

Endosulfan, cypermethrin, 2,4-D ve trifluralin'in androjenik ve anti-androjenik etkilerinin hersberger metoduyla araştırılması

Investigation of the androgenic and anti-androgenic effects of endosulfan, cypermethrin, 2,4-D and trifluralin by hersberger assay

Özgür Bulmuş¹, Süleyman Sandal², Zafer Şahin³,
Sedat Yıldız⁴, Bayram Yılmaz⁵

¹Dr. Öğr. Üyesi,, Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Balıkesir, Türkiye.

²Prof. Dr., İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Malatya, Türkiye.

³Doç. Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Trabzon, Türkiye.

⁴Prof. Dr., İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Malatya, Türkiye.

⁵Prof. Dr., Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, İstanbul, Türkiye.

Sorumlu Yazar: Özgür BULMUŞ, Dr. Öğr. Üyesi, Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Balıkesir, Türkiye
E-mail:ozgur.bulmus@balikesir.edu.tr
Telefon: 05333082723.

Başvuru Tarihi: 17.06.2021

Kabul Tarihi: 21.06.2021

Yayınlanma Tarihi: 28.06.2021

Atf için: Özgür Bulmuş, Süleyman Sandal, Zafer Şahin, Sedat Yıldız, Bayram Yılmaz, Endosulfan, cypermethrin, 2,4-D ve trifluralin'in androjenik ve anti-androjenik etkilerinin hersberger metoduyla araştırılması, 2021;5(2):109-116

ABSTRACT

Aim: This study was aimed to investigate the androgenic and anti-androgenic effects of organochlorid (Endosulfan) and pyrethroid (Cypermethrin) pesticides and herbicides (2,4-D and Trifluralin), on serum LH and FSH levels and androgen-sensitive tissues in peri-pubertal rat model with Hershberger assay.

Material and Method: 56 peri-pubertal 42 days old Sprague Dawley rats were used in the study. The first group was separated as sham castration. The remaining 49 rats were castrated. After 10 days recovery period, rats were divided into further seven groups: Castration group; Testosterone Propionate (TP) group; TP+Flutamide group; TP+Endosulfan group; TP+2,4-D group; TP+Cypermethrin group; TP+Trifluralin group. 24 hours after the last application, rats were decapitated and blood samples were obtained. Prostate, bulbourethral gland, vesicula seminalis and musculus levator ani (mLA) were dissected and weighed. Serum LH, FSH and testosteron levels were determined with ELISA.

Result: Castration caused significant reduction in all androgen-sensitive tissue weights ($p<0.001$); whereas TP application to the castrated animals recovered this tissue weights to sham group levels ($p<0.001$). While Endosulfan, Cypermethrin and Trifluralin caused significant decrease in bulbourethral gland weights ($p<0.01$); 2,4-D significantly increased vesicula seminalis weights compared to TP group ($p<0.01$). None of the applied test compounds caused significant differences in prostate and mLA weights compared to TP group ($p>0.05$). 2,4-D, Cypermethrin and Trifluralin significantly increased serum FSH levels; but the increase in serum LH levels was only significant in Trifluralin group.

Conclusion: Data obtained from this study showed that 2,4-D has androjenic effects on vesicula seminalis whereas Endosulfan, Cypermethrin and Trifluralin have anti-androgenic effects on bulbourethral gland. It can be suggested that, these environmental pollutants could affect male reproductive functions negatively.

Keywords: endosulfan; cypermethrin; 2,4-D; trifluralin; hersberger assay

Öz

Amaç: Bu çalışma; organoklorlu (Endosulfan) ve pyrethroid (Cypermethrin) pestisitler ile herbisitlerin (2,4-D ve Trifluralin) Hershberger metodu ile peri-pubertal erkek sıçan modelinde serum LH ve FSH düzeyleri ile androjen duyarlı dokular üzerine androjenik ve anti-androjenik etkilerini araştırmak amacıyla planlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 56 adet peri-pubertal 42 günlük erkek Sprague Dawley sıçan kullanıldı. İlk grup sham kastrasyon olarak ayrıldı. Geriye kalan 49 adet sıçan kastre edildi. On günlük iyileşme süresinin sonunda sıçanlar yedi gruba daha ayrıldı: Kastrasyon grubu; Testosteron propiyonat (TP) grubu; TP+Flutamide grubu; TP+Endosulfan grubu; TP+2,4-D grubu; TP+Cypermethrin grubu; TP+Trifluralin grubu. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar dekapite edilerek kan örnekleri toplandı. Tüm hayvanların prostat bezi, bulbouretral bezleri, seminal vezikülleri ve musculus levator ani (mLA) diseke edilerek tartıldı. Serum LH, FSH ve testosteron düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi.

Bulgular: Kastrasyon, tüm androjen-duyarlı doku ağırlıklarında azalmaya neden olurken ($p<0.001$); kastre edilen hayvanlara TP uygulanması bu dokuların ağırlıklarının sham grubu değerlerine dönmesini sağladı ($p<0.001$). Endosulfan, Cypermethrin ve Trifluralin bulbouretral bez ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı azalmaya yol açarken ($p<0.01$); 2,4-D ise vesicula seminalis ağırlıklarında anlamlı artış oluşturdu ($p<0.01$). Uygulanan test bileşiklerinden hiçbiri prostat ve mLA ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı fark oluşturmadı ($p>0.05$). 2,4-D, Cypermethrin ve Trifluralin serum FSH düzeylerinde anlamlı artışa yol açarken; serum LH düzeylerindeki artış sadece Trifluralin grubunda istatistiksel olarak anlamlı idi.

Sonuç: Çalışmadan elde edilen bulgular, Hershberger metodunda Endosulfan, Cypermethrin ve Trifluralin'in bulbouretral bez üzerinde anti-androjenik; 2,4-D'nin ise vesicula seminalis üzerinde androjenik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu çevresel kirleticilerin erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebileceği öngörülebilir.

