oranı 1/1700, insanlarda 1/1500 ve sıçanlarda 1/100'dür. Testis ağırlığı genellikle farelerde 0,06 gram, sıçanlarda 3-5 gram, tavşanlarda ise 8-10 gram arasında değişir (Kalkan, 2001; Ogbuewu ve ark., 2009).

Testisin kan dolaşımı, aorta abdominalis'ten ayrılan arteria testicularis ile sağlanır. Bu arter, canalis inguinalis'e girdikten sonra funiculus spermaticus

içerisinde kıvrılarak ilerler. Arteria testicularis, rami ductus deferentis ve rami epididymales dallarını verdikten sonra tunica albuginea'dan geçerek tunica vasculosa'da dağılır. Testisin toplardamarı ise vena testicularis'tir. Testis ve epididimisten gelen damarlar, plexus pampiniformis'i oluşturduktan sonra birleşerek vena testicularis'i oluşturur. Bu toplardamar, funiculus spermaticus içinde arteria testicularis ile arteriovenöz anastomoz yaparak vücut boşluğuna girer ve vena cavae caudalis'e bağlanır (Dursun, 2005; König ve Liebich, 2018).

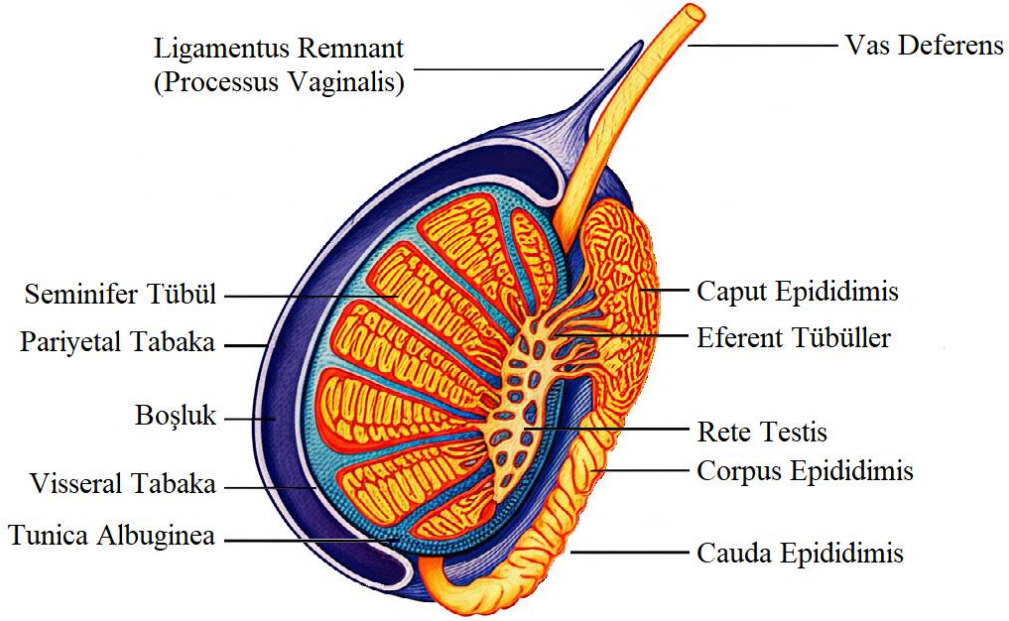
Lenf dolaşımı açısından bakıldığında, testisin lenf damarları Inn. lumbales aortici ve Inn. iliaci mediales'e açılır. Testisin lenf sıvısında hormonlar da bulunur. Sinirsel uyarımlar açısından testis, sempatik liflerini plexus mesentericus caudalis ve plexus pelvinus'tan, parasempatik liflerini ise n. vagus ve plexus pelvinus'tan alır (König ve Liebich, 2018).

2.1.3. Testisin Histolojisi

Testis, cinsiyet hormonlarının üretiminden sorumlu olan intersitisyel Leydig hücreleri sayesinde endokrin bir organ olmasının yanı sıra, spermatozoon üretimi ile de ekzokrin bir bez olarak görev yapar (Fietz ve Bergmann, 2017). Testislerin temel işlevleri, sperm ve testosteron üretimini sağlamaktır (Szmelskyj ve ark., 2015). Testis, tunica albuginea olarak bilinen kalın bir bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Bu kapsül, testisin arka kısmında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur ve testis içine doğru uzanır. Mediastinum testis, bağ dokusu septumları ile testis dokusunu yaklaşık 250 bölmeye ayırır. Bu bölmelere testiküler lobüller denir ve her bir lobül, içinde 1 ila 4 adet seminifer tübül bulundurur (O'Donnell ve ark., 2017; Jiménez-Reina ve ark., 2016).

Seminifer tübüller, çok katmanlı bir germinal epitel ile çevrilidir ve bu epitelde spermatogenik (germ) hücreler, proliferatif olmayan destek hücreleri ve Sertoli hücreleri bulunur. Seminifer tübüller, sperm hücrelerinin bölünmesi, olgunlaşması ve spermatozoonlara dönüşümü için ana işlevsel alanlardır (Eroschenko, 2017). Kıvrımlı yapıdaki bu seminifer tübüller, tubuli seminifer recti olarak devam eder ve mediastinum testiste yer alan rete testise açılır. Bu yapı, testisin

üst kısmından alt kısmına kadar uzanan tamamlanmamış bir dikey septum meydana getirir. Ayrıca, mezonefrik kanaldan gelişen 12 ila 14 elastik kanal, rete testisi epididimisin baş kısmındaki epididimal kanal ile bağlar (Fietz ve Bergmann, 2017).



Şekil 2.1. Memeli testis ve epididimisin kesitsel anatomik yapısı.

2.1.3.1. Tubulus Seminiferus Kontortus

Testis lobcukları, kör uçla başlayan 2 ila 5 adet kanalcık içerir. Bu kanalcıklar, tunika albuginea'dan başlayarak testisin merkezine doğru uzanan kıvrımlı yapıya sahip olup, tubuli seminiferi contorti olarak adlandırılır. Her bir testiste bu kanalcıklardan yaklaşık 250 ila 1000 adet bulunur. Tubuli seminiferi kontorti'nin duvarları, çok katmanlı ve karmaşık bir yapıya sahip epitel hücrelerden oluşur (Junqueira ve Carneiro, 2003; König ve Liebich, 2018).

Testisin merkezine yaklaştıkça, bu kanalcıkların lümenleri daralır ve kıvrımlarını kaybederek düzleşir. Bu noktadan sonra bu yapılar tubuli seminiferi recti olarak adlandırılır. Tubuli seminiferi recti, testisin merkezinde bulunan mediastinum testis'e açılır. Mediastinum testiste bu kanalcıklar birbirleriyle birleşerek rete testis adı verilen bir ağ oluşturur. Bu ağdan çıkan ductuli efferentes testis adlı kanallar, tunika albuginea'yı geçerek epididimise ulaşır (Junqueira ve Carneiro, 2003).

Tubuli seminiferilerin iç kısmı, germinal epitel ile kaplanmıştır. Bu epitel tabakası içinde Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreler yer alır. Kanal duvarının dış kısmında, fibröz yapıda bazal membran olan tunika propria ile çevrilidir. Kemirgenlerde bu membranın çevresinde tek katlı kasılabilir peritübüler myoid hücre tabakası bulunur. Myoid hücreler, hareketsiz spermatozoonların rete testise ilerlemesine yardımcı olan önemli bir mekanik işlev görür (Clermont ve ark., 1957; Junqueira ve Carneiro, 2003).

Sertoli hücreleri, destek hücreleri olarak görev yapar ve lateral ile apikal uzantıları sayesinde spermatogenik hücreleri çevreler. Işık mikroskobu ile incelendiğinde, Sertoli hücrelerinin ve spermatogenik hücrelerin sınırlarının net bir şekilde ayrılamadığı görülür. Sertoli hücreleri, olgunlaşmamış spermatozoonların korunmasını, beslenmesini ve desteklenmesini sağlar. Ayrıca, dejenere olan eşey hücrelerini veya olgunlaşan hücrelerin atık maddelerini fagosit eder. Bu hücreler, aktin aracılı kasılmalar ile olgun spermatozoonların tübül lümenine salınmasını sağlar. Sekresyonları, spermatozoonların taşınmasına yardımcı olurken, kan-testis bariyerinin oluşumunda da görev alırlar. Sertoli hücrelerinin bu fonksiyonlarına ek olarak, östrojen salgıladığı da bildirilmektedir (Junqueira ve Carneiro, 2003; Bremner, 1994).

2.1.3.2. Kan-Testis Bariyeri

Sertoli hücrelerinin alt ve yan yüzeyleri arasında sıkı bağlantılar oluşur ve bu bağlantılar, belirli moleküllerin geçişini engelleyen bir yapı meydana getirir. Bu yapıya "kan-testis bariyeri" denir. Sertoli hücrelerinin birbirine bağlanmasıyla tubuli seminiferi iki bölgeye ayrılır: bazal kompartıman ve adlüminal kompartıman. Bazal kompartıman, erken aşamada bulunan eşey hücrelerini barındırırken, adlüminal kompartıman daha gelişmiş eşey hücrelerini içerir. Bu iki bölge, fiziksel ve fizyolojik açıdan diğer bölgelerden tamamen izole edilmiştir (Junqueira ve Carneiro, 2003; Dym ve Fawcett, 1970).

Normal şartlarda, büyük moleküller testis kılcallarından dışarı çıkabilir ve bu moleküller, adlüminal kompartımanda bulunan spermatogenik hücrelere zarar

verebilir. Benzer şekilde, spermatozoonların testis dokusundaki boşluklara geçişi, bağışıklık sisteminde güçlü bir tepkiye neden olabilir. Kan-testis bariyeri, bu tür geçişlerin kısıtlanmasında önemli bir rol oynar (Junqueira ve Carneiro, 2003; Levy ve ark., 1999). Ancak kan-testis bariyerinin oluşumunda yalnızca Sertoli hücreleri görev almaz. Bu bariyer, oldukça karmaşık bir bağışıklık engelidir ve yalnızca adlüminal kompartımanda değil, tüm testis dokusu boyunca bağışıklık-seçici bir yapı olarak işlev görür (Mital ve ark., 2011).

2.1.3.3. Spermatogenezis

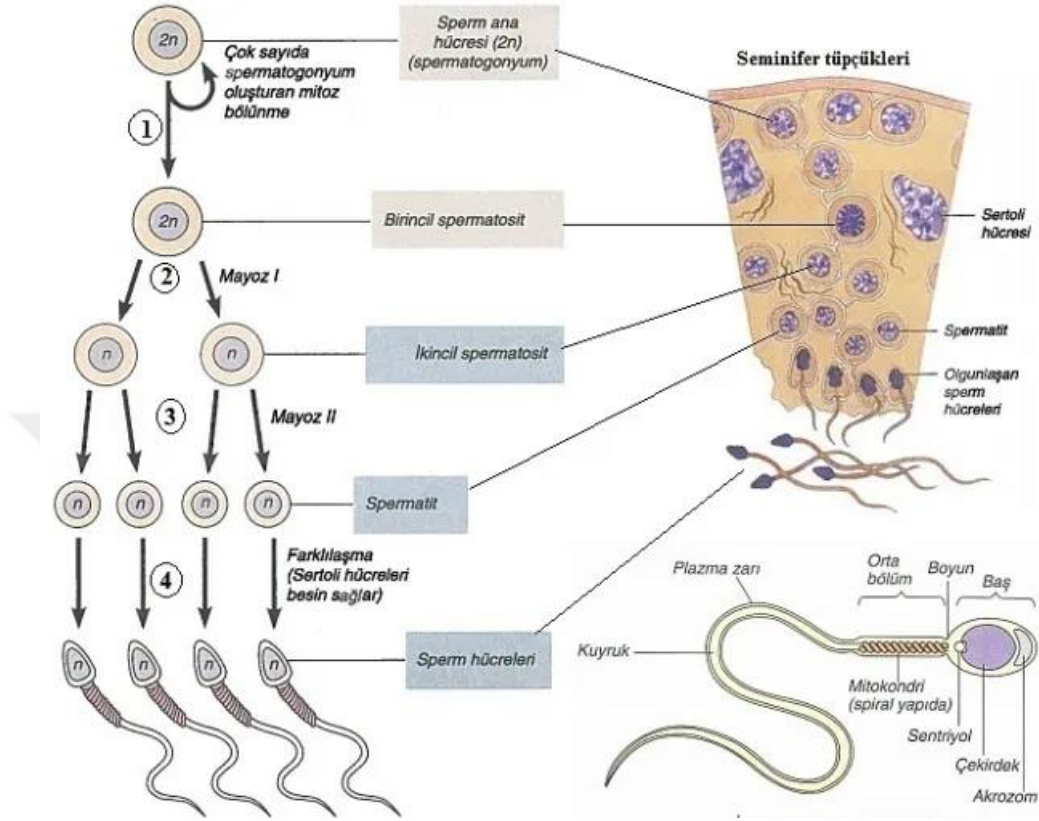
Spermatogenez, mitotik hücre bölünmesi, mayoz ve spermiogenez süreçlerini içeren karmaşık bir süreçtir. Spermatogenez regülasyonu hem endokrin hem de parakrin mekanizmalarla sağlanır. Endokrin uyarım, FSH ve LH aracılığıyla gerçekleşir. LH, etkisini testiste Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron üzerinden dolaylı olarak gösterir.

Germ hücreleri FSH ve testosteron reseptörlerine sahip olmadığından, hormonal sinyaller Sertoli hücreleri ve peritübüler hücreler aracılığıyla henüz tanımlanmamış sinyallerin üretilmesi yoluyla iletilir. Hormonal sinyaller başarılı spermatogenez için temel öneme sahip olmakla birlikte, mitozla kök hücre yenilenmesi ve iki mayoz bölünmenin karmaşık sürecini etkileyen lokal kontrol mekanizmalarında çok sayıda büyüme faktörü ve sitokinin rol oynadığına dair kanıtlar giderek artmaktadır.

Yuvarlak bir hücrenin spermatozoanın karmaşık yapısına dönüştüğü son derece karmaşık metamorfoz yapısal düzeyde iyi tanımlanmıştır (de Kretser, 1998)

Memelilerde seminifer tübüllerin epiteli, seminifer epitel döngüsü olarak bilinen tekrarlayan bir dizi değişiklikten geçer. Bu döngü, "tübülün herhangi bir alanında görülen ardışık hücresel birlikteliklerin tamamı" olarak tanımlanmıştır (Leblond ve Clermont, 1957). Kesit alınmış seminifer tübüller, çoğalan, mayozdan geçen ve spermatozoa olarak farklılaşan birçok germ hücre tipi içerir. Seminifer tübüllerdeki germ hücrelerinin organizasyonu, özellikle kemirgenler başta olmak

üzere birçok memeli türünde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Leblond ve Clermont, 1957; Russell ve ark., 1990).



Şekil 2.2. Spermatogenezin fazları: 1- Spermatogonial faz, 2- Spermatosit fazı, 3- Spermatit fazı (Lamkin J, 2011).

Oakberg, fare seminifer epitel döngüsünü, spermatidlerin ilk 12 gelişim adımına (spermiogenez olarak adlandırılan süreç) dayanarak 12 aşamaya ayırmayı önermiştir (Oakberg, 1956). Oakberg, ayrıca seminifer epitel döngüsünün süresini 8,6 gün olarak belirlemiş ve bu döngüyü oluşturan aşamaların sürelerinin değişkenlik gösterdiğini ifade etmiştir. Russell ve arkadaşları ise sıçan, fare ve köpek testislerinin histolojik değerlendirilmesine yönelik pratik bir kılavuz yayımlamıştır (Russell ve ark., 1990).

Spermatogenez döngüsü süresi, fare ve hamsterlerde yaklaşık 35 gün, sıçanlarda 50 gün, bazı primatlarda 45-65 gün ve insanlarda ise 70 gün civarındadır (Franca ve ark., 2005; Bergmann, 2006; Sharma, 2007; Amann, 2008; de Kretser ve

ark., 2016). Bu süreç, testislerdeki Leydig hücrelerinin, FSH ve LH etkisiyle androjen üretimine başlamasıyla, ergenlik döneminde başlar. FSH ve LH hormonlarının eksikliği durumunda ise bu süreç durma noktasına gelir (Szmelskyj ve ark., 2015).

Ergin erkek memelilerde spermatogenezis üç temel evreden oluşur: spermatogonyal hücrelerin çoğalması, spermatositlerin mayoz bölünmesi ve haploid spermatidlerin olgunlaşarak farklılaşması (Zhang ve ark., 2011; Gunes ve ark., 2015). Bu süreç, yetişkin testislerinde diploid kök hücrelerden (SSC) başlar ve bu hücreler adım adım spermatozoaya dönüşür. Bu dönüşüm sırasında erkek üreme hücreleri belirli bir düzen içerisinde değişim geçirerek olgunlaşır ve sonunda dış üreme kanalına salınır (Evans ve Ganjam, 2017). Sıçanlarda spermatogenezis süresi ise şu şekilde gerçekleşir: spermatogonyal hücrelerin bölünmesi yaklaşık iki hafta, spermatositlerin gelişimi üç hafta ve spermiogenezis evresi üç hafta sürerek toplamda yaklaşık sekiz haftada tamamlanır.

2.1.3.3.1.Spermatogenik Siklus Dönemleri

Spermatogenezis üç faza ayrılır: spermatogonyal faz, spermatosit fazı ve spermatid fazı.

Spermatogonyal Faz; spermatogonyalar, kök hücrelerden primer spermler oluşmasını sağlamak için mitoz bölünme geçirirler. Bu süreçte A tipi spermatogonyalar, tekrarlanan mitotik bölünmeler sayesinde birden fazla klon oluşturabilir. Ancak bu bölünmeler sırasında sitokinez tamamlanmaz ve kök hücreler, plazmodyal yapı oluşturan sitoplazmik köprüler aracılığıyla birbirine bağlı kalır (Zhou ve ark., 2012). Bu sitoplazmik bağlantılar, hücrelerin eş zamanlı olarak gelişmesini sağlar. Fazın sonunda, A tipi spermatogonyalar B tipi spermatogonyalara dönüşür (Perdrix, 2013).

Spermatosit Fazı; primer spermler, haploid spermatidlerin oluşabilmesi için iki mayoz bölünme geçirir. Bu fazda, her bir B tipi spermatogonyanın mitoz bölünmesi, seminifer tübülün lümen bölgesine doğru hareket eden iki kardeş primer

sperm üretir (Nozawa ve ark., 2014). Mayoz-1 başlamadan önce, bu hücreler DNA'larını kopyalar ve kromatit sayısı iki katına çıkar. Mayoz-1'in sonunda, iki sekonder spermatosit ($2n$, $1d$) meydana gelir, buadaki n kromozom sayısını, d bir hücrenin nükleotid bazında sahip olduğu toplam DNA miktarını ifade eder (Görgülü, 2019). Sekonder spermatositler, interfaz aşaması olmadan doğrudan mayoz-2'ye geçer ve bu süreç sonucunda spermatidler ($1n$, $0.5d$) oluşur (Lachance ve Leclerc, 2011).

Spermatid Fazı; bu aşamada spermatidler, genellikle sertoli hücrelerine bağlı olarak gelişimlerini spermatozoa haline gelerek tamamlar (Liu ve ark., 2015).

Erkek germ hücreleri üç ana türe ayrılabilir. İlk olarak, kök hücreleri de içeren ve yaklaşık 10 mitotik bölünme geçiren spermatogonyumlar yer alır. Spermatogonyumların çoğu çekirdeklerinde heterokromatin göstermez ve "A" spermatogonyumu olarak adlandırılır. Bu hücreler arasında, "A-tek" (As) spermatogonyum adı verilen spermatogonyal kök hücreler bulunur. Son spermatogonyum jenerasyonlarında çekirdek heterokromatini gözlemlenir ve bu hücreler, heterokromatin miktarına bağlı olarak "ara" (In) veya "B" spermatogonyumları olarak adlandırılır (De Rooij, 1973; de Rooij, 2001). Son spermatogonyum bölünmesi, ikinci tip germ hücreleri olan spermatositleri üretir. Spermatositler hücre döngüsünün G1 ve S fazlarından geçtikten sonra ilk mayotik bölünmenin profaz evresine girer (de Rooij, 1973). Mayotik profaz, leptoten, zigoten, pakiten ve diploten aşamalarına ayrılabilir. Leptoten aşamasına girmeden önce bu hücrelere pre-leptoten spermatosit adı verilir. Spermatositler iki mayotik bölünmeyi gerçekleştirir ve uzun bir süreç olan spermiogenez ile yuvarlak spermatidlerden uzamış spermatidlere dönüşürler. Spermiogenez, Oakberg'in fare epitel döngüsünü 12 aşamaya ayırmak için kullandığı ilk 12 adımı içeren 16 ardışık adıma bölünebilir (Tegelenbosch ve de Rooij, 1993; de Rooij, 2001).

Epitel aşamalarının doğru bir şekilde tanımlanması, örneğin, germ hücre gelişimi sırasında protein/mRNA ekspresyonunu izlemek veya mutant farelerde spermatogenik durmayı analiz etmek için önemlidir. Epitel aşamalarını tanımlayan çalışmaların çoğu, Periodik Asit Schiff (PAS) ve hematoksilinle boyanmış kesitlere

ve genç spermatid neslinin akrozom ve nükleer morfolojisindeki değişimlere dayanmaktadır. Ancak, immünohistokimya uygulandığında veya genç farelerde ve bazı mutant farelerde olduğu gibi karakteristik germ hücre tiplerinin eksik olduğu durumlarda, PAS-hematoksilin boyalı kesitler mevcut olmayabilir ve aşama tanımlama daha zor hale gelebilir (Oakberg, 1956).

Oakberg'in 12 aşamalı sınıflandırma şemasına göre; (Oakberg, 1956)

Aşama I: Bir spermatosit nesli ve iki spermatid nesli bulunur. En yaşlı spermatidler elongasyon (uzama) aşamasına gelmişken, en genç spermatid nesli hala yuvarlak olup, önceki aşama olan XII. aşamadaki sekonder spermatositlerin bölünmesiyle yeni oluşmuştur. Aşama I yuvarlak spermatidleri, gelişimlerinin 1. adımında olduklarından tanımlanabilir ve sekonder spermatositlerden daha küçük boyutlarıyla ayırt edilebilir. 1. adım spermatidleri, akrozomal vezikülün ilk görünümünü gösterir, ancak henüz PAS-pozitif akrozom granülleri mevcut değildir. Ayrıca, erken pakiten spermatositleri ve birkaç A spermatogonyumu bulunur.

Aşama II: Bu aşama, daha genç spermatid neslinde, akrozomal vezikülde iki veya üç küçük PAS-pozitif akrozomal granülün görülmesiyle karakterizedir. Pakiten spermatositlerinde, hâlâ bazal membran yakınında olan seks cismi oluşur. A4 spermatogonyumları, ovoid çekirdekleri ve iç çekirdek zarına yakın belirgin heterokromatin kenarı bulunan ara spermatogonyumlara (In) bölünür. Bu aşamada, spermatogonyumlarla ilgili olarak büyük A spermatogonyumları, geç G2 fazında olanlar, spermatogonial mitozlar ve erken In spermatogonyumları gözlemlenebilir.

Aşama III: Aşama II spermatidlerinde görülen PAS-pozitif akrozomal granüllerinin birleşerek tek bir yuvarlak granül halini aldığı anda epitel, Aşama III'tedir.

Aşama IV: Aşama III'teki yuvarlak akrozomal granül, spermatidlerin nükleer zarı yönüne doğru hareket eder ve nükleer zarla temas ettiği yerden düzleşir. Spermatogonyumlar açısından, büyük In spermatogonyumları, B spermatogonyumlarına bölünmeye yakın olanlar, In spermatogonyumlarının

mitozları ve/veya (küçük) erken B spermatogonyumları tanımlanabilir. B spermatogonyumları, In spermatogonyumlarından daha fazla heterokromatin gösterir. Orta pakiten spermatositleri, belirgin seks cisimleri gösterir ve bu aşamadan itibaren bazal membrandan uzaklaşarak tübüllerin lümenine doğru hareket etmeye başlarlar.

Aşama V: yuvarlak spermatidlerin akrozomal granülü, çevresinde düz bir kenar oluşturur ve bu aşamada bu kenar düz kalır.

Aşama VI: Akrozomal kenar, yuvarlak spermatidlerin nükleer yüzeyinin üçte birini kaplayacak şekilde yayılır. Kenar, nükleer yüzeyi takip etmek için bükülerek bir kapsül oluşturur. B spermatogonyumları, preleptoten spermatositlere bölünür. Bu nedenle, büyük premitotik B spermatogonyumları, mitotik B spermatogonyumları ve küçük, yeni oluşan preleptotenler Aşama VI'da bulunabilir. Ayrıca, Aşama V'te uzamış spermatidlerin hala seminifer epitelde derinlemesine gömülü olduğu, ancak Aşama VI'da tübül lümenine doğru hareket ettikleri ancak henüz salınmadıkları görülür.

Aşama VII: spermatid nükleer yüzeyinin üçte birinden fazlası akrozomal kapsülle kaplanmıştır. Yuvarlak spermatidlerin çoğu, akrozomal kapsüllerini bazal membrana yönlendirecek şekilde henüz konumlanmamıştır.

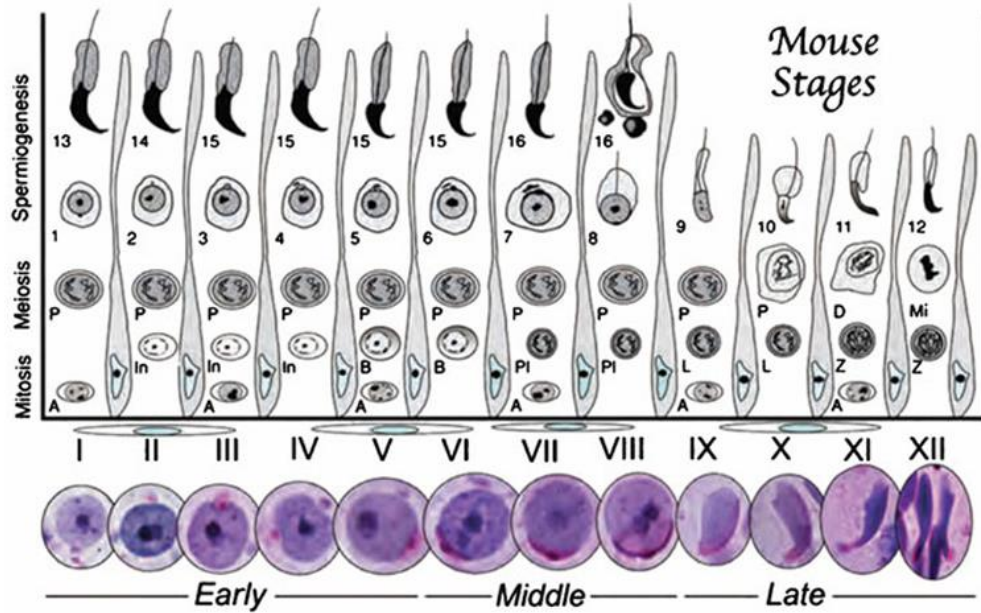
Aşama VIII: Aşama VII'ye göre Aşama VIII, bu aşamada çoğu yuvarlak spermatidlerin akrozomal kapsüllerinin tübül bazal membranına yöneldiği gerçeğiyle ayırt edilir. Ayrıca, Aşama VIII sırasında spermiyasyon gerçekleşir ve uzamış spermatidler, spermatozoa olarak tübül lümenine salınır. Aşama VIII'de, preleptoten spermatositleri S fazından geçer ve Aşama VIII'in sonunda bu hücreler mayotik profazın leptoten fazına girerler. Bu geçiş, ince kromatin ipliklerinin ortaya çıkmasıyla karakterizedir. Bu noktadan itibaren, Aşama XII'ye kadar, iki nesil profaz spermatositleri bulunur.

