

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEMİR DİKENİ (*TRİBULUS TERRESTRİS*) UYGULAMASININ
HİPERKOLESTEROLEMİ OLUŞTURULMUŞ FARELERİN
TESTİS DOKUSUNDA AQP1 (AQUAPORİN 1) EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gökhan BAYRAKCI

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI

2019 - KARS

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DEMİR DİKENİ (*TRIBULUS TERRESTRIS*) UYGULAMASININ
HİPERKOLESTEROLEMİ OLUŞTURULMUŞ FARELERİN
TESTİS DOKUSUNDA AQP1 (AQUAPORİN 1) EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gökhan BAYRAKCI
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI

Bu tez Kafkas Üniversitesi BAP tarafından 2015-TS-66

proje numarası ile desteklenmiştir.

2019 - KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Gökhan BAYRAKCI tarafından hazırlanmış olan “**Demir Dikeni (Tribulus Terrestris) Uygulamasının Hiperkolesterolemi Oluşturulmuş Farelerin Testis Dokusunda AQP1 (Aquaporin I) Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **OY.....BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/04/2019

Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Şahin ASLAN

Üye : Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ

Üye : Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI

İmza


Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç.Dr. Özgür ÇELEBİ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın amacı: hiperkolesterolemi oluşturulmuş farelere Demir Dikeni (*Tribulus Terrestris*) ekstraktının oral gavaj yoluyla uygulanmasının farelerin testis dokusu üzerine etkisinin histopatolojik olarak ve bu dokuda hücre membranlarında su kanalı proteinleri olarak bulunan Aquaporin 1 (AQP1) ekspresyonu üzerine etkisinin immünohistokimyasal ve RT-PCR yöntemleri ile belirlenmesidir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerimi benimle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI'ya, tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Şahin ASLAN, Prof. Dr. Serpil DAĞ, Doç. Dr. Sevda ELİŞ YILDIZ, Doç. Dr. Metin ÖĞÜN, Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ, Dr. Öğr. Üyesi Serpil ADIGÜZEL IŞIK, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa SERTÇELİK, Dr. Öğr. Üyesi Şükran YEDİEL ARAS ve Dr. Öğr. Üyesi Hasan ASKER'e, katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Fatih KARA, Dr. Barış YILDIZ, Dr. Öğr. Tarık MECİT, YL. Öğr. Erol BAYRAKCI, Vet. Hekim İsa GÜNAL, Vet. Hekim Süleyman ÖZKAN ve Laborant Direniş HARMANKAYA'ya, her zaman yanımda olan ve hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan, gösterdikleri sabır ve verdikleri emeklerle bugünlere gelmemi sağlayan aileme ve adını yazamadığım emeği geçen herkese çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IV
TABLOLAR LİSTESİ.....	VII
RESİMLER LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IX
1. ÖZET	X
2.SUMMARY	XII
1.GENEL BİLGİLERİ.....	1
1.1. Demir Dikeni (Tribulus Terrestris)	2
1.2.Aquaporinler (AQPs).....	3
1.2.1. AQP0	4
1.2.2.AQP1	4
1.2.3.AQP2	6
1.2.4.AQP3	7
1.2.5.AQP4	7
1.2.6.AQP5	8
1.2.7.AQP6	8
1.2.8.AQP7	9
1.2.9.AQP8	9
1.2.10.AQP9	9
1.2.11.AQP10	10
1.2.12.AQP11	10
1.2.13.AQP12	10
1.3.Testisin Histolojik Yapısı	10
1.4.Hiperkolesterolemi ve İnfertilite.....	14
2.MATERYAL VE METOT	16
2.1. Deney Hayvanı Materyali.....	16
2.2. Canlı Ağırlık ve Testis Ağırlığı Ölçümü	17
2.3. Biyokimyasal Analizler	17
2.4. Histolojik İncelemeler.....	17
2.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler.....	18
2.6.Real Time PCR (RT-PCR) Yöntemi.....	19

2.6.1. TRI Reagent ile Total RNA İzolasyonu	19
2.6.2. Total RNA Örneklerinden Geri Transkripsiyon (RT) yöntemi ile cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması	20
2.6.3. RT-PCR ile Aquaporin-1 (AQP1) gen ekspresyonunun belirlenmesi.	20
2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler	22
3. BULGULAR	23
3.1. Testis ve Canlı Ağırlık Bulguları	23
3.2. Kolesterol Değerleri	25
3.3. Histopatolojik Bulgular	25
3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	28
3.5. Real-Time PCR Bulguları	33
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
5. KAYNAKLAR	41
6. ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGE	AÇIKLAMA
g	Gram
kg	Kilo Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
dl	Desilitre
lt	Litre
μ l	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
μ m	Mikrometre
mm	Milimetre
mol	Molar
m ²	Metrekare
s	Saniye
dk	Dakika
bp	Baz çifti
% w/w	Ağırlıkça yüzde

KISALTMA	AÇIKLAMA
AQP	Aquaporin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DD	Demir Dikeni
Kol+DD	Demir Dikeni Uygulanan Yüksek Kolesterolü Grup
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
cDNA	Komplementer DNA
RNA	Ribo Nükleik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
TDF	Testis Belirleyici Faktör
MIF	Müllerian İnhibe Edici Faktör
AlCl ₃	Alimünyum Klorür
BPA	Bisphenol-A
SIF	Soya İzoflavon
i.p.	İntrapertoneal
HCL	Hidroklorik asit
TBS	Tris Buffer Saline
SD	Standart Sapma
dH ₂ O	Distile Su
ddH ₂ O	Double Distile Su
BSA	Bovine Serum Albumin

PBS Phosphate-Buffered Saline

DAB 3,3'-Diaminobenzidine



TABLÖLARLİSTESİ

Tablo 1. Real Time PCR Mix içeriği.....	21
Tablo 2. Real Time PCR reaksiyon koşulları.....	21
Tablo 3. Çalışmada kullanılan Aquaporin1 (AQP1) ve GAPDH primerlerinin dizilimleri.....	22
Tablo 4. Gruplar arası canlı ağırlık (g) sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	23
Tablo 5. Gruplar arası testis ağırlığı (g) sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	24
Tablo 6. Gruplar arası kolesterol seviyelerinin (mg/dl) istatistiksel değerlendirilmesi.....	25
Tablo 7. Gruplarda AQP1 immünoaktivitenin semikantitatif analiz sonuçları.....	29
Tablo 8. Gruplar arasında GAPDH mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması (Şekil 2).....	34
Tablo 9. Gruplar arasında Aquaporin 1 (AQP1) mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması (Şekil 3).....	35

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Kontrol grubu.Fare testis dokusu. Üçlü boyama (Triple).	26
Resim 2. Sham grubu. Fare testis dokusu. Üçlü boyama (Triple).	26
Resim 3. DD grubu. Fare testis dokusu. Üçlü boyama (Triple)..	27
Resim 4. Kol+DD grubu. Fare testis dokusu. Üçlü boyama (Triple).	27
Resim 5. Kolesterol grubu. Fare testis dokusu. H&E boyama.....	28
Resim 6. Kontrol grubu.Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi..	30
Resim 7. Sham grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi..	30
Resim 8. DD grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi..	31
Resim 9. DD grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi..	31
Resim 10. Kol+DD grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi..	32
Resim 11. Kolesterol grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi.....	32
Resim 12. Kolesterol grubu. Fare testis dokusu. Negatif kontrol.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Aquaporin 1 (AQP1) geni PCR görüntüsü.....	33
Şekil 2. GAPDH kontrol geni Real Time grafikleri.....	34
Şekil 3. AQP1 geni Real Time grafikleri.	35



1. ÖZET

Bu çalışmada hiperkolesterolemi oluşturulmuş farelerde Demir Dikeni (*Tribulus Terrestris*) ekstraktının oral gavaj yoluyla uygulanmasının farelerin testis dokusu üzerindeki etkilerinin histopatolojik olarak ve bu dokuda AQP1 ekspresyonu üzerine etkisinin immunohistokimyasal ve RT-PCR yöntemleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırma materyali olarak daha önceden çiftleşmemiş ve herhangi bir çalışmada kullanılmamış 43 adet / 40 günlük Balb-c cinsi erkek fare kullanıldı. Gruplar bir haftalık alıştırmaya süresi sonunda rastgele seçilen farelerden Kolesterol Grubu ($n=8$), Kolesterol ve Demir Dikeni Grubu ($n=8$), Demir Dikeni Grubu ($n=8$), Sham Grubu ($n=8$) ve Kontrol Grubu ($n=8$) olacak şekilde oluşturuldu. Kolesterol ve Kolesterol ve Demir Dikeni grubundaki farelere %3 w/w kolesterol intraperitoneal (i.p) olarak 15 gün boyunca uygulandı. 15 günün sonunda Demir Dikeni ve Kolesterol ve Demir Dikeni gruplarına Demir Dikeni ekstraktı 6 mg/kg olacak şekilde oral gavaj yöntemi ile 7 gün boyunca verildi. Deney sonunda tüm gruplardaki fareler tartıldıktan sonra testis dokuları alındı.

Hiperkolesterolemi oluşturulan farelerde Demir Dikeni ekstraktı uygulanması sonucunda farelerin canlı ağırlıklarının, testis ağırlıklarının ve serum total kolesterol düzeylerinin kontrol grubuna benzer düzeyde olduğu belirlendi. Kontrol, Sham, Demir Dikeni ve Kolesterol ve Demir Dikeni gruplarına ait farelerin testis dokularının normal histolojik yapıda olduğu ancak Kolesterol grubuna ait farelerin testis dokusunda seminifer tübüllerde hücre kayıpları ve hidropik dejenerasyon alanlarının olduğu görüldü.

Sonuç olarak; Kolesterol grubuna göre Demir Dikeni ekstraktı uygulanan grupta AQP1 mRNA ekspresyonunun daha yüksek olduğu tespit edildi. AQP1 immunoreaktivite derecesinin ise diğer gruplara göre daha zayıf olan grubun hiperkolesterolemi oluşturulan grup olması testis dokusunda kolesterolün AQP1 üzerine inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Testis, Kolesterol, Demir Dikeni (*Tribulus Terrestris*), AQP1, İmmünohistokimya, RT-PCR.



2.SUMMARY

In this study, it was aimed to determine the effects of administration of Tribulus Terrestris extract by oral gavage on mice testis tissue histopathologically as well as its effect on AQP1 expression with immunohistochemical and RT-PCR methods in mice with hypercholesterolemia.

As research materials, 43, 40-day-old Balb-c male mice which had not been previously mated and used in any study were used. The groups were formed as Cholesterol Group ($n=8$), Cholesterol and Tribulus Terrestris Group ($n=8$), Tribulus Terrestris Group ($n=8$), Sham Group ($n=8$) and Control Group ($n=8$) from the mice randomly selected at the end of the one-week practice period. 3% w/w cholesterol were administered to the mice in the Cholesterol group, Cholesterol and Tribulus Terrestris group intraperitoneally (i.p) for 15 days. At the end of 15 days, 6 mg/kg Tribulus Terrestris extract were given to the Tribulus Terrestris and Cholesterol and Tribulus Terrestris groups by oral gavage for 7 days. At the end of the experiment, the mice in all groups were weighed and then their testicular tissues were taken.

In consequence of the administration of the Tribulus Terrestris extract in mice with hypercholesterolemia, the mice's live weights, testis weights and serum total cholesterol levels were determined to be similar to the control groups. The testis tissues of the mice in the Control, Sham, Tribulus Terrestris and Cholesterol and Tribulus Terrestris groups were found to have normal histological structure, but in the testicular tissues of the mice belonging to the Cholesterol group, cell losses and hydrophilic degeneration areas were observed in the seminiferous tubules.

As a result; it was found that the expression of AQP1 mRNA was higher in the group administered Tribulus Terrestris extract than the cholesterol group. The finding that AQP1 immunoreactivity level was weaker in the hypercholesterolemia group compared to other groups suggests that cholesterol in the testis tissue has an inhibitory effect on AQP1.

Key Words: Testis, Cholesterol, Tribulus Terrestris, AQP1, Immunohistochemistry, RT-PCR.



1. GENEL BİLGİLERİ

Cinsel iktidarsızlık, ödem, karın şişliği ve kardiyovasküler hastalıklara karşı Hindistan, Çin, Bulgaristan ve Güney Afrika halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Kostova ve ark. 2002).

Su kanalı proteini ailesi olan Aquaporinler (AQPs) suyun hızlı hareketini kolaylaştıran, küçük hidrofobik integral membran kanal proteinleridir (Huang ve ark. 2006). Aquaporinler epitel boyunca düşük aktivasyon enerjisi ile suyun sürekli ve hızlı geçirgenliğini sağlayarak su dengesi düzenlenmesinden sorumludur (Agre ve ark. 1993, Brown ve ark. 1993, King ve Agre 1996, Wintour 1997). AQP1 ilk olarak insan kırmızı kan hücrelerinde ve renal proksimal tübüllerde tanımlanmıştır (Denker ve ark. 1988). AQP1'in vücutta sıvı salınımına ve sıvı geri emilimine katılarak su homeostazisi, nöro-homeostaz, sindirim, vücut ısısının düzenlenmesi ile üreme gibi fizyolojik süreçlerde önemli rolleri bulunduğu belirlenmiştir (Sui ve ark. 2001). AQP1'in anjiyogenez, yara iyileşmesi, organ rejenerasyonu ve tümör yayılmasında rolünün bulunabileceği öne sürülmüştür (Saadoun ve ark. 2005).

Testisler, holokrin tipte salgı yapan ekzokrin karakterde bir çift organdır. Her erişkin testis, 12-15 gram ağırlığında olup sağ testis genellikle sol testisten daha büyük ve ağırdır (Krause 2005). Her testiste yaklaşık 20-1000 seminifer tübül yer alır. Seminifer tübüllerde spermatogenik (germ) hücreler ve Sertoli (destekleyici) hücreleri olmak üzere iki tür hücre bulunur (Dongmei 2011).

1.1. Demir Dikeni (*Tribulus Terrestris*)

Cinsel iktidarsızlık, ödem, karın şişliği ve kardiyovasküler hastalıklara karşı Hindistan, Çin, Bulgaristan ve Güney Afrika halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Kostova ve ark. 2002). Bu bitki: saponinler, flavonoidler, alkaloidler gibi biyolojik maddeler ve diğer besin maddeleri bakımından büyük öneme sahiptir (Wang ve ark. 1997). Bu önemli metabolitlerin mevcudiyeti ve miktarı bitkinin kullanılan kısımlarına bağlıdır. Demir Dikeninin meyvesi (Caltrop fruit) ve kökü fitosteroller, flavonoidler, alkaloidler ve glikosidler gibi farmakolojik olarak önemli metabolitleri içerir (Wu ve ark. 1996).

Demir Dikeni, erkeklerde cinsel işlevi artırmak amacıyla bir enerji verici ve canlandırıcı olarak doğuya özgü bitkisel formülasyonlarda bir bileşen olarak yaygın bir şekilde kullanılır (Park ve ark. 2006). Bu bitki ekstresinin insanlar ve hayvanlarda uygulanmasının libido ve spermatogenezini geliştirdiği belirtilmiştir (Tomova ve ark. 1981). Demir Dikeninin saponin fraksiyonuna dayalı farmasötik preparatlarının ve gıda takviyelerinin dünya çapında satışı bulunmaktadır (Tomova ve ark. 1981, Adimoelja ve Adaikan 1997, Xu ve ark. 2000, Cai ve ark. 2001, Mulinacci ve ark. 2003). Geleneksel Çin tıbbında Demir Dikeninin meyvesi yüksek tansiyon, koroner kalp hastalığı (Chui ve ark. 1992, Lu ve ark. 1994) ve iktidarsızlık tedavisinde kullanılmıştır (Adimoelja 2000, Adaikan ve ark. 2000).

Demir Dikeni bitkisinin; idrar taşı (Al-Ali ve ark. 2003), Parkinson hastalığı (Badmaev 2002), malign melanom (Bedir ve Khan 2000), karaciğer, göz hastalıkları (Li ve Shi 1998) ve benign prostat hiperplazisi (Lokesh ve ark. 2001) gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğine dair bilgiler bulunmaktadır. Demir Dikeninin erkek cinsel fonksiyonunu (Gauthaman ve ark. 2002) ve sporcuların performansını geliştirebileceği öne sürülmüştür (Krcik 2001). Demir Dikeninin halk hekimliğinde yaygın olarak diüretik ve kolik ağrıları, hipertansiyon ve hiperkolesterolemiye karşı kullanıldığı da belirtilmiştir (Arcasoy ve ark. 1998).

1.2. Aquaporinler (AQPs)

Su kanalı proteini ailesi olan Aquaporinler (AQPs) suyun hızlı hareketini kolaylaştıran, küçük hidrofobik ve integral membran kanal proteinleridir (Huang ve ark. 2006). Aquaporinler epitel boyunca düşük aktivasyon enerjisi ile suyun sürekli ve hızlı geçirgenliğini sağlayarak su dengesi düzenlenmesinden sorumludur (Brown ve ark. 1993, Wintour 1997). Aquaporinlerin, moleküler ağırlığı 28 kDa (glikozillenmemiş form) ve 40-50 kDa (glikozillenmiş form) arasında değişen ve çoğunlukla homotetramerler olarak bulunan altı transmembran alanı olan hidrofobik proteinler olduğu bildirilmiştir (Yasui ve ark. 1999a).

Memelilerde on üç tip AQP (AQP0-12) tanımlanmıştır (Preston ve ark. 1992). Geçirgenliklerine bağlı olarak, memelilerde AQP'ler: su seçici geçirgen aquaporinler (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 ve AQP8); suyun yanında gliserol, üre ve diğer çözünen maddelere geçirgen olan aquaporinler (AQP3, AQP7, AQP9 ve AQP10) ve düşük hücreli aquaporinler veya süper aquaporinler (AQP11 ve AQP12) olarak üç gruba ayrılır (Murai-Hatano ve ark. 2008). Su taşımanın yanı sıra üre, arsenat taşıma özelliğine sahip olan aquaporinler, aquaglikoprotein olarak da adlandırılır. Aquaglikoproteinlerin çeşitli şeker alkollerinin (Heller ve ark. 1980, Hub ve DeGroot 2008) yanı sıra embriyo ve germ hücrelerinin dondurulmasında kullanılan gliserol ve diğer kriyoprotektan maddelerin de taşınmasında görev aldığı bildirilmiştir (Jin ve ark. 2011).

