

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ENDOSULFAN, CYPERMETHRİN, 2,4-D ve TRİFLURALİN'in
ANDROJENİK ve ANTİ-ANDROJENİK ETKİLERİNİN
RATLARDA HERSHBERGER METODUYLA ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Özgür BULMUŞ
ELAZIĞ-2007**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bayram YILMAZ

Danışman

Tez Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ

Prof. Dr. Bayram YILMAZ

Prof. Dr. Ahmet AYAR

Doç. Dr. Selim KUTLU

Sevgili Eşime ve Minik Emir'ime

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Bayram YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında ve eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a; Anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Gıyaseddin BAYDAŞ'a, Prof. Dr. Ahmet AYAR'a, Doç.Dr. Selim KUTLU'ya ve Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım. Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Fizyoloji Anabilim Dalı asistanları ve görevli bütün personele teşekkür ederim.

Hayatımın her anında desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Yrd. Doç Dr. Funda BULMUŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasını 1347 nolu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelendirme (FÜBAP) fonuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. ANDROJENLER	5
3.1.1. Testosteron ve Dihidrotestosteron (DHT).....	5
3.1.2. Androjenlerin Biyosentezi	6
3.1.2.1. Adrenal Androjenler	6
3.1.2.2. Gonadal Androjenler	7
3.1.3. Androjenlerin Transportu	9
3.1.4. Androjenlerin Metabolizması	9
3.1.5. Androjenlerin Etki Mekanizmaları	10
3.1.6. Androjenlerin Etkileri	11
3.2. ANTİANDROJENLER	13
3.2.1. Antiandrojenlerin Sınıflandırılması	13
3.2.1.1. Steroidal Antiandrojenler	13
3.2.1.2. Non-steroidal Antiandrojenler	14
3.2.2. Antiandrojenlerin Etki Mekanizmaları	14
3.2.3. Antiandrojenlerin Tedavide Kullanım Alanları	14
3.3. ENDOKRİN BOZUCULAR (ENDOCRINE DISRUPTERS)	15
3.3.1. Endokrin Bozucuların Sınıflandırılması	16
3.3.2. Endokrin Bozucuların Etki Mekanizmaları	16
3.3.2.1. Östrojen Reseptörünün İllegal Aktivasyonu	16
3.3.2.2. Ksenohormonların Androjenik veya Antiandrojenik Etkileri	17
3.3.2.2.1. Androjen Reseptör Antagonizması	17
3.3.2.2.2. Androjen Reseptörünün İllegal Aktivasyonu	17
3.3.2.2.3. Testosteron Sentezinin İnhibisyonu	17

3.3.2.2.4. Testosteronun Metabolik Klirensi	18
3.3.2.3. LH ve FSH'nın İnhibisyonu	18
3.4. ANDROJENİK ve ANTİANDROJENİK ETKİLERİN BELİRLENMESİNDE HERSHBERGER METODU	19
3.4.1. Hershberger Assay Protokolünde Uygulama Grupları	23
3.4.2. Hershberger Assay Protokolünde Kullanılan Test Kimyasalları	24
3.5. HERSHBERGER METODU ile ANDROJENİK ve ANTİANDROJENİK ETKİLERİ ARAŞTIRILACAK MADDELER	25
3.5.1. Endosulfan	25
3.5.2. Cypermethrin	26
3.5.3. 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) ve Trifluralin	27
3.6. AMAÇ	27
4. GEREÇ ve YÖNTEM	28
4.1. Deney Hayvanları	28
4.2. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	29
4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
4.4. Serum Testosteron Düzeylerinin Ölçümü	31
4.5. Serum LH ve FSH Düzeylerinin Ölçümü	32
4.6. İstatistiksel Analizler	32
5. BULGULAR	33
5.1. İlk ve Son Vücut Ağırlıkları	33
5.2. Seminal Vezikül Ağırlıkları	34
5.3. Prostat Bezi Ağırlıkları	35
5.4. Sağ ve Sol Bulbouretral Bez Ağırlıkları	36
5.5. Musculus Levator Ani Ağırlıkları	37
5.6. Karaciğer Ağırlıkları	38

5.7. Sağ ve Sol Böbrek Ağırlıkları	39
5.8. Serum Testosteron Düzeyleri	40
5.9. Serum LH Düzeyleri	40
5.10. Serum FSH Düzeyleri	41
6. TARTIŞMA	44
7. KAYNAKLAR	55
8. ÖZGEÇMİŞ	68

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Steroid yapılı hormonların hedef dokular üzerindeki etkileri ve bu etkiyi ortaya çıkaran steroid hormon türü	12
Tablo 2. Tüm gruplara ait ilk ve son vücut ağırlıkları, androjen duyarlı dokular (prostat, bulbouretral bezler, seminal veziküller, m. Levator ani) ile karaciğer ve böbrek ağırlıkları (g cinsinden)	42
Tablo 3. Tüm gruplara ait serum testoteron, LH ve FSH düzeyleri	43

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Androjenler için sentez basamakları	8
Şekil 2. Plazma testosteronunun periferik metabolizması	10
Şekil 3. Hedef hücrede androjen etki mekanizması	11
Şekil 4. Hershberger Assay Protokolü (OECD tarafından önerilen)	22
Şekil 5. Hershberger metodunda ratlarda prostat ve seminal veziküllerin diseksiyonu	30
Şekil 6. Hershberger metodunda ratlarda m.levator ani ve bulbouretral (cowper) bezlerinin diseksiyonu	30
Şekil 7. Hershberger deneyinde kontrol grupları ile test gruplarında deneylerin başlangıcı ve sonundaki vücut ağırlıkları	33
Şekil 8. Hershberger deney gruplarında Seminal vezikül ağırlıkları	34
Şekil 9. Hershberger deney gruplarında Prostat bezi ağırlıkları	35
Şekil 10. Hershberger deney gruplarında sağ ve sol bulbouretral bez ağırlıkları	36
Şekil 11. Hershberger deney gruplarında m. Levator ani ağırlıkları	37
Şekil 12. Hershberger deney gruplarında karaciğer ağırlıkları	38
Şekil 13. Hershberger deney gruplarında sağ ve sol böbrek ağırlıkları	39
Şekil 14. Hershberger deney gruplarında serum LH düzeyleri	40
Şekil 15. Hershberger deney gruplarında serum FSH düzeyleri	41

KISALTMALAR

AR	: Androjen Reseptörü
ARE	: Androgen Responsive Element
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
CRH	: Kortikotropin-salgılatıcı hormon
DDT	: o,p'-diklorodifenil-trikloroetan
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHEA-S	: Dehidroepiandrosteron sülfat
DHT	: Dihidrotestosteron
DNA	: Deoksiribonükleik asit
2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid
EDC	: Endokrin bozucular - Endocrine Disrupting Chemicals
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPA	: Amerikan Çevre Koruma Teşkilatı - Environmental Protection Agency
ER	: Östrojen Reseptörü
ERE	: Estrogen Responsive Element
FSH	: Follikül Stimüle Edici Hormon
GTF	: Genel Transkripsiyon Faktörleri
HPMC	: Hidroksipropil metoksisellüloz
HSP	: Isı şok proteinleri - heat shock proteins
LH	: Luteinize Edici Hormon
LH-RH	: Luteinize Edici Hormon Salgılatıcı Hormon
mLA	: Musculus Levator ani
mRNA	: Messenger Ribonükleik Asit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (Redükte form)
OECD	: Ekonomik İşbirliği ve Gelişme Teşkilatı
PCB	: Poliklorlu bifeniller
RNA Pol	: RNA polimeraz
SAT	: Aksesuar seks dokuları
SHBG	: Seks hormonu-bağlayıcı globulin
StAR	: Steroidogenik akut regülatör protein