Aşama IX: Aşama VIII'in yuvarlak spermatidlerinin uzamaya başlayıp artık yuvarlak olmamaya başladığı anda başlar. Çekirdek daha fazla yassılaşır.

Aşama X: Spermatidler uzamaya devam eder ve iki taraflı yassılaşır. Ancak, spermatid çekirdekleri henüz yoğunlaşmaz. Spermatositlerdeki kromatin iplikleri, leptoten fazından zigoten fazına geçerken kalınlaşır ve koyu boyanır.

Aşama XI: Uzamış spermatidlerin çekirdekleri yoğunlaşmaya başlar ve daha koyu boyanır. Uzama daha da ileri seviyeye gelir.

Aşama XII: Birinci veya ikinci mayotik bölünme aşamasındaki spermatositlerin ve/veya sekonder spermatositlerin varlığı ile karakterizedir.



Şekil 2.3. Spermatogenez döngüsü: Fare Seminifer epitel döngüsündeki aşamalar (I-XII). Hücresel ilişkileri tasvir eden katmanlar, her aşamayı ayıran Sertoli hücreleri ile gösterilmiştir. Taban boyunca, PAS reaksiyonu ve hematoksinin ile boyanmış erken, orta ve geç spermatid çekirdeklerinin fotoğrafları yer almaktadır. Spermatogonyum (A, In, B); spermatositler (Pl: preleptoten, L: leptoten, Z: zigoten, P: pakiten, D: diakinezi, Mi: mayotik bölünme); yuvarlak spermatidler (1-8); uzun spermatidler (9-16) (Douglas ve ark., 2013).

2.1.3.3.2. Proliferasyon (Mitoz / Spermatositogenezis)

Spermatogonyumlar, bodrum membranı üzerinde yer alan diploid germ hücreleridir. Farklı spermatogonyum tipleri, A tipi, ara (Intermediate) ve B tipi olarak tanımlanır. Fare ve sıçan gibi iyi çalışılmış laboratuvar kemirgenlerinde dört sınıf

spermatogonyum bulunur: farklılaşmamış A tipi [A-single (As), A-paired (Apr), A-aligned (Aal)]; farklılaşmış A tipi (A1, A2, A3, A4); ara (In); ve B tipi spermatogonyumlar (Russell ve ark., 1990). Bu sınıflar, ışık ve transmisyon elektron mikroskobu ile heterokromatin varlığına ve dağılımına göre karakterize edilebilir (Chiarini-Garcia ve ark., 2001; Chiarini-Garcia ve Russell, 2001). Sertoli hücreleri tarafından düzenlenen seminifer epitel nişlerinde yer alan As tipi spermatogonyumlar kök hücre olarak kabul edilir (Chiarini-Garcia ve ark., 2001; Ryu ark., 2006).

2.1.3.3.3. Mayoz

B tipi spermatogonyumlar mitozla bölünerek mayotik profazın başlangıcını temsil eden iki preleptoten spermatosit oluşturur. Bu küçük hücreler bodrum membranında bulunur, ancak leptoten ve zigoten spermatositler, Sertoli-Sertoli bariyerinden geçerek hareket eder (Russell, 1977; Russell, 1980). Mayoz süreci, yaklaşık 14 gün süren uzun bir süreç olup, farede Aşama XII'de tamamlanır ve hücreler haploid spermatidleri oluşturur (Hess, 1998).

2.1.3.3.4. Farklılaşma (Spermiyogenezis)

Haploid spermatidlerin olgun spermatozoalara dönüşümü spermiyogenez olarak adlandırılır ve Golgi, kaplama, akrozomal ve olgunlaşma olmak üzere dört ana aşamaya ayrılır. Golgi aygıtı, akrozomun oluşumu için önemlidir ve PAS boyama ile tanımlanabilir. Spermiyogenez sırasında, yuvarlak spermatidler uzun, yoğun ve olgun spermatozoalara dönüşerek tübül lümenine salınır (Hess, 1998).

Bu bölümlerin tamamı, spermatogenez sürecini daha iyi anlamak ve değerlendirmek için önemli bilgiler sunmaktadır (Hess, 1998).

Golgi; bu evrede, spermatidlerin kutupları belirginleşmeye başlar. Trans-Golgi ağından köken alan proakrozomal veziküller, çekirdeğin zarına ve proksimal bölgesine yönelerek akrozomal granüllerle birleşir ve akrozomal boşluk oluşumunu başlatır. Bu sürecin ardından, sentrioller flagellum gelişimini başlatmak amacıyla zıt kutba hareket eder (Kuo ve ark., 2012).

Cap; spermatid farklılaşması ilerledikçe, akrozomal vezikül yassılaşılarak çekirdeğin yüzeyine yayılır ve bu sırada Golgi aygıtı, gelişen kolum kısmına doğru yer değiştirir (Chen ve ark., 2017). Aynı zamanda, dairesel yapıdaki spermatidler yalnızca türe özgü olan 200'den fazla transkripti (geni) aktarır (Bottrel ve ark., 2018). Akrozom oluşumundaki en önemli düzenleyici aşamalardan biri, cap fazından uzama fazına geçiştir. Bu nedenle, spermiogenez süreci bu geçişte gen susturma (örneğin Herb ve GOPC genleri) yoluyla kolaylıkla sekteye uğrayabilir. Bu tür mutasyonlarda, Golgi kaynaklı veziküller birleşemez ve spermatidlerin gelişimiyle birlikte akrozomal granüller çekirdekten tamamen ayrılır (Görgülü, 2019).

Akrozomal; akrozomal evreler 9-14, uzayan spermatid çekirdeğinin ventral yüzeyi boyunca akrozomal sistemin göçünü içerir. Bu göç, yaklaşık olarak 14. adımdaki spermatid tarafından tamamlanır ancak histolojik kesitlerde tanımlanması zordur; çünkü bu yapı, kesitlerin farklı düzlemlerinde ve açılarında bulunabilir. Bu nedenle, spermatogenez aşamalarının belirlenmesi genellikle yuvarlak spermatidlerde gözlemlenen akrozomal sisteme dayanır, uzamış hücrelerde değil. Bu spermatid evrelerinde ayrıca, kromatin yoğunlaşması gerçekleşir; kromozomlar daha sıkı paketlenir ve hematoksin ile daha yoğun boyanır (Hess ve ark., 1993; Franca ve ark., 1995).

Olgunlaşma; olgunlaşma evreleri 15-16, Aşamalar III-VIII arasında görülür ve çekirdek şekli ile akrozomal göçte daha az değişiklik gösterir. Çekirdek yoğunlaşmaya devam eder ve akrozom, ince bir PAS-pozitif yapıya dönüşerek nükleusun tepesinde çıkıntı yapar, ancak kuyrukla bağlantılı kısım hariç neredeyse tüm çekirdeği kaplar. Aşamalar VII-VIII sırasında fazla sitoplazma uzaklaştırılır ve bu, kullanılmayan mitokondri, ribozom, lipidler, veziküller ve diğer sitoplazmik bileşenleri içeren belirgin sitoplazmik loblar ve artık cisimlerin oluşumuyla sonuçlanır (Russell ve ark., 1990; Hess ve ark., 1993; Francave ark., 1995).

2.1.4. İntersitisyel Doku

Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemli bir role sahiptir. Seminifer tübüller arasında yer alan bağ dokusu, sinirler, lenf ve kan

damarları bu bölgede bulunur. Testis dokusundaki kapiller damarlar pencereci bir yapıdadır, bu da makromoleküller, örneğın kan proteinleri, için geçişi kolaylaştırır (Junqueira, 2006). İnterstisyel doku olarak adlandırılan bu gevşek bağ dokusu, testiküler parankim hacminin yaklaşık %40'ını oluşturur (Kerr, 1991).

İnterstisyel kompartıman, birincil cinsiyet steroidlerinin üretiminden sorumlu olan Leydig hücrelerinin kümelerini içerir. Bunun yanı sıra, bu bölge makrofajları da barındırır. Makrofajlar, sitokin salınımıyla Leydig hücrelerinin steroidogenezi düzenler ve ayrıca dejenerasyona uğramış hücreler ile nekrotik kalıntıları fagosit etme görevini üstlenir (Haider, 2004).

İnterstisyel doku, testosteron ve diğer hormonların dolaşıma salınmasını sağlayan zengin bir kapiller ağ ve arteriyollere sahiptir. Ayrıca, testis fonksiyonlarının ana endokrin düzenleyicileri olan FSH ve LH gibi gonadotropinlerin salgılanmasına da olanak tanır (Matsumoto ve Bremner, 2016).

2.1.5. Leydig Hücreleri

Kemirgenlerde, progenitor Leydig hücrelerinin doğum sonrası 10-14. günler arasında kök Leydig hücrelerinden farklılaşması, Leydig hücre soyunun başlangıcını ifade etmektedir. Doğumdan yaklaşık 28 gün sonra, progenitor Leydig hücreleri olgunlaşmamış Leydig hücrelerine dönüşür. Bu hücreler birkaç kez bölündükten sonra testosteron salgılayan olgun Leydig hücreleri haline gelir (Zirkin ve ark., 2009).

İnterstisyel hücreler, seminifer tübüller arasındaki gevşek bağ dokusu içinde tek tek veya kümeler halinde bulunur. Bu hücrelerin sitoplazmaları eozinofilik, şekilleri ise büyük, yuvarlak ya da poligonal yapıdadır. Çekirdekleri ise sitoplazmalarının şekline uygun bir yapı gösterir. Leydig hücreleri, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, mitokondriler ve granülsüz endoplazmik retikulum açısından zengindir (Ergün, 2016).

Testosteron üretiminin ana kaynağı olan Leydig hücreleri, bu işlevlerini büyük ölçüde hipofizden salgılanan LH hormonu aracılığıyla gerçekleştirir. Leydig hücreleri bol miktarda LH reseptörü içerir ve bu reseptörler aracılığıyla steroid üretimi yaparak spermatogenezi, sekonder cinsiyet özelliklerini ve libidoyu destekler. Ayrıca, hipofiz geri bildirim mekanizmalarını da düzenler. Testis mikrodolaşımındaki testosteron seviyeleri, sistemik dolaşımdakilerden en az on kat daha yüksektir (Johnson ve Thompson Jr., 1986; Schnobrich, 2018).

2.1.5.1. Testosteron

Testosteron, testislerdeki intertubuler boşluklarda bulunan Leydig hücreleri tarafından salgılanan temel androjen hormondur (O'Donnell ve ark., 2017). Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron, testislerdeki kılcal damarlar aracılığıyla genel dolaşıma katılır ve vücuttaki hedef androjen organlarında endokrin sinyal olarak işlev görür (Matsumoto ve Bremner, 2016).

Testosteron, spermatogenezi kontrol eden bir hormon olduğu için yüksek seviyeleri, hipotalamustan GnRH salgısını baskılar. Bu durum, ön hipofiz bezinden daha az LH salgılanmasına yol açar ve düşük LH seviyeleri, Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron miktarının azalmasına neden olur. Ergenlik döneminde testosteron, erkek cinsel gelişimini düzenleyen temel hormon olarak görev yapar (Szmelskyj ve ark., 2015).

Testosteronun spermatogenezi desteklemedeki temel etkileri arasında, Sertoli hücreleri tarafından seminifer tübül sıvısının üretimini teşvik etmek, olgun spermatidlerin Sertoli hücrelerinden serbest bırakılmasını (spermiasyon) düzenlemek ve spermatogenik döngünün VII evresinde geç germ hücreleri ile pakiten spermatositlerin gelişimini desteklemek yer alır (Creasy ve Chapin, 2018).

2.1.6. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü

Sertoli hücreleri, LH ve FSH etkilerine aracılık eder. FSH'nin primatlarda spermatogenezin başlatılması, sürdürülmesi ve yeniden başlatılmasında önemli bir

rol oynadığı öne sürülse de diğer memelilerde testosteronun kantitatif olarak normal spermatogenezi sürdürmede daha önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Sharpe, 1994). Seminifer tubüllerde, beyindeki hipofiz bezinden salgılanan FSH etkisiyle sperm hücrelerini üretir. FSH, özellikle seminifer tübüllerde bulunan Sertoli hücrelerini uyararak sperm hücrelerinin gelişimini ve olgunlaşmasını destekler. Ancak sperm üretimi yalnızca FSH etkisiyle gerçekleşmez. Bu süreç için ayrıca LH da gerekli olduğu bilinmektedir. LH, testislerdeki Leydig hücrelerini uyararak testosteron salgılanmasını sağlar ve testosteron, spermatogenezin devamı için temel bir hormon olarak görev yapar. Sonuç olarak, spermatogenez süreci FSH ve LH'nin eşgüdümlü etkileriyle düzenlenir (Kantarci ve ark., 2012). Aynı zaman da, spermatogenik hücrelere gerekli besinsel ve fiziksel desteği sağlamakta; ayrıca bu hücrelerden kaynaklanan sitoplazmik artıkları fagosite etmektedir. Fruktöz açısından zengin bir sıvı sentezleyip salgılayarak sperm gelişimini desteklerler (Wang ve ark., 2017). Sertoli hücreleri arasında bulunan sıkı bağlantılar sayesinde, spermatogenik hücreler testis kan-bariyerinin içinde korunur ve sistemik dolaşımdaki immün hücrelerin oluşturabileceği olası otoimmün yanıtların önüne geçilmiş olur. Ayrıca, androjen bağlayıcı protein (ABP) ve inhibin salgılayarak hormonal düzenlemede görev alırlar. Testiküler transferrin aracılığıyla demir taşınmasını sağlarlar. Gelişim döneminde ise Anti-Müllerian Hormon (AMH) salgılayarak embriyogenez sırasında Müller kanallarının regresyonuna neden olur ve ovaryum gelişimini engeller (Kierszenbaum, 2006; Eşrefoğlu, 2016).

Sertoli hücresine özgü androjen reseptör eksikliği (SCARKO) fare modellerinde, spermatogenezin diploten spermatosit aşamasının ötesine geçmediği gözlemlenmiştir. Bu, androjelerin özellikle geç mayoz ve spermiogenez için kritik olduğunu göstermektedir. Sertoli hücreleri, aynı zamanda olgun spermatidlerin tübül lümenine serbest bırakılmasından (spermiation) sorumludur ve germ hücrelerinin düzgün şekilde ilerlemesi için gerekli faktörleri salgılar (De Gendt ve ark., 2005).

2.1.7. Spermatozoonun Yapısı (Anatomisi)

Sperm hücresi yaklaşık 0,005 mm uzunluğundadır ve farklı anatomik bölümlerden oluşur. Kuyruk kısmı, protein liflerinden oluşan yapısıyla hareketi

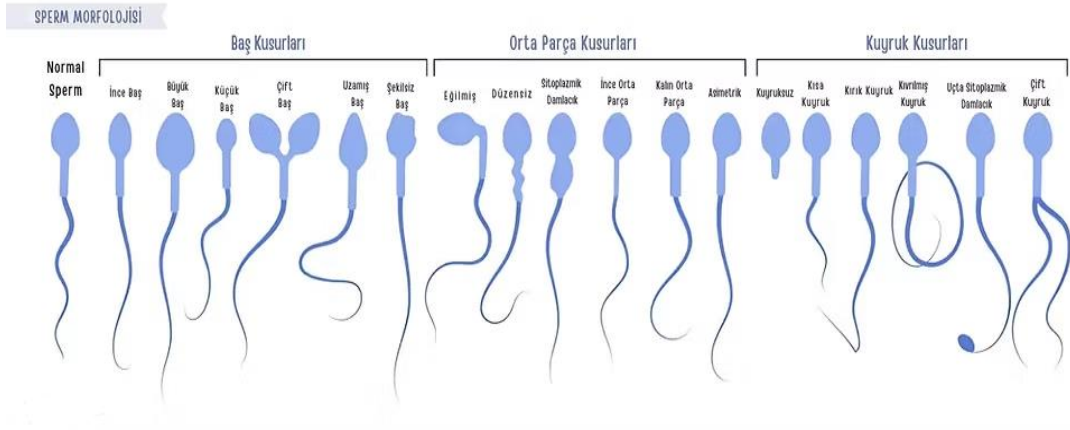
sağlar. Orta parçada ise enerji üretiminde görevli mitokondriler bulunur. Baş bölgesinde ise spermin genetik materyalini taşıyan nükleus (çekirdek) yer alır (Ross ve Pawlina, 2013). DNA, bu baş kısmın içinde yoğun şekilde paketlenmiş halde bulunur. Sağlıklı bir spermin başı oval formda, kuyruğu ise uzun ve düzgün yapıda olmalıdır. Genellikle ideal bir sperm hücresinin boyu 5–6 μm , eni ise 2,5–3,5 μm arasında olmalıdır. Spermin yapısal olarak normal formda olması, yumurtayı döllenme ihtimalini artıran kritik bir özelliktir (Auger ve ark., 2016). Spermin başı aynı zamanda en geniş kısımdır ve bu bölge genetik bilgiyi taşır. Baş ucunda ise, yumurtanın dış zarını çözerek döllenmeyi mümkün kılan çeşitli enzimler yer alır (Chang ve ark., 2017). Spermin boyun kısmında ise sentrozom bulunur. Sentrozom, kuyruğun oluşumunda görev alan ve döllenme sonrası embriyonik hücre bölünmeleri için gerekli olan mikrotübül organizasyon merkezidir. Döllenme sonrası, yumurtaya ait sentrozomun erimesi nedeniyle sperm sentrozomu büyük önem taşır (Aydın ve ark., 2013). Orta kısımda bulunan mitokondriler, hücrenin enerji ihtiyacını karşılayan yapılardır. Bu enerji, spermin hareket etmesini sağlar. Mitokondride oluşan yapısal ya da fonksiyonel bozukluklar, sperm hareketliliğinde azalmaya yol açabilir ve bu durum erkek infertilitesine neden olabilir (Belloc ve ark., 2014). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2021 yılında yayımladığı kriterlere göre, normal bir semen analizinde toplam sperm sayısının en az 39 milyon (mililitrede ≥ 15 milyon), ileri hareketliliğin en az %32, pH değerinin 7,2'nin üzerinde, hacmin ise 2 ml'den fazla olması gerekir. Ayrıca, normal morfoloji oranı %4'ün üzerinde olmalı, lökosit sayısı 1 milyon/ml'yi aşmamalı ve sıvılaşma süresi de maksimum 1 saat olmalıdır (WHO, 2021). Spermin kuyruğu, hücrenin yumurtaya doğru yüzmesini sağlayan temel yapıdır. Kuyruktaki yapısal bozukluklar doğal yollarla döllenmeyi engelleyebilir ve infertiliteye neden olabilir. Ancak bu tür bozukluklar tüp bebek gibi yardımcı üreme teknikleri ile aşılabılır ve başarılı döllenme sağlanabilir (Chemes ve Alvarez Sedo, 2012).



Şekil 2.4. Normal morfolojiye sahip fare spermlerinin mikroskopik görüntüsü.

2.1.7.1. Sperm Şekil (Morfoloji) Bozuklukları

Spermdeki şekil bozuklukları, önemli işlevsel sorunlara neden olmaktadır. Bu anomaliler, spermin boyutunda, yapısında veya şekil özelliklerinde görülebilir. Ortaya çıkan bu tür bozukluklar kısırlık gibi üreme problemlerine yol açabilir (Singh ve Rajender, 2015). Morfolojik bozukluklar baş, gövde ve kuyruk bölgesi olmak üzere üç farklı kategoride incelenmektedir.



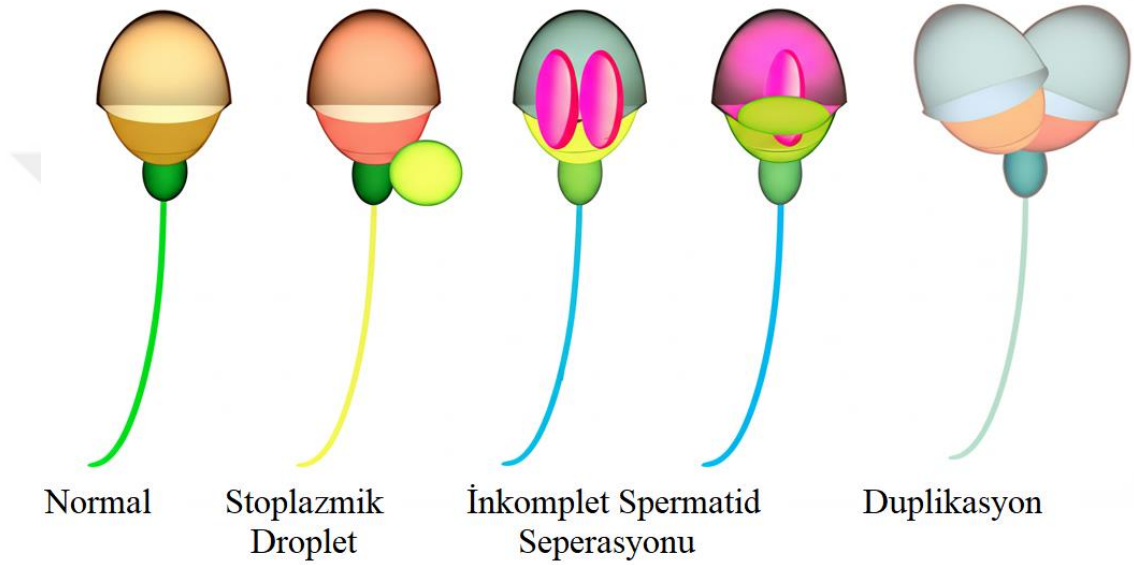
Şekil 2.5. Sperm yapı bozuklukları (Issı, 2025).

2.1.7.2. Baş Yapısı Bozuklukları

Spermin baş yapısındaki anomaliler, baş ve akrozomun boyut ve şekil farklılıkları ile baş bölgesinde bulunan vakuollerden kaynaklanabilir. Makrosefali, sperm başının normalden büyük olduğu durumu ifade eder ve bu genellikle kromozom sayısındaki fazlalıktan kaynaklanır (Menkveld, 2013). Mikrosefali ise sperm başının normalden küçük olması durumudur ve bu tip spermiler genellikle yetersiz genetik materyal içermektedir. Konik baş, sperm başının oval yerine konik biçimde olmasıdır (Ray ve ark., 2017). İğne baş, sperm başının çok küçük ve sivri uçlu bir görünüm sergilediği bir bozukluktur ve bu durum genellikle diyabetle ilişkilendirilir. İnce baş, konik baş anomalisinin bir varyasyonudur ve genellikle DNA yapısındaki problemlerden kaynaklanır. Yuvarlak baş ise mutasyon sonucu ortaya çıkan bir şekil bozukluğudur ve bu tür spermiler döllenme yeteneğine sahip değildir (WHO, 2021). Başsız sperm, yalnızca bir iplik benzeri görünüme sahiptir ve bu anomali, sentriol ile kuyruk arasındaki bağlantı hatasından kaynaklanır. Sonuç olarak, baş ve kuyruk ayrılır, baş kısımları ise sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir (Auger ve ark., 2016). Çift başlı spermiler ise toksik maddeler veya ağır metallerle temas sonucu oluşabilir (Ray ve ark., 2017).

Akrozom anomalileri, spermin gelişim ve farklılaşma sürecinde meydana gelen sorunları ifade eder. Bu anomaliler, akrozomun yanlış formasyonu, hatalı dağılımı veya sperm başına yanlış bağlanma gibi şekillerde görülebilir (Ray ve ark.,

2017). Boyun bölgesindeki sitoplazmik damlacıklar ise spermin tam olarak olgunlaşmadığını ve immatür bir yapıya sahip olduğunu gösterir. Bu damlacıklar, testiküler spermlerde sıkça görülür ve boyut olarak başın yarısından büyük olmamaları gerekir (WHO, 2021). Sperm boyun anomalileri, başın normalden büyük, düzensiz ve çoğunlukla çok çekirdekli (mülinükleer) olduğu durumlar olarak tanımlanmaktadır (WHO, 2021).



Şekil 2.6. Normal ve anormal sperm yapıları.

2.1.7.3. Gövde Yapısı Bozuklukları

Spermin gövde kısmındaki bozukluklar genellikle mitokondri, sentrioller, büyük sitoplazmik damlacıklar ve mikrotübüllerle ilişkilidir. Bu tür bozukluklar, bazen baş ve kuyruk bölgelerindeki anomalilerle kendini gösterebilir (Knez ve ark., 2012). Gövde yapısındaki anomaliler, spermatid nükleusu ile sentriol arasındaki ilişki bozukluklarından da kaynaklanabilmektedir. Büyük ve şişkin orta kısım anomalisi, spermlerde enerji üretiminin gerçekleştiği bu bölgelerdeki hatalı mitokondri ya da enerji üretim merkezinden kaynaklanmaktadır ve anormal morfolojiye yol açar (Kovac ve ark., 2017).

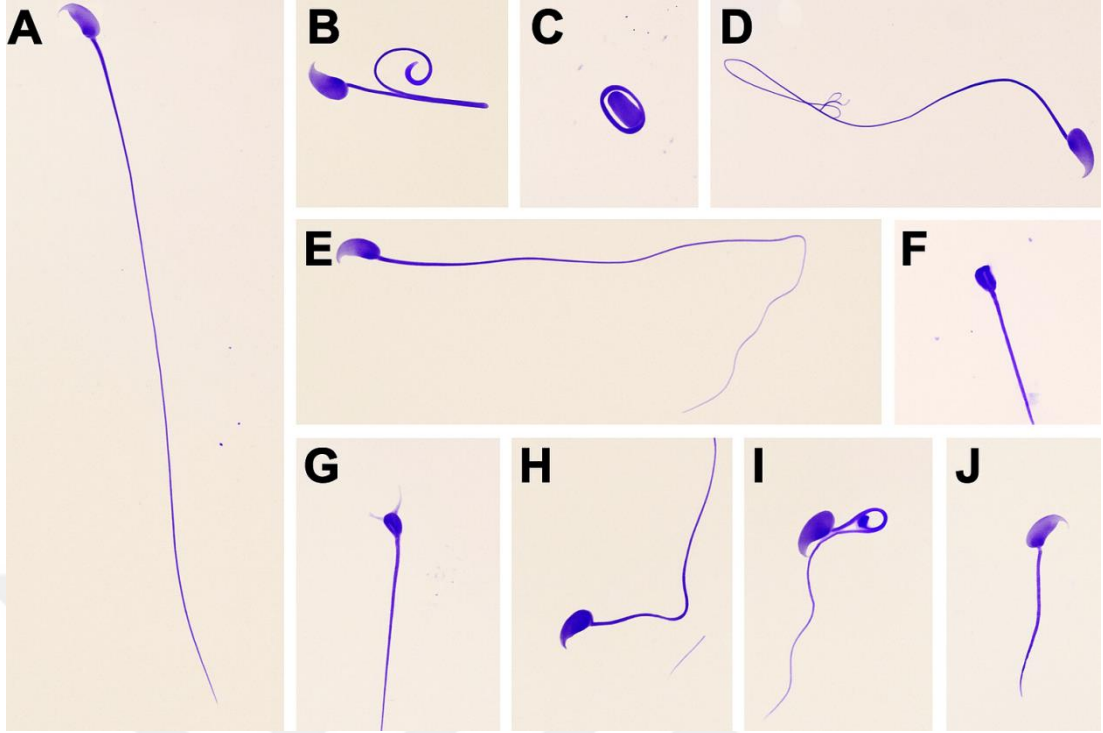
Nükleer vakuoller, spermde birden fazla kist benzeri kabarcığın varlığı ile tanımlanır. Sitoplazmik damlacıklar ise spermin olgunlaşmadığını gösterir. Globozospermi, akrozomun eksikliği ile karakterize edilen bir durumdur ve bu anomalili spermiler döllenme yeteneğine sahip değildir (Li ve ark., 2014).

