

## Farelerde *Trifolium pratense*'nin Spermatogenezis Üzerine Etkisi ve Akut Toksisitesi

Tülay BAKIREL, Oya KELEŞ

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Avcılar, 34851, İstanbul- TÜRKİYE

H. Hakan BOZKURT

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Avcılar, 34851, İstanbul-TÜRKİYE

Kemal AK

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Bilim Dalı, Avcılar, 34851, İstanbul-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 01.02.2001

**Özet:** *Trifolium pratense* fitoöstrojen içeren ve bu nedenle östrojenik etkinliğe sahip olan bir bitkidir. Erkeklerde doğal östrojenlerin, üreme sisteminin gelişimi ve işlevlerinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynadığı gözönüne alınarak bu bitkinin spermatogenezis ve sperma parametreleri üzerine etkisi incelendi ve bunun yanısıra akut toksisitesi saptandı.

Bu çalışmada %20 ve %40 oranında *Trifolium pratense* içeren yemlerle beslenen farelerde epididimisten alınan spermatozoonların motilite ve morfolojisinin bozulduğu saptandı. Testiste primer spermatositlerin sayısı ve tubulus seminiferusların çapında kontrol grubuna göre önemli olmayan değişimler belirlendi. Akut toksisite ile ilgili incelemelerde intraperitoneal LD<sub>50</sub> değerinin 4237 mg/kg olduğu bulundu. Bu yönüyle bitkinin düşük toksisiteye sahip olmasının yanısıra sperma parametrelerini olumsuz yönde etkilediği saptandı.

**Anahtar Sözcükler:** *Trifolium pratense*, akut toksisite, spermatogenezis, fare

### The Effect of *Trifolium pratense* on Spermatogenesis and its Acute Toxicity (LD<sub>50</sub>) in Mice

**Abstract:** *Trifolium pratense* contains phytoestrogens and thus it has estrogenic activity. Estrogen has an important role in the development of the reproductive system and the maintenance of its function, and for this reason the effect of *Trifolium pratense* on sperm parameters and spermatogenesis was examined. Furthermore, its acute toxicity was established.

In this study, the motility and morphology of epididymal spermatozoa taken from animals fed diets contains 20% and 40% *Trifolium pratense*, were affected. Statistically insignificant differences in the diameter of the seminiferous tubule and the number of primary spermatocytes between the control and experimental groups were observed. Intraperitoneal LD<sub>50</sub> was found to be 4237 mg/kg. These findings indicate that this plant has low toxicity but negative effects on sperm parameters.

**Key Words:** *Trifolium pratense*, acute toxicity, spermatogenesis, mice

### Giriş

Fitoöstrojenler, yeryüzünde 16 familyaya ait 300 bitki türünde tanımlanan ve kimyasal yönden birbirine benzer özellikte olan en az 20 adet bileşikten oluşmaktadır (1). Değişen derecelerde östrojenik etkinliğe sahip olan ve doğal östrojenlere hem yapı hem de şekil yönünden benzerlik gösteren fitoöstrojenler organizmada bulunan doğal östrojenler ile yarışa girerek reseptörlere bağlanır ve direkt etki oluşturabilirler. Ayrıca fitoöstrojenlerin, östrojen metabolizmasında rol oynayan kimi enzimlerin etkinliğini değiştirebildiği bildirilmiştir. Bu işlevi ile üreme sistemi hücrelerinin östrojen metabolizmasını bozabildiği ve östrojenlerin hücreler üzerindeki etkisini

değiştirebildiği saptanmıştır (2, 3). Biyolojik yönden en etkin fitoöstrojenler isoflovonlar ve coumestanlardır. Birçok yem bitkisi değişik düzeylerde isoflovon içermekle beraber yapılan araştırmalarda, özellikle Leguminoseae familyasına ait *Trifolium* türlerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir (4). *Trifolium pratense* ise kuru madde ağırlığının %0,5-2,5'u oranında fitoöstrojen içeren (4) ve yapısında 4 isoflovon (daidzein, formononetin, genistein, biochanin-A) türevi bulunan az sayıdaki bitki türünden biridir (5). Ayrıca isoflovonların farklı biyolojik işlevlere sahip oluşu, bitkinin öneminin daha da artmasına neden olduğu vurgulanmıştır. *Trifolium pratense*'de bulunan