1. ÖZET

Endokrin bozucuların (EDC) insan sağlığı, hayvanlar ve çevre üzerindeki potansiyel zararlı etkileri, önemli bir halk sağlığı problemi olarak üzerinde durulan bir konu haline gelmiştir. Bu çalışma; Türkiye’de yaygın olarak kullanılan ve doğada uzun süre kalma potansiyeline sahip organoklorlu (Endosulfan) ve pyrethroid (Cypermethrin) pestisitler ile herbisitlerin (2,4-D ve Trifluralin) Hersberger metodu ile peri-pubertal erkek rat modelinde serum LH ve FSH düzeyleri ile androjen duyarlı dokular (prostat, bulbouretral bezler, seminal veziküller, m. Levator ani) üzerine androjenik ve anti-androjenik etkilerini araştırmak amacıyla planlandı.

Çalışmada toplam 56 adet peri-pubertal 42 günlük erkek Sprague Dawley rat kullanıldı. İlk grup sham kastrasyon olarak ayrıldı. Geriye kalan toplam 49 adet rat xylazin+ketamin anestezisi altında total olarak (testisler + epididimis) kastre edildi. On günlük iyileşme süresinin sonunda ratların vücut ağırlıkları belirlendi ve yedi gruba daha ayrıldı: Kastrasyon grubu; Testosteron propiyonat (TP) grubu (0.5 mg/kg/gün s.c. TP); TP+Flutamide grubu (25 mg/kg/gün, oral gavaj); TP+Endosulfan grubu (10 mg/kg/gün, oral gavaj); TP+2,4-D grubu (10 mg/kg/gün, oral gavaj); TP+Cypermethrin grubu (20 mg/kg/gün, oral gavaj); TP+Trifluralin grubu (15 mg/kg/gün, oral gavaj). On günlük uygulamaların sonunda tüm hayvanların vücut ağırlıkları tekrar belirlendi. Son uygulamadan 24 saat sonra ratlar dekapite edildi ve kan örnekleri toplandı. Tüm hayvanların prostat bezi, bulbouretral (cowper) bezleri, seminal veziküller ve musculus levator

ani (mLA) ile karaciğer ve böbrekleri hemen diseksiyon ile çıkartıldı ve tartıldı. Serum testosteron, LH ve FSH düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi.

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 androjen-duyarlı dokulardan bulbouretral bez ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı azalmaya yol açarken ($p<0.01$); 2,4-D ise seminal vezikül ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı artış oluşturdu ($p<0.01$). Uygulanan test bileşiklerinden hiçbirisi prostat ve m. Levator ani ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı bir 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 olarak; bu çalışmadan elde edilen bulgular, Hershberger metodunda Endosulfan, Cypermethrin ve Trifluralin'in bulbouretral bez üzerinde anti-androjenik; 2,4-D'nin ise seminal vezikül üzerinde androjenik etkilere sahip olabileceğini göstermiştir. Bu çevresel kirleticilerin erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebileceği öngörülebilir.

Anahtar Kelimeler: Endokrin bozucular (EDC), Endosulfan, Cypermethrin, 2,4-D, Trifluralin, Hershberger assay.

2. ABSTRACT

The potential harmful effects of endocrine-disrupting chemicals (EDC) on human health, animals and environment constitutes a major concern as an important public health problem. The present 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), which have potential to accumulate in nature and widely used in Turkey, on serum LH and FSH levels and androgen-sensitive tissues (prostate, bulbourethral glands, vesicula seminalis, m.Levator ani) in peri-pubertal rat model with Hershberger assay.

A total of 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 totally (testes and epididymis) castrated under xylazin+ketamine anaesthesia. After 10 days recovery period, rats were weighed and divided into further seven groups: Castration group; Testosterone Propionate (TP) group (0.5 mg/kg/day s.c. TP); TP+Flutamide group (25 mg/kg/day, oral gavage); TP+Endosulfan group (10 mg/kg/day, oral gavage); TP+2,4-D group (10 mg/kg/day, oral gavage); TP+Cypermethrin group (20 mg/kg/day, oral gavage); TP+Trifluralin group (15 mg/kg/gün, oral gavage). After 10 days application all animals weighed again. 24 hours after the last application, rats were decapitated and blood samples were obtained. Prostate, bulbourethral (Cowper) gland, vesicula seminalis and musculus levator ani (mLA) as well as liver and kidneys were dissected immediately and weighed. Serum testosterone, LH and FSH levels were determined with ELISA.

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 the levels of sham group ($p < 0.001$). 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 m. Levator ani 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.

In conclusion; data obtained from this study showed that 2,4-D has androgenic 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.

Key Words: Endocrine disrupting chemicals (EDC), Endosulfan, Cypermethrin, 2,4-D, Trifluralin, Hershberger assay.

3. GİRİŞ

3.1. ANDROJENLER

Testosteron, dihidrotestosteron (DHT), dehidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenedion gibi erkek cinsiyet hormonlarını içeren hormon topluluğuna “*androjenler*” denir (48). Androjenler; erkek üreme fonksiyonları üzerinde başlıca düzenleyici etkiyi sağlayan 19 karbonlu steroidlerdir (86). Erkek cinsel farklılaşması, sekonder seks karakterlerinin gelişimi ve devamlılığında, spermatogenezde karakteristik rolleri ve somatik dokularda anabolik etkileri bulunmaktadır (14, 44, 49). Bu açıdan ele alındığında; en önemli iki androjen testosteron ve aktif metaboliti olan 5 α -dihidrotestosteron’dur.

3.1.1. Testosteron ve Dihidrotestosteron (DHT)

Testosteron erkeklerdeki major androjendir. Birçok dokuda, kendisinden daha potent bir androjen olan aktif metaboliti DHT’ye dönüşür. Bu dönüşüm, NADPH-bağımlı mikrozomal bir enzim olan 5 α -redüktaz tarafından katalize edilir (14, 49).

Aynı androjen reseptörü aracılığı ile etki gösteren bu androjenlerden her biri erkeklerde cinsel farklılaşma sırasında kendine ait spesifik role sahiptir. Testosteron Wolf kanalından köken alan yapıların (epididimis, vas deferens, seminal vezikül, ejakülatör kanallar) farklılaşması ve gelişimine direkt olarak katılırken; 5 α -dihidrotestosteron ise ürogenital sinüs ve tüberkül ile bunlardan köken alan (prostat bezi, skrotum, uretra, penis) diğer androjen hedef dokularda aktif ligandır (11, 14, 82, 118).