Aquaporinler, memeli türlerinde üreme organları dahil olmak üzere çeşitli organlarda eksprese edilir (Brown ve ark. 1993, Kozono ve ark. 2002). Aquaporinler böbrek, akciğer, pankreas, beyin, mide-bağırsak kanalı, göz, kulak, bağışıklık sistemi, deri, adipositler, kas, uterus ve testisler gibi geniş çeşitlilikteki hücre ve dokularda bulunmaktadır (Li ve ark. 1994, Ishibashi ve ark. 1997a, Frigeri ve ark. 1998, Page ve ark. 1998, Beitz ve Schultz 1999, Shanahan ve ark. 1999).

Aquaporinlerin birden fazla üyesinin testis (AQP0, AQP1, AQP7, AQP8 ve AQP9), efferent kanallar (AQP1, AQP9 ve AQP10), epididimis (AQP1, AQP3, AQP9 ve AQP10), vas deferens (AQP1, AQP2 ve AQP9) ve eklenik bezlerde (AQP1 ve AQP9) aktif olduğu gösterilmiştir (Huang ve ark. 2006). Hem memelilerde hem de teleostlarda, AQP'lerin spermatogenez sırasında sperm matürasyonu ve konsantrasyonu ile sperm aktivasyonu ve ejakülasyon üzerine hacim düzenlemesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Boj ve ark. 2015).

1.2.1. AQP0

İlk olarak sıgır major intrinsik ana protein (MIP) olarak adlandırılan ve 26 kDa ağırlığından dolayı MIP26 olarak da isimlendirilen AQP0 lensde ana intrinsik protein olarak tanımlanmıştır (Gorin ve ark. 1984).

AQP0'ın lens fiber hücrelerinin plazma membranı boyunca dağıldığı bildirilmiştir (Fitzgerald ve ark. 1983). AQP0'ın su geçirgenliğini ortamın pH ve Ca^{2+} düzeyine göre düzenlediği ve mutasyonunun konjenital katarakt ile sonuçlandığı belirlenmiştir (Shiels ve Bassnett 1996, Nemeth-Cahalan ve Hall 2000, Okamura ve ark. 2003).

1.2.2. AQP1

AQP1 ilk olarak insan kırmızı kan hücrelerinde ve renal proksimal tübüllerde tanımlanmıştır (Denker ve ark. 1988). İlk belirlendiğinde Tip 1 AQP olarak isimlendirilen AQP1; 28 kDa ağırlığında kanal oluşumunda entegre bir membran proteindir (Preston ve ark. 1992). Bitkiler ve bakterilerdeki membran proteinlerine benzerlikleri bunun bir membran kanal proteini olduğunu göstermiştir (Baker ve Saier 1990). Moleküler kütle ağırlığından dolayı ise CHIP28 olarak adlandırılan bu protein daha sonra AQP1 olarak isimlendirilmiştir (Preston ve Agre 1991). İnsan eritrositlerinde ise Colton kan grubu antijeni AQP1 olarak tanımlanmıştır (Preston ve ark. 1994, Smith ve ark. 1994). Eritrositlerde yapılan fonksiyonel analizler sonucunda AQP1'in

eritrosit membranındaki ozmotik su geçirgenliğinin %85'inden fazlasına katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur (Mathai ve ark. 1996).

İnsanda AQP1 geni 7p14 kromozomunda belirlenmiştir (Moon ve ark. 1993). Sekans verilerinin karşılaştırılması sonucunda, sığır lensinin ana intrinsik proteini (MIP; AQP0) ile güçlü bir homoloji sergilediği belirtilmiştir (Gorin ve ark. 1984). AQP1'in böbrek proksimal tübüllerinde mevcut olduğu, inen henle kulpunun ince ekstremitesinin apikal ve bazolateral yüzeylerinde bulunup nefronun diğer kısımlarında bulunmadığı tespit edilmiştir (Preston ve Agre 1991, Sabolic ve ark. 1992). İdrar iletici borucuklara ek olarak, AQP1 vasa recta'da mevcuttur (Sabolic ve ark. 1992).

AQP1'in varlığı; akciğer, anüs, karaciğer, böbrek, göz, safra kesesi ve kırmızı kan hücreleri gibi birçok dokuda bildirilmiştir (Higa ve ark. 2000, Mobasheri ve Marples 2004, Calamita ve ark. 2005). Sıçan gastrointestinal kanalında submukoza ve lamina propriadaki lenfatik damarların endotel hücrelerinde de belirlenmiştir (Nielsen ve ark. 1993, Koyama ve ark. 1999).

Sıçan lenf düğümünde, lenf damarlarının ve yüksek endotelyal venüllerin endotel hücrelerinde AQP1 eksprese edilmiştir (Ohtani ve ark. 2003). AQP1'in, safra kesesi epitel hücrelerinin hem apikal hemde bazolateral membranında lokalize olduğu saptanmıştır (Nielsen ve ark. 1993, Hasegawa ve ark. 1994a). İnsan pankreasında, AQP1'in orijinal olarak sadece asiner hücrelerde eksprese edildiği bildirilirken (Hasegawa ve ark. 1994a), bunun yanında pankreasta kan damarlarında da bulunduğu öne sürülmüştür (Hurley ve ark. 2001, Ko ve ark. 2002).

AQP1, sıçan aortu ve büyük arterlerin düz kaslarında (Shanahan ve ark. 1999) ve sıçan epididimisi (Arrighi ve ark. 2010) gibi diğer organlardaki düz kaslarda olası fonksiyonel rolü ile tespit edilmiştir. AQP1 vas deferens, seminal vezikül ve prostat bezinin epitel hücrelerinde bulunduğu belirlenmiştir (Brown ve ark. 1993).

AQP1'in vücutta sıvı salınımına ve sıvı geri emilimine katılarak su homeostazisi, nöro-homeostaz, sindirim, vücut ısısının düzenlenmesi ile üreme gibi fizyolojik süreçlerde önemli rolleri bulunduğu belirlenmiştir (Sui ve ark. 2001). AQP1 eksikliği olan bireylerde kusurlu idrar konsantrasyonu gözlenmiştir (King ve ark. 2001).

AQP1'in anjiyogenez, yara iyileşmesi, organ rejenerasyonu ve tümör yayılmasında rolünün bulunabileceği öne sürülmüştür (Saadoun ve ark. 2005). Tümör ilerlemesinde; AQP1, mikrovasküler dansite ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile endometriyal adenokarsinom arasında pozitif bir bağlantı kurulmuştur (Pan ve ark. 2008). AQP1'in kanserli hücrelerin yakınındaki lenfositler ve dendritik hücrelerde eksprese olduğu belirlenmiştir (Moon ve ark. 2004).

AQP1'in siliyer cisim, iris ve lens epitelinde eksprese olduğu gösterilmiştir (Hasegawa ve ark. 1993). AQP1'in kornea endotelinde (Nielsen ve ark. 1993) ve keratositlerde (Hamann ve ark. 1998) bulunduğu ve korneanın şişmesini önlemede rol oynayabileceği öne sürülmüştür.

Memelilerde, vajina, uterus, ovaryum, plasenta, fetal membran, embriyo içinde epididimis, vas deferens, testis ve prostatda AQP1 ekspresyonu gösterilmiştir (Brown ve ark.1993, Kozono ve ark. 2002). İnsan ve farelerin germ hücrelerinde AQP1 proteini tespit edilmiştir (Curry ve ark. 1995, Liu ve ark. 1995, Lu ve ark. 2007). Fare embriyolarında AQP1 ekspresyon seviyesinin çözülme sonrası dondurulan embriyoların hayatta kalmasına katkıda bulunduğu gösterilmiş ve bu bilginin sperm dondurulması araştırmaları için yararlı olacağı bilgisi verilmiştir (Edashige ve ark. 2003).

1.2.3. AQP2

AQP2, sıçanlarda vas deferens'in distal kısmında eksprese edilmiştir (Stevens ve ark. 2000). AQP2'nin rete testis, efferent kanallar ve epididimis dahil reproduktif yoldaki dağılımı belirlenmiştir (Domeniconi ve ark. 2008).

AQP2'nin sıçan ve insanlarda iç kulakta endoplazmik retikulum membranında bulunduğu ve endolenfin homeostazisinde aktif rol oynadığı öne sürülmüştür (Mhatre ve ark. 2002, Taguchi ve ark. 2007).

1.2.4. AQP3

AQP3 ilk olarak sıçan cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır (Ishibashi ve ark. 1994, Echevarria ve ark. 1994). AQP3; insan ve farelerde mayoz II'nin metafaz (MII) aşamasında ovulasyon öncesi foliküllerin granuloza ve theca hücrelerinde belirlenmiştir (Meng ve ark. 2008, Thoroddsen ve ark. 2011). AQP3 böbrekte, sıçan ve insanda vücut yüzeyini kaplayan deride eksprese edilmiştir (Ishibashi ve ark. 1994, Matsuzaki ve ark. 1999a, Sougrat ve ark. 2002).

AQP3'ün, sığır embriyolarının vitrifikasyonu sırasında, etilen glikolün geçirgenliğinde görev aldığı ve kriyoprezervasyonun ardından embriyoların kalitesini belirten bir biyobelirteç olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Campos-Chillón ve ark. 2006, Camargo ve ark. 2011).

1.2.5. AQP4

AQP4 farelerde, homoloji klonlaması ile beyinde bol miktarda eksprese edilerek klonlanmıştır (Jung ve ark. 1994, Hasegawa ve ark. 1994b). AQP4 baskın olarak memeli beyinde bulunan bir su kanalı proteindir (Jung ve ark. 1994).

AQP4'ün sıçan iskelet kaslarında hızlı kasılan ekstansör digitorum longus kasının sarkoleminde lokalize olduğu belirlenmiştir (Frigeri ve ark. 1998). AQP4'ün insan midesinde parietal hücrelerinde eksprese olduğu (Misaka ve ark. 1996), sıçan midesinde ise gastrik bezin parietal hücrelerinin bazolateral membranında bulunduğu belirlenmiştir (Koyama ve ark. 1999). AQP1-yoksun yada AQP4-yoksun farelerde üriner konsantrasyon yeteneğinin daha da azaldığı öne sürülmüştür (Van Hoek ve ark. 2000).

1.2.6. AQP5

AQP5'in cDNA'sı sıçan submandibular bezden ve insan tükürük bezinden homoloji klonlamasıyla elde edilmiştir (Raina ve ark.1995, Lee ve ark. 1996). AQP5, çeşitli dokularda yaygın olarak bulunan transselüler ve transepitelyal su hareketinde önemli rol oynayan transmembran su kanalı proteinlerindedir (King ve Agre 1996, Verkman ve ark. 1996). Tükürük bezi, göz, lakrimal bez, trakea ve akciğerde de ekspresyonu belirlenmiştir (Raina ve ark. 1995).

AQP5, sıçanda submandibular, parotis ve dil altı bezlerinin sekretuar asiner hücrelerinde tespit edilmiştir (Matsuzaki ve ark. 1999b). AQP5-yoksun farelerde parotis ve sublingual asiner hücrelerde osmotik su geçirgenliğinin azaldığı belirlenmiştir (Krane ve ark. 2001). AQP5, sıçanlarda gastrointestinal kanaldaki mukus salgılayan bezlerin bazılarında eksprese edilmiştir (Parvin ve ark. 2002, Matsuzaki ve ark. 2003). Midede pilorik bez hücrelerinde ve duodenumda duodenal bez hücrelerinde de AQP5 varlığı belirlenmiştir (Parvin ve ark. 2002, Matsuzaki ve ark. 2003).

1.2.7. AQP6

AQP6, sıçan ve insan böbrek cDNA kütüphanesinden gelen bir aquaporin homoloğu olarak klonlanmış ve başlangıçta WCH3 ve hKID olarak adlandırılmıştır (Ma ve ark.1993, 1996). Xenopus oositte eksprese edildiğinde civaya duyarlı osmotik su geçirgenliğinin artışı bildirilmiştir (Ma ve ark. 1996).

AQP6'nın sıçan böbreğindeki toplama kanallarının asit salgılayan interkalasyon hücrelerinde eksprese olduğu ortaya konulmuştur (Yasui ve ark. 1999a, 1999b, Ohshiro ve ark. 2001). AQP6'nın böbrekte hücre yüzeyinde lokalize olmadığı fakat toplama kanallarının böbrek epitel hücrelerindeki hücre içi keseciklerde bulunduğu gösterilmiştir (Yasui ve ark. 1999b).

1.2.8. AQP7

AQP7'nin AQP3'e en yüksek benzerlik gösteren AQP olduğu bildirilmiştir (Ishibashi ve ark. 1997b). İnsanda, AQP7 adipoz dokularda belirlenmesinden dolayı aquaporin adipozu (AQPap veya AQP7L) olarak da adlandırılmıştır (Kuriyama ve ark. 1997, Kishida ve ark. 2000, 2001). AQP7'nin, AQP9 ile birlikte, arsenit taşınmasından sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Liu ve ark. 2002). *Xenopus* oositlerde AQP7'nin, ozmotik su geçirgenliğinin yanı sıra, üre ve gliserolün kolaylaştırılmış şekilde taşınmasını uyardığı gösterilmiştir (Ishibashi ve ark. 1997b, Kuriyama ve ark. 1997).

AQP7, testiste bolca eksprese edilmiş ve seminifer tübüllerde spermatidler (Ishibashi ve ark. 1997b), spermatozoon ile seminifer epitelde kalan artık cisimler içinde lokalize olduğu bildirilmiştir (Suzuki-Toyota ve ark. 1999, Calamita ve ark. 2001).

1.2.9. AQP8

AQP8'in, sıçan ve fare testis hücrelerinden klonlandığı bildirilmiştir (Koyama ve ark.1997, Ma ve ark. 1997). Pankreas, karaciğer, kolon, tükürük bezi, böbrek, testis, epididimis, mide, duodenum, jejunum, akciğer, trakea ve plasenta gibi birçok organ ve dokularda varlığı belirlenmiştir (Ishibashi ve ark. 1997a, Koyama ve ark. 1997, Ma ve ark. 1997, Elkjaer ve ark. 2001).

AQP8'in spermatogenezisin primer spermatositlerden spermatidlere kadar tüm aşamalarında ve Sertoli hücrelerinde eksprese olduğu ortaya konmuştur (Elkjaer ve ark. 2001, Tani ve ark. 2001).

1.2.10. AQP9

AQP9'un, akuagliseroproteinler grubuna dahil olan AQP3 ve AQP7'ye benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Ishibashi ve ark. 1998). AQP9'un aktivitesi, phloretin ve civaya karşı da hassastır (Tsukaguchi ve ark. 1999). AQP9'un hücre zarı boyunca su ve çözünenlerin koordineli hareketini mümkün kıldığı

ve minimal ozmotik taşınım ile metabolitlerin hızlı hücresel tutulumu ve çıkışına olanak sağladığı öne sürülmüştür (Tsukaguchi ve ark. 1998).

İnsanlarda, AQP9'un lökositlerde yoğun, karaciğer, akciğer ve dalakta daha az miktarda olduğu, testiste ise interstisyel Leydig hücrelerinin plazma membranında ve spermatozoidlerde lokalizasyonu bildirilmiştir (Ishibashi ve ark. 1998, Nicchia ve ark. 2001).

1.2.11. AQP10

AQP10, insan dokularından klonlanmıştır ve AQP3, AQP7 ve AQP9 gibi akuagliseroporinlere benzerlik gösterdiği ve gliserol ve üre taşınmasını uyardığı bildirilmiştir (Ishibashi ve ark. 2002). AQP10'un, ince duodenumda eksprese olduğu belirlenmiştir (Ishibashi ve ark. 2002).

1.2.12. AQP11

AQP11, aquaporin ailesinin yeni bir üyesidir ve endoplazmik retikulum (ER) gibi hücre içi organellerin zarında bulunduğu belirlenmiştir (Morishita ve ark. 2005, Rojek ve ark. 2013). AQP11'in, testiste yoğun böbrekte ve karaciğerde ise daha az eksprese olduğu belirlenmiştir (Gorelick ve ark. 2006). AQP11-yoksun farelerde polikistik böbrek olgusuna bağlı ölümcül böbrek yetmezliği sonucu doğumdan 1 ay sonra ölüm gerçekleştiği tespit edilmiştir (Morishita ve ark. 2005).

1.2.13. AQP12

AQP12'nin pankreas asiner hücrelerinde ve diğer AQP'lerle birlikte meme kanseri hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir (Ohta ve ark. 2009, Shi ve ark. 2012).

1.3. Testisin Histolojik Yapısı

Erkek üreme sistemi; testisler, genital kanallar, eklenik bezler ve penisten oluşur (Luiz ve José 2003). Testisler, holokrin tipte salgı yapan ekzokrin karakterde bir çift organdır. Her erişkin testis, 12-15 gram

ağırlığında olup sağ testis genellikle sol testisten daha büyük ve ağırdır (Krause 2005). Testisler karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişir. Fetüsün gelişimi sırasında deriden bir kılıf olan skrotuma doğru gerçekleştirdikleri göç sırasında her testis tunika vaginalis adı verilen ve peritondan gelişmiş olan seröz bir zar ile sarılıdır (Luiz ve José 2003).

Embriyonun genotipi (46, XX veya 46, XY) dölleme ile sağlanır. Embriyo 1-6. haftalarda, cinsiyet bakımından farklılaşmamış bir aşamada kalır. Bunun anlamı genetik olarak dişi ve erkek embriyoların fenotipik olarak ayırt edilemez olduklarıdır. Fenotipik cinsel farklılaşma, SRY geni tarafından belirlenir. SRY geni ayrıca testis belirleyici faktör (TDF) olarak da bilinir ve Y proteinini kodlar. Embriyo fenotipik cinsel farklılaşmaya 7. haftada başlar. Bu aşamada Leydig hücreleri testosteron, Sertoli hücreleri ise Mülleriyan İnhibe Edici Faktör (MIF) üretmek amacıyla farklılaşır. Embriyo TDF, testosteron ve MIF varlığında erkek fenotipine yönlendirilecektir. Dış genital organın kadın ya da erkek özellikleri 12. haftaya kadar tanınabilir ve 20. haftaya kadar fenotipik farklılaşma tamamlanır (Ronald 2014).