2.1.7.4. Kuyruk Yapısı Bozuklukları

Kuyruğun şekli, uzunluğu ve sayısındaki değişiklikler, spermin anormal morfolojik yapısını oluşturan faktörlerdir. Kuyruksuz spermiler, en belirgin morfolojik bozukluklardan biridir ve bu durumdaki spermilerin çoğu cansızdır, bu nedenle döllenme yetenekleri bulunmamaktadır (Chang ve ark., 2017).

Sarmal kuyruk anomalisi, kuyruğun hasar görmesi nedeniyle spermin yüzme kabiliyetini kaybetmesine neden olur. Bu durum, genellikle bakteriyel enfeksiyonların veya hatalı seminal sıvı koşullarının bir sonucu olarak ortaya çıkar (Berker ve ark., 2012). Kısa kuyruklu spermiler, anormal kromozomların oluşmasına neden olabilir ve bu bozukluk spermin oluşumu sırasında meydana gelir (Amaral, 2013).

Çoklu (çift) kuyruk anomalisi, tek bir başa bağlı birden fazla kuyruğun varlığıyla karakterizedir. Bu tür spermiler döllenme yeteneğine sahip değildir (WHO, 2021).



Şekil 2.7. Sperm yapı bozuklukları: Tüm spermatozoalar standart morfolojik değerlendirmeye göre sınıflandırılmıştır. Normal spermatozoan (A); yaygın kuyruk defektleri (B–E); akrozom defekti (F); şekilsiz baş (G); gövde defektleri (H, I) ve dekapite sperm (J).

2.1.8. Eşey Hücrelerini İleten Yollar

2.1.8.1. Tubulus Seminiferus Rektus

Tubulus seminiferus kontortus, mediastinum testise doğru ilerleyen düz, kısa ve dar yapıda bir boru segmentine dönüşerek tubulus rektus adını alır. Tubulus rektusun duvar yapısı, tek katlı prizmatik epitel hücrelerinden oluşur (Tanyolaç, 1999). Bu kısa bölümde spermatogenik hücreler bulunmadığı için yalnızca Sertoli hücreleri yer alır. Sertoli hücreleri, bazal laminanın üzerinde tek katlı prizmatik epitel oluşturur ve bu epitel kanalı döşer. Kanalin duvarı ise, dış kısmında düz kas hücrelerini barındıran gevşek bağ dokusu ile çevrilidir (Ergün, 2016).

2.1.8.2. Rete Testis

Rete testis, testisin kraniyal kutbunda, Tunika albuginea'nın hemen altında yer alan genişlemiş intratestiküler bir yapıdır. Aynı zamanda, testisin arteriyel kaynağı olan testis arterine yakın bir konumda bulunur. Testiküler arter, kıvrımlı bir yapıya sahiptir ve çevresinde venöz pampiniform pleksus bulunur; bu düzenleme, ısı değişimini sağlamak için önemlidir. Kemirgenlerde rete testis, düzleştirilmiş kübik epitel ile çevrelenmiştir (Knoblauch ve ark., 2018).

2.1.8.3. Epididimis

Epididimisin bağ dokusuyla çevrili uzun ve kıvrımlı kanalı, testisin üst ve arka kısmında, skrotum boyunca uzanır. Epididimis, duktulus efferentese bağlanan baş (kaput), gövde (korpus) ve duktus deferense açılan kuyruk (kavda) olmak üzere üç ana bölümden oluşur (Junqueira ve Mescher, 2013). Epididimisin duvarı, bazal lamina üzerine yerleşmiş yalancı çok katlı prizmatik epitel hücreleri ile kaplıdır. Bu hücrelerin lümene bakan yüzeyleri stereosilyum ile donatılmış olup hem salgı hem de absorpsiyon işlevlerini yerine getirir. Testisten çıkan sıvının büyük bir kısmı ve Sertoli hücrelerinden salgılanan androjen bağlayıcı protein ile inhibin, epididimis kanalının proksimal kısmında yeniden emilirken, spermatozoonlara hareketlilik kazandıran salgılar burada üretilir (Ergün, 2016).

Epididimis kanalı içinde spermlerin geçiş süreci zaman alır ve bu süreçte spermler olgunlaşarak döllenme yeteneği kazanır. Bu sırada, bağımsız hareketlilik geliştirilir, akrozom olgunlaşır ve hücre membranında biyokimyasal değişiklikler meydana gelir (Junqueira ve Mescher, 2013). Epididimis tarafından üretilen salgılar, spermlerin canlılığını, hareketliliğini ve fertilizasyon kapasitesini artırmada önemli bir role sahiptir. Epididimis kanalı, spermleri taşıyan, konsantre eden ve depolayan bir yapıdır (Arrotéia ve ark., 2012). Spermatozoonların döllenme yeteneği kazanması, epididimiste meydana gelen olgunlaşma süreci boyunca gerçekleşir. Bu süreçte, sperm hücrelerinde morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve fonksiyonel değişiklikler oluşur (Gatti ve ark., 2004).

2.1.8.4. Duktus Deferens

Duktus deferens, kalın bir kas tabakasıyla çevrili, dar lümenli boru şeklinde bir yapıdır (Alm, 1982). Önceki bölüm olan duktus epididimiste epitel dokusu, duktus deferenste kas dokusuna (tunika muskularis) işlevsel önem kazandırır. Duktus deferens, tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya olmak üzere üç katmandan oluşur (Tanyolaç, 1999). Mukozanın lamina epitelialisi, yalancı çok katlı prizmatik hücrelerden oluşur ve lümene bakan yüzeyindeki stereosilyumlar, epididimisten daha kısadır ve ilerleyen bölümlerde kaybolur. Tunika muskularis, içte ve dışta uzunlamasına, ortada ise sirküler yerleşimli güçlü düz kaslardan oluşur. Bu kas tabakası, ejakülasyon sırasında spermatozoonların atılmasını sağlayan peristaltik hareketlerle işlev görür. Kanalin dışını saran tunika adventisya, gevşek bağ dokusundan oluşur ve damar ile sinir açısından zengindir (Ergün, 2016).

2.1.9. İlk Spermatogenik Dalga

Spermatogenez döngüsünün ilk dalgasının, yetişkin seminifer epitel döngüsünden daha hızlı ilerlediği bilinmektedir (Kluin ve ark., 1982; Oakberg, 1956; van Haaster ve de Rooij, 1993). Örneğin, farelerde ve sıçanlarda, ilk dalganın ortalama süresi, yetişkinlerdeki döngüden yaklaşık bir gün daha kısadır. GFP farelerinden alınan germ hücrelerinin transplantasyonunda, ilk iki ay boyunca büyüme hızı üçüncü aydakine göre iki kat daha hızlı olmuştur (Ventela ark., 2002). Bu durum, hücre döngüsünün hızlanmasıyla bağlantılı olabileceği gibi, ilk dalganın klonal nişlerin doldurulmasına ve epitel dalgasının kurulmasına bağlı farklı bir düzenlemeye sahip olabileceğini düşündürmektedir (Vilela ve ark., 2003).

İlk dalganın, Ngn3-negatif bir subpopülasyona bağlı olarak düzenlendiği gösterilmiştir. Bu hücreler, ilk dalgada farklılaşarak germ hücrelerini oluştururken, Ngn3-pozitif hücreler kök hücre olarak korunur ve sonraki dalgalar için kullanılır (Yoshida ve ark., 2004).

2.1.10. Sperm Hareket (Motilite) Bozuklukları

Bir organizmanın ya da sıvının hareket edebilme kapasitesine "hareketlilik (motilite)" adı verilmektedir (Garolla ve ark., 2015). Embriyo oluşumunun gerçekleşmesi için, spermin kadın vajinasına bırakıldıktan sonra rahim boyunca ilerleyerek fallop tüplerinin ampulla bölgesinde yumurta ile birleşmesi gereklidir (Alp ve ark., 2012). Bu süreçte spermin hareket kabiliyeti, yumurtaya ulaşmak ve birleşmeyi gerçekleştirmek için kritik bir rol oynamaktadır (Abbasoğlu ve ark., 2012).

Spermin hareket şekilleri farklı kategorilere ayrılabilir. İlerleyici (progressif) hareketlilikte spermler, düz bir çizgi üzerinde veya geniş daireler çizerek ileriye doğru hareket eder (Hussein ve ark., 2012). İlerleyici olmayan (non-progressif) hareketlilikte ise spermler, kıvrımlı kuyruk yapıları ile çok küçük daireler çizerek ilerleme sağlar (Hussein ve ark., 2012; Katib, 2015). Spermlerin yumurtayı döleyebilmek için rahimde ilerlerken saniyede en az 25 mikrometre hızla hareket etmeleri gerekmektedir (Hosseini ve ark., 2014).

Sperm hareketliliği, erkek kaynaklı kısırlık durumlarında sıkça incelenir ve bu hareketliliğin türü embriyo oluşumunu etkileyen önemli bir faktördür. Örneğin, yalnızca yerinde titreşim hareketi yapan spermler hareketli kabul edilse de, bu hareket türü genellikle yumurtaya ulaşmayı engeller (Engin Üstün, 2011). Bu nedenle embriyo oluşumu için ilerleyici hareket yeteneği olan ve mayoz-2 evresini tamamlamış spermlere ihtiyaç duyulmaktadır (Cooper ve ark., 2012). Tüm spermler içinde düzgün bir şekilde hareket edenlerin oranının %32'nin altında olması durumu "astenozoospermi" olarak tanımlanmaktadır (Guo ve ark., 2014).

Sperm sayısı, semen içindeki toplam sperm hücresi miktarını ifade eder ve bir mililitrede 15 milyonun altındaki değerler idealin dışında kabul edilir. Ayrıca, hareketli sperm oranının 15 milyondan az olması "oligospermi", ejakulatta sperm bulunmaması "azospermi", normal morfolojiye sahip spermlerin oranının %4'ün altında olması ise "teratozoospermi" olarak adlandırılır (Gatimel ve ark., 2017). Sperm hareketliliğinde azalma durumunda, spermlerin fallop tüplerinin ampulla

bölgesine ulaşarak döllenmeyi gerçekleştirme olasılığı önemli ölçüde düşer (Kutluyer ve ark., 2016).

Sperm hareketliliğindeki azalma birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkabilir. Genetik yatkınlıklar, hormonal bozukluklar, çevresel faktörler, yaşam tarzı tercihleri, aşırı alkol tüketimi, pelvik bölgeye alınan darbeler, kronik hastalıklar, aşırı stres, obezite ve varikozel gibi durumlar sperm motilitesini olumsuz etkileyebilmektedir (Kutluyer ve ark., 2016).

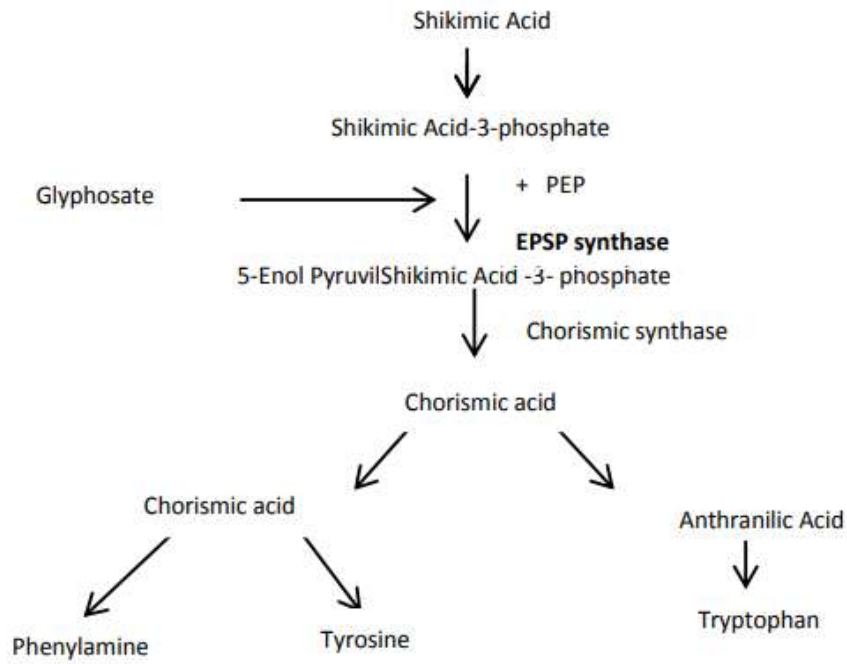
2.2. Glifosat'ın Kimyasal Yapısı, Kaynakları ve Farmakolojik Özellikleri

Pestisitler; endüstriyel tarımda yetiştirilen bitkileri, zararlı böcekler, yabancı otlar ve çeşitli hastalık etmenlerine karşı korumak amacıyla kullanılan kimyasal veya mikrobiyal kökenli maddelerdir. Bu bileşikler genellikle bir ya da birden fazla aktif etken madde içerir; ayrıca çözücü, emülgatör ve yapışmayı artırıcı yardımcı maddelerle formüle edilirler. Tarım ilacı ya da bitki koruma ürünü olarak adlandırılan bu preparatların aktif bileşenlerinin önemli bir kısmı toksik özellik göstermekte, yani canlılar üzerinde zehirli etkilere sahip olmaktadır. Pestisitlerin kullanımı tarih boyunca zararlı organizmalarla mücadelede önemli bir yer tutmuştur. İlk pestisitlerin kükürt gibi doğal elementlerden üretildiği ve daha sonra bakır, cıva ve arsenik gibi bileşiklerle zenginleştirildiği bilinmektedir (Altıkat ve ark., 2009; Abubakar ve ark., 2020). Günümüzde pestisitler etki mekanizmaları, hedef organizmalara giriş yolları, biyolojik aktivite düzeyleri, çevresel etkileri ve toksisite seviyelerine göre sınıflandırılmaktadır. Pestisitlerin taşınması gereken temel özellikler arasında etkinlik, çevresel normlara uyumluluk, kalıntı bırakmama, kararlılık ve kullanıcı güvenliği ön plana çıkmaktadır (TOB, 2019).

Dünya genelinde pestisitlerin pazar hacmi yıllar içinde önemli ölçüde artmıştır. Türkiye pestisit kullanımında 12. sırada yer almaktadır. Türkiye'de pestisit kullanım miktarı, zararlı organizmaların yoğunluğu ve iklimsel değişikliklere bağlı olarak yıllara göre dalgalanmaktadır. Ancak, bitkisel üretimin artmasına rağmen pestisit kullanım oranlarının aynı hızda artmadığı görülmektedir. 2020 yılında

Türkiye’de pestisit kullanımının %38,4’ünü fungusitler, %24,7’sini herbisitler ve %23’ünü insektisitler oluşturmuştur (TOB, 2019).

Glifosat, 1970’lerde keşfedilmiş, geniş spektrumlu, seçici olmayan bir herbisit olarak pestisit endüstrisinde önemli bir yere sahiptir. Bitkilerde şikimat yolunu hedef alarak fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik amino asitlerin sentezini engellemekte, bu nedenle etkisini seçici olmayan bir şekilde göstermektedir. Omurgalı canlılarda şikimat yolu bulunmadığı için, glifosat’ın bu mekanizma üzerinden doğrudan bir toksisite riski oluşturmadığı düşünülmüş, uzun yıllar boyunca güvenli kabul edilmiştir. Ancak, çevresel kalıcılığı, biyolojik birikimi ve potansiyel genotoksik etkileri nedeniyle son yıllarda tartışmalara konu olmuştur (Brake ve Evenson, 2004; EPA, 1993).

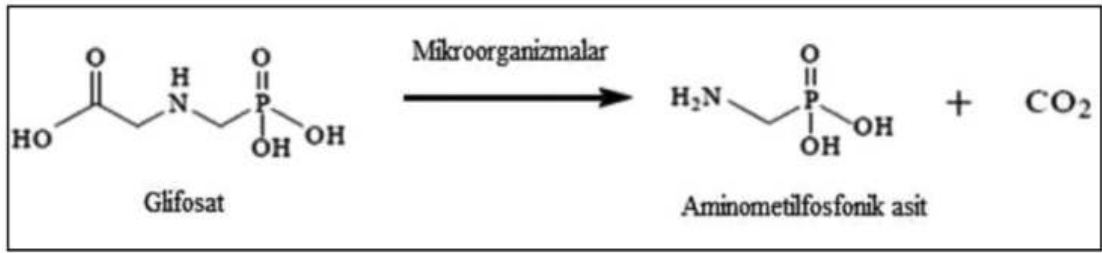


Şekil 2.8. Glifosat’ın etki mekanizması (Gerald ve ark., 2015).

Glifosat, özellikle tarım alanlarında, geniş yapraklı yabancı otlar ve yıllık bitkiler üzerinde etkili bir herbisit olarak kullanılmaktadır. 1996 yılında genetiği değiştirilmiş, glifosat’a dirençli bitkilerin ticari üretime başlaması, glifosat kullanımında ciddi bir artışa yol açmıştır. 2009 yılına kadar ABD’de herbisit

kullanımının %53,5'ini glifosat oluşturmuş, 2014 yılında bu oran 108,8 milyon kg'a ulaşmıştır (Livingston ve Fernandez-Cornejo, 2013). 2017 yılında dünya genelinde yaklaşık 1,35 milyon ton glifosat kullanılmıştır. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri ve Çin gibi tarımsal üretimin yoğun olduğu ülkelerde, glifosatın kullanım oranları oldukça yüksektir (Laura Carretta, 2019).

Fizikokimyasal özellikleri açısından glifosat, yüksek çözünürlük kapasitesine sahip polar bir bileşiktir. Zwitter iyon yapısı, molekül içinde hem katyonik hem de anyonik alanlar oluşturmaya olanak tanır, bu nedenle amino asitlerle benzerlik gösterir. Glifosat formülasyonlarında genellikle glifosat tuzları, yardımcı maddeler ve yüzey aktif bileşenler bir arada kullanılır. Bu yardımcı maddeler, herbisidal etkinliği artırmakla birlikte toksisite düzeyini de etkileyebilir (Sarıaltın ve Çoban, 2017).



Şekil 2.9. Glifosat'ın mikrobiyal mekanizması (Sarıaltın ve Çoban, 2016).

Glifosat metabolize edildiğinde aminometilfosfonik asit (AMPA) gibi türevler oluşturur; bu maddelerin de çevresel ve biyolojik kalıcılığı yüksek düzeydedir.

Glifosat'ın çevresel etkileri ve toksikolojik sonuçları üzerine yapılan çalışmalarda, toprak mikroorganizmaları tarafından metabolize edilerek toksik olmayan ürünlere dönüştürülebildiği, ancak uzun süreli maruziyetin çeşitli ekosistemlerde birikime yol açabileceği belirtilmiştir (Kanissery ve ark., 2019). Bunun yanı sıra, insan ve hayvan çalışmalarında, glifosat kalıntılarının tiroid, karaciğer, dalak ve kemik iliği gibi organlarda birikebildiği gözlenmiştir. Malezya'da yapılan bir çalışmada, Glifosat maruziyetinin çocuklarda kan kolinesteraz düzeylerinde azalma ve DNA hasarı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Bolognesi ve

ark., 1997). Ayrıca, folik asit sentezini etkileyerek DNA sentezi ve onarım mekanizmalarını bozduğu, dolayısıyla kanserojen potansiyele sahip olduğu ileri sürülmüştür (Duthie, 1999).

Glifosat'ın genotoksisite oluşturma potansiyeli hem in vivo hem de in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. İnsan lenfosit hücrelerinde yapılan çalışmalar, doza bağımlı olarak kardeş kromatit değişimleri ve DNA zincir kırıkları gibi hasarları ortaya koymuştur (Shehata ve ark., 2013). Folik asit metabolizmasının bozulması, özellikle proto-onkogenlerin aktivasyonuna ve malignite gelişimine yol açabilir (Livingston ve Fernandez-Cornejo, 2013). Ayrıca, glifosat'ın bağırsak mikrobiyotasında faydalı bakterilerin gelişimini inhibe ettiği ve bu durumun bağışıklık sistemi üzerindeki olumsuz etkileri ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Rossi ve ark., 2011).

Sonuç olarak, glifosat'ın geniş tarımsal kullanımına rağmen, çevresel kalıcılığı, biyolojik birikimi ve genotoksisite potansiyeli gibi olumsuz etkileri, pestisit yönetiminde dikkatle değerlendirilmesi gereken kritik unsurlardır. Bu durum hem çevresel hem de insan sağlığı açısından pestisitlerin kullanımında sürdürülebilir ve güvenli uygulamaların önemini vurgulamaktadır (Rossi ve ark., 2011).

2.2.1.Roundup

Ticari ürünler arasında en yaygın tercih edilen tarım ilacı, 1970'lerde Monsanto firması tarafından üretilen Roundup®'tır. Bu tarım ilacının aktif maddesi Glifosat adı verilen bir herbisittir. Glifosat, yıllık ve çok yıllık otları, geniş yapraklı bitkileri seçici olmayan bir şekilde öldüren, geniş spektrumlu bir çimlenme sonrası organofosfor, N-fosfonometil glisin yapısında bir herbisittir (Brake ve Evenson, 2004). Ayrıca, dünya çapında en çok kullanılan pestisitlerden biri olarak bilinmektedir. 2017 yılında dünya çapında 1.35 metrik ton kullanıldığı tahmin edilmektedir (Laura Carretta ve ark., 2019).

2.2.2. Glifosat'ın Etki Şekli

Glifosat, suda çözünürlüğü yüksek (12 g/L), polar, organik çözücülerde çözünmeyen bir pestisittir (Veiga ve ark., 2001). Glifosatın biyotransformasyon ürünü olan aminometilfosfonik asit (AMPA) de polaritesi yüksek bir maddedir. Glifosat içerikli ticari ürünler, genellikle glifosatın tuzları ile formüle edilerek ve membran geçirgenliğini arttırmak için yüzey aktif maddeler eklenerek piyasaya sürülmektedir. Roundup Star® 'ın içeriği 441 g/L glifosatın potasyum tuzu ve eter amin etoksilat'tan oluşmaktadır (Mitchell ve ark., 1987).

Glifosatın oral veya intravenöz (IV) yolla vücuda alınmasının ardından kısa süre içinde, idrar ve kan gibi biyolojik örneklerde hem kendisi hem de metabolitleri çeşitli analitik yöntemlerle tespit edilebilmektedir. Metabolizma sürecinde başlıca aminometilfosfonik asit olmak üzere, metilaminometilfosfonik asit, N-formilglifosat, N-asetilglifosat ve N-nitrosoglifosat gibi farklı türevler oluşmaktadır. Sprague Dawley (SD) cinsi sıçanlarla yapılan radyoaktif izleme çalışmalarında, glifosat kalıntılarının tiroid, testis, over gibi endokrin bezlerin yanı sıra kemik, kemik iliği, kan, kalp, karaciğer, akciğer, dalak ve mide gibi birçok majör organda birikebildiği gösterilmiştir. Toprakta bulunan glifosat, mikroorganizmalar aracılığıyla aminometilfosfonik aside (AMPA) dönüşmektedir (Mitchell ve ark., 1987).

Glifosatın temel etki mekanizması, mantarlar, bakteriler, arkebakteriler ve bitkilerde bulunan şikimat yolunda görevli 5-enolpirüvil şikimik asit-3-fosfat sentaz (EPSPS) enzimini inhibe etmesidir. Bu inhibisyon, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik amino asitlerin biyosentezini engelleyerek bitkilerde ölümle sonuçlanır. Uygulama sonrasında glifosat çevrede kalıcı hale gelebilmekte; toprakta 2 ila 197 gün, suda ise ortalama 91 gün süresince varlığını sürdürebilmektedir. Glifosat, oksidoredüktaz enzimi aracılığıyla glisolat ve AMPA'ya parçalanmaktadır. Bu süreç, aromatik amino asitlerin üretimini sekteye uğratır; ancak bu yolak omurgalı canlılarda bulunmamaktadır (Serra ve ark., 2021). Malezya'da pirinç tarlalarına yakın yerleşim alanlarında yaşayan çocuklar üzerinde yürütülen bir çalışmada, glifosata maruz kalan bireylerde kolinesteraz enzim düzeylerinde düşüş, kromozomal kırıkların artışı ve DNA hasarının belirginleştiği tespit edilmiştir. Glifosatın

genotoksik etki potansiyeli, hem in vivo hem de in vitro modellerde ortaya konmuştur. Hayvan deneylerinde çeşitli doku ve organlarda DNA iplikçiklerinin kırıldığı gözlemlenmiş; insan lenfosit hücrelerinde ise doza bağlı kardeş kromatid değişimleri bildirilmiştir (Bolognesi ve ark., 1997). Folik asit, bağırsak mikrobiyotasında yer alan *Lactobacillus reuteri* ve *Bifidobacterium* türleri gibi bakteriler tarafından sentezlenen hayati bir B vitamini türevidir (Rossi ve ark., 2011). Ancak glifosat maruziyeti, bu bakterilerin çoğalmasını engelleyerek folik asit üretimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Shehata ve ark., 2013). Bu durum, glifosatın şikimat yolunu baskılaması nedeniyle, folik asidin öncül maddesi olan korizmatin sentezini sekteye uğratmasıyla ilişkilendirilmiştir (Lu ve ark., 2013). Folik asidin, DNA sentezi ve tamirinde hayati rol oynadığı; eksikliği durumunda DNA'da urasil birikimi gibi sentez bozukluklarına yol açtığı bilinmektedir (Duthie, 1999).

2.2.3. Glifosatın Erkek Genital Sistem Üzerine Etkileri

Glifosatın testis dokusu ve sperm parametreleri üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda maruziyetin gebelik ve erken postnatal aşamalarda gerçekleştiğinde serum testosteron konsantrasyonlarında artış gösterirken, peripubertal aşamalarda gerçekleştiğinde azalma görülmüştür, sonuç olarak etkilerin kullanılan GBH çeşitinin, gelişim aşamasının ve maruziyet süresinin, testosteron salınımında farklılık meydana getirdiği saptanmıştır (Serra vd., 2021). Teleken vd. (2020) yaptığı çalışmada gebelik ve laktasyon sırasında Roundup'a maruz kalmanın, F1 yavrularında spermatogenezin azalmasına ve hipotalamus-hipofiz-testis eksenini düzenlemesinde bozulmalara yol açabileceğini göstermektedir. Nerozzi vd. (2020) GLY üzerine yaptığı çalışmada sperm, farklı konsantrasyonlarda (0-360 µg/mL) glifosat veya Roundup'a maruz bırakılmışlardır. Glifosatın 360 µg/mL'de sperm motilitesini, canlılığını, mitokondriyal aktiviteyi ve akrozom bütünlüğünü önemli ölçüde azalttığı ancak daha düşük dozlarda zararlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, Roundup, ≥ 5 µg/mL GLY eşdeğer konsantrasyonda sperm motilitesini; ≥ 25 µg/mL GLY eşdeğer konsantrasyonda mitokondriyal aktiviteyi ve ≥ 100 µg/mL GLY eşdeğer konsantrasyonda sperm canlılığını ve akrozom bütünlüğünü anlamlı bir şekilde azalttığı ancak GLY ve Roundup'ın, sperm DNA bütünlüğü

üzerinde zararlı bir etki yapmadığı belirtilmiştir. Roundup'ın erkek gametler üzerinde olumsuz bir etki yaptığını ve ana bileşeni olan glifosattan daha toksik olduğunu rapor etmişlerdir. Cassault-Meyer vd. (2014) 60 günlük ratları sekiz gün boyunca Roundup uygulamasına maruz bıraktıktan sonra uygulamanın bitiş günü, bir spermiyogenez sonrası (d87) ve bir spermatogenez siklusu sonrasında (d122) endokrin ve testis fonksiyonları bakımından inceleme yapmışlardır. Deney grubunda aromataz mRNA seviyelerinde ve aromataz proteininde artış görülmüştür. Ayrıca, Gper1 ekspresyonunda 122. günde benzer bir artış ve kan-testis bariyer belirteçlerinde hafif bir değişiklik gözlemlenmiştir. Normal sperm konsantrasyonu ve motilitelerine rağmen, epididimal spermde anormal sperm morfolojisinin arttığı ve protamin 1 ile histon 1'in testis de ekspresyonunun azaldığını belirtmişlerdir.

