



**VİNKRİSTİNE MARUZ KALMIŞ RATLARDA
TRİBULUS TERRESTRİSİN SPERMA KALİTESİ VE
TESTİS TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Vet. Hek. Battal ERDOĞAN
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Deniz YENİ
Tez No: 2024-045
Afyonkarahisar

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

**VİNKRİSTİNE MARUZ KALMIŞ RATLARDA TRİBULUS
TERRESTRİSİN SPERMA KALİTESİ VE TESTİS TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Vet. Hek. Battal ERDOĞAN

Prof . Dr. Deniz YENİ

Tez No: 2024-045

AFYONKARAHİSAR

**Bu Tez Çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 22.SAĞ.BİL.23**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Öğrencinin	Adı- Soyadı	Battal ERDOĞAN
	Numarası	213324001
	Anabilim Dalı	Dölerme ve Suni Tohumlama
	Program	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora
Tezin Başlığı		Vinkristine Maruz Kalmış Ratlarda Tribulus Terrestrisin Sperma Kalitesi ve Testis Toksisitesi Üzerine Etkileri
Tez Savunma Sınav Tarihi		16.10.2024
Tez Savunma Sınav Saati		10.00
Yukarıda bilgileri verilen tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.		
Başkan	Prof. Dr. Deniz YENİ	
Üye	Prof. Dr. Duygu BAKİ ACAR	
Üye	Doç. Dr. Şükrü GÜNGÖR	
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.**

13/11/2024

Battal ERDOĞAN

ÖZET

Vinkristine Maruz Kalmış Ratlarda Tribulus Terrestrisin Sperma Kalitesi ve Testis Toksisitesi Üzerine Etkileri

Bu çalışma, kemoterapötik ajan vinkristin maruziyetinin erkek Wistar-Albino ratlarda üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkilerini araştırmakta ve bu etkilerin önlenmesinde bitkisel bir ajan olan Tribulus terrestris 'in potansiyel koruyucu etkilerini incelemektedir. Çalışmada, spermatolojik ve histolojik parametreler, DNA hasarı, oksidatif stres göstergeleri ve serum testosteron seviyeleri değerlendirildi. Araştırma, 45 gün boyunca kontrol, yalnızca Tribulus terrestris uygulanan, Tribulus terrestris ile vinkristin birlikte uygulanan ve yalnızca vinkristin verilen rat gruplarında yürütüldü. Vinkristin uygulaması, seminifer tübüllerin çapında ve epitel yüksekliğinde azalma, spermatozoon motilitesi ve sayısında düşüş, DNA hasarı ve histolojik bozukluklarla sonuçlandı. Tribulus terrestris uygulaması ratlarda antioksidan ve hücrel koruyucu etkileriyle vinkristin kaynaklı bu zararları anlamlı ölçüde azalttı. Tribulus terrestris'in seminifer tübül sağlığını koruduğu, spermatoza kalitesini artırdığı ve DNA hasarını önlediği gösterildi. Tribulus terrestris'in etkileri, muhtemelen androjen salınımını artırması ve hücrel antioksidan savunmayı güçlendirmesiyle ilişkilendirili olduğu kanaatine varılmıştır. Bu çalışma, vinkristin tedavisinin üreme sistemi üzerindeki toksik etkilerine karşı Tribulus terrestris'in koruyucu potansiyelini göstermektedir ve bu bitkinin kemoterapi sırasında destekleyici bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Testis toksisitesi, Vinkristin, Tribulus Terrestris, Rat, Spermatozoa

SUMMARY

Effects of Tribulus Terrestris on Sperm Quality and Testicular Toxicity in Vincristine-Exposed Rats

This study investigates the adverse effects of the chemotherapeutic agent vincristine on the reproductive system of male Wistar-Albino rats and examines the potential protective effects of the herbal agent Tribulus terrestris in mitigating these effects. Parameters such as spermatological and histological changes, DNA damage, oxidative stress markers, and serum testosterone levels were evaluated. The experiment was conducted over 45 days with rat groups divided into control, Tribulus terrestris only, combined Tribulus terrestris and vincristine, and vincristine-only groups. Vincristine exposure resulted in reduced seminiferous tubule diameter and epithelial height, decreased sperm motility and count, increased DNA damage, and histological disruptions. Administration of Tribulus terrestris significantly alleviated these damages in rats through its antioxidant and cellular protective effects. It was demonstrated that Tribulus terrestris preserved seminiferous tubule health, improved sperm quality, and prevented DNA damage. The effects of Tribulus terrestris were attributed to its potential to enhance androgen release and strengthen cellular antioxidant defenses. This study highlights the protective potential of Tribulus terrestris against the toxic effects of vincristine on the reproductive system and suggests its use as a supportive agent during chemotherapy.

Keywords: Testicular toxicity, Vincristine, Tribulus Terrestris, Rat, Spermatozoa

ÖNSÖZ

“Vinkristine Maruz Kalmış Ratlarda Tribulus Terrestrisin Sperma Kalitesi ve Testis Toksisitesi Üzerine Etkileri” 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 Prof. Dr. Deniz YENİ hocama, geniş bilgi, deneyim ve imkânlarından faydalandığım çok değerli Prof. Dr. Fatih AVDATEK ve Arş. Gör. Murat KIRIKKULAK hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardımcı olan Doç. Dr. Özay GÜLEŞ’ e, Dr. Öğr. Üyesi Barış DENK’ e, ve tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde 22.SAĞ.BİL.23 no’lu proje olarak destekleyen AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Birimi’ ne teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu günlere gelmemde büyük katkısı olan aileme, çalışmalarım boyunca büyük bir sabır ve özveri gösteren destekleriyle başarılarımda büyük katkısı olan kıymetli eşim Havva ERDOĞAN’ a teşekkür ederim.

Battal ERDOĞAN

Afyonkarahisar

2024

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	II
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	III
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ÖNSÖZ	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÇİZELGELER	XII
RESİMLER	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Ratlarda Reprodüktif Sistem	1
1.1.1. Testis İç Kanalları	1
1.1.2. Tubuli Recti	1
1.1.3. Rete Testis	1
1.1.2. Testis Dışı Kanallar	1
1.1.2.1. Ductuli Efferentes	1
1.1.2.2. Ductus Epididimis	1
1.1.2.3. Ductus Deferens (Vas Deferens)	2
1.1.2.3.1. Tunica Mukoza	2
1.1.2.3.2 Tunica Muscularis	2
1.1.2.3.3 Tunica Adventitia	2
1.1.2.4. Ductus Ejaculatorius	2
1.1.2.5. Üretra	2
1.1.3. Erkek Ek Salgı Bezleri	2
1.1.3.1. Prostat	3
1.1.3.2. Vesicula Seminalis	3
1.1.3.3. Bulbourethral Bezler	3
1.1.3.4 Pıhtılaşma Bezi	3
1.1.4. Penis	4
1.1.5. Spermatogenezis	4
1.1.5.1. Spermatositogenezis	4

1.1.5.2. Mayozis	4
1.1.5.3. Spermiyogenezis	5
1.1.5.3.1. Golgi evresi	5
1.1.5.3.2. Kap Evresi	5
1.1.5.3.3. Akrozom Evresi	5
1.1.5.3.4. Olgunlaşma Evresi	5
1.1.6. Spermatozoon	6
1.1.6.1. Baş	6
1.1.6.2. Boyun	6
1.1.6.3. Kuyruk	6
1.1.6.3.1. Orta kısım	6
1.1.6.3.2. Esas kısım	6
1.1.6.3.3. Son kısım	6
1.1.7. Sperma Toplama, Suni Tohumlama ve Embriyo Transferi	7
1.8. Tribulus terrestris	8
1.9. Tribulus Terrestris ve Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi	11
1.10. Vincristine	13
1.11. Vincristine Ve Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi	14
2. MATERYAL ve METOT	16
2. 1. Deney Hayvanları	16
2. 2. Grupların Oluşturulması	16
2. 3. Doku Örneklerin Alınması	17
2.4. Histolojik incelemeler	17
2.4.1.Histolojik Analizler	17
2.4.2.Histomorfometrik analiz	17
2.4.3.Histolojik değişimler	18
2.4.4.İmmunohistokimyasal analiz	18
2.5. Spermatolojik Muayeneler	18
2.5.1. Spermatozoon Motilitesi	18
2.5.2. Anormal Spermatozoon Oranı	19
2.5.3. HE Test	19
2.6. DNA Hasarı	20
2.6.1. Spermanın Yıkınması	20
2.6.2. Slaytların Hazırlanması ve Spermatozoonların Agoroza Gömülmesi	20
2.6.3. Lizis	21

2.6.4. Elektroforez	21
2.6.5. Nötralizasyon	21
2.6.6. Boyama	21
2.6.7. Slaytların Değerlendirilmesi	21
2.7. İstatistiksel Analiz	22
3. BULGULAR	23
3.1. Histomorfometrik Bulgular	23
3.2. Histolojik Değişimler	24
3.3.İmmunohistokimyasal Bulgular (Caspase 3 Boyanma Yoğunluğu)	27
3.4. Spermatolojik Parametrelere Ait Bulgular	28
3.5. DNA Hasarına Ait Bulgular	29
3.6. Testis Ölçülerine Ait Bulgular	29
4. TARTIŞMA	30
5. SONUÇ	36
6. KAYNAKLAR	37
7. EKLER	Hata!
Yer işareti tanımlanmamış.	
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

<: Küçüktür

=: Eşittir

>: Büyüktür

±: Artı eksi

°C: Santigrat derece

μl: Mikrolitre

ANOVA: Analysis of Variance (ANOVA)

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DTT: Dithioerithrol

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid

FSH: Follicle stimulating hormone

g: Gram

GnRH: Gonadotropin releasing hormone

HE: Hipo ozmotik Eozin boya

HOS: Hipo ozmotik şişme

IVF: İn vitro fertilizasyon

kg: Kilogram

LH: Lüteinleştirici hormon

LMA Low melting agar

M: Molar

mA: Miliamper

mg: Miligram

Mg⁺²: Magnezyum iyonu

mL: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

nm: Nanometre

p: Anlamlılık (önemlilik) testine ilişkin olasılık değeri

PBS: Phosphate Buffered Saline

pH: Potansiyel hidrojen

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

x: Çarpı

µg: Mikrogram

ÇİZELGELER

SAYFA

Çizelge 3.1: Vinkristin Kaynaklı Toksisite Erkek Sıçanlarda Tribulus'un Seminifer Tübüllerin Histomorfometrik Analizleri Üzerindeki Etkisi	23
Çizelge 3.2: Erkek Rat Testislerinde Histolojik Değişim Skor Değerleri	26
Çizelge 3.3: Kontrol ve deneme gruplarında caspase-3 boyanma yoğunluğu	27
Çizelge 3.4: Gruplara ait Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranları	28
Çizelge 3.5: Gruplara ait DNA Hasarları	29
Çizelge 3.6: Gruplara ait testis parametreleri	29



RESİMLER

SAYFA

Şekil 1.1 : Tribulus Terrestris	11
Şekil 1.2: Vincristin Yapısı	14
Şekil 3.1: Kontrol ve deneme gruplarına ait testis dokularında seminifer tubulus görüntüleri	24
Şekil 3.2: Kontrol ve T gruplarına ait testis dokularında seminifer tubulus görüntüleri	25
Şekil 3.3: T+V grubuna ait testis dokusunda seminifer tubulus görüntüleri	25
Şekil 3.4: V grubuna ait testis dokusunda seminifer tubulus görüntüleri	26
Şekil 3.5: V grubuna ait testis dokusunda seminifer tubulus görüntüleri	26
Şekil 3.6: Kontrol ve deneme gruplarına ait testis dokularında seminifer tubuluslarda caspase-3 pozitif hücreler	27



1. GİRİŞ

1.1. Ratlarda Reprodüktif Sistem

Erkek genital sistemin 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, ductus epididimis, ductus deferens, ductus 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).

1.1.1. Testis İç Kanalları

1.1.2. 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. Rete Testis

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

1.1.2. Testis Dışı Kanallar

1.1.2.1. 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).

1.1.2.2. Ductus 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).

1.1.2.3. Ductus 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).

1.1.2.3.1. Tunica Mukoza

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

1.1.2.3.2 Tunica Muscularis

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

1.1.2.3.3 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).

1.1.2.4. Ductus Ejaculatorius

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

1.1.2.5. Üretra

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

1.1.3. 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).

1.1.3.1. 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).