Periferik hedef dokularda androjenik etki için DHT oluşumu gerekli iken; testosteron konsantrasyonunun çok yüksek olduğu dokularda (testis, wolf kanalı) virilizasyon için DHT oluşumu gerekli olmayabilir (33).

3.1.2. Androjenlerin Biyosentezi

Androjenler testis, böbrek üstü bezi ve az miktarda da overlerde üretilirler. Sentez edildikleri yere göre “*adrenal androjenler*” ve “*gonadal androjenler*” olarak iki gruba ayrılabilirler. Androjenlerin yaklaşık %90’ı testislerde üretilip testosteron şeklinde salgılanırken; geri kalanı adrenal korteksten dehidroepiandrosteron (DHEA) şeklinde serbestlenirler (99).

Androjenler kolesterolden sentezlenir. Kolesterolün testosterona biyosentetik dönüşümü birkaç basamakta gerçekleşir. Bunlardan ilki; kolesterolün steroidogenik akut regülatör protein (StAR) ile dıştan iç mitokondrial membrana transferini ve kolesterol yan zinciri yıkan enzim ile kolesterolün pregnenolona dönüşümünü kapsamaktadır. Bu reaksiyon androjen sentezinde hız-sınırlayıcı basamaktır. Daha sonraki basamaklar için ise 17 α -hidroksilaz, 17,20-desmolaz, 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz/izomeraz kompleksi, 17 α -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimleri gereklidir (14, 16, 49, 101). Androjenler için sentez basamakları Şekil 1’de gösterilmiştir.

3.1.2.1. Adrenal Androjenler

Adrenal androjenler zona fasciculata ve zona retikularis tarafından prekürsör substrat olan 17 α -hidroksipregnenolon’dan sentezlenir. Adrenal androjenlerin sekresyonu; hipotalamik bir peptid olan kortikotropin-salgılatıcı hormon (CRH)’ın kontrolü altında olan adrenokortikotropik hormon (ACTH) tarafından düzenlenmektedir (Hipotalamik-hipofizer-adrenal kortikal eksen) (16).

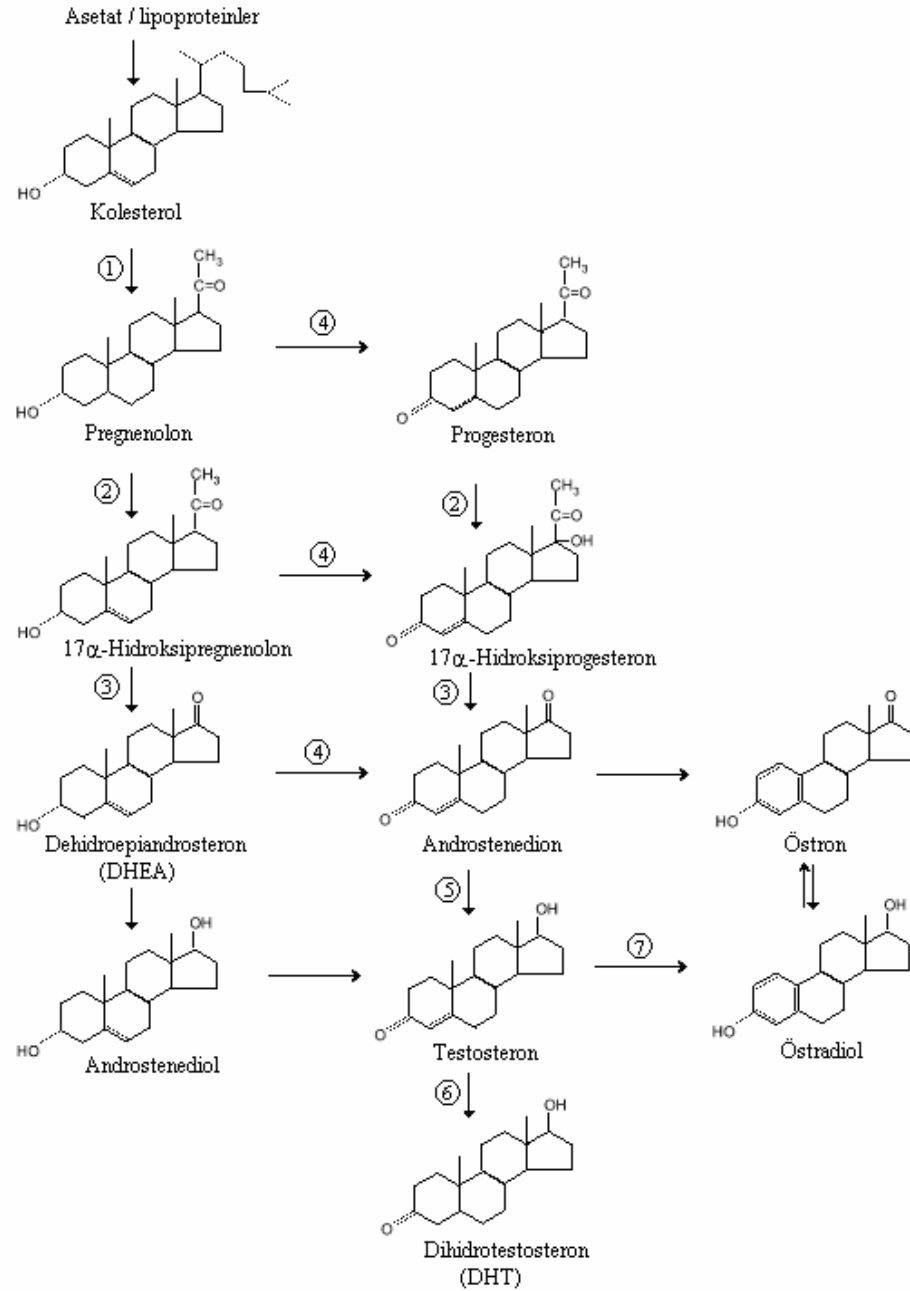
Bu androjenler androstenedion, testosteron, DHEA ve 11 β -hidroksiandrostenedionu içermektedir. Kantitatif bakımdan en önemli adrenal

androjenler DHEA ve dehidroepiandrosteron-sülfat (DHEA-S)'tır (2, 16). Dolaşımdaki DHEA'nın %50'ye yakını ve DHEA-S'nin %90'ından fazlası adrenal bezlerden salgılanır. Adrenal bezden günlük üretilen testosteron miktarı ise 0.1 mg'dan azdır. Plazmadaki testosteronun %1'inden daha azı DHEA'dan elde edilir. İnsan vücudu yağ doku, kemik, kas, akciğerler, prostat, cilt ve beyin gibi birçok dokuda DHEA'ı testosteron ve DHT'a dönüştürecek enzimleri içerir (107).