Pham vd. (2019) farklı dozlarda GLY veya GBH'leri farelerin gebeliğinin E10.5. gününden 20 gün sonrasına kadar içme suyu içerisinde vermiştir. Sonuçta, GLY'a maruziyetin, (GBH'in değil) testis morfolojisini 20 gün'de etkilediği ve 35 günlük erkeklerde serum testosteron konsantrasyonlarının ve spermatozoa sayısının, azaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca, 5 mg/kg/gün glifosat grubunda, germ hücresi diferansiyasyonunda rol alan Sall4 ve Nano3 gibi genlerin ekspresyonundaki değişiklikler ve Bax ve Bcl2 gibi apoptozla ilişkili genler nedeniyle farklılaşmamış spermatogonia sayısının da azaldığı ve 8 aylık hayvanlarda, GBH gruplarında azalmış testosteron seviyesi gözlenmiştir. Böylece, GLY'ın ve GBH'lerin düşük dozlarda erkek üreme sistemi üzerinde endokrin bozucu etkilere neden olabileceği gösterilmiştir. Anifandis ve arkadaşları (2018) insanlarda yaptığı çalışmada glifosatın sperm motilitesi ve sperm DNA parçalanması (SDF) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Glifosat uygulanan örneklerin sperm progresif motilitesi, uygulama sonrası 1 saatte, ilgili kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde azaldığı, buna karşılık glifosat ile tedavi edilen örneklerin SDF'si, ilgili kontrollerle benzer seviyede olduğu görülmüştür (Anifandis ve ark., 2018).

2.2.4. Glifosat'ın Oksidatif Stres Üzerine Etkileri

Erkeklerde görülen infertilitenin %25'i idiyopatikdir, çevresel toksikantlar gibi çevresel faktörler, sigara, alkol ve uyuşturucu madde kullanımı, kötü beslenme,

psikolojik stres, radyasyon, metal alımı idiopatik infertilite nedenleri içerisinde yer almaktadır (Kumar ve ark., 2015). İdiopatik erkek kısırlığı tanısı, açıklanamayan sperm anormallikleri olduğunda ve kadından kaynaklı meydana gelen bir kısırlık olmadığıda konur. İdiopatik erkek kısırlığına neden olan ana mekanizmalarından biri olarak oksidatif stress (OS) tanımlanmıştır. OS ilişkili mekanizmalar, vakaların yaklaşık %40 ila %50'sinde erkek üreme parametrelerinin bozulmasından sorumlu tutulmaktadır (Dutta ve ark., 2020; Selvam ve ark., 2020). Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulmasıdır. Meydana gelen bu bozulma sonucunda serbest radikaller adı verilen hücre yapısı ve fonksiyonunda bozulmaya sebep olan oksijen bileşikler meydana gelir. Bu durumu önleyen antioksidan savunma sisteminin yeterli olmadığı durumlarda vücutta serbest radikallerin artması ile oksidatif stres meydana gelir (Sorg ve ark., 2004). Oksidatif stres indüklendiğinde, endojen testiküler antioksidan savunma mekanizmaları aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerini nötralize etmek için yetersiz kalır (Dutta ve ark., 2020). ROS'lar (örneğin süperoksit anyonu, $O_2^{\bullet-}$, hidroksil radikal, $OH^{\bullet}$ ve hidrojen peroksit, H_2O_2) yoğun reaktif metabolizma kaynaklı oksitleyici moleküllerdir (Selvam vd., 2020). Normal, fizyolojik seviyelerde ROS, spermatogenez, sperm canlılığını sürdürmek, olgunlaşma, hiperaktivasyon ve kapasitasyonu sağlamak, sperm hareketliliğini ve akrozom reaksiyonunu (AR) aracılık etmek gibi erkek üreme fonksiyonları için hayati önem taşımaktadır (Dutta ve ark., 2020). OS indüklendiğinde, endojen testiküler antioksidan savunma mekanizmaları ROS'un zararlı etkilerini nötralize etmek için yetersiz kalır. ROS'un ve metabolitlerinin fizyolojik değerlerin üstünde olan konsantrasyonları lipidleri, proteinleri ve DNA'yı hasara uğratar, apoptosisi tetikler, enzim aktivitesini değiştirir ve döllenme için önkoşul olan sperm parametrelerini etkiler (Dutta ve ark., 2020).

Organizmalar sürekli olarak ROS ve diğer serbest radikalleri üretmektedir. ROS'lar, mitokondriyal solunum zincirinin yan ürünleri olarak endojen şekilde üretilbildiği gibi, duman, radyasyon, ultraviyole (UV) ışınları ve çevresel kirleticiler gibi eksojen kaynaklardan da organizmalara ulaşabilir (Södergren, 2000). Hücreler açısından ROS düzeylerinin sağlıklı sınırlar içinde tutulabilmesi için, organizmalar birbirini tamamlayan antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir: glutatyon

(GSH), C ve E vitaminleri, karotenoidler gibi antioksidan moleküller ile katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD), GSH redüktaz, GSH peroksidaz (GPx) ve glutatyon-S-transferaz gibi antioksidan enzimler bu savunmayı oluşturur. ROS üretimi ile biyolojik sistemlerin bu reaktif ara ürünleri ortadan kaldırma ya da hasarı önleme kapasitesi arasındaki olumsuz dengesizlik ise OS olarak tanımlanmaktadır (Limón-Pacheco ve Gonsebatt, 2009).

Pestisitlerin, ROS üretimi yoluyla proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olan yüksek reaktiviteye sahip bileşikler oldukları bilinmektedir. Bu maddeler çeşitli dokularda pro-oksidan olarak işlev görebilir; ROS birikimine, DNA hasarına, antioksidan savunma sistemlerinde bozulmaya ve lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre içi ve hücreler arası homeostazda ciddi bozulmalara neden olurlar (Halliwell, 2012).

Roundup formülasyonunda bulunan yardımcı maddeler, özellikle polietoksile tallow amin (POEA) glifosatın hücre zarından geçişini artırarak toksisitesini yükseltmektedir (Mesnage ve ark., 2012; Benachour ve Séralini, 2007). Roundup'un erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri, özellikle oksidatif stres yoluyla gerçekleşmektedir. Bu formülasyon, testislerde ve Sertoli hücrelerinde ROS aşırı üretimine neden olarak GSH düzeylerinin azalmasına, lipid peroksidasyonu ve protein karbonilasyonunun artmasına yol açar (Cavalli ve ark., 2013; Clair ve ark., 2012). Hücre içi kalsiyum dengesinin bozulması ve endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımı, mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına ve dolayısıyla hücre ölümüne (nekroz ve apoptoz) zemin hazırlar (Benachour ve Séralini, 2008; Richard ve ark., 2005). Ayrıca, Roundup'un sinyal yolları üzerindeki etkileri protein kinazlarının aktivasyonu ile hücrel stres yanıtlarını tetikler (Clair ve ark., 2012). Bu mekanizmalar, testosteron seviyelerinde azalma, aromataz enzimi aktivitesinin bozulması ve sperm üretiminde düşüş gibi endokrin bozucu etkilerle birleşerek erkek fertilitésinin azalmasına neden olur. Roundup'un erkek üreme sistemi üzerindeki toksisitesi, oksidatif stresin tetiklediği hücrel ve moleküler bozukluklar aracılığıyla gerçekleşmekte olup, bu durum erkek fertilitésinde azalmaya yol açmaktadır. (Romano ve ark., 2010; Dallegrave ve ark., 2007).

2.3. Koenzim Q10'in Kimyasal Yapısı, Kaynakları ve Farmakolojik Özellikleri

CoQ10, biyolojik işlevleri bakımından vitamin benzeri bir bileşiktir; ancak tanım gereği bir vitamin olarak kabul edilmez çünkü insan hücreleri tarafından sentezlenebilmektedir. CoQ10, tüm hücrelere enerji sağlanmasında hayati bir rol oynar (Crane ve ark., 2001). Özellikle mitokondriyal solunum zincirinde kompleks I ve II'den kompleks III'e elektron taşıyarak enerji üretiminde yer alır. Bu nedenle, CoQ10 elektron taşıma zincirinde ATP üretimine katkı sağlayan bir enerji transfer molekülüdür (Crane ve ark., 2001). Bunun yanı sıra, CoQ10 hücre zarlarını serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasardan koruyan önemli bir antioksidan işlevi görür (Crane ve ark., 2001). Vücut tarafından doğal olarak sentezlenen tek lipid çözünen antioksidan olan CoQ10, sadece lipid peroksidasyonunu önlemekle kalmaz, aynı zamanda C ve E vitaminlerini aktif ve indirgenmiş formlarına geri dönüştürebilir. CoQ10'un bu antioksidan fonksiyonu, indirgenmiş formu olan ubikinol ile ilişkilidir ve bu formun, oksitlenmiş ubikinon formundan sürekli olarak yenilenmesi gereklidir (Crane ve ark., 2001).

Mitokondrilerde enerji üretimi için temel bir rol oynayan CoQ10, besinlerin hücresel enerji birimi olan adenosin trifosfata (ATP) dönüştürülmesini kolaylaştırır (Crane, 2001; Zozina ve ark., 2018). Vücut CoQ10'u doğal olarak sentezleyebilmekte olup esas olarak karaciğerde üretilmektedir. Bununla birlikte, somon ve ton balığı gibi yağlı balıklar, sakatatlar başta olmak üzere et ürünleri ve tam tahıllar gibi bazı gıdalarda düşük miktarlarda bulunmaktadır (Pravst ve Žmitek, 2011).

Çeşitli toksik ajanlar tarafından indüklenen kardiyotoksisite, hepatotoksisite, nörotoksisite ve nefrotoksisite gibi birçok toksisiteye karşı CoQ10'un koruyucu etki gösterebildiği ortaya konmuştur (Garrido-Maraver ve ark., 2014). CoQ10'un bu etkilerinin altında yatan mekanizmalar; LPO ve ROS baskılanması, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interlökin-1 β ve 6 (IL-1 β ve IL-6) gibi inflamasyon belirteçlerinin azalması ve GSH düzeyinin yanı sıra SOD, KAT, GR ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinin artırılması gibi çeşitli yollarla açıklanmaktadır (Sharma ve ark., 2016).

CoQ10 takviyesinin, kanser gibi birçok hastalığın tedavisi ve önlenmesinde faydaları olduğu gösterilmiştir (El-Khadragy ve ark., 2020). Ayrıca, CoQ10, oksijen bazlı radikallerle etkileşime girerek lipid peroksidasyonunun başlamasını ve bimoleküler hasarı önleyerek antioksidan etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Bonakdar ve Guarneri, 2005). Bu faydalar, CoQ10'un belgelenmiş antioksidan ve anti-enflamatuar özellikleri ile ilişkilidir. CoQ10, doğal olarak seminal sıvıda bulunur ve semenin birkaç temel özelliğini artırmada merkezi bir rol oynar. CoQ10 eksikliği, bozulmuş sperm parametreleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, infertil erkeklerde tedavi amaçlı birkaç çalışmada kullanılmıştır. Sperm yoğunluğunu, sperm motilitesini, sperm morfolojisini ve sperm sayısını artırmaktadır. İdiopatik oligoastenoteratozoospermia hastalığına sahip bireylerde yapılan bir çalışma, CoQ10'un sperm konsantrasyonunu ve motilitesini artırma yeteneğini ve bunun antioksidan kapasite ve enzimatik antioksidan aktivite artışı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (El-Khadragy ve ark., 2020). Ayrıca, araştırmacılar CoQ10'un erkek üreme sistemleri üzerinde antiapoptotik bir etkisi olabileceğini bildirmişlerdir (Erol ve ark., 2010). Ayrıca, FSH ve LH düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (Mancini ve Balercia, 2011; Safarinejad ve ark., 2023). Yakın tarihli bir çalışmada, idiyopatik oligoastenoteratozoospermi tanısı alan erkeklerde yapılan CoQ10 tedavisinin, sperm konsantrasyonu ve hareketliliğini artırdığı; bu iyileşmenin ise antioksidan kapasitenin ve enzimatik antioksidan aktivitenin artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Alahmar ve ark., 2019). Kurşun asetat (PbAc) maruziyeti sonrası CoQ10 takviyesinin rat testisleri üzerindeki koruyucu etkilerini raştıran bir çalışmada testiküler dokuda tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlökin-1 β (IL-1 β) gibi proinflamatuvar mediyatörlerin artışıyla belirginleşen iltihabi yanıtı tetiklemiştir. Ayrıca, Bax ve kaspaz-3 ekspresyon düzeylerinde artış ve Bcl-2 düzeyinde azalma gözlemlendiği, PbAc'nin apoptozu indüklediğini gösterilmiştir. Bu patolojik değişikliklere karşılık, CoQ10 takviyesi, testislerdeki kurşun birikimini azaltmış, oksidatif stres, inflamasyon, hücre ölümü ve histopatolojik bozulmaları önemli ölçüde baskıladığını ve CoQ10'un PbAc maruziyetine bağlı gelişen üreme sistemi hasarına karşı koruyucu ve terapötik potansiyele sahip doğal bir ajan olabileceğini ortaya koymuştur (El-Khadragy ve ark., 2020)

2.4. NF- κ B/TLR4 Yolaklarının Histolojik Etkileri

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B), yapısal olarak beş farklı alt birimden (p50, p65/RelA, RelB, c-Rel, p52) oluşan bir transkripsiyon faktörleri ailesidir ve genellikle sitoplazmada inhibitör Kappa B (I κ B) proteinleri (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ vb.) ile heterodimerler halinde inaktif durumda bulunur (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Klasik (kanonik) NF- κ B aktivasyon yolu, proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1 β), patojen ilişkili moleküler paternler (PAMP'ler) ve hasar ilişkili moleküler paternler (DAMP'ler) gibi çeşitli uyarıcılar tarafından tetiklenir. Bu uyarıcılar, hücre yüzeyindeki veya sitoplazmadaki reseptörlere (örneğin, TNF reseptör ailesi, Toll-like reseptörler- TLR'ler) bağlanarak aşağı akış sinyal kaskadlarını başlatır. Sinyal kaskadı", hücrelerde bir sinyalin alınmasından sonra gerçekleşen, birbirini tetikleyen bir dizi moleküler olayı ifade eder. Tıpkı bir domino taşı dizisinin ilk taşın devrilmesiyle diğerlerini de sırayla devirmesi gibi, bir sinyal molekülünün bir reseptöre bağlanmasıyla başlayan ilk olay, sonraki molekülleri aktive eder veya inhibe eder. Bu aktivasyon veya inhibisyon, bir sonraki molekülü etkiler ve bu zincirleme reaksiyon hücre içinde bir sinyal iletim yolu boyunca ilerler. Bu sinyallerin temel hedefi, I κ B kinaz (IKK) kompleksidir. Klasik IKK kompleksi, katalitik alt birimler olan IKK α ve IKK β ile düzenleyici alt birim NEMO/IKK γ 'dan oluşur. Aktive olan IKK kompleksi, I κ B proteinlerini serin kalıntıları üzerinde fosforile eder. Fosforile I κ B proteinleri, E3 ubiquitin ligaz kompleksi olan β -TrCP tarafından tanınır ve poliubikitinasyona uğrar. Ubikitinasyona uğrayan I κ B proteinleri, 26S proteazom tarafından proteolize edilir. I κ B'nin yıkımı, NF- κ B dimerlerinin serbest kalmasına ve nükleer lokalizasyon sinyallerinin açığa çıkmasına neden olur. Serbest NF- κ B dimerleri, nükleer porlardan geçerek çekirdeğe transloke olur ve hedef genlerin promoter bölgelerindeki spesifik DNA sekanslarına (κ B bölgeleri) bağlanır. Bu bağlanma, RNA polimeraz II kompleksinin ve ko-faktörlerin rekrutmentini sağlayarak gen transkripsiyonunu başlatır (Karin ve Lin, 2002). Histolojik düzeyde, NF- κ B aktivasyonu immünohistokimya yöntemleriyle saptanabilir. Özellikle p65 alt biriminin sitoplazmadan çekirdeğe translokasyonu, hücrenin aktive olduğunu ve gen ekspresyon profilinin değiştiğini gösterir. İnflamatuvar infiltrasyonun yoğun olduğu dokularda, aktive NF- κ B pozitif lökositler

(nötrofiller, makrofajlar, lenfositler) ve dokuya özgü yerleşik hücreler (endotel hücreleri, epitel hücreleri) sıklıkla gözlemlenir. Kronik inflamatuvar hastalıklarda, bu sürekli NF- κ B aktivasyonu doku hasarının ve hastalığın ilerlemesinin önemli bir itici gücü olabilir (Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

Toll-like reseptör 4 (TLR4), özellikle Gram-negatif bakterilerin lipopolisakkariti (LPS) olmak üzere çeşitli PAMP'leri ve ayrıca endojen DAMP'leri (örneğin, HMGB1, ısı şok proteinleri) tanıyan bir yüzey reseptörüdür (Akira et al., 2006). TLR4 sinyali, Toll/IL-1 reseptör (TIR) domaini aracılığıyla dört ana adaptör proteinini (MyD88, TIRAP/Mal, TRIF, TRAM) kullanarak iki temel aşağı akış sinyal yolunu aktive eder: MyD88-bağımlı ve TRIF-bağımlı yollar (Takeda & Akira, 2004). MyD88-bağımlı yolak, TLR4 ligandına bağlandığında, TIR domaini MyD88 ve TIRAP'ı rekürte eder. MyD88, IRAK ailesi kinazlarını (IRAK1, IRAK4) aktive eder. Aktive IRAK'lar, TRAF6'yı fosforile eder ve bu da TAK1 (Transforming growth factor- β -activated kinase 1) ve TAB1/TAB2/TAB3 kompleksini aktive eder. TAK1, IKK kompleksini fosforile ederek NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açar. MyD88 yolu ayrıca MAPK (Mitogen-activated protein kinase) yollarını (JNK, p38, ERK) aktive ederek AP-1 gibi diğer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna da katkıda bulunur ve proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6) ekspresyonunu indükler. TRIF-bağımlı yolak ise TLR4 endozomlara internalize olduğunda, TRIF ve TRAM adaptör proteinlerini kullanır. TRIF, TRAF3'ü aktive ederek IRF3 (Interferon regulatory factor 3) aktivasyonuna ve tip I interferonların (IFN- α/β) üretimine yol açar. TRIF ayrıca RIP1 (Receptor-interacting protein 1) kinazını aktive ederek NF- κ B'nin geç faz aktivasyonuna da katkıda bulunur. Histolojik olarak, TLR4 ekspresyonu immünohistokimya ile çeşitli hücre tiplerinde saptanabilir. Özellikle makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilir. Enfeksiyon bölgelerinde, TLR4 pozitif immün hücrelerin yoğun infiltrasyonu ve bu hücrelerde NF- κ B aktivasyonunun göstergesi olan nükleer p65 birikimi tipiktir. Kronik inflamatuvar hastalıklarda, anormal TLR4 ekspresyonu ve aktivasyonu, inflamatuvar döngünün sürekli hale gelmesine ve doku hasarının ilerlemesine katkıda bulunabilir. Örneğin, romatoid artritli sinoviyal dokuda artmış TLR4 ekspresyonu ve NF- κ B aktivasyonu gözlemlenir. Benzer şekilde, aterosklerotik plaklarda TLR4

ekspresyonu artışı ve NF- κ B aktivasyonu, inflamatuvar süreçleri tetikleyerek plak gelişimini ve instabilitesini destekler. İmmünohistokimyasal analizler, TLR4 ekspresyon seviyelerini ve aktivasyon durumunu değerlendirerek hastalık patogeneziye yönelik önemli bilgiler sunar (Takeda ve Akira, 2004).

TLR4, NF- κ B'nin güçlü bir yukarı akış aktivatörüdür ve birçok inflamatuvar durumda bu iki molekülün aktivasyonu yakından ilişkilidir. TLR4 tarafından tanınan PAMP'ler ve DAMP'ler, MyD88-bağımlı yolak üzerinden IKK kompleksini aktive ederek NF- κ B'nin çekirdeğe translokasyonunu ve proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu tetikler (Medzhitov, 2010). Bu sinyalizasyon, lökositlerin inflamasyon bölgesine göçünü, sitokin ve kemokin salgılanmasını ve dolayısıyla inflamatuvar yanıtın başlatılmasını ve sürdürülmesini sağlar. Histolojik incelemelerde, TLR4 ekspresyonunun arttığı dokularda sıklıkla eş zamanlı NF- κ B aktivasyonu gözlemlenir (Kawasaki ve Kawai, 2014). Örneğin, bir bakteriyel pnömoni vakasında akciğer dokusunda yoğun nötrofil infiltrasyonu ve bu nötrofillerde hem yüksek TLR4 ekspresyonu hem de nükleer NF- κ B pozitifliği saptanabilir. Bu durum, bakteriyel LPS'nin TLR4'ü aktive ederek NF- κ B aracılığıyla güçlü bir inflamatuvar yanıtı tetiklediğini gösterir. Ancak, NF- κ B ve TLR4 arasındaki ilişki sadece doğrusal değildir. NF- κ B tarafından transkripsiyonu düzenlenen genler arasında TLR4'ün kendisi de bulunabilir. Bu durum, pozitif veya negatif geri bildirim döngülerine yol açarak inflamatuvar yanıtın amplifikasyonunu veya çözünürlüğünü etkileyebilir. Ayrıca, TLR4 sinyali sadece NF- κ B'yi değil, aynı zamanda IRF3 gibi diğer transkripsiyon faktörlerini de aktive ederek tip I interferonlar gibi farklı efektör moleküllerin üretimine katkıda bulunur. Bu nedenle, histolojik analizlerde TLR4 aktivasyonunun sadece NF- κ B aktivasyonu ile değil, aynı zamanda interferon yanıtı ve diğer immünolojik belirteçlerle birlikte değerlendirilmesi, inflamatuvar süreçlerin karmaşıklığını anlamak için önemlidir (Kawasaki ve Kawai, 2014).

2.5. Nrf2/HO-1/Keap1 Yolağının Testiküler Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri

Testiküler disfonksiyon, infertiliteye sebep olan önemli bir faktördür ve son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Proje önerimizde belirttiğimiz gibi birçok çalışma, anormal sperm fonksiyonu ve morfolojisinin ROS ve oksidatif stresle

ilişkilendirildiğini göstermiştir. Nükleer faktör eritroid türetilmiş 2 (Nrf2), oksidatif durumu, mitokondriyal disfonksiyonu, inflamasyonu ve proteostazı düzenleyen, hücrel streslere (içsel veya dışsal) karşı transkripsiyonel yanıt olarak ortaya çıkan bir faktördür (Rotimi ve ark., 2022). Yapılan çalışmalarda Nrf2'nin spermatogenezde oksidatif hasarın önlenmesinde önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir (Wajda ve ark., 2016). Testiküler OS, Nrf2 geninin downregülasyonuna sebep olarak, artmış testiküler lipid peroksidasyonuna, germ hücre ölümünde artış ve antioksidan seviyelerinde azalmaya yol açar (Moreno-Fernandez ve ark., 2019). Nrf2, hücrel antioksidan savunmada kritik bir rol oynayarak testisi OS'I korur (Wajda ve ark., 2016). Nrf2, antioksidan yanıt yoluyla antioksidan genlerin promotörlerinde antioksidan yanıt elementlerine (AREs) bağlanarak çalışır. Bu ARE'ler, cis-aktif geliştirici dizinlerdir. Nrf2, temel lösin fermuar (bZIP) proteinlerinin cap-n-collar ailesinin bir üyesidir. Nrf2 genellikle sitoplazmada Kelch-like ECH-Associated Protein 1 (KEAP1) ile bağlanır ve Nrf2'nin parçalanmasını hedefler. OS veya elektrofil varlığı nedeniyle KEAP1 üzerinde nükleofilik sistein sülfhidril gruplarının modifikasyonu meydana geldiğinde, bu, KEAP1 bağımlı Nrf2'nin parçalanmasını ve aynı zamanda Nrf2 birikimini çekirdekte azaltan alosterik bir konformasyonel değişikliğe neden olur (Kumar ve ark., 2014). Antioksidan stres sırasında, Nrf2 ekspresyonu artar ve Nrf2 sitoplazmadan çekirdeğe taşınır; bu protein daha sonra antioksidan stresörün downstream'unda bulunan iki antioksidan enzim olan NQO-1 ve HO-1'i aktive etmek için ARE ile etkileşime girer, böylece burada koruyucu bir rol oynayarak hücrelerin antioksidan stres yeteneğini artırır. Bu nedenle, Nrf2 aracılığıyla iletim yolu, hücrelerdeki en önemli antioksidan yollarından biridir (Feng ve ark., 2020).

Bilindiği kadarıyla, glifosatın neden olduğu testiküler ve sperm hasarına karşı CoQ10'un koruyucu etkilerini kapsamlı şekilde inceleyen bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Bu doğrultuda, bu çalışmada CoQ10'un antioksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuar özellikleri, özellikle Nrf2/Keap1/HO-1 sinyal yolları üzerinden detaylı olarak araştırılmaktadır. Ayrıca, konvansiyonel ve fonksiyonel sperm parametrelerinin birlikte değerlendirilmesiyle, CoQ10'un hem in vivo hem de in vitro koşullardaki etkileri kapsamlı biçimde analiz edilmekte; böylece glifosat

kaynaklı üreme toksisitesine karşı terapötik potansiyeline dair yeni bulgular sunulması amaçlanmaktadır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Kullanılan Hayvan Materyali

Mevcut tez çalışmasının gerçekleştirilmesi amacıyla, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi (MAKÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, protokol numarası 1336-2024 ile onay alınmıştır. Sunulan tez çalışmasında Burdur MAKÜ Deney Hayvanları Ünitesinden sağlanan CD1 ırkına ait 10-12 haftalık yaklaşık 33.73 ± 3.10 gr erkek (n=42) fare hayvan materyeli olarak kullanıldı. Grupların belirlenmesinde Basit Rasgele Örnekleme Yöntemi ile Tek Körlü Deneme (Single Blind) Yöntemi kullanılmıştır. Deney süresince tüm hayvanlar, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde 20-22 °C oda sıcaklığında barındırılarak, *ad libitum* su ve standart yem ile beslendi. Otuzbeş günlük deney süresi sonunda fareler sabah tartılarak vücut ağırlıkları kaydedilmiştir. Tartım sonrası fareler ksilazin-ketamin (7.5mg mg/kg - 80 mg/kg, i.p.) ile anesteziye alındı. Anestezi altında kalplerinden kan alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi edildi. Biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere kan örnekleri EDTA içeren serum tüplere alınarak 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen serum analiz süresine kadar -80 °C saklandı. Ötenazi uygulanan farelerin testisleri çıkarıldıktan sonra her iki testis ve epididimis ağırlıkları ayrı olarak tartıldı. Sol testis dokusunun yarısı oksidatif stress analizleri, diğer yarısı da Western blot tekniği ile Nrf2/Keap1/HO-1, TLR4/NF-κB, Bax, Bcl yoğunluğu ve ekspresyonunun belirlenmesinde kullanılmak üzere analiz aşamasına kadar -80 °C'de olan dondurucuya kaldırıldı. Sağ testis histolojik ve histopatolojik analizlerin yapılabilmesi için bütün olarak % 10 tamponlu nötral formalin ile hazırlanan tespit solüsyonuna konuldu, doku bütünlüğünün olumsuz etkilenmemesi için iki saat tespit solüsyonunda durduktan sonra trimlendi ve trimlenen testis dokusu toplam 24 saat tespit solüsyonunda bekletildi. Tamponlu nötral formalin solüsyonunda tespit süresini tamamlayan testis doku örnekleri, çeşme suyunda yıkama sonrası rutin takibe (dereceli alkol serileri takiben ksilol ve parafin aşamalarından geçirilen) alındı. Rutin takip sonrası parafine gömülen dokular

bloklendi. Spermatolojik analizlerin yapılabilmesi için sağ ve sol testise ait kauda epididymis alınıp trimlendi ve gereken analizler için sperma hazırlandı. Tez çalışmasının spermatolojik parametreler ile ilgili kısmı Burdur MAKÜ Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı laboratuvarında, patolojik değerlendirmeler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, oksidatif stres parametreleri Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapılırken, diğer tüm analizler Burdur MAKÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Maddelerin Hazırlanması, Doz Seçimi ve Uygulama Grupları

3.1.2.1 Glifosat Maddesinin Hazırlanması ve Doz Seçimi

Bu çalışmada, izopropilamin tuzu formunda 486 g/L glifosat (360 g/L glifosat asidine eşdeğer) içeren ticari bir GBH olan Roundup® (Monsanto Company, St. Louis, MO, ABD) kullanılmıştır. GLY uygulamasında kullanılan 500 mg/kg vücut ağırlığı dozu, ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA, 1993) tarafından fareler için bildirilen olumsuz etki gözlenmeyen seviye (NOAEL) temel alınarak belirlenmiştir. Bu doz, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA, 2023) 90 günlük bir çalışmada bildirdiği 1.221 mg/kg ve Japonya Gıda Güvenliği Komisyonu'nun (FSCJ, 2016) erkek fareler için bildirdiği 1.630 mg/kg vücut ağırlığı NOAEL değerlerinin altında kalmaktadır. Ayrıca, bu doz farelerde yapılmış benzer çalışmalarla da uyumludur (He ve ark., 2022; Bali ve ark., 2019).