Anahtar Kelimeler: endosulfan; cypermethrin; 2,4-D; trifluralin; hershberger assay.

GİRİŞ

Endokrin sistemi etkileme potansiyeline sahip kimyasal maddeler genel anlamda “endokrin bozucular” (endocrine disrupters) olarak adlandırılmaktadır (1). Endokrin bozucu terimi daha geniş kapsamlı olarak 1996 yılında Avrupa Komisyonu tarafından Weybridge Seminerinde “*intak bir organizmada ya da bunun yavrularında, sonraki nesillerinde endokrin sistem fonksiyonlarında değişikliklere ve sonuçta sağlık için zararlı etkilere neden olan ekzojen bir madde*” şeklinde tanımlanmıştır (2). Endokrin bozucu kimyasalların (EDC-Endocrine Disrupting Chemicals) insan sağlığı ve çevrede hayvanlar üzerinde oluşturabileceği potansiyel etkiler önemli bir sağlık sorunu olarak üzerinde durulan bir konu haline gelmiştir (3).

Çok sayıda çevresel kirleticinin endokrin bozucu özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir. Bu maddeler ksenohormonlar, ksenoestrogenler veya ksenobiyotikler olarak da adlandırılmaktadır. Ksenohormonların etkilerini vücudun doğal hormonlarını taklit ederek (mimic) veya onların fizyolojik etki mekanizmalarını bozarak (antagonize ederek) gösterdikleri sanılmaktadır. Bu kirleticilerin endokrin bozucu etkileri esas olarak östrojenik, anti-östrojenik, androjenik ve anti-androjenik özelliklerinden kaynaklanmaktadır (4).

Endokrin bozucu kimyasalların memeliler ve diğer hayvanlarda hipotalamik-hipofizer-gonadal fonksiyonları; östrojen, androjen ve tiroid hormon sentezlerini; androjen ve östrojen reseptör-araçlı etkileri değiştirdiği gösterilmiştir (3). Bu etkilerin sonucu olarak ksenobiyotiklerin kanser insidansında artışa (özellikle testis, prostat ve meme kanseri), genital anomalilere (hipospadias, kriptorşidizm) ve erkeklerde sperm sayısında azalmaya yol açabileceği düşünülmektedir (1, 5).

Endokrin bozucuların başlıca etki mekanizması; bu kimyasalların hormon reseptörleri ile direkt etkileşim sonucu reseptör agonisti veya antagonisti olarak endokrin fonksiyonları bozmalardır. Yapılan çalışmalar özellikle östrojen reseptörü üzerinden endojen östrojeni taklit eden (mimic) kimyasallar üzerine odaklanmıştır; ayrıca endokrin bozucuların birçoğunun androjen reseptörü ile etkileşime girerek, antiandrojenik etki gösterdiği bildirilmiştir (6).

Geniş spektrumlu bir pestisid olan Endosulfan, tüm dünyada yaygın olarak kullanılmıştır. Organoklor yapısından dolayı doğada ve canlı organizmada birikme eğilimi göstermektedir (7). Organik klorlu pestisitler insan ve hayvanların vücut yağlarında, su, yağmur suyu ve havadaki yoğunluğunun milyonlarca katına varan derişimlerde birikebilmektedir. Canlıların doğrudan temas sonucu (mide, solunum, deri) veya besin zinciri yoluyla pestisite maruz kalması sonucunda bireysel ve toplu halde akut, subakut ve kronik nitelikli zehirlenmeler ile mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler ortaya çıkmaktadır. Ayrıca geniş boyutlu çevre ve besin kirlenmesine neden olmaktadır (8). Endosulfan, Amerikan Çevre Koruma Teşkilatı (EPA-Environmental Protection Agency) tarafından toksisite riski yüksek pestisitler sınıfına dahil edilmiştir (9). Türkiye’de de yakın yıllara kadar yoğun şekilde kullanıldığı ve çevreyi kirlettiği bilinen endosulfanın dünyada ve 2011 yılından itibaren ülkemizde kullanımı yasaklanmıştır.

Cypermethrin tip-II (alfa-siyano) pyrethroid grubuna ait, etkili sentetik bir insektisittir. Organoklorlu pestisitlerin yerine geçmesi amacıyla üretilen bu pestisit ülkemizde de yaygın şekilde kullanılmıştır. Pyrethroidlerin nörotoksik etkileri; nöronal hücre membranı üzerindeki etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bu bileşiklerin başlıca hedefi voltaj-bağımlı sodyum kanallarıdır. Pyrethroidler hücreye sodyum girişini artırır, membran repolarizasyonu ve kanalların kapanmasında gecikmeye yol açarak; sonuçta sinir iletiminde blokaja neden olurlar. Cypermethrin γ -aminobütirik asit reseptörünü inhibe ederek eksitabilite ve konvülsiyonlara yol açar. Ayrıca nörotransmitterlerin yıkımında görevli bir enzim olan monoaminoksidadı ve sinir hücreleri tarafından kalsiyum alınımını inhibe eder. Bu etkiler; hücre membranlarındaki Na^+ -kanallarının açık kalması sonucu nöronlarda sürekli impulslara ve sonuçta hedef hücrenin ölümüne yol açar (10).

Pyrethroid pestisitlerin insan östrojen reseptörüne bağlanma potansiyellerinin olduğu ve dolayısıyla östrojenik aktivite gösterebilecekleri ileri sürülmüştür (11). Erkek sıçanlara oral yolla uygulanan cypermethrin’in testis histolojisini ve spermatogenezisi olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (12). Cypermethrin’in anti-androjenik etki gösterebileceği düşünülerek, çalışmamızda test edilecek kimyasal kirleticiler grubuna dahil edilmiştir.