3.1.2.2. Gonadal Androjenler

Başlıca androjen olan testosteronun %95'inden fazlası matür testis hacminin yaklaşık %5'ini oluşturan interstisyel (intertubuler) kısımda yerleşmiş Leydig hücrelerinde bir dizi enzimatik reaksiyon sonucunda kolesterolden sentezlenir (49). Fötal insan testisinde testosteron üretimi gebeliğin altıncı haftasında başlar. Fötal testiste Leydig hücre farklılaşması ve ilk erken testosteron biyosentezi Luteinize edici hormon (LH)'dan bağımsızdır (36, 79). Testis gelişimi sırasında testislerden testosteron üretimi, hipofiz tarafından üretilen LH'nın kontrolü altına girer. LH'nın sentez ve salınımı ise Luteinize edici hormon salgılatıcı hormon (LH-RH) aracılığı ile hipotalamusun kontrolü altında gerçekleşir ve negatif feedback sistemi ile testosteron tarafından baskılanır (gonadal-hipotalamik-hipofizer eksen) (14, 26, 49, 99).

Testislerde testosterona ilaveten DHT, DHEA ve androstenedion da üretilmektedir.



Şekil 1. Androjenler için sentez basamakları. (16)

- 1) Kolesterol yan zinciri kıran enzim. 2) 17 α -hidroksilaz.
- 3) 17,20-desmolaz. 4) 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz/izomeraz kompleksi.
- 5) 17 α -hidroksisteroid dehidrogenaz. 6) 5 α -redüktaz. 7) Aromataz

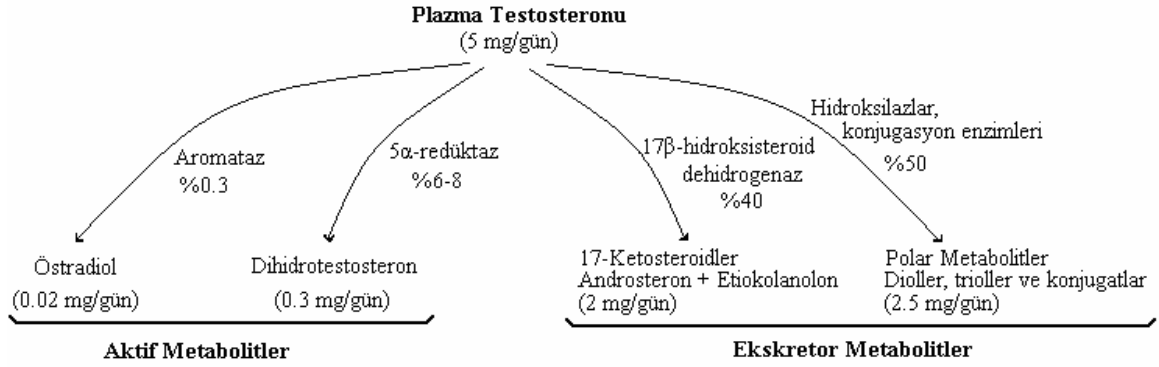
3.1.3. Androjenlerin Transportu

Testosteron ve DHT plazmada serbest (yaklaşık %1-3) veya plazma proteinlerine bağlı olarak dolaşımda bulunurlar. Bağlandığı proteinler spesifik seks hormonu-bağlayıcı globulin (SHBG) ve albumin gibi non-spesifik proteinlerdir. SHBG steroidler için yüksek affiniteli fakat düşük kapasiteye sahip bir β -globulindir. Albumin ise steroidler için yüksek kapasiteye fakat düşük affiniteye sahiptir. SHBG en yüksek affiniteyi DHT'ye karşı göstermektedir. Erkeklerde testosteron %44-65 oranında SHBG'ye ve %33-50 oranında albumine bağlı olarak dolaşımda bulunur. Testosteron ve SHBG'nin dolaşımdaki konsantrasyonları ritmik varyasyon göstermekte olup; testosteron konsantrasyonları sabah erken saatlerde pik yapmaktadır. Albumine bağlı (non-SHBG-bağlı) testosteron ve serbest testosteron, biyolojik olarak aktif olan formlarıdır (16, 49).

3.1.4. Androjenlerin Metabolizması

Androjenler esas olarak karaciğerde metabolize edilirler. Testosteron metabolizması sonrasında biyoaktif metabolitler yada üriner ve biliyer ekskresyona uğrayacak oksidize ve konjuge inaktif metabolitler oluşur. Testosteron 5α -redüktaz enzimi ile aktif metaboliti olan dihidrotestosterona dönüştürülür. Diğer bir aktif metabolit ise aromataz enzimi ile testosterondan oluşan östradiol'dür (16, 49, 99). Testosteronun 17. karbon pozisyonunda yükseltgenmesi sonucu ise aktivitesi düşük yada inaktif 17-ketosteroidler meydana gelir.

Plazma testosteronunun periferik metabolizması Şekil 2'de gösterilmiştir.



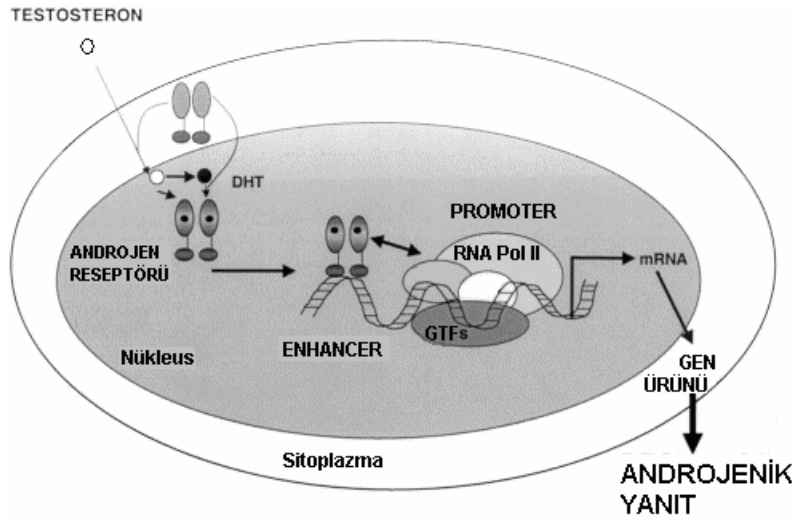
Şekil 2. Plazma testosteronunun periferik metabolizması. (16)

3.1.5. Androjenlerin Etki Mekanizması

Testosteron, DHT ve diğer androjenler hedef hücrelerde etkilerini tek bir androjen reseptörünü (AR) aktive ederek gösterirler. Androjen reseptörü, steroid/nüklear reseptör ailesine bağlı ligand-bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür (13, 14, 68, 71, 122). Androjen reseptörü; DNA-bağlanma bölgesi, C-terminal ligand-bağlanma bölgesi, N-terminal transaktivasyon bölgesi olmak üzere başlıca üç fonksiyonel bölge içermektedir. Ayrıca DNA-bağlanma ile ligand-bağlanma bölgeleri arasında bir bağlantı alanı yer almaktadır (14, 41, 51, 96).