Testisler, tunika albuginea adı verilen sıkı bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir. Fibröz bir kapsül olan tunika albuginea, tunika vaginalisin visseral yaprağın altında yer alır ve tunika vaginalisten sadece bir bazal lamina ile ayrılır. Dağınık düz kas hücrelerini içeren yoğun fibroelastik bağ dokusu özelliğindedir (Krause 2005). Testisler, funikulus spermaticus adı verilen ve ductus deferensin yanı sıra kremaster kası, spermatik arter ve pampiniform pleksus venlerini içeren spermatik kordonla skrotum denilen kese içerisinde asılı halde bulunur (Ross ve Pawlina 2016). Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Tunika albuginea testisin içine giren fibröz uzantılar (septum), bezi testiküler lobüller/bölmeler denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Bu uzantılar tam değildir ve bölmeler çoğunlukla birbiriyle ilişkilidir. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül (tubulus seminiferus kontortus) yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan, lenf damarı,

sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içerir (Ross ve Pawlina 2011, Luiz ve José 2003).

Her testiste yaklaşık 20-1000 seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül, 150-250 µm çapında ve 30-70 mm uzunluğundadır. Birbirine eklenen seminifer tübüllerin 500 m'yi aşan boru şeklinde bir uzunluğu vardır (Luiz ve José 2003, Krause 2005). Seminifer tübüller başlangıçta kör uçla başlayan, sonlanırken lümeni daralan ve düz tübüller yada tubuli rekti olarak adlandırılan kısa segmentler halinde devam eden kıvrımlı yapılardır. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır. Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal yada seminifer epitelden oluşur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir (Luiz ve José 2003, Gümüşel 2013).

Seminifer epitel spermatogenik (germ) hücreler ve Sertoli (destekleyici) hücreleri olmak üzere iki tür hücreden oluşur.

Spermatogenik hücreler;

Spermatogonyum: Yuvarlak veya oval çekirdeklere sahip ve bazal membranın yakınında bulunan ilk sıradaki hücrelerdir. Bölünerek Tip A ve B hücrelerini oluştururlar. A Tipi hücreler yavaş bölünen ve B tipi hücrelere dönüşen kök hücrelerdir (Dongmei 2011).

Spermatosit: Spermatogonyum B hücrelerinde mayoz bölünme başlar ve lümeneye doğru hareket ederek Primer (birinci mayotik bölüm) ve Sekonder (ikinci mayotik bölüm) spermatoositlere dönüşürler. Primer spermatoositler en çok profaz safhasında görülür ve büyük çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin iplikleri bulunur. Sekonder spermatoositler ikinci mayotik bölünmeyi çok hızlı tamamlar ve bu nedenle seminifer tübüllerde nadir olarak tespit edilebilirler (Dongmei 2011).

Spermatid: Sekonder spermatozoidlerin bölünmesi 23 kromozom içeren spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır (Luiz ve José 2003). İkinci mayotik bölünme sonucunda oluşan her bir spermatid, 22 otozom ve bir X veya Y kromozomu ile temsil edilen DNA içeriğinde ve haploid kromozom sayısındadır (Ross ve Pawlina 2011).

Spermatozoon (spermium): Spermatidlerin başkalaşması sonucunda şekillenen ve baş, boyun ve kuyruk bölümlerinden oluşan hücrelerdir. Seminifer tübüllerin lümeninde yer alırlar. Baş kısmında dişi eşey hücrelerini döllenmede rol alan hidrolitik enzimleri içeren (örneğin, asit fosfataz, neuraminidaz, hiyaluronidaz ve proteazlar) akrozomu bulundurlar (Leslie ve James 2015).

Sertoli hücreleri, spermatogenik hücrelerin mimari stabilitesini destekleyen, mikro-ortam ve kan-testis bariyerini şekillendiren hücrelerdir (Mruk ve Cheng 2004). Spermatogenik hücreleri arasında yer alan Sertoli hücreleri girintili sitoplazmaya, ökromatik çekirdeğe ve iki yada daha fazla belirgin çekirdeğe sahiptir (Johnson 1991). Sertoli hücrelerinin çekirdeği olukludur (Şahin 2016). Bu özellikler, seminifer tübüllerin lümenine doğru materyallerin akışına yardımcı olur, proteinlerin ve diğer faktörlerin salgılanmasını indükleyerek spermatogenik hücrelerinin hayatta kalmasını destekler (Mruk ve Cheng 2004). Seminifer sıvısının salgılanmasında, olgunlaşmış spermatidlerin salınmasında, artık cisimlerin, fagositozu ve apoptotik spermatogenik hücre kalıntılarının ortamdaki uzaklaştırılmasını içeren çoklu karmaşık rollere sahiptirler (Clermont 1990). Sertoli hücreleri; bazal kısım, ana gövde, lateral hücre uzantıları ve apikal hücre yüzeyi olmak üzere 4 bölüme ve morfolojik açıdan ise tip A ve tip B olarak adlandırılan iki farklı kategoriye ayrılır. Tip A Sertoli hücrelerinde lümeneye atılmaya hazır olgun spermatidler Sertoli hücresi kripleri arasında oldukça derinde bulunurken, Tip B Sertoli hücrelerinde spermatidler yüksekte ve lümeneye yakın yerlerde bulunur (Dimitriadis ve ark. 2015).

Yetişkinlerde Sertoli hücrelerinin sayısı hem testis ebadını hem de günlük sperm üretimini belirler (Sharpe ve ark. 2003). Bazal lamina üzerine

oturan Sertoli hücrelerinin Leydig hücreleri üzerinde parakrin etkisi bulunmaktadır (Johnson ve ark. 2008).

Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasındaki interstisyel alanda (interstisyel bağ dokusu) bulunan ve yüksek konsantrasyonda testosteron üretimi ile spermatogenezi destekleyen hücrelerdir. Yuvarlak ökromatik bir çekirdeğe ve periferik bölgesinde lipit damlacıkları içeren soluk lekeli sitoplazmaya sahip olan yuvarlak şekilli hücrelerdir (Dongmei 2011). Leydig hücreleri, kolesterolün sentezlendiği ve pregnenolonun testosteroonla hızla metabolize edildiği bol miktarda granülsüz endoplazmik retikulumuna sahiptir (Johnson ve Neaves 1981). Bu hücreler, testis somatik hücrelerinin sadece %5'ini oluşturur (Kerr 1991, Setchell 2008).

1.4. Hiperkolesterolemi ve İnfertilite

Fransız kimyager M.E. Chevreul, 1815'te ilk kolesterol keşfi ile tanınmıştır. İnsan safra kesesi taşlarının bir bileşeni olarak bulmuş ve buna kolesterol (safra için chole ve katı için stereos) adını vermiştir (Deuel 1957, Gibbons ve ark. 1982).

Erkek üreme sisteminde lipid homeostazisinin testiküler ve post-testiküler mekanizmalarla yapıldığı öne sürülmüştür (Lobaccaro ve ark. 2012, Maqdasy ve ark. 2013). Serum lipid konsantrasyonunun sperm parametrelerinin kalitesi ile bir ilişkisi olmadığı, trigliserit düzeyindeki artışla ilişkili olarak endojen testosteroonla azalma olduğu bildirilmiştir (Zmuda ve ark. 1997, Khalili ve ark. 2006).

Trigliseritlerdeki artışın erkeklerde spermatogenez üzerinde zararlı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Vignon ve ark. 1989). İnfertil erkeklerde sperm trigliseritlerinin sperm aktivitesini ve testosteroon miktarını azalttığı saptanmıştır (Ergun ve ark. 2007). Bu bulguların aksine, trigliserit konsantrasyonu ve sperm parametreleri (sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji) arasında bir ilişki göstermediği de öne sürülmüştür (Kulka ve ark. 1984). İdiopatik infertilitesi olan hastalardan elde edilen spermatozoonlarda

kolesterol/fosfolipid oranı daha yüksek bulunmuştur (Sugraroek ve ark. 1991).

Lxr (karaciğer X reseptörü eksik fare modeli) eksikliği olan erkek farelerde diyet kolesterolünün aşırı yüklenmesinin tam infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir. Bu özellikteki farelerde spermatogenezin etkilenmemesine rağmen spermatozoonların yaşam ömrünün kısa olduğu, daha az hareketli olduğu ve erken bir akrozom reaksiyonuna karşı oldukça hassas olduğu belirlenmiştir (Ouvrier ve ark. 2011). Ayrıca, hiperkolesteroleminin serbest radikaller ve spermatozoon için sitotoksik olan oksidatif stresin artması ile üreme ve testiküler hasara yol açtığı öne sürülmüştür (Shalaby ve ark. 2004, Bashandy 2007, Fang ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2012). Antioksidanların ve lipit düşürücü ajanların uygulanmasının, hiperkolesterolemi sırasında testis ve üreme fonksiyonlarını koruduğu gösterilmiştir (Shalaby ve ark. 2004, Bashandy 2007, Fang ve ark. 2012).

Bu çalışmada hiperkolesterolemi oluşturulmuş farelerde Demir Dikeni (*Tribulus Terrestris*) ekstraktı uygulamasının testis dokusu ve AQP1 ekspresyonu üzerine etkisinin histopatolojik, immünohistokimyasal ve Real Time PCR (RT-PCR) yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için Kafkas Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan (Karar No: 25.05.2015/051) onay alınmıştır. Çalışmanın deney aşaması Kafkas Üniversitesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarları ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.1. Deney Hayvanı Materyali

Çalışmada kullanılan deney hayvanları Erzurum Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığında temin edildi. Çalışmada daha önceden çiftleşmemiş ve herhangi bir çalışmada kullanılmamış 43 adet/40 günlük Balb-c cinsi erkek fare kullanıldı. Hayvanlar $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, %60-65 düzeyinde nemin ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünün uygulandığı koşullarda günlük temizliği yapılan kafeslerde ve her kafeste 4 hayvan olacak şekilde *ad libitum* olarak beslenerek barındırıldı.

Gruplar bir haftalık alıştırma süresi sonunda rastgele seçilen farelerden aşağıdaki gibi oluşturuldu.

Kolesterol ve Kol+DD (Kolesterol ve Demir Dikeni) grubu için ayrılan 19 fareye Freund's Adjuvant Incomplete içinde çözdürülen %3 w/w kolesterol intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı (Kadir 2009). Rastgele seçilen 3 adet fareden 15 gün sonunda kan örnekleri alınarak kolesterol düzeyleri 116.5 ± 7.8 olarak ölçüldü ve yüksek kolesterol seviyesine (Satomi ve ark. 2012) ulaştığı belirlendi. Bunun sonucunda ise Demir Dikeni (DD) ve Kol+DD grubundaki farelere Demir Dikeni uygulamasına başlandı.

Kolesterol Grubu (Kol) (n=8): Bu gruptaki farelere Freund's Adjuvant Incomplete içinde çözdürülen %3 w/w kolesterol intraperitoneal (i.p) olarak 15 gün boyunca uygulandı.

Kolesterol ve Demir Dikeni Grubu (Kol+DD) (n=8): Bu gruptaki farelere distile su içinde çözülmüş ticari amaçla satılan katkısız DD ekstraktı 6 mg/kg

oral gavaj yöntemi ile 7 gün boyunca uygulandı (Jagadeesan ve Kavitha 2006).

Demir Dikeni Grubu (DD) (n=8): Bu gruptaki farelere distile su içinde çözülmüş ticari amaçla satılan katkısız DD ekstraktı 6 mg/kg oral gavaj yöntemi ile 7 gün boyunca uygulandı (Jagadeesan ve Kavitha 2006).

Sham Grubu (n=8): Bu gruptaki farelere 15 gün boyunca Freund's Adjuvant Incomplete intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı.

Kontrol Grubu (n=8): Bu gruptaki farelere herhangi bir uygulama yapılmadı.

Deney sonunda fareler eter anestezisi yapıldıktan sonra servikal dislokasyon yoluyla ötenazi edilerek testis dokuları alındı. Sağ testis dokuları RT-PCR yönteminde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilirken sol testis dokuları ise histolojik ve immünohistokimya çalışmaları için %10'luk formaldehit tespit solüsyonuna alındı.

2.2. Canlı Ağırlık ve Testis Ağırlığı Ölçümü

Deneye başlamadan önce ve deney sonunda gruptaki fareler tartılarak ağırlıkları alındı. Sağ ve sol testis ağırlıkları ayrı ayrı ölçülüp çeşitli çalışmalar için farklı işlemler uygulandı.

2.3. Biyokimyasal Analizler

Deney sonunda eter anestezisi altında kalpten alınan kan örneklerinden total kolesterol değerleri ölçüldü.

2.4. Histolojik İncelemeler

%10'luk formaldehit tespit solüsyonunda tespit edilen testis dokuları rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 5 µm'lik kesitlere dokunun genel yapısını göstermek amacıyla Crossman'ın üçlü boyama tekniği ve Hematoksilen&Eosin boyaması uygulandı.

2.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler

İmmünohistokimyasal inceleme için Avidin-Biotin-Peroksidaz tekniği kullanıldı. Krom alum jelatin ile kaplı lamlara 4 µm'lik kesitler alınarak deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemleri uygulandı. Ardından endojen peroksit aktivitesini önlemek için hidrojen peroksitin metanoldeki (%3) çözeltisinde 20 dk bekletildi. Kesitler PBS (Fosfatlı Buffer Solüsyonu) (pH 7.4) ile yıkandıktan sonra antijenik reseptörlerin açığa çıkması amacıyla sodyum sitrat buffer (pH 6.0) solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında 600 watt, 20 dk tutuldu. Blocking Solüsyon A (İnvitrogen-Histostatin Plus Bulk Kit) ile 10 dk boyunca inkübe edilen kesitler PBS yıkaması yapılmadan Aquaporin 1 primer antikor [1/500] (abcam: ab9566) damlatılarak oda sıcaklığında 1 saat boyunca bekletildi. Daha sonra kesitler biotinli sekonder antikor ile 30 dk ve Streptavidin peroksidaz solüsyonunda 30 dk inkübe edildi. Antikor reaksiyonunu göstermek amacıyla kesitlere DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kromojen solüsyonu eklendi ve ışık mikroskobu ile incelendi. İmmünoreaktivitenin durumu kontrol edilerek reaksiyon PBS ile durduruldu. Distile su ile yıkanan kesitler zıt boyama için Harris'in hematoksilen boyamasına tabi tutuldu ve dehidre edilerek entellan ile kapatıldı.

Kesitlerde boyanma derecesi kriter alınarak semikantitatif yöntem ile skorlama yapıldı. Değerlendirmede zayıf (+), orta derecede (++) ve yoğun (+++) olmak üzere boyanma özelliklerine göre derecelendirme yapıldı. İmmünohistokimyasal boyamanın spesifik olup olmadığını belirlemek amacıyla kesitlere bütün işlemler aynı olmak koşulu ile primer antikor ilave edilmeksizin (negatif kontrol) immünohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı.

Histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda (Olympus Bx53, Japan) değerlendirildikten sonra fotoğraflandırıldı.

2.6. Real Time PCR (RT-PCR) Yöntemi

2.6.1. TRI Reagent ile Total RNA İzolasyonu

- -80°C'de alınan numuneler oda ısısına gelmesi beklenmeden 1 ml TRI Reagent içerisinde homojenize edildi.
- 1 ml TRI reagent içerisinde konulan dokular, homojenizasyonun ardından sürekli pipetlenerek TRI reagent'in dokulara iyice nüfuz etmesi amaçlandı.
- 5 dk oda sıcaklığında bekletilen homojenatlar her 1 ml TRI reagent için 200 µl kloroform eklendi ve 15 saniye boyunca hızlı bir şekilde çalkalandı
- Karışım 10 dk. boyunca oda ısısında bekletildi ve bu süre sonunda 15 dk boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda oluşan üst faz, yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Yeni tüpe aktarılan üst fazın üzerine, kullanılan 1 ml TRI reagent için 500 µl izopropanol eklenerek 10 dk. boyunca oda ısısında bekletildi.
- Karışım, süre sonunda 8 dk. boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda karışım yavaş bir şekilde dökülerek pelet elde edildi.
- Elde edilen peletin üzerine, kullanılan 1 ml TRI reagent için 1 ml %75'lik etanol eklenerek vortexlendi ve peletin etanol içerisinde çözünmesi sağlandı.
- Vortexlenen karışım 5 dk. boyunca 7.500 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda karışım yavaş bir şekilde dökülerek tekrar peletelde edilerek tüpler ters çevrildi ve 15-20 dk. boyunca oda ısısında tüplerin kuruması sağlandı.
- Kurutma işleminin ardından pelet, 80 µl DNase/RNase içermeyen dH₂O ile iyice çözülerek homojenize edildi.

2.6.2. Total RNA Örneklerinden Geri Transkripsiyon (RT) Yöntemi ile cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

- cDNA kütüphanesinin oluşturulması için Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Yürütülen tüm basamaklar kit protokolünde belirtilen yönergeler doğrultusunda yapıldı.
- RNA örneklerinden eşit yoğunlukta alınması için gereken miktar belirlendi.
- RNA örnekleri bir pipet yardımıyla buz üzerinde tekrardan homojenize edildi ve 1. basamakta hesaplanan örnek miktarları PCR tüplerine aktarıldı.
- PCR tüplerine aktarılan örneklerin üzerine 1 µl Oligo (dT)18 primeri eklenerek son hacim steril dH₂O ile 12 µl'ye tamamlandı.
- Karışım pipet yardımı ile homojenize edilerek santrifüj edildi (Tek spin).
- Spinlemeden sonra karışım, 65°C'de 5 dk. boyunca inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından her tüpe 2 µl dNTP (10mM) mix, 1 µl Ribo Lock RNase Inhibitor (20 U/µl), 4 µl 5x Reaction Buffer ve 1 µl Revert AidM- MuLV RT (200U/µl) eklendi.
- Son olarak karışım sırasıyla 42°C'de 60dk. ve 70°C'de 5 dk. boyunca bekletilerek reaksiyonların tamamlanması sağlandı.