2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) yaygın olarak kullanılan bir herbisittir. 2,4-D’nin prostat kanser hücre kültürlerinde androjenik etki gösterdiği bildirilmiştir (13). 2,4-D kronik toksisite yönünden incelenmiş olmasına rağmen, erkek üreme fonksiyonları üzerine etkileri ile ilgili araştırmalar sınırlıdır. Tordon 75D isimli bir ticari karışımın testis histolojisi üzerine etkileri incelenmiş ve gözlenen toksik etkiler 2,4-D’ye atfedilmiştir (14). Tarımda 2,4-D spreyleyici olarak çalışan erkeklerde zaman içerisinde azospermi, nekrospermi ve teratospermi geliştiği bildirilmiştir (15). Yine uzun yıllar yaygın olarak kullanılan bir herbisit olan trifluralinin ise ülkemizde 2013 yılı itibarıyla kullanımı yasaklanmıştır. Fakat pestisitlerin farklı ekolojik

zincirdeki biyolojik parçalanma oranları ile bitkisel ve ona bağlı olarak da hayvansal ürünlerindeki kalıntıları ile toksik etkileri uzun yıllar sürebilmektedir (16).

Bu çalışma; organoklorlu (endosulfan) ve pyrethroid (cypermethrin) pestisitler ile herbisitlerin (2,4-D ve trifluralin) peri-pubertal erkek sıçan modelinde serum LH, FSH ve testosteron düzeyleri ile androjen duyarlı dokular (prostat, cowper bezleri, seminal veziküller, m. Levator ani) üzerine androjenik ve anti-androjenik etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Hayvanları

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edilen peri-pubertal 42 günlük erkek Sprague-Dawley ırkı sıçanlar kullanıldı ve çalışma FÜDAM'da gerçekleştirildi. Sıçanlar standart şartlarda barındırılarak, *ad libitum* beslenme şartları sağlandı. Deney hayvanlarının seçimi, yapılan tüm ilaç uygulamaları ve cerrahi girişimler sırasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı (28.12.2005/14/3) alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Çalışmada toplam 56 adet sıçan kullanıldı.

Grup 1 (Sham grubu; n=7); Sham kastrasyon yapıldı ve diğer gruplarda oluşan enjeksiyon stresini karşılamak için, sadece taşıt madde (mısırözü yağı, 0.3 ml,sc) uygulandı.

Geriye kalan toplam 49 adet sıçan rompun+ketamin anestezisi altında, skrotum orta hattın açılıp her iki testis ve epididimiler total olarak alınarak kastre edildi. On günlük iyileşme süresinin sonunda sıçanların vücut ağırlıkları belirlendi ve yedi gruba daha ayrıldı:

Grup 2 (Kastrasyon grubu; n=7)

Grup 3 (TP grubu; n=7); 10 gün süreyle Testosteron propionat (TP) 0.5 mg/kg/gün s.c. olarak uygulandı.

Grup 4 (TP+Flutamide grubu; n=7); 10 gün süreyle TP'ye ilaveten Flutamid (referans anti-androjen) 25 mg/kg/gün oral gavaj yöntemiyle uygulandı.

Grup 5 (TP+Endosulfan grubu; n=7); 10 gün süreyle TP'ye ilaveten Endosulfan 10 mg/kg/gün oral gavaj yöntemiyle uygulandı.

Grup 6 (TP+2,4-D grubu; n=7); 10 gün süreyle TP'ye ilaveten 2,4-D 10 mg/kg/gün oral gavaj yöntemiyle uygulandı.

Grup 7 (TP+Cypermethrin grubu; n=7); 10 gün süreyle TP'ye ilaveten Cypermethrin 20 mg/kg/gün oral gavaj yöntemiyle uygulandı.

Grup 8 (TP+Trifluralin grubu; n=7); 10 gün süreyle TP'ye ilaveten Trifluralin 15 mg/kg/gün oral gavaj yöntemiyle uygulandı.

Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar dekapite edildi ve kan örnekleri toplandı. Tüm hayvanların prostat bezi, bulbouretral (cowper) bezleri ve seminal veziküller ile musculus levator ani (mLA) hemen diseke edilerek tartıldı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konularak analizler yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Biyokimyasal Analizler

Serum Testosteron, FSH ve LH hormon düzeyleri, enzyim-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. Absorbanslar Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, USA) cihazında spektrofotometrik olarak 450 nm'de okutuldu. Test sonuçları ng/ml olarak verildi.

Kastre edilen hayvanlara dışarıdan TP verildiğinde pozitif veya negatif feedback etkileri ile serum "sentetik testosteron" değerleri farklı çıkabileceğinden ve bu hayvanlarda zaten endojen testosteron kaynağı olan testisler bulunmadığından; sadece testisleri olan (sham) grubu ve dışarıdan hiç TP verilmemiş olan fakat kastre hayvanların serum testosteron düzeyleri ölçüldü. Sham ve kastrasyon gruplarında serum testosteron düzeylerinin ölçülmesinin amacı ise; yapılan kastrasyon işleminin güvenilirliğinin değerlendirilmesiydi. Zaten Hershberger metodunda androjenik ve anti-androjenik maddelerin belirlenmesinde primer sonlanma noktası aksesuar seks organ (SAT) ağırlıklarının belirlenmesidir; testosteron ve LH ölçümleri ise opsiyonel olarak yapılmaktadır (17).