1.1.3.2. Vesicula Seminalis

Duvar yapısı dairesel bir kas tabakasından oluşur ve epitel tek tabakalı silindriktir. 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. Bulbourethral Bezler

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).

1.1.3.4 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).

1.1.4. 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).

1.1.5. 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).

1.1.5.1. Spermatositogenezis

Spermatogoniumların mitoz bölünmesi sonucunda primer spermatositlerin oluştuğu ve hücrelerin sayıca arttığı süreci kapsar. Pubertas öncesinde primordial germ hücreleri olarak bulunan spermatogoniumlar pubertasın 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).

1.1.5.2. 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 (Vernet vd., 2016).

1.1.5.3. 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).

1.1.5.3.1. 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).

1.1.5.3.2. 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).

1.1.5.3.3. 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).

1.1.5.3.4. 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).

1.1.6. 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).

1.1.6.1. 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, döllenme sırasında zona pellucida'nın delinmesi için gereklidir. (Kim vd., 2017). Ratların spermatozoon başı kanca şeklindedir (Creasy ve Chapin, 2013).

1.1.6.2. Boyun

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

1.1.6.3. Kuyruk

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

1.1.6.3.1. 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).

1.1.6.3.2. 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).

1.1.6.3.3. 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).

1.1.7. 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 elektroejakulator 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 kısrağ serum gonadotropini (PMSG) ve ardından farelerde kullanılabilecek benzer bir şekilde insan koryonik gonadotropin (HCG) kullanılarak gerçekleştirilir. Embriyo manipülasyonu 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 Serum (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 döllenme 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).

1.8. Tribulus terrestris

Tribulus terrestris (Zygophyllaceae familyası), yaygın olarak Gokshur veya Gokharu veya ponksiyon asması olarak bilinir, hem Hint hem de Çin tıp sistemlerinde çeşitli hastalıkların tedavisi için uzun zamandır kullanılmaktadır. Çeşitli kısımları, flavonoidler, flavonol glikozitler, steroidal saponinler ve alkaloidler gibi tıbbi açıdan önemli olan çeşitli kimyasal bileşenler içerir. Diüretik, afrodizyak, antiürolitik, immünomodülatör, antidiyabetik, emilim artırıcı, hipolipidemik, kardiyotonik, merkezi sinir sistemi, hepatoprotektif, anti-inflamatuar, analjezik, antispazmodik, antikanser, antibakteriyel, antihelmintik, larvisidal ve antikaryojenik aktivitelere sahiptir. Son birkaç on yıldır, biyolojik aktivitelerini ve özütlerinin farmakolojisini kanıtlamak için kapsamlı araştırma çalışmaları yapılmıştır. Bu incelemenin amacı, bu bitkinin keşfedilen fitokimyasal ve farmakolojik özelliklerinin daha fazla araştırılması için bir veri tabanı oluşturmak ve araştırmayı teşvik etmektir. Bu, geleneksel kullanımının yanı sıra katma değerli faydasının doğrulanmasına yardımcı olacak ve sonunda bitkiden daha yüksek gelir elde edilmesine yol açacaktır (Chhatre vd., 2014).

Geniş bir coğrafi çevre boyunca dağılmıştır. Hindistan'ın her yerinde, Keşmir, Seylan ve her iki yarımkürenin tüm sıcak bölgelerinde 11.000 ft'ye kadar bulunur. Hindistan'daki Batı Rajasthan ve Gujarat dahil olmak üzere sıcak, kuru ve kumlu bölgelerde, mera arazilerinin, yol kenarlarının ve diğer atık yerlerin yaygın bir yabancı otudur (Kokate, 2007).

Küçük, yatay, 10-60 cm yüksekliğinde, tüylü veya ipeksi tüylü bir çalıdır. Yapraklar karşılıklı, genellikle eşitsiz, çift kanatlı; beş ila sekiz çiftten oluşan pinnalar, eliptik veya dikdörtgen mızrak şeklinde (Şekil 1). Çiçekler sarı renktedir. Karpel meyveleri karakteristik, yıldız şeklinde, biraz yuvarlak, basık, beş köşeli ve çok açık sarı renkte

dikenlerle kaplıdır. Her çiğdem içinde aralarında enine bölmeler bulunan birkaç tohum vardır. Tohumlar yağlı yapıdadır. Tazeyken kök ince, lifli, silindirik, sık dallı, çok sayıda küçük kökçük taşır ve açık kahverengi renktedir. Meyveler ve kökler çoğunlukla çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için halk ilacı olarak kullanılır. Kök parçalar halinde bulunur, 7-18 cm uzunluğunda ve 0,3-0,7 cm çapında, silindirik, lifli, sık dallı, çok sayıda küçük kökçük taşır, sert, odunsu, sarıdan açık kahverengiye kadar renkte, küçük nodüllerin varlığı nedeniyle yüzeyi pürüzlüdür; kırık liflidir; kokulu aromatiktir; tadı tatlımsı büzücüdür. Bitkinin meyveleri Çin'de "Chih-hsing" veya ABD'de keçi başı olarak bilinir. Dikenli meyve bir ineğin çatallı toynağı gibi görünür ve bu nedenle go-ksura (inek toynağı) olarak bilinir. Meyveler dikenli, soluk yeşilimsi sarıdır. Küreseldirler, beş, neredeyse tüysüz, murikulat, kama biçimli, odunsu koklardan oluşurlar, her biri iki çift sert, keskin dikene sahiptir, bir çift diğerinden daha uzundur. Omurgaların uçları neredeyse çiftler halinde birleşerek meyvenin etrafında beşgen bir çerçeve oluştururlar. Şizokarpın dış yüzeyi pürüzlüdür. Her kokta birkaç tohum vardır, aralarında enine bölmeler vardır. Meyvelerin kokusu hafif aromatiktir ve tadı hafif acıdır (Chhatre vd., 2014).

TT halk ilaçlarında tonik, afrodisyak, palyatif, büzücü, mideyi rahatlatan, antihipertansif, diüretik, litotriptik ve idrar dezenfektanı olarak kullanılır. Bitkinin kurutulmuş meyvesi genitoüriner sistem rahatsızlıklarının çoğunda oldukça etkilidir. Genitoüriner sistemin düzgün işleyişini desteklemek ve idrar taşlarını çıkarmak için kullanılan güçlü bir Ayurveda ilacı olan *Gökshuradi Guggul'un* hayati bir bileşenidir. TT, Ayurveda'da yüzyıllardır iktidarsızlığı, zührevi hastalıkları ve cinsel zayıflığı tedavi etmek için kullanılmıştır. Bulgaristan'da bitki iktidarsızlığı tedavi etmek için halk ilacı olarak kullanılıyor. Tüm bu uygulamalara ek olarak Hindistan Ayurvedik Farmakopesi, kök ve meyveye kardiyotonik özellikler atfeder. Geleneksel Çin tıbbında meyveler göz sorunları, ödem, karın şişliği, emisyon, hastalıklı lösoire ve cinsel işlev bozukluklarının tedavisinde kullanılıyordu. TT, Shern-Nong Farmakopesi'nde (Çin'de bilinen en eski farmakolojik çalışma), çökmüş karaciğerin onarılmasında, göğüste dolgunluk, mastit, şişkinlik, akut konjonktivit, baş ağrısı ve vitiligo tedavisinde oldukça değerli bir ilaç olarak tanımlanmaktadır. Unani tıbbında TT diüretik, hafif müshil ve genel tonik olarak kullanılır (Khare, 2007). Ülkemizde kullanılan Türkçe isimleri ; Demir diken, Çoban çökerten, Demirleyen, Deve çökerten, Çarık diken ve Demir bıtıracağı şeklindedir.

Türün Sistematikteki Yeri

Bölüm :.....Spermatophyta

Alt bölüm :.....Angiospermae

Sınıf :.....Dicotyledoneae

Takım:.....Zygophyllales

Familya :.....Zygophyllaceae

Cins :.....Tribulus

Tür :.....Tribulus terrestris



Şekil 1.1 : Tribulus Terrestris (Chhatre vd., 2014)

1.9. Tribulus Terrestris ve Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi

Tribulus terrestris'in libido ve ereksiyon fonksiyonu üzerindeki etkisinin aksine, bu bitkinin sperma parametrelerini, yani sayı, hareketlilik ve morfolojiyi iyileştirme yeteneği, gerçekleştirilen klinik çalışmaların çoğunda gösterilmiştir (Roaiah vd. 2017; Salgado vd., 2017, Sanagoo vd., 2019). Hayvan ve in vitro çalışmalar ayrıca *Tribulus terrestris*'in sığırcılarda (Martino-Andrade vd., 2010; Kumari ve Singh 2015; Sahin vd., 2016; Salahshoor vd., 2020), koçlarda (Kistanova vd., 2005), çiftlik hayvanlarında (Clément vd., 2012) ve insanlarda (Asadmobini vd.,

2017; Khaleghi vd.; 2017) sperm miktarını ve kalitesini artırabildiğini göstermiştir. Koçlarda *Tribulus terrestris* fertilitiyi artırmıştır (Kistanova vd., 2005).

Tribulus'un spermatozoon üzerindeki olumlu etkisi, erkek üreme organlarının aktivasyon belirtileriyle ilişkilendirilmiştir. En azından, *Tribulus terrestris* farelerde testis ağırlığını artırmış ve spermatogenezisi yeniden kazandırmıştır (Kumari ve Singh, 2015). Demir dikenli, sıçan testisinde Leydig, spermatogonia ve spermatid hücrelerinin sayısını artırmıştır (Haghmorad vd., 2019). Benzer şekilde, *Tribulus*'un ana fitokimyasal ajanı olan protodioscin, Sertoli ve germ hücrelerinin çoğalmasını teşvik edebilir ve bu durum seminifer tübüllerin büyümesi ve işlevini destekler (Salgado vd., 2017). Diğer yandan, *Tribulus terrestris* ekstresinin sıçan prostatı, seminal veziküllerinin ağırlığı ve histostrüktürü ile seminifer tübülün germinal tabaka yüksekliği üzerinde bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır (Martino-Andrade vd., 2010; Sahin vd., 2016; Salahshoor vd., 2020).

Tribulus terrestris'in erkek üreme süreçleri üzerindeki etkileri, üreme dışı süreçlerdeki ekstra ve hücre içi araçlarla benzer yollarla gerçekleşebilir. Araştırmalardan elde edilen bazı (ancak tümü değil) bulgular, *Tribulus terrestris*'in gonadotropinler ve androjenler gibi üreme hormonlarının salınımını artırarak erkek üreme süreçlerini etkileyebileceğini göstermiştir. Örneğin, sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, *Tribulus terrestris* tedavisinin plazmadaki LH (luteinize edici hormon) ve testosteron seviyelerini artırdığı rapor edilmiştir (Haghmorad vd., 2019; Salahshoor vd., 2020). Ancak bazı çalışmalar, *Tribulus*'un testosteron seviyelerini artırırken LH ve FSH üzerinde etkisi olmadığını ortaya koymuştur (Sahin vd., 2016). İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda da, *Tribulus*'un dihidrotestosteron (DHT) ve testosteron seviyelerini artırabileceği görülmüştür (Selgado vd., 2017; Sahin vd., 2016; Roaiah vd., 2017).

Ancak, diğer araştırmalar *Tribulus terrestris*'in androjen salınımını artırıcı etkisini tespit edememiştir (Martino-Andriade vd., 2010; Ma vd., 2017). Bu durum, *Tribulus terrestris*'in erkek üreme sistemini destekleyici etkilerinin androjen artışı ile ilişkili olmayabileceğini düşündürmektedir. Bazı hipotezler, bitkinin beyin yapıları üzerindeki etkilerini ön plana çıkarır. Örneğin, *Tribulus*'un sıçan beyinlerindeki nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-diaphoraz aktivitesini ve androjen reseptörü immünoreaktivitesini

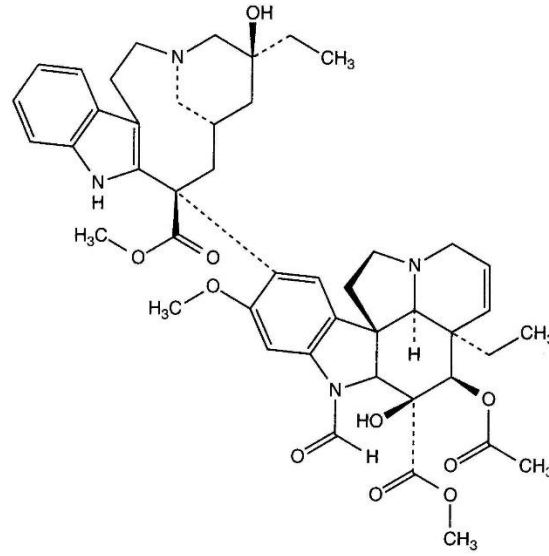
artırdığı gözlenmiştir (Gauthman ve Adaikan, 2005). Bu durum, bitkinin androjen üretiminden çok, androjen reseptörlerini ve beyin yapılarını etkileyerek erkek üreme süreçlerini iyileştirebileceğini düşündürmektedir.