2.6.3. RT-PCR ile Aquaporin 1 (AQP1) Gen Expresyonunun Belirlenmesi

cDNA içeren tüplerin her birinden 1 µl örnek DNA, 2,5µl 10X tampon, 2,5 µl MgCl₂, 2 µl dNTP, 2,5 µl MMP-primer-F, 2,5 µl MMP-primer R, kontrol grubu için 2,5 µl Aktin F, 2,5 µl Aktin R, 0,5 µl Taq DNA Polimeraz ve son olarak toplam hacmi 25 µl tamamlamak için 11,5 µl ddH₂O eklenerek tüpler PCR cihazına yerleştirildi ve Tablo 5'de gösterilen PCR programları uygulandı. Elde edilen ürünler -20 °C'ye alındı.

DNA örneklerine uygulanan PCR programı.

94°C'de, 2dk
 94°C'de 1 dk,
 60°C'de, 1dk, } X 40
 72 °C'de 1 dk
 72°C'de 5dk
 4°C'de 5 dk

Light Cycler sisteminin uygulanmasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Sybergreen 1) kullanılarak çoğalmaya bağlı DNA artışı ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir.

Çalışma kapsamında kullanılan Real Time PCR Mix içeriği Tablo 1'de gösterilmiştir. Hazırlanan mix 95°C' de 5 dk. enzim aktivasyonu için bekletildi ve daha sonra uygun koşullarda reaksiyonu (Tablo 2) gerçekleştirildi.

Tablo 1. Real Time PCR Mix içeriği.

Karışım	Miktar
SybergreenMix	10 µl
PCR Grade Water	4 µl
PrimerMix	1 µl
cDNA	5 µl

Tablo 2. Real Time PCR reaksiyon koşulları.

50 Siklus	Süre	Derece
Denatürasyon	10s	95°C
Bağlanma	30s	55°C
Uzama	10s	72°C

Tablo 3. Çalışmada kullanılan Aquaporin 1 (AQP1) ve GAPDH primerlerinin dizilimleri.

Gen	Oligonükleotid Dizisi	Forward/Reverse
Aquaporin 1	TGGACACCTCCTGGCTATTG	Forward
Aquaporin 1	GGGCCAGGATGAAGTCGTAG	Reverse
GAPDH	GTTCGACAGTCAGCCGCATC	Forward
GAPDH	GGAATTTGCATGGGTGGA	Reverse

2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS (16.0) paket programı kullanıldı.

İkiden fazla gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için Tek Yönlü Varyans (One Way ANOVA) testi uygulandı. İkişerli gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için ise T-testi kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Testis ve Canlı Ağırlık Bulguları

Tablo 4. Gruplar arası canlı ağırlık (g) sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

GÜNLER → GRUPLAR ↓	1.GÜN	24.GÜN		P
KOLESTEROL	33.40±0.58 ^a	42.73±0.71 ^a	***	0.000
KOL+DD	31.99±1.11 ^a	36.70±1.38 ^b	*	0.019
DD	29.89±0.99 ^a	29.15±1.10 ^c	-	0.626
SHAM	32.68±0.60 ^a	38.60±1.24 ^{ab}	**	0.001
KONTROL	32.49±0.81 ^a	36.03±1.63 ^b	-	0.080
P	0.061	0.000		

Aynı sütunda aynı harf taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar önemsiz, farklı harf taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar önemlidir.

Aynı satırdaki ikiyeşerli gruplar arasında ise; (-): P>0,05, *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001

Deneye başlamadan önce (1. gün) tüm gruplardaki fareler canlı ağırlık yönünden değerlendirildiğinde Kontrol, Sham, DD, Kolesterol ve Kol+DD grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark gözlenmezken (P>0,05), deney sonunda (24. gün) bu gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi (P<0,001). 24. günde canlı ağırlık bakımından DD grubu ile Kolesterol, Kol+DD, Sham ve Kontrol grupları arasında ve Kolesterol grubu ile Kol+DD, DD ve Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (P<0,05). Kontrol, Sham ve Kol+DD grupları arasında ise istatistiksel açıdan bir fark gözlenmedi (P>0,05). 1. ve 24. günlerde canlı ağırlık bakımından yapılan karşılaştırmada DD ve Kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken, Kolesterol grubunda farklılık ileri düzeyde önemli (P<0,001), Kol+DD grubunda önemli (P<0,05), Sham grubunda çok önemli (P<0,01) bulunmuştur.

Tablo 5. Gruplar arası testis ağırlığı (g) sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

TESTİSLER → GRUPLAR ↓	SAĞ TESTİS	SOL TESTİS		P
KONTROL	1.494±0.83 ^{bc}	1.466±0.84 ^{bc}	-	0.82
SHAM	1.731±0.11 ^{ab}	1.680±0.13 ^{ab}	-	0.77
DD	1.326±0.02 ^c	1.316±0.02 ^c	-	0.74
KOLESTEROL	1.880±0.60 ^a	1.915±0.79 ^a	-	0.73
KOL+DD	1.792±0.09 ^a	1.654±0.77 ^{ab}	-	0.27
P	0.000	0.000		

Aynı sütunda aynı harf taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar önemsiz, farklı harf taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar önemlidir.

Aynı satırdaki ikiyeşerli gruplar arasında ise; (-): $P>0,05$, *: $P<0,05$, **: $P<0,01$, ***: $P<0,001$

Tüm gruplardaki fareler sağ testis ağırlığı yönünden değerlendirildiğinde Kolesterol, Kol+DD ve Sham grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark görülmedi ($P>0,05$). DD grubu ile Kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan bir fark gözlenmezken ($P>0,05$), DD grubu ile Kolesterol, Kol+DD ve Sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($P<0,05$). Sol testis ağırlığı bakımından Kolesterol grubu ile DD ve Kontrol grupları arasında ve DD grubu ile Sham, Kolesterol ve Kol+DD arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($P<0,05$) saptandı. Tüm gruplardaki farelerin sağ ve sol testis ağırlıkları arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görüldü.

3.2. Kolesterol Değerleri

Tablo 6. Gruplar arası Kolesterol seviyelerinin (mg/dl) istatistiksel değerlendirilmesi

KOLESTEROL SEVİYELERİ →	(mg/dl)
GRUPLAR ↓	
KOLESTEROL	111.78± 3.50 ^a
KOL+DD	77.86± 0.94 ^b
DD	73.05± 1.67 ^{bc}
SHAM	70.36± 0.84 ^c
KONTROL	70.55 ± 0.95 ^c
Sig.	0.000

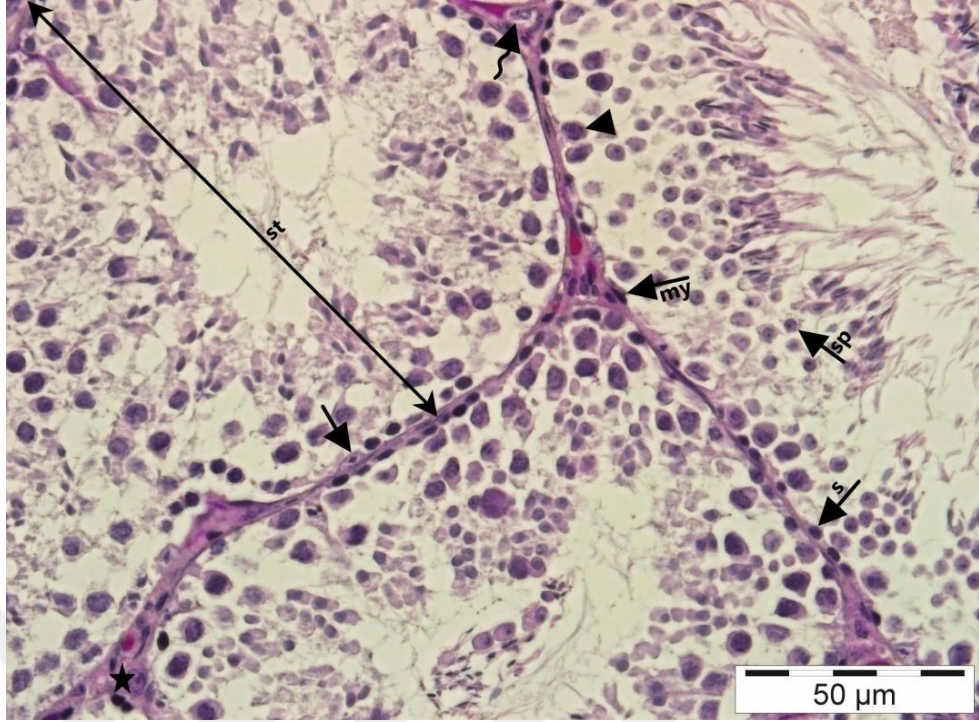
Aynı sütunda aynı harf taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar önemsiz, farklı harf taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar önemlidir (P<0,001).

Kolesterol seviyesi bakımından DD grubu ile Kontrol ve Sham grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark gözlenmezken (P>0,05). Kolesterol grubu ile Kol+DD, DD, Sham ve Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi (P<0,001).

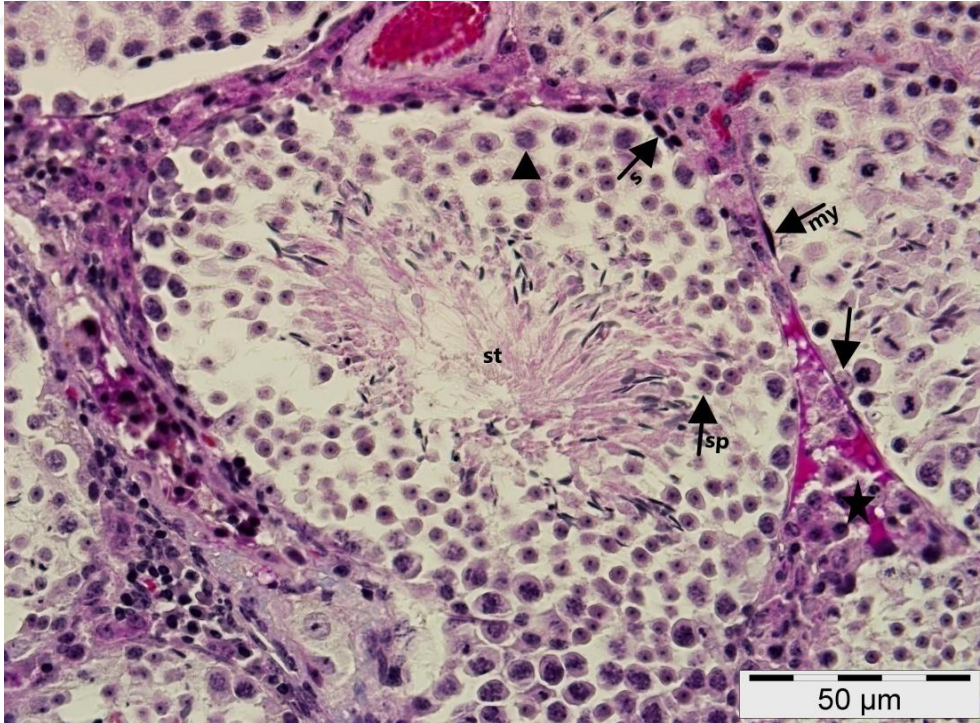
3.3. Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubu farelerin testis dokusunda seminifer tübüllerin ve bu tübüllerde bulunan spermatogonium, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve Sertoli hücrelerinin normal yapıda olduğu görüldü. Seminifer tübüllerin arasında intersitisyel bağ dokusu (interstiyel alan) ile bağ dokusu içerisinde Leydig hücreleri ve kan damarlarının bulunduğu gözlemlendi (Resim1).

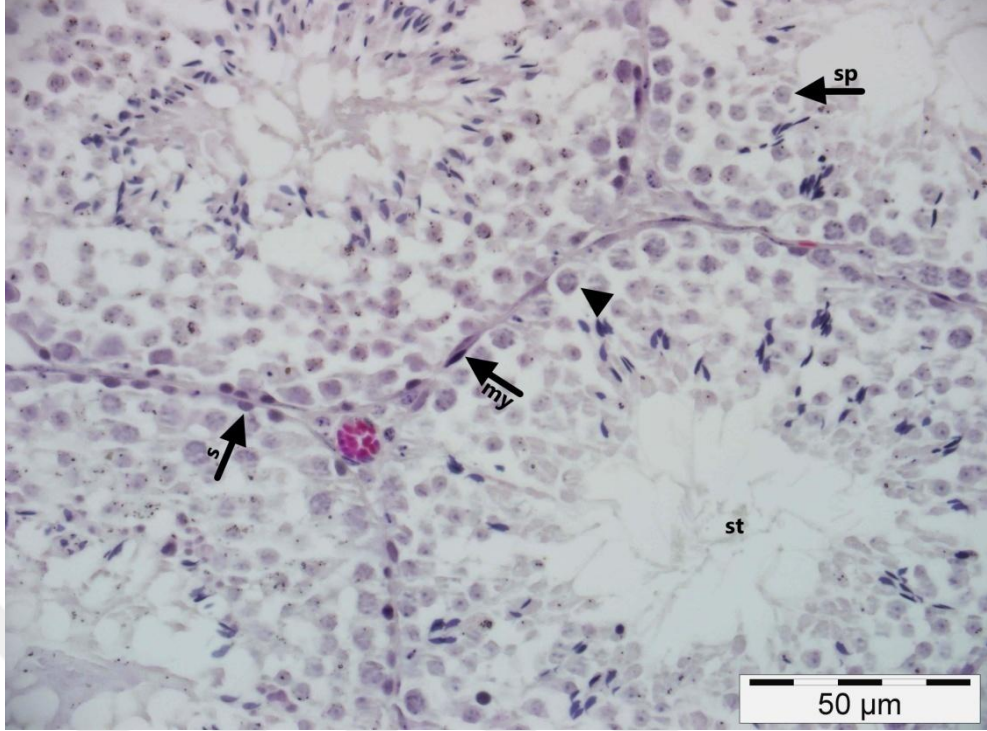
Sham, DD ve Kol+DD gruplarındaki farelerin testis dokularının Kontrol grubundakiler ile benzer histolojik yapıya sahip olduğu gözlemlendi (Resim 2-4). Kolesterol grubundaki farelerin testis dokularında seminifer tübüllerde hücre kayıpları ve hücrelerde hidropik dejenerasyon olduğu saptandı (Resim 5).



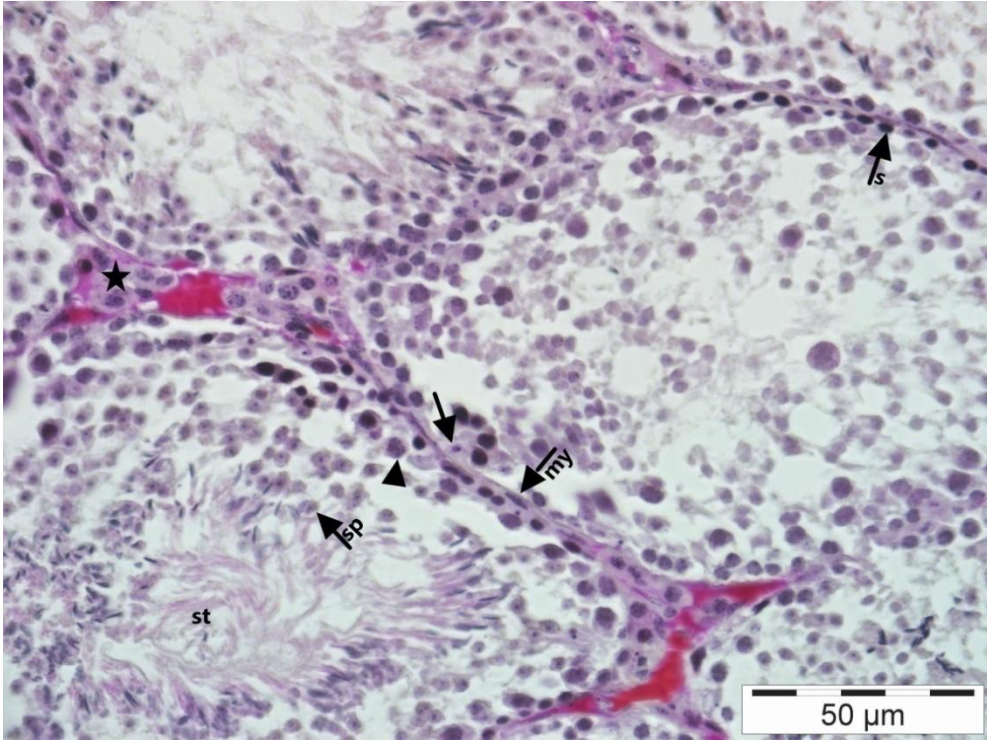
Resim 1. Kontrol grubu. Fare testis dokusu. (st): Seminifer tübül, (okmy): Myoid hücre, (oks): Spermatogonium, (ok başı): Primer spermatozoid, (ok): Sertoli hücresi, (yıldız): İnterstiyeel bağ dokusu, (kivrikk ok): Leydig hücresi, (oksp): Spermatozoid. Üçlü boyama (Triple).



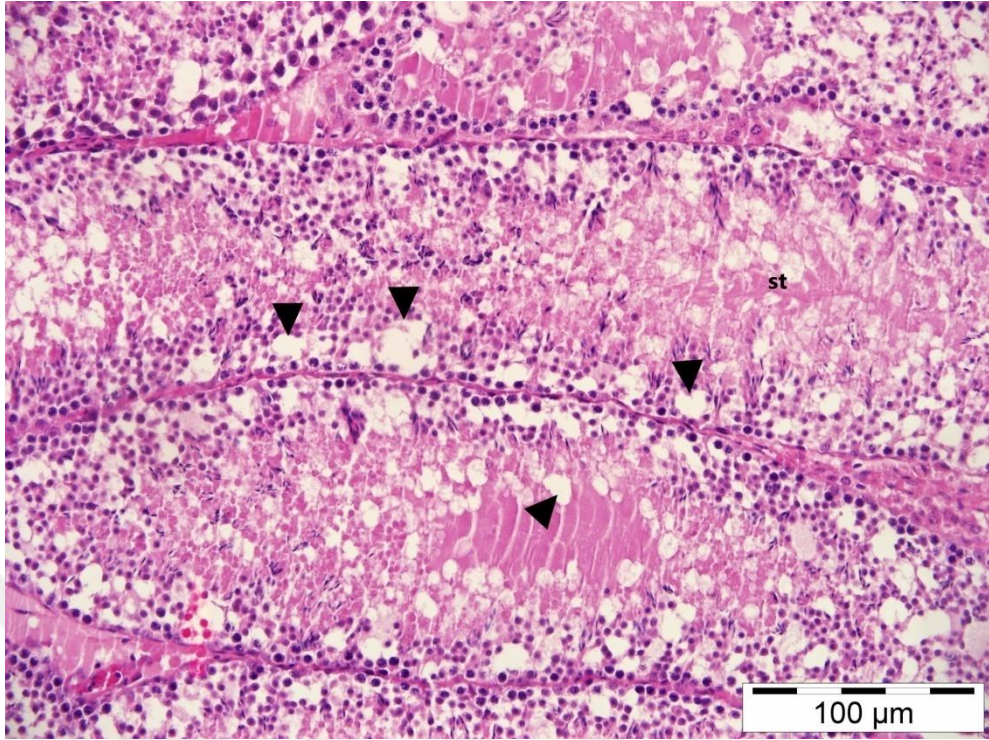
Resim 2. Sham grubu. Fare testis dokusu. (st): Seminifer tübül, (okmy): Myoid hücre, (oks): Spermatogonium, (ok başı): Primer spermatozoid, (ok): Sertoli hücresi, (yıldız): İnterstiyeel bağ dokusu, (oksp): Spermatozoid. Üçlü boyama (Triple).