Serbest testosteron pasif yada kolaylaştırılmış difüzyon ile hücre zarını geçerek sitoplazmaya girer. Serbest testosteron yada hücre membranı yanında albuminden ayrılarak serbestleşen testosteron pasif olarak hücreye girebilirken; SHBG'ye bağlı testosteronun hücreye girebilmesi için membran reseptörüne gerek duyulmaktadır (99). Sitoplazmaya girdikten sonra testosteron hedef hücrede bu şekilde kalır yada 5α-redüktaz enzimi ile DHT'ye dönüştürülür. Testosteron ve DHT için tek bir androjen reseptörü vardır; fakat DHT'nin reseptöre bağlanma ilgisi testosterondan daha fazladır (14, 33, 49). Reseptöre hormon bağlanması sitoplazma yada nükleusta gerçekleşir. Reseptör nükleusa intrinsik bir nükleer lokalizasyon sinyali ile girer (11). Hormonun androjen reseptörüne bağlanması; ısı-şok proteinlerinin (heat-shock proteins-HSP) ayrılmasına ve androjen reseptör

proteininde konformasyonel bir değişikliğe yol açar (14, 49, 96, 98). Bu değişiklik; androjen-yanıt elemanı (androgen responsive element-ARE) olarak adlandırılan, AR geni üzerindeki “promoter” ve “enhancer” bölgelerinde yer alan DNA segmentlerine reseptörün bağlanmasını kolaylaştırır (41, 49). Androjen reseptörünün, diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte ARE’ye bağlanması mRNA ekspresyonunu düzenler; mRNA ve ilgili protein sentezi sonucu spesifik androjen yanıtı oluşur (11, 14, 49, 70, 99).



Şekil 3. Hedef hücrede androjen etki mekanizması (11, 14)

(DHT: Dihidrotestosteron; RNA Pol II: RNA Polimeraz II; GTFs: Genel Transkripsiyon Faktörleri)

3.1.6. Androjenlerin Etkileri

Androjenler, özellikle testosteron ve DHT aşağıdaki olaylarda yer alır (16, 44, 48, 119):

- Fötal hayatta testislerin skrotuma inmesini sağlar.
- Fötusta ürogenital kanalın ve dış genital organların virilizasyonu ve pubertede gelişmesini sağlar.
- Cinsel farklılaşmada etkilidir.
- Sekonder seks karakterlerinin (penisin büyümesi, gırtlak ve kaslı yapının gelişmesi, yüz, kasık ve koltukaltı kıllanmasının oluşması, cildin koyulaşması) ortaya çıkmasını sağlar.

- Testisler, penis, prostat, seminal vezikül ve aksesuar salgı bezlerinin büyümesi; spermatogenezin başlaması ve spermatozoidlerin olgunlaşmasında etkilidir.
- Larenkste büyüme, ses tellerinde uzama ve kalınlaşma sonucu sesin kalınlaşmasına yol açar.
- Anabolik etkileri vardır.
- Erkek tipi davranışın gelişmesini sağlar.
- Temel metabolik hızı artırır.
- Kırmızı kan hücrelerinin yapımını artırır.
- Kemiklerde kalsiyum depolanmasını artırır.
- Böbrek distal tübüllerinde sodyum tutulumunu artırır.

Tablo 1. Steroid yapıdaki hormonların hedef dokular üzerindeki etkileri ve bu etkiyi ortaya çıkaran steroid hormon türü (119).

Steroid	Hedef Doku	Etki
Testosteron	Wolf kanalı	Büyüme ve farklılaşmanın uyarılması
DHT	Eksternal genital	Maskünlizasyon ve büyüme
DHT	Ürogenital sinus	Maskünlizasyon ve büyüme
Testosteron ve Östradiol	Kemik	Epifizlerin kapanması ve anabolik etki
Testosteron ve DHT	Larinks	Vokal kordların uzunlamasına büyümesi
DHT	Deri	Sebum üretimi, kıl foliküllerinin büyümesi, androjenik alopesi
Testosteron / DHT	Böbrekler	Eritropoetin üretimi
Testosteron ve DHT	Karaciğer	Enzim üretimi ve protein sentezi
Testosteron	Kas	Anabolik etki
Testosteron / DHT	Kemik iliği	Eritropoezis
DHT ve Östradiol	Testis	Spermatogenezis
DHT ve Östradiol	Prostat	Büyüme ve fonksiyon
Testosteron ve DHT	Göğüs	Büyümenin inhibisyonu
Testosteron / DHT	Hipofiz	LH / FSH sekresyonunda negatif geri kontrol
DHT	Hipotalamus	GnRH sekresyonunda negatif geri kontrol
Testosteron/DHT/Östradiol	Beyin	Psikotropik etkiler

3.2. ANTİANDROJENLER

Antiandrojenler; androjenlerin hedef hücrelerde aktivite göstermelerini engelleyen bileşiklerdir (75, 91). Androjen etkisinin bloke edilmesi birkaç şekilde gerçekleşir (77):

- Gonadotropin sentezi veya salınımının inhibisyonu,
- Testosteron ve/veya DHT biyosentezi ile interferans,
- Protein sentezinin engellenmesi,
- Reseptör bölgelerinde androjenler ile yarışma (competition).

Anti-androjenler; hedef dokularda endojen androjenlerin (testosteron ve DHT) reseptörlerine bağlanmalarını inhibe etmenin yanı sıra, androjen uptake'ini de inhibe edebilirler (114).

3.2.1. Antiandrojenlerin Sınıflandırılması

Antiandrojenler yapısal olarak, ayrıca hormon benzeri etki (östrojenik, progestasyonel veya androjenik) gösterip göstermemelerine göre steroidal ve non-steroidal olmak üzere iki gruba ayrılırlar (45, 52, 91, 96, 109).

3.2.1.1. Steroidal Antiandrojenler

Steroidal antiandrojenler (örn: siproteron asetat, megestrol asetat, klormadinon asetat gibi) parsiyel agonistik ve antagonistik androjenik etkiye sahip olup; saf antiandrojenik etki göstermezler (11, 14, 96). Aynı zamanda parsiyel progestasyonel ve glukokortikoid etki ile antigonadotropik etki de sergileyebilirler (11, 91). Siproteron asetat; kombine androjenik ve progestojenik etkiden dolayı hipofizde progesteron reseptörüne bağlanır, LH salınımını ve testislerden testosteron üretimini inhibe eder (4, 108). Testosteron düzeylerindeki azalma sonucu libido ve seksüel fonksiyon kaybına yol açarlar (4, 45, 90).

3.2.1.2. Non-steroidal Antiandrojenler

Non-steroidal antiandrojenler (örn: flutamid, nilutamid, bicalutamid, anandron gibi) herhangi bir agonistik veya başka bir hormonal aktivite göstermeksizin; androjen reseptörünü bloke ederler ve saf antiandrojenik etki gösterirler (14, 96). Bu saf antiandrojenler hipotalamik-hipofizer düzeyde etki ederek, gonadal steroidlerin negatif feed-back mekanizmasını inhibe ederler; böylece hipofizden daha fazla gonadotropin ve gonadlardan daha fazla testosteron ve östradiol salınımına yol açarlar (91).