fitoöstrojenlere karşı hayvan türleri arasında duyarlılık ayrımı bulunduğu; koyunların sığırlara oranla daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir. Bitkinin silajı ile beslenen sığırlarda sadece geçici infertilite ile ilgili bulgular görülmesine karşın koyunlarda *Trifolium* türlerinin, geçici infertilite sendromunun yanısıra uzun süreli yedirmelerde kalıcı infertilite ile karakterize olan yonca hastalığına neden olduğu belirlenmiştir (6, 7). Bitkinin yedirilmesi sonucu östrojenik yanıtın artmasına bağlı olarak serviks ve uterus dokuları ile salgılarında değişimler şekillendiği, ovulasyon ve hormonal dengenin bozulduğu bildirilmiştir. Yeni doğan ratlara 2 g kurutulmuş *Trifolium pratense* (20-50mg isoflovanoid) yedirilmesinin, östrojenik etkinin belirleyici ölçütü olan uterus kalınlığında 2,5-3 kat artışa yol açtığı (8) ve üreme fonksiyonlarında ciddi bozukluklara neden olabilecek düzeyde serum östrojen düzeyini yükselttiği bulunmuştur (9).

Doğal östrojenlerin, dişilerin yanısıra erkeklerde de  $\alpha$  ve  $\beta$  östrojen reseptörlerini etkileyerek üreme sisteminin gelişimi ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bu durumun östrojen reseptörlerinin, fetal dönemi kapsayacak şekilde tüm yaşam süresince testis ve üreme sisteminde yaygın bir dağılım göstermesinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Bu yönde yapılan araştırmalarda farelerdeki östrojen reseptörlerinin işlevini sürdürmemesinin infertilite problemine yol açtığı ve bu etkiden sadece  $\alpha$  reseptörlerinin sorumlu olduğu gözlenmiştir (10). Reseptör düzeyindeki etkilerinin yanısıra kemirici ve insanların, fetal dönemde sentetik ve bitkisel orijinli östrojenlere maruz kalmalarının testis atrofi, epididimal kistler ve cinsel olgunluğun gecikmesi şeklinde birçok anomaliye neden olduğu bildirilmiştir (11). Yapılan bir diğer araştırmada ise zayıf etkili eksojen östrojenlerin bile spermatogenezisi bozduğu ve bunun sonucu olarak sperm sayısında önemli düzeyde azalmaya neden olduğu saptanmıştır (10).

*Trifolium* türlerinin biyolojik etkinlikleri ile ilgili incelemeler, dişilerdeki üreme sistemi üzerine yoğunlaşmıştır. Bazı türler hariç genellikle sistemik toksisitesine ait bulgulara rastlanılmamıştır. Sadece *T. hybridum*'un ölümlü sonuçlanabilen zehirlenmelere yol açtığı (12), *T. subterenaum*'un ise koyunlarda ölüm oranını %20-30 düzeyinde artırdığı belirlenmiştir (13).

Bu çalışmada *Trifolium pratense*'nin farelerdeki sperma ile ilgili parametreler ve spermatogenezis üzerindeki etkisinin yanısıra akut toksisitesinin incelenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

### Bitki Örnekleri

Araştırmada kullanılan *Trifolium pratense* L. var. *pratense* (Kırmızı yonca, çayır tırfılı) Mayıs- Haziran 2000 tarihleri arasında Avcılar- İstanbul yöresinden toplandı. Bitkinin botanik tanısı Prof.Dr.Kerim ALPINAR (İ.Ü. Fen Fakültesi, Botanik Anabilim Dalı) tarafından yapıldı ve bitki örnekleri İ.Ü. Fen Fakültesi, Botanik Enstitüsü herbaryumuna (İSTF 37429) kaydedildi. Bitki örneklerinin çalışmada kullanılan toprak üstü kısımları gölgede kurutulduktan sonra rutubetsiz bir ortamda saklandı, kullanmadan önce toz haline getirildi.

### Deney Hayvanları

*Trifolium pratense*'nin akut toksisitesi ve spermatogenezis üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 74 adet 6-8 haftalık Balb/C erkek fare kullanıldı. Çalışma süresince fareler, 14 saat aydınlık ve 10 saat karanlık şeklinde uygulanan aydınlatma düzeni içinde ve oda ısısında tutuldu (14, 15). Deneyden önce ve akut toksisite deneyi sırasında standart pelet yem ve su *ad libitum* olarak verildi.

