

**GLİSOFAT BAZLI HERBİSİTE MARUZ BIRAKILAN
RATLARDA PROANTOSİYANİDİNİN TESTİS
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Arş. Grv. Murat KIRIKKULAK
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Fatih AVDATEK
Tez No: 2022-013
Afyonkarahisar

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME ve SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

**GLİSOFAT BAZLI HERBİSİTE MARUZ BIRAKILAN RATLARDA
PROANTOSİYANİDİNİN TESTİS TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Arş. Grv. Murat KIRIKKULAK

Doç. Dr. Fatih AVDATEK

Tez No: 2022-013

AFYONKARAHİSAR

**Bu Tez Çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 21.SAĞ.BİL.01**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda** Murat KIRIKKULAK tarafından hazırlanan “Glisofat Bazlı Herbisite Maruz Bırakılan Ratlarda Proantosiyanidin Testis Toksikitesi Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca 24/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Umut TAŞDEMİR

İmza

Üye

Doç. Dr. Deniz YENİ

İmza

Üye

Doç. Dr. Fatih AVDATEK

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı **beyan ederim.**

24/06/2022

Murat KIRIKKULAK

ÖZET

Glisofat Bazlı Herbisite Maruz Bırakılan Ratlarda Proantosiyanidin Testis Toksisitesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmanın amacı, glifosat (GLF) maruziyetine bırakılan erkek ratlarda spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri ile DNA hasarı, serum testosteron seviyesi ve testis dokusundaki toksisite üzerine güçlü bir antioksidan olan proantosiyanidin (PA) etkinliğini ortaya koymaktır. Çalışmamızda 24 adet, 2,5-3 aylık, 160-180 g ağırlığında, erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Her grupta 6 rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki (1. Grup) ratlar standart rat yemi ve su ile beslendi. PA grubundaki (2. Grup) ratlara 400 mg/kg dozunda PA, DMSO ile çözdürülerek gastrik gavaj yoluyla verildi. PA+GLF grubundaki (3. Grup) ratlara önce 400 mg/kg dozunda PA, daha sonra LD_{50/10} dozu olan 787,85 mg/kg dozunda GLF, DMSO ile karıştırılarak gastrik gavaj yoluyla verildi. GLF grubundaki (4. Grup) ratlara LD_{50/10} dozu olan 787,85 mg/kg dozunda GLF, DMSO karıştırılarak gastrik gavaj yoluyla verildi.

Motilite açısından kontrol grubuna göre GLF grubunda azalma görülürken PA ve PA+GLF gruplarında motilite artışının istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Anormal spermatozoon ve H+/E- oranları açısından kontrol grubuna göre PA ve PA+GLF gruplarındaki azalma ile beraber GLF grubundaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p<0,001$). GLF uygulamasının DNA hasarını artırdığı, PA+GLF ve PA uygulamalarının ise DNA hasarını azalttığı istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). GSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p<0,05$). Seminifer tubulus çapı açısından yapılan incelemede, kontrol grubu ile PA+GLF ve GLF grupları karşılaştırıldığında GLF ve PA+GLF grubunda gözlenen azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p<0,001$). Germinatif hücre katman kalınlıkları incelendiği zaman kontrol grubuna göre PA+GLF ve GLF gruplarında tespit edilen azalmanın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi ($p<0,05$).

Sonuç olarak güçlü bir antioksidan olan PA'nın GLF maruziyeti sonucunda azalan spermatolojik parametreler ile ratların testis dokusundaki olumsuz histolojik değişimleri etkili bir şekilde önlediği belirlendi. Bu gibi olumlu etkilerinden dolayı GLF ile indüklenen testis toksisitesi üzerine PA'nın koruyucu bir etkisinin olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Glifosat, Proantosiyanidin, Rat, Spermatozoa, Testis Toksisitesi

SUMMARY

Effect of Proanthocyanidine on Testicular Toxicity in Rats Exposed to the Glyphosate-Based Herbicide

This study aims to reveal the effectiveness of proanthocyanidine (PA), which is a powerful antioxidant, on spermatological and oxidative stress parameters, DNA damage, serum testosterone level, and toxicity in testicular tissue in male rats exposed to glyphosate (GLF). In our study, 24 male Wistar Albino rats, 2.5-3 months age, weighing 160-180 g, were used. They were divided into 4 groups with 6 rats in each group. The rats in the control group (Group 1) were fed with standard rat chow and water. The rats in the PA group (Group 2) were given 400 mg/kg PA dissolved with DMSO and administered via gastric gavage. The rats in the PA+GLF group (Group 3) were first administered 400 mg/kg PA, then LD_{50/10} dose 787.85 mg/kg GLF mixed with DMSO and administered via gastric gavage. The LD_{50/10} dose of 787.85 mg/kg GLF was mixed with DMSO and administered via gastric gavage to the rats in the GLF group (Group 4).

In terms of motility, a decrease was observed in the GLF group compared to the control group. In contrast, the increase in motility was statistically significant in the PA and PA+ GLF groups ($p < 0.001$). In terms of abnormal spermatozoa and H+/E- ratios, it was determined that the decrease in PA and PA+ GLF groups and the increase in the GLF group were statistically significant compared to the control group ($p < 0.001$). It was found statistically significant that GLF application increased DNA damage, while PA+ GLF and PA applications decreased DNA damage ($p < 0.001$). A statistically significant difference was observed in GSH values ($p < 0.05$). In the examination performed in terms of seminiferous tubule diameter, when the control group and PA+GLF and GLF groups were compared, the decrease observed in the GLF and PA+GLF groups was found to be statistically significant ($p < 0,001$). When the germinative cell layer thicknesses were examined, it was determined that the decrease detected in the PA+GLF and GLF groups compared to the control group was statistically significant ($p < 0,05$).

As a result, it was determined that PA, a powerful antioxidant, effectively prevented negative histological changes in testicular tissue of rats with decreased spermatological parameters due to GLF exposure. Due to such positive effects, it was concluded that PA has a protective impact on GLF-induced testicular toxicity.

Keywords: Glyphosat, Proanthocyanidine, Rat, Sperm, Testicular Toxicity,

ÖNSÖZ

“Glisofat Bazlı Herbisite Maruz Bırakılan Ratlarda Proantosiyanidin Testis Toksisitesi Üzerine Etkisi” adlı bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı Programı’nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım Doç. Dr. Fatih AVDATEK hocama, geniş bilgi, deneyim ve imkânlarından faydalandığım çok değerli Doç. Dr. Deniz YENİ ve Prof. Dr. Mustafa GÜNDOĞAN hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardımcı olan Doç. Dr. Ruhi TÜRKMEN’ e, Doç. Dr. Şükrü GÜNGÖR’ e, Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL’ e, Dr. Öğr. Üyesi Özay GÜLEŞ’ e, Arş. Grv. Orkun ATİK’ e, Vet. Hek. Büşra YALOVA’ ya, Vet. Hek. Orhan ESER’ e ve tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde 21.SAĞ.BİL.01 no’lu proje olarak destekleyen AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Birimi’ ne teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu günlere gelmemde büyük katkısı olan insani değerleri ve çalışma ahlakını bizlere bırakan rahmetli babama, bana olan inançlarını ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili anneme, abime, hayatımın her anında benimle birlikte olan, çalışmalarım boyunca büyük bir sabır ve özveri gösteren destekleriyle başarılarımda büyük katkısı olan kıymetli eşim Neslihan KIRIKKULAK’ a teşekkür ederim.

Murat KIRIKKULAK

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	III
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ÖNSÖZ SAYFASI	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	X
ÇİZELGELER	XIII
RESİMLER	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Ratlarda Reprodüktif Sistem	1
1.1.1. Ratlar Hakkında Genel Bilgiler	1
1.1.2. Dişi Ratlarda Reprodüksiyon	2
1.1.3. Erkek Ratlarda Reprodüksiyon	4
1.1.3.1. Testis İç Kanalları	5
1.1.3.1.1. Tubuli Recti	5
1.1.3.1.2. Rete Testis	5
1.1.3.2. Testis Dışı Kanallar	5
1.1.3.2.1. Ductuli Efferentes	5
1.1.3.2.2. Duktus Epididimis	5
1.1.3.2.3. Ductus Deferens (Vas Deferens)	5
1.1.3.2.3.1. Tunica Mukoza	6
1.1.3.2.3.2. Tunica Muscularis	6
1.1.3.2.3.3. Tunica Adventitia	6
1.1.3.2.4. Ductus Ejaculatorius	6
1.1.3.2.5. Üretra	6
1.1.3.3. Erkek Ek Salgı Bezleri	6
1.1.3.3.1. Prostat	7
1.1.3.3.2. Vesicula Seminalis	7

1.1.3.3.3. Bulbourethral Bezler (Cowper's Glands)	7
1.1.3.3.4 Pıhtılaşma Bezi	7
1.1.3.4. Penis	8
1.1.3.5. Spermatogenezis	8
1.1.3.5.1. Spermatositogenezis	8
1.1.3.5.2. Mayozis	9
1.1.3.5.3. Spermiyogenezis	9
1.1.3.5.3.1. Golgi evresi	9
1.1.3.5.3.2. Kap Evresi	9
1.1.3.5.3.3. Akrozom Evresi	10
1.1.3.5.3.4. Olgunlaşma Evresi	10
1.1.3.6. Spermatozoon	10
1.1.3.6.1. Baş	10
1.1.3.6.2. Boyun	11
1.1.3.6.3. Kuyruk	11
1.1.3.6.3.1. Orta kısım	11
1.1.3.6.3.2. Esas kısım	11
1.1.3.6.3.3. Son kısım	11
1.1.3.7. Sperma Toplama, Suni Tohumlama ve Embriyo Transferi	11
1.2. Glifosat	13
1.2.1. Pestisitler	13
1.2.2. Herbisitler	14
1.2.3. Glifosat	14
1.2.3.1. Glifosatın Etkileri	16
1.3. Proantosiyanidin	18
1.3.1. Polifenoller	18
1.3.2. Flavonoidler	19
1.3.3. Proantosiyanidin	22
1.3.3. Proantosiyanidinin Etkileri	22
2. MATERYAL ve METOT	24
2. 1. Deney Hayvanları	24
2. 2. Grupların Oluşturulması	24
2. 3. Kan ve Doku Örneklerin Alınması	25
2.3.1. Kan Örneklerinin Alınması	25

2.3.2. Doku Örneklerinin Alınması	25
2.4. Doku Homojenizasyonu	26
2.5. Biyokimyasal Analizler	26
2.5.1. Serum Testosteron Seviyelerinin Belirlenmesi	26
2.5.2. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayin	26
2.5.3. Glutatyon (GSH) Aktivite Tayini	27
2.6. Spermatolojik Muayeneler	27
2.6.1. Spermatozoon Motilitesi	28
2.6.2. Anormal Spermatozoon Oranı	28
2.6.3. HE Test	28
2.7. DNA Hasarı	29
2.7.1. Spermanın Yıkanması	30
2.7.2. Slaytların Hazırlanması ve Spermatozoonların Agoroza Gömülmesi	30
2.7.3. Lizis	30
2.7.4. Elektroforez	31
2.7.5. Nötralizasyon	31
2.8.6. Boyama	31
2.8.7. Slaytların Değerlendirilmesi	31
2.8. Testis Histopatolojisi	32
2.9 İstatistiksel Analiz	32
3. BULGULAR	32
3.1. Spermatolojik Parametrelere Ait Bulgular	32
3.2. HE Test Parametrelerine Ait Bulgular	33
3.3. DNA Hasarına Ait Bulgular	34
3.4. Serum Testosteron Bulguları	35
3.5. Oksidatif Stres Parametrelerine Ait Bulgular	36
3.6. Testis Dokusundaki Histopatolojik Bulgular	37
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇ	44
6. KAYNAKLAR	45
7. EKLER	52
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	52
8. ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

<: Küçüktür

=: Eşittir

>: Büyüktür

±: Artı eksi

°C: Santigrat derece

µl: Mikrolitre

AChE: Asetilkolinesteraz

ANOVA: Analysis of Variance (ANOVA)

AU: Arbitrary Unit

BSA: Bovine serum albümin

Ca⁺²: Kalsiyum iyonu

Cd: Kadmiyum

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DTNB: 5,5'- (2-ditiobisnitrobenzoik asit)

DTT: Dithioerithrol

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid

EIA: Enzim immunoassay

EPSPS: Enolpiruvilshikimat-3-fosfat sentazı

FCS: Fetal buzağı serumu

FLX: Fluoxetine

FSH: Follicle stimulating hormone

g: Gram

GLF: Glifosat

GnRH: Gonadotropin releasing hormone

GSH: Glutasyon

HCG: Human Chorionic Gonadotropin

HCl: Hidrojen klorür

HE: Hipo ozmotik Eozin boya

HOS: Hipo ozmotik şişme

IVF: İn vitro fertilizasyon

kg: Kilogram

LD_{50/10}: Öldürücü dozun onda biri

LH: Lüteinleştirici hormon

LMA Low melting agar

M: Molar

mA: Miliamper

MDA: Malondialdehit

mg: Miligram

Mg⁺²: Magnezyum iyonu

mL: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

NaCL: Sodyum klorür

NaOH: Sodyum hidroksit

nm: Nanometre

p: Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri

PA: Proantosiyanidin

PA+GLF: Proantosiyanidin+Glifosat

PBS: Phosphate Buffered Saline

pH: Potansiyel hidrojen

PMSG: Pregnant mare serum gonadotropin

ROS: Reaktif oksijen türleri

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

x: Çarpı

yy: Yüzyıl

ZEN: Zearalenone

β: Beta

μg: Mikrogram

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 3.1: Gruplara ait Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranları	33
Çizelge 3.2: Gruplara ait HE-test Parametreleri	33
Çizelge 3.3: Gruplara ait DNA Hasarları	34
Çizelge 3.4: Gruplara ait Testosteron Düzeyleri	35
Çizelge 3.5: Gruplara ait Oksidatif Stres Parametreleri	37
Çizelge 3.6. Gruplara ait Seminifer Tubul Çapı ve Germinatif Hücre Katman Kalınlığı	38

RESİMLER

SAYFA

Resim 3.1: Ratların Testislerindeki Glifosat Kaynaklı Hasar Üzerine Proantosiyanidin' in Etkisi 38

1. GİRİŞ

1.1. Ratlarda Reprodüktif Sistem

1.1.1. Ratlar Hakkında Genel Bilgiler

Rattus norvegicus, Rodentia takımından Muridae ailesine aittir (Sharp ve Villano, 2012). Ratların, Asya' da ortaya çıktığı ve 18. yüzyılda (yy) Amerika ve Avrupa' ya yayıldığı düşünülmektedir. Ratlar, ilk olarak 19. yy' ın sonlarında yapılan laboratuvar çalışmalarında kullanıldığı bildirilmiştir (Keeble, 2011). Ratların Laboratuvar çalışmalarında ilk bildirilen kullanımı, 1856' da Fransa' da yapılan ve yayınlanan albino ratlarda adrenalektominin etkileri üzerine yapılan bir çalışmadır (Foster ve Frost, 2018).

Ratların yaşam süreleri 2,5-4 yıl arasında olup pubertasa 50 ± 10 günde ulaşır. Gebelik süresi 21-23 gün arasındadır. Erkekler 450-520 g, dişiler 250-400 g' dır. Vücut sıcaklığı 35,9-37, 5 °C, solunum sayısı dakikada 70-150, kalp atım sayısı ise dakikada 250-600 arasında değişmektedir. 100 g ağırlığındaki bir ratın günlük yem tüketimi 5-6 g, su tüketimi ise 10-12 ml' dir (Hankenson, 2014).

Ratların koku alma, duyma ve dokunma duyuları oldukça gelişmiş olmasına rağmen görüşleri zayıftır. Ratlar, Omnivor olup ad libitum olarak beslenmektedir (Koolhaas, 2010). Tüm kemirgenler gibi, ratlarda da ağızdan alınan gıdanın ve metabolitlerinin bazı kısımlarını içeren yumuşak dışkıyı yedikleri için kaprofaji vardır. Ratlar kusamazlar. Ratların maksilla ve mandibulada iki kesici ve altı azı dişi bulunmakta olup bunların diş formülü (incisive 1/ 1, canine 0/ 0, premolar 0/ 0, molar 3/ 3) şeklindedir (Sharp ve Villano, 2012). Ön ayaklarda 4 arka ayaklarda 5 parmak vardır (İnt.Kyn. 1).

Ratların safra kesesi yoktur. Gece aktif hayvanlardır. Gözyaşı bezi olan Harderian bezi, normalde gözü yağlayan kırmızı bir salgı üretir. Rat strese girdiğinde, bu salgı yüze taşar ve göz çevresinde stresin özelliği olan kırmızı bir halka oluşturur (Wolfensohn ve Lloyd, 2013).