3.2.2. Antiandrojenlerin Etki Mekanizmaları

Antiandrojenler hedef hücrede androjen reseptörüne bağlanarak; testosteron ve DHT'nin reseptöre bağlanmasını kompetatif olarak inhibe ederler. Antiandrojenlerin androjen reseptörü ile etkileşimleri, unstabil antiandrojen-reseptör kompleksi oluşumu ile sonuçlanır. Bu kompleks geçici bir yapı olup, androjen-bağımlı gen transkripsiyonu ve protein sentezini başlatmaz ve spesifik androjen yanıtı oluşmaz. Antiandrojenlerin androjen reseptörüne rölatif bağlanma affinitesi zamanla azalmaktadır. Bu da antiandrojen-reseptör kompleksinin karalı bir yapı olmayıp, testosteron veya DHT-reseptör kompleksinden daha kolay ve hızlı ayrıştığını göstermektedir (100).

3.2.3. Antiandrojenlerin Tedavide Kullanım Alanları

Terapotik ajan olarak antiandrojenler, androjene-duyarlı çeşitli hastalıkların tedavi edilmesinde topikal veya sistemik olarak uygulanmaktadır (96). Antiandrojenlerin en önemli ve en yaygın klinik uygulama alanı prostat kanserinin tedavisidir (4, 45, 75, 108). Ayrıca kadınlarda hirsutizm, akne, sebore ve androgenetik alopesi gibi hiperandrojenik bozukluklar, benign prostat hiperplazisi, erkeklerde meme kanseri, erken puberte, hiperseksüalite ve seksüel deviasyon gibi durumlarda da antiandrojenler kullanılmaktadır (75, 89, 91, 109).

3.3. ENDOKRİN BOZUCULAR (EDC-ENDOCRINE DISRUPTERS)

Endokrin sistemi etkileme potansiyeline sahip kimyasal maddeler günümüzde genel anlamda “*endokrin bozucular*” (endocrine disrupters) olarak adlandırılmaktadır (88, 103). Endokrin bozucu terimi daha geniş kapsamlı olarak 1996 yılında Avrupa Komisyonu tarafından Weybridge Seminerinde “*intak bir organizmada yada bunun yavrularında, sonraki nesillerinde endokrin sistem fonksiyonlarında değişikliklere ve sonuçta sağlık için zararlı etkilere neden olan ekzojen bir madde*” şeklinde tanımlanmıştır (39). Endokrin bozucu kimyasalların (EDC-Endocrine Disrupting Chemicals) insan sağlığı ve çevrede hayvanlar üzerinde oluşturabileceği potansiyel etkiler önemli bir halk sağlığı sorunu olarak üzerinde durulan bir konu haline gelmiştir (46).

Günümüzde çok sayıda çevresel kirleticinin endokrin bozucu özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir (31, 59). Bu maddeler ksenohormonlar, ksenoöstrojenler veya ksenobiyotikler olarak da adlandırılmaktadır (Brooks-1998). Ksenohormonların etkilerini vücudun doğal hormonlarını taklit ederek (mimic) veya onların fizyolojik etki mekanizmalarını bozarak (antagonize ederek) gösterdikleri sanılmaktadır (25, 72). Bu kirleticilerin endokrin bozucu etkileri esas olarak östrojenik, anti-östrojenik, androjenik ve anti-androjenik özelliklerinden kaynaklanmaktadır (87).

Endokrin bozucu kimyasalların memeliler ve diğer hayvanlarda hipotalamik-hipofizer-gonadal fonksiyonları; östrojen, androjen ve tiroid hormon sentezlerini; androjen ve östrojen reseptör-aracılı etkileri değiştirdiği gösterilmiştir (46). 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 (3, 5, 9, 30, 117).

3.3.1. Endokrin Bozucuların Sınıflandırılması

Endokrin bozucu maddeler genel olarak üç gruba ayrılabilir (9):

1. Sentetik hormonlar (17α -etinilöstradiol gibi endokrin sistemi kasıtlı olarak bozmaya yönelik üretilen kimyasallar)
2. Doğal bileşikler (birçok bitkide bulunan fitoöstrojenler - genistein, kumestrol)
3. Sentetik kimyasallar (o,p'-diklorodifenil-trikloroetan (DDT) ve metabolitleri (p,p'-DDE), dieldrin, chlordan ve endosulfan gibi pestisid ve herbisidler; poliklorlu bifeniller (PCBs) ve dioksinler; Bisfenol A; bazı ftalatlar (PVC gibi birçok uygulamada yaygın kullanılan plastikleştiriciler) gibi.

3.3.2. Endokrin Bozucuların Etki Mekanizmaları

Endokrin bozucuların başlıca etki mekanizması; bu kimyasalların hormon reseptörleri ile direkt etkileşim sonucu reseptör agonisti veya antagonisti olarak endokrin fonksiyonları bozmalarıdır. Son 20 yılda özellikle östrojen reseptörü üzerinden endojen östrojeni taklit eden kimyasallar üzerine çalışmalar odaklanmıştır. Ayrıca son yıllardaki çalışmalarda endokrin bozucuların birçoğunun androjen reseptörü ile etkileşime girerek, androjenik ve antiandrojenik etki gösterdiği bildirilmiştir (64, 104).

3.3.2.1.Östrojen Reseptörünün İllegal Aktivasyonu

Nüklear reseptör ailesinin bir üyesi olan östrojen reseptörünün doğal ligandı 17β östradioldür. Östradiolün kendi reseptörüne bağlanması reseptörde konformasyonel değişikliklere ve ısı şok proteinlerinin ayrılmasına yol açar. Hormon-reseptör kompleksi hedef promotor üzerinde östrojen yanıt elemanı

(estrogen responsive element-ERE) olarak adlandırılan spesifik DNA bölgesine bağlanır. Transkripsiyon koaktivatörlerinin de bağlanmasından sonra transkripsiyonel aktivasyon gerçekleşir (72).

Poliklorlu pestisitler (endosulfan, toxafen, dieldrin, o,p'-DDT gibi) östrojen reseptörü ile direkt etkileşime girerek 17 β -östradiolü reseptöründen uzaklaştırırlar. Östrojen reseptörü-pestisid kompleksi östradiol varlığında promoter bölgeleri aktive etme yeteneğine sahiptir (72).

3.3.2.2. Ksenohormonların Androjenik veya Antiandrojenik Etkileri

3.3.2.2.1. Androjen Reseptör Antagonizması

Vinclozolin, o,p'-DDT ve metaboliti p,p'-DDE gibi bazı bileşikler antiandrojenik etki ile AR'ye bağlanarak reseptörü bloke ederler. Puberte veya erginlik döneminde bu gibi maddelere maruziyet, erkek cinsiyet karakterlerinin gelişiminde aksamalara yol açmaktadır (58, 72).

3.3.2.2.2. Androjen Reseptörünün İllegal Aktivasyonu

Bazı durumlarda ise çeşitli kimyasallar agonistik etki göstermektedir. Hidroksiflutamid ve vinclozolinin bir metaboliti olan enanilid; testosteron varlığında ve yüksek konsantrasyonlarda AR üzerinde agonistik etki gösterir (72, 121).