Tribulus terrestris, testiküler hücrelerin proliferasyonunu ve spermatogenezi artırarak sperm üretimini iyileştirebilir. Bu durum, sıçanlarda (Haghmorad vd., 2019), farelerde (Kumari ve Singh, 2015) ve insanlarda (Salgado vd., 2017) rapor edilmiştir. Ayrıca, *Tribulus terrestris*'in sıçanlarda üreme davranışı ve testosteron salınımını teşvik ettiği ve bu etkilerin NF- κ B transkripsiyon faktörünün azaltılması, NF-E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) ve hem oksijenaz-1 (HO-1) seviyelerinin artışı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Sahin vd., 2016). Bu bulgular, *Tribulus*'un libido ve androjen salınımındaki etkilerinde hücre içi sinyal yollarının rol oynayabileceğini göstermektedir.

Ayrıca, *Tribulus terrestris*'in sperm kalitesini artırıcı etkisi, bitkinin antioksidan özellikleriyle ilişkilendirilebilir. Antioksidanlar genellikle sperm kalitesini artırır. Fare testislerinde antioksidan enzimlerin konsantrasyonunu ve antioksidan aktiviteyi artırdığı, spermatozoonun oksidatif strese karşı direncini artırdığı bildirilmiştir (Kumari ve Singh, 2015, Salahshoor vd., 2020). Bu etkiler, bitkinin reaktif oksijen türlerini temizleme kapasitesine bağlanabilir (Clément vd., 2012).

1.10. Vincristine

Vinkristin (C₄₆ H₅₆ N₄ O₁₀), kanser için en yaygın kullanılan etkili tedavi edici maddelerden biridir. Deniz salyangozu bitkisinden elde edilen bir indoleindolin alkaloididir. Vinkristin lösemi, lenfoma ve testis kanserinin tedavisinde önemli bir klinik ajandır. Bu ilaçların biyolojik aktiviteleri, spesifik olarak tübüline bağlanma ve proteinin mikrotübüller halinde polimerize olma yeteneğini bloke etme yetenekleriyle açıklanabilir. Mitotik aygıtın mikrotübüllerinin bozulmasıyla hücre bölünmesi metafazda durdurulur. Sağlam bir mitotik milin yokluğunda, kromozomlar sitoplazma boyunca dağılabilir (patlamış mitoz) veya toplar veya yıldızlar gibi olağandışı gruplar halinde kümelenebilir. Mitoz sırasında kromozomların doğru şekilde ayrılamaması, muhtemelen kromozomal mutasyon nedeniyle hücre ölümüne yol açmaktadır (Chaudhari vd., 2014).



Şekil 1.2: Vincristin Yapısı

1.11. Vincristine Ve Sperma Kalitesi Üzerine Etkisi

Yapılan birçok çalışmada VCR vücut ağırlığında önemli bir azalmaya neden olduğu görülmüştür (Cooke vd., 1978; Chinoy ve Geetha Ranga, 1983; Stanley, 1993). Ratlarda yapılan çalışmalarda, VCR'den kaynaklı testosteron seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (Chinoy ve Geetha Ranga, 1983; Sherins vd., 1978). VCR ile ilgili yapılan çalışma, üreme sistemi üzerindeki toksisiteyi güçlü bir şekilde ortaya koymuştur ve spermatogenik döngüdeki bazı aşamaların diğerlerinden daha hassas olduğunu, spermatojenik bölmeyi doza ve süreye bağlı bir şekilde etkileyebileceğini göstermektedir (Chaudhari vd., 2014). Kanser kemoterapisinde kullanıldığında VCR'nin etki mekanizması, hücre bölünmesinin engellenmesi şeklinde olmaktadır (Dustin, 1984). Spermatojenik bölmedeki patolojik değişiklikler VCR'nin bu etki mekanizmasına bağlanabilir. Primer spermatositlerden spematidlerin oluşumu mayoz bölünmeyi içerir. Böylece VCR, seminifer epiteldeki tüm bölünme aşamalarında mitotik/mayotik tutulma yoluyla etki edecektir. Kök hücrelerin spermatogonia'nın tüm aşamaları boyunca birincil spermatositlere farklılaşması, birkaç mitoz döngüsünü içerir (Russell vd., 1995). Yüksek dozda VCR ile tedavi edilen gruplarda, seminifer tübüllerin boyutunda önemli bir azalma gözlemlenirken şeklinde de bozukluklar meydana geldi (Joshi ve Ambaye 1968; Murugavel ve Akbarsha 1991; Stanley ve Akbarsha, 1992). Seminifer tübüllerin gerilemesi ve düzenli konfigürasyonunun kaybı, VCR'nin antiandrojenik özelliğine işaret etmektedir. Düşük

doz VCR uygulanan sıçanlarda 10 gün boyunca seminal vezikülde sekresyon epitelinin hafif hasar görmesi sonucu asiner boşlukların kısmen sekresyonla dolduğu görülmüştür. İntertübüler bağ dokularındaki orta derecede artışa bağlı olarak asiner boyutta bir miktar azalma görülmüştür. Gerileyen sekreter epitelinin supranükleer bölgesinde vakuolasyonun yaygınlığı, doğrudan sekreter aktivitesinin tükendiğini ve dolayısıyla lümende yetersiz sekresyonun olduğu belirlenmiştir. VCR'nin yüksek doz, Seminifer tübüller arası bağ dokusunda büyük bir artışa neden oldu ve Seminifer tübüllerin boyutunun daha da azalmasına neden oldu. Epitelyal hasar, yüksek doz tedavisinde daha belirgin olduğu tespit edildi. Bu durum, supra nükleer bölgeden salgı granüllerinin kaybı ve tübüllerin çoğundan salgılamının tamamen kaybıyla sonuçlanmıştır (Chaudhar vd., 2014). VCR ile tedavi edilen sıçanlarda prostat bezinin tamamen gerilediği, kalan bezde foliküllerin gerilediği, epitelin tamamen düzensiz olduğu ve dejenere görüldüğü ve gevşek hücrelerin kolloidle karışmak üzere lümene ulaştığı görülmüştür. Bu tür foliküllerde yalancı çok katlı epitelyumun inceldiği görülmüştür (Akbarsha vd., 1995). Benzer şekilde, 10 günlük düşük doz VCR tedavisinde Seminifer tübüller arası bağ dokusundaki artışa bağlı olarak prostat asinüsünde atrofi ortaya çıkmıştır, epitellerde düzensizliklerle beraber bir miktar dejenerasyon belirlenmiştir (Chaudhari vd., 2014).

Yapılan bu çalışmanın amacı; Vinkristin 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 Tribulus terrestrisin etkinliğini ortaya koymaktır.

2. MATERYAL ve METOT

2. 1. Deney Hayvanları

Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' nun 04.10.2022 Tarihli ve 49533702/91 sayı no'lu izni ile yapıldı. Çalışmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ünitesinden temin edilen 28 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 45 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 22.SAĞ.BİL.23 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

2. 2. Grupların Oluşturulması

Deney hayvanları her kafeste 7 hayvan olacak şekilde Kontrol, Tribulus Terrestris (TT), Tribulus Terrestris+Vincristine (TT+V), Vincristine (V) olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

1.Kontrol Grubu (n=7) : Bu gruptaki ratlar 45 gün boyunca her gün standart rat yemi ve su ile beslendi.

2.Tribulus Terrestris (TT) Grubu (n=7) : Bu gruptaki ratlara 45 gün boyunca her gün aynı saatte 10 mg/kg dozunda TT, distile su ile çözündürülerek gastrik gavaj yoluyla verildi.

3.Tribulus Terrestris+Vincristine (TT+V) Grubu (n=7) : Bu gruptaki ratlara 45 gün boyunca her gün aynı saatte önce 10 mg/kg dozunda TT distile su ile karıştırılarak gastrik

gavaj yoluyla verildi, daha sonra 6 hafta boyunca haftada 1 doz 0,2 mg/kg dozunda vincristine, intraperitoneal yolla uygulandı.

4.Vincristine (V) Grubu (n=7) : Bu gruptaki ratlara 6 hafta boyunca haftada 1 doz aynı gün aynı saatte 0,2 mg/kg dozunda vincristine, intraperitoneal yolla uygulandı.

2. 3. Doku Örneklerin Alınması

Epididimislerden alınan sperma örnekleri ile frotiler hazırlandı ve spermatolojik parametrelere bakılmak üzere laboratuvara götürüldü. Sağ testis ve epididimis histolojik değerlendirilmeler yapılmak üzere histoloji laboratuvarına teslim edildi (Ohkawa vd., 1979).

2.4. Histolojik incelemeler

Histolojik incelemeler için sağ testisler 24 saat boyunca Bouin's solüsyonunda tespit edildi. Daha sonra doku örnekleri sırasıyla %50'lik alkolde 48 saat ve %70'lik alkolde 12 saat bekletildikten sonra %80'lik alkole alındı ve rutin doku takip işlemi uygulanarak parafinde bloklandı (Howroyd vs., 2005).

2.4.1.Histolojik Analizler

Hazırlanmış olan parafin bloklardan 300 µm ara ile 6 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Seri alınan kesitlere histomorfometrik analiz için periyodik asit Schiff (PAS) boyama metodu, histolojik değişimleri belirlemek amacıyla hematoksilin-eosin (H&E) boyama metodu, apoptozis için ise strept avidin-biyotin kompleks (sABC) boyama metotları uygulandı (Culling vs., 1985).

2.4.2.Histomorfometrik analiz

Periyodik asit Schiff (PAS) boyama metodu ile boyanan testis parafin kesitlerinde spermatogenetik siklusun 7-8. dönemindeki seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği ile 14. dönem tubulus % yoğunluğu belirlendi. Bu amaçla her hayvandan alınan seri iki kesitin her birinde rastgele olarak seçilen yuvarlak veya yuvarlağa yakın 10'ar adet spermatogenetik siklusun 7-8. dönemindeki seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği (spermatogenetik hücrelerin oluşturduğu katmanın yüksekliği) ölçüldü (Güleş vs., 2019; Güleş vs., 2022). Bu amaçla her tubulusun dört farklı bölgesinden seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği ölçülüp, ortalaması hesaplandı. Ayrıca her kesitte 100 adet olmak üzere her hayvan için toplam 200 adet tubulus rastgele olarak incelenerek, 14. dönem tubulus % yoğunluğu hesaplandı (Güleş vs., 2019; Güleş vs., 2022, Narayana vs., 2006).

2.4.3.Histolojik değişimler

Her hayvandan alınan iki kesite hematoksilin-eosin (H&E) boyama metodu uygulandı. Işıık mikroskobunda (Leica DMLB, Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK) incelenen preparatlar epitel dejenerasyon, vakuolizasyon, atrofi, konjesyon ve ödem açısından semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Bu amaçla her kesitte beş alan incelendi. İnceleme sonucunda histolojik değişimlerin değerlendirilmesi amacıyla subjektif puanlama (0: Hiçbir hasar yok, 1: Az hasar, 2: Orta derecede hasar, 3: Yoęun derece hasar) yapıldı.

2.4.4.İmmunohistokimyasal analiz

Her hayvandan 300 µm ara ile 6 µm kalınlığında organosilan ile kaplanmış lamlara alınan iki kesite apoptozis yoğunluğunun belirlenmesi için sABC boyama metodu uygulandı. Bu amaçla anti-caspase 3 poliklonal primer antikoru (Cloud-Clone Ceerp., Katolog no: PAA626Ra01, TX 77494, USA) kullanıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Leica DMLB, Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK) ile incelendi ve kahverengi presipitasyonun görölmesi, reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi. Her hayvan için alınan iki kesitte caspase-3'ün dokudaki boyanma yoğunlukları semi-kantitatif olarak belirlendi (Güleş vs., 2019). Bu amaçla her kesitte beş alan incelendi. İnceleme sonucunda pozitivitenin değerlendirilmesi amacıyla subjektif puanlama (0: Hiçbir hücrede boyanma yok, 1: Az sayıdaki hücrede boyanma, 2: Hücrelerde orta derecede boyanma, 3: Hücrelerde yoğun derece boyanma) yapıldı.