1.1.2. Dişi Ratlarda Reprodüksiyon

Ratların son derece yüksek üreme kapasitesi vardır. Hem erkekler hem de dişiler, ortalama 2-3 aylıkken cinsel olgunluğa ulaşır. İlk östrusun görülme yaşı 40-65 gün arasında olmakla beraber östrus siklusunun uzunluğu 4-6 gün kadardır. İlk çiftleşme yaşı 50-100 gün arasında değişmektedir ve 6 çift meme bezine sahiptir (Koolhaas, 2010).

Ratlar bir batında 6-12 arasında değişen yavru doğurmaktadır. Yeni doğan ratlar yaklaşık 5,5-10 g ağırlığında doğmakta olup tüsüzdür. Kesici dişler 8-10 günde ortaya çıkar. Gözler 14-17 günde açılır ve tüy 16 günde tamamen gelişir. Rat yavruları 20-21. günlerde süttten kesilebilir (Tan ve Tan, 2017).

Ovaryumları düzensiz, nodüler bir yüzeye sahip olup yuvarlaktır. Her ovaryum bir bursa içerisinde bulunur. Ovaryumlar, oositlerin hem gelişiminden hem salınmasından hem de vücuttaki diğer organları etkileyen çeşitli steroid ve protein hormonlarının üretilmesinden sorumludur. Rat oviductları çift kıvrımlı kanallardır. Rat uterusu, caudal olarak kısmen kaynaşmış iki ayrı cornudan (uterus duplex) oluşur. Uterusun caudal kısmının kısmi birleşmesi ve büyük ölçüde tek bir cerviks gibi görünmesine rağmen, her bir cornu, her biri ayrı bir cervikal kanala bağlanan ayrı bir lümen oluşturur. Portio vaginalis, cervikste dış açıklıklardan vajinal lümeneye çıkan dört veya beş epitel katlı fibromüsküler yastıklardır. Vajinal duvarın uterus ağzıyla bulunduğu yerde kör bir uç veya forniks vardır. Dış vajina açıklığı üretral açıklıktan ayrıdır. Klitoris, tıpkı klitoral bezin kanalı gibi dış üretral açıklığın içindedir (Vidal ve Dixon, 2018).

Ratlar yıl boyu poliöstrik hayvanlardır. Ratların östrus siklusu 28. ile 42. günler arasında pubertaya girmesiyle başlar. Proöstrus ve östrus döneminde ovaryumlarda foliküler gelişim meydana gelir. Östrus döneminin ortasında ovulasyon ve ovulasyondan sonra corpus luteum oluşur. Diöstrus dönemi ise dinlenme evresidir.

Ön hipofiz bezinden salgılanan gonadotropinler, ovaryumlardaki ve foliküllerdeki değişikliklere bağlı olarak hormonal dalgalanmaları düzenler. Luteinizing Hormone (LH) sekresyonu, en yüksek proöstrus döneminde ve en düşük östrus döneminde meydana gelir. Preovulatör foliküllerin ovule olmasını LH' ın proöstrus dönemi süresince yüksek seviyede olması sağlamaktadır. LH, ovulasyon sonucunda meydana

gelecek olan corpus luteumun oluşumunu hazırlar. Follicle stimulating hormone (FSH) sekresyonu küçük foliküllerin büyümesini uyarır. İki preovulatör FSH dalgasından birincisi LH dalgasından kaynaklanırken, ikincisi ise ovulasyondan sonra inhibinin azalmasından kaynaklanmaktadır. 17β östradiolün artışı ile foliküler gelişme meydana gelir. Metöstrus ve diöstrus dönemlerinin başlarında östradiol seviyesi düşüktür; ancak diöstrus döneminin sonuna doğru östradiol seviyesi artmaya başlar. Serum östradiol düzeyi proöstrus dönemi boyunca birdenbire artarak pik yapar ve ovulasyonu tetikler, proöstrusun sonunda ise aniden düşer. Proöstrusu östrus dönemi takip eder. Bu süre boyunca serum östradiol düzeyi düşük seviyede kalır. Metöstrus döneminde progesteron salınımı biraz daha yüksek olmasına karşın diöstrusun başında azalır ve proöstrusun sonuna doğru yükselir. Progesteron, proöstrus döneminin sonunda pik seviyesine ulaşır. Şayet çiftleşme olursa LH seviyesi düşük kalmaya devam eder, FSH seviyesi yeniden artmaya başlar ve prolaktin seviyesi yükselir. Çiftleşmemiş hayvanlarda ise prolaktin seviyesi bazal düzeyde kalır, corpus luteum oluşuktan iki gün sonra dejenere olur (Yiğit vd., 2019).

Ratta vajina, doğumda vajinal plaka olarak adlandırılan kompakt epitel ile kapatılır. Bu, 20-35 günlük yaşta dejenere ve kornifiye olmaya başlar ve 40 ile 80 günlükler arasında tamamen açıktır. Vajinal açıklık, dişi ratlarda yaklaşan ergenliğin dışsal bir göstergesi olarak kullanılabilir ve benzer bir durum olan prepüsyal ayrılma erkek ratlarda da vardır (Otto vd., 2015).

Dişinin fertilité durumu, en kolay şekilde erkek bir ratın varlığındaki davranışıyla tanınır. Östrustaki dişiler zıplama, kulak kıpırdatma ve anogenital bölgeyi erkeğe koklatma gibi oldukça karakteristik bir istek davranışı sergiler. Erkek dişiye atlamaya çalıştığında, alıcı bir dişi lordosis pozisyonunu benimser. Dişinin fertilité durumunu belirlemenin daha ayrıntılı bir yolu, günlük vajinal smear yoluyla östrus siklusunu izlemektir (Koolhaas, 2010).

Ratlarda östrus siklusunda mevsimsel değişiklik olmamasına rağmen, hem ovaryumun işlevi hem de östrus siklusu ışık döngülerinden etkilenir. Sürekli ışığın, corpus luteum oluşmadan ovaryumlarda kalıcı östrusa ve kistik foliküllere neden olduğu bildirilmiştir (Otto vd., 2015). Işık döngüsü (12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık) ratlarda üreme için

önemlidir. Bu döngüden sapmalar üreme performansını etkileyebilir (Bogdanske vd., 2010).

Östrus siklusunun evre, süre ve sitolojik bulguları ise şöyledir: Proöstrus evresi 12 saat olup bu evredeki sitolojik bulgularda çekirdekli epitel hücreleri, lökositler, ara sıra kornifiye hücreler görülmektedir. Östrus evresi 12 saat olup bu evredeki sitolojik bulgularda % 75 çekirdekli hücreler, % 25 kornifiye hücreler; östrus ilerledikçe kornifiye hücrelerin daha baskın olduğu görülmektedir. Metöstrus evresi 21 saat olup bu evredeki sitolojik bulgularda çok sayıda lökosit, kornifiye hücre ve hücresel döküntü; büyük, düz çekirdekli hücreler görülmektedir. Ayrıca ovulasyon metöstrus sırasında meydana gelmektedir. Diöstrus evresi 57 saat olup bu evredeki sitolojik bulgularda daha çok lökositler görülmektedir (Sharp ve Villano, 2012).

Ratlar çiftleştikten sonra, ratların vajinasında beyaz, mumsu bir çiftleşme tıkacı (vajinal tıkaç) bulunur. Ratlarda gebeliği tespit etmek amacıyla vajinal smear üzerinde spermatozoon görülmesi, ratların palpasyon ile muayenesi ve tartımları gibi yöntemler kullanılır. Ratların gebelik süresi 21-23 gün arasında değişir. Ratlarda yalancı gebelik nadir görülürken bu süre 13 gün kadardır (Harkness vd., 2010). Ayrıca ratlarda cinsiyet ayrımı yaparken dikkat edilmesi gereken nokta, erkeklerin dişilerden daha fazla anogenital mesafeye sahip olduğudur (Sharp ve Villano, 2012).

1.1.3. Erkek Ratlarda Reprodüksiyon

Erkek genital sistem n kromozoma sahip erkek cinsiyet hücrelerinin üretiminden, beslenmesinden, depolanmasından, erkek cinsiyet hormonlarının üretiminden ve salgılanmasından sorumludur. Erkek genital sistem organları, testislerden, tubuli recti, rete testis, ductuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoris, üretra, erkek eklenti bezleri ile penisten oluşur (Bernal vd., 2015).

Testisler, steroid hormonların üretimi ile gamet üretiminden sorumlu olan, ekzokrin ve endokrin işlevi olan, cinsel olgunlaşmayı ve üreme işlevini etkileyen bir organdır. Ekzokrin fonksiyonu pubertasta spermatozoa üretimini başlatır ve sekonder cinsiyet özelliklerini geliştirir. Endokrin fonksiyonu erişkinlerde spermatozoa üretiminin devamlılığını, sekonder cinsiyet özelliklerinin korunmasını sağlar ve yardımcı bezlerin

fonksiyonunu etkiler (Prihatno vd., 2018; Gezer ve Karadağ Sarı, 2020). İnsanlarda ve çoğu memeli hayvanlarda, testisler oval şekilli bir çift organken, ratlarda tek bir organ olup şekli yuvarlaktır (Antepli ve Beyaz, 2017).

1.1.3.1. Testis İç Kanalları

1.1.3.1.1. Tubuli Recti

Her seminifer tübülün düz seyirli son bölümüne tubuli recti denir. Tubuli recti, eşey hücrelerinden yoksun olup duvarı tek katlı prizmatik hücrelerden oluşur. Düz tübüllerin lümenleri kanalın sonuna yaklaştıkça rete testise açılır (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.1.2. Rete Testis

Kübik veya düşük prizmatik epitel ile döşenmiş anatomik bir kanaldır. Epitel hücreleri, birkaç kısa mikrovillus içerir (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.2. Testis Dışı Kanallar

1.1.3.2.1. Ductuli Efferentes

Sayıları 12 ile 25 arasında değişen ductuli efferentes, rete testisten köken alır ve çok katmanlı prizmatik epitel ile kaplı olup kinosilyumludur (Beyaz vd., 2008).

1.1.3.2.2. Duktus Epididimis

Duktus epididimisin duvarı, yalancı çok katmanlı prizmatik epitel ve kas katmanından oluşur. Duktus epididimis; caput epididimis, corpus epididimis ve cauda epididimis olmak üzere üç farklı bölgeye ayrılır. Caput epididimis ve corpus epididimis, spermatozoonun olgunlaşmasından, cauda epididimis ise spermatozoonun depolanmasından sorumludur (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.2.3. Duktus Deferens (Vas Deferens)

Cauda epididimisten başlar, duktus ejakulatoriusu oluşturmak için vesicula seminalis salgı kanalında son bulur. Duvarı, içten dışa doğru tunica mukoza, tunica muscularis, tunica adventitia olmak üzere üç katmandan oluşur (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.2.3.1. Tunica Mukoza

Uzunlamasına kıvrımlar oluşturur. Absorpsiyon, fagositoz ve sekresyon fonksiyonlarına sahip, kinosilyumlu yalancı çok katmanlı prizmatik epitel ile kaplıdır (Anisatuzzahro ve Luthfi, 2017).

1.1.3.2.3.2 Tunica Muscularis

İyi gelişmiş kas katmanından oluşmaktadır. Spermatozoon, kas katmanının kasılmasıyla öne doğru itilir (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.2.3.3 Tunica Adventitia

Damarlar ve sinirler açısından zengin bağ dokusu içerir.

Ductus deferens spermatozoonun taşınmasından sorumludur. Ayrıca Ductus deferens'in genişlemiş kısmına sahip bir bölge olan ampulla ductus deferenste spermatozoonlar ejakülasyon oluncaya kadar bir süre burada depolanır (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.2.4. Ductus Ejaculatorius

Prostat içinden geçen ve pelvik üretra kısmına açılan kısa, kıvrımlı bir kanaldır (Schimming vd., 2015).

1.1.3.2.5. Üretra

Erkeklerde spermanın ve idrarın dış ortama atılmasını sağlayan fibromüsküler bir kanaldır (Drobnis ve Nangia, 2017).

1.1.3.3. Erkek Ek Salgı Bezleri

Prostat, vesicula seminalis ve bulboüretral bezler ve bunların dışında ratlarda bulunan pıhtılaşma bezi erkek genital sisteminin ek salgı bezleridir. Her bir bezden gelen salgılar farklı olup bu salgıların aktivitesi androjen düzeylerine karşı çok duyarlıdır. Prostat ve vesicula seminalisteki ağırlık değişimi ve değişen hücresel aktiviteler, dolaşımdaki

androjen seviyelerini değiştirmek için hızlı ve iyi bir belirleyici olarak kullanılabilir (Drobnis ve Nangia, 2017; Adebayo vd., 2015).

1.1.3.3.1. Prostat

Prostat, üretranın etrafındaki birçok lobdan oluşur. Bu, çeşitli kanallarla üretradan seröz salgılar salgılayan renksiz, kombine bir tübüloalveolar bezdir. Ratlarda bir çift ventral lob, daha küçük olan bir dorsal lob ve lateral loblar bulunur ve bu loblar vesica urinarianın boynunda yer alır. Prostatik sekresyon ejakülatın % 15 ile 30' unu oluşturmakla beraber proteolitik enzimler, sitrik asit, transferrin, inositol ve çinko içermektedir (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.3.2. Vesicula Seminalis

Duvar yapısı dairesel bir kas tabakasından oluşur ve epitel tek tabakalı silindiriktir. Erkek üremesinde önemli rolü olduğu düşünölen vesicula seminalis, yeşilimsi beyaz viskoz sıvıyla dolu uzun, içi boş, iki taraflı bir bezdir. Bu bez ampulla ductus deferenslerin yanında bulunur ve ejakülatuar kanal yoluyla üretraya atılır. Yuvarlak yapının tepe noktası koniktir. Vesicula seminalis sekresyonu ejakülatın % 50-80' ini oluşturur. Vesicula seminalisin ana bileşenlerini fruktoz, protein, C vitamini ve laktoferrin içeren sitrik asit oluşturmaktadır (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.3.3. Bulbourethral Bezler (Cowper's Glands)

Membranöz üretra arkasındaki ürogenital diyaframda yer alan birleşik iki tübüloalveolar bezdir. Kanallar üretranın ön kısmında birleşir. Bağ dokusu içeren çizgili kasın dış yüzü kapsüllerle çevrilidir. Bu kapsülden ayrılan septum, organı loblara ayırır. Septumun bağ dokusu elastik lifler, düz kas ve çizgili kas lifleri bakımından zengindir. Salgı kısmı, mukus salgılayan tek katmanlı kübik veya prizmatik epitel ile kaplıdır. Salgı ürünü kayganlaştırıcı görevi gören berrak mukus, preseminal sıvının büyük bölümünü oluşturur (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.3.4 Pıhtılaşma Bezi

Genellikle prostat bezinin bir parçası olarak kabul edilir ve ratlarda sıklıkla ön prostat olarak adlandırılır. Protein ve fruktozdan zengin

sekresyonları, sperma pıhtılaşmasında ve spermatozoon hareketliliğinde önemli bir rol oynar. Bu sekresyonlar ayrıca, veziküler ve bulboüretal bezlerin salgıları ile karmaşık biyokimyasal etkileşimler yoluyla, çiftleşmeden sonra dişi üreme yolundan spermanın geri akışını önleyen vajinal tıkaçlar oluşturur (Adebayo vd., 2015).

1.1.3.4. Penis

Süngerimsi gövde ve çift kavernöz gövdeden oluşan çiftleşme organıdır (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

Erkek ratlarda puberta, testislerin karın boşluğundan skrotuma inmesi ve spermatogenezisin başlangıcı ile karakterizedir. Spermatozoon üretimi doğumdan 45 gün sonra başlar. Ancak en elverişli üretim 75. günden önce gerçekleşmez. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) hem LH hem de FSH sekresyonunu sağlar. LH ise pubertada Leydig hücrelerini uyararak testosteron salınımını arttırmaktadır. Puberta dönemi öncesi yapılan bir hipofizektomi, pubertadaki değişiklikleri engellemektedir. Hipofizektomiden sonra ratlara FSH ve LH uygulanması spermatogenezisi uyarabilir. Çiftleşme davranışı erkek ratlarda sadece testosteron varlığında gerçekleşir. Kastre edilen ratlarda çiftleşme davranışı gözlenmemektedir. Çiftleşme davranışlarında feromonların çok önemli yeri vardır (Mülazımoğlu vd., 2010). Erkeklerde anogenital mesafe dişilere göre daha fazladır. Dişilerin meme uçları görünür haldeyken erkeklerde yoktur (Keeble, 2011). Erkek ratlar uzun bir büyüme periyodu sergilerler ve uzun kemiklerin kemikleşmesi ikinci yıla kadar tamamlanmaz (Harkness vd., 2010).