### Spermatogenezis üzerine etkinin incelenmesi:

*Trifolium pratense*'nin spermatogenezis üzerine etkisi 3 grup fare (n=6) üzerinde incelendi. Fare yemleri, günlük tüketilen miktarın %0, 20, 40 oranında *Trifolium* bitkisi içerecek şekilde hazırlanarak pelet haline getirildi. Fareler 21 gün süresince bu yemlerle beslendi. Deneyin sonunda servikal dislokasyon uygulandı ve cauda epididimiden spermalar alındı.

Spermatolojik özelliklerin incelenmesi amacıyla sperma, stereo mikroskop altında ve 37°C'lik ortamda, 400-600  $\mu$ l kapasitasyon medyumuna (TYH) içerisine sağılarak elde edildi (15, 16). Spermatozoonların motilitesi ve progressif motilitesi sperma alındıktan 10 dakika sonra 37°C'de faz kontrast mikroskop ile 400 büyütmede incelendi. Spermatozoon morfolojisi aynı mikroskopta 1000 büyütme ile Hancock tespit solüsyonunda değerlendirildi (17). Her preparatta 10 hücrenin morfolojisi incelenerek %değerleri alındı.

Histolojik ve histometrik incelemeler için testisler %10 tamponlanmış formol solüsyonu içinde tesbit edildi. Örnekler, rutin preparat hazırlama yöntemleri ile parafin bloklar halinde hazırlandı ve 6-7 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere Crossman'ın triple stain (üçlü boyama) uygulandı (18). Her hayvandan alınan kesitlere

ait görüntüler bilgisayara aktarıldı. Bir objektif sahasında sadece bir tubulus seminiferusu değerlendirmek koşulu ile 10 adet enine kesilmiş tubulusun çapı ölçüldü. Ayrıca bu tubulus seminiferuslarda bulunan primer spermatozoidler sayıldı.

Gruplar arasındaki verilerin önemliliğini belirlemek amacıyla varyans analizi uygulandı. Gruplar arasındaki farklılıklar ise LDS metodu ile incelendi (19).

#### Akut Toksikite Deneyi

Akut toksisite deneyinde, *Trifolium pratense*'nin biyolojik yönden etkin bileşikleri olan isoflovonların ayrıştırılması amacıyla, 50 g bitki örneği alınarak 40°C etanol:su (80:20) karışımı ile soksalette 4-5 saat süresince ekstrakte edildi. Elde edilen çözelti süzöldükten sonra düşük basınç altında kuruluğa kadar uçuruldu. Kuru ekstraktlar istenilen konsantrasyonu sağlayacak şekilde distile suda çözdürüldü (9).

*Trifolium pratense*'nin etanol ekstraktının akut toksisitesini belirlemek amacıyla LD<sub>50</sub> değeri saptandı (20). Ekstraktlar, herbiri 8 fareden oluşan 6 gruba 3000, 3500, 4000, 4500, 4750 ve 5000 mg/kg dozlarda i.p. olarak verildi. Kontrol grubuna ise sadece distile su uygulandı. Ölüm oranı ve zehirlenme semptomlarını saptamak için fareler 72 saat süresince gözlemlendi.

#### Bulgular

*Trifolium pratense*'nin farelerdeki spermatozoa motilitesi ve morfolojisi üzerine etkisi Tablo 1'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *Trifolium pratense* içeren yemlerle beslenen gruplarda spermatozoan motilitesi ve progresif motilitenin doza bağlı olarak azaldığı belirlendi (P<0,05). Özellikle %40 oranında *Trifolium* verilen grupta spermının morfolojik

bütünlüğünün belirgin düzeyde zarar gördüğü saptandı.

Histolojik ve histometrik yönden incelemeler ise Tablo 2'de gösterilmiştir. İstatistik yönden değerlendirmelerde %20 oranında *Trifolium pratense* içeren yemle beslenen grupta primer spermatozoidlerin sayısının kontrole göre arttığı, %40'lık grupta ise azaldığı saptandı. Kontrol grubuna göre belirlenen değişimler önemsiz olmasına rağmen iki deney grubu arasında istatistiksel yönden belirgin bir farklılık bulundu. Tubulus seminiferusların çapında ise önemli bir değişim görülmedi. Ayrıca testislerde yapılan incelemelerde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı.

Tablo 2. *Trifolium pratense*'nin spermatogenezis üzerine etkisi.