2.5. Spermatolojik Muayeneler

2.5.1. Spermatozoon Motilitesi

Testisler alındıktan sonra, yapışık yağ, bağ dokusu ve kan damarları çıkarıldı. Her bir hayvanın testislerini, kanın dışarı çıkmasını sağlamak amacıyla izotonik tuzlu su çözeltisi içeren içi boş bir kaba alındı. Sol kauda epididimis bir pens ile sıkıştırılırken ince uçlu makas kullanılarak uzunlamasına kesildi. Spermatozoon, fosfat tamponlu salin (PBS) içeren Petri kaplarında kauda epididimis ufak parçalar şeklinde kesilerek Sperma alındı. Motilitenin belirlenmesi için 37°C' ye sabitlenen ısıtma tablasına bir lam konuldu. Lam üzerine 10 mikrolitre (µl) büyüklüğünde sperma konuldu 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 % olarak belirlendi (Avdatek vd., 2018).

2.5.2. Anormal Spermatozoon Oranı

Sperma numunesindeki anormal spermatozoon oranı Giemsa boya ile boyanıp değerlendirildi. Lam üzerine bir damla sperma örneğinden damlatıldı. 45 derecelik açıyla farklı bir lamla periferik yayma işlemi uygulandı. Sonrasında yatay olarak kurumaya bırakıldı. Ardından alkolle fikze edilip kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminin tamamlanmasından sonra boyama işlemine geçildi. Giemsa boyası pipetle lamın üzerini kaplayacak biçimde damlatıldı. Kırk beş dakika süreyle bekletildi. Bekleme süresi sonunda lam numunenin olduğu tarafın tersinden suya tutuldu. Yıkanan lam dik bir biçimde kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminin tamamlanmasından 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).

2.5.3. HE Test

Ölü-canlı spermatozoon oranı ve hipo-ozmotik şişme testinin beraber 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 aktarıldı. Ardından eozin boyası ilave edildi ve karışım 37°C'lik su banyosunda 30 dakika süreyle inkübasyona 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 almadığına ve kuyrukta şişme olup olmadığına 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 hazırlanması:

0,9 g Fruktöz

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

Eosin boyasının hazırlanması:

1,67 g Eosin-Y

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

2.6. DNA Hasarı

Spermatozoondaki DNA hasarının belirlenmesi için comet assay yöntemi kullanıldı. Comet assay yönteminin başka bir adlandırılması ise Single Cell Gel Electrophoresis yöntemidir. Bu yöntem ile tek tek spermatozoonların çift iplikli DNA hasarının 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).

2.6.1. Spermanın Yıkınması

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

2.6.2. Slaytların Hazırlanması ve Spermatozoonların Agoroza Gömülmesi

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

2.6.3. Lizis

Hazırlanan slaytlar yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan içeren taze olarak 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 olarak 1 saat süre ile inkübe edildi. Daha sonra lizis solüsyonuna 40 mM dithioerithrol (DTT) ilave edilerek slaytlar +4 °C'de yine 1 saat olacak şekilde inkübe edildi. Ardından 100 µg/ml proteinase K lizis solüsyonu eklenen slaytlar 37 °C'de iki gece inkübe edildi (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

2.6.4. Elektroforez

Hücrelerin lizis işleminin ardından 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 aşamasının ardından 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).

2.6.5. Nötralizasyon

Elektroforez işleminin ardından slaytlardaki alkali elektroforez çözeltisini taze hazırlanmış olan Tris tamponuyla (40 mM Tris HCl, pH 7.4) yıkanılarak nötralizasyon sağlandı (Hughes vd., 1997; Singh vd., 2003).

2.6.6. Boyama

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

2.6.7. Slaytların Değerlendirilmesi

Ethidium bromide ile boyanan slaytlar üstüne lamel kapatılarak 400x büyütme floresan atamalı mikroskop (Olympus CX-31) ile 100 adet DNA iplikçığının görüntüsü değerlendirildi. Floresan mikroskobu altında slaytlar incelendi ve TriTek CometScore yazılım versiyonu 1.5 (TriTek Corp., Sumerduck, VA, ABD) kullanılarak bir kuyruklu yıldız testi ile sonraki analizler / skorelama için dijital görüntüler saptandı. Toplam 100 sperm hücresi için beş parametre her slaytta incelendi. Bütün çalışmalar daha fazla kromatin dejenerasyonuna karşı korunmak için karanlık oda şartlarında yapıldı (Avdatek vd., 2018).

2.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 22.00 paket programı ile gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi kullanılarak yapıldı. Normal dağılım göstermeyen gruplar arası farklılık Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi uygulandı. Normal dağılım gösteren gruplar arası farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, farkların önem kontrolü ise post hoc Duncan testi ile yapıldı. Yapılan istatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlardan * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olan değerler önemli kabul edildi ve tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi (Conover, 1980)



3. BULGULAR

3.1. Histomorfometrik Bulgular

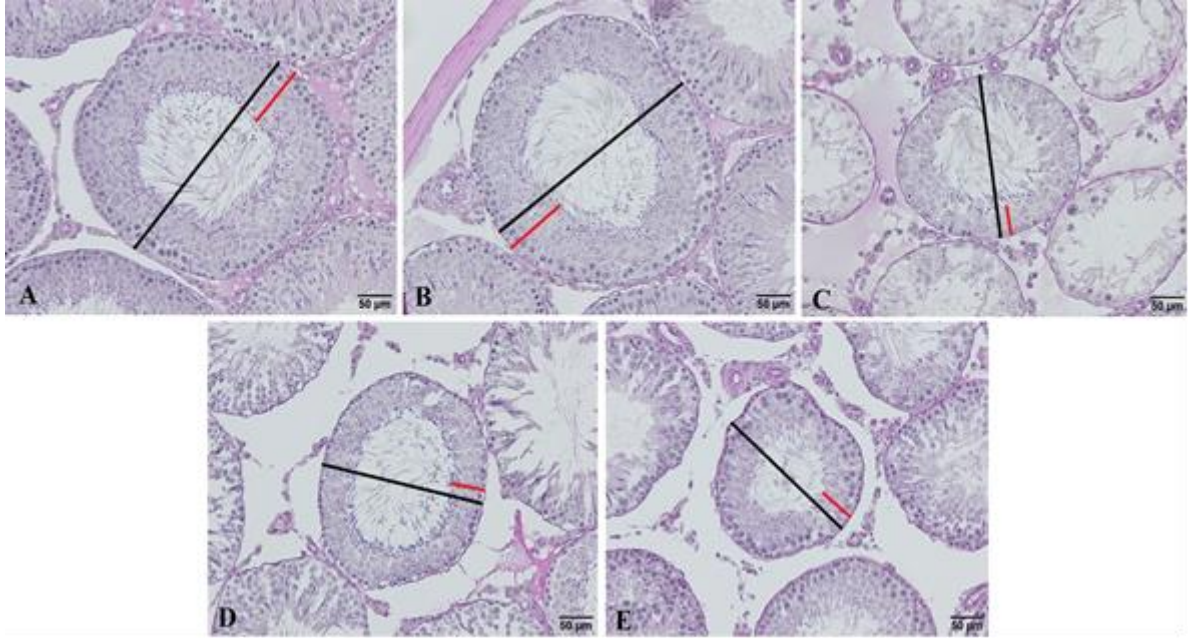
Kontrol ve deneme gruplarına ait VII-VIII. dönem ortalama seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği değerleri ile XIV. dönem tubulus % yoğunluk değerleri Tablo 1’de gösterildi. Seminifer tubulus çapı açısından yapılan incelemede, kontrol ve T grubuna kıyasla T+V, V grubunda tubulus çapının anlamlı bir şekilde azaldığı, en düşük tubulus çapının V grubunda olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Seminifer tubulus epitel yüksekliği ise kontrol ve tribulus grupları arasında farklılık göstermezken T+V, V gruplarında anlamlı derecede daha düşük olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). XIV. dönem tubulus yoğunluk (%) değerleri açısından yapılan incelemelerde ise, kontrol, T ve T+V grupları arasında önemli bir fark yokken ($p>0.05$), V gruplarında kontrol ve T gruplarına göre anlamlı oranda azalma belirlendi ($p<0.001$).

Çizelge 3.1: Vinkristin Kaynaklı Toksisite Erkek Sıçanlarda Tribulus'un Seminifer Tübüllerin (Yükseklik Ve Çap; μm) Histomorfometrik Analizleri Üzerindeki Etkisi.

Gruplar	Stage VII-VIII Seminifer Tubulus Çapı (μm) ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	Stage VII-VIII Seminifer Tubulus Epitel Yüksekliği (μm) ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	Stage XIV Tubulus Yoğunluğu (%) ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)
Kontrol	323.37 ± 2.67^a	73.35 ± 0.78^a	5.67 ± 0.47^a
TT	326.85 ± 2.81^a	74.68 ± 0.68^a	5.50 ± 0.76^a
TT+V	232.39 ± 3.63^c	52.24 ± 1.02^b	4.13 ± 0.55^{ab}
V	242.38 ± 3.22^b	53.71 ± 0.92^b	2.88 ± 0.35^{bc}
P	*	*	*

a,b,c,d Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası fark istatistiksel olarak önemlidir.

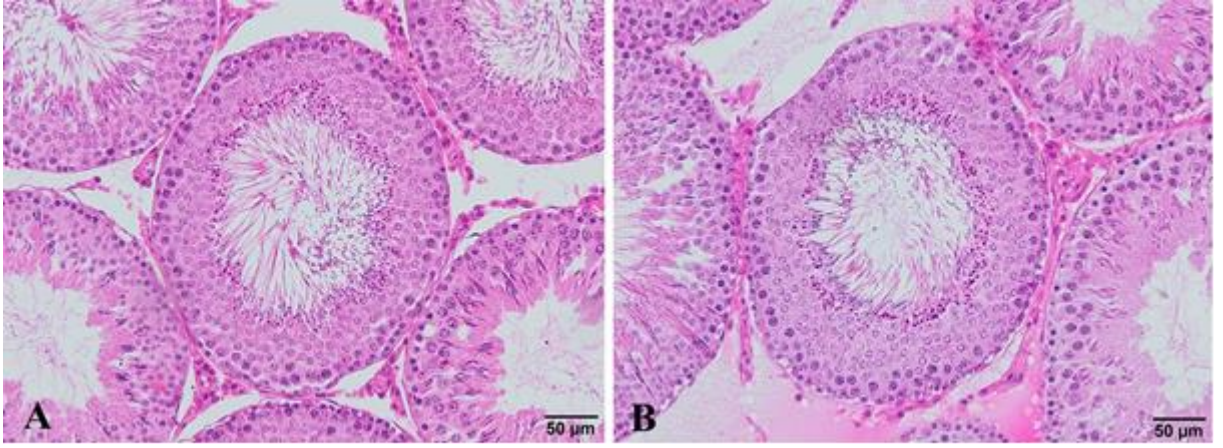
***: $P<0.001$, Tri: tribulus, V: vincristine, n: rat sayısı, $\bar{x}$: ortalama, $S\bar{x}$: standart hata.



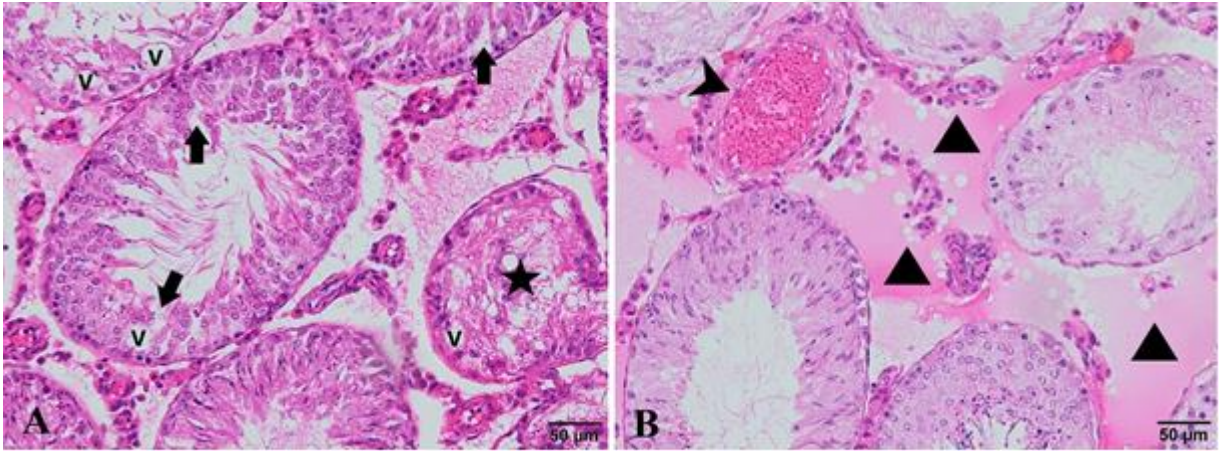
Şekil 3.1: Kontrol ve deneme gruplarına ait testis dokularında seminifer tubulus görüntüleri. A: Kontrol grubu, B: T grubu, C: T+V grubu, D-E: V grubu, Siyah çizgi: Seminifer tubulus çapı, Kırmızı çizgi: Seminifer tubulus epitel yüksekliği. PAS boyama metodu.