1.1.3.5. Spermatogenezis

Spermatogoniumdan spermatozoaya kadar olan olayların dizisine spermatogenezis denir ve 3 aşamada gerçekleşir: Spermatositogenezis (çoğalma), Mayozis (bölünme) ve Spermiyogenezis (başkalaşma) (Gezer ve Karadağ Sarı, 2020).

1.1.3.5.1. Spermatositogenezis

Spermatogoniumların mitoz bölünmesi sonucunda primer spermatositlerin oluştuğu ve hücrelerin sayıca arttığı süreci kapsar. Pubertas öncesinde primordial germ hücreleri

olarak bulunan spermatogoniumlar pubertasin başlamasıyla aktif spermatogonyumlara dönüşür. Aktif spermatogoniumlar da ard arda bir dizi mitoz bölünme geçirerek sırasıyla A4 spermatogonium, intermedier spermatogonium, B tipi spermatogonium ve primer spermatositler meydana gelir (Tan, 2015).

1.1.3.5.2. Mayozis

Diploid (2n) kromozoma sahip primer spermatositlerin mayoz bölünme geçirerek önce haploid (n) kromozoma sahip sekonder spermatosit, daha sonra sekonder spermatositlerin de mayoz bölünmenin ikinci aşamasının tamamlanması ile spermatidler oluşur. Böylece 2n kromozoma sahip bir primer spermatositten n kromozoma sahip dört spermatid oluşur (Öztürk, 2019).

1.1.3.5.3. Spermiyogenezis

Spermatidlerin spermatozoaya farklılaşmasına spermiyogenezis denir. Spermiyogenezis sırasında meydana gelen en önemli morfolojik değişiklikler, akrozom oluşumu, çekirdek kromatinin yoğunlaşması, hareketli bir kuyruğun büyümesi ve daha sonra spermatid materyalde oluşacak spermatozoa için gereksiz parçaların kaybıdır. Spermiyogenezis; Golgi, Kap, Akrozomal ve Olgunlaşma evrelerinden oluşur (Vernet vd., 2016).

1.1.3.5.3.1. Golgi evresi

Proakrozomal granüller Golgi veziküllerinde görülür. Proakrozomal granüller, tek bir akrozomal vezikülde bir akrozomal granül oluşturmak için erir ve birbirleriyle kaynaşır. Bu iki yapı, çekirdeğin iç tarafı ile temas ederek oluşacak spermatozoon başının ön kutbunu belirler (Aitken vd., 2016).

1.1.3.5.3.2. Kap Evresi

Akrozomal vezikül büyür ve çekirdeğin 2/3 'lük ön kısmını kaplayan başlığını oluşturur. Geç kap fazında, hareketsiz spermatitler polarize edilir ve çekirdek ile baş kapağı eksantrik olarak yer değiştirir. Çekirdeğin caudal kutbunda iki merkez noktası toplanır ve uzak merkezci, kamçı büyümesine yol açar (Morrow vd., 2017).

1.1.3.5.3.3. Akrozom Evresi

Erken akrozomal fazda çekirdek ve hücre gövdesi büyümeye başlar ve spermatidlerin çekirdekleri tübüllerin çevresine ve kuyrukları lümene doğru yönlendirilir. Daha önce sertoli hücrelerinin yanal uzantısından ayrılan spermatidler daha sonra bu hücrelerin apikal girintilerine gömülür. Çekirdek büyümeye başladığında, çekirdek histonların yerini gerekli proteinler alır. Bu konsantrasyondan sonra DNA direnç kazanır. Protamin, döllenme sırasında kromatinin yoğunlaşmasından önce oositler tarafından sağlanan histonlarla değiştirilmelidir (Vernet vd., 2016).

1.1.3.5.3.4. Olgunlaşma Evresi

Çekirdek konsantrasyonu bu aşamada tamamlanır. Olgunlaşma aşamasında spermatozoonun orta kısmında, mitokondrilerin çoğu aksonem etrafında sarmal şeklinde toplanır. Spermatidler arasındaki sitoplazma köprüleri birbirinden ayrılır ve ayrılan sitoplazma artıkları uzaklaştırılır. Kalan cisimlerin farklı uçları vardır. Bunlar ya sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ya tübüler lümen içinde kaybolur ya da tübül epitelinin apikal kenarlarına bağlanarak hızla otolize olur. Olgunlaşma evresinin ileri aşamalarında spermatid hacmi, kap evresindeki spermatidin % 20-30' u kadardır. Bu azalmadan genellikle otoliz sorumlu tutulur (Aitken vd., 2016).

1.1.3.6. Spermatozoon

Spermatozoon, spermatogenezis sonucu oluşan ve erkeğe ait genetik materyal taşıyan üreme hücresidir. Spermatozoon baş, boyun ve kuyruk olmak üzere 3 kısımdan oluşur (Vernet vd., 2016).

1.1.3.6.1. Baş

Türe özgü olan ve bu nedenle hem şekil hem de boyut olarak türler arasında farklılık gösteren spermatozoon başı, büyük oranda genetik materyal içeren çekirdeklerle doludur. Başın şekli çekirdeğin şeklini belirler. Çekirdeğin üst 2 / 3'ü, çok sayıda

hidrolitik ve proteolitik enzim içeren akrozomal kapla çevrilidir. Akrozomal enzimler, dölleme sırasında zona pellucida'nın delinmesi için gereklidir. (Kim vd., 2017). Ratların spermatozoon başı kanca şeklindedir (Creasy ve Chapin, 2013).

1.1.3.6.2. Boyun

Baş ile orta kısım arasında kısa ve dar bir oluşumdur (Stewart vd., 2016).

1.1.3.6.3. Kuyruk

Spermatozoonun hareket yeteneğini sağlayan kuyruk kısmı; orta kısım, esas kısım ve son kısım olarak üçe ayrılır (Stewart vd., 2016).

1.1.3.6.3.1. Orta kısım

Mikrotübül ve aksiyel filamentten oluşan bir kamçı yapısına sahiptir. Bu oluşumlar, boyunda fibrillerle birleştirilmiş uzunlamasına hizalanmış dış fibrillerle ve enerji veren mitokondri ile çevrilidir. Orta kısmın plazma zarının halka benzeri kalınlaşması, çekirdeğin ve orta kısmın sınırını belirler (Kim vd., 2017).

1.1.3.6.3.2. Esas kısım

Bu, spermatozoanın en uzun kısmıdır. Aksiyel filament kompleksinin yapısı orta kısmın yapısına benzer ve orta kısmın dış lifleri ile devam eder. Lifler, ana parçanın sonuna doğru giderek inceler (Stewart vd., 2016).

1.1.3.6.3.3. Son kısım

Lifli kılıfın sadece aksiyel filament kompleksini içeren son kısmı, son parçanın başlangıcını belirler. Son parçanın proksimal kısmında, bu kompleks karakteristik olan 9 çift periferik mikrotübülden oluşur, ancak distalde bu çiftler bire düşer ve farklı seviyelerde sona erer (Garcia-Vazquez vd., 2016).

1.1.3.7. Sperma Toplama, Suni Tohumlama ve Embriyo Transferi

Ratların elektroejakülasyonu mümkündür, ancak bu şekilde toplanan sperma ratlarda suni tohumlama için kullanılmaz. Çünkü pıhtılaşma bezlerinin ve vesicula seminalislerin katkıları nedeniyle, sperma bir şekilde koagule olur. Bu nedenle erkek

ratlarda elektroejakulatör yardımıyla sperma alınırken bir antikoagülan içeren sulandırıcı içine alınması koagülasyon olayını ortadan kaldırmaktadır (Otto vd., 2015).

Suni tohumlama veya spermatozoon kriyoprezervasyonu için epididimal sperma en yaygın olarak terminal diseksiyon sırasında toplanır. Cauda epididimisin yakın kısmından (baş) alınan sperma orta (gövde) veya kuyruk (kuyruk) kısımlarına göre daha fazla fertilizasyon yeteneğine sahiptir. Sperma, toplandıktan sonra cerrahi olarak doğrudan östrustaki dişinin uterusuna verilebilir. Suni tohumlamanın başarısını sağlamanın önemli bir adımı, alıcı dişide önceden vazektomi geçirmiş bir erkekle çiftleşme, vajinanın mekanik stimülasyonu veya serviksin elektriksel stimülasyonu yoluyla yalancı gebeliğin indüklenmesidir (Otto vd., 2015).

Embriyo transferi, belirli özelliklerin yalnızca genetik faktörlerle belirlenmesinin aksine uterus ortamından kaynaklanıp etkilenmediğini araştırmak için bir araştırma tekniği olarak da kullanılabilir. Dondurularak saklama teknikleri, elde edilen embriyoların sonraki implantasyondan önce uzun süre saklanmasına izin verir. Ratların hormonal süperovülasyonu genellikle gebe kısarak serum gonadotropini (PMSG) ve ardından farelerde kullanılan benzer bir şekilde insan koryonik gonadotropin (HCG) kullanılarak gerçekleştirilir. Embriyo maniplasyonu için gerekli gelişme aşamasına bağlı olarak, embriyolar dişiler yetiştirildikten 1-5 gün sonra toplanır. Yeniden elde etme yöntemi olarak embriyo transferi kullanıldığında, embriyolar daha sonra Bovine Serum Albümin (BSA) ve Fetal Buzağı Serumu (FCS) ile Phosphate Buffered Saline (PBS) içinde süspanse edilir ve cerrahi olarak yalancı gebe alıcının uterus veya oviduktuna aktarılır. Embriyoların bir otoskop kullanılarak serviksten cerrahi olmayan implantasyonu da rapor edilmiştir. Ancak geniş kullanım alanı bulamamıştır. İn vitro fertilizasyon (IVF), ratlarda yapılır, ancak öncelikle bir koloni yönetim aracı olmaktan ziyade dölleme ve erken gelişimdeki olaylar için bir araştırma aracı olarak kullanılır (Otto vd., 2015).

Dondurarak saklama, şu anda mevcut olan binlerce genetiği değiştirilmiş genotipten canlı fare yetiştirme potansiyelini sürdürmenin etkili bir yöntemi olabilir. Bir suşun genetik olarak kontamine olması durumunda, güvenli bir önlem olarak hizmet edebilir. Ayrıca dondurulmuş embriyolar insan IVF' nu için kültür reaktiflerini ve ortamlarını test etmek için kullanılır. Spermatozoon kriyoprezervasyonu ratlarda da başarılı olmuştur.

Yavrular, çözdürülmüş spermatozoon ile doğrudan intrauterin tohumlama kullanılarak veya dondurulmuş-çözdürülmüş spermatozoon kullanılarak IVF yoluyla elde edilebilir (Otto vd., 2015).

1.2. Glifosat

1.2.1.Pestisitler

Pestisitler, yabancı otların ve böceklerin zararlılarını hafifletmek; onları ortadan kaldırmak için kullanılan sentezlenmiş maddeler ya da biyolojik ajanlardır. Bunlar esas olarak tarımda, büyüme sırasındaki bitkileri yabancı otlardan, böceklerden, mantar ve bakteri hastalıklarından; gıdaları depolama esnasında ratlardan, farelerden ve böceklerden korumak için kullanılır (Lushchak vd., 2018).

Dünya genelinde yaklaşık 2 milyon ton pestisit kullanılmaktadır, bunun %47.5'i herbisit, %29.5'i böcek ilacı, %17.5'i mantar ilacı ve %5.5'i diğer pestisitlerdir. Dünyada pestisit tüketen ilk on ülke Çin, Tayland ,ABD, Fransa, Arjantin, Brezilya, Japonya, İtalya, Hindistan ve Kanada 'dır (Sharma vd., 2019).

Mahsul verimliliğini artırmak için pestisitler uygulanır; ancak zamanla bitki kısımlarında, suda, toprakta, havada birikirler. Pestisitlerin yaygın kullanımı toprağı ve suyu kirletir, ekinlerde kalır ve sonunda besin zincirine girerek insanlar için tehdit oluşturur (Sharma vd., 2019).

Çeşitli tarıma dayalı pestisitlerin ve diğer organik kirleticilerin kalıcı ve her yerde bulunan doğası, biyolojik birikim özellikleri ve yüksek toksisiteleri nedeniyle insanlığı zarar vermiştir. Bu pestisitlerin canlı organizmalarda endokrin ve üreme sistemlerinin normal işleyişini engellediğı bilinmektedir (Lushchak vd., 2018).

Yabancı otlar, tarımsal ürünler ile besin, su, ışık kaynakları ile mücadele ettikleri için ekinlerin verimini azaltır (Quareshy vd., 2018).

Yabancı otlar, tarımsal alanlarda kontrol edilmediğinde ürünlerin tamamının kaybedilmesine neden olabilir. Yabancı ot mücadelesinde birçok metod kullanılmaktadır; bu metodlardan en yaygın kullanılanı kimyasallar maddelerdir (Serim ve Özdemir, 2012).

1.2.2. Herbisitler

Kimyasal maddelerden olan herbisitler; tarım, bahçecilik, çim ve peyzaj yönetimi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Quareshy vd., 2018).

Herbisitlerin kısa sürede uygulanabilir olması ve sonuç vermesi, uzun süre etkili olması gibi özelliklerinden dolayı tarımsal üretim maliyetlerinin azalmasını sağlar (Serim ve Özdemir, 2012).

Ancak herbisitlerin aşırı ve bilinçsiz bir şekilde kullanılmaları insanların, hayvanların ve çevrenin sağlığına zarar vermesi olumsuz bir durumdur. Herbisitlerin direkt ya da dolaylı yolla meydana getirmiş oldukları yan etkilerin başında toksisite bulunmaktadır (Mengüç, 2018).

Herbisitlerin toksisitesinin arılar, kuşlar, balıklar ve diğer organizmalarda ölümlerin görülmesi ve üreme potansiyelinin azalması; ekolojik yapısının zarara uğraması gibi uzun süreli olumsuz etkileri bulunmaktadır. Herbisit toksisitesinin insanlar üzerinde de yan etkileri vardır (Mengüç, 2018).

İnsanlar gıda ve plastikte herbisitlere, endüstriyel kirleticilere ve sentetik kimyasallara maruz kaldıklarında, bu maddelerin endojen üreme hormonu fonksiyonunu olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Bu, çeşitli üreme anomalilerine yol açabilir (Avdatek vd., 2018).

Bazı herbisitlerin toksik etkilerinin kadınlarda sterilite ile ilgili olduğu, insanların immun ve sinir sistemlerini de tahrip ettiği belirlenmiştir. Ayrıca dünyanın en çok kullanılan herbisitleri olan paraquat ve glifosat' ın (GLF) Parkinson hastalığına, GLF' nin ise çocuklarda saman nezlesi ve otizme neden olduğu belirlenmiştir (Mengüç, 2018).

1.2.3. Glifosat

Herbisitler, birçok pestisit türünden sadece biridir. GLF bazlı herbisitler, dünyada kullanılmaya başlanan ilk herbisitlerdir. GLF, tarımsal ve tarım dışı amaçlar için kullanılan arazilerde, istenmeyen bitkileri öldürmek için yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir herbisittir (Avdatek vd., 2018).

Genetiği değiştirilmiş ekinlerin hızla yaygınlaşmasıyla birlikte, GLF kullanım miktarı dđnya çapında artmaktadır (Cai vd., 2017).

GLF, metilfosfonik asidin metil grubunun glisin amino grubu ile formal oksidatif eşleşmesinden kaynaklanan bir fosfonik asittir. GLF, kokusuz beyaz bir tozdur. Suda özünebilirken aseton, etanol ve ksilen gibi yaygın organik çözücülerde pratik olarak özünmez (İnt kay, 2).

GLF, şu anda tüm herbisitler içerisinde en yüksek üretim hacmine sahip bir kimyasaldır. Tarım, ormancılık, kentsel ve ev uygulamaları için 750' den fazla farklı üründe kullanılmaktadır (Guyton vd., 2015).

GLF ilk olarak 1950' de bir İsviçreli kimyager Henri Martin tarafından bir metal bağlama maddesi olarak sentezlendi. Başlangıçta herbisit kullanımını için test edilmedi veya patenti alınmadı (Richmond, 2018; Duke ve Powles, 2008).

GLF ilk pazarlandığında, herbisitlerde "ığır açan bir buluş" olarak müjdelendi. Elektrik hatları ve tren rayları etrafındaki istenmeyen bitkilerin ortadan kaldırılması dâhil olmak üzere yabancı ot kontrolü, meyve bahçelerinde, meyve üretiminde yabancı otların ortadan kaldırılması ve mahsul hasadının ardından tarlalarda istenmeyen bitki büyümesinin ortadan kaldırılması için kullanıldı. Bununla birlikte, 1990' larda genetiği değiştirilmiş ticari mahsullerin piyasaya sürülmesi herbisit kullanım hacminin çarpıcı bir şekilde artışına neden olmuştur. Bugün, GLF kullanımını küreseldir (Richmond, 2018).