Grup	Primer spermatozoid sayısı	Tubulus seminiferus çapı (µm)
% 0 (Kontrol)	41,125 ± 9,64 <sup>ab</sup>	194,007 ± 20,95 <sup>a</sup>
% 20	44,469 ± 4,69 <sup>a</sup>	199,025 ± 16,06 <sup>a</sup>
% 40	39,219 ± 5,99 <sup>b</sup>	195,907 ± 18,86 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Sütunlarda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Akut toksisite yönünden incelemelerde ise *Trifolium pratense*'nin etanol ekstraktının 3000 mg/kg'lık dozu ile herhangi bir ölüm veya zehirlenme bulgusu görülmedi. Ekstraktın 5000 mg/kg'lık dozu ise tüm farelerde ölüme neden oldu. Farelerde doza bağlı olarak değişen derecelerde yem yeme ve su içme isteğinde azalma, depresyon hali, koordinasyon bozukluğu, tüylerde kabarma ve solunum düzensizliği saptandı. *Trifolium pratense*'nin etanol ekstraktı ile farelerdeki LD<sub>50</sub> değeri 4237 mg/kg olarak bulundu.

Tablo 1. *Trifolium pratense*'nin deney gruplarının spermatozoa motilitesi ve morfolojisi üzerine etkisi.

Grup	n	Spermatozoa Hareketi (%)		Morfolojik Bozukluklar (%)			
		Motilite	Progresif Motilite	Kuyruksuz Baş	Baş	Orta ve Kuyruk	Toplam
% 0 (Kontrol)	6	68,3±16,3 <sup>a</sup>	57,5±16,7 <sup>a</sup>	4,7±2,1 <sup>a</sup>	7,0±3,7 <sup>b</sup>	6,2±1,6 <sup>a</sup>	14,5±,6 <sup>b</sup>
% 20	6	44,2±18,3 <sup>b</sup>	23,7±14,0 <sup>b</sup>	4,2±2,3 <sup>a</sup>	6,8±1,7 <sup>b</sup>	7,2±4,3 <sup>a</sup>	17,5±3,3 <sup>bc</sup>
% 40	5	26,0±8,9 <sup>c</sup>	12,0±4,5 <sup>b</sup>	7,0±4,7 <sup>a</sup>	15,4±4,7 <sup>a</sup>	9,8±6,7 <sup>a</sup>	23,4±4,5 <sup>a</sup>

a, b, c Sütunlarda ortak harf taşımayan özellikler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

## Tartışma

Adenohipofizden GnRH hormonu aracılığıyla salgılanan FSH, spermatogenezisden sorumlu olan ve spermatogenik hücrelerin bölünmesi ve gelişmesi için fiziksel ve kimyasal bir ortam sağlayan sertoli hücrelerini etkileyerek spermatogenezisi düzenler. Sertoli hücrelerinin spermatogenezisin oluşma mekanizmasındaki rolü tam olarak bilinmemesine rağmen bu hücrelerin testesteron etkinliği için gerekli olan bağlayıcı proteinin (testeron resptörü) yanısıra mayoz ve mitoz bölünmeyi baskılayan yada uyarıcı inhibin  $\alpha$  gibi bazı maddeler salgıladığı bilinmektedir. Ratlara eksojen kaynaklı östrojen uygulanmasının sertoli hücreleri ile bağlantılı olan bu maddeler ve reseptörlerin etkinliğini engellediği bildirilmiştir (10, 21). Bu çalışmada *T. pratense* verilen gruplarda saptanan spermatozoaların motilite bozukluğu ve morfolojik yönden değişimleri, spermatogenezisin bozulmasının doğal sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Sertoli hücreleri ile spermatogenezis arasındaki ilişki doğrultusunda, spermatozoa anomalileri ile ilgili bulgularımızın sertoli hücrelerinin fonksiyonunun bozulması sonucu geliştiği düşüncesindeyiz.

Spermatogenezisin düzenlenmesinde sertoli hücrelerinin fonksiyonunun yanısıra bu hücrelerin sayısının da önemli rol oynadığı ve bir sertoli hücrelerinin belirli sayıda spermatogenik hücreyi desteklediği bildirilmektedir. Sertoli hücrelerinin sayısı doğumu izleyen ve her hayvan türü için değişen kısa bir sürede içinde belirlenir (22, 23). Yapılan araştırmalarda bu evrede östrojenik etkili bileşiklerin verilmesinin sertoli hücre sayısını önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (24). Araştırmamızda *T. pratense*'nin ergin fareler üzerindeki etkisi incelendiğinden bu hücrelerin sayısı yönünde bir değerlendirme yapılmamıştır.