Roundup, distile su ile seyreltilerek hazırlandı ve günlük olarak oral gavaj yoluyla uygulandı. Araştırma da kullanılan ticari preperat CoQ10 takviyesi (Solgar, 100 mg), kapsül formunda temin edilmiştir ve CoQ10, pirinç kepeği yağında çözünmüş okside ubiquinone formunda içermektedir. Uygulama için kapsüllerin içeriği pirinç kepeği yağına tamamen çözülerek sıvı form elde edildi ve CoQ10 günlük olarak oral gavaj yöntemiyle 200 mg/kg vücut ağırlığı dozunda verildi (Nyariki ve ark., 2019). Çözücü etkisini kontrol etmek amacıyla sham kontrol

grubuna aynı hacimde yalnızca pirinç kepeği yağı uygulandı. Deney prosedürü Tablo 1 de gösterilmiştir. CoQ10 uygulaması, özofagus irritasyonunu ve olası etkileşimleri önlemek amacıyla her gün glifosat uygulamasından iki saat önce yapıldı. Tüm uygulamalar, farelerde spermatogenez döngüsüne karşılık gelen 35 gün boyunca uygulanmıştır (Griswold, 2016).

Bu çalışmada, GLY'nin testis ve sperm üzerindeki potansiyel zararlarının değerlendirilmesi ve CoQ10'un bu zararlara karşı testiküler doku ve sperm parametreleri üzerindeki olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tablo 3.1. Deney gruplarına ait uygulama protokolü ve deneysel işlem basamakları

Gruplar	Uygulama ve Doz	Hayvan Sayısı (n)
Kontrol Grubu	Çalışma boyunca hiçbir uygulama yapılmadı.	6
Sham Grubu	35 gün boyunca CoQ10 grubuyla aynı hacimde pirinç kepeği yağı oral gavaj ile uygulandı.	9
CoQ10 Grubu	35 gün boyunca günlük 200 mg/kg vücut ağırlığında CoQ10 oral gavaj ile uygulandı.	9
GLY Grubu	35 gün boyunca günlük 500 mg/kg vücut ağırlığında Roundup oral gavaj ile uygulandı.	9
GLY + CoQ10 Grubu	35 gün boyunca günlük 500 mg/kg Roundup ve 200 mg/kg CoQ10 oral gavaj ile birlikte uygulandı.	9

3.1.2.2 Koenzim Q10 maddesinin hazırlanması ve doz seçimi

Kapsül formunda satılan CoQ10 maddesi (Solgar-100mg) eczaneden alınarak temin edilmiştir. Çalışmada farelere 200mg/kg c.a/gün gavajla oral olarak uygulama yapılmıştır. Hayvanların ortalama ağırlıklarına göre belirtilen dozda CoQ10 solüsyonu verilebilmesi için hemen gavaj öncesinde pirinç kepeği yağı içinde çözülmüş olarak piyasadan satın alınan sıvı haldeki CoQ10 maddesi ışıktan korunarak porsiyonlanmış ve hayvanlara oral olarak uygulanmıştır (Nyariki ve ark., 2019). Pirinç kepeği yağı içinde çözülmüş olan CoQ10 kullanılması sebebiyle pirinç

kepeği yağı uygulanan sham kontrol grubu oluşturulmuş CoQ10 ile aynı miktarda gavaj yolu ile hayvanlara günlük olarak uygulanmıştır. GLY artı CoQ10 grubunda glifosat maddesi (500mg/kg/c. a/gün gavajla) ve CoQ10 (200mg/kg c.a/gün gavajla) ikisinin de aynı uygulama yoluyla uygulanacak olması sebebiyle hayvanların özefaguslarının irrite olmaması ve maddelerin birbirleriyle etkileşime girmemesi için CoQ10 GLY den 2 saat önce verilmiştir. Proje önerisinde sham kontrol grubu olarak CoQ10 maddesinin çözücüsü olarak zeytin yağı kullanılacağı belirtilmişti. Ancak hayvan uygulamaları başlamadan, Solgar firmasına ait kapsül şeklinde ticari preperat kullanılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir. Bu preperat içeriğinde pirinç kepeği yağı kullanılması sebebiyle sham kontrol grubu olarak CoQ10 grubu ile aynı miktarda pirinç kepeği yağı verilen grup oluşturulmuştur ve ona göre etik kurul izni de güncellenmiştir

3.1.2.3 Uygulama Grupları ve Doz Seçimi

Fareler, beş farklı gruba dağıtılmıştır ve deney prosedürü Tablo 1 de gösterilmiştir. Tüm uygulamalar, farelerde spermatogenez döngüsüne karşılık gelen 35 gün (Griswold, 2016) boyunca uygulanmıştır. Bu çalışmada, GLY'nin testis hasarına neden olup olmadığını değerlendirmek, testisin ve epididimisten elde edilecek olan spermat ozoonların GLY uygulaması sonrası bir spermatogenez döngüsünden geçtikten sonra (35 gün) testis dokusunda ve sperm parametrelerinde ne tür değişiklik meydana geldiği incelenmiştir.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Vücut ve Testis Ağırlıkları ile Histolojik ve Histopatolojik İnceleme Prosedürleri

Deney süresince farelerin vücut ağırlıkları her gün ve son gavaj uygulamasından bir gün sonra (36. gün) olacak şekilde düzenli olarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Çalışmanın 36. gününde, fareler ketamin/xylazin karışımı ile anestezi altına alınarak ötenazi edilmiştir. Sağ ve sol testisler ile epididimler dikkatlice diseke edilmiş, yağ dokularından arındırılmış ve gram cinsinden tartılmıştır. Her bir

hayvana ait sağ ve sol testislerin toplam ağırlığı mutlak çift testiküler ağırlık olarak kaydedilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmaların yapılabilmesi amacıyla relatif çift testiküler ağırlık, mutlak çift testiküler ağırlığın son vücut ağırlığına oranının yüzde olarak hesaplanmasıyla elde edilmiştir.

Histolojik ve histopatolojik incelemeler için sağ testis, %10'luk nötr tamponlu formalin solüsyonunda 24 saat süreyle fiks edilmiştir. Sol ve sağ cauda epididimis yapıları spermatolojik analizler için ayrılmıştır. Sol testis, ileri düzey biyokimyasal ve moleküler analizlerde kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

Fiksasyon işlemini takiben rutin doku takip işlemleri uygulanmış ve parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitlerden bir kısmı genel histolojik ve histopatolojik değerlendirme amacıyla Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanırken, diğer kesitler immünohistokimyasal analizlerde kullanılmıştır.

Testis dokusunun histolojik yapısı, normal morfolojiden sapmaların tespiti amacıyla ışık mikroskobu altında değerlendirilmiş ve kontrol ile deney grupları arasında karşılaştırmalar yapılmıştır.

Histopatolojik değişiklikler, Cosentino ve ark., (1985) tarafından tanımlanan derecelendirme sistemi (Tablo 3.2) kullanılarak değerlendirilmiştir. Her grup için rastgele seçilen 100 seminifer tübül skorum sistemine tabi tutulmuş ve dağılıma göre baskın olan derecelendirme belirlenmiştir. Ayrıca, ödem, hemoraji ve inflamasyon gibi ek patolojik bulgular da kaydedilmiştir.

Tablo 3.2. Cosentino histolojik skrlama sistemi

Skor	Özellikler
I	Normal testis histolojik yapısı ve düzenli dizilmiş germ hücreleri
II	Germ hücrelerinde bütünlüğün kaybı, sıkıca paketlenmiş seminifer tübüller
III	Düzensiz ve dökülen germ hücreleri, küçülmüş piknotik çekirdekler, belirgin olmayan seminifer tübül sınırları
IV	Düzensiz ve hasarlı seminifer tübüller, germ hücrelerinin koagülatif nekrozu ile dolu tübüller

3.2.2 İmmünohistokimya

İmmünohistokimyasal boyama işlemi, üretici firmanın protokolüne uygun olarak streptavidin–biotin peroksidaz (StreptABC-P) yöntemi (UltraVision Large Detection System, Thermo Scientific, Waltham, MA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Antijen geri kazanımı, sitrat tamponu (pH 6.0) ile yapılmıştır; Ki67 kesitleri düdüklü tencerede 15 dakika işleme tabi tutulurken, Nrf2 kesitleri mikrodalga fırında (iki kez 800 W’de 5 dakika ve bir kez 600 W’de 5 dakika) ısıtılarak işlenmiştir. Ki67 (klon SP6, Thermo Fisher Scientific, kullanıma hazır) ve Nrf2 (Affinity Biosciences, 1:200 dilüsyon) primer antikorları 37 °C’de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sinyal tespiti AEC substrat kiti kullanılarak sağlanmış, ardından Gill’in hematoksilini ile karşı boyama yapılmıştır. Negatif kontroller, primer antikor yerine PBS kullanılarak hazırlanmıştır. Boyama değerlendirmesi, yaygınlık (diffusiveness) ve şiddet (intensity) skorlarının çarpımı ile hesaplanan bir histoskor yöntemi ile yarı kantitatif olarak gerçekleştirilmiştir (Histoskor = yaygınlık × şiddet). Mikrofotograf çekimleri Leica mikroskop sistemi ile yapılmıştır.

3.2.3 Biyokimyasal Analizler İçin Testiküler Doku Homojenizasyonu

Testiküler doku örnekleri (0,5 g), buz üzerinde 5 mL potasyum dihidrojen fosfat tamponu (50 mM, pH 7) içerisinde mekanik olarak homojenize edilmiştir (IKA-T18 Ultra Turrax homojenizatör kullanılarak). Bu işlem sonrasında ultrasonik

homojenizasyon uygulanmıştır (Bandelin Sonopuls, 20 kHz). Elde edilen homojenat 5000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı analizler için ayrılmıştır.

3.2.4 Testiküler Dokuda Lipid Peroksidasyonu, Oksidatif Stres ve Antioksidan Kapasite Ölçümleri

Lipid peroksidasyonu, Draper ve Hadley (1990) tarafından tanımlanan metoda göre malondialdehit (MDA) seviyelerinin belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Tiyobarbitürik asit ile yapılan reaksiyon sonucunda oluşan renkli kompleks, 532 nm’de ölçülmüş ve sonuçlar nmol/g yaş doku olarak ifade edildi. Glutasyon (GSH) seviyeleri ise Ellman yöntemi (Hilf ve Hissin, 1976) ile belirlenmiştir; DTNB ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucu oluşan sarı ürün 412 nm’de ölçüldü ve değerler mg/g yaş doku olarak raporlanmıştır. Toplam antioksidan kapasite (TAS) ve toplam oksidan kapasite (TOS), ticari test kitleri kullanılarak belirlendi (TAS: Rel Assay Diagnostics, Türkiye; katalog no: RL0017; TOS: Rel Assay Diagnostics, Türkiye; katalog no: RL0024). TAS, ABTS indirgenmesi ile 660 nm’de ölçülerek mmol/L cinsinden ifade edildi; TOS ise Fe²⁺ oksidasyonu ile 660 nm’de ölçülüp µmol/L olarak raporlanmıştır. Oksidatif stres indeksi (OSI), Esen ve ark. (2012) tarafından tanımlanan formüle göre $OSI = TOS / (TAS \times 100)$ hesaplanarak belirlenmiştir. Tüm biyokimyasal analizler, oksidatif stres ve antioksidan savunma mekanizmalarını değerlendirmek amacıyla standart protokoller doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Western Blot Analiz Yöntemi

Oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyonla ilişkili protein düzeylerini değerlendirmek amacıyla her gruptan testis dokuları toplanmış ve analiz zamanına kadar -80 °C’de saklanmıştır. Western blot analizinin yapılacağı gün, doku örnekleri tartılmış, sıvı azot içerisinde pulverize edilmiş ve proteaz ile fosfataz inhibitörleri içeren RIPA tamponu (Ecotech Bio, Türkiye) ile lizlenmiştir. Homojenizasyon işlemi, doku öğütücü cihazı (Qiagen, ABD) kullanılarak 30 Hz’de 20 saniye süresince gerçekleştirilmiştir. Toplam protein konsantrasyonu BCA protein tayin kiti (Thermo Scientific, ABD) ile belirlenmiştir. Eşit miktarda protein (30 µg), %10 SDS-PAGE jelinde ayrıştırılmış ve PVDF membranlara transfer edilmiştir. Membranlar

%5 BSA ile 90 dakika bloke edildikten sonra, 4 °C’de bir gece boyunca primer antikolar, Nrf2 (A-10, sc-365949), HO-1/HMOX1 (A-3, sc-136960), Keap1 (F-10, sc-514914), Bax (B-9, sc-7480), Bcl-2 (C-2, sc-7382), TLR4 (25, sc-293072) ve NF-κB p65 (F-6, sc-8008) (hepsi Santa Cruz Biotechnology, ABD ; 1:1000 dilüsyon) gece boyunca 4°C’de inkübe edilmiştir. TBST ile yapılan yıkama işlemlerinin ardından, HRP-konjuge sekonder antikolar (Santa Cruz, sc-2004/sc-2005) 90 dakika süreyle uygulanmıştır. Protein bantları ECL reaktifi (Thermo) kullanılarak görselleştirilmiş ve Image Lab™ Yazılımı (Bio-Rad) ile kantitatif analizleri yapılmıştır.

3.2.6 Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi ve Akım (Flow) Sitometrisi Analizleri

Sperm sayısı, Yokoi ve arkadaşlarının (2003) uyarladığı bir yöntemle göre analiz edildi. Cauda epididimis diseke edilip Tris tamponunda ince doğrandıktan sonra, sperm salınımını kolaylaştırmak için 35°C’de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra, sperm konsantrasyonu ışık mikroskobu altında (×200 büyütme) hemositometre kullanılarak belirlendi. Sperm motilitesi, Sönmez ve ark. (2005) tarafından bildirilen yöntemle, en az üç farklı mikroskop alanında (×400 büyütme) incelenerek ortalama motilite oranı hesaplandı. Osmotik direnç, membran fonksiyonel bütünlüğünü yansıtan hiposmotik şişme testi (HOST) ile değerlendirildi. Morfolojik anormallikler, Hancock çözeltisinde seyreltilen örneklerde (Hancock, 1952) faz kontrast mikroskopisi (×100 büyütme) ile tespit edildi. Akış sitometrik analiz, Beckman Coulter marka CytoFLEX platformunda gerçekleştirildi; 525/40, 585/42 ve 610/20 nm dalga boylarında emisyon filtreleri ve 488 nm, 50 mW lazer kullanıldı. Her örnekten yaklaşık 10.000 olay kaydedildi. Analiz öncesi örnekler 37°C’de 5 dakika inkübe edildi. Boyama işlemleri Yeni ve arkadaşlarının (2022) tarif ettiği şekilde yapıldı. Sperm plazma membran ve akrozom bütünlüğü (PMAI), canlılık ve mitokondriyal reaktif oksijen türleri (MitoSOX) seviyeleri standart protokoller doğrultusunda değerlendirildi. Örnekler, PBS içinde 5×10^6 sperm/mL olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı. PMAI analizi için 10 µL semen örneğine 5 µL FITC-PNA ve 3 µL PI, 480 µL PBS içinde eklendi. Canlılık değerlendirmesinde, 492 µL PBS içindeki sperm örneğine 5 µL SYBR-14 ve 3 µL PI eklendi. Mitokondriyal ROS

tespiti için, 492 µL PBS içinde 10 µL sperm örneğine 5 µL MitoSOX Red (5 mM) ve 3 µL PI eklendi. Tüm örnekler 37°C’de karanlık ortamda 15 dakika inkübe edilip CytExpert 2.2 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.2.7 Serum Hormonlarının Kantitatif Analizi

Eppendorf tüplerinde –80 °C’de saklanan serum örnekleri, buz banyosu içerisinde oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Santrifüjleme işleminin ardından, testosteron (BT-EA0017Mo) ve luteinize edici hormon (LH) (BT-E0573Mo) düzeyleri, üretici firmanın protokolüne uygun olarak ticari ELISA kitleri (BT Lab, Çin) kullanılarak ölçülmüştür. Absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunmuştur.

3.2.8 İstatistiksel Analizler

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı (sürüm 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve sonrasında post-hoc analiz için Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. p değeri 0,05’in altında olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Vücut Ağırlığı, Mutlak ve Relatif Testis Ağırlığı Bulguları

Uygulanan maddelerin erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla vücut ve testis ağırlıkları ölçülmüş ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Deney başlangıcında gruplar arasında başlangıç vücut ağırlıkları benzer bulunmuş olup, bu durum uygulama öncesinde grupların homojen dağıldığını ve başlangıç koşullarının karşılaştırılabilir olduğunu göstermektedir. Otuz beş günlük uygulama süresinin sonunda, GLY grubunda vücut ağırlığında diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu durum, GBH maruziyetinin sistemik toksisiteye yol açabileceğini ve genel fiziksel durumu olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir. CoQ10'un eşzamanlı uygulanması, bu vücut ağırlığı kaybını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hafifletmiş ($p < 0.05$) ve değerlerin kontrol, sham ve CoQ10 gruplarına yakın seviyelere dönmesini sağlamıştır. Bu bulgu, CoQ10'un sistemik koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Benzer şekilde, GLY grubunda hem mutlak hem de relatif testis ağırlıkları anlamlı şekilde azalmış ve bu azalmalar diğer tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu sonuçlar, GBH'nin testiküler toksisite oluşturduğunu ve testis hacmini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. GLY + CoQ10 grubunda ise bu azalmaların kısmen geri döndüğü ve CoQ10'un bu olumsuz etkileri bir miktar engellediği belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Kontrol, sham ve CoQ10 grupları arasında hem vücut hem de testis ağırlıkları bakımından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu durum, CoQ10'un tek başına uygulandığında herhangi bir zararlı etkisinin olmadığını ve biyolojik açıdan güvenli bir ajan olduğunu desteklemektedir. Elde edilen veriler, CoQ10'un GBH kaynaklı sistemik ve testiküler toksisiteyi hafifletme potansiyeline sahip olduğunu ve olası bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Tablo 4.1. Gruplara göre testis ve vücut ağırlığı parametreleri

Gruplar	Mutlak Testis Ağırlığı (MTA) (g)	Son Vücut Ağırlığı (SVA) (g)	Relatif Testis Ağırlığı (%)
Kontrol	0,176 ± 0,015 ^a	35,33 ± 2,37 ^a	0,562 ± 0,122 ^a
Sham	0,172 ± 0,017 ^a	35,28 ± 5,01 ^a	0,558 ± 0,117 ^a
CoQ10	0,186 ± 0,02 ^a	36,29 ± 2,37 ^a	0,579 ± 0,112 ^a
GLY	0,09 ± 0,048 ^b	32,39 ± 1,75 ^b	0,290 ± 0,158 ^c
GLY + CoQ10	0,170 ± 0,05 ^a	35,78 ± 1,90 ^a	0,472 ± 0,140 ^b

Vücut Ağırlığı (MTA), son vücut ağırlığı (SVA) ve relatif testis ağırlığı [(MTA/SVA) × 100].

Veriler ortalama ± standart sapma (SS) şeklinde ifade edilmiştir. Grup başına örneklem sayıları şu şekildedir: Kontrol (n = 6), Şam (n = 9), CoQ10 (n = 9), GLY (n = 9) ve GLY+CoQ10 (n = 9). Aynı sütun içinde farklı üst simge harfler (a, b, c) gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (p < 0,05; tek yönlü ANOVA ve ardından yapılan Tukey post hoc testi).

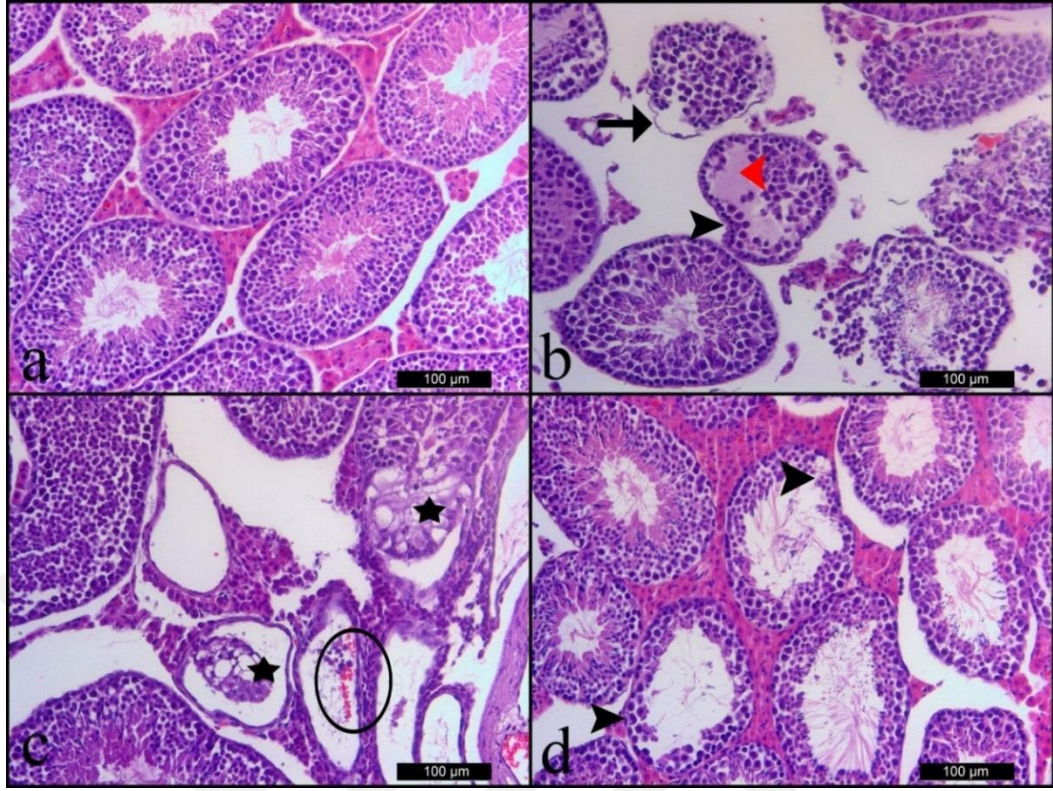
4.2 Histopatolojik Değişikliklere İlişkin Bulgular

Tüm deney gruplarına ait testiküler doku kesitleri hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelenmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Kontrol, sham ve CoQ10 gruplarında seminifer tübüller, gelişmekte olan germ hücreleri, lümen yapısı, seminifer epitel tabakası, Sertoli ve Leydig hücreleri ile kapiller damar yapısı detaylı biçimde değerlendirilmiş olup, bu gruplarda testiküler dokular fizyolojik morfolojik özellikler sergilemiştir. GLY grubunda ise belirgin şekilde hidropik dejenerasyon, germinal epitel tabakasında incelme ve deskuamasyon gibi patolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu morfolojik bozulmaların daha hafif formu GLY+CoQ10 grubunda da izlenmiştir. (Şekil 4.2). Cosentino yöntemine göre yapılan histopatolojik skora sonuçları Tablo 4'te sunulmuştur. GLY grubunda ağırlıklı olarak Grade II lezyonlar tespit edilirken,

kontrol, sham, CoQ10 ve GLY + CoQ10 gruplarında ise genellikle Grade I olarak sınıflandırılmış testiküler yapılar gözlemlenmiştir. GLY grubunun histopatolojik incelemesinde hidropik dejenerasyon, germinal epitelyumda incelme ve bazı hayvanlarda belirgin düzensizlikler tespit edilmiştir. Bu belirgin değişiklikler gösteren seminifer tübüller Cosentino skorlamasına göre Grade III olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca, GLY grubundaki bir hayvanda hemoraji ve ödem bulgularına da rastlanmıştır (Şekil 4.1).

Tablo 4.2. Deney gruplarına göre cosentino histolojik skorlama dağılımı.