3.3.2.2.3. Testosteron Sentezinin İnhibisyonu

Anti-fungal bir imidazol olan ketokonazol gibi bazı ajanlar direkt olarak testosteron sentezi için gerekli 17 β -hidroksilazı bloke ederek Leydig hücrelerinde testosteron sentezini baskılayabilirler (54).

3.3.2.2.4. Testosteronun Metabolik Klirensi

Endosulfan, o,p'-DDT gibi bazı pestisitler indirekt olarak androjenlerin eliminasyonunu artırır. Bu etkileri, detoksifikasyonda rol oynayan ve testosteronu elimine eden UDP-glukuronoziltransferaz ve monooksijenaz gibi enzimleri indüklemeleri sonucu ortaya çıkmaktadır (72).

3.3.2.3. LH ve FSH'nın İnhibisyonu

Testosteron, LH ve FSH spermatogenezi kontrol eden major hormonlardır. Bunların etkileri LH-Leydig hücreleri eksen ve FSH-Sertoli hücreleri eksen üzerinden meydana gelmektedir. Leydig hücreleri plazma membran yüzeylerinde LH reseptörlerini eksprese ederler. LH ile stimülasyonu takiben bu endokrin hücreler testosteron serbestler; bu da negatif feed-back etki ile hipofizden LH sekresyonunu inhibe eder. Böylece; androjenik aktiviteli bileşikler gonadotropinleri baskılayarak spermatogenezi bozar. (72). Östradiolü taklit eden bileşikler de testosteronu benzer şekilde LH sekresyonunu baskılayabilir. LH-Leydig hücresi-testosteron sekresyon eksen kesintiye uğrar (129).

Sertoli hücreleri, tohum (germ) hücre farklılaşması için gerekli olup; büyümeleri FSH tarafından stimüle edilmektedir. LH'ya benzer şekilde FSH da östradiol veya testosteron tarafından inhibe edilir. Böylece; gebelik süresi, çocukluk çağı ve pubertede ksenohormonlara maruziyet FSH sekresyonunu baskılayarak Sertoli hücre proliferasyonunun bozulmasına yol açabilir. Bu da erişkin dönemde geri dönüşümsüz oligozoospermi veya azospermiye neden olabilir. Epidemiyolojik bir çalışmada doğumdan sonra ksenoöstrojenlere maruziyetin FSH sekresyonunda etkili bir düşüşe yol açtığı gösterilmiştir (93).

3.4.ANDROJENİK ve ANTIANDROJENİK ETKİLERİN BELİRLENMESİNDE HERSHBERGER METODU

Hershberger metodu test kimyasallarının subakut bir periyot için kastre edilmiş erkek ratlara uygulandığı, androjenik ve antiandrojenik özelliğe sahip kimyasalların tespiti için kullanılan bir *in vivo* yöntemdir (6, 7).

Antiandrojenik aktivite için kastre edilmiş erkek ratlarda kullanılan metodlar yaklaşık 70 yıldır çeşitli formlarda uygulanmıştır. Metod ilk olarak 1932’de Korenevsky ve ark. tarafından androjenlerin tespiti için tasarlanmış ve daha sonra kimyasalların myotropik özelliklerinin izlenmesi için modifiye edilmiştir (65). 1953’te Hershberger ve ark (50) tarafından kastre edilen süten kesilmiş ratların levator ani kası, seminal vezikül ve prostatta büyümeyi indüklemeye özellikleri ile steroidlerin androjenik ve myotropik aktivitelerinin değerlendirildiği çalışmanın yayınlanmasından sonra metod “Hershberger assay” olarak adlandırıldı. Araştırmacılar levator ani ağırlığında indüklenen artışın ventral prostat ağırlığındaki artış ile bölünme oranının izlenerek steroidlerin anabolik etkilerine göre sıralanabileceğini bildirmişlerdir. Dorfman’ın androjenler ve antiandrojenlerin ölçümü çalışmalarında da yine levator ani kası, seminal vezikül ve prostat ağırlıklarında değişiklikler gözlenmiştir (34). Daha yeni çalışmalarda da aynı organlar takip edilmiş (106) veya prostat tek başına (84, 85, 92) yada seminal vezikül ile birlikte (58, 116) ele alınmıştır. Bu metod daha sonra rodentlerde androjenik ve antiandrojenik aktivitenin incelenmesi için çeşitli değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (6). O zamandan sonra metod özellikle ratlarda antiandrojenler için bir test sistemi olarak kullanılmaya devam edilmiştir.

Rodent Hershberger metodunun temeli; hayvanlardaki aksesuar seks dokularının (SAT) androjenlerin kontrolü altında olduğu ve büyümelerinin androjenler tarafından stimüle edilmesi esasına dayanmaktadır. Hayvanın olgunlaşmamış olması (immature) veya kastre edilmesinden dolayı bu hormonların endojen kaynağı bulunmuyorsa; SAT'ta büyümenin başlaması ve/veya sürdürülebilmesi için ekzojen bir kaynağa gerek duyulmaktadır. Hershberger metodunda androjen agonisti olarak rol oynayan kimyasallar androjen-bağımlı SAT ağırlıklarında artışa yol açmaları ile; androjen antagonistleri ise kuvvetli bir androjen ile birlikte uygulandıklarında SAT ağırlıklarında nisbi azalmaya yol açmaları ile tespit edilebilirler (6, 60).