GLF fizyolojik pH seviyelerinde anyoniktir. Çeşitli katyonlarla birlikte (örneğin sodyum veya izopropilamin tuzları) bir tuz olarak aktif hale gelmektedir (Duke ve Powles, 2008).

Günümüzde herbisitler, ekinlerde yabancı otların zaptedilmesinde olumlu etkileri olduğu için modern tarımda vazgeçilmez bir rol oynamaktadır. Bu kimyasallar arasında, GLF güçlü etkinlik sergilemektedir. GLF, sap ve yaprak tarafından emilir ve daha sonra enolpiruvilshikimat-3-fosfat sentazı (EPSPS) bloke ederek tüm vücuda taşınır ve meyve bahçelerindeki yıllık, iki yıllık ve çok yıllık bitkiler, geniş yapraklı, yabancı otlar ve odunsu çalılar gibi birçok bitkiyi öldürür. Bir herbisit kimyasalı olarak GLF, bitkilere yönelik hedef özgülüğu, 6-7 gün içinde tamamen bozunması, insan ve hayvanlar,

kuşlar ve sucul canlılar gibi bitki dışı yaşam formları için düşük toksisite de dahil olmak üzere diğerler herbisitlere kıyasla baskın değerlere sahiptir (Dai vd., 2016).

GLF' nin birincil etki şekli, bitkilerde ve bazı bakterilerde korizatin biyosentezinden sorumlu fenilalanin, tirozin ve triptofan esansiyel aromatik amino asidin biyosentezindeki bir ara madde olan şikimat yolunun 5 enolpiruvilşikimat 3 fosfat sentaz enzimini bloke etmektir (Owagboriayea vd., 2017).

Bununla birlikte, GLF' nin memelilerde hedef dışı etkileri olabileceğine ve potansiyel olarak istenmeyen sağlık sonuçlarına neden olabileceğine dair endişeler vardır (Johansson vd., 2018).

Bu ticari formülasyonlar, aktif bileşenlerden ayrı olarak, uygulanmasını kolaylaştıran, hedef organizmaya penetrasyonu ve toksik etkiyi artıran formülasyona bağlı olarak çeşitli spesifik adjuvanlar da içerir (Abarikwu vd., 2014).

Başlangıçta, ticari veya diğer kullanımları hakkında çok az endişe dile getirildi. Bununla birlikte, GLF' nin daha yaygın olarak kullanılmaya başlaması ile ekosistem, su yolları, hayvanlar ve nihayetinde insanların sağlığı ile ilgili endişeler bulunmaktadır (Richmond, 2018).

1.2.3.1. Glifosatın Etkileri

Geçtiğimiz on yıllar boyunca, herbisitlerin yoğun kullanımından kaynaklanan çevre kirliliği dikkate değer bir sorundur (Sinhorin vd., 2014). Herbisitler, su ve toprak yoluyla hayvanlarda birikir ve pestisit dozları belirli konsantrasyonlara ulaşan hayvanları yiyerek sağlığımızı etkiler (Acquavella vd., 2004). Son yıllarda, GLF ve ticari formülasyonlarının neden olduğu üreme toksisitesine giderek daha fazla ilgi gösterildi. GLF, insan plasental hücrelerinde ve insan embriyonik hücrelerinde düşük bir konsantrasyonda androjenin östrojene dönüşüm sürecini içeren aromataz enzimini bozduğu kanıtlandı (Benachour ve Séralini, 2007; Richard vd., 2005).

GLF birçok alanda uygulanmakta olup toprakta ve yakınındaki ekosistemlerde ciddi kirliliğe neden olmaktadır. Dolayısıyla insan sağlığına zararını artırmaktadır. GLF' ye maruz kalma, hem insanlarda hem de kemirgenlerde endokrin bozucu etkiye sahip olabilir ve erkeklerin üreme sistemini etkileyebilir. Özellikle ratlarda, GLF,

spermatozoon üretimi ve hatta fetal gelişim dâhil olmak üzere spermatozoon özelliklerini değiştirebilir. GLF' nin hücrel antioksidan durumunu önemli ölçüde değiştirdiği, bunun da glutasyon tükenmesine, enzimatik bozukluklara ve keratinositlerde lipid peroksidasyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir (Cai vd., 2017; Abarikwu vd., 2014).

Püskürtme sırasında havada, suda ve yiyeceklerde GLF tespit edildi. Çiftliklerde ve tarım dışı hanelerde yaşayan ailelerin idrarında pestisit kalıntılarının ve metabolitlerinin varlığı rapor edilmiştir (Mesnage vd., 2012).

Erkek farelerde, GLF, nadir görülen bir tümör olan renal tübül karsinomu insidansında pozitif bir eğilim olduğu bildirildi (Guyton vd., 2015).

GLF, insan ve hayvan hücrelerinde in vitro DNA ve kromozomal hasara, kemirgenlerde in vitro oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir (Bolognesi vd., 2009).

Yetişkin ratlarda iki yıllık bir süre boyunca GLF bazlı herbisitlerin maruziyetinin sonucunda dişilerde erken ölüm ve meme tümörleri oranları artmıştır. Erkeklerde karaciğer tıkanıklıklarında ve böbrek nefropatilerinde artış meydana gelmiştir. Pestisitlere maruz kalmanın, erkek ratlardaki germ hücrelerinde pestisit aracılı değişikliklerden kaynaklanan doğum kusurlarına neden olduğu giderek daha fazla kabul edilmektedir (Séralini vd., 2013; Ngo vd., 2009).

GLF' nin üreme fonksiyonunu bozması, ratların testis ve epididimisinde antioksidan savunma sisteminin tükenmesine neden olması muhtemeldir, bu da oksidatif stresin indüklendiğini gösterir (Ikpeme vd., 2012).

Testis hücrelerinin değişmesinin spermatogenezisi kötüleştirdiği belirtilmiştir. Bu nedenle, spermatozoon sayısındaki azalma, spermatozoonun üretiminin altında yatan bu hücrel mekanizmadaki değişikliklerle bağlantılı olabilir. GLF ya da adjuvanının, spermatid oluşum aşaması yerine spermatogonyal aşama sırasında etki etmiş olması çok olasıdır. Ek olarak, GLF veya adjuvanının kan-testis bariyerinden geçmesi de spermatozoon motilitesinin azalmasına yol açmış olabilir. GLF' nin spermatozoonun baş kısmındaki olumsuz etkisi, epididimise doğrudan sitotoksik etkisine bağlı olabilir (Ikpeme vd., 2012).

Spermatozoon başı anormalliklerinin ortaya çıkması, Spermatozoon başında genetik materyalin paketlenmesi sırasında meydana gelen kromozomal anormalliklere veya testis DNA' sında bir nokta mutasyonunun meydana gelmesine bağlanmıştır. Bu nedenle, spermatogenezis sırasında ratların testislerindeki genetik materyal ile GLF etkileşimleri, anormal spermatozoon oranında artışına yol açabilmektedir. Anormal spermatozoon oranı ile analiz edilen oksidatif stres endeksleri arasındaki pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Oksidatif stresin kan ve testislerdeki antioksidan seviyesini azaltarak spermatogenezisin bozulmasına neden olduğu ve erkeklerde steriliteye yol açtığı kanıtlanmıştır (Owagboriyea vd., 2017).

Erkeklerde hiperprolaktineminin tipik olarak libido azalmasına, erektil disfonksiyona ve anormal sperma kalitesine yol açan hipogonadizmle sonuçlandığı gösterilmiştir. Benzer bir eğilimde, spermatogonia, seminifer epitel ve prolaktin reseptörlerinde de gösterilmiştir. Ayrıca GLF' ye maruz kalan ratlar arasında gözlemlenen düşük spermatozoon yoğunluğu ve motilitesi, serum prolaktinlerindeki artışa da bağlanabilir (Owagboriyea vd., 2017).

Tiroid bezini olumsuz etkileyen herhangi bir eylemin, spermatogenezisi ve leydig hücrelerinin gelişimini engellediğinden, spermatozoon motilitesinde ve fertilitesinde bozulmaya yol açabileceği belirtilmiştir (Ikpeme vd., 2012).

1.3. Proantosiyanidin

1.3.1. Polifenoller

Bitkiler aleminde geniş çapta Polifenol bileşikleri bulunur. Dolayısıyla Polifenoller bitki kökenli gıdaların bileşenleri arasındadır (Choy ve Waterhouse, 2014). Bu bileşikler, bitkilerin ikincil metabolitleridir (Manach vd., 2004). Polifenoller, antioksidan özelliklerinden dolayı son zamanlarda yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar ve ilgili meta-analizler, bitki polifenollerini açısından zengin diyetlerin uzun süreli tüketiminin kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, osteoporoz ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimine karşı koruma sağladığını güçlü bir şekilde göstermektedir (Pandey ve Rizvi, 2009). Ayrıca ultraviyole ışınlarına ve patojenlerin saldırılarına karşı Polifenoller vücut savunmasında da yer alır (Manach vd., 2004).

Polifenoller, çoğunlukla meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda ve içeceklerde bulunan bileşiklerdir. Özellikle Üzüm, elma, armut, kiraz ve çilek gibi meyvelerde bulunmaktadır. Gıdalardaki polifenoller acılık, burukluk, renk, tat, koku ve oksidatif stabiliteye katkıda bulunabilir (Pandey ve Rizvi, 2009).

Gıdalardaki polifenol konsantrasyonları, gıdaların polifenol içeriğini optimize etmek için kontrol edilebilen çok sayıda genetik, çevresel ve teknolojik faktöre göre değişir. Polifenollerin sağlık üzerindeki etkileri, hem alımlarına hem de büyük ölçüde değişebilen biyoyararlanımlarına bağlıdır (Manach vd., 2004).

Polifenoller, bitki bazlı gıdalardaki biyolojik olarak aktif bileşikler grubudur (Abbas vd., 2017) ve çeşitli bitki türlerinde 8000' den fazla polifenolik bileşik tanımlanmıştır. Tüm bitki fenolik bileşikleri, ortak bir ara madde olan fenilalanin veya şikimik asitten kaynaklanır. Polifenoller içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elementlere göre farklı gruplara ayrılabilirler (Pandey ve Rizvi, 2009): Bu gruplar flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve lignanlardır (Choy ve Waterhouse, 2014). Flavonoidler, insan sağlığına önemli faydaları olan bir polifenolik bileşik sınıfıdır (Rauf vd., 2019). Flavonoidler de özellikle merkezi karbonun oksidasyon durumuna göre 6 alt sınıfa ayrılır (Abbas vd., 2017): Bunlar; flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler ve flavanoller (kateşinler ve proantosiyanidinler) olarak adlandırılır (Choy ve Waterhouse, 2014).

1.3.2. Flavonoidler

Flavonoidler önemli bir doğal ürün sınıfıdır (Panche vd., 2016). 4000'den fazla bileşik ile, bitkisel gıdalarda en çok bulunan polifenollerdir (Diane vd., 2013). Flavonoidler, en önemli nitrojen olmayan bitki pigmentlerinden biridir. Sürgünlerde, yapraklarda, tomurcuklarda ve meyvelerde sarı veya kırmızı/mavi pigmentasyon üreterek çiçek renklenmesinden sorumludur (Karak, 2019). Flavonoidler, birincil metabolitlerin aksine bitkinin hayatta kalması için gerekli olmayan düşük moleküler ağırlıklı ikincil metabolitlerdir (Cotelle, 2001). Fitokimyasallardan olan flavonoidler, insanlar ve hayvanlar tarafından sentezlenemezler (Karak, 2019). Flavonoidlerin, insan ve hayvan sağlığı üzerinde önemli etkilere sahip olması ve bitkiler âleminde yoğun olarak

bulunmaları nedeniyle büyük ilgi uyandırmıştır. Sağlığın korunması ve kronik dejeneratif hastalıkların önlenmesindeki potansiyel rolleri nedeniyle literatürde "fonksiyonel bileşenler" ve "sağlığı teşvik eden biyomoleküller" olarak adlandırılmaktadırlar (Karak, 2019).

Flavonoidler bitkilerde aromatik amino asitler olan fenilalanin, tirozin ve malonattan oluşur. Flavonoidler genellikle bitkilerde glikozillenmiş türevler olarak bulunur. Yapraklarda, çiçeklerde ve meyvelerde mavi, kırmızı ve turuncunun parlak tonlarına katkıda bulunurlar. Çeşitli sebze ve meyvelerin yanı sıra tohumlarda, kabuklu yemişlerde, tahıllarda, baharatlarda ve çayda bulunur (Pietta, 1999).

Flavonoidlerin kimyasal çeşitliliği, boyutu, üç boyutlu şekli, fiziksel ve biyokimyasal özellikleri; bitkilerde ve hayvanlarda biyolojik aktiviteyi etkilemek için farklı hücre altı konumlarındaki hedeflerle etkileşime girmelerine izin verir (Buer vd., 2010).

Flavonoidler, çeşitli nutrasötik, farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda vazgeçilmez bir bileşendir. Bunun nedeni, temel hücrel enzim fonksiyonlarını modüle etme kapasiteleri ile birlikte antioksidan, antiinflamatuvar, antimutajenik ve antikanserojen özellikte olmasıdır (Panche vd., 2016). Flavonoidler, ayrıca antioksidan ve serbest radikal süpürücü yetenekleriyle ilişkili olabilen çeşitli biyolojik özelliklere de (hepatik koruyucu, antitrombotik ve antiviral aktiviteler dahil) sahiptir (Saija, 1995). Flavonoidler antioksidan ve anti-inflamatuvar aktiviteye ek olarak cilt koruması, beyin fonksiyonu, kan şekeri ve kan basıncının düzenlenmesi ile ilişkilidirler (Karak, 2019). Flavonoidlerin kardiyovasküler hastalık ve nörodejeneratif bozukluklar dahil olmak üzere çok sayıda hastalık durumunda faydalı etkiler gösterdiği öne sürülmüştür (Williams, 2004). Ayrıca aldoz redüktaz, ksantin oksidaz, siklo-oksijenaz, lipoksijenaz ve fosfoinositid 3-kinaz gibi çeşitli enzimler için güçlü inhibitörler oldukları bilinmektedir (Karak, 2019).

Flavonoidler, antialerjenik, antiviral, antiinflamatuvar ve vazodilatör etkiler dahil olmak üzere biyolojik aktiviteler sergilemektedir. Bununla birlikte, en çok ilgi, serbest radikal oluşumunu azaltma ve serbest radikalleri temizleme yeteneklerinden dolayı flavonoidlerin antioksidan aktivitesine ayrılmıştır (Panche vd., 2016).

Vücut hücreleri ve dokuları, normal oksijen metabolizması sırasında üretilen veya ekzojen hasarın neden olduğu serbest radikallerin neden olduğu hasar tarafından sürekli tehdit altındadır (Panche vd., 2016).

Yaygın olarak serbest radikaller olarak adlandırılan reaktif oksijen türleri (ROS), biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hücre ve doku hasarına yol açar. ROS' un ateroskleroz, Parkinson, Alzheimer, kalp ve beyin hasarı gibi çok çeşitli dejeneratif süreçlere ve hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir (Cotelle, 2001).

ROS' un önemli olaylardan biri, hücresel membran hasarı ile sonuçlanan lipid peroksidasyonudur. Bu hücresel hasar, hücrenin net yükünde bir kaymaya neden olarak ozmotik basıncı değiştirerek şişmeye ve sonunda hücre ölümüne yol açar. Lipid peroksidasyonunun yaşlanma ile birlikte ateroskleroz, diyabet, hepatotoksisite ve inflamasyon gibi çeşitli hastalıklardan sorumlu olduğu belirlenmiştir (Panche vd., 2016).

Flavonoidler, ROS' un neden olduğu hasarı çeşitli şekillerde önleyebilir. ROS ile reaksiyona girerek onları stabilize eder. Hidroksil grubunun yüksek reaktivitesi nedeniyle radikaller etkisiz hale getirilir (Panche vd., 2016).

Flavonoidlerin antioksidan özellikleri üzerine yapılan çalışmalarda, oksidatif stresleri önlemek için potansiyel ilaçlar olarak kullanılabileceğini vurgulanmıştır. Antioksidanlar, hücreleri ROS' un oksidatif etkisine karşı koruyan bileşiklerdir ve ROS ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres, diyabet, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve yaşlanma gibi çeşitli sağlık rahatsızlıklarıyla ilişkili hücresel hasara yol açabilir. Oksidatif stres ayrıca DNA ve protein gibi moleküllere zarar verebilir. Antioksidanlar, radikal üreten sistemlere müdahale eder ve endojen antioksidanların işlevini artırarak hücreleri ROS' un zararlarından korur (Panche vd., 2016).