Resim 3. DD grubu. Fare testis dokusu. (st): Seminifer tübül, (okmy): Myoid hücre, (oks): Spermatogonium, (ok başı): Primer spermatozoid, (oksp): Spermatozoid. Üçlü boyama (Triple).



Resim 4. Kol+DD grubu. Fare testis dokusu. (st): Seminifer tübül, (okmy): Myoid hücre, (oks): Spermatogonium, (ok başı): Primer spermatozoid, (ok): Sertoli hücresi, (yıldız): İnterstiyel bağ dokusu, (oksp): Spermatozoid. Üçlü boyama (Triple).



Resim 5. Kolesterol grubu. Fare testis dokusu. (st): Seminifer tübül, (ok başı): Hidropik dejenerasyon. H&E boyama.

3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Tüm gruptaki farelerin testis dokusu AQP1'in immünohistokimyasal olarak dağılımı ve immünoreaktivite derecesi yönünden incelendi ve kapsül, interstiyel bağ dokusu, damar endoteli ile eritrositlerde AQP1 immünoreaktivitesi belirlendi (Resim 6-11).

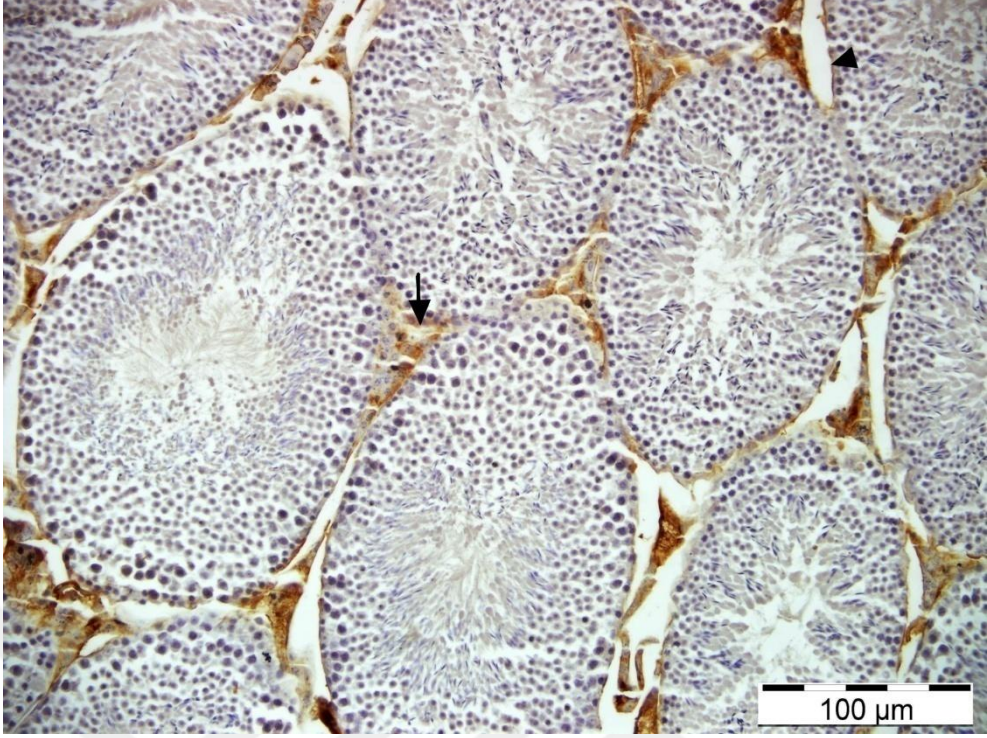
Kontrol, Sham, DD, Kol+DD ve Kolesterol grubundaki farelerin testis dokusunu saran kapsülde orta derecede AQP1 immünoreaktivitesi görüldü. Kontrol, Sham, Kol+DD ve Kolesterol gruplarında interstiyel bağ dokusunda yoğun AQP1 immünoreaktivitesi gözlenirken DD grubunda orta derecede olduğu saptandı. Kontrol ve Sham gruplarında damar endotelinde AQP1 immünoreaktivitesi orta derece, DD, Kol+DD ve Kolesterol gruplarında ise zayıf derecede olduğu belirlendi. Kontrol, Sham, DD ve Kol+DD gruplarında eritrositlerde AQP1 immünoreaktivitesinin yoğun, Kolesterol grubunda ise

orta derecede olduğu görüldü (Tablo 7). Negatif kontrol fare testis dokusunda ise AQP1 immünoreaktivitesi gözlenmedi (Resim 12).

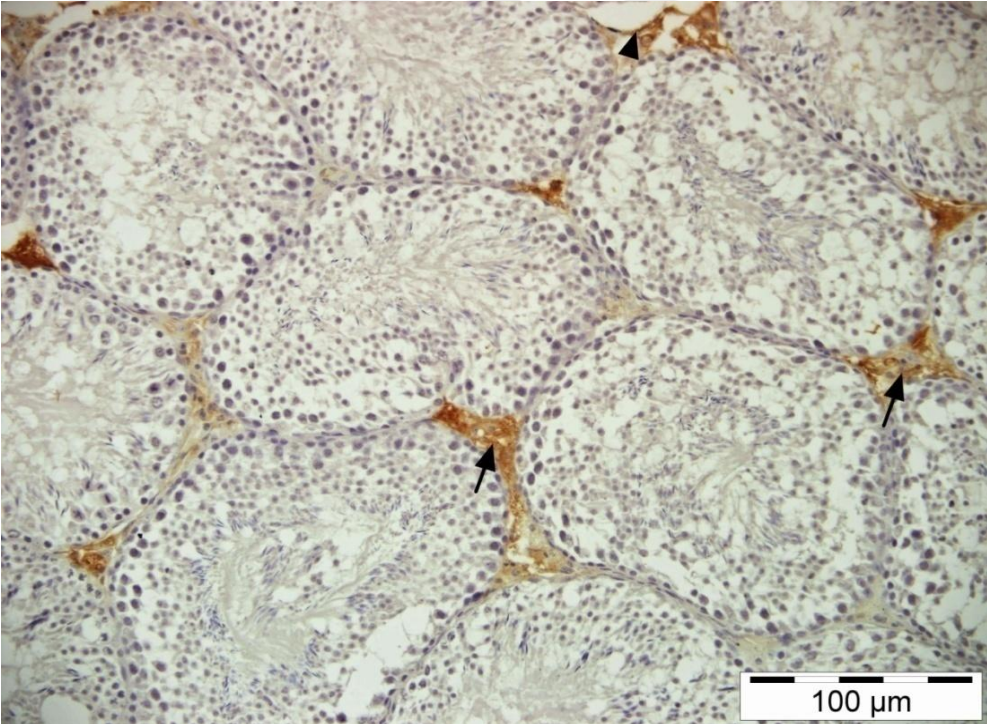
Tablo 7. Gruplarda AQP1 immünoreaktivitenin semikantitatif analiz sonuçları.

	Kontrol	Sham	DD	Kol+DD	Kolesterol
Kapsül	++	++	++	++	++
İnterstiyeel bağ dokusu	+++	+++	++	+++	+++
Damar endoteli	++	++	+	+	+
Eritrositler	+++	+++	+++	+++	++

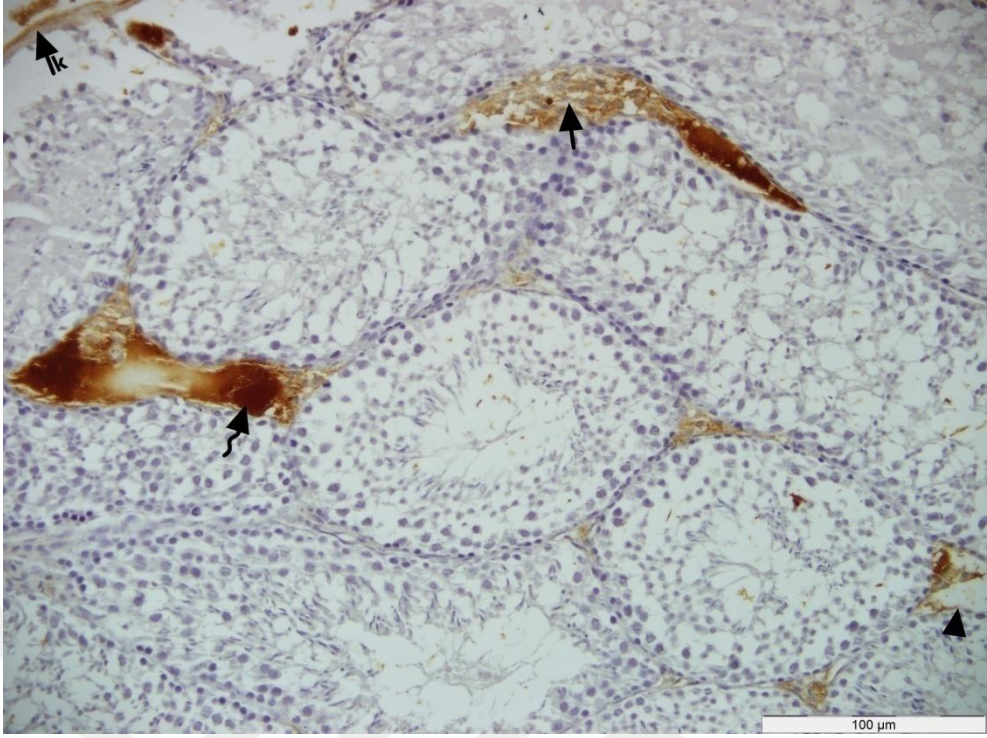
Testisdeki AQP1 immünoreaktivitesi; (+): Zayıf, (++) : Orta, (+++) : Yoğun.



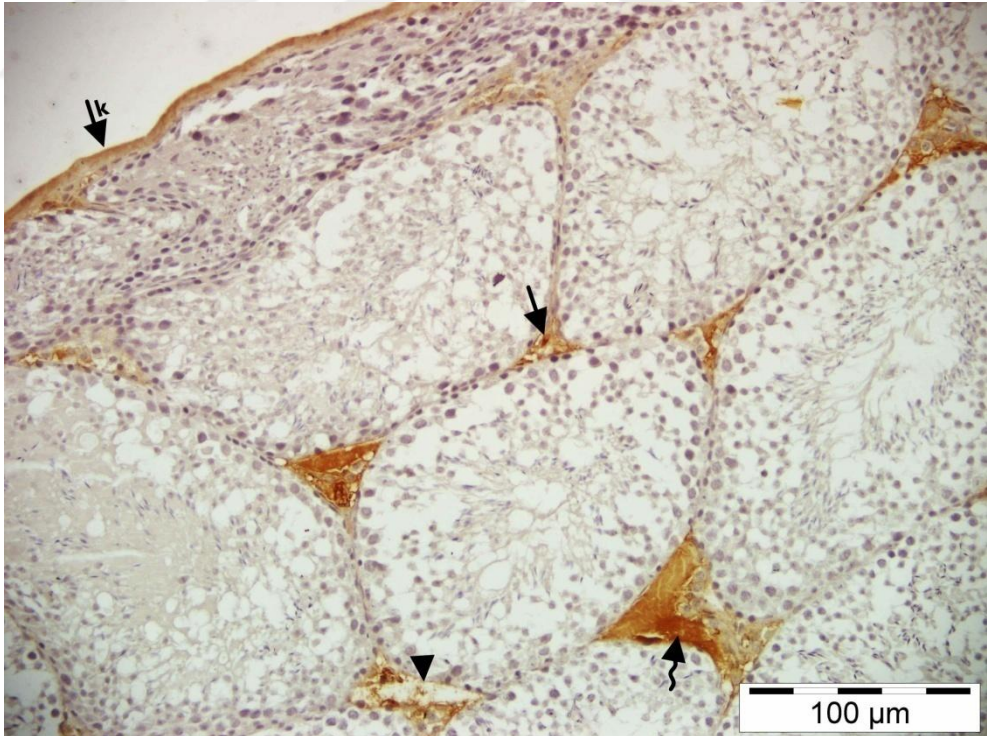
Resim 6. Kontrol grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoaktivitesi. (ok): İnterstiyeel bağ dokusu, (ok başı): Damar endotelii.



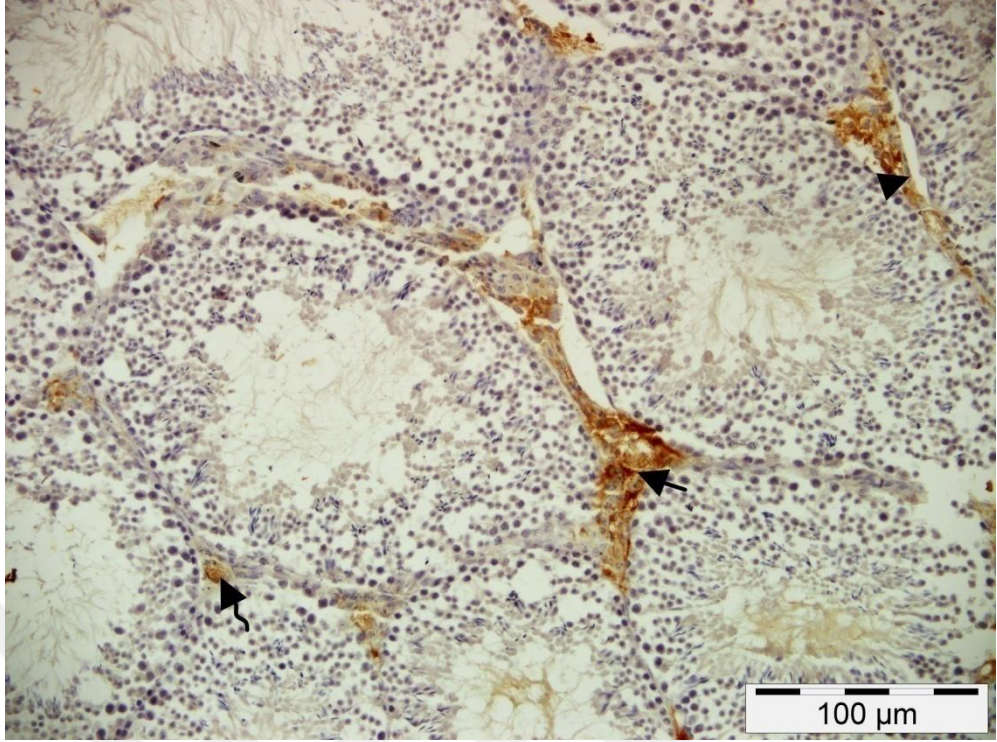
Resim 7. Sham grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoaktivitesi. (ok): İnterstiyeel bağ dokusu, (ok başı): Damar endotelii.



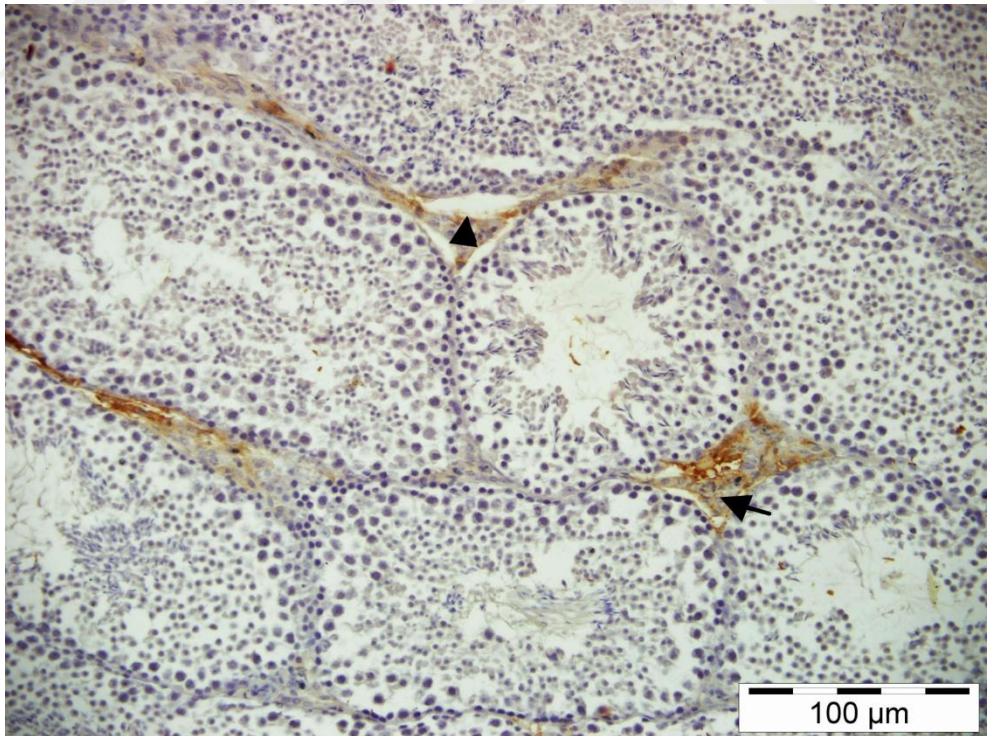
Resim 8. DD grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi. (ok): İnterstiyeel bağ dokusu, (ok başı): Damar endoteli, (kıvrık ok): Eritrosit, (okk): Kapsül.