Gruplar	Cosentino skoru
Kontrol	I
Sham	I
CoQ10	I
GLY	II
GLY-CoQ10	I

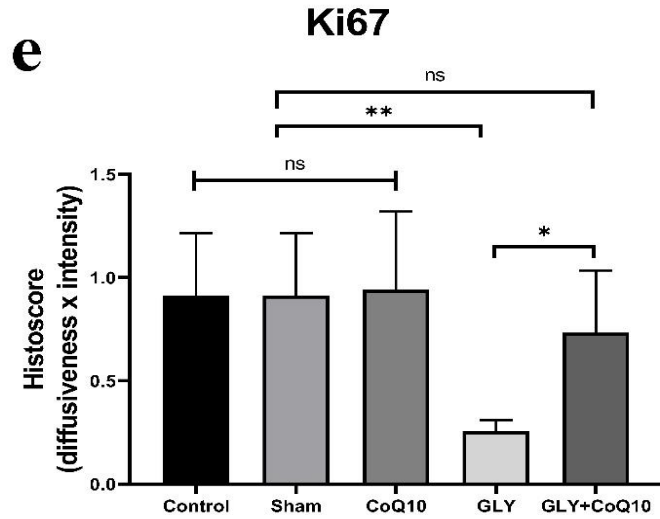
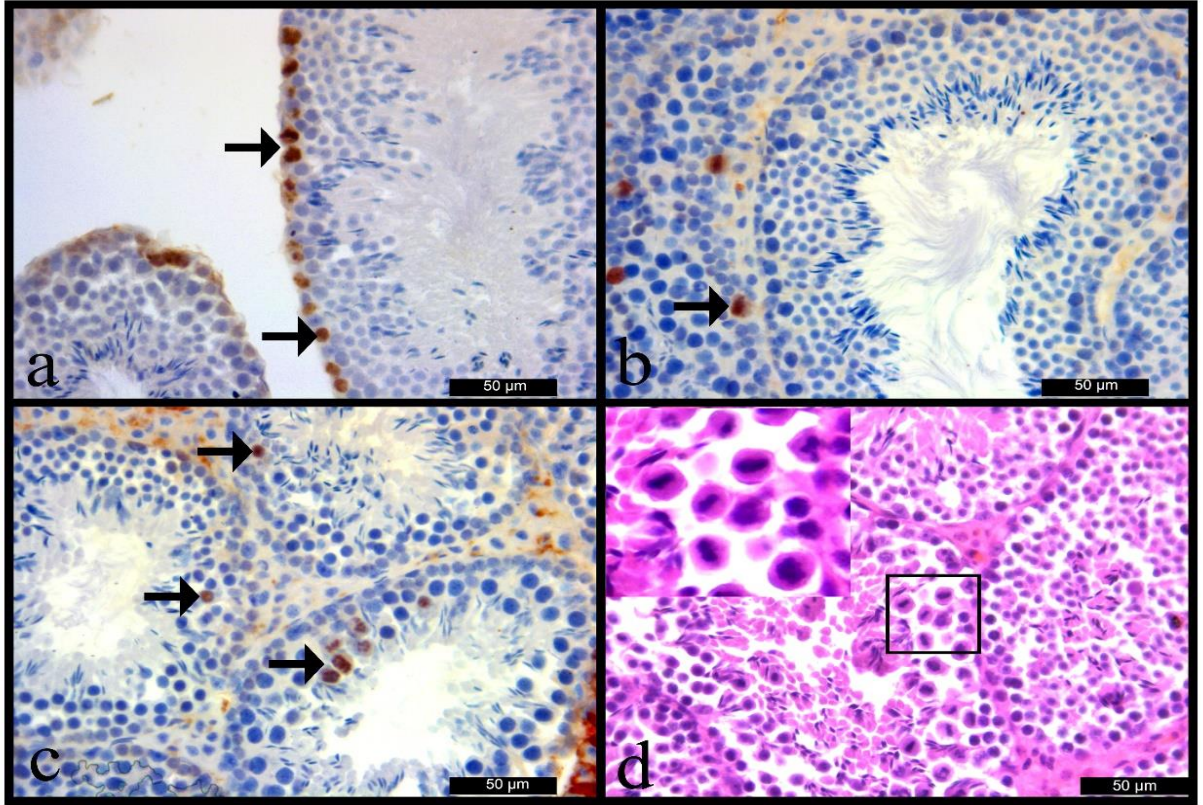


Şekil 4.1. Testiküler histopatolojik bulgular, H&E, bar = 100 µm. a) Testiküler yapının normal histolojik görünümü, Cosentino skoru: I, Kontrol grubu; b-c) Germinal hücrelerin düzensizliği, seminifer tübül sınırlarının belirsizleşmesi (ok), germinal tabakanın incelmesi (ok başları), hidropik dejenerasyon (yıldız), ödem (kırmızı ok başı), mikro-hemoraji (daire) ve seminifer tübüller arası mesafede genişleme ile karakterize hasar, Cosentino skoru: III, GLY grubu; d) Az sayıda incelmış germ tabakası içeren, normale yakın histolojik yapı, Cosentino skoru: I, GLY + CoQ10 grubu.

Mitotik aktivite, hücresel proliferasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilen bir diğer parametre olarak sunulmuştur. H&E boyaması, GLY+CoQ10 grubunda belirgin mitotik aktiviteyi ortaya koymuştur. Hücre bölünmesini değerlendirmek amacıyla immünohistokimyasal yöntemle Ki-67 boyaması uygulanmış, proliferatif hücreler nükleer pozitiflik şeklinde saptanmıştır. Kontrol grubunda, seminifer tübüllerin bazal membranı üzerinde yer alan spermatogonyalarda orta düzeyde nükleer Ki-67 ekspresyonu gözlenmiştir. GLY grubunda ise Ki-67 immünreaktivitesi belirgin şekilde azalmış, yalnızca birkaç dağınık pozitif çekirdek izlenmiştir. Buna karşılık, GLY + CoQ10 grubunda daha fazla sayıda germ hücresinde güçlü nükleer Ki-67 pozitifliği saptanmış, bu durum proliferatif aktivitedeki artışı göstermiştir. Elde edilen bulgular H&E boyamalarıyla

da doğrulanmış, özellikle GLY + CoQ10 grubunda mitotik figürlerin varlığı immunohistokimyasal verileri desteklemiştir (Şekil 11). Ki-67 proteinine ait immünreaktivite, GLY grubunda anlamlı düzeyde azalmıştır ($p < 0,05$). Kontrol, sham ve CoQ10 gruplarında ise immünreaktivite düzeyleri orta seviyelerde seyretmiştir. GLY + CoQ10 grubunda, GLY ve diğer gruplara kıyasla immünreaktivite düzeyinde anlamlı bir artış gözlenmiş olsa da ($p < 0,05$), bu artış kontrol, sham ve CoQ10 gruplarının altında kalmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 4.2). Bu sonuçlar, CoQ10 uygulamasının GLY tarafından baskılanan testiküler hücre proliferasyonunu kısmen iyileştirebildiğini ve hücre yenilenme sürecine katkı sağladığını ortaya koymaktadır.





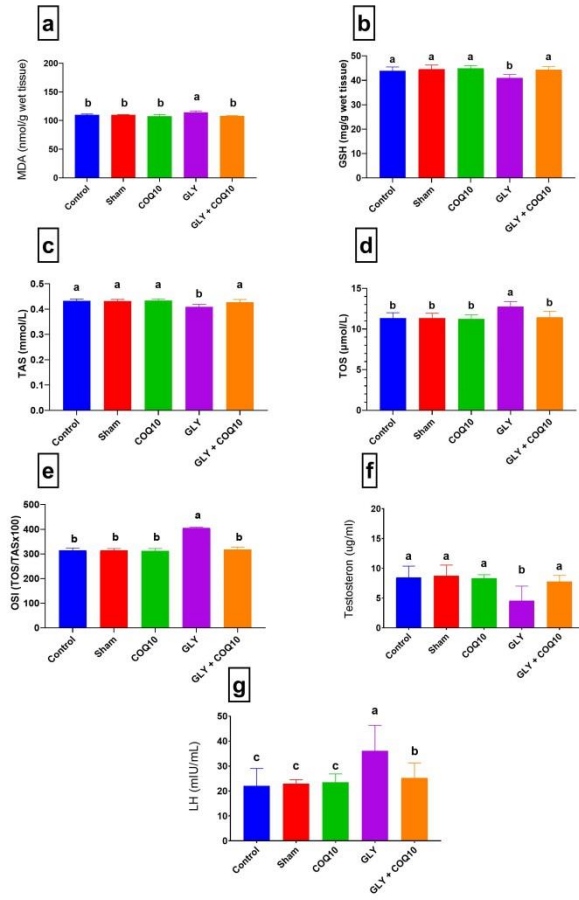
Şekil 4.2. Testis dokusunda immünohistokimyasal yöntemle belirlenmiş olan Ki-67 ekspresyonu ve histopatolojik değişiklikler (H&E), bar = 50 μ m. (a–c) panellerinde seminifer tübüllerde proliferasyon gösteren hücreleri işaret eden Ki-67 immünboyaması (nükleer kahverengi boyanma; oklar) yer almaktadır: (a) Kontrol grubunda orta düzeyde immünreaktivite, (b) GLY grubunda zayıf immünpozitiflik, (c) GLY+CoQ10 grubunda güçlü immünreaktivite. (d) GLY+CoQ10 grubunda Hematoksilen-eozin (HE) boyası ile gözlenen mitotik germ hücreleri (kare içinde). (e) Ki-67 ekspresyonunun histoskor (yaygınlık $\times$ yoğunluk) yöntemiyle kantitatif değerlendirmesi. $p < 0.01$, $p < 0.05$; ns: anlamlı değil.

4.3 Oksidatif Stres Belirteçlerine İlişkin Bulgular

GLY'nin testiküler hasarı üzerindeki etkilerinde ROS aracılık edici rolü ve CoQ10'un oksidatif stres belirteçleri üzerindeki olası düzenleyici etkileri dikkate alınarak testiküler MDA, GSH, TAS, TOS ve OSI düzeyleri değerlendirilmiştir.

Şekil 12'de görüldüğü üzere, glifosat uygulaması testiküler MDA ve TOS düzeylerini GLY+CoQ10 ve diğer gruplara kıyasla anlamlı ölçüde artırmış; bu artış CoQ10 birlikte uygulamasıyla tersine çevrilmiştir. Ayrıca, glifosat uygulaması GSH düzeylerini ve TAS aktivitelerini anlamlı şekilde azaltmıştır.

Kontrol, sham ve CoQ10 grupları benzer MDA, GSH, TAS, TOS ve OSI düzeylerine sahipken, CoQ10 birlikte uygulaması, glifosatın neden olduğu antioksidan parametreler ve enzimatik aktivitelerdeki bozulmaları hafifletmiş ve oksidatif hasara karşı koruyucu bir etki göstermiştir (Şekil 4.3).

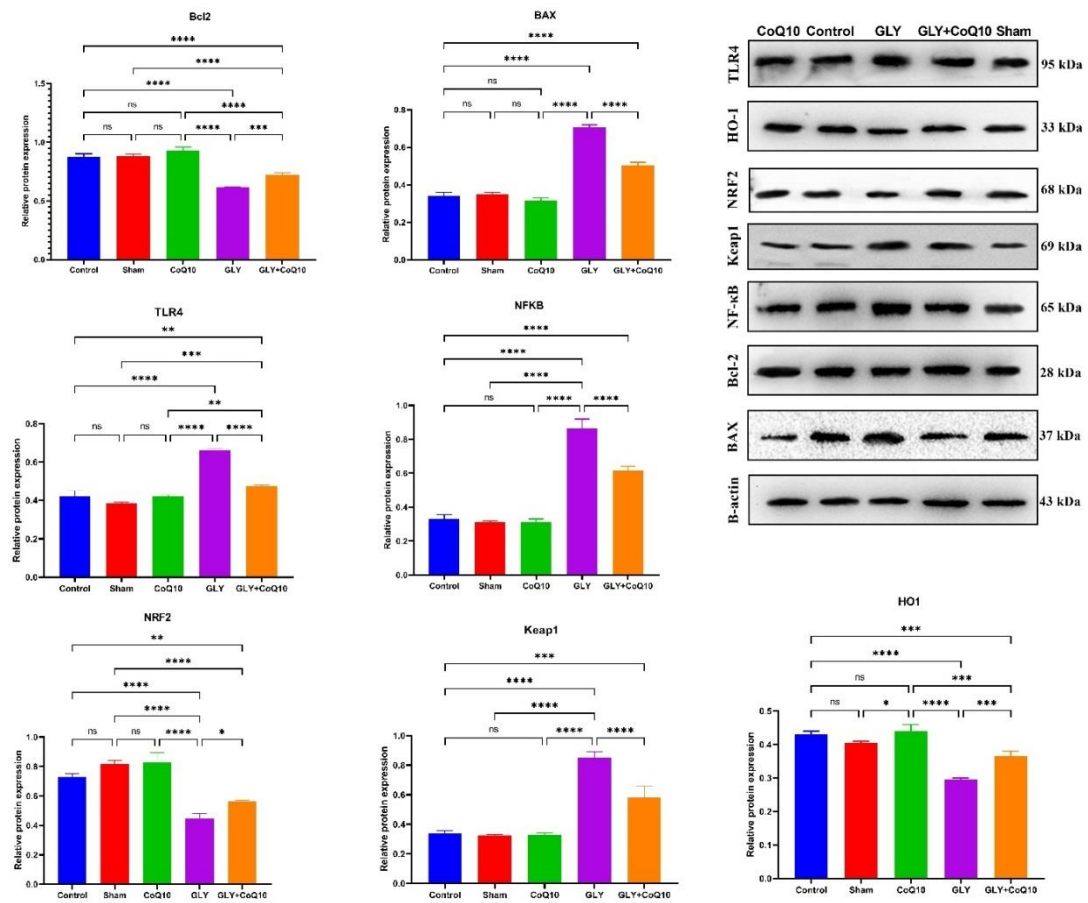


Şekil 4.3. Deney grupları arasında oksidatif denge ve üreme hormonu düzeylerinin karşılaştırılması. Şekilde testis veya serum düzeyleri sırasıyla (a) MDA, (b) GSH, (c) TAS, (d) TOS, (e) OSI, (f) testosteron ve (g) LH için gösterilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklar farklı üst simge harflerle belirtilmiştir (p < 0,05).

4.4 Nrf2/Keap1/HO-1 Sinyal Yolağına Ait Bulgular

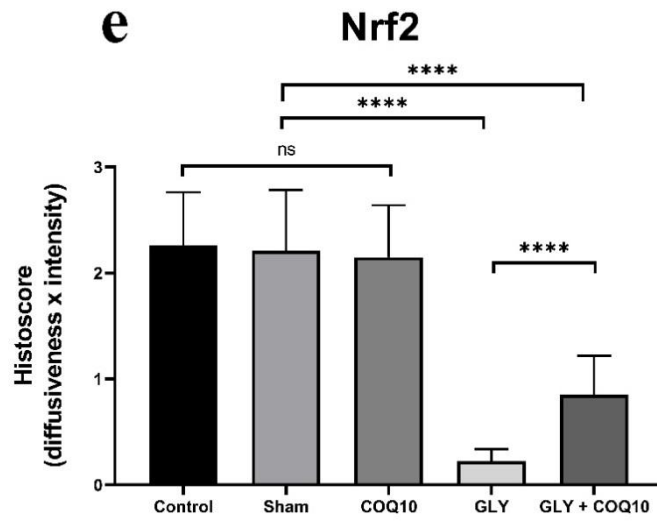
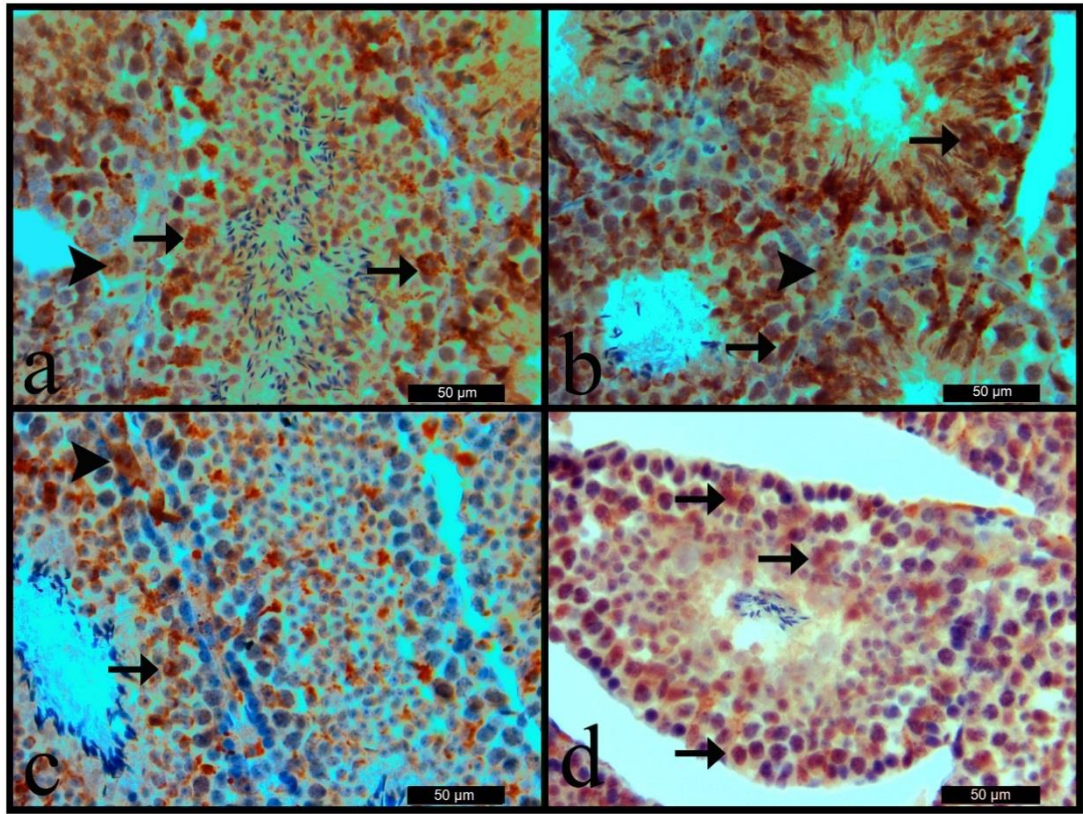
Nrf2, antioksidan regülasyonda rol oynayan temel bir protein olup, dokunun antioksidan kapasitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Li ve ark., 2014). Bu nedenle, testis dokusunda antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla kontrol ve deney gruplarında Nrf2/Keap1/HO-1 sinyal yollarına ait proteinlerin ekspresyon düzeyleri Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir (Şekil 13). Western blot analizleri, GLY grubunda Nrf2 ve HO-1 ekspresyon düzeylerinin diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde azaldığını (p < 0.05) ortaya koymuştur. Buna karşılık, GLY+CoQ10 grubu, GLY grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (p < 0.05), ancak ekspresyon düzeyleri hâlâ kontrol, sham ve CoQ10 gruplarına kıyasla belirgin

şekilde düşük kalmıştır ($p < 0.05$). Kontrol, sham ve CoQ10 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Keap1 ekspresyonu ise GLY grubunda diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır ($p < 0.01$). GLY+CoQ10 grubunda Keap1 düzeylerinde GLY grubuna göre anlamlı bir azalma izlenmiştir ($p < 0.05$), ancak düzeyler kontrol, sham ve CoQ10 gruplarına göre hâlâ yüksek kalmıştır. Kontrol ve CoQ10 grupları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu bulgular, Nrf2/HO-1 yolunun aktivasyonunun glifosatla baskılandığını ve CoQ10'un bu baskıyı kısmen tersine çevirebildiğini göstermektedir (Şekil4.4).



Şekil 4.4. Deney gruplarında oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyleri. Western blot analizleri ve kantitatif veriler; TLR4, NF-κB, Keap1, NRF2, HO-1, BAX ve BCL2 proteinlerinin ifade düzeylerini göstermektedir. β-actin, yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyleri şu şekilde gösterilmiştir: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Testis dokularında immünohistokimyasal analizler de gerçekleştirilmiş ve Nrf2 ekspresyonu ile seminifer tübüller içerisindeki lokalizasyonu Şekil 14'te sunulmuştur. Tüm deney gruplarında, spermatogonyalar, spermatositler ve spermatidler gibi farklı germ hücre tiplerinde, hem sitoplazmada hem de çekirdeklerde Nrf2 pozitifliği tespit edilmiştir. Ayrıca, Leydig hücrelerinde de Nrf2 immünreaktivitesi gözlemlenmiştir. Tüm gruplarda sitoplazmik boyanma ve nükleer pozitiflik mevcut olmakla birlikte, boyanma yoğunluğunun gruplar arasında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 14). GLY grubunda Nrf2 protein ekspresyonu ve immünreaktivitesi anlamlı derecede azalmış olarak tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Buna karşılık, kontrol, sham ve CoQ10 gruplarında daha yüksek Nrf2 immünreaktivite düzeyleri gözlemlenmiştir. GLY + CoQ10 grubunda ise, GLY grubuna kıyasla Nrf2 immünreaktivitesinde anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$). Ancak bu artış, kontrol, sham ve CoQ10 gruplarındaki seviyelere ulaşmamış ve bu gruplardan istatistiksel olarak düşük kalmıştır ($p < 0.05$). İmmünreaktiviteye ilişkin H-skoru sonuçları Şekil 4.5'te özetlenmiştir. Bu bulgular, glifosat maruziyetinin testis dokusunda Nrf2 ekspresyonunu baskıladığını ve CoQ10 uygulamasının bu etkiyi kısmen geri çevirebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.5. Testis dokusunda immunohistokimyasal boyama yöntemi ile belirlenmiş olan Nrf2 ekspresyonu. Germ hücrelerinde (oklar) ve Leydig hücrelerinde (ok başları) Nrf2 protein immünreaktivitesi. Güçlü boyanma gösteren gruplarda sitoplazmik ve nükleer immünpozitiflik (a, b), zayıf boyanma gösteren gruplar (c) ve orta düzeyde boyanma gösteren gruplar (d). (a: Kontrol, b: CoQ10, c: GLY, d: GLY +CoQ10), StreptABC-P yöntemi. (e) Nrf2 immünreaktivitesine ait yarı kantitatif histoskor analiz sonuçları. **** $p < 0.0001$, ns: anlamlı değil, bar = 50 μ m.

4.5 NF-κB/TLR4 Sinyal Yolağına Ait Bulgular

NF-κB/TLR4 sinyal yolları üzerine CoQ10'un etkisini değerlendirmek amacıyla, protein ekspresyon düzeyleri Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Bulgularımız, glifosat uygulamasının NF-κB ve TLR4 protein düzeylerinde diğer gruplara kıyasla anlamlı bir artışa yol açtığını ortaya koymuştur. Buna karşılık, GLY + CoQ10 grubunda bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri Gly grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır (Şekil 13). Bu sonuçlar, CoQ10 uygulamasının glifosat kaynaklı inflamasyon üzerinde anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin muhtemelen NF-κB/TLR4 sinyal yolunun düzenlenmesi yoluyla gerçekleştiğini göstermektedir.

4.6 Apoptozla Belirteçlerine İlişkin Bulgular

Çalışmamızda, glifosat maruziyetinin testiküler hücrelerde apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Bu durum, GLY grubunda Bcl-2 ekspresyonunun anlamlı düzeyde azalması ($p < 0.0001$) ve buna eşlik eden Bax ekspresyonundaki anlamlı artışla ($p < 0.0001$) ortaya konmuştur. Apoptotik yanıtın glifosat maruziyetiyle birlikte belirgin şekilde arttığı, kontrol, sham ve CoQ10 gruplarıyla karşılaştırıldığında açıkça gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, CoQ10 uygulamasının bu apoptotik değişiklikleri anlamlı derecede hafiflettiği tespit edilmiştir. GLY + CoQ10 grubunda, glifosat grubuna kıyasla Bcl-2 düzeylerinde belirgin bir iyileşme ($p < 0.0001$) sağlanmış ve Bax ekspresyonunda anlamlı bir azalma ($p < 0.0001$) gözlemlenmiştir (Şekil 4). Elde edilen bulgular, CoQ10'un glifosatın neden olduğu testiküler hücre apoptozunu azaltma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

4.7 Serum LH ve Testosteron Değerlerine Ait Bulgular

GLY ile tedavi edilen grupta serum LH düzeyleri anlamlı şekilde artarken, testosteron düzeyleri kontrol ve CoQ10 gruplarına kıyasla anlamlı ölçüde azalmıştır. GLY + CoQ10 grubunda ise testosteron düzeyleri kontrol ve CoQ10 gruplarına yakın değerlere ulaşarak önemli bir iyileşme göstermiştir. Buna karşın, GLY + CoQ10 grubundaki LH düzeyleri GLY grubuna göre anlamlı olarak azalmış olsa da kontrol ve CoQ10 gruplarına kıyasla hâlâ anlamlı düzeyde yüksek seyretmiş ve LH

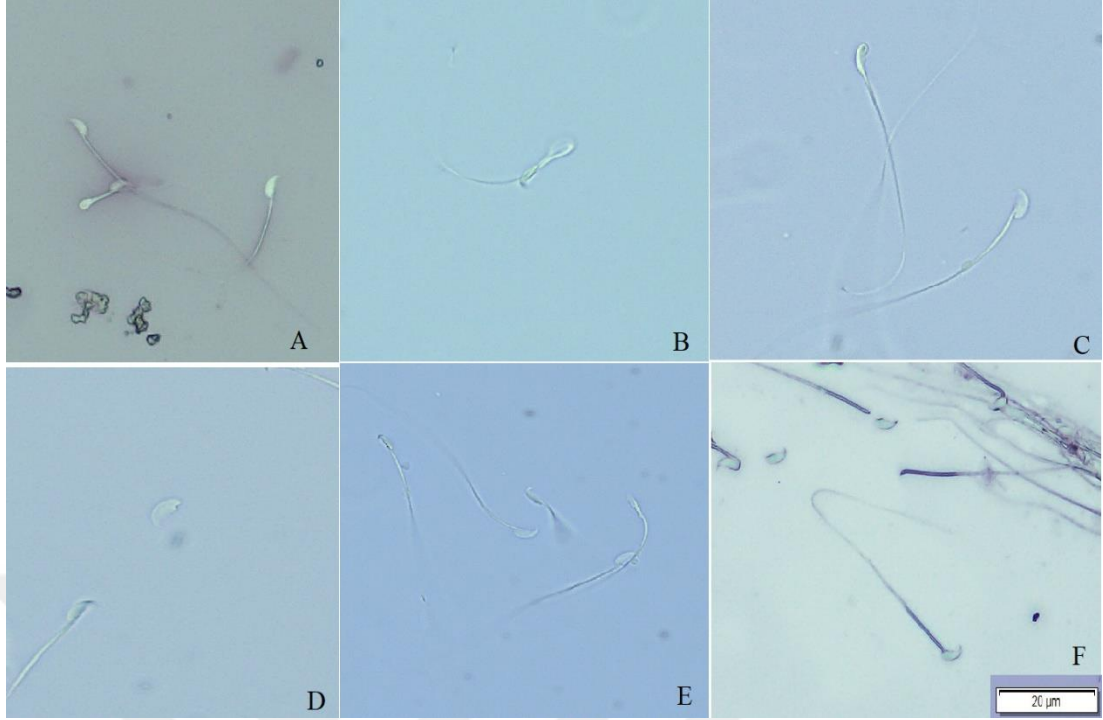
sekresyonunun yalnızca kısmen normale döndüğünü ortaya koymuştur (Şekil 12). Bu sonuçlar, CoQ10'un glifosat kaynaklı testosteron eksikliğini önemli ölçüde düzelttiğini ve hipotalamus-hipofiz-gonad aksının yeniden düzenlenmesine bağlı olarak LH düzeylerindeki kompensatuar artışı kısmen tersine çevirdiğini göstermektedir.

4.8 Sperm Parametreleriyle İlişkili Bulgular

Morfolojik, fonksiyonel ve oksidatif stres parametrelerini içeren kapsamlı sperm analiz sonuçları Tablo 5 ve 6'te sunulmuştur. Uygulanan tedavilerin sperm konsantrasyonu, plazma zarı bütünlüğü, anormallikler, mitokondriyal ROS düzeyleri, PMAI, yaşama oranı ve motilite üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla istatistiksel karşılaştırmalar yapılmıştır.