Flavonoidler ayrıca antimikrobiyal aktiviteleriyle tanınırlar ve birçok araştırmacı antifungal, antiviral ve antibakteriyel aktivite özelliklerine sahip flavonoidlerin yapılarını izole etmiş ve tanımlamıştır. Bu özelliğinden dolayı birçok flavonoid günümüzde beslenme, gıda güvenliği ve sağlık alanlarında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Panche vd., 2016).

1.3.3. Proantosiyanidin

Flavonoidlerin en karmaşık alt sınıflarından biri olarak kabul edilen proantosiyanidinler (PA), monomerik (-)epikateşin veya (+)kateşinin yüksek oranda polimerize edilmiş oligomerlerinden oluşur (Choy ve Waterhouse, 2014).

Meyvelerde (üzüm, hurma, elma, şeftali, armut, çilek, kıvılcık, yaban mersini ve siyah ahududu), sebzelerde (bezelye), sert kabuklu yemişlerde (findık, badem), tohumlarda (üzüm çekirdeği, *Antidesma thwaitesianum* tohumu), çiçeklerde (longan çiçeği), ağaç kabuğunda (çam ağacı), yumrulara (soğan), yapraklarda (yeşil çay, maydanoz), kakao, çay ve şarap gibi çeşitli yiyecek ve içeceklerde bulunabilir (Choy ve Waterhouse, 2014; Joshi vd., 2001; Fine, 2000; Iglesia vd., 2010).

Üzüm çekirdeği ekstraktı olan PA'lar C vitamini, E vitamini, C ve E vitamini kombinasyonu, β -karoten, gallik asit ve resveratrol'den daha iyi bir serbest radikal temizleyicisi ve oksidatif doku hasarı inhibitörü olduğunu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Zhao vd., 2014; Su vd., 2011; He vd., 2018; Fine, 2000; Ou ve Gu, 2014). Üzüm çekirdeği ekstraktının biyoaktif bileşenlerinin araştırılması ilk olarak 20. yy 'da başlamıştır. Üzüm çekirdeklerinden elde edilen PA'ların, çam kabuğundan elde edilenlere göre hem konsantrasyon hem de antioksidan etki bakımından daha üstün olduğunu gözlemlemiştir (Unusan, 2020; Blade vd., 2016).

1.3.3. Proantosiyanidin Etkileri

PA'ların biyolojik, farmakolojik ve tıbbi özellikleri kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir. Serbest radikal temizleyici ve antioksidan aktivitelerine ek olarak antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antialerjik, antikarsinogenik, antidiyabetik, antinörodejeneratif, antiosteoartrit, kardiyoprotektif, hepatoprotektif ve vazodilatör etkiler dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik etkiler sergilemektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonunu, trombosit agregasyonunu, kılcal damar geçirgenliği ve kırılabilirliği inhibe etmektedir ve fosfolipaz A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz ve ksantin oksidaz gibi enzim sistemlerinin aktivitesini düzenlemektedir (Bashir, 2019; Joshi vd., 2001; Fine, 2000; Unusan, 2020; Bagchi vd., 2000)

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin sistemik tezahürü ile biyolojik bir sistemin reaktif ara maddelerini kolayca detoksifiye etme ve ortaya çıkan hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizliği yansıtır (Li vd., 2015). Erkek infertilitesinin nedenlerinden biri olan oksidatif stres, lipid peroksidasyonuna, DNA, protein ve iskemik (oksijen eksikliği) hasarına neden olabilir (Al-Daraji, 2012). Oksidatif stresin doğrudan araçları olarak ROS' lar son derece önemlidir. Oksijen iyonları, serbest radikaller ve peroksitlerden oluşan ROS, spermatozoa DNA'sına doğrudan zarar vererek veya spermatozoanın plazma membran bütünlüğünü bozarak infertiliteye neden olarak motilite ve penetrasyon kabiliyetinin azalmasına neden olmaktadır. Oksidatif strese karşı bir güç olarak, antioksidanlar seminal plazmada bulunarak ROS'un birçok olumsuz etkisini ortadan kaldırır (Soleimani ve Masoumi, 2017).

Antioksidanlar, vücutta bulunan ROS'u temizleyen bileşiklerdir. ROS, hücre zarı lipidlerini oksitleyerek ve vücudun genetik materyalleri olan DNA'ya zarar vererek dokuyu yok eden oldukça reaktif moleküllerdir. Nötralize edilmezlerse birçok patolojik duruma yol açan oksidatif strese neden olabilir. Antioksidanlar, ROS'un dokuya önemli zarar vermeden önce nötralize ederek çalışır (Joshi vd., 2001).

Yapılan birçok çalışma ile PA' nın antioksidan özelliğinden dolayı çeşitli erkek üreme bozukluklarında potansiyel bir koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Bayatli vd., 2013; El-Beltagi vd., 2017; Abdel-Kawi vd., 2016; Long vd., 2017; Attia vd., 2010).

Yapılan bu çalışmanın amacı; GLF maruziyetine bırakılan erkek ratlarda spermatolojik ve oksidatif stres parametreleri, DNA' da meydana gelebilecek değişimler, serum testosteron seviyesine etkisi ve testis dokusundaki toksisite göstergesi olan histolojik değişimler üzerine güçlü bir antioksidan olan PA' nın etkinliğini ortaya koymaktır.

2. MATERYAL ve METOT

2. 1. Deney Hayvanları

Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu' nun 26.01.2021 Tarihli ve 49533702/06 sayı no'lu izni ile yapıldı. Çalışmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ünitesinden temin edilen 24 adet, 2,5-3 aylık erkek Wistar-Albino cinsi (160-180 g) rat kullanıldı. Çalışmanın deneysel bölümü yine bu merkezde yapıldı. Ratlar için standart şartlarda ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sabit sıcaklık, % 60-65 düzeyinde nem ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) ve her gün altları temizlenen kafeslerde standart rat yemi ve su ile ad libitum olarak beslendi. Tüm hayvanlar çalışma başlangıcında ve ötenazi edilmeden önce tartılarak ağırlıkları kayıt altına alındı. Uygulamalar her gün 13:00 -14:00 saatleri arasında yapıldı. Çalışmanın deneysel bölümü 56 gün sürdü. Spermatolojik parametreler Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı laboratuvarında, patolojik değerlendirmeler Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, oksidatif stres parametreleri Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Çalışmamız, AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 21.SAĞ.BİL.01 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

2. 2. Grupların Oluşturulması

Deney hayvanları her kafeste 6 hayvan olacak şekilde Kontrol, Proantosiyanidin (PA), Proantosiyanidin+Glifosat (PA+GLF) ve Glifosat (GLF) olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

1. Kontrol Grubu (n=6) : Bu gruptaki ratlar 56 gün boyunca her gün standart rat yemi ve su ile beslendi.

2. Proantosiyanidin (PA) Grubu (n=6) : Bu gruptaki ratlara 56 gün boyunca her gün aynı saatte 400 mg/kg dozunda PA, DMSO ile çözündürülerek gastrik gavaj yoluyla verildi.

3. Proantosiyanidin+Glifosat (PA+GLF) Grubu (n=6) : Bu gruptaki ratlara 56 gün boyunca her gün aynı saatte önce 400 mg/kg dozunda Proantosiyanidin, daha sonra LD_{50/10} dozu olan 787,85 mg/kg dozunda GLF, DMSO ile karıştırılarak gastrik gavaj yoluyla verildi.

4. Glifosat (GLF) Grubu (n=6) : Bu gruptaki ratlara 56 gün boyunca her gün aynı saatte LD_{50/10} dozu olan 787,85 mg/kg dozunda GLF, DMSO karıştırılarak gastrik gavaj yoluyla verildi.

2. 3. Kan ve Doku Örneklerin Alınması

2.3.1. Kan Örneklerinin Alınması

Deney aşamasındaki son uygulamadan 24 saat sonra tüm hayvanlar tarılıp ağırlıkları not edildikten sonra inhalasyon anestezisi altında kalpten alınan kanlar jelli biyokimya tüplerine konularak 3500 devirde 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen serumlar ependorflara alınarak biyokimyasal analizler yapılana kadar -20 °C' de saklandı.

2.3.2. Doku Örneklerinin Alınması

Kan örnekleri alındıktan sonra ötenazi işlemi sonrasında ratların testis ve epididimisleri çıkarıldı. Epididimislerden elde edilen sperma örnekleri ile frotiler hazırlandı ve spermatolojik parametrelere bakılmak üzere laboratuvara götürüldü. Sağ testis ve epididimis patolojik değerlendirilmeler yapılmak üzere patoloji laboratuvarına teslim edildi.

2.4. Doku Homojenizasyonu

İlk önce homojenizasyonun yapılabileceği bir kap ayarlandı. Sonra 0,5 g doku tartılıp kaba konuldu ve üstüne 5 mL 50 mM potasyum dihidrojen fosfat eklendi. Doku bu çözelti içerisindeyken homojenize edildi. Doku tamamen parçalandıktan sonra kap içindeki sıvı santrifüje uygun bir tüpe aktarıldı ve 3500 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınıp temiz bir tüpe aktarıldı ve analiz zamanına kadar -20 °C' de saklandı. Örneğimiz analiz yapılacak günden bir gün önce +4'e bırakılıp dinlenmesi ve çözülmesi için beklenildi (Ohkawa vd., 1979).

2.5. Biyokimyasal Analizler

2.5.1. Serum Testosteron Seviyelerinin Belirlenmesi

Ependorflara alınarak -20 °C saklanan kan serum testosteron örneklerinin oda sıcaklığına gelmesi için bir süre beklendi. Analizler için Çin menşeli, E0259Ra katalog numaralı, BT LAB Bioassay Technology Laboratory marka elisa kitleri kullanıldı. Bu kit, Rat Testosteron düzeyini tahlil etmek üzere, biyotin, çift antikor sandviç teknolojisine dayalı enzim immunoassay (EIA) yöntemiyle çalışmaktadır. Mikroplaka yıkayıcı olarak USA menşeli BIO-TEK marka, EL x 50 model yıkayıcı kullanıldı. Okumalar ise USA menşeli BIO-TEK marka ELx800 model mikroplaka okuyucuda yapıldı. Tüm parametreler 450 nm dalgaboyunda okutulmuş ve cihazdan alınan absorbans değerleri kalibrasyon grafiğinde yerine koyularak örneklerin sonuçları elde edildi.

2.5.2. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini

Testis doku homojenizasyon işlemini tamamlandı. Standart maddemiz olan tetraetoksipropan'dan 0,5 mL alınıp 100 mL etanol ile karıştırıldı. Bu çözeltiden 0,1 mL alınıp 100 mL distile su eklenerek standart solüsyonumuz hazırlandı. Hazırlanan homojenizat örnekten ve standarttan 0,2 mL alınıp 10 mL' lik cam tüplere eklendi. Üzerine sırasıyla 0,2 mL %8'lik sodyum dodesil sülfat, 1,5 mL %20'lik glasiyel asetik

asit, 1,5 mL % 0,8 tiyobarbitürük asit, 0,6 mL distile su eklendi. Karışım tüp sporu çalkalama yöntemi ile iyice karıştırıldı. Daha sonra karışım aliminyum folyo ile sarılıp 95 °C'lik su banyosunda bir saat kaynatıldı. Kaynatıldıktan sonra örnekler ve standartlar su banyosundan çıkarılıp +4 °C' ye soğutuldu. Soğutma işleminden sonra üzerlerine 1 mL distile su eklendi. Daha sonra 5 mL N-butanol+piridin karışımı eklendi ve karışım tüp sporu çalkalama yöntemi ile iyice karıştırıldı. Tüm örnekler 3500 devirde 10 dk santrifüj edildi. Pembe/mor renkli kısım 532 nm'de absorbansı okundu. En son standart ile karşılaştırıp değerlendirmesi yapıldı. Spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirmek için Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometresi (Tokyo, Japonya) kullanıldı (Ohkawa vd., 1979).

2.5.3. Glutatyon (GSH) Aktivite Tayini

Dokuda GSH tayini yapabilmek için öncelikle gerekli kimyasallar hazırlandı. Çöktürücü, 5 g metafosforik asit, 1 g EDTA ve 90 g NaCL 300 mL distile suda çözdürülerek hazırlandı. Fosfat tamponu 0,3 Molar Na₂HPO₄, 40,02 g Na₂HPO₄.7H₂O 500 mL distile suda çözdürülerek hazırlandı. 5,5'- (2-ditiobisnitrobenzoik asit) (DTNB) ise 40 mg DTNB 100 mL' lik %1 sodyum sitrat çözeltisiyle çözdürülerek hazırlandı. GSH standartı ise 10 mg GSH, 25 ml distile suda çözdürülerek hazırlandı. Testis doku homojenizasyon işleminin tamamlanmasından sonra analizin yapımına geçildi. Hazırlanan homojenizat örnekten 0,2 mL alındı. Üzerine 3 mL çöktürücü eklendi. İyice karıştırılıp biraz beklendi. Daha sonra 3500 devirde 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant başka bir tüpe alındı. Üzerine 8 mL fosfat tamponu, 0,5 mL DTNB ayırıcı eklendi. İyice karıştırıldı. Standart tüpte doku homojenizatu yerine 0,2 mL GSH standartı kullanıldı. KÖR tüpüne 0,2 mL distile su ve 3 mL çöktürücü eklendi. Süzgeçten geçirilerek filtre edildi. Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometresi' nde (Tokyo, Japonya) 412 nm' de okuması yapılarak değerlendirildi (Beutler ve Kelly, 1963).

2.6. Spermatolojik Muayeneler

2.6.1. Spermatozoon Motilitesi

Testisler çıkarıldıktan sonra, yapışık yağ, bağ dokusu ve kan damarları çıkarıldı. Her bir hayvanın testislerini, kanın dışarı çıkmasını sağlamak için izotonik tuzlu su çözeltisi içeren içi boş bir kaba aktarıldı. Sol kauda epididimis bir pens ile sıkıştırılırken ince uçlu makas kullanılarak uzunlamasına kesildi. Spermatozoon, fosfat tamponlu salin (PBS) içeren Petri kaplarında kauda epididimis küçük parçalar halinde kesilerek Sperma alındı. Motilitenin belirlenmesi için 37°C' ye ayarlanan ısıtma tablasına bir lam konuldu. Lam üzerine 10 mikrolitre (μ l) büyüklüğünde sperma koyuldu ve üzerine lamel kapatıldı. Faz-kontrast mikroskop kullanılarak 100x' de görüntü bulunup 400x' de değerlendirildi. Mikroskop altında üç farklı alanda herhangi bir yöne doğrusal hareket eden spermatozoonlar sayılarak motilite belirlendi ve yüzde olarak ifade edildi (Avdatek vd., 2018).

2.6.2. Anormal Spermatozoon Oranı

Sperma numunesindeki anormal spermatozoon oranı Giemsa boya ile boyanıp değerlendirilmesi yapıldı. Lam üzerine bir damla sperma örneğinden damlatıldı. 45 derecelik açıyla başka bir lamla periferik yayma işlemi yapıldı. Yatay olarak kurumaya bırakıldı. Ardından alkolle fikze edilip kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra boyama işlemine geçildi. Giemsa boyası pipetle lamın üzerini kapatacak şekilde damlatıldı. Kırk beş dakika beklenildi. Bekleme süresi sonunda lam numunenin bulunduğu tarafın tersinden suya tutuldu. Yıkanan lam dik bir şekilde kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra faz-kontrast mikroskopta 400x' de 400 spermatozoon sayılarak anormal spermatozoon oranı % olarak belirlendi. Normal spermatozoon yapısı dışındaki yapılar anormal olarak kabul edildi ve spermatozoon'un baş, orta kısım, kuyruk ve toplam anomalileri ayrı ayrı değerlendirilip kaydedildi (Watson, 1975).

2.6.3. HE Test

Ölü-canlı spermatozoon oranı ve hipo-ozmotik şişme testinin birlikte uygulandığı sperma örneklerinde Hipo-ozmotik Eozin boya testi adı verilen HE testi kullanıldı. 37°C'deki su banyosunda bulunan 100 mOsm HOST solüsyonundan 1 ml, sperma örneğinden de 10 µl eppendorf tüplerine alındı. Daha sonra eozin boyası eklendi ve karışım 37°C'lik su banyosunda 30 dakika İnkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu karışımdan bir damla alınarak frotiler çekildi ve çok kısa süre içerisinde kurutuldu. Hazırlanan örnekler mikroskopta 400x' de 400 spermatozoon, baş kısmının tamamının veya bir kısmının boya alıp almamasına ve kuyrukta şişme olup olmamasına göre dört tipe ayrıldı. Bunlar:

Tip 1. Kuyruk şişmiş, baş boya almamış. (H+/E-)

Tip 2. Kuyruk şişmemiş, baş boya almamış. (H-/E-)

Tip 3. Kuyruk şişmiş, baş boya almış. (H+/E+)

Tip 4. Kuyruk şişmemiş, baş boya almış. (H-/E+)

HOS Test Solüsyonunun hazırlanışı:

0,9 g Fruktoz

0,49 g Sodyum sitrat, 100 ml distile suya tamamlanarak (100 mOsm/kg) hazırlandı.