Spermatogenezis sırasında spermatogenik hücrelerin gelişiminin etkilendiğini gösteren sperma ile ilgili parametrelerden başka bu hücrelerin bölünmesinin düzeyini incelemek amacıyla primer spermatozoidlerin sayısı araştırılmıştır. %20 oranında *T. pratense* içeren yemle beslenen grupta hücre sayısında önemsiz bir artış, %40 *T. pratense* verilen grupta ise azalma görülmüştür. Buna karşın iki deney grubu arasında hücre sayısı yönünden önemli düzeyde farklılık belirlenmiştir. Yapılan bir araştırmada FSH düzeylerinin eksojen kaynaklı östrojenlere oldukça duyarlı olduğu ve bu nedenle

bileşiklerin etkilerinin saptanmasında önemli bir ölçüt olabileceği bildirilmektedir (11). Bulgularımıza benzer şekilde östrojenlerin düşük dozları ile FSH düzeylerinde artış, yüksek dozlarda ise azalma şeklinde görülen değişimlerin geri tepme uyarılarının ve bu uyarılara karşı duyarlılığın değişmesi gibi kompleks bir etkileşimin göstergesi olabileceği ileri sürülmektedir (10). Araştırmamızda %20 oranında *T. pratense* verilen grupta primer spermatozoidlerin sayısındaki artışın FSH düzeyindeki yükselmeye bağlı olarak spermatogenik hücrelerin bölünmesindeki artıştan kaynaklanabileceği, diğer grupta ise buna karşıt bir durumun geçerli olduğu düşüncesindeyiz. Tubulus seminiferus çaplarının gruplar arasındaki değişimi de istatistiksel yönden önemsiz olmasına rağmen hücre sayısı sonuçları ile paraleldir.

*Trifolium* türlerindeki fitoöstrojen düzeyinin mevsim, toprağın yapısı, bitkinin gelişim dönemi ve kurutulma işlemi gibi faktörler ile etkilendiği bilinmektedir (13). Erkek farelerde elde edilen bu bulgulara paralel olarak yine aynı yöreden toplanan bitkinin dişi ratlarda üreme fonksiyonlarını belirgin olarak etkilediği saptanmıştır. Dişi ratlar ile yapılan araştırmada %30 ve %60 oranında bitki içeren yemlerle beslemenin yavru atmaya, daha düşük dozların ise yavru sayısının yanısıra boy ve ağırlık artışında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. *T. pratense*'nin ikinci jenerasyon üzerine etkisi incelendiğinde ise %60 oranında bitki ile beslenen grupta yavru sayısının %70, %30 bitki içeren grupta %44 düzeyinde azaldığı saptanmıştır (25).

Avcılar yöresinden toplanan *T. pratense*'nin farelerin üreme sistemi üzerindeki etkileri göz önüne alındığında bitkinin, fonksiyon bozukluğuna yol açabilecek düzeyde fitoöstrojen içerdiği düşünülmektedir. Bu nedenle *T. pratense*'nin özellikle ruminantlarda ekonomik yönden önemli bir etkiye sahip olup olmadığının araştırılması gereklidir.

*Trifolium pratense*'nin farelerdeki akut toksisitesi ile bulgular etanol ekstraktının büyük bir LD<sub>50</sub> değerine sahip olduğunu ve zehirlenmeler yönünden bir risk oluşturmayacağını göstermiştir. *Trifolium pratense* ile herhangi bir zehirlenme olgusunun bildirilmemesi bu bulguyu destekler niteliktedir. Bununla birlikte uzun süreli yedirme deneylerinde bitkinin östrojenik etkinliğine bağlı olarak zehirlenme semptomlarının ortaya çıkması olasıdır.