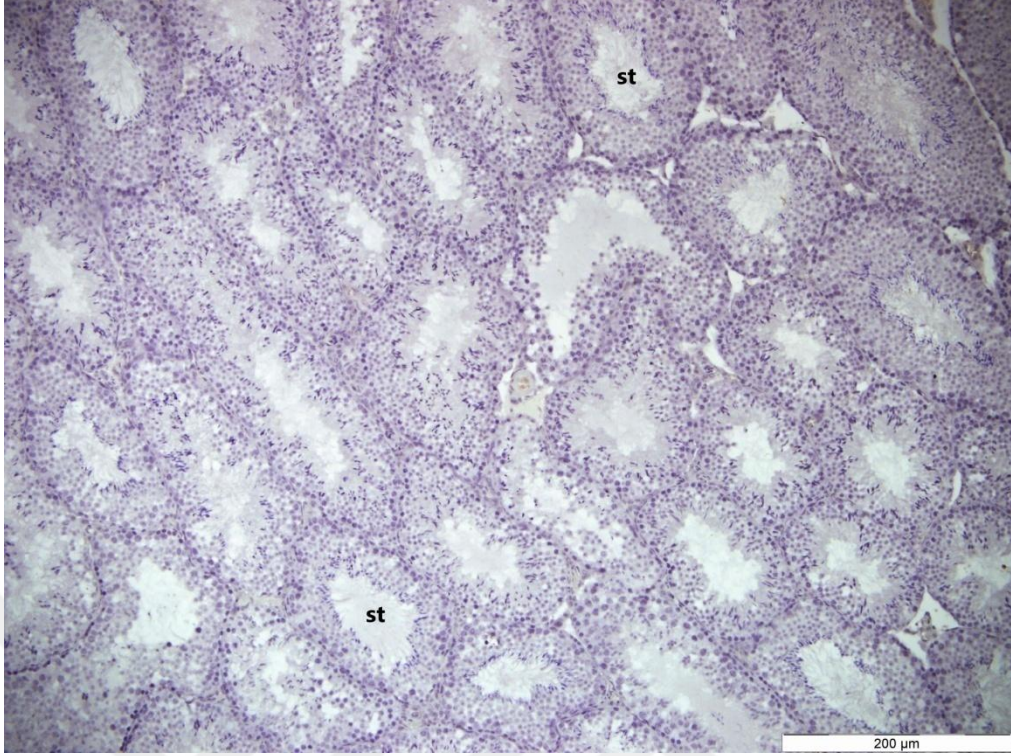
Resim 9. DD grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi. (ok): İnterstiyeel bağ dokusu, (ok başı): Damar endoteli, (kıvrık ok): Eritrosit, (okk): Kapsül.



Resim 10. Kol+DD grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi. (ok): İnterstiyeel bağ dokusu, (ok başı): Damar endotelii, (kıvrık ok): Eritrosit.



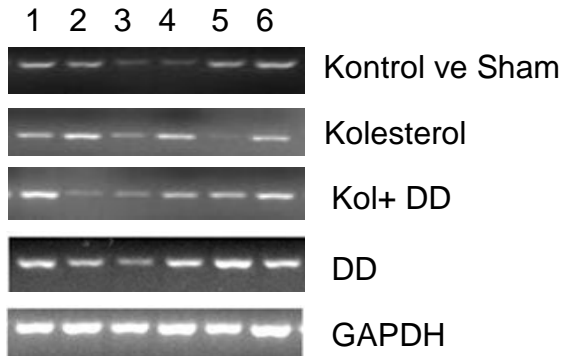
Resim 11. Kolesterol grubu. Fare testis dokusu. AQP1 immünoreaktivitesi. (ok): İnterstiyeel bağ dokusu, (ok başı): Damar endotelii.



Resim 12. Kolesterol grubu. Fare testis dokusu. Negatif kontrol. (st): Seminifer tübül.

3.5. Real-Time PCR Bulguları

Çalışmamızda oluşturulan grupların ilk olarak Aquaporin1 (AQP1) geni PCR ile elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre genin varlığı belirlenmiştir (Şekil 1).

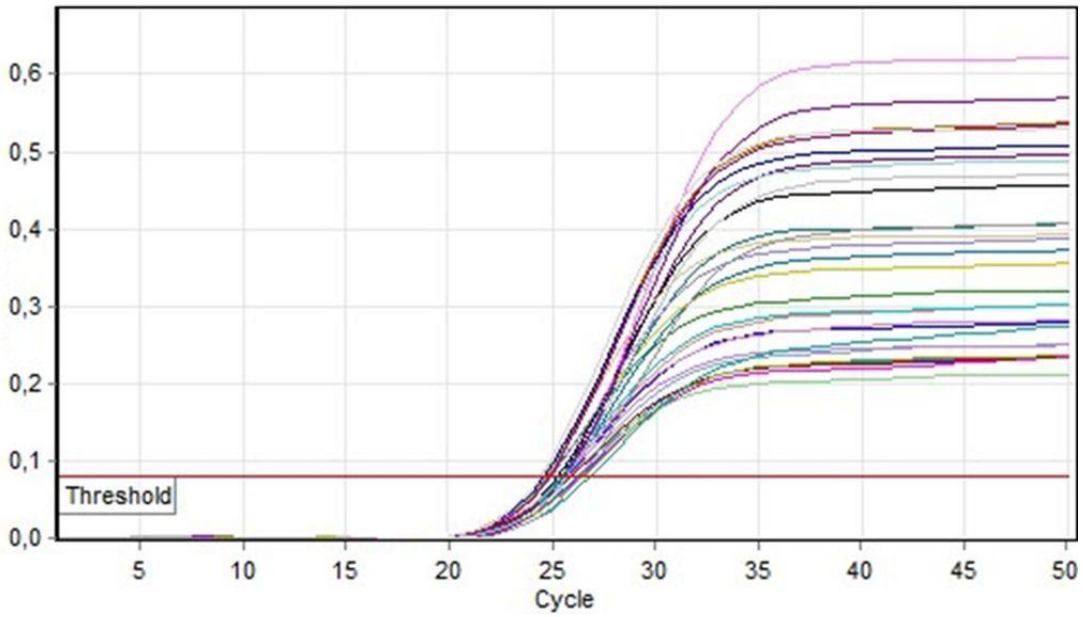


Şekil 1. Aquaporin 1 (AQP1) geni PCR görüntüsü.

AQP1 geni PCR sonuçları genin varlığı gösterilmiş ve genin ekspresyon düzeyi için Light Cycler Syber Green metodu kullanılmıştır. Gruplar arasında AQP1'in gen ekspresyonu RT-PCR ekniğiyle analiz edilmiş ve kontrol grubu olarak GAPDH kullanıldı.

Tablo 8. Gruplar arasında GAPDH mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması (Şekil 2).

GRUPLAR	N	GAPDH mRNA	SD
KONTROL	6	85,710	9,856
SHAM	6	84,423	8,402
KOLESTEROL	6	79,318	9,714
KOL+DD	6	80,926	8,450
DD	6	83,547	10,920

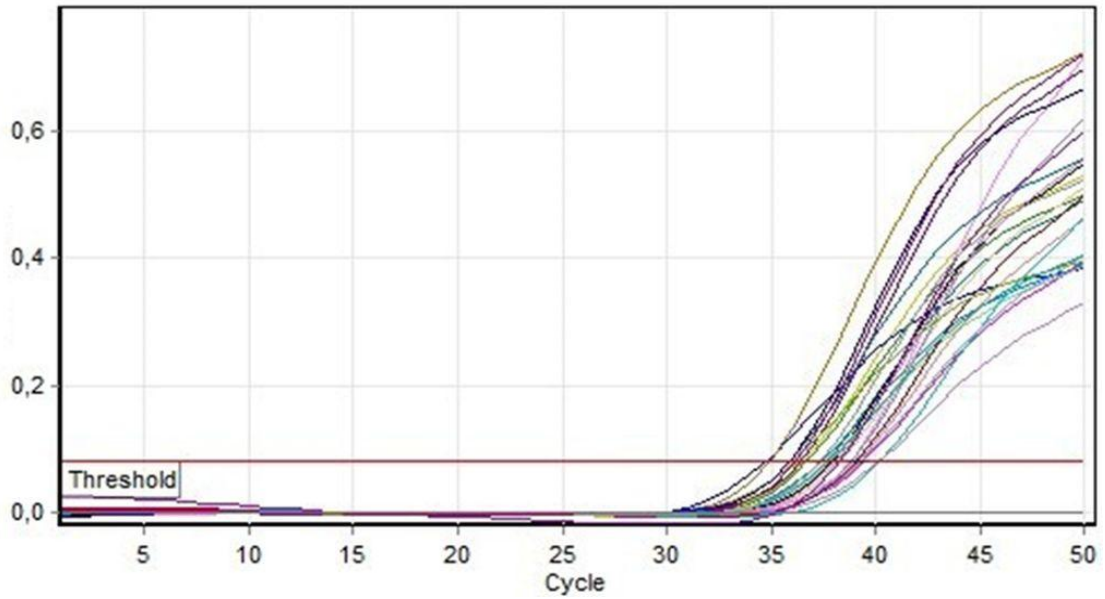


Şekil 2. GAPDH kontrol geni Real Time grafikleri.

Gruplar GAPDH geni ekspresyon düzeyi bakımından istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($P>0,05$) (Tablo 8, Şekil 2).

Tablo 9. Gruplar arasında Aquaporin 1 (AQP1) mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması (Şekil 3).

GRUPLAR	N	AQP1 mRNA	SD
KONTROL	6	0,0030	0,00027
SHAM	6	0,0029	0,00030
KOLESTEROL	6	0,0034	0,00035
KOL+DD	6	0,0074	0,00074
DD	6	0,0082	0,00081



Şekil 3. AQP1 geni Real Time grafikleri.

AQP1 geni amplifikasyon sonuçları kontrol geni ile karşılaştırıldığında Kontrol, Sham ve Kolesterol gruplarının ekspresyon düzeyinin diğer gruplara göre yakın miktarda olduğu belirlendi. Kol+DD grubunun Kontrol, Sham ve Kolesterol gruplarına göre ekspresyon düzeyi fazlayken, DD grubunun ise ekspresyon düzeyinin diğer gruplara göre daha fazla olduğu belirlendi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($P < 0,05$)

(Tablo 9, Şekil 3). Bu sonuçlar Demir Dikeninin AQP1 geni ekspresyonunu arttırdığı ve ekspresyona etki ettiğini gösterdi.



4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lipid homeostazı, spermatogenik hücreleri için özellikle önemlidir. Lipid konsantrasyonları kolesterol, desmosterol ve fosfolipid gibi yağ türevlerinin farklılaşmasıdır ve bu farklılaşmalar spermatogenik hücrelerin membran akışkanlığını ve döllenenmesini korumak için önemlidir (Rejraji ve ark. 2006). Lipid metabolik bozukluklarının doğurganlık üzerindeki etkisi şimdilerde klinik bir problem haline gelmiştir (Kasturi ve ark. 2008, Maqdasy ve ark. 2013). Bir dizi insan çalışması hiperkolesterolemi ve erkek infertilitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Padrón ve ark. 1989, Ramírez-Torres ve ark. 2000).

Limon otu esansiyel yağının farelerde serum kolesterol düzeyini ve vücut ağırlığını azalttığı bildirilmiştir (Celso ve ark. 2011). Sıçanlarda kolesterolü yüksek yağlı diyet ile beslenme sonucunda, canlı ağırlık, testis ağırlığı ve serum total kolesterol değerlerinin arttığı ancak timokinon uygulaması ile bu değerlerin istatistiksel olarak kontrol grubuna benzer değerlere düştüğü öne sürülmüştür (Asker ve Karadağ Sarı 2017). Diabetik erkek sıçanlarda tarçının vücut ağırlığında düşüşe neden olduğu belirlenmiştir (Yediel Aras ve Karadağ Sarı 2016). Demir Dikeninin lipidler üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, Demir Dikeninin serum kolesterol ve trigliserit düzeylerini önemli ölçüde azaltabileceğini göstermiştir (Chu ve ark. 2003). Demir Dikeninin halk hekimliğinde yaygın olarak diüretik ve kolik ağrıları, hipertansiyon ve hiperkolesterolemiye karşı kullanıldığı belirtilmiştir (Arcasoy ve ark. 1998) ve serumdaki yüksek kolesterol seviyesini düşürmede çok etkili olduğu öne sürülmüştür (Tuncer ve ark. 2009). Yapmış olduğumuz çalışmada yüksek kolesterol seviyelerine sahip olan farelere Demir Dikenini uygulanmasının kolesterol değerlerini Kontrol grubuna benzer düzeylere düşürdüğü belirlendi.

Sıçanlarda hem Bisphenol-A (BPA)'nın hem de Soya İzoflavonların (SIF), testis dokusu ve enzimleri ile erkek sıçanların doğurganlığını etkileyebilecek hormonal seviyelerde bozulmaya neden olduğu ve Demir Dikenini ekstraktının bu zararlı etkileri hafiflettiği bildirilmiştir (Nashwa ve

Sahar 2015). Demir Dikeninin albino sıçanlarda BPA'nın neden olduğu spermatotoksisiteye karşı koruma sağladığı ve BPA'nın albino sıçan testislerinde oluşturduğu dejeneratif lezyonları iyileştirme yeteneğine sahip olduğu öne sürülmüştür (Bushra ve ark. 2017). Diyabetik sıçanlarda testis ağırlığı azalmış ve testis dokusunda dejeneratif lezyonlar gözlemlenmiş, Demir Dikenin ekstrektinin uygulanması sonucu ise testis ağırlığında artış ve testiste oluşan dejeneratif alanların iyileştiği belirlenmiştir (Hend ve ark. 2015).

Alüminyum klorüre (AlCl₃) maruz kalan farelerin testis ve vücut ağırlığında azalma, testis dokusundaki seminifer tübüllerde ve Leydig hücrelerinde dejeneratif değişiklikler ve bunun yanında kolesterol seviyesinin artmış olduğu saptanmıştır. Demir Dikenin ile tedavi edilmiş AlCl₃ grubunun testis ve vücut ağırlığında artma, dejeneratif testis dokularında iyileşme ve kolesterol seviyesinin ise kontrol grubuna benzer olduğu bildirilmiştir (Praveen ve Poonam 2015). Siklofosamid (romatolojide ve kanser tedavisinde kullanılan ilaç) uygulanan farelerde Demir Dikenin kullanımının testesteron seviyesini arttırdığı ve testis dokusundaki histopatolojik durumu iyileştirdiği tespit edilmiştir (Natasha ve ark. 2018).

Sıçanlarda Demir Dikenin ekstrektinin uygulamasının vücut ve testis ağırlığı olmak üzere diğer üreme organlarının ağırlığını arttırdığı bildirilmiştir (Aruna ve ark. 2009, Hemalatha ve Rajeswari 2015). Başka bir araştırmada ise Demir Dikenin ekstrektinin sıçanlarda vücut ağırlığında düşüşe neden olduğu ancak cinsel aktivite ve spermatogenez üzerinde olumlu etkisinin bulunduğu saptanmıştır (Gauthaman ve ark. 2002).

Balb-c farelerde artmış total kolesterol düzeyi ile ilişkili olarak vücut ağırlığında azalma olduğu bildirilmiştir (Chih-Ya Cheng ve ark. 2005). Yüksek kolesterolün (Shalaby ve ark. 2004, Bataineh ve Nusier 2005) ve yüksek yağ ile beslenmenin sıçan ve tavşanlarda (Mortazavi ve ark. 2014), sperm canlılığını, hareketliliğini ve kısmen de sayılarını azalttığı belirlenmiştir (Shalaby ve ark. 2004, Bataineh ve Nusier 2005). Aynı zamanda da morfolojik olarak anormal sperm hücrelerinin yüzdesinin arttığı tespit

edilmiştir (Shalaby ve ark. 2004, Mortazavi ve ark. 2014). Bu çalışmada Kolesterol grubundaki farelere Demir Diken bitkisinin uygulamasının farelerin canlı ağırlıklarını Kontrol grubuna yakın seviyelere indirdiği ve aynı zamanda testis ağırlıklarında azalmaya neden olduğu görüldü.

30 gün boyunca civa zehirlenmesine tabi tutulan farelere 15 gün boyunca Demir Diken uygulaması yapılmış ve civa zehirlenmelerinin kontrol grubuna göre iyileştiği gözlemlenmiştir (Jagadeesan ve ark. 2005). Hiperkolesterolemik sıçanların testis dokusunun çoğunda spermatogenez kaybıyla birlikte dejenere atrofiye bağlı, işlevsiz seminifer tübüllerin olduğu belirlenmiştir (Shalaby ve ark. 2004). Hiperkolesteroleminin serbest radikaller ve spermatozoa için sitotoksik olan oksidatif stresin artması ile üreme ve testiküler hasara yol açtığı öne sürülmüştür (Shalaby ve ark. 2004, Zhang ve ark. 2012).

Çalışmamızda Demir Diken uygulamasının Kolesterol grubundaki farelerin testis dokusunda seminifer tübüllerde görülen hücre kayıpları ve hidropik dejenerasyon gibi histopatolojik bulguları tedavi edici yönde giderdiği belirlendi.

Sıçan epididimisinde AQP1, epididimis tübüllerinin çevresinde bulunan myoid hücrelerinde eksprese edilmiştir. Tüm epididimis boyunca ve efferent kanalların yanı sıra intertübüler boşluklarda bulunan damarların endotelial hücrelerinde yoğun bir reaksiyon kaydedilmiştir. AQP1'in, testiste eksprese edilmediği bildirilmiştir (Badran ve Hermo 2002). Erkek AQP1 nakavt farelerin, üreme kapasitelerinin azaldığı belirlenmiştir (Oliveira ve ark. 2005). AQP1 erişkin farelerin rete testislerinde (Lu ve ark. 2008), kaz testisinde (Skowronski ve ark. 2010), köpek testis ve spermatozoonlarında (Ito ve ark. 2008) insan testisinde (Yeung ve ark. 2010) eksprese olduğu öne sürülmüştür. AQP1 çift hörgüçlü deve testisinin interstitiumundaki vasküler endotelial hücrelerde belirlenmiştir (An ve Wang 2016). AQP1'in sıçan ve mamoset maymununda testiste lokalize olmadığı bildirilmiştir (Jane ve ark. 1998).