Eosin boyasının hazırlanışı:

1,67 g Eosin-Y

2,9 g Sodyum sitrat, 100 ml distile suya tamamlanarak hazırlandı (Gündoğan vd., 2010).

2.7. DNA Hasarı

Spermatozoondaki DNA hasarını belirlemek için comet assay yöntemi kullanıldı. Comet assay yönteminin bir başka adlandırılması ise Single Cell Gel Electrophoresis yöntemidir. Bu yöntemle, tek tek spermatozoonların çift iplikli DNA hasarını değerlendirmesi sağlanmaktadır. Bu yöntemin, alkali pH'da farklı elektrik yüküne ve

molekül ağırlıklarına sahip olan DNA moleküllerinin elektriksel alandaki hareketine bağlı çalışma prensibi vardır (Ostling ve Johanson, 1984; Singh vd., 2003).

2.7.1. Spermanın Yıkanması

Taze olarak alınan sperma örnekleri hemen eppendorf tüplere alınıp havayla teması önlenerek karanlık ortamda ve soğuk zincirde korundu. Sperma örnekleri Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS ile 1:1 oranında sulandırılıp santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant spermadan uzaklaştırıldı. Sperma tekrar sulandırıldı ve çalışmanın bir sonraki aşamasına hazır hale getirildi (Gündoğan vd., 2010).

2.7.2. Slaytların Hazırlanması ve Spermatozoonların Agoroza Gömülmesi

Slaytlar % 0.75'lik düşük kaynama dereceli agaroz jel (low melting agar, LMA) PBS içerisinde hazırlandı. Tamamı traşlanmış lamaların üzerine LMA'dan 120 µl alınarak üzerine damlatıldı. Daha sonra lam üzerine damlatılan LMA froti şeklinde yayılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Böylece birinci tabakanın oluşturulması sağlandı. Seyreltilmiş olan spermadan 5 µl, 85 µl % 1 oranında LMA jel alınıp 37 °C'de karıştırılarak birinci agaroz kat üzerine tabakalandırıldı. Daha sonra hazırlanmış lamın üzerine 24 x 60 mm lamel ile kapatılarak buz kalıpları üzerinde katılaşması için bekletildi. Katılaşma işleminden sonra lameller dikkatlice çekilerek slaytlar hazırlandı (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

2.7.3. Lizis

Hazırlanan slaytlar yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan içeren taze hazırlanmış soğuk lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, pH 10) +4 °C'de yaklaşık 1 saat süre ile inkübe edildi. Ardından lizis solüsyonuna 40 mM dithioerithrol (DTT) ilave edilerek slaytlar +4 °C'de yine 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 100 µg/ml proteinase K lizis solüsyonu eklenerek slaytlar 37 °C'de iki gece inkübe edildi (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

2.7.4. Elektroforez

Hücrelerin lizisinden sonra DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar Elektroforezde yürütmeden önce taze olarak hazırlanmış ve hafif buzlu elektroforez tamponunda (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH 12.5) 20 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon aşamasından sonra DNA'lar 300 mA ve 20 volt'luk elektriksel alanda 20 dk boyunca elektroforez tamponu içerisinde işleme tabi tutuldu (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

2.7.5. Nötralizasyon

Elektroforez işleminden sonra slaytlardaki alkali elektroforez çözeltisini taze hazırlanmış Tris tamponuyla (40 mM Tris HCl, pH 7.4) yıkayarak nötralizasyon sağlandı (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

2.8.6. Boyama

Nötralizasyon işleminden sonra slaytlar bir floresan boya olan ethidium bromid (5 µg/ml) ile boyandı (Hu vd., 2008).

2.8.7. Slaytların Değerlendirilmesi

Boyama işlemi sonrasında slaytların üzerine lamel kapatılarak floresan ilaveli mikroskopun (Olympus CX-31) 400x' de 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.

Görsel skorlama yöntemi ile değerlendirme gerçekleştirildi. Meydana gelen hasarın derecesine göre DNA görüntüleri 0 ile 4 arasında bir puanlama yapıldı. Hiç hasar meydana gelmeyen DNA'lar 0, hasar meydana gelmiş olan DNA'lar hasarın derecesine göre 1'den 4'e kadar puanlandırıldı. Sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak değerlendirildi (Collins, 2004).

2.8. Testis Histopatolojisi

Tüm hayvanlardan testis dokularının toplanması ve Bouin solüsyonunda fiksasyonu yapıldıktan sonra parafine gömüldü ve 5 µm kalınlığında kesitler halinde kesildi. Boyama için Mayer hematoksileni ve eozin (H&E) kullanıldı. Dokuların değerlendirilmesi, kameralı (Olympus DP20) bir ışık mikroskobu (Olympus Bx51 modeli) kullanılarak yapıldı (Avdatek vd., 2018).

2.9 İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmada elde edilen motilite ve anormal spermatozoon oranları, HE-test parametreleri, DNA hasarları, testosteron düzeyleri ve oksidatif stres parametrelerinin istatistiksel açıdan analizi için SPSS programının 22.0 versiyonu kullanıldı. Elde edilen verilerin normal dağılıma sahip olup olmadığını test etmek amacıyla Shapiro Wilk-W Testi kullanıldı. Gruplar arası farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, farkların önem kontrolü ise post hoc Duncan testi ile yapıldı. İstatistiksel sonuçlardaki farklılıklardan $p<0.05$ (*) ve $p<0.001$ (**) olan değerler önemli olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Spermatojik Parametrelere Ait Bulgular

Çalışmamıza ait gruplar arası spermatozoon motiliteleri ve anormal spermatozoon oranları Çizelge 3.1.'de verildi. Motilite açısından kontrol grubuna göre GLF grubundaki azalma ile beraber PA ve PA+ GLF gruplarında artışın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Baş anomalileri açısından kontrol ve diğer gruplara karşı GLF grubundaki artış, orta, kuysuk kısımlarındaki anomalilerde ve toplam anormal spermatozoon oranlarında kontrol grubuna göre PA ve PA+ GLF gruplarındaki azalma ile beraber GLF grubundaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi. ($p<0,001$).

Gruplar	Motilite %	Baş %	Orta Kısım %	Kuyruk %	Toplam %
Kontrol	70,00±1,82 ^c	7,66±0,33 ^b	16,83±0,98 ^b	41,50±1,11 ^a	66,00±2,12 ^b
PA	84,16±0,83 ^a	6,16±0,47 ^b	8,00±0,81 ^c	24,83±1,01 ^b	39,00±1,18 ^d
PA+ GLF	78,33±1,05 ^b	8,16±0,70 ^b	11,66±1,30 ^c	29,16±1,47 ^b	49,00±2,16 ^c
GLF	62,50±1,11 ^d	13,66±1,76 ^a	20,83±1,92 ^a	43,83±3,04 ^a	78,33±4,22 ^a
Gruplar	** H+/E-	** H-/E-	** H+/E+	** H-/E+	**

Çizelge 3.1: Gruplara ait Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranları ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:6).

a-d: Her bir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir $p < 0,001$ ** PA: Proantosiyanidin, PA+ GLF: Proantosiyanidin+Glifosat, GLF: Glifosat

3.2. HE Test Parametrelerine Ait Bulgular

Araştırmamıza ait HE test bulguları Çizelge 3.2.'de sunuldu. H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre PA+ GLF ve GLF gruplarındaki azalma, H-/E- oranı bakımından PA grubundaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0,001$). Ayrıca H+/E+ bakımından kontrol grubuna göre PA grubundaki azalma ile GLF grubundaki artış istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p < 0,001$).

Çizelge 3.2: Gruplara ait HE-test Parametreleri ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:6).

	%	%	%	%
Kontrol	26,83±1,70 ^a	37,50±2,17 ^{bc}	15,33±2,01 ^b	20,33±2,17 ^{ab}
PA	25,16±0,79 ^{ab}	48,50±2,07 ^a	10,33±1,08 ^c	16,00±0,57 ^b
PA+GLF	23,50±0,22 ^b	43,33±2,31 ^{ab}	14,83±0,87 ^{bc}	18,33±1,58 ^{ab}
GLF	19,50±0,80 ^c	35,33±1,99 ^c	21,16±1,83 ^a	24,00±2,43 ^a
p	**	**	**	*

a-c: Her bir sütündeki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir p<0,05 *, p<0,001 ** H+/E-: Kuyruk şişmiş, baş boya almamış, H-/E-: Kuyruk şişmemiş, baş boya almamış, H+/E+: Kuyruk şişmiş, baş boya almış, H-/E+: Kuyruk şişmemiş, baş boya almış. PA: Proantosiyanidin, PA+ GLF: Proantosiyanidin+Glifosat, GLF: Glifosat

3.3. DNA Hasarına Ait Bulgular

Çalışmamıza ait DNA hasar bulguları Çizelge 3.3.' de değerlendirildi. GLF uygulamasının DNA hasarını artırdığı, GLF uygulamasından önce PA uygulamasının (PA+ GLF) ve sadece PA uygulamasının ise DNA hasarını azaltmasının istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi (p<0,001).

Çizelge 3.3: Gruplara ait DNA Hasarları ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:6).

Gruplar	DNA Hasarı (AU)
Kontrol	59,66±3,85 ^b

PA	28,16±2,52 ^d
PA+ GLF	49,50±3,50 ^c
GLF	87,16±2,62 ^a
p	**

a-d: Her bir sütündeki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir $p<0,001$ ** PA: Proantosiyanidin, PA+G: Proantosiyanidin+Glifosat, G: Glifosat

3.4. Serum Testosteron Bulguları

Çalışma gruplarına ait serum testosteron düzeylerine Çizelge 3.4.'de sunuldu Gruplar arasında serum testosteron değerleri bakımından istatistiksel bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p<0,05$).

Çizelge 3.4: Gruplara ait Testosteron Düzeyleri ($\bar{X} \pm SEM$, n:6).

Gruplar	Testosteron (ng/L)
Kontrol	0,08±0,0042 ^a
PA	0,07±0,0046 ^a

PA+GLF	0,08±0,0041 ^a
GLF	0,07±0,0014 ^a
p	-

PA: Proantosiyandin, PA+GLF: Proantosiyandin+Glifosat, GLF: Glifosat p<0,05

3.5. Oksidatif Stres Parametrelerine Ait Bulgular

Çalışmamızın oksidatif stres parametrelerine ait elde edilen veriler Çizelge 3.5.'de sunuldu. Çalışma gruplarından toplanan testislere yapılan doku biyokimyası analiz sonuçlarında MDA değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmezken, GSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi. GSH düzeylerinde; GLF grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma belirlendi. PA+GLF grubunda, GLF grubuna göre yüksek olduğu belirlenirken, kontrol grubunda ise PA+GLF grubuna göre yüksektir. Antioksidan grup olan PA' da ise GLF grubuna göre anlamlı bir şekilde GSH düzeyleri yüksektir (p<0,05).

Çizelge 3.5: Gruplara ait Oksidatif Stres Parametreleri ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:6).

Gruplar	MDA (nmol/g)	GSH (mg/g)
Kontrol	14,47±0,28 ^a	16,41±0,43 ^{ab}
PA	14,10±0,43 ^a	16,98±0,28 ^a
PA+GLF	14,18±0,26 ^a	15,64±0,30 ^b
GLF	15,05±0,73 ^a	15,51±0,24 ^b
p	-	*

a-b: Her bir sütündeki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir. p<0,05 * PA: Proantosiyanidin, PA+GLF: Proantosiyanidin+Glifosat, GLF: Glifosat MDA: Malondialdehit, GSH: Glutatyon

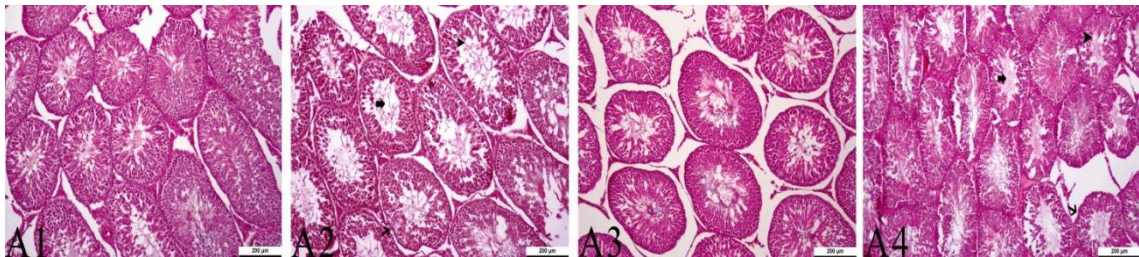
3.6. Testis Dokusundaki Histopatolojik Bulgular

Bütün gruplarda seminifer tubulus çapları ve germinatif hücre katman kalınlıkları belirlendi (Çizelge 3.6). Seminifer tubulus çapı açısından yapılan incelemede, kontrol grubu ile PA+GLF ve GLF grupları karşılaştırıldığında GLF ve PA+GLF grubunda gözlenen azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p<0,001$). PA+GLF grubunda seminifer tubulus çapı ise GLF grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulundu. Germinatif hücre katman kalınlıkları açısından yapılan incelemede ise kontrol grubuna göre PA+GLF ve GLF gruplarında tespit edilen azalmanın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenirken ($p<0,05$), PA+GLF ve GLF grupları arasındaki farkın ise önemsiz olduğu tespit edildi ($p>0,05$). Ayrıca PA ve GLF grupları arasındaki farkın da önemli olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.6. Gruplara ait Seminifer Tubul Çapı Ve Germinatif Hücre Katman Kalınlığı ($\bar{X} \pm$ SEM, n:6).

Gruplar	Seminifer Tubulus	Germinatif Hücre Katman
	Çapı (μm)	Kalınlığı (μm)
Kontrol	102,49 \pm 0,35 ^a	42,95 \pm 1,53 ^a
PA	103,05 \pm 0,28 ^a	39,42 \pm 0,86 ^{ab}
PA+GLF	99,04 \pm 0,47 ^b	35,11 \pm 1,13 ^c
GLF	94,77 \pm 1,17 ^c	36,56 \pm 1,57 ^{bc}
P	**	*

a,b,c: Her bir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir. $P<0,001$ ** $P<0,05$ * PA: Proantosiyanidin, PA+GLF: Proantosiyanidin+Glifosat, GLF: Glifosat



Resim 3.1: Ratların Testislerindeki Glifosat Kaynaklı Hasar Üzerine Proantosiyanidin' in Etkisi

Sunulan resim hemotoksilen ezosin ile boyandı. Kontrol grubu (A1), PA uygulanan grup (A2), PA+GLF uygulanan grup (A3), GLF uygulanan grup (A4) olarak sunuldu.

4. TARTIŞMA

Ratlarda GLF uygulaması spermada antioksidan kapasitesinin azalması, ROS oluşumuna ve nihayetinde ise oksidatif strese neden olur. Bu durumun spermatolojik parametrelere, spermatozoon DNA' sına, testis dokusu histopatolojisine ve dolayısıyla fertilitte üzerine olumsuz etkileri vardır. Yapılan araştırmalarda infertiliteye yol açan en

önemli sebep olarak spermatozoonlarda lipid peroksidasyonunun varlığı gösterilmektedir (Nithya ve Elango, 2015; Abarikwu vd., 2014). Antioksidanlar, vücutta bulunan ROS' u temizleyen bileşiklerdir. ROS' lar, hücre zarı lipidlerini oksitleyen ve vücudun genetik materyali olan DNA' ya zarar veren oldukça reaktif moleküllerdir. Nötralize edilmezlerse birçok patolojik duruma yol açan oksidatif strese neden olabilir. Antioksidanlar, ROS' ları dokuya önemli zarar vermeden önce nötralize ederek etkilerini göstermektedir (Joshi vd., 2001; Hassan vd., 2013; Bashir, 2019). Bu nedenle spermatolojik parametreler ve testis toksisitesi üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünüldüğünden çalışmamızda tedavi amaçlı PA gibi güçlü bir antioksidan maddeyi kullandık.