**Kaynaklar**

1. Colborn, T., Dumanoski, J.P., Myers, J.P.: Our stolen future. New York, Penguin Books, p.76, 1996.
2. Harris, R.M., Waring, R.H., Kirk, C.J., Hughes, P.J.: Sulphation of oestrogenic alkylphenols and 17- $\beta$ -estradiol by human platelet phenol sulphotransferases. *J.Biol.Chem.* 2000; 275, 159-166.
3. Singh, J., Hunt, P., Eggo, M.C., Sheppard, M.C., Kirk, C.J., Michell, R.H.: Thyroid-stimulating hormone rapidly stimulates inositol polyphosphate formation in FRTL-5 thyrocytes without activating phosphoinositidase C. *Biochem. J.* 1996; 316, 175-182.
4. Petersson, H., Kiessling, K.H.: Liquid chromatographic determination of the plant oestrogens coumestrol and isoflavones in animal feed. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984; 67, 503-506.
5. Reichert, R.G.: Phyto-Oestrogens. *Qtly Rev. Nat. Med.* 1994; 27-33.
6. Adams, N.R.: Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens. *Aust. Vet. J.* 1990; 67, (6): 197-201.
7. Nwannenna, A.I., Madej, A., Lundh, J.O., Fredriksson, G.: Effects of oestrogenic silage on some clinical and endocrinological parameters in ovariectomized heifers. *Acta Vet. Scand.* 1994; 35, 173-183.
8. Lamartiniere, C.A., Murrill, W.B., Manzolillo, P.A., Zhang, J.X., Barnes, S., Zhang, X., Wei, H., Brown, N.M.: Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemically-induced mammary cancer in rats. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine.* 1998; 217, 358-364.
9. Saloniemi, H.K., Wahala, P., Nykaanen-Kurki, P., Kallela, K., Saastamoinen, I.: Phytoestrogen content and oestrogenic effect of legume fodder. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine.* 1995; 208, 13-17.
10. Atanassova, N., McKinnell, C., Walker, M., Turner, K.J., Fisher, J.S., Morley, M., Millar, M.R., Groome, N.P., Sharpe, R.M.: Permanent effects of neonatal oestrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, sertoli cell number and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology.* 1999; 140, (1): 5364-5373.
11. Sharpe, R.M., Atanassova, N., McKinnell, C., Parte, P., Turner, K.J., Fisher, J.S., Kersr, J.B., Groome, N.P., Macpherson, S., Millar, M.R., Saunders, P.T.K.: Abnormalities in functional development of the sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: A possible role for oestrogens in sertoli cell development. *Biol. Reprod.* 1998; 59, 1084-1094.
12. Nation, N.P.: Alsike clover poisoning: A review. *Can. Vet. J.* 1989; 30, 410-413.
13. Erođlu, A.: Fitoöstrojenler ve fertilitte. *U. Ü. Vet. Fak. Derg.* 1993; 1,(12): 119-126.
14. Hogan, B., Constantini, F., Lacy, E.: Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. New York, Second ed., Cold Spring Harbour Laboratory, 131, 1994.
15. Miyamoto, H., Chang, E.: Development of mouse eggs fertilized in vitro by epididymal spermatozoa. *J. Reproduct. Fert.* 1972; 30, 135-137.
16. Choi, Y.H., Sang, S., Toyoda, Y.: *In vitro* fertilization and embryonic development in Balb/C mice. *Theriogenology.* 1997; 49, (1): 281.
17. Hancock, J.L.: A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature.* 1952; 167, 323-324.
18. Luna, L.G.: Manual of histologic staining methods of the armed forced institute of pathology. New York, Third ed., Mc Graw-Hill Book Company, 12-31, 1968.
19. Evrim, M., Güneş, H.: Biyometri Ders Notları. İ.Ü. Vet. Fak. Yayın No:14, İstanbul, 1994.
20. Şener, S., Yıldırım, M.: Veteriner Toksikoloji. İstanbul, Teknik Yayıncılık, 22-26, 2000, (Akademik eserler serisi:001).
21. Sharpe, R.M., Turner, K.J., McKinnell, C., Groome, N.P., Atanassova, N., Millar, Buchanan, D.L., Cooke, P.S.: Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of sertoli cell number. *J. Androl.* 1999; 20,1, 94-101.
22. Russel, L.D., Peterson, R.N.: Determination of the elongate spermatid-sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fertil.* 1984; 70, 635-641.
23. Sharpe, R.M.: Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.) *The physiology of reproduction.* New York, 2<sup>nd</sup> Edition, Raven Press, 1363-1434, 1994.
24. Sharpe, R.M., Walker, M.R., Millar, M.R., Atanassova, N., Morris, K., McKinnell, Saunders, P.T.K., Fraser, H.M.: Effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist administration on sertoli cell number and testicular development in the marmoset: comparison with the rat. *Biol. Reprod.* 2000; 62, 1685-1693.
25. Bakirel, T.: Veteriner toksikoloji yönünden Trakya bölgesinin zehirli bitkileri üzerine çalışmalar. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 1998.