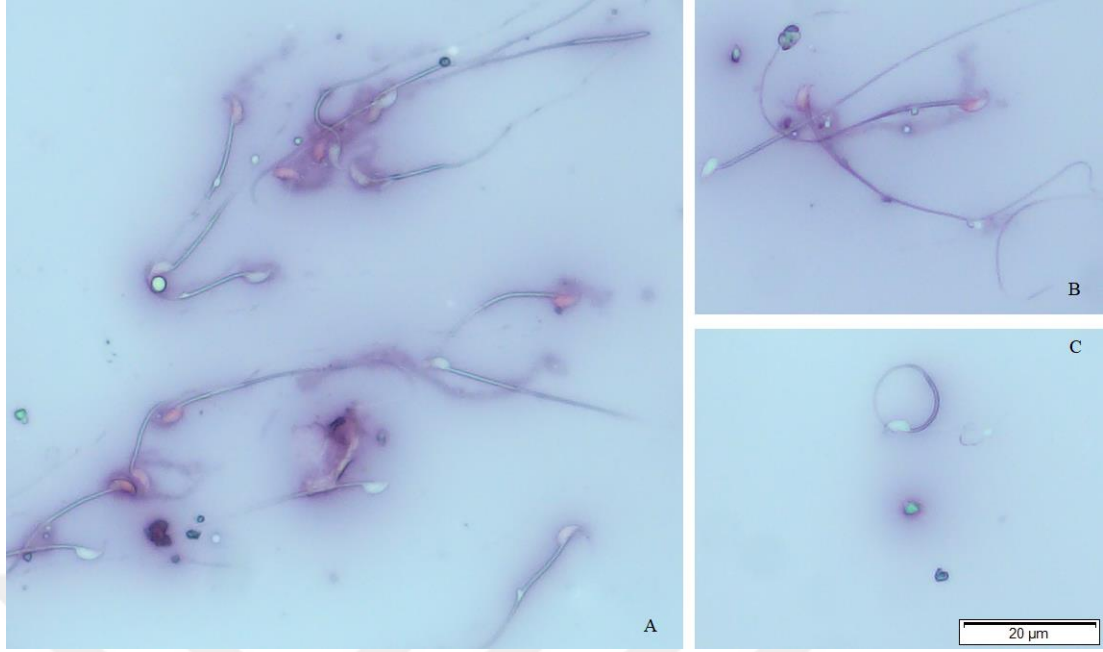
GLY grubunda sperm konsantrasyonu, kontrol, sham ve CoQ10 gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde azalmıştır ($p < 0,05$). GLY+CoQ10 grubunda sayısal olarak bir artış gözlenmiş olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış; bu durum, CoQ10'un kısmi bir koruyucu etki sağlayabileceğini düşündürmektedir. GLY grubunda plazma zarı bütünlüğü anlamlı şekilde bozulmuş ($p < 0,05$), ancak CoQ10 birlikte uygulanması bu bozulmayı kısmen düzeltmiştir. GLY+CoQ10 grubunda plazma zarı bütünlüğü kontrol düzeylerinin altında kalmakla birlikte, GLY grubuna kıyasla anlamlı şekilde iyileşmiştir.

Buna ek olarak, sperm morfoloji analizleri, toplam anormalliklerin (baş + orta parça + kuyruk) GLY grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.6). Toplam anormallik oranları ile uyumlu olarak, baş bölgesi kusurları oranı da GLY grubunda en yüksek seviyede iken, GLY+CoQ10 grubunda anlamlı düzeyde azalma göstermiştir (Tablo 5).



Şekil 4.6. Glifosat grubu fare spermalarında görülen anomaliler. Tüm spermatozoalar standart morfolojik değerlendirmeye göre sınıflandırılmıştır. Baş yapı bozukluğu olanlar (A, C, E); yaygın kuyruk defektleri (B, E,); şekilsiz baş (C); gövde defektleri (F) ve dekapite sperm (D).

GLY grubunda PMAI, yaşama oranı ve motilite gibi sperm parametrelerinde anlamlı azalmalar tespit edilmiştir (Tablo 6). CoQ10 takviyesi bu parametrelerde GLY grubuna kıyasla anlamlı iyileşmelere yol açmıştır ($p < 0,05$). Kontrol, şam ve CoQ10 grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır. MitoSOX düzeyleri GLY grubunda en yüksek seviyede ölçülmüş ve diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır ($p < 0,05$)(Şekil 16). CoQ10 ile birlikte uygulama bu seviyeleri belirgin şekilde azaltmış, ancak yine de kontrol, sham ve CoQ10 gruplarının üzerinde kalmıştır. Bu üç grup arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 4.3).



Şekil 4.7. Glifosat grubu farelerden alınan spermelerin ölü-canlı muayenesi; baş kısmı boya alan spermalar ölü, boya almayanlar spermalar canlıdır.

Tablo 4.3. Coq10 uygulamasının sperm konsantrasyonu, plazma zarı bütünlüğü ve sperm morfolojisi üzerine etkileri.

Grup	Konsantrasyon (spzx10 ⁶ /ml)	Plazma Zarı Bütünlüğü (%)	Toplam Anomaliler (%)	Sperm Başı Anormalliği (%)
Kontrol	15,62±1,13 ^a	83,75±1,62 ^{ab}	26,00±1,88 ^b	13,25±1,41 ^c
Sham	17,85±2,40 ^a	86,57±1,88 ^a	29,14±1,22 ^b	18,28±2,06 ^b
CoQ10	17,22±2,22 ^a	87,55±1,14 ^a	23,77±2,24 ^b	13,55±1,19 ^c
GLY	8,88±1,38 ^b	74,88±1,63 ^c	50,88±2,51 ^a	29,55±1,36 ^a
GLY+	12,85±1,25 ^b	81,78±0,87 ^b	39,64±1,50 ^b	18,71±0,90 ^b
CoQ10				
P<0,05	*	*	*	*

Farklı üst simge harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (p < 0,05).

Tablo 4.4. Coq10 uygulamasının mitakondriyal ros seviyeleri, akrozom bütünlüğü, sperm canlılığı ve motilitesi üzerine etkileri.

Groups	MITOSOX+ (%)	PMAI (%)	Canlılık (%)	Motilite (%)
Kontrol	5,01±0,56 ^c	85,97±4,93 ^{abc}	91,15±2,12 ^a	83,00±1,48 ^a
Sham	6,07±0,26 ^c	91,92±2,38 ^a	91,72±2,14 ^a	80,71±1,49 ^a
CoQ10	6,90±0,79 ^c	89,79±1,75 ^{ab}	85,92±1,55 ^a	84,11±0,88 ^a
GLY	19,86±1,04 ^a	77,83±1,62 ^c	63,28±4,64 ^c	56,33±6,55 ^b
GLY+	13,39±0,75 ^b	80,55±3,12 ^{bc}	74,91±2,42 ^b	76,57±2,98 ^a
CoQ10				
P<0,05	*	*	*	*

Farklı üst simge harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir (p < 0,05)

5. TARTIŞMA

Son yıllarda, küresel gıda talebindeki artış ve tatlı su kaynaklarının tükenmesi, tarımsal verimi artırmak ve kayıpları azaltmak amacıyla pestisit kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur (Tilman ve ark., 2011). Bu pestisitler arasında glifosat, en yaygın kullanılan herbisitlerden biri olup insan, hayvan ve çevre sağlığı üzerindeki potansiyel toksik etkileri nedeniyle kaygı uyandırmaktadır (Marino ve ark., 2021). Glifosata artan maruziyetin oksidatif stresle ilişkili üreme toksisitesine neden olduğu göz önünde bulundurulduğunda, erkek infertilitesindeki artış (Takalani ve ark., 2023) bu toksik etkilerle ilişkili olabilir. Bu bağlamda, antioksidan özelliklere sahip bileşiklerin, özellikle koenzim Q10'un (CoQ10), olası koruyucu etkilerinin araştırılması önem kazanmaktadır. Güçlü antioksidan, anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar özellikleriyle bilinen CoQ10'un, infertil erkeklerin tedavisinde kullanıldığı ve üreme bozukluklarının yönetiminde antioksidan tedavilerin faydalı rolünü desteklediği bildirilmektedir (Keshavarzi ve ark., 2025; Safarinejad ve ark., 2009).

Bu çalışmada, CoQ10 ile kombine tedavi, GBH kaynaklı testiküler hasarı belirgin şekilde hafifletmiş; bu iyileşme testis histolojisinde, apoptoz belirteçlerinin dengelenmesinde, oksidatif stres parametrelerinde, seks hormon düzeylerinde ve epididimal sperm parametrelerinde gözlenen olumlu değişikliklerle doğrulanmıştır. Bu koruyucu etkilerin, Nrf2/Keap1/HO-1 yolunun yukarı regülasyonu ve TLR4/NF- κ B sinyal yolunun aşağı regülasyonu yoluyla gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

Elde edilen bulgular, CoQ10 ile birlikte uygulanan tedavinin vücut ağırlığında artış sağladığını göstermiştir. GBH maruziyeti, testislerin hem mutlak hem de relatif ağırlığında anlamlı bir azalmaya yol açarken, CoQ10 eş tedavisi bu düşüşü önemli ölçüde azaltmıştır. Önceki bazı çalışmalar glifosat ya da GBH maruziyeti sonrasında testis ağırlığında belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Cassault-Meyer ve ark., 2014; Dai ve ark., 2016). Bu tutarsızlıkların, maruz kalma süresi, doz ve zamanlamadaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Örneğin, Pham ve ark. (2019), perinatal dönemde glifosat maruziyeti ile relatif testis ağırlığında azalma bildirmiş; ancak GBH ile bu etki gözlemlenmemiştir. Bu çalışmada ise daha

uzun süreli maruziyet ve GBH formülasyonu kullanılmıştır; bu durum, gözlemlenen toksisiteyi açıklayabilir. Bulgularımız, antioksidan tedavilerin koruyucu rolünü vurgulayan önceki çalışmalarla uyumlu olup, CoQ10'un hücrel metabolizmayı koruyarak ve oksidatif hasarı azaltarak faydalı etkiler gösterdiğini düşündürmektedir (Keshavarzi ve ark., 2025).

Testislerin histopatolojik değerlendirmesinde, GLY maruziyetine bağlı olarak belirgin yapısal bozulmalar saptanmıştır. Glifosat grubunda germinal epitelde düzensizlik, germ hücre tabakalarında incelme ve hidropik dejenerasyon gözlemlenmiştir. Bu bulgular, glifosatın oksidatif ve inflamatuvar mekanizmalar yoluyla testiküler toksisiteye neden olabileceğini göstermektedir (Astiz ve ark., 2009; Owagboriaye ve ark., 2021). Hücre proliferasyonu için güvenilir bir belirteç olan Ki-67, bu çalışmada GLY grubunda belirgin şekilde azalmış; bu durum seminifer tübül epitelinde proliferatif aktivitenin baskılandığını göstermektedir. Buna karşılık, GLY + CoQ10 grubunda CoQ10 tedavisi ile Ki-67 immünreaktivitesi artmış, bu da hücre bölünmesi üzerinde onarıcı bir etkiyi işaret etmiştir. CoQ10'un, mitokondri stabilizasyonu ve antioksidan etkileri sayesinde testiküler hasarı hafiflettiği ve spermatogenezi desteklediği bildirilmiştir (Kaltsas, 2023; Mazen ve Elnegris, 2013). Nitekim, Mazen ve Elnegris (2013) akrilamid kaynaklı oksidatif stres durumunda CoQ10 uygulamasıyla testiste hücre proliferasyonunun arttığını göstermiştir. Ancak bu artış, kontrol grubunun mitotik aktivitesini aşmamıştır; bu da CoQ10'un koruyucu etkisinin uyarıcıdan çok, yeniden dengeleyici nitelikte olduğunu göstermektedir.

Glifosat kaynaklı testiküler hasarın altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Oksidatif stresin, bu toksik etkinin temel belirleyicilerinden biri olduğu bilinmekle birlikte, ilgili hücrel hedefler ve sinyal yolları hâlâ araştırılmaktadır. Glifosatın reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırarak lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve testiküler hücrelerde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Avdatek ve ark., 2018). Bu çalışmada da GLY maruziyeti testiküler ROS düzeylerini önemli ölçüde artırmış; bu durum MDA ve TOS düzeylerinin yükselmesi ve GSH ile TAS aktivitelerinin düşmesiyle yansıtılmıştır. CoQ10 tedavisi ise oksidatif hasarı azaltarak antioksidan savunma mekanizmalarının

yeniden yapılandırılmasını sağlamıştır (El-Khadragy ve ark., 2020; Keshavarzi ve ark., 2025).

Nrf2 transkripsiyon faktörü, hücrel oksidatif stres durumlarında antioksidan yanıtların düzenlenmesinde, mitokondriyal işlevlerin korunmasında ve inflamasyonun baskılanmasında merkezi bir rol oynamaktadır (Rotimi ve ark., 2022). Normal koşullarda KEAP1 tarafından sitoplazmada baskılanan Nrf2, oksidatif stresle aktive olarak nükleusa taşınmakta ve HO-1 gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu indüklemektedir (Feng ve ark., 2020). Bu çalışmada, GLY maruziyetinin Nrf2 ve HO-1 düzeylerini anlamlı biçimde azalttığı, buna karşılık KEAP1 düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. CoQ10 ile kombine tedavi, Nrf2 ve HO-1 ekspresyonlarını kısmen geri kazandırırken KEAP1 düzeylerini düşürerek antioksidan yanıtı aktive etmiştir. Bu etki, metotreksat kaynaklı testiküler hasar modelinde de rapor edilmiştir (Arafa ve ark., 2024). Nrf2'nin immunohistokimyasal düzeyde de baskılandığı, CoQ10 ile ise kısmen geri kazanıldığı gösterilmiş ve bu bulgular batı blot analizleriyle tutarlılık göstermiştir.

Oksidatif stresin inflamatuvar yanıtların başlatıcısı olduğu bilinmektedir ve bu süreç erkek üreme fonksiyonlarıyla da ilişkilidir (Takalani ve ark., 2023). TLR4/NF- κ B ve Nrf2/HO-1 yolları, hücrel stres yanıtında önemli düzenleyici mekanizmalardır (Akhigbe, 2025). NF- κ B'nin aşırı aktivasyonu, IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimiyle inflamasyonu artırmakta, bu da spermatogenez üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır (Sayed ve ark., 2021; Afolabi ve ark., 2022). Buna karşılık, Nrf2/HO-1 yolu, ROS birikimini baskılayarak inflamasyonu azaltmaktadır (Ganesh Yerra ve ark., 2013). Bu iki yolak arasındaki çift yönlü etkileşim, testiküler homeostazın korunmasında kritik rol oynamaktadır (Liu ve ark., 2008). Bu çalışmada GLY, NF- κ B ve TLR4 ekspresyonlarını artırarak inflamatuvar yanıtı tetiklemiş; ancak CoQ10 tedavisi bu aktiviteyi azaltmıştır.

Apoptoz, Nrf2 baskılanmasının önemli sonuçlarından biridir. Bu süreçte Bcl-2 düzeyleri azalırken, Bax gibi pro-apoptotik proteinler artmaktadır (Varışlı ve ark., 2022). Çalışmamızda, GLY maruziyeti bu paterni gösterirken, CoQ10 tedavisi Bax

ekspresyonunu düşürmüş, Bcl-2 düzeylerini artırarak anti-apoptotik bir etki oluşturmuştur (Arafa ve ark., 2024).

Sperm analizinde, GLY'nin motilite, canlılık, morfoloji ve PMAI gibi parametreleri anlamlı şekilde bozduğu, bunun mitokondriyal ROS artışıyla ilişkili olduğu görülmüştür (Velásquez vd., 2021). CoQ10 tedavisi bu parametrelerde iyileşme sağlamış, ancak sperm konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlenmemiştir (Cakiroğlu vd., 2014). Morfolojik bozuklukların azalması, CoQ10'un terapötik potansiyelini desteklemektedir (Cassault-Meyer vd., 2014).

GLY maruziyeti serum testosteron düzeylerini düşürürken LH düzeylerini artırmıştır; bu da hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) aksında bir bozulmayı göstermektedir. Leydig hücrelerinin işlevsel yetersizliği, testosteron sentezini azaltarak LH düzeylerinin telafi amaçlı artmasına neden olabilir (Teleken ve ark., 2020). CoQ10 uygulaması bu hormonal bozuklukları düzeltmiş, testosteron düzeylerini toparlamış ve LH seviyelerinde kısmi normalleşme sağlamıştır (Allam ve ark., 2022). Bu iyileşme, CoQ10'un steroidogenez üzerindeki koruyucu etkisini ve spermatogenetik hat üzerindeki destekleyici rolünü yansıtmaktadır. CoQ10'un HPG aksı üzerindeki düzenleyici rolü, literatürde de benzer şekilde rapor edilmiştir (Safarinejad ve ark., 2009; Banihani ve ark., 2018).

İnsan çalışmalarında yüksek LH düzeylerinin düşük sperm kalitesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kumanov ve ark., 2009; Meeker ve ark., 2012). Bu çalışmada da GLY, LH artışı ile birlikte sperm parametrelerini bozmuş, CoQ10 tedavisi ise bu bozulmayı düzeltmiştir. LH'nin sperm kalitesindeki düzenleyici rolü bir kez daha vurgulanırken, testosteronun daha ikincil bir role sahip olabileceği anlaşılmaktadır (Zhao ve ark., 2020).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, erkek farelerde GBH uygulamasının testiküler hasara, spermatogenezde bozulmaya, sperm kalitesinde düşüşe ve hormonal dengesizliklere yol açtığını göstermektedir. Üstelik bu etkiler, kabul edilen NOAEL seviyelerinin altında kalan dozlarda dahi ortaya çıkmıştır. Söz konusu hasarın temel mekanizmaları; aşırı oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozdur. Nrf2/Keap1/HO-1, NF-κB/TLR4 ve Bax/Bcl-2 sinyal yollarındaki bozulmalar bu etkilerin moleküler temellerini oluşturmaktadır. Çalışma ayrıca, CoQ10'un, histopatolojik hasarı hafifletme, antioksidan savunmayı güçlendirme, inflamasyonu azaltma ve sperm parametrelerini iyileştirme yoluyla daha güçlü koruyucu ve tedavi edici etkilere sahip olduğunu ortaya koymakta; böylece CoQ10'un glifosat kaynaklı üreme toksisitesine karşı potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini önermektedir.

Bununla birlikte, çalışmada tek bir sabit GLY ve CoQ10 dozu kullanılmıştır; bu, doz-cevap ilişkilerinin değerlendirilmesini sınırlamaktadır. Gelecek çalışmalarda farklı dozların kullanılması, mekanizmanın daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Ayrıca, uzun dönem üreme sonuçları ve yavru sağlığı değerlendirilmemiştir. Gelecek araştırmaların, GBH maruziyetinin uzun dönem ve transgenerasyonel etkilerini, GLY ve CoQ10 için doz-cevap ilişkilerini ve CoQ10'un diğer antioksidan veya toksinlerle etkileşimini incelemesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbasoğlu L, Kalaz EB, Soluk Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru Abbasoğlu S, Uysal M (2012).** Beneficial effects of taurine ve carnosine in experimental ischemia/reperfusion injury in testis. *Pediatr. Surg. Int.*, **28(11)**, 1125-31.
- Abubakar Y, Tijjani H, Egbuna C, Adetunji CO, Kala S, Kryezu T, Ifemeje JC, Iwuanyanwu KCP (2020).** *Pesticides, History, and Classification*. In: Egbuna C, Sawicka B (Eds) *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. Amerika: Elsevier Inc, p: 29-42.
- Afolabi AO, Akhigbe TM, Odetayo AF, Anyogu DC, Hamed MA, Akhigbe RE (2022).** Restoration of hepatic and intestinal integrity by *Phyllanthus amarus* is dependent on Bax/Caspase 3 modulation in intestinal ischemia–reperfusion–induced injury. *Molecules*, **27(16)**, 5073.
- Akhigbe TM, Fidelis FB, Adekunle AO, Akhigbe RE (2025).** Does coenzyme Q10 improve semen quality and circulating testosterone level? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front. Pharmacol.*, **15**, 1497930.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006).** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124(4)**, 783–801.
- Alahmar AT (2019).** Role of oxidative stress in male infertility: an updated review. *J. Hum. Reprod. Sci.*, **12**, 4–18.
- Alahmar AT (2019).** The impact of two doses of coenzyme Q10 on semen parameters and antioxidant status in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Clin. Exp. Reprod. Med.*, **46(3)**, 112-118.
- Allam EA, Ibrahim HF, Abdulmalek SA, Abdelmeniem IM, Basta M (2022).** Coenzyme Q10 alleviates testicular endocrine and spermatogenic dysfunction induced by high-fat diet in male Wistar rats: Role of adipokines, oxidative stress and MAPK/ERK/JNK pathway. *Andrologia*, **54(10)**, e14544.
- Alm P (1982).** On the autonomic innervation of the human vas deferens. *Brain Res. Bull.*, **9(1-6)**, 673-677.
- Alp H, Cirit U, Tas M, Rifaioglu MM, Hatipoglu NK, Aytakin I, Yucel M, Firat U, Ozmen MF, Seker U, Eren LB. (2012).** Effects of sildenafil citrate, isoniazid, ve streptomycin on testicular tissue ve epididymal semen quality in rats. *Urology*, **80(4)**, 953.e9-953.e14.
- Altıkat A, Turan, T, Ekmekyapar Torun F, Bingöl Z. (2009).** Türkiye’de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, **40(2)**, 87-92.
- Amann RP (2008).** The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J. Androl.*, **29(5)**, 469-487.

Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, **146**(5), R163–R174.

Arafa EA, Hassanein EHM, Ibrahim NA, Buabeid MA, Mohamed WR (2024). Involvement of Nrf2-PPAR- γ signaling in coenzyme Q10 protecting effect against methotrexate-induced testicular oxidative damage. *Int. Immunopharmacol.*, **129**, 111566.

Arrotéia KF, Garcia PV, Barbieri MF, Justino ML, Pereira LAV (2012). The epididymis: embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility. In: Pereira LA (Eds), *Embryology Updates and Highlights on Classic Topics*. Croatia: IntechOpen, p: 41-66.

Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA (2009). Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **28**(3), 465–473.

Auger J, Jouannet P, Eustache F (2016). Another look at human sperm morphology. *Hum. Reprod.*, **31**(1), 10–23

Avdatek F, Birdane YO, Türkmen R, Demirel HH (2018). Ameliorative effect of resveratrol on testicular oxidative stress, spermatological parameters and DNA damage in glyphosate-based herbicide-exposed rats. *Andrologia*, **50**, e13036.

Avdatek F, Türkmen R, Demirel HH, Birdane YO (2018). Protective effect of N-acetylcysteine on testicular oxidative damage, spermatological parameters and DNA damage in glyphosate-based herbicide-exposed rats. *Kocatepe Vet. J.*, **11**(3), 292–300.

Aydin MS, Senturk GE ve Ercan F (2013). Cryopreservation increases DNA fragmentation in spermatozoa of smokers. *Acta. Histochem.*, **115**(4), 394-400

Bali YA, Kaikai NE, Ba-M'hamed S, Bennis M (2019). Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology*, **415**, 18–25.

Banihani, SA (2018). Effect of coenzyme Q10 supplementation on testosterone. *Biomolecules*, **8**(4), 172.

Belloc S, Cohen-Bacrie M, Amar E, Izard V, Benkhalifa M, Dalléac A, de Mouzon J (2014). High body mass index has a deleterious effect on semen parameters except morphology: Results from a large cohort study. *Fertil. Steril.*, **102**(5), 1268–1273.

Benachour N, Séralini GE (2007). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**(1), 97-105.

Bentinger M, Brismar K, Dallner G (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, **7**, 41–50.

Bergmann M (2006). Physiology of spermatogenesis. In: Schill WB, Comhaire F, Hargreave TB (eds), *Andrology for the Clinician*. Berlin: Springer, p: 272-281.

Berker B, Sükür YE, Kahraman K, Atabekoğlu CS, Sönmezer M, Özmen B, Ateş C (2012). Absence of rapid and linear progressive motile spermatozoa “grade A” in semen specimens: Does it change intrauterine insemination outcomes? *Urology*, **80(6)**, 1262–1266.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.*, **5(1)**, 9–19.

Bolognesi C, Bonatti S, Degan P, Gallerani E, Peluso M, Rabboni R (1997). Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.*, **45(5)**, 1957–1962.

Bonakdar RA, Guarneri E (2005). Coenzyme Q10. *Am. Fam. Physician*, **72(6)**, 1065-1070.

Bonanno O, Romeo G, Asero P, Pezzino FM, Castiglione R, Burrello N, Sidoti G, Frajese GV, Vicari E, D’Agata R (2016). Sperm of patients with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and genomic alterations. *Reproduction*, **152(6)**, 695–704.

Brake DG, Evenson DP (2004). A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal, and adult testicular development. *Food Chem. Toxicol.*, **42(1)**, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.08.003>

Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PTK (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat tissue: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgen. *Endocrinology*, **135(3)**, 1227-1234.

Cakiroglu B, Eyyupoglu SE, Gozukucuk R, Uyanik BS (2014). Ubiquinol effect on sperm parameters in subfertile men who have astheno-teratozoospermia with normal sperm concentration. *Nephro-Urol. Mon.*, **6(3)**, e16870.

Carles L, Gardon H, Joseph L, Sanchís J, Farré M, Artigas J (2019). Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. *Environ. Int.*, **124**, 284–293.

Carrell DT, Aston KI (2013). *Spermatogenesis: Methods and Protocols* (cilt 927, 1. baskı), Springer Science+Business Media,

Carretta L (2019). A new rapid procedure for simultaneous determination of glyphosate and AMPA in water at sub µg/L level. *J. Chromatogr. A*, **1600**, 65–72.

Cassault-Meyer E, Gress S, Séralini GÉ, Galeraud-Denis I (2014). An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **38(1)**, 131–140.

Chang V, Heutte L, Petitjean C, Hartel S, Hitschfeld N (2017). Automatic classification of human sperm head morphology. *Biol. Medicine*, **84**, 205-216.

Chemes HE, Alvarez Sedo C (2012). Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J. Androl.*, **14(1)**, 14–23.

Chen J, Saili KS, Liu Y, Li L, Zhao Y, Jia Y, Bai C, Tanguay RL, Dong Q, Huang C (2017). Developmental bisphenol A exposure impairs sperm function ve reproduction in zebrafish. *Chemosphere*, **169**, 262-70.

Chiarini-Garcia H, Hornick JR, Griswold MD, Russell LD (2001). Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol. Reprod.*, **65(4)**, 1179-1185.

Chiarini-Garcia H, Russell LD (2001). High-resolution light microscopic characterization of Mouse spermatogonia. *Biol. Reprod.*, **65(4)**, 1170-1178.

Chiasson, R. B. (1994). *Laboratory Anatomy of the White Rat* (5th ed.). Boston, MA: WCB McGraw-Hill.

Clair E, Mesnage R, Travert C, Séralini GE (2012). A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol. in Vitro*, **26(2)**, 269–279.

Clermont Y, Perey B (1957). The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA-Schiff-hematoxylin stained sections. *Rev. Canad. Biol.*, **16**, 451–462.

Cooper G, Schiller AL (1976). *Anatomy of the Guinea Pig*. Massachusetts: Harvard university press.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM (2012). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod. Update*, **(16)**, 231–245.

Cosentino M J, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett A T (1985). Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J. Urol.*, **133**, 906–911

Crane FL (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.*, **20(6)**, 591-598.

Creasy DM, Chapin RE (2018). *Male Reproductive System*. In: Wallig MA, Haschek WM, Rousseaux CG, Bolon B (eds), *Fundamentals of Toxicologic Pathology* (3 rd ed), Elsevier Inc, Academic Press, 459-516.

Cui H, López M, Rahmouni K (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 338–351

Dai P, Hu P, Tang J, Li Y, Li C (2016). Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta. Histochem.*, **118(5)**, 519–526.

Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira RT, Andrade AJ, Dalsenter PR, Langeloh A (2007). Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, **81(9)**, 665–673.

Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira RT, Andrade AJM, Dalsenter PR, Langeloh A (2007). Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, **81(9)**, 665–673

De Gendt K, Atanassova N, Tan KAL, de França LR, Parreira GG, McKinnell C, Sharpe RM, Saunders PTK, Mason JI, Hartung S, Ivell R, Denolet E, Verhoeven G (2005). Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. *Endocrinology*, **146(9)**, 4117–4126.

de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N (1998). Spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, **13(Suppl 1)**, 1–8.

de Liz Oliveira Cavalli VL, Cattani D, Heinz Rieg CE, Pierozan P, Zanatta L, Benedetti Parisotto E, Wilhelm Filho D, Silva FRMB, Pessoa-Pureur R, Zamonier A (2013). Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 335–346

de Rooij DG (1973). Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. I. Normal situation. *Cell Tissue Kinet.*, **6**, 281–287.

de Rooij DG (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, **121**, 347–354.

de Rooij DG, Russell LD (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.*, **21(6)**, 776–798.

Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE (2018). Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicol. Rep.*, **5**, 156–163.

Defarge N, Takács E, Lozano V, Mesnage R, Spiroux de Vendômois J, Séralini G-E, Székács A (2016). Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **13(3)**, 264.