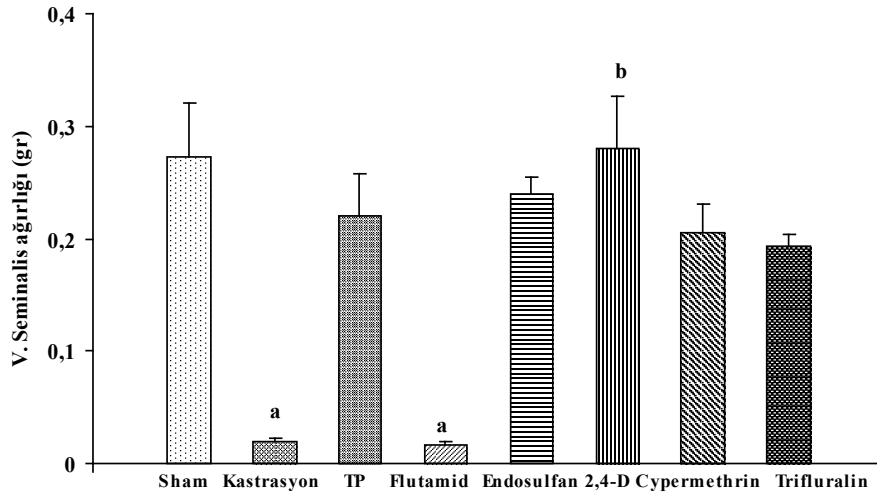
İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS for Windows 21.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında parametrelerin karşılaştırılmasında One-way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve Post hoc Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ortalamaya standart sapma olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Seminal Vezikül Ağırlıkları

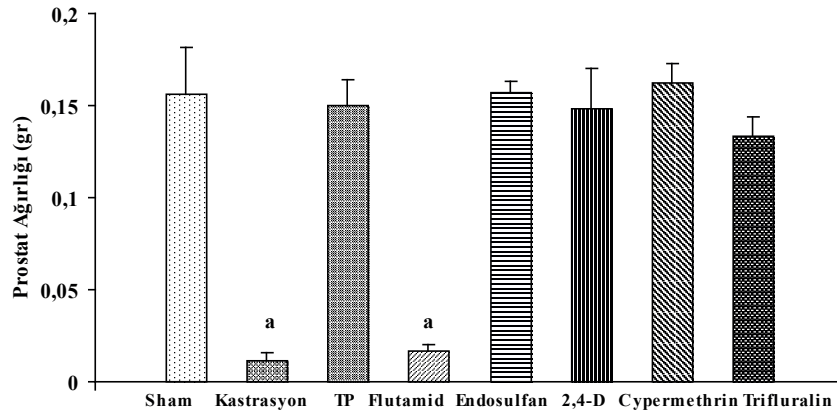
Kastrasyon, seminal vezikül ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olurken ($p < 0.001$); kastre edilen hayvanlara TP uygulaması bu dokunun ağırlığının sham grubu değerlerine dönmelerini sağladı ($p < 0.001$). TP'ye ilaveten referans anti-androjen olan Flutamid uygulaması ise seminal vezikül ağırlıklarını TP grubuna göre anlamlı azaltarak, kastrasyon grubu değerlerine düşmesine yol açtı ($p < 0.001$). Uygulanan test kimyasallarından ise sadece 2,4-D seminal vezikül ağırlıklarında TP grubuna kıyasla anlamlı artış meydana getirdi ($p < 0.01$) (Şekil 1).



Şekil 1. Hershberger deney gruplarında Seminal vezikül ağırlıkları (Ort±SD).
a: $p < 0.001$ sham grubuna göre; b: $p < 0.01$ TP grubuna göre.

Prostat Bezi Ağırlıkları

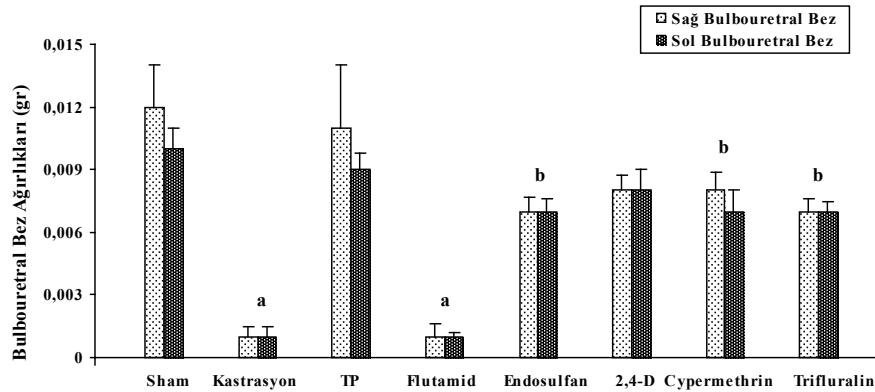
Kastrasyon, prostat bezi ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olurken ($p < 0.001$); kastre edilen hayvanlara TP uygulaması bu dokunun ağırlığının sham grubu değerlerine dönmesini sağladı ($p < 0.001$). TP'ye ilaveten referans anti-androjen olan Flutamid uygulaması ise prostat bezi ağırlıklarını TP grubuna göre anlamlı azaltarak, kastrasyon grubu değerlerine düşmesine yol açtı ($p < 0.001$). Uygulanan test kimyasallarından ise hiçbirinin prostat bezi ağırlığında TP grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı görüldü ($p > 0.05$) (Şekil 2).



Şekil 2. Hershberger deney gruplarında Prostat bezi ağırlıkları (Ort±SD).
a: $p < 0.001$ sham grubuna göre.