3.2. Histolojik Değişimler

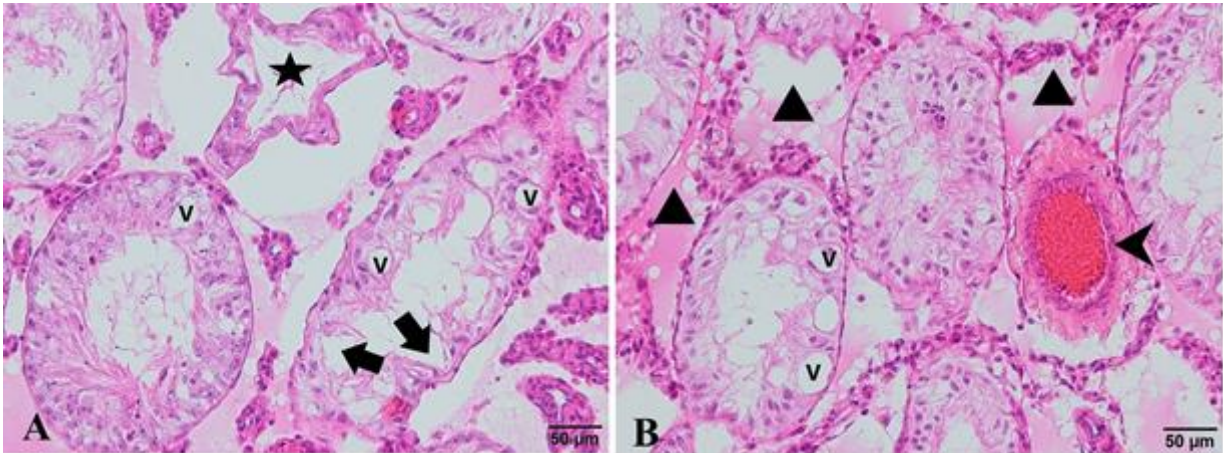
Seminifer tubuluslarda epitel dejenerasyon, vakuolizasyon ve atrofi açısından yapılan incelemede T+V, V grupları arasında anlamlı fark bulunmazken, aynı şekilde kontrol ve T grupları arasında da anlamlılık yoktur. Ayrıca T+V, V gruplarındaki hasarın kontrol ve T gruplarına göre önemli derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). İntertisyel alanda konjesyon ve ödem açısından yapılan incelemede ise T+V, V gruplarındaki hasarın kontrol ve T gruplarına göre önemli derecede yüksek olduğu ($p<0.001$), kontrol ve T grupları arasında ise önemli bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) gözlemlendi.



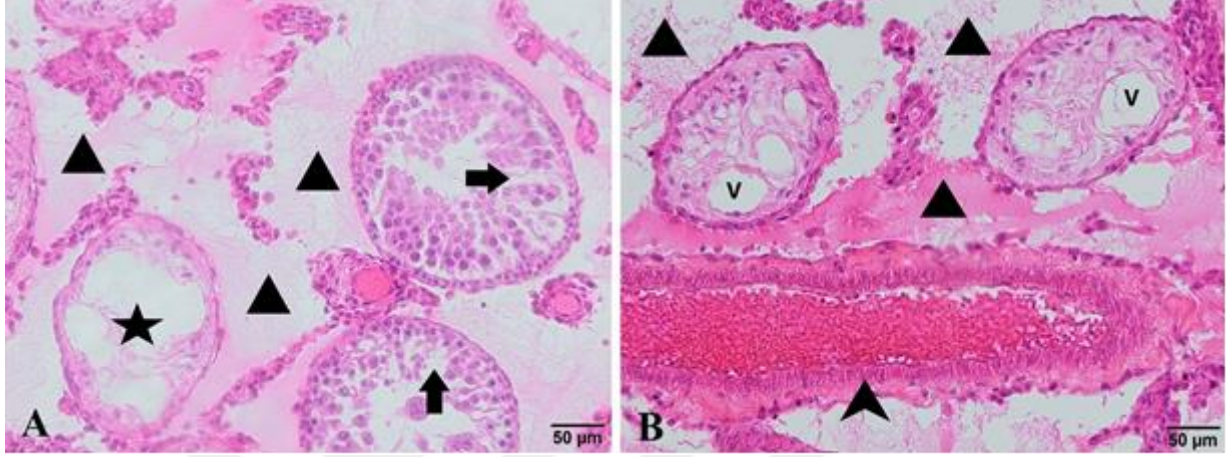
Şekil 3.2: Kontrol ve T gruplarına ait testis dokularında seminifer tubulus görüntüleri. HE boyama metodu.



Şekil 3.3: T+V grubuna ait testis dokusunda seminifer tubulus görüntüleri. Ok: Epitel dejenerasyon, V: Vakuolizasyon, *: Atrofi, Ok başı: Konjesyon, Üçgen: Ödem. HE boyama metodu.



Şekil 3.4: V grubuna ait testis dokusunda seminifer tubulus görüntüleri. Ok: Epitel dejenerasyon, V: Vakuolizasyon, *: Atrofi, Ok başı: Konjesyon, Üçgen: Ödem. HE boyama metodu.



Şekil 3.5: V grubuna ait testis dokusunda seminifer tubulus görüntüleri. Ok: Epitel dejenerasyon, V: Vakuolizasyon, *: Atrofi, Ok başı: Konjesyon, Üçgen: Ödem. HE boyama metodu.

Çizelge 3.2: Erkek Rat Testislerinde Histolojik Değişim Skor Değerleri

Gruplar	Epitel dejenerasyon	Vakuolizasyon	Atrofi	Konjesyon	Ödem
	($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	($\bar{x} \pm S\bar{x}$)	($\bar{x} \pm S\bar{x}$)
Kontrol	0.28 ± 0.07^b	0.28 ± 0.06^b	0.00 ± 0.00^b	0.15 ± 0.05^c	0.32 ± 0.06^c
TT	0.23 ± 0.06^b	0.45 ± 0.07^b	0.00 ± 0.00^b	0.35 ± 0.07^c	0.37 ± 0.06^c
TT+V	2.92 ± 0.04^a	1.00 ± 0.09^a	2.87 ± 0.04^a	0.73 ± 0.09^b	1.27 ± 0.09^a
V	2.90 ± 0.04^a	0.83 ± 0.07^a	2.78 ± 0.08^a	0.82 ± 0.11^b	0.93 ± 0.11^b
P	*	*	*	*	*

Farklı üst simgelerle (a, b, c, d) işaretlenen ortalamalar aynı sütunda birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

***: $P < 0,001$, T: tribulus, V: vinkristin, n: sıçan sayısı, $\bar{x}$: ortalama, $S\bar{x}$: standart hata.

3.3.İmmunohistokimyasal Bulgular (Caspase 3 Boyanma Yoğunluğu)

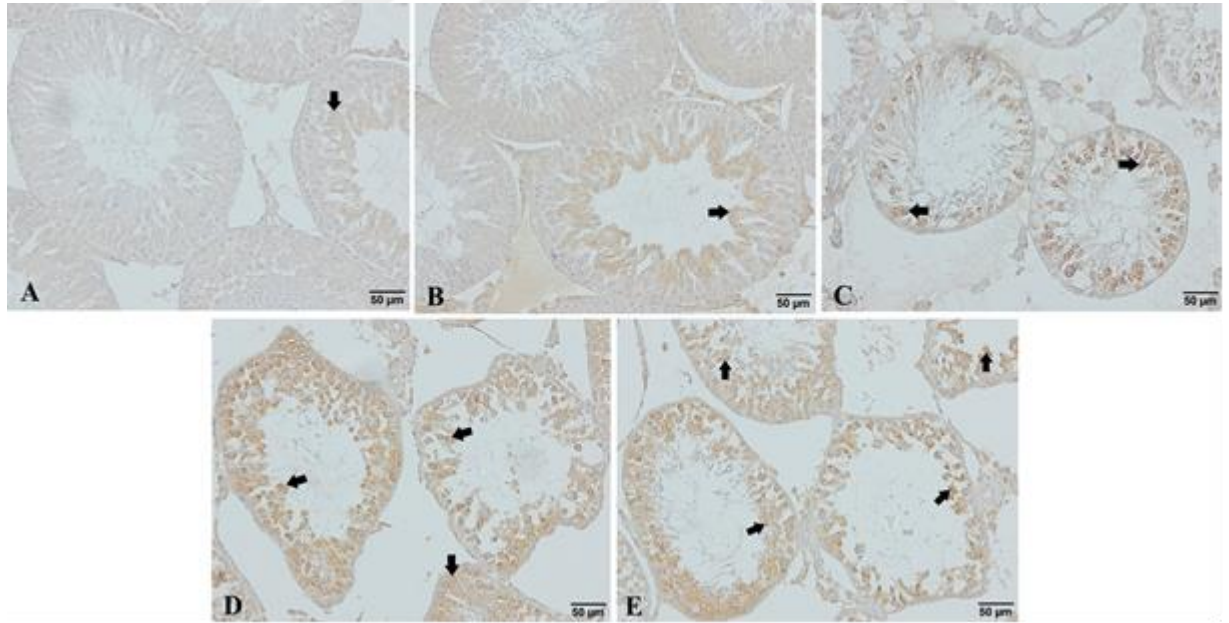
Kontrol ve deneme gruplarında caspase-3 boyanma yoğunluğu tablo 2’de verildi. Caspase-3 boyanma yoğunluğu açısından Vin ve Vin45 grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), bu grupların kontrol, tri ve T+V gruplarından önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Caspase-3 boyanma yoğunluğu T+V grubunda, kontrol ve tri gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek tespit edilirken, Vin ve Vin45 gruplarından daha düşük olduğu ortaya konmuştur ($p<0.001$).

Çizelge 3.3: Kontrol ve deneme gruplarında caspase-3 boyanma yoğunluğu

Grup	Caspase-3 Boyanma Yoğunluğu ($\bar{x} \pm Sx$)
Kontrol	$0.95 \pm 0.06d$
TT	$1.28 \pm 0.08c$
TT+V	$1.63 \pm 0.09b$
V	$2.25 \pm 0.08a$
P	*

a,b,c,d, Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası fark istatistiksel olarak önemlidir.

***: $P<0.001$, Tri: tribulus, V: vincristine, n: rat sayısı, $\bar{x}$: ortalama, Sx : standart hata.



Şekil 3.6: Kontrol ve deneme gruplarına ait testis dokularında seminifer tubuluslarda caspase-3 pozitif hücreler (oklar: kahverengi presipitasyonlar). A: Kontrol grubu, B: Tri grubu, C: T+V grubu, D-E: Vin grubu, sABC boyama metodu.

3.4. Spermatolojik Parametrelere Ait Bulgular

Çalışmamıza ait gruplar arası spermatozoon motiliteleri ve anormal spermatozoon oranları Çizelge 4'te verildi. Motilite açısından kontrol grubuna göre Vinkristin grubundaki azalma ile beraber Tribulus ve Vinkristin gruplarında artışın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Baş anomalileri açısından kontrol ve diğer gruplara karşı Tribulus grubundaki artış, orta, kuysuk kısımlarındaki anomalilerde ve toplam anormal spermatozoon oranlarında kontrol grubuna göre Tribulus grubundaki azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi. ($p<0,05$).

Çizelge 3.4: Gruplara ait Motilite ve Anormal Spermatozoon Oranları ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n:6).