AQP1'in testis ve vas deferenslerde mRNA seviyelerinin doğum sonrası 15. günde az olduğu, 35. ve 70. günlerde ise büyük bir artışın meydana geldiği bildirilmiştir. AQP1 mRNA'nın ekspresyonunda oluşan bu anlamlı değişimin, testiste, epididimde ve vas deferens'te yaşlanma ile birlikte meydana geldiğini göstermiştir (Lu ve ark. 2008).

Köpek sperminde AQP1 varlığı PCR (178 bp) sonucu ile doğrulanmıştır. Köpek sperminde tespit edilen AQP1'in, testisteki PCR ürünleriyle aynı boyutta olduğu bildirilmiştir (Ito ve ark. 2008). Farelerde AQP1 proteinleri Western Blot yöntemi ile testis, vas deferens ve prostatta belirlenmiştir (Lu ve ark. 2008).

İnsan testisinde Sertoli hücreleri, spermatogenik hücreler ve Leydig hücrelerinde AQP1 reaksiyonu olmadığı bildirilirken, damar endotelinin hücre zarında ve sitoplazmasında yoğun reaksiyon olduğu öne sürülmüştür (Nicòtina ve ark. 2005). Yetişkin insan hidrosel testiste AQP1 proteininin tunica vaginalis içinde aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (Mami ve ark. 2014).

AQP1'in testis dokusundaki varlığı ile ilgili farklı sonuçlar bulunsa da çalışmamızda RT-PCR yöntemi ile AQP1 geninin varlığı tespit edildi. Her ne kadar AQP1 immunoreaktivite derecesi gruplara göre farklılık gösterse de tüm gruplardaki farelerin testis dokusunda kapsül, interstisyel bağ dokusu, damar endoteli ve eritrositlerde, AQP1 immunoreaktivitesi immunohistokimyasal olarak da belirlendi.

Sonuç olarak; bu çalışmada hiperkolesterolemi oluşturulan farelere Demir Dikeni ekstraktı uygulanması ile farelerin canlı ağırlıkları, testis ağırlıkları ve serum total kolesterol düzeylerinin kontrol grubuna benzer olması, Demir Dikeni bitkisinin yüksek kolesterol durumlarında, tedavi edici bir bitki olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Demir Dikeni ekstraktı uygulanan gruptaki farelerin testis dokusunda AQP1 mRNA ekspresyonunun diğer gruplara göre daha yüksek oranda tespit edilmesi ise testis dokusunda Demir Dikeninin AQP1 geni ekspresyonuna arttırıcı yönde etki ettiğini ortaya koymaktadır.

5. KAYNAKLAR

Adaikan PG, Gauthaman K, Prasad RN Ng SC: Proerectile pharmacological effects of *Tribulus terrestris* on the rabbit corpus cavernosum. *Annals of the Academy of Medicine Singapore*, 29 (1): 22–26, 2000.

Adimoelja A: Adaikan PG: Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L. improves the male sexual functions, probably via DHEA. *Int. J. Impotence Res*, 9: 1–15, 1997.

Adimoelja A: Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. *International Journal of Andrology*, 23 (2): 82–84, 2000.

Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, Nielsen S: Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am.J. Physiol*, 34: 463–476, 1993.

Al-Ali M, Wahbi S, Twajj H, Al-Badr A: *Tribulus terrestris*: Preliminary study of its diuretic and contractile effects and comparison with *Zea mays*. *J Ethnopharmacol*, 85:257-260, 2003.

An F. & Wang J. Immunohistochemical study of aquaporin 1 and 2 in the reproductive tract of the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Int. J. Morphol*, 34(4):1218-1222, 2016.

Arcasoy HB, Erenmemisoglu A, Tekol Y, Kurucu S, Kartal M. Effect of *Tribulus terrestris* L. saponin mixture on some smooth muscle preparations: A preliminary study. *Boll Chim Farm*, 137:473-475,1998.

Arrighi S, Aralla M, Genovese P, Picabea N, Bielli A: Undernutrition during foetal to prepubertal life affects aquaporin 9 but not aquaporin 1 and 2 expression in the male genital tract of adult rats. *Theriogenology*, 74:1661–1669, 2010.

Aruna Bashir, Tahir M, Waqas Samee and Bushra Munir: Effects Of *Tribulus Terrestris* on Testicular Development of Immature Albino Rats, P.63–68, 2009.

Asker H, Karadağ Sarı E: Kolesterolü Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Sıçanlarda Timokinon'un Testis Dokusunda GDNF (Glial Hücre Türevi Nörotrofik Faktör) Ekspresyonu Üzerine Etkisi Doktora Tezi Kars, 2017.

Badmaev V: The evolving approach to Parkinson's disease. *Nutra Cos*, 1(4):14-16, 2002.

Badran HH and Hermo LS.: Expression and Regulation of Aquaporins 1, 8, and 9 in the Testis, Efferent Ducts, and Epididymis of Adult Rats and During Postnatal Development *J Androl*, 23:358–373, 2002.

Baker ME, Saier Jr. MH: A common ancestor for bovine lens fiber major intrinsic protein, soybean nodulin-26 protein, and *E coli* glycerol facilitator. *Cell*, 60:185–186, 1990.

Bashandy AES: Effect of fixed oil of *nigella sativa* on male fertility in normal and hyperlipidemic rats. *Int J Pharmacol*, 3: 27-33, 2007.

Bataineh HN, Nusier MK: Effect of cholesterol diet on reproductive function in male albino rats. *Saudi Med J*, 26: 398–404, 2005.

Bedir E, Khan IA: New steroidal glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*. *Journal of Natural Products*, 63(12):1699-1701, 2000.

Beitz, E, Schultz J.E: The mammalian aquaporin water channel family: a promising new drug target. *Curr. Med. Chem*, 6: 457–467, 1999.

Boj M, Chauvigné F, Cerdà J: Aquaporin biology of spermatogenesis and sperm physiology in mammals and teleosts. *Biol. Bull*, 229: 93-108, 2015.

Brown D, Verbavatz JM, Valenti G, Lui B, Sabolic I. Localization of the CHIP28 water channel in reabsorptive segments of the rat male reproductive tract. *Eur. J. Cell Biol*, 61:264–273, 1993.

Bushra Munir, Abdul Qadir, Mohammad Tahir: Negative effects of bisphenol A on testicular functions in albino rats and their abolitions with *Tribulus terrestris* L. *Braz. J. Pharm. Sci*, 53(3):e00104, 2017.

Cai L, Wu Y, Zhang J, Pei F, Xu Y, Xie S, Xu D: Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. *Planta Med*, 67: 196–198, 2001.

Calamita G, Ferri D, Bazzini C, Mazzone A, Botta G, Liquori GE: Expression and subcellular localization of the AQP8 and AQP1 waterchannels in the mouse gall-bladder epithelia cells. *Biol Cell*, 97: 415-423, 2005.

Calamita G, Mazzone A, Bizzoca A, Svelto M: Possible involvement of aquaporin-7 and -8 in rat testis development and spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 288:619–625, 2001.

Camargo LSA, Boite MC, Viana SW, Mota GB, Serapiao RV, Sa WF: Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology*, 63:256–262, 2011.

Campos-Chillón LF, Walker DJ, Torre-Sanchez JF, Seidel GE Jr: In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology*, 65:1200–1214, 2006.

Celso ARA Costa, Lucas T. Bidinotto, Regina K. Takahira, Daisy MF Salvadori, Luís F. Barbisan, Mirtes Costa: Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil *Food and Chemical Toxicology*, 49; 2268–2272, 2011.

Chih-Ya Cheng, Chen-Jee Hongb, Shih-Jen Tsaib: Effects of subchronic clozapine administration on serum glucose, cholesterol and triglyceride levels, and body weight in male BALB/c mice *Life Sciences*, 76; 2269–2273, 2005.

Chu S, Qu W, Pang X, Sun B, Huang X: Effect of saponin from *Tribulus terrestris* on hyperlipidemia. *Zhong Yao Cai*, 26:341–344, 2003.

Chui SZ, Liao CX, Jiao QP, Zhu HM, Chen SY, Chou ZJ: Xinnao shutong for coronary heart disease in 41 patients. *New Drugs and Clinical Remedies*, 11; 202–204, 1992.

Clermont Y: Introduction to the Sertoli cell. In *The Sertoli Cell* (L. D.Russell and M. D. Griswold, eds.), Cache River Press, Clearwater, FL, pp. 552–575, 1990.

Curry MR, Millar JD, Watson PF: The presence of water channel proteins in ram and human sperm membrane, *J. Reprod. Fertil*, 104; 297–303, 1995.

Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P: Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem.*, 263:15634–15642, 1988.

Deuel HJ: *The Lipids, Their Chemistry and Biochemistry*, vol. III: Biochemistry, Biosynthesis, Oxidation, Metabolism and Nutritional Value, Interscience Publishers, New York, 1065 pp. 1957.

Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N: The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *HORMONES*, 14(4): 479-503, 2015.

Domeniconi RF, Orsi AM, Justulin LA, Leme Beu CC, Felisbino SL: Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. *Cell Tissue Res*, 332 (2); 329–335, 2008.

Dongmei Cui MS.: *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations* 2011.

Echevarria M, Windhager EE, Tate SS, Frindt G: Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:10997–11001, 1994.

Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M: Artificial expression of Aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation, *Biol. Reprod.*, 68: 87–94, 2003.

Elkjaer ML, Nejsum LN, Gresz V, Kwon TH, Jensen UB, Frokiaer J, Nielsen S: Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 281: 1047–1057, 2001.

Ergün A, Köse SK, Aydos K, Ata A, Avci A: Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones. *Arch Androl*, 53: 21-23, 2007.

Fang X, Xu QY, Jia C, Peng YF: Metformin improves epididymal sperm quality and antioxidant function of the testis in diet-induced obesity rats. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 18: 146-149, 2012.

Fitzgerald PG, Bok D, Horwitz J: Immunocytochemical localization of the main intrinsic polypeptide (MIP) in ultrathin frozen sections of rat lens. *J. Cell Biol.*, 97:1491–1499, 1983.

Frigeri A, Nicchia GP, Verbavatz JM, Valenti G, Svelto M: Expression of Aquaporin-4 in fast-twitch fibers of mammalian skeletal muscle. *J. Clin. Invest.*, 102: 695–703, 1998.

Gauthaman K, Adaikan PG, Prasad RNV: Aphrodisiac properties of Tribulus terrestris extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. *Life Sciences*, 71(12):1385-1396, 2002.

Gibbons GF, Mitropoulos KA, Myant NB: *Biochemistry of Cholesterol*, Elsevier, Amsterdam, 369 pp. 1982.

Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P: Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain, *BMC Biochem.*, 7; 14, 2006.

Gorin MB, Yancey SB, Cline J, Revel JP, Horwitz J: The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell*, 39: 49–59. 1984.

Gümüşel A: Adolesan çağıdaki sıçanların epididiminden alınan spermilere ve testis leydig hücrelerine sigara dumanının ve kurkumin antioksidanının etkilerinin mikroskopik incelenmesi (tez). İstanbul. İstanbul Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2013.

Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, Nagelhus EA, Ottersen OP, Agre P, Nielsen S: Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1–5 in human and rat eye. *Am. J. Physiol*, 274:1332–1345, 1998.

Hasegawa H, Lian SC, Finkbeiner WE, Verkman AS: Extrarenal tissue distribution of CHIP28 water channels by in situ hybridization and antibody staining. *Am. J. Physiol*, 266: 893–903, 1994a.

Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS: Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J. Biol. Chem*, 269: 5497–5500, 1994b.

Hasegawa H, Zhang R, Dohrman A, Verkman AS: Tissue-specific expression of mRNA encoding rat kidney water channel CHIP28k by in situ hybridization. *Am. J. Physiol*, 264: 237–245, 1993.

Heller KB, Lin EC, Wilson TH: Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 144: 274–278, 1980.

Hemalatha S, Rajeswari H: Fertility Enhancing Effect of Saponin Rich Butanol Extracts of *Tribulus terrestris* Fruits in Male Albino Rats. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(1): 36-43, 2015.

Hend M. Tag, Heba MA Abdelazek, Yasmen S. Mahoud and Nahla S. EL-Shenawy: Efficacy of *Tribulus terrestris* extract and metformin on fertility indices and oxidative stress of testicular tissue in streptozotocin-induced diabetic male rats, 1088-1098, 2015.

Higa K, Ochiai H, Fujise H: Molecular cloning and expression of aquaporin 1 (AQP1) in dog kidney and erythroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1463: 374-382, 2000.

Huang HF, He RH, Sun CC, Zhang Y, Meng QX, Ma YY: Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum. Reprod*, 12: 785–795, 2006.

Hub JS, DeGroot BL: Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:1198–1203, 2008.

Hurley PT, Ferguson CJ, Kwon TH, Andersen ML, Norman AG, Steward MC, Nielsen S, Case RM: Expression and immunolocalization of aquaporin water channels in rat exocrine pancreas. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 280: 701–709, 2001.

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F, Sasaki S: Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J. Biol. Chem*, 272: 20782–20786, 1997b.

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Tanaka Y, Marumo F, Sasaki S: Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 244: 268–274, 1998.

Ishibashi K, Kuwahara M, Kageyama Y, Tohsaka A, Marumo F, Sasaki S: Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 237: 714–718, 1997a.

Ishibashi K, Morinaga T, Kuwahara M, Sasaki S, Imai M: Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1576: 335–340, 2002.

Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, Maruo F: Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6269–6273, 1994.

Ito Junya, Kawabe Masumi, Ochiai Hideharu, Suzukamo Chika, Harada Masahiko, Mitsugi Yusuke, Seita Yasunari, Kashiwazaki Naomi: Expression and immunodetection of aquaporin 1 (AQP1) in canine spermatozoa *Cryobiology*, 57: 312–314, 2008.

Jagadeesan G and Kavitha AV: Recovery of phosphatase and transaminase activity of mercury intoxicated *Mus musculus* (Linn.) liver tissue by *Tribulus terrestris* (Linn.) (Zygophyllaceae) extract *Tropical Biomedicine*, 23(1): 45–51, 2006.

Jagadeesan G, Kavitha AV, Subashini J: FT-IR study of the influence of *Tribulus terrestris* on mercury intoxicated mice, *Mus musculus* liver. *Tropical Biomedicine*, 22(1): 15–22, 2005.

Jane SF, Katle JT, Hamish MF, Philippa TKS, Dennis B, and Richard MS: Immunoexpression of Aquaporin-1 in the Efferent Ducts of the Rat and Marmoset Monkey during Development, Its Modulation by Estrogens, and Its Possible Role in Fluid Resorption *Endocrinology*, 139: 3935–3945, 1998.

Jin B, Kawai Y, Hara T, Takeda S, Seki S, Nakata Y: Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biol Reprod*, 85: 834–837, 2011.

Johnson Kurt E. *Histology and cell biology* 2nd edition 1991.

Johnson L, Neaves WB: Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biol Reprod*, 24: 703–712, 1981.

Johnson Larry, Donald L. Thompson Jr. , Dickson D. Varner : Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*, 105: 23–51, 2008.

Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P: Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 13052–13056, 1994.

Kadir A, Aysel G: Hiperkolesterolemi Oluşturulmuş Farelerde Kefirin ve Statin İçerikli İlaçların Kolesterol Üzerine Etkilerinin Araştırılması Yüksek Lisans Tezi Kars, 2009.

Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE: The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl*, 29: 251–259, 2008.

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

Khalili MA, Aghaie-Maybodi F, Anvari M, Talebi AR: Sperm nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. *Urol J*, 3: 154–159, 2006.

King LS, Agre P: Pathophysiology of the aquaporin water channels, *Annu. Rev. Physiol*, 58: 619–648, 1996.

King LS, Choi M, Fernandez PC, Cartron JP, Agre P: Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N. Engl. J. Med*, 345: 175–179, 2001.

Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T, Shimomura I, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Nishizawa H, Matsuda M, Takahashi M, Hotta K, Nakamura T, Yamashita S, Tochino Y, Matsuzawa Y: Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J. Biol. Chem*, 275: 20896–20902, 2000.

Kishida K, Shimomura I, Kondo H, Kuriyama H, Makino Y, Nishizawa H, Maeda N, Matsuda M, Ouchi N, Kihara S, Kurachi Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Genomic structure and insulin-mediated Article in Press 74 K. Takata *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 39 (2004) 1–83 repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. *J. Biol. Chem*, 276: 36251–36260, 2001.

Ko SB, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Furuya S, Mizuno N, Wang Y, Yoshikawa T, Suzuki A, Shimano S, Hayakawa T: Aquaporins in rat pancreatic interlobular ducts. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 282: 324–331, 2002.

Kostova I, Dinchev D, Rentsch GH, Dimitrov V, Ivanova A: Two new sulfated furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Z. Naturforsch. C*, 57: 33–38, 2002.

Koyama Y, Yamamoto T, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I: Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver. *J. Biol. Chem*, 272: 30329–30333, 1997.

Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I: Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol*, 276: 621–627, 1999.

Kozono D, Yasui M, King LS, Agre P: Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine, *J. Clin. Invest*, 109: 1395–1399, 2002.

Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson L, Towne JE, Doetschman T, Menon AG: Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J. Biol. Chem*, 276: 23413–23420, 2001.

Krause William J: *Krause's Essential Human Histology* 3rd edition 2005.

Krcik JA: Performance-enhancing substances: what athletes are using. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 68(4): 283-302. 2001.

Kulka P, Nissen HP, Kreysel HW: Triglycerides and phospholipids -relation to fertility. *Andrologia*, 16: 48-51, 1984.

Kuriyama H, Kawamoto S, Ishida N, Ohno I, Mita S, Matsuzawa Y, Matsubara K, Okubo K: Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 241: 53–58, 1997.

Lee MD, Bhakta KY, Raina S, Yonescu R, Griffin CA, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Preston GM, Agre P: The human aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization. *J. Biol. Chem*, 271: 8599–8604, 1996.

Leslie P. Gartner and James L. Hiatt: *BRS Cell Biology and Histology* 7th edition 2015.

Li J, Nielsen S, Dai Y, Lazowski KW, Christensen EI, Tabak LA, Baum BJ: Examination of rat salivary glands for the presence of the aquaporin CHIP. *Pflugers Arch*, 428, 455–460, 1994.