Sunmuş olduğumuz çalışmamızda ratlara 56 gün boyunca 787,85 mg/kg gastrik gavaj yolu ile vermiş olduğumuz GLF' nin sperma kalitesinin en önemli göstergelerinden biri olan motilite oranının, kontrol ve diğer gruplara göre önemli ölçüde azalmasına; ayrıca baş, orta, kuyruk ve toplam anormal spermatozoon oranı gibi önemli spermatolojik parametrelerde istatistiki açıdan önemli artışlara neden oldu. Bununla beraber membran bütünlüğünü ve ölü-canlı oranını kombine olarak değerlendirdiğimiz HE test parametrelerine baktığımızda da membran bütünlüğünü azaltmak, ölü spermatozoon oranını artırmak gibi önemli olumsuz etkileri olduğunu belirledik. Bu bulgular, farklı hayvan türlerini araştıran birçok araştırmacının bulgularıyla uyumludur. Abarikwu vd. (2017), 6 haftalık erkek ratlarda haftada üç kez 52 gün boyunca gavaj yoluyla GLF (5 mg/kg), uyguladıkları çalışmalarında spermatozoon motilitesinde ve yoğunluğunda azalmalar olduğunu ayrıca GLF grubunda kontrol grubuna göre ölü spermatozoon oranında artışı olduğunu bildirmektedirler. Yousef vd. (1995), erkek tavşanların herbisit olan glifosata kronik olarak maruz kalmasının, spermatozoon yoğunluğunda azalmaya ve anormal veya ölü sperm hücrelerinde artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Avdatek vd. (2018), ratlara günlük 375 mg/kg GLF uygulaması yaptıkları çalışmalarında kontrol ve diğer gruplara göre GLF uygulaması yapılan grupta spermatozoon motilitesinde ve membran bütünlüğünde azalmalar ile anormal spermatozoon oranlarında da artışlar olduğunu bildirmektedirler. Cai vd. (2017), yaptıkları çalışmaları sonucunda GLF' nin hem farelerde hem de ratlarda spermatozoon yoğunluğunda ve motilitesinde azalmaya neden olduğunu ve sonuç olarak fertilité üzerinde olumsuz etki meydana getirdiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda toksik madde olarak uyguladığımız GLF' den önce

koruyucu madde olarak 400 mg/kg/gün verdiğimiz PA spermatozoon motilitesinde artış, anormal ve ölü spermatozoon oranlarında azalma ile membran bütünlüğünü artırmak gibi pek çok olumlu etkiler meydana getirdi. Long vd. (2017), tarafından yapılan çalışmada PA' nın önceden uygulanması Zearalenone' un (ZEN) neden olduğu azalmış spermatozoon yoğunluğunun ve motilitesinin iyileşmesini sağlarken, anormal spermatozoon artışını önemli ölçüde önlemiş olduğu ortaya koymuşlardır. Yapılan çalışmalar PA' nın Kadmiyum (Cd) toksisitesine maruz kalmış ratların spermatozoonların yoğunluğunu, motilitesini, anormal ve canlı/ölü spermatozoon oranlarını iyileştirdiği bildirilmiştir (Sönmez ve Tascioglu, 2016; He vd., 2018; Bashir, 2019). Yine bir başka çalışmada PA uygulaması, doksorubisinin neden olduğu yüksek spermatogonial kromozomal anormalliklerini ve spermatozoon başı anormalliğini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Attia vd., 2010).

Hücreler kimyasal maddelere karşı daha yüksek duyarlılığa sahip olabilir. Bu duyarlılığın sonucunda da hücrelerde özellikle tek zincirli DNA kırılmaları gibi hasarlar şekillenebilmektedir (Kumaravel ve Jha, 2006). Ratlar, Drosophila, ruminantlar, akvaryum balığı, yılan balığı ve insanlar dahil olmak üzere farklı türlerde yüksek dozlarda GLF' ye maruz bırakıldıktan sonra DNA hasarı meydana geldiği tespit edilmiştir (Poletta vd., 2009; Çavaş ve Könen, 2007; Bolognesi vd., 2009). Çalışmamızdaki bulgulara göre GLF, kontrol ve diğer gruba kıyasla spermatozoon hücrelerinde yüksek oranda DNA hasarına neden olduğu ancak koruyucu madde olarak 400 mg/kg/gün PA uygulamasının DNA hasarını önemli derecede azalttığı belirlendi. Lopes vd. (2014), glifosatın zebra balığı Danio rerio'da spermatozoon DNA' sına zarar verdiğini bununla beraber mitokondriyal zarın bütünlüğünü ve işlevselliğini azaltarak üreme parametreleri üzerinde zararlı etkilere neden olabileceğini bildirmişlerdir. Avdatek vd. (2018), ratlara günlük 375 mg/kg/gün GLF uygulaması yaptıkları çalışmalarında DNA bütünlüğünün önemli oranda hasar gördüğünü bildirmektedirler. Bashir (2019), ratlarda yapmış olduğu çalışmasında Cd'ye maruz kalan ratların spermatozoonlarının yüksek DNA hasarına sahip olduğu ancak PA uygulamasının, Cd tarafından üretilen serbest radikallerin DNA'ya ulaşmadan önce durdurarak koruyucu etki yaptığını bildirmektedir. Dolayısıyla, PA' nın güçlü antioksidan özelliği sayesinde Cd' nin neden olduğu oksidatif testis toksisitesine karşı koruyucu olduğu belirlendi. Hajizadeh vd. (2016), ratlarda yaptıkları çalışmalarda Fluoxetine (FLX) maruziyetinin

neden olduğu oksidatif stresin PA' nın uygulaması ile baskılandığı bunun sonucunda da DNA hasarının azaldığını ileri sürmektedirler. Elde ettiğimiz bulgular diğer çalışmaların sonuçları ile paralellik arz etmektedir.

Pestisitler de dahil olmak üzere çevresel toksik maddelere maruz kalma, fertilizasyonu olumsuz yönde etkilerken steriliteye kadar varan etkiler oluşturabilmektedir. Testis ve diğer üreme organlarında pestisit birikimi, spermatozoon hücrelerin hızlandırılmış ölümüne yol açan oksidatif stresi hızlandırmış olabilir. Oksidatif stres, plazma membranında peroksidatif hasarın indüklenmesine neden olarak spermatozoonun normal fonksiyonlarına ve DNA' sına önemli zararlar vermektedir. DNA, oksidatif stresin etkilerine karşı çok hassastır. Owagboriyea vd. (2017), tarafından yapılan çalışmada ise GLF' ye maruz kalan rat testislerinde GSH' ın azaldığı MDA' nın arttığını bu durumun oksidatif strese neden olduğu bildirilmektedir. Avdatek vd. (2018), ratlarda yaptıkları çalışmalarında diğer gruplara göre GLF uygulanan gruplarda MDA seviyesinde bir artış GSH aktivitesinde ise bir azalmanın olduğunu gözlemlemişlerdir. Nithya ve Elango (2015), ratlardaki çalışmalarında oksidatif stresin kan ve testislerdeki antioksidan seviyesini azaltarak spermatogenezin bozulmasına neden olduğu ve bu durumun erkek ratlarda steriliteye yol açtığı ortaya koymuşlardır. Abarikwu vd. (2014), ratlarda yaptıkları çalışmalarında testis dokusundaki MDA ve GSH düzeylerinin aktivitesinin GLF uygulamasından etkilenmediğini ileri sürmektedirler. Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgularımıza göre testis dokusundaki MDA seviyesinde gruplar arasında bir fark yok iken GSH aktivitesi yönünden değerlendirdiğimizde ise GLF uygulanan gruptaki azalmanın diğer gruplara göre önemli olduğu belirlenirken PA uygulamasının GSH seviyesinde artışa neden olduğu tespit edildi. Zhao vd. (2014), tarafından yapılan çalışmada Cisplatin uygulaması ratlarda, GSH düzeyinin önemli ölçüde azalmasına, MDA düzeyinin önemli ölçüde artmasına neden olmuştur. PA ile tedavi edildiğinde, Cisplatin 'nin neden olduğu lipid peroksidasyonunun ve oksidatif stresin üzerine önemli ölçüde azaldığını bildirmektedirler. Oksidatif stres, varikozeldeki başlıca patojenik mekanizmalardan biridir. Testis ve epididimide morfolojik ve fonksiyonel hasara neden olur. Varikozel testis dokusunun MDA düzeyinde önemli artışlara, GSH düzeyinde önemli düşümlere neden olmuştur. Ancak, PA' nın uygulanması bu parametreleri önemli ölçüde iyileştirmiştir (Wang vd., 2018). Yüksek yağlı diyet ve Cd uygulaması testis dokusunun MDA düzeylerinde önemli artışlara,

GSH düzeylerinde önemli düşüöşlere neden olmuştur. Ancak PA uygulaması, yüksek yağlı diyet ve Cd' nin neden olduğu testiküler oksidatif stresi iyileştirmiştir. Bu durum PA'nin ROS temizleme kabiliyetini ortaya koymuştur (He vd., 2018; Wang vd., 2019). Rodríguez-Pérez vd. (2019), ratlarda arsenik toksisitesine karşı PA uygulamasının MDA düzeyi önemli ölçüde azalttığını ve GSH düzeyi artırdığını bunun sonucunda arsenik kaynaklı oksidatif hasarın bloke edildiği bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz bulgular bazı çalışmaların sonuçlarından farklı iken bazı çalışmaların bulguları paralellik arz etmektedir.

Çalışmamızda serum testosteron seviyesinde gruplar arasında istatistiki anlamda bir fark tespit edilmedi. Yapılan bir çalışmada kontrol ve diğer gruplara kıyasla GLF uygulanan grupta serumdaki testosteron, progesteron ve estradiol konsantrasyonlarının doza bağlı bir şekilde azalma eğiliminde olduğu bildirilmektedir (Dai vd., 2016). Romano vd. (2010), tarafından yapılan çalışmada genç yaştaki ratların GLF maruziyetinin kandaki testosteron düzeylerini azalttığını bununda pubertasa gelme yaşını geciktirebileceğini ileri sürmektedirler. PA tedavisi, Wang vd. (2019) ve Hajizadeh vd. (2016), yapılan çalışmalarda yüksek yağlı diyetin ve FLX maruziyetinin neden olduğu anormal serum testosteron seviyeleri ve testiküler androjenik bozukluklar üzerinde koruyucu bir rol üstlenmiştir. Çalışmamızda testosteron seviyesi bakımından GLF uygulanan grup ile diğer uygulama grupları arasında istatistiki anlamda bir fark belirlenmedi.

GLF, ratların testislerinde epitel yüksekliğinde ve tübüler çapta azalma ile lümen çapında artış gibi dejeneratif değişikliklere neden olmaktadır (Romano vd., 2010). Rat testislerinin seminifer tübüllerinde ve intersitisyel hücrelerinde gözlenen dejeneratif değişiklikler, GLF' nin erkek ratların üreme sistemi üzerindeki toksisitesinin kanıtıdır (Owagboriayea vd., 2017). Ikpeme vd. (2012), farelere glifosat maruziyetinin, gonadların hücresel bütünlüğü de dâhil olmak üzere üreme fizyolojilerine zararlı olduğunu belirtti. Avdatek vd. (2018), ratlarda yaptıkları çalışmalarında diğer gruplara göre GLF uygulanan grupların seminifer tubul çaplarında ve germinatif epitel katman kalınlığında azalma olduğunu bildirmektedirler. Zhao vd. (2014), ratlarda cisplatin uygulaması testisin seminal tübül çapında ve germinatif epitel hücre kalınlığında önemli azalmalarla beraber testislerinde dejenerasyon, nekroz ve interstisyel ödem tespit etmiştir. PA ile tedavi edildiğinde testis yapısındaki Cisplatin' in neden olduğu hasarın neredeyse tamamını iyileştirdiği bu parametrelerde de belirgin bir düzelme görüldüğünü

ortaya koymuştur. Böylece PA' nın Cisplatin' in neden olduğu testis toksisitesine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu açıkça gösterdiğini bildirmektedirler. Çalışmamızda seminifer tubulus çapı ve germinatif hücre katman kalınlığı açısından yapılan incelemede, kontrol grubu ile PA+GLF ve GLF grupları karşılaştırıldığında GLF ve PA+GLF grubunda gözlenen azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların bazı çalışmalarla uyumluluk arz etmesine rağmen bazı çalışmalarla da farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların sebepleri arasında değerlendirmeyi yapan kişi, çalışmada kullanılan maddelerin hayvanlara uygulanış yolları, parametrelerin değerlendirilmesinde kullanılan alet, ekipman ve yöntemlerin farklı olması gibi nedenler sayılabilir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak güçlü bir antioksidan olan PA' nın GLF maruziyeti sonucunda azalan motiliteyi ve plazma membran bütünlüğünü, artan anormal spermatozoon oranını ile

DNA hasarı üzerine olumlu etkileri oldu. Bunun yanı sıra ratların testis dokusundaki olumsuz histolojik değişimleri etkili bir şekilde önlediği belirlendi. Bu gibi olumlu etkilerinden dolayı GLF ile indüklenen testis toksisitesi üzerine PA' nın koruyucu bir etkisinin olduğu kanaatine varıldı.

6. KAYNAKLAR

Abarikwu, S. O., Akiri, O. F., Durojaiye, M. A., Adenike, A. (2015). Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on

- testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. *Toxicol Mech Methods*, 25(1), 70-80.
- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *Int. J. Food Prop*, 20(8), 1689-1699.
- Abdel-Kawi, S. H., Hashem, K. S., Abd-Allah, S. (2016). Mechanism of diethylhexylphthalate (DEHP) induced testicular damage and of grape seed extract-induced protection in the rat. *Food Chem Toxicol*, 90, 64-75.
- Acquavella, J. F., Alexander, B. H., Mandel, J. S., Gustin, C., Baker, B., Chapman, P., Bleeke, M. (2004). Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. *Environ Health Perspect*, 112(3), 321-326.
- Adebayo, O. A., Akinloye, A. K., Ihunwo, A. O., Oke, B. O. (2015). The coagulating gland in the male greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*): morphological and immunohistochemical features. *Folia morphologica*, 74(1), 25-32.
- Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev*, 28(2), 1-10.
- Al-Daraji, H. J. (2012). The use of certain grape constituents for improve semen quality and storage ability of diluted Roosters' semen. *Am J Pharm Tech Res*, 2, 308-322.
- Anisatuzzahro, A., Luthfi, M. J. (2017). Anatomical Study of Male Reproductive Organs of the Indonesian Short-Nosed Fruit Bat (*Cynopterus titthaecheilus* Temminck, 1825). *Biology, Medicine, ve Natural Product Chemistry*, 6(1), 13-17.
- Antepli, N., Beyaz, F. (2017). The immunohistochemical localization of the vascular endothelial growth factor and its receptors in the testes and epididymis of the rabbit. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 64(4), 289-299.
- Attia, S. M., Bakheet, S. A., Al-Rasheed, N. M. (2010). Proanthocyanidins produce significant attenuation of doxorubicin-induced mutagenicity via suppression of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*, 3(6), 404-413.
- Avdatek, F., Türkmen, R., Demirel, H. H., Birdane, Y. O. (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.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148(2-3), 187-197.
- Bashir, N., Shagirtha, K., Manoharan, V., Miltonprabu, S. (2019). The molecular and biochemical insight view of grape seed proanthocyanidins in ameliorating cadmium-induced testes-toxicity in rat model: implication of PI3K/Akt/Nrf-2 signaling. *Biosci Rep*, 39(1), DOI:10.1042/BSR20180515.
- Bayatli, F., Akkuş, D., Kilic, E., Saraymen, R., Sönmez, M. F. (2013). The protective effects of grape seed extract on MDA, AOPP, apoptosis and eNOS expression in testicular torsion: an experimental study. *World J Urol*, 31(3), 615-622.
- Benachour, N., Séralini, G. E. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem Res Toxicol.*, 22(1), 97-105.
- Bernal, R. A. D., Aya, F. A., De Jesus-Ayson, E. G. T., Garcia, L. M. B. (2015). Seasonal gonad cycle of the climbing perch *Anabas testudineus* (Teleostei: Anabantidae) in a tropical wetland. *Ichthyol. Res*, 62(4), 389-395.