Gruplar	Motilite %	Baş %	Orta Kısım %	Kuyruk %	Toplam %
Kontrol	$74,64 \pm 1,84^b$	$6,64 \pm 1,27^a$	$2,64 \pm 0,62^b$	$6,00 \pm 0,61^b$	$15,28 \pm 2,31^b$
TT	$84,28 \pm 1,18^a$	$0,36 \pm 0,14^b$	$1,28 \pm 0,10^c$	$2,64 \pm 0,21^c$	$4,28 \pm 0,34^c$
TT+V	$61,25 \pm 2,30^c$	$1,50 \pm 0,24^b$	$3,28 \pm 0,94^b$	$6,00 \pm 0,82^b$	$10,78 \pm 1,58^b$
V	$38,75 \pm 5,28^d$	$7,71 \pm 1,36^a$	$7,07 \pm 0,75^a$	$15,78 \pm 1,07^a$	$30,57 \pm 1,42^a$
P	*	*	*	*	*

a-d: Her bir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir $P<0,001$ **

3.5. DNA Hasarına Ait Bulgular

Çalışmamıza ait DNA hasar bulguları Çizelge 5'te değerlendirildi. Vinkristin uygulamasının DNA hasarını artırdığı istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).

Çizelge 3.5: Gruplara ait DNA Hasarları ($\pm$ SEM, n:6).

Gruplar	TAIL LENGHT	TAIL DNA	TAIL MOMENT
Kontrol	27,88 $\pm$ 0,85 ^c	68,94 $\pm$ 1,33 ^c	21,31 $\pm$ 0,50 ^b
TT	26,34 $\pm$ 0,85 ^c	72,03 $\pm$ 1,30 ^{bc}	21,56 $\pm$ 0,86 ^b
TT+V	31,20 $\pm$ 0,80 ^b	79,74 $\pm$ 1,79 ^a	22,83 $\pm$ 0,80 ^b
V	37,69 $\pm$ 0,76 ^a	76,43 $\pm$ 2,58 ^{ab}	26,69 $\pm$ 0,98 ^a
P	*	*	*

a-d: Her bir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir $P<0,05$ *

3.6. Testis Ölçülerine Ait Bulgular

Çalışmamıza ait testis ölçülerine ait bulgulara bakıldığında Çizelge 6'da Vinkristin uygulamasının testis ve epididimis ağırlıklarını istatistiksel olarak önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi ($p<0,05$).

Çizelge 3.6: Gruplara ait testis parametreleri ($\bar{X} \pm$ SEM, n:6).

Gruplar	EPİSOL	EPİSAĞ	TESTİSSOL	TESTİSSAĞ
Kontrol	3,10 $\pm$ 0,16 ^a	3,33 $\pm$ 0,01 ^a	7,10 $\pm$ 0,20 ^a	7,14 $\pm$ 0,19 ^a
TT	2,94 $\pm$ 0,14 ^a	3,39 $\pm$ 0,11 ^a	6,85 $\pm$ 0,31 ^a	6,86 $\pm$ 0,29 ^a
TT+V	0,57 $\pm$ 0,02 ^b	0,62 $\pm$ 0,02 ^b	1,16 $\pm$ 0,07 ^b	1,32 $\pm$ 0,07 ^b
V	0,56 $\pm$ 0,03 ^b	0,61 $\pm$ 0,03 ^b	1,13 $\pm$ 0,12 ^b	1,25 $\pm$ 0,12 ^b
P	*	*	*	*

a-d: Her bir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir $P<0,05$ *

4. TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları, tribulus terrestris tedavisinin vinkristin uygulaması sonrası sperm kalitesinin düşen erkek ratlarda motilite, DNA hasarı ve histolojik parametreleri iyileştirebileceğini göstermektedir. Bu bulgular, tribulus terrestris erkek faktörü kısırlığında olası bir müdahale olarak araştırılmasına yönelik desteği artırmakta ve tribulus terrestris takviyesinin hem sperma parametreleri hem de yardımcı üreme teknolojilerinde veya doğal gebe kalma sonrasında gebelik oranları üzerindeki etkisini değerlendirmek için gelecekteki vaka kontrollü çalışmalara temel teşkil etmektedir.

Tribulus terrestris metanol ekstraktlarının sperma miktarını ve kalitesini doza bağlı olarak iyileştirdiği bildirilmiştir (Shalaby ve Hammouda, 2014). Dahası, deney hayvanlarının aksesuar seks organlarının makroskopik düzeyindeki yaygın değişikliklerin testis ağırlığının, epididimin, seminal veziküllerin ve ventral prostatın azalmasını içerdiğini belirtmiştir. Benzer şekilde, Wang vd. (2008), 55 gün boyunca kurşun asetat zehirlenmesine maruz bırakılan sıçanların testis, prostat bezi, epididim, vas deferens ve seminal vezikülün ortalama ağırlığında azalma olduğu belirtilmiştir.

Arsyad (1996), oligozoospermik erkeklerin belirtilmemiş miktarda ticari olarak hazırlanmış protodiosin ile tedavisinden sonra spermatozoa yoğunluğu ve motilitesinde benzer bir artış olduğunu bildirmiştir. Oligozoospermik erkeklerde yapılan bir klinik çalışmada spermatozoa yoğunluğunda artış bildirilmiş, ancak motilitede artış bildirilmemiştir (Moelock vd., 1994). Tribulus terrestris tedavi grubundaki 36 erkekten 8'i ile çiftleşen dişilerde gebelik elde edilirken, kontrol grubundaki 9 erkek ile çiftleşen dişilerin hiç birinde gebelik elde edilememiştir. Tribulus terrestris ekstraktları ile tedavi, çevresel toksinlerin olumsuz etkilerini tersine çevirerek oligozoospermili erkeklerde sperm parametrelerini iyileştirebileceği bildirilmiştir, Kumari ve Singh (2015), 200 mg kg⁻¹ TT meyve ekstraktı dozunun farelerde metronidazol maruziyetinin neden olduğu testis hasarını önlediğini bulmuşlardır. Benzer şekilde, Rajendar vd. (2011), tribulus terrestrisin sıçanlarda kadmiyum kaynaklı testis hasarı üzerinde koruyucu bir etki uyguladığını ve bunun testis dokusunda peroksidasyonun inhibisyonuyla ilişkili görüldüğünü bildirmiş Tribulus Terrestris'in GnRH düzeylerindeki önceki artış yoluyla testosteron düzeylerini artırarak spermatozoon sayısını artırdığı ve bunun da LH ve FSH üretimini uyardığı varsayılmıştır (Antonio vd., 2000). Bildirilen bu sonuçlar çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik ar etmektedir.

Tribulus terrestris'in metanol ekstraktlarının sıçan histopatolojik lezyonlarının kısmi iyileşmesini etkilediği bildirilmiştir (Shalaby ve Hammouda, 2014). *Tribulus terrestris*'in metanol fraksiyonlarındaki heksan ve sulu çözünür fraksiyonların, erkek Wistar sıçanlarında Leydig hücrelerinin nükleer hacmini, sitoplazmik hacmini ve bireysel hacmini artırdığı için, intertübüler bölmede değişiklikleri teşvik ettiği de bildirilmiştir (Oliveira vd., 2015).

Tribulus terrestris'in faydalı etkilerini göz önünde bulundurarak ve bu bitkinin hem hayvanlarda hem de insanlarda kullanımına ilişkin çalışmalara göre bu ekstraktların ana maddesi olan protodiyosinin bu etkilerden sorumlu olma olasılığının yüksek olduğunu bildirmişlerdir, çünkü birkaç çalışmada cinsel performans, kas tonusu, hormon seviyeleri ve diğer faydalarda iyileşme tanımlanmıştır. Protodiyosin içeren TT'nin erkeklerde DHEA (dehidroepiandrosteron) düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. DHEA, esas olarak adrenal bezler ve daha az ölçüde gonadlar tarafından sentezlenen insan plazmasında dolaşan önemli bir steroiddir ve hem androjenlerin hem de östrojenlerin ortak bir öncüsü olabileceği bildirilmiştir (Selvakumar vd., 2012).

Adimoelja ve Adaikan, (1997), 3 hafta boyunca günde 750 mg TT kuru ekstresi ile tedavi edilen diyabetli ve diyabetsiz erkeklerde protodioscin TT'nin erkek cinsel işlevini iyileştirdiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, infertilitenin kan değerlerindeki düşük DHEA seviyeleriyle ilişkili olabileceğini ve DHEA'daki azalmanın ayrıca serumdaki testosteron seviyelerinin ve 17 β -HSD aktivitesinin azalmasıyla da ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Bu nedenle, *Tribulus terrestris*'in bu kuru ekstresinde bulunan protodioscinin serum testosteron seviyelerini ve kısmen de olsa 17 β -HSD aktivitesini artırma yeteneğine sahip olabileceğine ve bunun da spermatozoon üretimini iyileştirebileceğini düşündürmektedir.

Tribulus'un etkileri hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörlerinin salınımı, bağlanması ve alımı üzerindeki değişiklikler aracılığıyla gerçekleşebilir. Örneğin, egzersiz yapan sıçanlarda *Tribulus terrestris* özütü, kas kazanımı ve fiziksel performansı desteklemiş ve bunun, hem IGF-I hem de reseptörünün plazma seviyesindeki artışla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Wu vd., 2017). Boksörlerde ise *Tribulus terrestris*'in kas hasarını azaltma ve anaerobik performansı artırma yeteneği, IGF-I'nin hedefi olan IGF-I' de değil,

plazma insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 (IGFBP-3) seviyesindeki azalma ile ilişkilendirilmiştir (Ma vd., 2017).

Bu araştırmalar, fiziksel performansın (ve belki de miyositler dışındaki hücrelerin aktivitesi, çoğalması ve onarımının) iki yolla desteklenebileceğini göstermektedir: bunlardan ilki IGF-I'i bağlayıp etkisiz hale getiren IGFBP-3'ün azaltılması, ikincisi ise IGF-I reseptörlerinin yukarı regülasyonu şeklindedir.

Pavin vd. (2018), siklofosamid ile tetikleri erkek üreme sistemi hasarına karşı kullandıkları *Tribulus terrestris*'in motilite değerlerini iyileştirdiğini bildirmişlerdir (% $20,37 \pm 5,35$ 'e karşı % $53,23 \pm 5,85$) bu bulgular çalışmamızda bildirdiğimiz sonuçlar ile benzer bulunmuştur. Aynı çalışmada elde edilen oksidatif stres bulguları da çalışmamız sonuçları ile örtüşmektedir. Histopatolojik bulgularımız da söz konusu çalışmanın sonuçları ile benzer bulunmuştur.

Gauthaman vd. (2002), normal ve kastre edilmiş ratlara sekiz hafta boyunca uyguladıkları *Tribulus terrestris* eksraktı sonrası hadım edilen grupta prostat ağırlığında artış gözlemlemişlerdir. Bu artışa Dehidroepiandrosteron (DHEA)'un sebep olduğunu ve bir nörosteroid olarak kabul edilen DHEA'nın cinsel işlevi kolaylaştırmak için merkezi olarak bir gama amino bütirik asit antagonisti olarak etki ettiğini ve DHEA'daki olası artış ve ardından testosterona ve metabolitlerine dönüşümünün, çalışmada gözlemlenen etkileri açıklayabileceğini bildirmişlerdir.