Sağ ve Sol Bulbouretral Bez Ağırlıkları

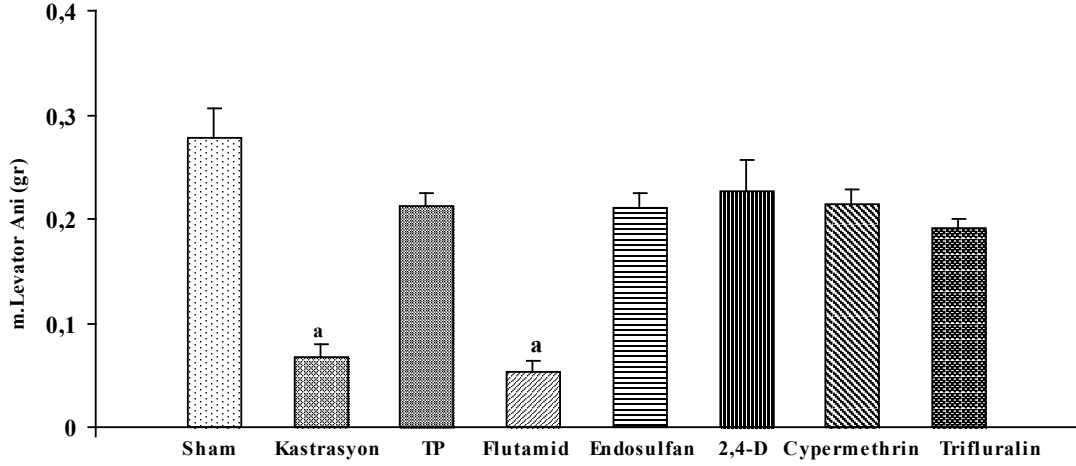
Kastrasyon, sağ ve sol bulbouretral bez ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olurken ($p < 0.001$); kastre edilen hayvanlara TP uygulaması bu dokunun ağırlığının sham grubu değerlerine dönmesini sağladı ($p < 0.001$). TP'ye ilaveten referans anti-androjen olan Flutamid uygulaması ise prostat bezi ağırlıklarını TP grubuna göre anlamlı azaltarak, kastrasyon grubu değerlerine düşmesine yol açtı ($p < 0.001$). Uygulanan test kimyasallarından Endosulfan, Cypermethrin ve Trifluralin sağ ve sol bulbouretral bez ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı azalmaya yol açarken ($p < 0.01$); 2,4-D ise herhangi bir değişikliğe neden olmadı ($p > 0.05$) (Şekil 3).



Şekil 3. Hershberger deney gruplarında sağ ve sol bulbouretral bez ağırlıkları (Ort±SD).
a: $p < 0.001$ sham grubuna göre; b: $p < 0.01$ TP grubuna göre.

Musculus Levator Ani Ağırlıkları

Kastrasyon, musculus levator ani ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olurken ($p < 0.001$); kastre edilen hayvanlara TP uygulaması bu dokunun ağırlığının sham grubu değerlerine dönmesini sağladı ($p < 0.001$). TP'ye ilaveten referans anti-androjen olan Flutamid uygulaması ise prostat bezi ağırlıklarını TP grubuna göre anlamlı azaltarak, kastrasyon grubu değerlerine düşmesine yol açtı ($p < 0.001$). Uygulanan test kimyasallarından ise hiçbirinin m. Levator ani ağırlığında TP grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı görüldü ($p > 0.05$) (Şekil 4).



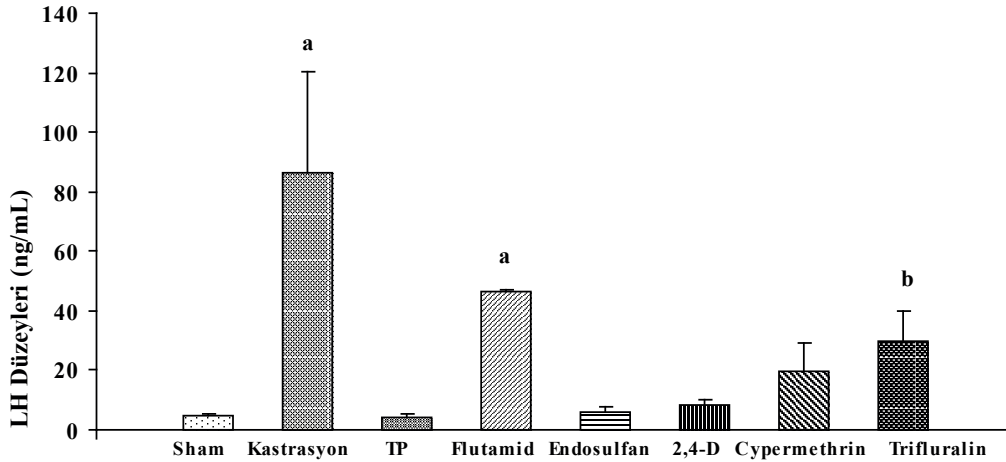
Şekil 4. Hershberger deney gruplarında m. Levator ani ağırlıkları (Ort±SD).
a: $p < 0.001$ sham grubuna göre.

Serum Testosteron Düzeyleri

Serum testosteron düzeyleri kastrasyon grubunda (< 0.2 ng/ml) sham grubuna göre (3.28 ± 0.44 ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ($p < 0.001$). Kastrasyon grubuna ait serum testosteron düzeyleri kullanılan kitin deteksiyon limitinin altında bulunduğu için < 0.2 ng/ml şeklinde belirlendi.