Draper HH, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **186**, 421–431.

Duthie SJ (1999). Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br. Med. Bull.*, **55(3)**, 578–592.

Dym M, Fawcett DW (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.*, **3(3)**, 308–326.

El-Khadragy M, Al-Megrin WA, AlSadhan NA, Metwally DM, El-Hennamy RE, Salem FEH, Kassab RB, Abdel Moneim AE (2020). Impact of coenzyme Q10 administration on lead acetate-induced testicular damage in rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2020**, Article ID 4981386.

Engin Üstün Y (2011). *İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi*. Çelik, Ö (Ed.), Adana: Nobel Kitabevi.

Ergün L (2016). *Erkek genital sistem*. In: Özer A (eds), *Veteriner Özel Histoloji*, Dora Basım-Yayın Dağıtım Ltd. Şti. 1. Baskı, 251-268.

Erol B, Bozlu M, Hancı V (2010). Coenzyme Q10 treatment reduces lipid peroxidation, inducible and endothelial nitric oxide synthases, and germ cell-specific apoptosis in a rat model of testicular ischemia/reperfusion injury. *Fertil. Steril.*, **93(1)**, 280–282.

Eroschenko VP (2017). *Atlas of Histology with Functional Correlations* (3 rd ed.), LWW.

Esen Ç, Alkan BA, Kırnap M, Akgül Ö, Işıkoğlu S, Erel Ö (2012). The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *J. Periodontol.*, **83(6)**, 773–779.

European Food Safety Authority (2023). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, **21(7)**, 8164. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8164>

Evans TJ, Ganjam VK (2017). *Reproductive Anatomy and Physiology*. In: Gupta RC (eds), *Reproductive and Developmental Toxicology* (2 nd ed), Academic Press, p:7-37.

Feng J, He Y, Shen Y, Zhang G, Ma S, Zhao X, Zhang Y (2020). Protective effects of nuclear factor erythroid 2-related factor on oxidative stress and apoptosis in the testis of mice before adulthood. *Theriogenology*, **148**, 112–121.

Fietz D, Bergmann M (2017). *Functional Anatomy and Histology of the Testis*. In: Simoni M, Huhtaniemi IT (eds), *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction* Cham: Springer International Publishing, p:313-341

Food Safety Commission of Japan (2016). *Risk assessment report: Glyphosate (Pesticide)*.

https://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/agrichemicals1_e1.data/kya0100622449b_202.pdf (Erişim Tarihi: 12.01.2025)

Franca LR, Avelar GF, Almeida FFL (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, **63(2)**, 300–318.

Franca LR, Ye SJ, Ying L, Sandberg M, Russell LD. (1995). Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *Anat. Rec.*, **241(2)**, 181–204.

Garolla A, Torino M, Miola P, Caretta N, Pizzol D, Menegazzo M, Bertoldo A, Foresta C (2015). Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men ve men with a varicocele as mirror of spermatogenic function. *Hum. Reprod.*, **30**, 1006–1013.

Garrido Maraver J, Cordero MD, Oropesa Ávila M, Fernández Vega A, de la Mata M, Delgado Pavón A, de Miguel M, Pérez Calero C, Villanueva Paz M, Cotán D, Sánchez Alcázar JA (2014). Coenzyme Q₁₀ therapy. *Mol. Syndromol.*, **5(3–4)**, 187–197

Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Leandri RD (2017). Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*, **5(5)**, 845-862.

Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Metayer S, Thimon V, Dacheux JL (2004). Posttesticular sperm environment and fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, **82**, 321-339.

Gigante P, Berni M, Bussolati S, Grasselli F, Grolli S, Ramoni R, Basini G (2018). Glyphosate affects swine ovarian and adipose stromal cell functions. *Anim. Reprod. Sci.*, **195**, 185–196.

Gorga A, Rindone GM, Centola CL, Sobarzo CM, Pellizzari EH, Del Carmen Camberos M, Marín-Briggiler CI, Cohen DJ, Riera MF, Galardo MN, Meroni SB (2021). Low doses of glyphosate/Roundup alter blood–testis barrier integrity in juvenile rats. *Front. Endocrinol.*, **12**, 615678.

Görgülü N (2019). *Odarant ve Progesteron Uygulanmış Kültür Ortamlarında Sperm Kalsiyum Kanalları ve Olfaktör Reseptörlerinin Çeşitli İnfertil Olgularda İncelenmesi*. Biruni Üniversitesi, Eğitim Enstitüsü, İstanbul/Türkiye.

Gren EC (1963). *Anatomy of the rat*. New York: Hafner Publishing Company.

Gren EL (1966). *Biology of the Laboratory Mouse*. New York: Dover Publications, Inc.

Griswold MD (2016). Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiol. Rev.*, **96(1)**, 1–17.

Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A (2015). Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod. Biomed. Online*, **31(3)**, 309–319.

Guo J, Zhao Y, Huang W, Hu W, Gu J, Chen C, Zhou J, Peng Y, Gong M, Wang Z (2014). Sperm motility inversely correlates with seminal leptin levels in idiopathic asthenozoospermia. *Int. J. Clin. Exp. Medicine*, **7(10)**, 3550-3555.

Guo Y, Jiang W, Yu W, Niu X, Liu F, Zhou T, Zhang H, Li Y, Zhu H, Zhou Z, Sha J, Guo X, Chen D (2019). Proteomics analysis of asthenozoospermia and identification of glucose-6-phosphate isomerase as an important enzyme for sperm motility. *J. Proteomics*, **208**, 103478.

Haider SG (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytol.*, **233(4)**, 181-241

Halliwell B (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr. Rev.*, **70**, 257–265.

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of Oxidative Stress. *Biochem. Soc. Trans.*, **35 (Pt 5)**, 1147–1150. doi:10.1042/BST0351147

Hancock JL (1952). The Morphology of Bull Spermatozoa. *J. Exp. Biol.*, **29(3)**, 445–453.

He Y, Xiong F, Qian Y, Xu K, Pu Y, Huang J, Liu M, Yin L, Zhang J, Pu Y, Sun R (2022). Hematological effects of glyphosate in mice revealed by traditional toxicology and transcriptome sequencing. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **92**, 103866.

Hess RA (1990). Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol. Reprod*, **43**, 525–542.

Hess RA (1998). *STAGES: Interactive Software on Spermatogenesis 2.2 ed.* Champaign: Vanguard Productions and Cache River Press.

Hess RA, Miller LA, Kirby JD, Margoliash E, Goldberg E (1993). Immunoelectron microscopic localization of testicular and somatic cytochromes c in the seminiferous epithelium of the rat. *Biol. Reprod.*, **48(6)**, 1299–1308.

Hilf R, Hissin, PJ (1976). A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Anal. Biochem.*, **74(1)**, 214–226.

Hosseini B, Eslamian G (2014). Association of dietary factors with male ve female infertility: review of current evidence. *Thrita*, **2014**, 3.

Hussein A, Ozgok Y, Ross L, Rao P, Niederberger C (2013). Optimization of spermatogenesis-regulating hormones in patients with non-obstructive azoospermia ve its impact on sperm retrieval: a multicentre study. *BJU Int*, **111(3ptB)**, E110-114.

Issi Y (2025). *Sperm Şekil Bozukluğu (Teratospermi) Nedir?* <https://www.yasarissi.com/post/sperm-sekil-bozuklugu-nedir> (Erişim Tarihi: 25.02.2025)

Jiménez-Reina L, Maartens PJ, Jimena-Medina I, Agarwal A, du Plessis SS (2016). *Overview of the Male Reproductive System.* In: Exercise and Human Reproduction Springer, p: 1-17.

Johnson L, Thompson Jr DL (1986). Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. *Biol. Reprod.*, **35(4)**, 971-979.

Junqueira LC, Carneiro J (2003). *Basic Histology (Temel Histoloji).* Çev: Aytekin Y, Solakoğlu S, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, s: 431- 443.

Junqueira LC, Carneiro J (2003). *Basic Histology (Temel Histoloji).* Çev: Aytekin Y, Solakoğlu S, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, s: 299-307.

Kalkan Y (2001). *Sıçanlarda testisin postnatal gelişimi üzerine histolojik ve histoşimik araştırmalar.* Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van/Türkiye.

Kaltsas A (2023). Oxidative Stress and Male Infertility: The Protective Role of Antioxidants. *Medicina*, **59(10)**, 1769.

Kanissery R, Gairhe B, Kadyampakeni D, Batuman O, Alferez F (2019). Glyphosate: Its Environmental Persistence and Impact on Crop Health and Nutrition. *Plants*, **8**, 499.

Kantarci F, Cebi Olgun D, Mihmanli I. (2012). Shear-wave elastography of segmental infarction of the testis. *Korean J. Radiol.*, **13(6)**, 820-822.

Karin M, Lin DY (2002). NF-kappa B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.*, **3(3)**, 221–227.

Kawasaki T, Kawai T (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.*, **5**, 461.

Kerr J (1991). Ultrastructure of the seminiferous epithelium and intertubular tissue of the human testis. *J. Electron Microsc. Tech.*, **19(2)**, 215–240.

Keshavarzi M, Naraki K, Razavi BM, Hosseinzadeh H (2025). Ameliorative and protective effects of coenzyme Q10 against natural and chemical toxicity: A narrative review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, Advance online publication.

Kluin PM, Kramer MF, de Rooij DG (1982). Spermatogenesis in the immature mouse proceeds faster than in the adult. *Int. J. Androl.*, **5(3)**, 282–294.

Knez K, Tomazevic T, Zorn B, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I (2012). Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients. *Reprod. Biomed. Online*, **25**, 168–179.

Knoblaugh SE, True L, Tretiakova M, Hukkanen RR (2018). *Male reproductive system*. In: Comparative Anatomy and Histology, Elsevier, pp: 335–363

Kovac JR, Smith RP, Cajipe M, Lamb DJ, Lipshultz LI (2017). Men with total absence of normal sperm morphology exhibit high success rates with assisted reproduction. *Asian J. Androl.*, **19**, 39–42.

Kumanov P, Nandipati K, Tomova A, Agarwal A (2006). Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility. *Fertil. Steril.*, **86(2)**, 332–338.

Kumar H, Kim IS, More SV, Kim BW, Choi DK (2014). Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat. Prod. Rep.*, **31**, 109–139.

Kumar N, Singh AK (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J. Hum. Reprod. Sci.*, **8**, 191.

Kuo YC, Lin YH, Chen HI, Wang YY, Chiou YW, Lin HH, Pan HA, Wu CM, Su SM, Hsu CC, Kuo PL (2012). SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Hum. Mutat.*, **33**, 710–719.

Kurtoğlu C (2020). Determination of herbicide degradation potentials of bacteria isolated from glyphosate applied soil. *Biological Diversity and Conservation*, **13(2)**, 102–108.

Kutluyer F, Öğretmen F, Inanan BE (2016). Cryopreservation of goldfish (*Carassius auratus*) spermatozoa: Effects of extender supplemented with taurine on sperm motility and DNA damage. *Cryo Letters*, **37**, 41–46.

Lachance C, Leclerc P (2011). Mediators of the Jak/STAT signaling pathway in human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **85**, 1222–1231.

Lamkin J (2011). *Investigating the Role of p53 in the Germ Cell Apoptotic Pathway* (Master's thesis). <https://scispace.com/pdf/investigating-the-role-of-p53-in-the-germ-cell-apoptotic-3xyoau8bay.pdf> (Erişim Tarihi: 25.05.2025)

Leblond CP, Clermont Y (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **55**, 548–573.

Levy S, Serre V, Hermo L, Robaire B (1999). The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood–testis barrier of the Brown Norway rat. *J. Androl*, **20**, 356–365.

Li B, Ma Y, Huang J, Xiao X, Li L, Liu C, Shi Y, Wang D, Wang X (2014). Probing the effect of human normal sperm morphology rate on cycle outcomes and assisted reproductive methods selection. *PLoS ONE*, **9(11)**, e113392.

Limón-Pacheco J, Gonssebatt ME (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*, **674**, 137–147.

Liu JB, Li ZF, Lu L, Wang ZY, Wang L (2022). Glyphosate damages blood-testis barrier via NOX1-triggered oxidative stress in rats: Long-term exposure as a potential risk for male reproductive health. *Environ. Int.*, **159**, 107038

Liu Y, DeBoer K, de Kretser DM, O'Donnell L, O'Connor AE, Merriner DJ, Okuda H, Whittle B, Jans DA, Efthymiadis A, McLachlan RI, Ormandy CJ, Goodnow CC, Jamsai D, O'Bryan MK (2015). LRGUK-1 is required for basal body and manchette function during spermatogenesis and male fertility. *PLoS Genetics*, **11(3)**, e1005090

Livingston M, Fernandez-Cornejo J, Lu W, Li L, Chen M, Zhou Z, Zhang W, Ping S, Yan Y, Wang J, Lin M (2013). Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* to glyphosate, a potent inhibitor of the shikimate pathway enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Molecular BioSystems*, **9(3)**, 522–530

Lu W, Li L, Chen M, Zhou Z, Zhang W, Ping S, Yan Y, Wang J, Lin M (2013). Genome wide transcriptional responses of *Escherichia coli* to glyphosate, a potent inhibitor of the shikimate pathway enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Molecular Biosystems*, **9(3)**, 522–530.

Mancini A, Balercia G (2011). Coenzyme Q (10) in Male Infertility: Physiopathology and Therapy. *Biofactors*, **37(5)**, 374–380.

Marino M, Mele E, Viggiano A, Nori SL, Meccariello R, Santoro A (2021). Pleiotropic outcomes of glyphosate exposure: From organ damage to effects on inflammation, cancer, reproduction and development. *Int. J. Mol. Sci.*, **22(22)**, 12606

Matsumoto AM, Bremner WJ (2016). *Testicular Disorders*. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM (eds), *Williams Textbook of Endocrinology* (13 th ed), Philadelphia: Content Repository Only! p: 694-784.

Mazen NF, Elnegris HM (2013). Role of coenzyme Q10 in testicular damage induced by acrylamide in weaned albino rats: A histological and immunohistochemical study. *Egyptian J. Histol.*, **36(1)**, 164–174.

McLaughlin CA, Chiasson RB (1990). *Laboratory Anatomy of the Rabbit 8th Edition*, Iowa; Wm. C. Brown Company Publisher.

Medzhitov R (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, **140(6)**, 771-776.

Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R (2007). Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J. Androl.*, **28(3)**, 397–406.

Menkveld R (2013). Sperm morphology assessment using strict (tygerberg) criteria. *Methods Mol. Biol.*, **927**, 39–50

Mescher AL (2013). *Junqueira's basic histology: text and atlas 13th Edition*. Indiana: McGraw-Hill Education.

Mesnage R, Bernay B, Séralini GE (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, **313(2–3)**, 122–128

Mínguez-Alarcón L, Gaskins AJ, Meeker JD, Braun JM, Chavarro JE (2023). Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Fertil. Steril.*, **120(6)**, 1138–1149

Mital P, Hinton BT, Dufour JM (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol. Reprod.*, **84**, 852-858

Mitchell DG, Chapman PM, Long TJ (1987). Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bull. Environ. Contam Toxicol.*, **39(6)**, 1028–1035.

Moreno-Fernandez J, Alferez MJ, Lopez-Aliaga I, Diaz-Castro J (2019). Protective effects of fermented goat milk on genomic stability, oxidative stress and inflammatory signalling in testis during anaemia recovery. *Scientific Reports*, **9**, 1–11

Muñoz JP, Bleak TC, Calaf GM (2021). Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. *Chemosphere*, **270**, 128619.

Nozawa YI, Yao E, Gacayan R, Xu SM, Chuang PT (2014). Mammalian Fused is essential for sperm head shaping and periaxonemal structure formation during spermatogenesis. *Dev. Biol.*, **388(9)**, 170–180.

Nyariki JN, Ochola LA, Jillani NE, Nyamweya NO, Amwayi PE, Yole DS, Isaac AO (2019). Oral administration of coenzyme Q10 protects mice against oxidative stress and neuro-inflammation during experimental cerebral malaria. *Parasitol. Int.*, **71**, 106–120

Oakberg EF (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *AM. J. Anat.*, **99**, 391–413.

O'Donnell L, Stanton P, de Kretser DM (2017). *Endocrinology of the male reproductive system and spermatogenesis*. In K. R. Feingold, L. J. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. de Herder, K. Dhatariya, et al. (Eds.), *Endotext* [Internet]. MDText.com, Inc.

Oeckinghaus A, Ghosh S (2009). The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1(6)**, a000034.

Ogbuewu IP, Okoli IC, Iloeje MU (2009). Semen quality characteristics, reaction time, testis weight and seminiferous tubule diameter of buck rabbits fed neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf meal based diets. *Iranian J. Reprod. Med.*, **7(1)**, 23–28.

Owagboriaye FO, Dedeké GA, Ademolu KO, Olujimi OO, Ashidi JS, Adeyinka AA (2017). Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **69(7)**, 461–468.

Perdrix A, Travers A, Clatot F, Sibert L, Mitchell V, Jumeau F, Mace B, Rives N (2013). Modification of chromosomal architecture in human spermatozoa with large vacuoles. *Andrology*, **1(1)**, 57–66.

Pham TH, Derian L, Kervarrec C, Kernanec PY, Jégou B, Smagulova F, Gely-Pernot A (2019). Perinatal exposure to glyphosate and a glyphosate-based herbicide affect spermatogenesis in mice. *Toxicological Sciences*, **169(1)**, 260–271.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. Med Biol. Sci.* **4(2)**, 89–96.

Pravst I, Žmitek K (2011). The coenzyme Q10 content of food supplements. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, **6**, 457–463.

Ray PF, Toure A, Metzler-Guillemain C, Mitchell MJ, Arnoult C, Coutton C (2017). Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clinical Genetics*, **91**, 217–232.

Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE (2005). Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environ. Health Perspect.*, **113(6)**, 716–720.

Romano MA, Romano RM, Bernardi MM, de Oliveira RT, Nascimento JM, Monteiro HP (2010). Glyphosate impairs male fertility in rats. *Reprod. Toxicol.*, **29(4)**, 523–530.

Ross MH ve Pawlina W (2017). *Histology a text and atlas (Histoloji konu anlatımı ve atlas)*. Çev: Baykal B, Ankara: Palme Yayıncılık.

Rossi M, Amaretti A, Raimondi S (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*, **3(1)**, 118–134.

Rotimi DE, Ojo OA, Olaolu TD, Adeyemi OS (2022). Exploring Nrf2 as a therapeutic target in testicular dysfunction. *Cell Tissue Res.* **390(1)**, 23–33.

Russell L (1977). Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.*, **148(3)**, 313–328.

Russell LD (1980). Sertoli-germ cell interactions: A review. *Gamete Research*, **3(2)**, 179–202

Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED (1990). *Histological and histopathological evaluation of the testis.*, Clearwater, FL, USA: Cache River Press.

Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL (2006). Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells*, **24(6)**, 1505–1511

Safarinejad MR (2009). Efficacy of Coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men. *J. Urol.*, **182(1)**, 237–248.

Sayed AM, Hassanein EHM, Ali FEM, Omar ZMM, Rashwan EK, Mohammedsaleh ZM, Abd El-Ghafar OAM (2021). Regulation of Keap-1/Nrf2/AKT and iNOS/NF- κ B/TLR4 signals by apocynin abrogated methotrexate-induced testicular toxicity: Mechanistic insights and computational pharmacological analysis. *Life Sciences*, **284**, 119911

Schnobrich MR (2018). *Disorders of the Reproductive Tract.* In: Reed SM, Bayly WM, Sellon DC (eds), *Equine Internal Medicine* (4 th ed), W.B. Saunders, p: 1217-1364.

Serra L, Estienne A, Vasseur C, Froment P, Dupont J (2021). Review: Mechanisms of glyphosate and glyphosate-based herbicides action in female and male fertility in humans and animal models. *Cells*, **10(11)**, 3079.

Sezen Yılmaz Sariatın, T, Çoban, T (2017). Glifosat ve glifosat bazlı herbisit kullanımının insan sağlığı açısından riskleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Pharmaceutical Sciences*, **6(1)**, 1–14.

Sharma A, Fonarow GC, Butler J, Ezekowitz JA, Felker GM (2016). Coenzyme Q10 and heart failure: A state-of-the-art review. *Circulation: Heart Failure*, **9(4)**, e002639

Sharma RK (2007). Physiology of male gametogenesis. *Clin. Reprod. Med. Surg.*, 73–83.

Sharpe R(1994). *Regulation of spermatogenesis.* In: Knobil E, Neill J (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed, New York: Raven Press, p: 1363-1434.

Shehata AA, Schrödl W, Aldin AA, Hafez HM, Krüger M (2013). The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Current Microbiology*, **66**(4), 350–358

Shumilina E, Andreassen C, Bitarafan Z, Dikiy A (2020). Determination of glyphosate in dried wheat by ¹H-NMR spectroscopy. *Molecules*, **25**(7), 1546.

Silver MK, Fernandez J, Tang J, McDade A, Sabino J, Rosario Z, Vélez Vega C, Alshawabkeh A, Cordero JF, Meeker JD (2021). Prenatal exposure to glyphosate and its environmental degradate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), and preterm birth: A nested case-control study in the PROTECT cohort (Puerto Rico). *Environ. Health Perspect.*, **129**(5), 57011

Singh AP, Rajender S (2015). CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod. Biomed. Online*, **30**(1), 28–38.

Singh S, Kumar V, Gill JPK, Datta S, Singh S, Dhaka V, Kapoor D, Wani AB, Dhanjal DS, Kumar M, Harikumar SL, Singh J (2020). Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **17**(20), 7519

Södergren E (2000). *Lipid peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement*. Uppsala University, Department of Public Health and Caring Sciences, Uppsala/Sweden.

Sönmez M, Türk G, Yüce A (2005). The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, **63**(6), 2063–2072

Szmelskyj I, Aquilina L, Szmelskyj AO (2015). *Anatomy and physiology of the reproductive system: Prerequisites for conception*. In: Szmelskyj I, Aquilina L, Szmelskyj AO (Eds.), *Acupuncture for IVF and Assisted Reproduction* Churchill Livingstone (Elsevier), p: 23-58.

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı (2019). *Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Verileri*. <https://cevreselgostergeler.csb.gov.tr/tarim-ilaci-pestisit-kullanimi-i-85834> (Erişim tarihi: 10.12.2023)

Takalani NB, Monageng EM, Mohlala K, Monsees TK, Henkel R, Opuwari CS (2023). Role of oxidative stress in male infertility. *Reprod. Fertil.*, **4**(3), e230024

Takeda K, Akira S (2004). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* **16**(1), 3–9

Tanyolaç A (1999). Erkek genital sistem. Ankara: Yorum Basın Yayın.

Tegelenbosch RA, de Rooij DG (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research*, **290**(3), 193–200

Teleken JL, Gomes ECZ, Marmentini C, Moi MB, Ribeiro RA, Balbo SL, Amorim EMP, Bonfleur ML (2020). Glyphosate-based herbicide exposure during pregnancy and lactation malprograms the male reproductive morphofunction in F1 offspring. *J. Dev. Orig. Health Dis.*, **11(2)**, 146–153.

Tilman D, Balzer C, Hill J, Belfort BL (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108(50)**, 20260–20264

Tiwana MS, Leslie SW (2023). *Anatomy, abdomen and pelvis: Testes*. In *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

U.S. Environmental Protection Agency (1993). Glyphosate. *Reregistration Eligibility Decision (RED)*.
https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-417300_1-Sep-93.pdf (Erişim Tarihi:22.03.2025)

Uenoyama Y, Inoue N, Maeda K, Tsukamura H (2018). The roles of kisspeptin in the mechanism underlying reproductive functions in mammals. *J. Reprod. Dev.*, **64**, 469–476.

Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, Morris JG (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.*, **616–617**, 255–268

van Haaster LH, de Rooij DG (1993). Spermatogenesis is accelerated in the immature Djungarian and Chinese hamster and rat. *Biol. Reprod.*, **49(6)**, 1229–1235.

Varışlı B, Caglayan C, Kandemir FM, Kılınç K, Yıldırım S, Kucukler S, Dortbudak MB (2022). The impact of Nrf2/HO-1, Caspase-3/Bax/Bcl2 and ATF6/IRE1/PERK/GRP78 signaling pathways in the ameliorative effects of morin against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *Mol. Biol. Rep.*, **49(10)**, 9641–9649

Velásquez MM, Velásquez Rivera V, Cardona Maya WD (2021). The effect of glyphosate on human sperm: In vitro approximation. *Urología Colombiana*, **30(3)**, e194–e198.

Ventela S, Ohta H, Parvinen M, Nishimune Y (2002). Development of the stages of the cycle in mouse seminiferous epithelium after transplantation of green fluorescent protein-labeled spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.*, **66(5)**, 1422–1429.

Verderame M, Chianese T, Rosati L, Scudiero R (2022). Molecular and histological effects of glyphosate on testicular tissue of the lizard *Podarcis siculus*. *Int. J. Mol. Sci.*, **23(9)**, 4850.

Vilela DAR, Silva SGB, Peixoto MTD, Godinho HP, Franca LR (2003). Spermatogenesis in teleost; Insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 187–190

Wajda A, Łapczuk J, Grabowska M, Słojewski M, Laszczyńska M, Urańska E, Drożdżik M (2016). Nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) expression and regulation in male reproductive tract. *Pharmacol. Rep.*, **68**, 101–108.

Wang EY, Huang Y, Du QY, Yao GD, Sun YP (2017). Body mass index effects sperm quality: a retrospective study in Northern China. *Asian J. Androl*, **19**, 234

World Health Organization (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 6th edition*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/343208/9789240030787-eng.pdf?sequence=1> (Erişim Tarihi: 21.12.2024)

Yeni D, Güngör Ş, Avdatek F, Gülhan MF, Olğaç KT, İnanç ME, Denk B, Taşdemir U (2022). Investigation of changes in spermatozoon characteristics, chromatin structure, and antioxidant/oxidant parameters after freeze-thawing of hesperidin (Vitamin P) doses added to ram semen. *Life (Basel)*, **12(11)**, 1780

Yerra VG, Negi G, Sharma SS, Kumar A (2013). Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF-κB pathways in diabetic neuropathy. *Redox Biology*, **1(1)**, 394–397.

Yokoi K, Uthus EO, Nielsen FH (2003). Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, **93**, 141–153.

Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, Abe K, Wakabayashi J, Yamamoto M, Suda T, Nabeshima Y (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev. Biol.*, **269(2)**, 447–458

Yoshida Y, Umeno A, Akazawa Y, Shichiri M, Murotomi K, Horie M (2015). Chemistry of lipid peroxidation products and their use as biomarkers in early detection of diseases. *J. Oleo Sci.*, **64(4)**, 347–356.

Zhang L, Tang J, Haines CJ, Feng HL, Lai L, Teng X, Han Y (2011). c-kit and its related genes in spermatogonial differentiation. *Spermatogenesis*, **1(3)**, 186–194.

Zhao W, Jing J, Shao Y, Zeng R, Wang C, Yao B, Hang D (2020). Circulating sex hormone levels in relation to male sperm quality. *BMC Urology*, **20**, Article 101.

Zhou J, Yang F, Leu NA, Wang PJ (2012). MNS1 is essential for spermiogenesis and motile ciliary functions in mice. *PLOS Genetics*, **8(5)**, e1002516.

Zirkin BR, Papadopoulos V, Hardy MP (2009). *Leydig cell development and function*. In: Niederberger CS, Lipshultz LI, Howards SS (Eds.), *Infertility in the Male* (4th ed), Cambridge: Cambridge University Press, p: 29–47.

Zozina VI, Covantev S, Goroshko OA, Krasnykh LM, Kukes VG (2018). Coenzyme Q10 in cardiovascular and metabolic diseases: current state of the problem. *Curr. Cardiol. Rev.*, **14(3)**, 164–174.