Setiawan (1996), tarafından *Tribulus terrestris*'in spermatozoon morfolojisi ve akrozom reaksiyonu üzerindeki etkisini belirlemek ve sonucu kontrol grubuyla karşılaştırmak amacıyla çift kör plasebo kontrollü yapılan çalışmada Oligoastenoteratospermisi olan birincil ve ikincil infertiliteye sahip 30 erkek (birincil kısırlığı olan 28 erkek ve ikincil kısırlığı olan 2 erkek) çalışmaya dahil edilmiş ve çalışma grubundaki 15 hastaya 60 gün boyunca günde üç kez 500 mg *Tribulus terrestris* tabletleri uygulanmıştır. Ayrıca, kontrol grubundaki 15 katılımcıya plasebo (şeker içeren) verilmiştir. Sperma hacmi, spermatozoon konsantrasyonu, morfoloji, akrozom reaksiyonu ve diğer parametreler tedavi öncesi ve sonrasında değerlendirilmiştir. Tedavi edilen grupta spermatozoon motilitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görüldüğü (1.666 ± 12.344 'e karşı -9.000 ± 10.889 , $p < 0.05$). Ayrıca tedavi edilen grupta normal akrozom reaksiyonlu sperm oranı kontrol grubuna göre arttı (6.633 ± 6.282 'ye

karşı -0.333 ± 3.406 , $p < 0.05$). Ayrıca tedavi edilen grupta hareketsiz spermatozoon oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunduğ u bildirilmiştir (10.333 ± 16.198 'e karşı 12.666 ± 21.865 , $p < 0.05$). Hacim (ml) (tedavi grubunda $0,373 \pm 1,102$, kontrol grubunda $0,240 \pm 0,783$), spermatozoa yoğunluğu (tedavi grubunda $-1,104 \pm 8,157$, kontrol grubunda $-0,346 \pm 7,183$), morfoloji (tedavi grubunda $2,866 \pm 5,222$, kontrol grubunda $2,533 \pm 6,058$) ve hızlı ve doğrusal hareketliliğ e sahip spermilerin yüzdesi (tedavi grubunda $1,666 \pm 5,563$, kontrol grubunda $1,000 \pm 5,732$), yavaş ve doğrusal olmayan (kontrol grubunda $1,666 \pm 12,344$, $-9,000 \pm 10,889$), durağ an hareketlilik (6.000 ± 11.052 'ye karşı -4.666 ± 20.482) ve hareketsizlik (-10.333 ± 16.198 'e karşı 12.666 ± 21.865) anlamlı şekilde farklı olmadığı belirtilmiştir ($p > 0.05$). Genel olarak, günde üç kez 500 mg'lık bir dozda 60 gün boyunca uygulanan *Tribulus terrestris*'in oligoastenoteratospermili erkeklerde özellikle motilite ve akrozom reaksiyonu olmak üzere bazı sperm fonksiyonlarının geri kazanılmasında anlamlı bir rol oynadığı bildirilmiş ve sonuçlar çalışmamız ile uyumlu bulunmuştur.

Martino-Andrade vd. (2010), *Tribulus terrestris*'in üç farklı dozunu (11, 42 ve 110 mg/kg/gün) kastre edilmiş erkek ratlarda 7 gün boyunca ve kastre edilmemiş erkeklerle ve kastre edilmiş dişilere 28 gün boyunca uygulandıkları çalışmalarında *Tribulus terrestris*'in Wistar Albino sıç anlarında prostat, seminal vezikül, uterus ve vajina gibi endokrin duyarlı dokuları uyaramadığını bu da *in vivo* androjenik ve östrojenik aktivite eksikliğini gösterdiğ ini bildirmişlerdir. Ayrıca, *Tribulus terrestris* uygulamasının sıç an spermatozoon üretimi üzerinde, dolaşımdaki androjenlerin değ işmeyen seviyeleriyle ilişkili olumlu bir etkisi gösterdiğ ini bildirmişlerdir. Ancak, deney hayvanlarına *Tribulus terrestris* uygulanmasını takiben ç elişkili sonuçların, kullanılan tür veya suşlardaki, tedavi süresindeki ve ekstrakttaki aktif bileş enlerin içeriğindeki farklılıklardan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Roaiah vd. (2017) idiyopatik infertilitesi olan erkeklerde *Tribulus terrestris*'in sperma parametreleri ve serum testosteron üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla kontrolsüz bir çalışma yürütmüş, idiyopatik infertilitesi olan 30 erkek çalışmaya dahil edilmiş ve üç ay boyunca günde üç tablet 250 mg *Tribulus terrestris* ekstraktı almışlardır. İdiyopatik infertilitesi olan tüm hastaların yaşları 30 ila 50 arasında olduğ u belirtilmiştir. Çalışmanın sonuçları sperma parametrelerinde (miktar; önce: 14.900 ± 23.987 , sonra: 17.600 ± 21.683 , $p = 0.839$), (motilite; b: 20.000 ± 11.396 , a: 27.500 ± 12.525 , $p = 0.091$) ve

(morfoloji; $b:40 \pm 13.352$, $a:37.500 \pm 10.296$, $P = 0.290$), (PR = progresif motilite; $b:5.000 \pm 5.241$, $a:10.000 \pm 7.512$, $P = 0.072$), (Non progresif = ilerlemeyen; $b:15.000 \pm 10.90$, $a:15.500 \pm 7.512$, $P = 0.290$)], serbest testosteron ($P = 0.075$), toplam testosteron düzeyi ve LH tedavi öncesi ve sonrası *Tribulus terrestris* idiyopatik erkek infertilitesinin tedavisinde etkili olmadığını bildirmişlerdir.

Keshtmand vd. (2014), *Tribulus terrestris* hidroalkolik ekstraktının erkek farelerde sperm parametreleri üzerindeki cisplatin kaynaklı sitotoksositeye karşı koruyucu etkisi üzerine yaptıkları çalışmalarında vücut ve testislerin ortalama ağırlıkları cisplatin grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı ($P=0,037$) ancak cisplatin+*Tribulus terrestris* grubunda cisplatin grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Testis kesitleri, seminifer tübüllerin çapının cisplatin'e maruz kalan farelerde azaldığını ve seminifer tübüllerin çapının cisplatin+*Tribulus terrestris* grubunda cisplatin grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Cisplatin ile tedavi edilen hayvanların ağırlığında önemli bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Bu veriler, vücut ağırlığındaki azalmaların kemoterapi ilaçlarının toksik yan etkisine atfedilebileceğini gösteren diğer çalışmaları destekliyor ve *Tribulus terrestris* cisplatinin olumsuz etkilerini hafiflettiğini öne sürmüşlerdir. Sitotoksik doz cisplatinin enjeksiyonundan 4 gün sonra farelerin testislerinde histolojik hasar olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada progresif ve total motilite, canlılık testis ağırlığı, miktar ve morfoloji değerlerinde sayısal değer olarak iyileşmeler görülmesine rağmen istatistiki olarak cisplatin gruplarına göre fark bulunamadığı bildirilmiştir.

Kumari ve Singh (2015), *Tribulus terrestris* ekstraktının, metronidazol (MTZ)'nin spermatogenezis, spermatozoon sayısı, testis fonksiyonları ve oksidatif stres üzerindeki koruyucu etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında, Metronidazol'un testis ağırlığında, spermatogeneziste, antioksidan enzim aktivitelerinde, laktat dehidrogenazda, alkalen fosfatazda ve LPO seviyesinde belirgin değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Epididimal spermatozoa sayısının MTZ ile tedavi edilen grupta önemli ölçüde azaldığı ve bu değişikliklerin 500 mg/kg BW/gün MTZ ve 100 mg/kg BW/gün TT'nin birlikte uygulanmasının ardından kısmen geri döndüğünü ancak 500 mg/kg BW/gün MTZ ve 200 mg/kg BW/gün *Tribulus terrestris* ile birlikte uygulanan

farelerde değişiklikler kontrollerdekine benzer şekilde tamamen geri döndüğünü bildirmişlerdir.

Şahin vd. 2016), erkek sıçanlarda *Mucuna pruriens* , *Tribulus terrestris* ve *Ashwagandha* (*Withania somnifera*) antioksidan etkili bitkiler olarak bilinen ve geleneksel kullanımlarda afrodizyak aktivitelere sahip olduğu bildirilen üç bitkinin cinsel işlev, serum biyokimyasal parametreler, oksidatif stres ve üreme dokularındaki NF-κB, Nrf2 ve HO-1 seviyeleri üzerindeki etkilerini belirledikleri çalışmalarında *Tribulus* , *Ashwagandha* ve *Mucuna* ekstraktlarının erkek sıçanlarda testosteron seviyelerini artırmak suretiyle ve NF-κB ve Nrf2/HO-1 yollarını düzenleyerek cinsel işlev ve davranışın güçlendiricileri olduğuna dair kanıt sunduğunu ve çalışmanın sonuçları ayrıca *Tribulus* ekstraktının cinsel işlevler bakımından *Ashwagandha* ve *Mucuna* özütlerinden nispeten daha güçlü olduğunu bildirmişlerdir.

Adimoelja ve Adaikan (1997), 3 hafta boyunca günde 750 mg *Tribulus terrestris* kuru ekstresi ile tedavi edilen diyabetli ve diyabetsiz erkeklerde protodioscin *Tribulus terrestris*'in erkek cinsel işlevini iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, infertilitenin kan değerlerindeki düşük DHEA seviyeleriyle ilişkili olabileceğini bildiriyor. DHEA'daki azalmanın ayrıca serumdaki testosteron seviyelerinin ve 17β-HSD aktivitesinin azalmasıyla da ilişkili olabileceğine ve bu nedenle, *Tribulus terrestris*'in bu kuru ekstresinde bulunan protodioscinin serum testosteron seviyelerini ve kısmen de olsa 17 β -HSD aktivitesini artırma yeteneğine sahip olabileceğine ve bunun da sperm üretimini iyileştirebileceğini bildirmişlerdir.

5. SONUÇ

Yaptığımız tez çalışması, vinkristinin neden olduğu testis hasarına karşı koruma sağlamak için Tribulus terrestris'in kuru ekstraktının etkinliğini araştıran ilk çalışmadır. Vinkristin, en yaygın kullanılan kanser ilaçlarından ve vinkristin tedavisi kullanması gereken hastalarda, bu ilacı kullanma kararını hem fiziksel hem de duygusal olarak etkileyen, azalmış fertilite veya sterilite görülmektedir. Yaptığımız çalışma, Tribulus terrestris kuru ekstraktının, vinkristin uygulamasıyla fare testislerinde oluşturulan biyokimyasal parametreleri, sperma analizlerini, histopatolojik değişiklikleri ve DNA hasarını iyileştirmede önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Tribulus terrestris'in, testis dokusunda vinkristin kaynaklı toksisitede koruyucu rolü açıktır ve özellikle vinkristin kullanan böyle bir tedaviye ihtiyaç duyan bir hastada kullanımıyla ilişkili olarak umut verici bir alternatif olduğu gösterilmiştir. Tribulus terrestris kuru ekstraktının faydalı etkilerini ve antikanser ilaçlarla olası etkileşimi ile ilgili mekanizmasını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- 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.
- Adimoelja A. and Adaikan P. G. (1997). Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L improves the male sexual functions, probably via DHEA, *International Journal of Impotence Research*, 9(1), 1–70.
- 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.
- Anisatuzzahro, A., Luthfi, M. J. (2017). Anatomical Study of Male Reproductive Organs of the Indonesian Short-Nosed Fruit Bat (*Cynopterus titthaechilus* 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.
- Antonio, L., Uelmen, J., Rodriguez, R., Earnest, C. (2000). The effects of *Tribulus terrestris* on body composition and exercise performance in resistance-trained males. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 10, 208–215.
- Arsyad, K. M. (1996). Effect of protodioscin on the quality and quantity of sperms from males with moderate idiopathic oligozoospermia. *Medica*, 22(4), 614–618.
- Asadmobini, A., Bakhtiari, M., Khaleghi, S., Esmaeili, F., Mostafaei, A. (2017). The effect of *Tribulus terrestris* extract on motility and viability of human sperms after cryopreservation. *Cryobiology*, 75, 154–159.
- 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 Veterinary Journal*, 11(3), 292–300.
- 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.
- 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.
- Chaudhari, R. M., Bhoi, D., Ansari, F. I., & Jadhav, R. (2014). Reproductive toxicity of vincristine on male reproductive organs of albino rat *Rattus rattus*. *International Journal of Biotechnology and Biosciences*, 4(1), 91–97.
- Chhatre, S., Nesari, T., Somani, G., Kanchan, D., & Sathaye, S. (2014). Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. *Pharmacognosy Reviews*, 8(15), 45–51. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.125530>
- Chinoy, N. J., & Geetha, R. (1983). Antiandrogenic and antifertility effects of *Vinca rosea* leaf extract on male albino rat. *Comparative Physiology and Ecology*, 8(1), 41–52.
- Clément, C., Witschi, U., Kreuzer, M. (2012). The potential influence of plant-based feed supplements on sperm quantity and quality in livestock: A review. *Animal Reproduction Science*, 132(1–2), 1–10. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.04.002.