Li J, Shi XQ: Tribulusamide A and B, new hepatoprotective lignanamides from the fruits of *Tribulus terrestris*: Indications of cytoprotective activity in murine hepatocyte culture. *Planta Medica*, 64(7):628-631, 1998.

Liu C, Gao D, Preston GM, McGann LE, Benson CT, Critser ES, Critser JK: High water permeability of human spermatozoa is mercury-resistant and not mediated by CHIP28. *Biol. Reprod*, 52: 913–919, 1995.

Liu Z, Shen J, Carbrey JM, Mukhopadhyay R, Agre P, Rosen BP: Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 6053–6058, 2002.

Lobaccaro JMA, Brugnion F, Volle DH, Baron S: Lipid metabolism and infertility: is there a link? *Clin Lipidol*, 7: 485-488, 2012.

Lokesh U, Tripathi K, Kulkarni KS, Upadhyay L: A study of Prostane in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Phytotherapy Research*, 15(5): 411-415, 2001.

Lu D, Li Y, Bi Z, Yu H, Li X: Aquaporin 1 expression in the testis, epididymis and vas deferens of postnatal ICR mice *Cell Biology International*, 32; 532-541, 2008.

Lu D, Li Y, Bi Z, Yu H, Li X: Expression and immunohistochemical localization of aquaporin-1 in male reproductive organs of the mouse, *Anat. Histol. Embryol*, 37: 1–8, 2007.

Lu SB, Lu BJ, Shen MZ, Rong YZ: The clinic report of Xinnao shutong on myocardial infarction. *Acta Universitatis Medicinalis Secundae Shanghai*, 14 (1): 78–79, 1994.

Luiz Carlos Junqueira and José Carneiro: *Basic Histology*, 10th Edition, 2003.

Ma T, Frigeri A, Skach W, Verkman AS: Cloning of a novel rat kidney cDNA homologous to CHIP28 and WCH-CD water channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 197: 654–659, 1993.

Ma T, Yang B, Kuo WL, Verkman AS: cDNA cloning and gene structure of a novel water channel expressed exclusively in human kidney: evidence for a gene cluster of aquaporins at chromosome locus 12q13. *Genomics*, 35: 543–550, 1996.

Ma T, Yang B, Verkman AS: Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 240: 324–328, 1997.

Mami Hattori, Akiko Tonooka, Masayoshi Zaitso, Koji Mikami, Ayako Suzue-Yanagisawa, Toshimasa Uekusa, and Takumi Takeuchi: Overexpression of Aquaporin 1 in the Tunica Vaginalis May Contribute to Adult-Onset Primary Hydrocele Testis, 2014.

Maqdasy S, Baptissart M, Vega A, Baron S, Lobaccaro JM: Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Mol Cell Endocrinol*, 368: 30-46, 2013.

Mathai JC, Mori S, Smith BL, Preston GM, Mohandas N, Collins M, van Zijl PC, Zeidel ML, Agre P: Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells. The Colton-null phenotype. *J. Biol. Chem*, 271: 1309–1313, 1996.

Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K: Aquaporin-5 (AQP5), a water channel protein, in the rat salivary and lacrimal glands: immunolocalization and effect of secretory stimulation. *Cell Tissue Res*, 295: 513–521, 1999b.

Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K: Water channel protein AQP3 is present in epithelia exposed to the environment of possible water loss. *J. Histochem. Cytochem*, 47:1275–86, 1999a.

Matsuzaki T, Tajika Y, Tserentsoodol N, Suzuki T, Aoki T, Hagiwara H, Takata K: Immunolocalization of water channel, aquaporin-5 (AQP5) in the rat digestive system. *Arch. Histol. Cytol*, 66: 307–315, 2003.

Meng QX, Gao HJ, Xu CM, Dong MY, Sheng JZ, Huang HF: Reduced expression and function of aquaporin-3 in mouse metaphase-II oocytes induced by controlled ovarian hyperstimulation were associated with subsequent low fertilization rate. *Cell Physiol Biochem*, 2: 23–128, 2008.

Mhatre AN, Jero J, Chiappini I, Bolasco G, Barbara M, Lalwani AK: Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear. Res*, 170 (1–2): 59–69, 2002.

Misaka T, Abe K, Iwabuchi K, Kusakabe Y, Ichinose M, Miki K, Emori Y, Arai S: A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secretory cells of human stomach. *FEBS Lett*, 381: 208–212, 1996.

Mobasher A, Marples D: Expression of the AQP1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286: 529–537, 2004.

Moon C, Preston GM, Griffin CA, Jabs EW, Agre P: The human aquaporin-CHIP gene. Structure, organization, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem*, 268: 15772–15778, 1993.

Moon C, Rousseau R, Soria JC, Hoque MO, Lee J, Jang SJ, Trunk B, Sidransky P, Mao L: Aquaporin expression in human lymphocytes and dendritic cells. *Am. J. Haematol*, 75: 1–6, 2004.

Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K: Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol. Cell. Biol*, 25: 7770–7779, 2005.

Mortazavi M, Salehi I, Alizadeh Z, Vahabian M, Roushandeh AM: Protective Effects of Antioxidants on Sperm Parameters and Seminiferous Tubules Epithelium in High Fat-fed Rats. *J Reprod Infertil*, 15: 22–28, 2014.

Mruk DD, Cheng CY: Sertoli–sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr. Rev*, 25: 747–806, 2004.

Mulinacci N, Vignolini P, Marca G, Pieraccani G, Innocenti M, Vincieri FF: Food supplements of *Tribulus terrestris* L.: an HPLC-ESI-MS method for an estimation of the saponin content. *Chromatographia*, 57: 581–592, 2003.

Murai-Hatano M, Kuwagata T, Sakurai J, Nonami H: Effect of low root temperature on hydraulic conductivity of rice plants and the possible role of aquaporins. *Plant Cell Physiol*, 49: 1294–1305, 2008.

Nashwa MS and Sahar KD: A possible Ameliorating Effects of Tribulus terrestris on Testicular Dysfunction Induced by Xenoestrogens Exposure in Adult Rats. *Curr. Sci. Int.*, 4(1): 73-89, 2015.

Natasha Frasson Pavin, Aryele Pinto Izaguirry, Melina Bucco Soares, Cristiano Chiapinotto Spiazzi, Andreas Sebastian Loureiro Mendez, Fábio Gallas Leivas, Daniela dos Santos Brum, and Francielli Weber Santos Cibin: Tribulus terrestris Protects against Male Reproductive Damage Induced by Cyclophosphamide in Mice. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume, 2018.

Nemeth-Cahalan KL, Hall JE: pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0. *J. Biol. Chem.*, 275: 6777–6782, 2000.

Nicchia GP, Frigeri A, Nico B, Ribatti D, Svelto M: Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel: evidence for sex-linked differences in liver. *J. Histochem. Cytochem.*, 49: 1547–1556, 2001.

Nicòtina PA, Romeo C, Arena S, Arena F, Maisano D, and Zuccarello B: Immunoexpression of Aquaporin-1 in Adolescent Varicocele Testes: Possible Significance For Fluid Reabsorption *Urology*, 65: 149–152, 2005.

Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7275–7279, 1993.

Ohshiro K, Yaoita E, Yoshida Y, Fujinaka H, Matsuki A, Kamiie J, Kovalenko P, Yamamoto T: Expression and immunolocalization of AQP6 in intercalated cells of the rat kidney collecting duct. *Arch. Histol. Cytol.*, 64: 329–338, 2001.

Ohta E, Itoh T, Nemoto T, Kumagai J, Ko SB, Ishibashi K, Ohno M, Uchida K, Ohta A, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Rai T: Pancreas-specific aquaporin 12 null mice showed increased susceptibility to caerulein-induced acute pancreatitis, *Am.J. Physiol. Cell Physiol.*, 297: 1368–1378, 2009.

Ohtani O, Ohtani Y, Carati CJ, Gannon BJ: Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatic labyrinths and aquaporin-1 expression. *Arch. Histol. Cytol.*, 66: 261–272, 2003.

Okamura T, Miyoshi I, Takahashi K, Mototani Y, Ishigaki S, Kon Y, Kasai N: Bilateral congenital cataracts result from a gain-of-function mutation in the gene for aquaporin-0 in mice. *Genomics*, 81: 361–368, 2003.

Oliveira CA, Carnes K, França LR, Hermo L & Hess RA: Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. *Biol. Cell*, 97(6): 385-395, 2005.

Ouvrier A, Alves G, Damon-Soubeyrand C, Marceau G, Cadet R: Dietary cholesterol-induced post-testicular infertility. *PLoS One*, 6: e26966, 2011.

Padron RS, Mas J, Zamora R, Riverol F, Licea M, Mallea L, Rodriguez J: Lipids and testicular function. *Int. Urol. Nephrol.*, 21: 515–519, 1989.

Page E, Winterfield J, Goings G, Bastawrous A, Upshaw-Earley J: Water channel proteins in rat cardiac myocyte caveolae: osmolarity-dependent reversible internalization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 274, 1998.

Pan H, Sun CC, Zhou CY, Huang HF: Expression of aquaporin-1 in normal, hyperplastic and carcinomatous endometria, *Int. J. Gynaecol. Obstet*, 101: 239–244, 2008.

Park SW, Lee CH, Shin DH, Bang NS, Lee SM: Effect of SA1, a herbal formulation, on sexual behavior and penile erection. *Biol Pharm Bull*, 29: 1383–1386, 2006.

Parvin MN, Tsumura K, Akamatsu T, Kanamori N, Hosoi K: Expression and localization of AQP5 in the stomach and duodenum of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1542:116–124, 2002.

Praveen K and Poonam S: Protective Role of Tribulus Terrestris on Aluminium Chloride-Induced Reproductive Toxicity in the Male Laboratory Mouse Vol, 6(6): 2395-2405, 2015.

Preston GM, Agre P: Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kDa: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 11110–11114, 1991.

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P: Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expression red cell CHIP28 protein, *Science*, 256: 385–387, 1992.

Preston GM, Smith BL, Zeidel ML, Moulds JJ, Agre P: Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science*, 265: 1585–1587, 1994.

Raina S, Preston GM, Guggino WB, Agre P: Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J. Biol. Chem*, 270: 1908–1912, 1995.

Ramirez-Torres MA, Carrera A, Zambrana M: High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men. *Ginecol. Obstet. Mex*, 68: 224–229, 2000.

Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, Vericel E, Grizard G, Vernet P, Drevet JR: Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod*, 74: 1104–1113, 2006.

Rojek A, Fuchtbauer EM, Fuchtbauer A, Jelen S, Malmendal A, Fenton RA: Liver-specific Aquaporin 11 knockout mice show rapid vacuolization of the rough endoplasmic reticulum in periportal hepatocytes after amino acid feeding, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 304: 501–515, 2013.

Ronald W. Dudek: *BRS Embryology* 6th Edition 2014.

Ross Michael H, Pawlina Wojciech: *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology* 7th, North American Edition 2016.

Ross Michael H, Pawlina Wojciech: *Ross Histology Text and Atlas* 6th edition 2011.

Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS: Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption, *Nature*, 434: 786–792, 2005.

Sabolic I, Valenti G, Verbavatz JM, van Hoek AN, Verkman AS, Ausiello DA, Brown D: Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney. *Am. J. Physiol*, 263: 1225–1233, 1992.

Satomi N, Jiro S, Miyoko O, Tetsuya S and Shiro T: Gene Expression in Livers of BALB/C and C57BL/6J Mice Fed a High-Fat Diet Toxicologic Pathology, 40: 71-82, 2012.

Setchell BP: Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. Adv. Exp. Med. Biol, 636; 212–233, 2008.

Shalaby MA, El Zorba HY, Gehan MK: Effect of α -tocopherol and simvastatin on male fertility in hypercholesterolemic rats Pharmacological Research, 50; 137–142, 2004.

Shanahan CM, Connolly DL, Tyson KL, Cary NR, Osbourn JK, Agre P: Aquaporin-1 is expressed by vascular smooth muscle cells and mediates rapid water transport across vascular cell membranes. J Vasc Res, 36: 353–362, 1999.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS: Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reproduction, 125: 769–784, 2003.

Shi Z, Zhang T, Luo L, Zhao H, Cheng J, Xiang J, Zhao C: Aquaporins in human breast cancer: identification and involvement in carcinogenesis of breast cancer, J. Surg. Oncol, 106: 267–272, 2012.

Shiels A, Bassnett S: Mutations in the founder of the MIP gene family underlie cataract development in the mouse. Nat. Genet, 12: 212–215, 1996.

Skowronski MT: Distribution and quantitative changes in amounts of aquaporin 1, 5 and 9 in the pig uterus during the estrous cycle and early pregnancy. Reprod. Biol. Endocrinol, 8: 109, 2010.

Smith BL, Preston GM, Spring FA, Anstee DJ, Agre P: Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens. J. Clin. Invest, 94: 1043–1049, 1994.

Sougrat R, Morand M, Gondran C, Barre P, Gobin R, Bonte F, Dumas M, Verbavatz JM: Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis. J. Invest. Dermatol, 118: 678–685, 2002.

Stevens AL, Breton S, Gustafson CE, Bouley R, Nelson RD, Kohan DE, Brown D: Aquaporin 2 is a vasopressin-independent, constitutive apical membrane protein in rat vas deferens. Am. J. Physiol. Cell Physiol, 278 (4): 791–802, 2000.

Sugkraroek P, Kates M, Leader A, Tanphaichitr N: Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. Fertil Steril, 55: 820-827, 1991.

Sui H, Han BJ, Lee JK, Walian P, Jap BK: Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. Nature, 414: 872-878, 2001.

Suzuki-Toyota F, Ishibashi K, Yuasa S: Immunohistochemical localization of a water channel, aquaporin 7 (AQP7), in the rat testis. Cell Tissue. Res, 295: 279–285, 1999.

Şahin, T. C: Testiste oluşturulan iskemi reperfüzyon modelinde montelukast'ın koruyucu etkisi (Master's thesis, ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü), 2016.

Taguchi D, Takeda T, Kakigi A, Takumida M, Nishioka R, Kitano H: Expressions of aquaporin-2, vasopressin type 2 receptor, transient receptor potential channel vanilloid (TRPV)1, and TRPV4 in the human endolymphatic sac. Laryngoscope, 117(4): 695–698, 2007.

Tani T, Koyama Y, Nihei K, Hatakeyama S, Ohshiro K, Yoshida Y, Yaoita E, Sakai Y, Hatakeyama K, Yamamoto T: Immunolocalization of aquaporin-8 in rat digestive organs and testis. *Arch. Histol. Cytol*, 64: 159–168, 2001.

Thoroddsen A, Dahm-Kahler P, Lind AK, Weijdegard B, Lindenthal B, Muller J: The water permeability channels aquaporins 1–4 are differentially expressed in granulosa and theca cells of the preovulatory follicle during precise stages of human ovulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 11;96: 1021–1028, 2011.

Tomova M, Gjulemetova R, Zarkova S, Peeva S, Pangarova T, Simova M: Steroidal saponins from *Tribulus terrestris* L. with a stimulating action on the sexual functions. In: International Conference of Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products. Varna, Bulgaria, RSC Publishing, pp. 298–302, 1981.

Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Mackenzie B, Devidas S, Guggino WB, van Hoek AN, Hediger MA: Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J. Biol. Chem*, 273;24: 737–743, 1998.

Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA: Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am. J. Physiol*, 277: 685–696, 1999.

Tuncer MA, Yaymaci B, Sati L, Cayli S, Acar G, Altug T, Demir R: Influence of *Tribulus terrestris* extract on lipid profile and endothelial structure in developing Atherosclerotic lesions in the aorta of rabbits on a high-cholesterol diet *Acta histochemica*, 111: 488–500, 2009.

Van Hoek AN, Ma T, Yang B, Verkman AS, Brown D: Aquaporin-4 is expressed in basolateral membranes of proximal tubule S3 segments in mouse kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 278: 310–316, 2000.

Verkman AS, Van Hoek AN, Ma T, Frigeri A, Skach WR, Mitra A: Water transport across mammalian cell membranes, *Am. J. Physiol*, 270: 12–30, 1996.

Vignon F, Koll-Back MH, Clavert A, Cranz C: Lipid composition of human seminal plasma. *Arch Androl*, 22: 49-53, 1989.

Wang Y, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K: Steroidal saponins from fruits of *Tribulus terrestris*. *Phytochemistry*, 45: 811–817, 1997.

Wintour EM: Water channels and urea transporters. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 24: 1–9, 1997.

Wu G, Jiang SH, Jiang FX, Zhu DY, Wu HM, Jiang SK: Steroidal glycosides from *Tribulus terrestris*. *Phytochemistry*, 42: 1677–1681, 1996.

Xu Y, Chen H, Liang H, Gu Z, Liu W, Leang W, Li T: Three new saponins from *Tribulus terrestris*. *Planta Med*, 66: 545–550, 2000.

Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, Agre P: Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature*, 402:184–187, 1999a.

Yasui M, Kwon TH, Knepper MA, Nielsen S, Agre P: Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96;5: 808–813, 1999b.

Yediel Aras Ş, Karadağ Sarı E: Tarçın Ekstraktı Uygulanmış Diabetik Ratlarda Pankreas Dokusunda NGF (Nerve Growth Factor Sinir Büyüme Faktörü) ve Trk-A (Tirozinkinaz A) Reseptörü Dağılımının İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi Doktora Tezi Kars, 2016.

Yeung CH, Callies C, Tüttelmann F, Kliesch S & Cooper TG: Aquaporins in the human testis and spermatozoa -identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance. *Int. J. Androl*, 33(4): 629-641, 2010.

Zhang K, Lv Z, Jia X, Huang D: Melatonin prevents testicular damage in hyperlipidaemic mice. *Andrologia*, 44: 230-236, 2012.

Zmuda JM, Cauley JA, Kriska A: Longitudinal relation between endogenous testosterone and cardiovascular disease risk factors in middleaged men. A 13-year follow-up of former Multiple Risk Factor Intervention Trial participants. *Am J Epidemiol*, 146: 609-617, 1997.



6. ÖZGEÇMİŞ

Konya ili Çumra ilçesinde 1990 yılında doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Şehit Koçak İlköğretim Okulunda tamamladım. Lise öğrenimimi Çumra Anadolu lisesinde tamamlayıp, Lisans öğrenimimi ise 2009-2013 yılları arasında Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladım. 2015 yılından bu zamana kadar lisans üstü eğitimime Kafkas Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında yapmaktayım.