Serum LH Düzeyleri

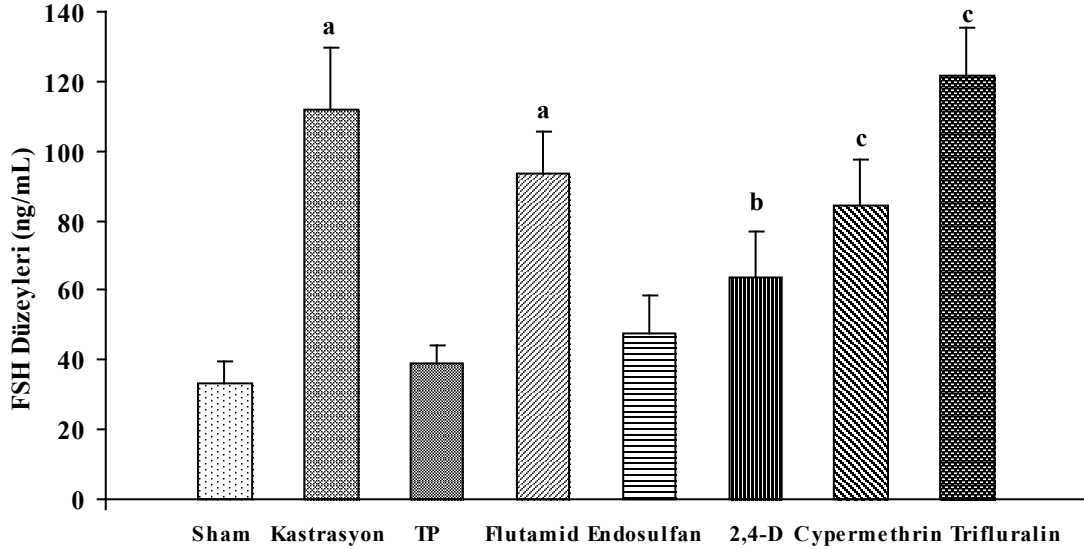
Kastrasyon, serum LH düzeylerinin sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmasına neden olurken ($p < 0.001$); kastre edilen hayvanlara TP uygulaması bu hormonun düzeylerinin sham grubu değerlerine dönmesini sağladı ($p < 0.001$). Flutamid uygulanması ise serum LH düzeylerinin TP grubuna göre anlamlı şekilde artmasına yol açtı ($p < 0.001$). Uygulanan test kimyasallarının hepsi serum LH düzeylerini TP grubuna göre artırmakla birlikte; sadece Trifluralin uygulaması ile görülen LH artışı istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$) (Şekil 5).



Şekil 5. Hershberger deney gruplarında serum LH düzeyleri (Ort±SD).
a: $p < 0.001$ sham grubuna göre; b: $p < 0.05$ TP grubuna göre.

Serum FSH Düzeyleri

Kastrasyon, serum FSH düzeylerinin sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmasına neden olurken ($p < 0.001$); kastre edilen hayvanlara TP uygulaması bu hormonun düzeylerinin sham grubu değerlerine dönmesini sağladı ($p < 0.001$). Flutamid uygulanması ise serum FSH düzeylerinin TP grubuna göre anlamlı şekilde artmasına yol açtı ($p < 0.001$). Uygulanan test kimyasallarından 2,4-D ($p < 0.05$), Cypermethrin ($p < 0.001$) ve Trifluralin ($p < 0.001$) serum FSH düzeylerini TP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırırken; Endosulfan uygulaması ile görülen FSH artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p > 0.05$) (Şekil 6).



Şekil 6. Hershberger deney gruplarında serum FSH düzeyleri (Ort±SD).

a: p<0.001 sham grubuna göre; b: p<0.05 TP grubuna göre; c: p<0.001 TP grubuna göre.

TARTIŞMA

Son yıllarda, araştırmacıların erkek fertilité azalması ile çevresel faktörler arasındaki ilişki ve erkek üreme sistemi toksikolojisi ile ilgili çalışmalara ilgisinin arttığı görülmektedir. Özellikle son 50 yılda sperm sayısında meydana gelen önemli orandaki düşüş bu ilgi ve araştırmaların sayısını artırmıştır.

Endokrin sistemi etkileme potansiyeline sahip kimyasal maddeler günümüzde genel olarak “endokrin bozucular” (endocrine disrupters) olarak adlandırılmaktadır (1). Günümüzde çok sayıda çevresel kirleticinin endokrin bozucu özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir. Ksenobiyotikler olarak da adlandırılan bu maddelerin endokrin bozucu etkileri esas olarak östrojenik, anti-östrojenik, androjenik ve anti-androjenik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Seks steroidlerinin spermatogenez, testislerin inmesi ve uretral gelişimde önemli rol oynaması; endokrin bozucuların erkek reproduktif sistemindeki anormalliklerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir (18). Erkek üreme fonksiyon bozukluklarında kimyasal kirleticilere mesleki ve çevresel maruziyet gibi epidemiyolojik faktörler de sorgulanmaktadır.

Doğada yıkılmıyandan uzun süre kalabilen ve lipofilik özellikleri nedeniyle canlı organizmada yağ dokusunda depo edilebilen pestisitlerin de endokrin bozucu etkilere sahip olabilecekleri bildirilmiştir (19). Bazı pestisitlerin biyoakümülatif özellikte olduğu ve yaygın kirlenmeye neden oldukları bilinmektedir. Zaman içerisinde DDT başta olmak üzere lindan, endosulfan, aldrin, metoksiklor ve heptaklor gibi birçok pestisitün üretim ve kullanımı yasaklanmıştır (7). Buna rağmen, bu bileşiklere çevredeki kalıcılıkları nedeniyle insan ve hayvanların çeşitli dokularında rastlanabilmektedir. Bir tarım ülkesi olan ülkemizde de pestisitler yaygın olarak kullanılmış ve birçok tarım alanı, nehir, göl ve deniz tonlarca madde ile kirlenmiştir (20). Biyoakümülatasyon faktörü de göz önüne alındığında, bu bileşiklerin halen ülkemizde maruz kalınan kimyasallar arasında yer aldığı görülmektedir (21).

Bu çalışmada Endosulfan, Cypermethrin, 2,4-D ve Trifluralin’in androjenik ve anti-androjenik etkilerini araştırmak amacı ile; test kimyasallarının subakut bir periyot için kastre edilmiş erkek sıçanlara uygulandığı *in vivo* bir yöntem olan Hershberger metodu kullanıldı (22). Bu metotta androjen agonisti olarak rol oynayan kimyasallar androjen-bağımlı SAT ağırlıklarında artışa yol açmaları ile; androjen antagonistleri ise kuvvetli bir androjen (Testosteron Propiyonat-TP) ile birlikte uygulandıklarında SAT ağırlıklarında nisbi azalmaya yol açmaları ile tespit edilmektedirler (17).