- Conover, W. J. (1980). Practical Nonparametric Statistics (2nd ed.). John Wiley & Sons, New York, p. 229–239.
- Cooke, R. A., Nikles, A., & Roeser, H. P. (1978). A comparison of the antifertility effects of alkylating agents and Vinca alkaloids in male rats. *British Journal of Pharmacology*, 63(4), 677–681.
- Creasy, D. M., ve Chapin, R. E. (2013). Male reproductive system. *Haschek and Rousseaux's handbook of Toxicologic Pathology*, 2493-2598.
- Culling, C. F. A., Allison, R. T., & Barr, W. T. (1985). Cellular Pathology Technique. Butterworths and Co. Ltd., London.
- Drobnis, E. Z., Nangia, A. K. (2017). Male reproductive functions disrupted by pharmacological agents. *Impacts of Medications on Male Fertility*, 13-24.
- Dustin, P. (1984). Microtubules. Springer-Verlag, New York/Tokyo.
- 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.
- Gauthaman, K., Adaikan, P. G., Prasad, R. N. (2002). Aphrodisiac properties of Tribulus terrestris extract (protodioscin) in normal and castrated rats. *Life Sciences*, 71(12), 1385–1396.
- 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.
- Güleş, Ö., Göksel, D., Ercins, U. H., & Eren, Ü. (2022). Effects of quercetin against doxorubicin-induced testicular toxicity in male rats. *Biology Bulletin*, 49(3), 203–213.
- Güleş, Ö., Kum, Ş., Yıldız, M., Boyacıoğlu, M., Ahmad, E., Naseer, Z., & Eren, Ü. (2019). Protective effect of coenzyme Q10 against bisphenol-A-induced toxicity in the rat testes. *Toxicology and Industrial Health*, 35(7), 466–481.
- 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. *Animal Reproduction Science*, 122(3–4), 200–207.
- Haghmorad, D., Mahmoudi, M. B., Haghighi, P., Alidadiani, P., Shahvazian, E., Tavasolian, P., et al. (2019). Improvement of fertility parameters with Tribulus terrestris and Anacyclus pyrethrum treatment in male rats. *International Brazilian Journal of Urology*, 45(5), 1043–1054. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2018.0843.
- Harkness, J.E., VandeWoude, S., Turner, P.V., Wheler, C.L. (2010). 5th ed., Wiley- Blackwell, Chichester, s: 95- 104.
- Howroyd, P., Hoyle-Thacker, R., Lyght, O., Williams, D., & Kleymenova, E. (2005). Morphology of the fetal rat testis preserved in different fixatives. *Toxicologic Pathology*, 33(3), 300–304.
- 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. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 374(2), 261–268.

- Joshi, M. S., & Ambaye, R. Y. (1968). Effect of alkaloids from *Vinca rosea* L. on spermatogenesis in male rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 6(4), 256–257.
- 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.
- Keshtmand, Z., Amouian, S., Ganjkhani, M., Fathi, M., Hashemzadeh, A., Pouramir, M. (2015). Protective effect of *Tribulus terrestris* hydroalcoholic extract against cisplatin-induced apoptosis on testis in mice. *International Journal of Morphology*, 33(1), 81–88.
- Khaleghi, S., Bakhtiari, M., Asadmobini, A., Esmaeili, F. (2017). *Tribulus terrestris* extract improves human sperm parameters in vitro. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 22(3), 407–412.
- Khare, C. P. (2007). *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 669–671.
- 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.
- Kistanova, E., Zlatev, H., Karcheva, V., Kolev, A. (2005). Effect of plant *Tribulus terrestris* extract on reproductive performances of rams. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21(1–2), 55–63.
- Kokate, C. K., Purohit, A. P., & Gokhale, S. B. (2007). *Pharmacognosy* (13th ed.). Nirali Prakashan Publisher, Pune, p. 370.
- Kumari, M., Singh, P. (2015). *Tribulus terrestris* ameliorates metronidazole-induced spermatogenic inhibition and testicular oxidative stress in the laboratory mouse. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(3), 304–310. doi:10.4103/0253-7613.157129.
- Ma, Y., Guo, Z., Wang, X. (2017). *Tribulus terrestris* extracts alleviate muscle damage and promote anaerobic performance of trained male boxers and its mechanisms: Roles of androgen, IGF-1, and IGF binding protein-3. *Journal of Sport and Health Science*, 6, 474–481.
- Martino-Andrade, A. J., Morais, R. N., Spercoski, K. M., Rossi, S. C., Vechi, M. F., Golin, M., et al. (2010). Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 165–170.
- Martino-Andrade, A. J., Morais, R. N., Spercoski, K. M., Rossi, S. C., Vechi, M. F., Golin, M., Lombardi, N. F., Greca, C. S., Dalsenter, P. R. (2010). Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 165–170.
- Martino-Andrade, A. J., Morais, R. N., Spercoski, K. M., Rossi, S. C., Vechi, M. F., Golin, M., Lombardi, N. F., Greca, C. S., Dalsenter, P. R. (2010). Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 165–170.
- 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.
- Moeloek, N., Adimoelja, A., Tanojo, T., Pangkahila, W. (1994). Trials of *Tribulus terrestris* on oligozoospermia. Proceedings of the VIth National Congress and IIIrd International Symposium on New Perspectives on Andrology in Human Reproduction. *National Congress of Indonesian Association of Andrology (PANDI)* in Manado, Indonesia.

- 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.
- Murugavel, T., & Akbarsha, M. A. (1991). Antispermato-genic effect of *Vinca rosea* Linn. *Indian Journal of Experimental Biology*, 29(9), 810–812.
- Mülazımoğlu, S. B., İde, T., Aslan, S. (2010). Ratlarda Reprodüktif Sistem. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 40(2), 39-44.
- Narayana, K., Prashanthi, N., Nayanatara, A., Bairy, L. K., & D'Souza, J. A. (2006). An organophosphate insecticide methyl parathion (O,O-dimethyl O-4 nitrophenyl phosphorothioate) induces cytotoxic damage and tubular atrophy in the testis despite elevated testosterone level in the rat. *Journal of Toxicological Sciences*, 31(3), 177–189.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.
- Oliveira, N. N. P. M., Félix, M. A. R., Pereira, T. C. S., Rocha, L. G. P., Miranda, J. R., Zangeronimo, M. G., Sousa, R. V. D. (2015). Sperm quality and testicular histomorphometry of wistar rats supplemented with extract and fractions of fruit of *Tribulus terrestris* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 891-897.
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 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.
- Pavin, N. F., Izaguirry, A. P., Soares, M. B., Spiazzi, C. C., Mendez, A. S. L., Leivas, F. G., Dos Santos Brum, D., Cibir, F. W. S. (2018). *Tribulus terrestris* protects against male reproductive damage induced by cyclophosphamide in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 5758191.
- 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.
- Rajendar, B., Bharavi, K., Rao, G. S., Kishore, P. V., Kumar, P. R., Kumar, C. S., et al. (2011). Protective effect of *Tribulus terrestris* Linn. against cadmium-induced testicular damage. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(5), 568–573.
- Roaiah, M. F., Elkhayat, Y. I., Abd El Salam, M. A., Din, S. F. G. (2017). Prospective analysis on the effect of botanical medicine (*Tribulus terrestris*) on serum testosterone level and semen parameters in males with unexplained infertility. *Journal of Dietary Supplements*, 14(1), 25–31.
- Roaiah, M. F., Elkhayat, Y. I., Abd El Salam, M. A., Din, S. F. G. (2017). Prospective analysis on the effect of botanical medicine (*Tribulus terrestris*) on serum testosterone level and semen parameters in males with unexplained infertility. *Journal of Dietary Supplements*, 14(1), 25–31.
- Roaiah, M. F., Elkhayat, Y. I., GamalEl Din, S. F., Abd El Salam, M. A. (2017). Prospective analysis on the effect of botanical medicine (*Tribulus terrestris*) on serum testosterone level and semen parameters in males with unexplained infertility. *Journal of Dietary Supplements*, 14(1), 25–31.

- Russel, L. D., deFranca, L. R., Hess, R. A., & Cooke, P. (1995). Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue and Cell*, 27(1), 105–128.
- Sahin, K., Orhan, C., Akdemir, F., Tuzcu, M., Gencoglu, H., Sahin, N., et al. (2016). Comparative evaluation of the sexual functions and NF- κ B and Nrf2 pathways of some aphrodisiac herbal extracts in male rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 318. doi:10.1186/s12906-016-1303-x.
- Sahin, K., Orhan, C., Akdemir, F., Tuzcu, M., Gencoglu, H., Sahin, N., Turk, G., Yilmaz, I., Ozercan, I. H., Juturu, V. (2016). Comparative evaluation of the sexual functions and NF- κ B and Nrf2 pathways of some aphrodisiac herbal extracts in male rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 318.
- 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.
- Salahshoor, M. R., Abdolmaleki, A., Faramarzi, A., Jalili, C., Shiva, R. (2020). Does Tribulus terrestris improve toxic effect of malathion on male reproductive parameters? *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(2), 183–191. doi:10.4103/jpbs.JPBS_224_19.
- Salgado, R. M., Marques-Silva, M. H., Goncalves, E., Mathias, A. C., Aguitar, J. G., Wolff, P. (2017). Effect of oral administration of Tribulus terrestris extract on semen quality and body fat index of infertile men. *Andrologia*, 49, e12627.
- Salgado, R. M., Marques-Silva, M. H., Goncalves, E., Mathias, A. C., Aguitar, J. G., Wolff, P. (2017). Effect of oral administration of Tribulus terrestris extract on semen quality and body fat index of infertile men. *Andrologia*, 49, e12627.
- Sanagoo, S., Sadeghzadeh Oskouei, B., Gassab Abdollahi, N., Salehi-Pourmehr, H., Hazhir, N., Farshbaf-Khalili, A. (2019). Effect of Tribulus terrestris L. on sperm parameters in men with idiopathic infertility: A systematic review. *Complementary Therapies in Medicine*, 42, 95–103.
- Sanagoo, S., Sadeghzadeh Oskouei, B., Gassab Abdollahi, N., Salehi-Pourmehr, H., Hazhir, N., Farshbaf-Khalili, A. (2019). Effect of Tribulus terrestris L. on sperm parameters in men with idiopathic infertility: A systematic review. *Complementary Therapies in Medicine*, 42, 95–103.
- 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.
- Selvakumar, S., Arunachalam, A., Jeevapraakash, G., Dheivanai, S. L., Doss, M. L., Rajalakshmi, V. (2012). Study of phytochemical constituents and antimicrobial activity of leaf extracts of Tribulus subramanyamii L. *International Journal of Phytopharmacology*, 3(2), 91–94.
- Setiawan, L. (1996). Tribulus terrestris L. extract improves spermatozoa motility and increases the efficiency of acrosome reaction in subjects diagnosed with oligoasthenoteratozoospermia. *Advances in Male Reproductive Physiology*, 2, 105–114.
- Shalaby, M. A., Hammouda, A. A. (2014). Assessment of protective and antioxidant properties of Tribulus terrestris fruits against testicular toxicity in rats. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 3(3), 113–118.
- Sherins, R. J., Olweny, C. L. M., & Ziegler, J. L. (1978). Gynecomastia and gonadal dysfunction in adolescent boys treated with combination chemotherapy for Hodgkin's disease. *New England Journal of Medicine*, 299(1), 12–16.

- Singh, N. P., Muller, C. H., & Berger, R. E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and Sterility*, 80(6), 1420–1430.
- Singh, S., Nair, V., & Gupta, Y. K. (2012). Evaluation of aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in sexually sluggish male albino rats. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 3(1), 43–47.
- Sirotkin, A. V., Kolesárová, A. (2021). Puncture vine (*Tribulus terrestris* L.) in control of health and reproduction. *Physiological Research*, 70(Suppl4), 657–S667.
- Stanley, A. (1993). Male reproductive toxicity of vincristine in albino rats. PhD Thesis, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, India.
- Stanley, A., & Akbarsha, M. A. (1992). Giant spermatogonial cells generated by vincristine and their uses. *Current Science*, 62(2), 144–147.
- 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.
- Tan, S. (2015). Varikoselli Sıçanlarda Spermatojenik Kök Hücrelerin Durumunun İmmünohistokimya Teknikleri İle Belirlenmesi, Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 8-10s, Denizli.
- 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.
- Wang, L., Xun, P., Zhao, Y., Wang, X., Qian, L., & Chen, F. (2008). Effects of lead exposure on sperm concentrations and testes weight in male rats: A meta-regression analysis. *Journal Name*, Volume(Issue), Page range.
- Watson, P. F. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record*, 97(1), 12–15.
- Wu, Y., Yang, H., Wang, X. (2017). The function of androgen/androgen receptor and insulin growth factor-1/insulin growth factor-1 receptor on the effects of *Tribulus terrestris* extracts in rats undergoing high-intensity exercise. *Molecular Medicine Reports*, 16, 2931–2938.