- Beutler, E., Kelly, B. M. (1963). The effect of sodium nitrite on red cell GSH. *Experientia*, 19(2), 96-97.
- Beyaz, F., Bayram, G. K., Alan, E. (2008). Pre-Pubertal Ve Pubertal Dönemlerde Ankara Tavşanı Testis Ve Epididimislerinde S10046 Proteininin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 5(2), 79-85.
- Bladé, C., Aragonès, G., Arola-Arnal, A., Muguerza, B., Bravo, F. I., Salvadó, M. J., Suárez, M. (2016). Proanthocyanidins in health and disease. *Biofactors*, 42(1), 5-12.
- Bogdanske, J.J., Hubbard, S., Stelle, V., Riley, M.R., Schiffman, B.M. (2010). Laboratory rat procedural techniques. CRC Press, Boca Raton, s: 67- 80.
- Bolognesi, C., Carrasquilla, G., Volpi, S., Solomon, K. R., Marshall, E. J. P. (2009). Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J. Toxicol. Environ*, 72(15-16), 986-997.
- Buer, C. S., Imin, N., Djordjevic, M. A. (2010). Flavonoids: new roles for old molecules. *J Integr Plant Biol*, 52(1), 98-111.
- Cai, W., Ji, Y., Song, X., Guo, H., Han, L., Zhang, F., Xu, M. (2017). Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Environ Toxicol Pharmacol*, 55, 148-155.
- Cassault-Meyer, E., Gress, S., Séralini, G. É., 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.
- Choy, Y. Y., Waterhouse, A. L. (2014). Proanthocyanidin metabolism, a mini review. *Nutr Healthy Aging*, 2(2, 3), 111-116.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol*, 26(3), 249-261.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*, 1(6), 569-590.
- Creasy, D. M., ve Chapin, R. E. (2013). Male reproductive system. *Haschek and Rousseaux's handbook of Toxicologic Pathology*, 2493-2598.
- Çavaş, T., Könen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22(4), 263-268.
- 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.
- Diane, F. Birt, D.F., Jeffery, E. (2013). Flavonoids. *Adv Nutr*, 4(5), 576–577.
- Drobnis, E. Z., Nangia, A. K. (2017). Male reproductive functions disrupted by pharmacological agents. *Impacts of Medications on Male Fertility*, 13-24.
- Duke, S. O., Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci*, 64(4), 319-325.
- El-Beltagi, E. M., Elwan, W. M., El-Bakry, N. A. M., Salah, E. F. (2017). Histological and immunohistochemical study on the effect of gibberellic acid on the seminiferous tubules of testis of adult albino rat and the possible protective role of grape seeds proanthocyanidin extract. *Tanta Med. J*, 45(2), 79.
- Engelhardt, W., Breves, G., Diener, M., Gäbel, G., Arnold, W., Aschenbach, J.R., Aurich, C., Breer, H., Bruckmaier, R.M., Deeg, C.A., Einspanier, A., Erben, R.G., Fromm, M.,

- Fuhrmann, H., Gassmann, M., Gerstberger, R., Göbel, T., Gros, G., Hammon, H., Huber, K., Kaske, M., Kaspers, B., Langhans, W., Leonhard-Marek, S., Lutz, T.A., Martens, H., Meinecke, B., Pfannkuche, H., Reitemeier, S., Roth, J., Rummel, C., Sallmann, H., Sann, H., Schemann, M., Schröder, B., Skadhauge, E., Stangas-Singer, M., Steinlechner, S., Weißmann, A., Wolfram, S. (2005). *Physiologie der Haustiere*. Veteriner Fizioloji, 5, Öztürk, H., Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Fine, A. M. (2000). Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alternative medicine review: Clin. Ther*, 5(2), 144-151.
- Foster, J.R., Frost, D. (2018). The History of the Rat. In: Boorman' s Pathology of the Rat. Eds.: Suttie, A.W., Leininger, J.R., Bradley, A.E., 2nd ed., Academic Press is an imprint of Elsevier, London, s: 8.
- Garcia-Vazquez, F. A., Gadea, J., Matás, C., Holt, W. V. (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian journal of andrology*, 18(6), 844.
- Gezer, A., Karadağ Sarı, E. (2020). Male Reproductive System In Laboratory Animals. In: Health Sciences Research Papers. Eds.: Çaltekin, İ., Çaltekin, M., Gece Akademi, Ankara, s: 25- 52.
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., Straif, K., International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, IARC, Lyon, France (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet. Oncol.* 16(5), 490–491.
- Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., Fidan, A.F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 122: 200-207.
- Hajizadeh, Z., Mehranjani, M. S., Najafi, G., Shariatzadeh, S. M. A., Jalali, A. S. (2016). Black grape seed extract modulates fluoxetine-induced oxidative stress and cytotoxicity in the mouse testis. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 11(2), DOI: 10.17795/jjnpp-27512.
- Hankenson, F. (2014). Critical care management for laboratory mice and rats. Fla: CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, s: 115.
- Harkness, J.E., VandeWoude, S., Turner, P.V., Wheler, C.L. (2010). 5th ed., Wiley- Blackwell, Chichester, s: 95- 104.
- Hassan, H. A., El-Kholy, W. M., Nour, S. E. (2014). Proanthocyanidin as a cytogenetic protective agent against adverse effects of plant growth regulators supplementation in rats. *Cytotechnology*, 66(4), 585-596.
- Hassan, H. A., Isa, A. M., El-Kholy, W. M., Nour, S. E. (2013). Testicular disorders induced by plant growth regulators: cellular protection with proanthocyanidins grape seeds extract. *Cytotechnology*, 65(5), 851-862.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96(2-3), 67-202.
- He, L., Li, P., Yu, L. H., Li, L., Zhang, Y., Guo, Y., Yang, S. H. (2018). Protective effects of proanthocyanidins against cadmium-induced testicular injury through the modification of Nrf2-Keap1 signal path in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 57, 1-8.

- Hu, J. H., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Li, W. Y. (2008). Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiology*, 57(3), 257-262.
- Hughes, C. M., Lewis, S. E., McKelvey-Martin, V. J., Thompson, W. (1997). Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*, 374(2), 261-268.
- Iglesia, R., Milagro, F. I., Campión, J., Boqué, N., Martínez, J. A. (2010). Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors*, 36(3), 159-168.
- Ikpeme, E. V., Udensi, O., Ekaluo, U. B., Solomon, T. O. (2012). Efficacy of Ascorbic Acid in Reducing Glyphosate-Induced Toxicity in Rats. *Br Biotechnol J*, 2(3): 157-168
- İnt. Kay. 1, <https://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/erdemg/72754/Rodentlerin%20Anatomisi.pdf>, 19.11.2020.
- İnt. Kay. 2, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>, 14.02.2022.
- Johansson, H. K. L., Schwartz, C. L., Nielsen, L. N., Boberg, J., Vinggaard, A. M., Bahl, M. I., Svingen, T. (2018). Exposure to a glyphosate-based herbicide formulation, but not glyphosate alone, has only minor effects on adult rat testis. *Reprod Toxicol*, 82, 25-31.
- Joshi, S. S., Kuszynski, C. A., Bagchi, D. (2001). The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Curr Pharm Biotechnol*, 2(2), 187-200.
- Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 10(4), 1567-1574.
- Keeble, E. (2011). Rodents: biology and husbandry. In: BSAVA Manual of Rodents and Ferrets. eds.: Keeble, E., Meredith, A., British Small Animal Veterinary Association, Gloucester England, s: 4-14.
- Kim, K.W., Bennison, C., Hemmings, N., Brookes, L., Hurley, L. L., Griffith, S. C., Slate, J. (2017). A sex-linked supergene controls sperm morphology and swimming speed in a songbird. *Nat Ecol Evol*, 1(8), 1168.
- Kolaç, T., Gürbüz, P., Yetiş, G. (2017). Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 5(1), 26-42.
- Koolhaas, J.M., (2010). The laboratory rat. In: The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. Eds.: Hubrecht, R., Kirkwood, J., 8th ed., Wiley-Blackwell, Chichester, s: 311- 323.
- Kumaravel, T. S., Jha, A. N. (2006). Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res*, 605(1-2), 7-16.
- Li, S. G., Ding, Y. S., Qiang, N. I. U., Xu, S. Z., Pang, L. J., Lin, R., Guo, S. X. (2015). Grape seed proanthocyanidin extract alleviates arsenic-induced oxidative reproductive toxicity in male mice. *Biomed Environ Sci*, 28(4), 272-280.
- Long, M., Yang, S., Zhang, Y., Li, P., Han, J., Dong, S., He, J. (2017). Proanthocyanidin protects against acute zearalenone-induced testicular oxidative damage in male mice. *Environ Sci Pollut Res Int*, 24(1), 938-946.
- Lopes, F. M., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., da Silva, A. C., Guazzelli, V. G., Tavares, G., da Rosa, C. E. (2014). Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquat Toxicol*, 155, 322-326.

- Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI J*, 17, 1101.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.*, 79(5), 727-747.
- Mengüç, Ç. (2018). Herbisit toksisitesi ve yabancı otlara karşı alternatif mücadele stratejileri. *Turk J Weed Sci*, 21(1), 61-73.
- Mesnage, R., Moesch, C., Grand, R., Lauthier, G., Vendômois, J., Gress, S., Séralini, G. (2012). Glyphosate exposure in a farmer's family. *J Environ Prot*, 3(9), 1001.
- Morrow, S., Gosálvez, J., Lopez-Fernandez, C., Arroyo, F., Holt, W., Guille, M. J. (2017). Effects of freezing and activation on membrane quality and DNA damage in *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis* spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev*, 29(8), 1556-1566.
- Mülazımoğlu, S. B., İde, T., Aslan, S. (2010). Ratlarda Reprodüktif Sistem. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 40(2), 39-44.
- Ngo, A.D., Taylor, R., Roberts, C.L., 2009. Paternal exposure to Agent Orange and spina bifida: a meta-analysis. *Eur. J. Epidemiol*, 25, 37-44.
- Nithya, R., Elango, V. (2015). Pesticide effect in male hormones and antioxidant status in male albino rats. *J Acad Indus Res*, 4(4), 140-143.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2), 351-358.
- Ostling, O. Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123(1), 291-298.
- Otto, G.M., Franklin, C.L., Clifford, C.B. (2015). Biology and Diseases of Rats. In: Laboratory Animal Medicine. Eds.: Fox, J.G., Anderson, L.C., Otto, G.M., Corning, K.R.P., Whary, M.T., 3rd ed., Academic Press is an imprint of Elsevier, London, S: 151- 165.
- Ou, K., Gu, L. (2014). Absorption and metabolism of proanthocyanidins. *J Funct Foods*, 7, 43-53.
- Owagboriaye, F. O., Dedeke, G. A., Ademolu, K. O., Olujimi, O. O., Ashidi, J. S., Adeyinka, A. A. (2017). Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. *Exp Toxicol Pathol*, 69(7), 461-468.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 5. DOI:10.1017/jns.2016.41.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2(5), 270-278.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63(7), 1035-1042.
- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M. D. (2009). Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup(glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutat Res*, 672(2), 95-102.
- Prihatno, S. A., Padeta, I., Larasati, A. D., Sundari, B., Hidayati, A., Fibrianto, Y. H., Budipitojo, T. (2018). Effects of secretome on cisplatin-induced testicular dysfunction in rats. *Vet World*, 11(9), 1349.
- Quareshy, M., Prusinska, J., Li, J., Napier, R. (2018). A cheminformatics review of auxins as herbicides *J Exp Bot*, 69(2), 265-275.

- Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Patel, S., Pan, X., Naz, S., Suleria, H. A. R. (2019). Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*, 116, DOI:10.1016/j.biopha.2019.108999.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., Seralini, G. E. (2005). Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect*, 113(6), 716-720.
- Richmond, M. E. (2018). Glyphosate: a review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Environ Stud Sci*, 8(4), 416-434.
- Rodríguez-Pérez, C., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E., Verardo, V. (2019). Grape seeds proanthocyanidins: An overview of in vivo bioactivity in animal models. *Nutrients*, 11(10), 2435.
- Romano, R. M., Romano, M. A., Bernardi, M. M., Furtado, P. V., Oliveira, C. A. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch Toxicol*, 84(4), 309-317.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, 19(4), 481-486.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45(4), 287-306.
- Schimming, B., Pinheiro, P., de Matteis, R., Machado, C., Domeniconi, R. (2015). Immunolocalization of aquaporins 1 and 9 in the ram efferent ducts and epididymis. *Reprod. Domest. Anim*, 50(4), 617-624.
- Séralini, G. E., Mesnage, R., Defarge, N., Gress, S., Hennequin, D., Clair, E., De Vendômois, J. S. (2013). Answers to critics: Why there is a long term toxicity due to a Roundup-tolerant genetically modified maize and to a Roundup herbicide. *Food Chem Toxicol*, 53, 476-483.
- Serim, A. T., Özdemir, Y. G. (2012). Herbisit uygulamalarında kullanılan pülverizatör memelerinin damla büyüklük dağılımlarının belirlenmesi. *IJANS*, 5(2), 172-175.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1-16.
- Sharp, P., Villano, J. (2013). The laboratory rat. 2nd ed., FL: CRC Press, Boca Raton, s: 1-30.
- Singh, N. P., Muller, C. H., Berger, R. E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, 80(6), 1420-1430.
- Sinhorin, V. D., Sinhorin, A. P., Teixeira, J. M. S., Miléski, K. M. L., Hansen, P. C., Moeller, P. R., Loro, V. L. (2014). Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. *Arch Environ Contam Toxicol*, 67(4), 659-667.
- Soleimani, M., Masoumi, N. (2017). The effect of grape seed extract on semen oxidative stress markers in men with idiopathic infertility: a cross-sectional before-after study. *Nephro-Urol Mon*, 9, DOI:10.5812/numonthly.13837.
- Sönmez, M. F., Tascioglu, S. (2016). Protective effects of grape seed extract on cadmium-induced testicular damage, apoptosis, and endothelial nitric oxide synthases expression in rats. *Toxicol Ind Health*, 32(8), 1486-1494.
- Stewart, K. A., Wang, R., Montgomerie, R. (2016). Extensive variation in sperm morphology in a frog with no sperm competition. *BMC evolutionary biology*, 16(1), 29.

- Su, L., Deng, Y., Zhang, Y., Li, C., Zhang, R., Sun, Y., Yao, S. (2011). Protective effects of grape seed procyanidin extract against nickel sulfate-induced apoptosis and oxidative stress in rat testes. *Toxicol Mech Methods*, 21(6), 487-494.
- Tan, S. (2015). Varikoselli Sıçanlarda Spermatojenik Kök Hücrelerin Durumunun İmmünohistokimya Teknikleri İle Belirlenmesi, Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 8-10s, Denizli.
- Tan, Y., Tan, D. (2017). Anatomy, Physiology, and Husbandry of Laboratory Animals. In: Fundamentals of Laboratory Animal Science. Eds.: Liu, E., Fan, j., CRC Press, Boca Raton, s: 140- 143.
- Tsao, R., Yang, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1018(1), 29-40.
- Unusan, N. (2020). Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *J Funct Foods*, 67, DOI:10.1016/j.jff.2020.103861.
- Vernet, N., Mahadevaiah, S. K., Decarpentrie, F., Longepied, G., de Rooij, D. G., Burgoyne, P. S., Mitchell, M. J. (2016). Mouse Y-encoded transcription factor Zfy2 is essential for sperm head remodelling and sperm tail development. *PLoS One*, 11(1), DOI: 10.1371/journal.pone.0145398.
- Vidal, J.D., Dixon, D. (2018). Ovary. In: Boorman' s Pathology of the Rat. Eds.: Suttie, A.W., Leininger, J.R., Bradley, A.E., 2nd ed., Academic Press is an imprint of Elsevier, London, s: 523- 534.
- Wang, E. H., Yu, Z. L., Bu, Y. J., Xu, P. W., Xi, J. Y., Liang, H. Y. (2019). Grape seed proanthocyanidin extract alleviates high-fat diet induced testicular toxicity in rats. *RSC Adv*, 9(21), 11842-11850.
- Wang, Y., Chen, F., Liang, M., Chen, S., Zhu, Y., Zou, Z., Shi, B. (2018). Grape seed proanthocyanidin extract attenuates varicocele-induced testicular oxidative injury in rats by activating the Nrf2-antioxidant system. *Mol Med Rep*, 17(1), 1799-1806.
- Watson, P. F. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec*, 97(1), 12-15.
- Williams, R. J., Spencer, J. P., Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radic Biol Med*, 36(7), 838-849.
- Wolfensohn, S., Lloyd, M. (2013). Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. 4th ed., Wiley-Blackwell, Chichester, s: 180- 184.
- Yiğit, A.A., Böyük, G., Kabakçı, R. (2019). Dişi Ratlarda Üreme Fizyolojisi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 12(2): 163- 167.
- Yousef, M. I., Salem, M. H., Ibrahim, H. Z., Helmi, S., Seehy, M. A., Bertheussen, K. (1995). Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *J. Environ. Sci. Health B*, 30(4), 513-534.
- Zhao, Y. M., Gao, L. P., Zhang, H. L., Guo, J. X., Guo, P. P. (2014). Grape seed proanthocyanidin extract prevents DDP-induced testicular toxicity in rats. *Food Funct*, 5(3), 605-611.
- Zhao, Y., Zhang, H., Gao, L. (2015). Anti-apoptotic effect of grape seed proanthocyanidin extract on cisplatin-induced apoptosis in rat testis. *Food Sci. Technol. Res*, 21(6), 805-811.