Çalışmada kastrasyon; incelenen bütün SAT (seminal vezikül, prostat, sağ ve sol bulbouretral bezler ve m.Levator ani) ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olurken (p<0.001); kastre edilen hayvanlara referans androjen olarak TP uygulaması bu dokuların ağırlıklarının artmasını ve sham grubu değerlerine dönmelerini sağladı (p<0.001). Referans androjen (TP) ile birlikte referans antiandrojen olarak Flutamid uygulanan pozitif kontrol grubunda da tüm SAT ağırlıklarının, TP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ve kastrasyon grubu değerlerine düştüğü görüldü. Bu durum; referans anti-androjen olarak uyguladığımız Flutamidin anti-androjenik özelliğini ortaya koyan, beklenen bir sonuçtur.

Endosulfan östrojenik özellik göstererek erkeklerde aksesuar seks organlarının farklılaşmasını ve fonksiyonlarını etkilemektedir. Erişkin erkek sıçanlarda yapılan bir çalışmada; oral yolla ve farklı dozlarda uygulanan Endosulfan’ın testis ve SAT ağırlıklarında azalma ile birlikte cauda epididimiste sperm sayısı ile intra-testiküler spermatid sayılarını azalttığı; sperm dansite ve motilitesini de baskıladığı gösterilmiştir (23). Endosulfan 3-β-hidroksisteroid dehidrogenaz ve 17β-hidroksisteroid dehidrogenaz enzim aktivitelerini değiştirerek testiküler fonksiyonlarda bozukluğa yol açmakta ve testiküler androjen biyosentezini de inhibe etmektedir (24). Otuz günlük uygulama ile endosulfanın sıçanlarda testiküler fonksiyonlar üzerine kronik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada endosulfanın testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat ağırlıklarında anlamlı azalma ile birlikte testiküler fonksiyonları da inhibe ettiği gösterilmiştir (25). Endosulfanın ayrıca plazma FSH, LH ve testosteron düzeylerini de azalttığı ve testiküler hasara yol açtığı ortaya konulmuştur (23, 25). Endosulfanın hücresel ve biyokimyasal toksisitesi açısından doz ve maruziyet süresinin önemli belirleyici olduğu belirtilmektedir (23, 24).

Çalışmamızda Endosulfan’ın seminal vezikül, prostat ve mLA ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı değişiklikler meydana getirmeyen; sağ ve sol bulbouretral bez değerlerinde TP grubuna göre anlamlı azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada etkisi araştırılan diğer bir kimyasal madde ise sentetik bir pyrethroid insektisit olan Cypermethrin'dir. Cypermethrin uygulanan erkek sıçanlarda epididimal ve testiküler sperm sayıları ile günlük sperm üretiminin azaldığı görülmüştür. Cypermethrin uygulamasının testis histolojisinde de; seminifer tübüllerin sayısında azalma, etrafında hemoraji alanları, aralarında konnektif doku birikimi ile lümende premature spermatidlerin bulunması gibi anormalliklere yol açtığı görülmüştür. Bu sıçanlarda ayrıca serum testosteron, FSH ve LH düzeylerinin azaldığı; testis, seminal vezikül ve preputial bez ağırlıklarının ise arttığı belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda cypermethrin'in erkek sıçanlarda fertilitate ve reproduksiyon üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar; Cypermethrin'in testisler üzerine doğrudan etki gösterdiği ve androjen biyosentez yolağını etkilediği şeklinde açıklanmıştır (12).

Çalışmamızda androjenik/anti-androjenik özellikleri araştırılan maddelerden 2,4-D; doğada yaygın olarak kullanılan bir herbisittir. 2,4-D'nin insan ve hayvanlarda embriyotoksosite ve teratojeniteden; nöro-, immuno- ve hepato-toksositeye kadar değişen toksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (26). Yapılan bir çalışmada 2,4-D veya metaboliti 2,4-diklorofenol'ün (DCP) sıçanlara uygulanmasının ventral prostat, cowper bezi ve glans penis ağırlıklarında artışa yol açtığı ve sitokrom P450- aracılı testosteron metabolizmasını inhibe ettiği ortaya konulmuştur (27). 2,4-D ve picloram içeren Tordon 75D isimli bir ticari karışımın testis histolojisi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise, görülen toksik etkiler 2,4-D'ye atfedilmiştir. Aynı ticari karışımın; yüksek doz uygulanan bazı hayvanların testiküler ağırlıklarında ciddi azalmaya yol açtığı ortaya konulmuştur (14). Lerda ve Rizzi ise; tarımda 2,4-D spreyleyici olarak çalışan erkeklerde zaman içerisinde azospermi, nekrospermi ve teratospermi geliştiğini bildirmişlerdir (15). Hormonal etki açısından incelendiğinde ise; herbisid spreyleyici olarak çalışanlarda üriner 2,4-D düzeyleri ile serum LH düzeyleri arasında korelasyon bulunurken; serum FSH ve testosteron düzeylerinde böyle bir ilişki bulunmamıştır. Serum 2,4-D düzeyleri ile serum LH düzeyleri arasındaki korelasyon, klorofenoksi herbisitlerin hormonal düzeyler üzerine direkt etkisi ile açıklanmıştır (28).

Trifluralin de, 2,4-D gibi doğada yaygın olarak kullanılan, yeraltı sularına bulaşma riski bulunan ve biyoakümülatif özelliğe sahip bir herbisittir (29). Ancak bu herbisit insan sağlığı üzerine etkileri ile ilgili yapılan araştırmalar sınırlı sayıda olup; androjenik/anti-androjenik etkilerini inceleyen yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bir araştırmada Trifluralin'in erişkin ratlarda serum testosteron, FSH ve LH düzeyleri ile vücut ve testis ağırlıklarında anlamlı azalmaya yol açtığı görülmüştür (30).

Sonuç olarak; bu çalışmadan elde edilen bulgular, Hershberger metodunda Endosulfan, Cypermethrin ve Trifluralin'in bulbouretral bez üzerinde anti-androjenik; 2,4-D'nin ise vesicula seminalis üzerinde androjenik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu çevresel kirleticilerin erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyeceği öngörülebilir.

KAYNAKLAR

1. Safe S. Environmental estrogens: roles in male reproductive tract problems and in breast cancer. *Reviews on Environmental Health*, 2002; 17: 253-262.
2. European Commission, Weybridge Workshop (1996). European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Report of proceedings, 2-4 December 1996, Weybridge, UK.
3. Gray LE, Wilson V, Noriega N, Lambright C, Furr J, Stoker TE, et al. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. *ILAR Journal*, 2004; 45: 425-437.
4. Massaad C, Entezami F, Massade L, Benahmed M, Olivennes F, Barouki R, et al. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2002; 100: 127-137.
5. Waring RH, Harris RM. Endocrine disruptors: a human risk? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005; 244: 2-9.
6. Sun H, Xu XL, Xu LC, Song L, Hong X, Chen JF, et al. Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. *Chemosphere*, 2007; 66: 474-479.
7. Vallack HW, Bakker DJ, Brandt I, Broström-Lunden E, Brouwer A, Bull KR, et al. Controlling persistent organic pollutants-what's next? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1998; 6: 143-175.
8. Yalvaç M. Göksu deltası sucul ekosisteminde endosülfan ve methamidophos pestisitlerinin kalıntı düzeylerinin araştırılması. Mersin Üniversitesi, Çevre Mühendisliği AD, 2005.
9. ATSDR. (1995). Endosulfan data sheet Agency for Toxic Substances and Diseases Registry, public health services US department of health and human services, US Sep 95, 3p.
10. Farag AT, Goda NF, Shaaban NA, Mansee AH. Effects of oral exposure of synthetic pyrethroid, cypermethrin on the behavior of F1-progeny in mice. *Reproductive Toxicology*, 2007; 23: 560-567.
11. McCarthy AR, Thomson BM, Shaw IC, Abell AD. Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. *Journal of Environmental Monitoring*, 2006; 8: 197-202.
12. Elbetieha A, Da'as SI, Khamas W, Darmani H. Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2001; 41: 522-528.
13. Kim HJ, Park YI, Dong MS. Effects of 2,4-D and DCP on the DHT-induced androgenic action in human prostate cancer cells. *Toxicological Sciences*, 2005; 88: 52-59.
14. Oakes DJ, Webster WS, Brown-Woodman PDC, Ritchie HE. Testicular changes induced by chronic exposure to the herbicide formulation, Tordon 75D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram) in rats. *Reproductive Toxicology*, 2002; 16: 281-289.
15. Lerda D, Rizzi R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Mutation Research*, 1991; 262: 47-50.
16. Kamburoğlu Çebi Ü, Çakır R, Tok HH. Tarla koşullarında uygulanan trifluralin herbisidinin toprakta taşınımı ve birikimi. *Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi*, 2019; 7(1): 1-9.
17. Kennel PF, Pallen CT, Bars GR. Evaluation of the rodent Hershberger assay using three reference endocrine disruptors (androgen and antiandrogens). *Reproductive Toxicology*, 2004; 18: 63-73.
18. Toppari J, Haavisto AM, Alanen M. Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries. *Cad Saude Publica*, 2002; 18: 413-420.

19. Stoker TE, Parks LG, Gray LE, Cooper RL. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee. Critical Reviews in Toxicology*, 2000; 30: 197-252.
20. Kurt PB and Ozkoc HB. A survey to determine levels of chlorinated pesticides and PCBs in mussels and seawater from the Mid-Black Sea Coast of Turkey. *Marine Pollution Bulletin*, 2004; 48: 1076-1083.
21. Çok İ, Donmez MK and Karakaya AE. Levels and trends of chlorinated pesticides in human breast milk from Ankara residents: comparison of concentrations in 1984 and 2002. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2004; 72: 522-529.
22. Ashby J, Lefevre PA. Preliminary evaluation of the major protocol variables for the Hershberger castrated male rat assay for the detection of androgens, antiandrogens and metabolic modulators. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2000; 31: 92-105.
23. Singh SK, Pandey RS. (1990). Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1990; 28: 953-956.
24. Jaiswal A, Parihar VK, Kumar MS, Manjula SD, Krishnanand BR, Shanbhag R, Unnikrishnan MK. 5-aminosalicylic acid reverses endosulfan-induced testicular toxicity in male rats. *Mutation Research*, 2005; 585: 50-59.
25. Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. Chronic effect of endosulfan on the testicular function of rat. *Asian Journal of Andrology*, 1999; 1: 203-206.
26. Charles JM. Hanley TR Jr, Wilson RD, van Ravenzwaay B, Bus JS. Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its forms. *Toxicological Sciences*, 2001; 60: 121-131.
27. Kim HJ, Kim WD, Kwon TH, Kim DH, Park YI, Dong MS. Mechanism of phenoxy compounds as an endocrine disruptor. *J Toxicol Pub Health*, 2002; 18: 331-339.
28. Garry VF, Tarone RE, Kirsch IR, Abdallah JM, Lombardi DP, Long LK, et al. Biomarker correlations of urinary 2,4-D levels in foresters: genomic instability and endocrine disruption. *Environ Health Perspect*, 2001; 109: 495-500.
29. Xue N, Xu X, Jin Z. Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. *Chemosphere*, 2005; 61: 1594-1606.
30. Shariati M, Noorafshan A, Mokhtari M, Askari HR. The effects of trifluralin on LH, FSH and testosterone hormone levels and testis histological changes in adult rats. *International Journal of Fertility & Sterility*, 2008; 2(1): 23-28.