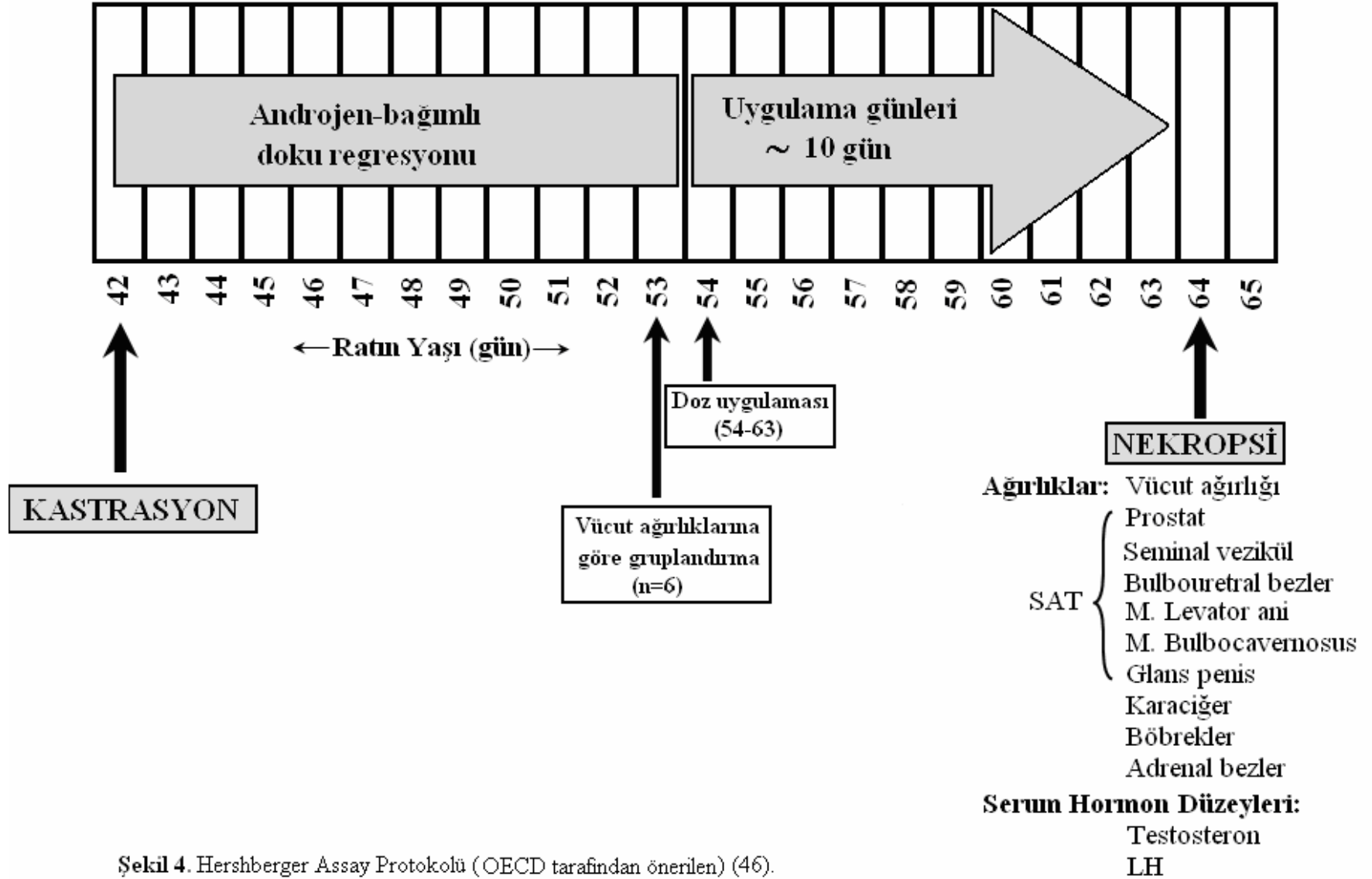
Günümüze kadar gelen süreçte Hershberger deney protokolünde birçok değişken bulunmaktadır.

- Rodentin, özellikle ratın cinsi ve kastrasyondaki yaşı başlıca değişkendir (6, 126, 128). Bu durum; sütten kesilen ratların kullanılmasından (50, 106, 116), genç erişkinlerin (84, 92) ve ~125 günlük ratların kullanılmasına (58) kadar değişmektedir.
- Kastrasyon ile uygulamanın başlangıcı arasındaki iyileşme periyodu da; iyileşme olmadan (50, 58), 7 güne kadar (92, 106) ve 11 güne kadar (78) değişmektedir.
- Seçim, uygulama yolu ve referans androjenin dozajı da değişebilmektedir. Testosteron hem Silastic implant olarak (58) hem subkutan şekilde erişkin ratlara 3 mg/kg/gün doz düzeylerine kadar ve sütten kesilenlere 2.4 mg total dozda (34) uygulanmaktadır. Testosteron propionat (TP) ise yaygın olarak

200 µg/kg (116) ile 1 mg/kg (92) arasındaki günlük subkutan doz düzeylerinde kullanılmaktadır. Kullanılan diğer referans androjenler de testosteron enanthate (2mg/kg) ve 5α-dihidrotestosteronu (8 mg/kg/gün) kapsamaktadır (105, 106).

- Benzer şekilde, antiandrojenler de farklı yollarla ve çeşitli zaman periyodlarında uygulanmaktadır. Uygulama periyotları çeşitli çalışmalarda 3 günden; 4, 5, 7, 10, 14 ile 20 güne kadar değişkenlik göstermektedir (34, 50, 59, 85, 92, 106). Çoğunlukla subkutan enjeksiyon (sc) tercih edilmektedir (34, 50, 85). Bununla birlikte, oral uygulama da yaygın olarak kullanılmaktadır (59, 106). Dorfman subkutan uygulama ile karşılaştırıldığı zaman, oral uygulama için daha uzun bir uygulama periyodu gerektiğini belirterek; oral yol ile 20 günlük uygulama ve sc yol ile 10 günlük uygulamayı tavsiye etmiştir (34).
- Son olarak; ağırlıkları belirlenecek organlar ve tartma metodu da uygulanan yöntemin farklı protokolleri arasında değişkenlik göstermektedir (6, 127).

Deney protokolünde bulunan birçok değişkenden dolayı OECD (Ekonomik İşbirliği ve Gelişme Teşkilatı - Organisation for Economic Co-operation and Development) Hershberger metodunda uluslar arası standardizasyonu sağlamak için çalışmalar başlatmıştır. Bu çalışmalar ışığında OECD tarafından önerilen Hershberger metodunun protokolü Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Hershberger Assay Protokolü (OECD tarafından önerilen) (46).

Şekilde gösterildiği gibi; Hershberger Assay protokolünde peripubertal erkek ratlar her iki testisleri ve epididimisleri uzaklaştırılarak kastre edilmektedir (örn: Sprague-Dawley ratlarda 42-46 günler arasında kastrasyon) (43). Seksüel gelişimin peripubertal evresinde uygun steroidogenik enzimler ve androjenik reseptörlere sahip olduğundan, SAT androjenlere karşı oldukça duyarlıdır. Bu yaştaki ratların kullanılmasının avantajı; SAT'ın yüksek sensitivitesine ilaveten nispi düşük ağırlıklarından dolayı hayvanlar arasında yanıtlardaki varyasyonların en aza inmesidir. Bu sistemde referans bir androjen ve antiandrojen olduğu düşünülen test kimyasalı 6'şar rattan oluşan gruplara 10 gün boyunca uygulanır ve son dozdan yaklaşık 24 saat sonra 11. gün vücut ağırlıkları belirlenen ratlar dekapite edilir. Dekapitasyondan sonra ratların SAT ağırlıkları, karaciğer ve böbrek ağırlıkları ile serum testosteron ve LH düzeyleri ölçülür.

3.4.1. Hershberger Assay Protokolünde Uygulama Grupları

Hershberger Assay protokolünde uygulama grupları genel olarak şu şekilde oluşturulmaktadır:

- Kastrasyondan sonra minimum organ ağırlıklarının ölçümü için bir çözücü kontrol grubu (örn; Testosteron propionat için çözücü olarak kullanılan hidroksipropil metoksisellüloz - HPMC kontrol grubu),
- Organların ulaşabileceği ağırlıkların üst limitini belirlemek için bir referans androjen grubu (çoğunlukla; Testosteron propionat grubu),
- Referans androjen / referans antiandrojen pozitif kontrol grubu (örn; Testosteron propionat / Flutamide grubu),
- Referans androjen / test bileşiği grubu (örn; Testosteron propionat /test bileşiği grubu).

- Bazı çalışmalarda testosteron propionat uygulanan kastre edilmiş ratlardaki ağırlıklara oranla normal organ ağırlıklarının kaydedilmesi için bir intak (kastre edilmemiş) grup da ilave edilmektedir.

3.4.2. Hershberger Assay Protokolünde Kullanılan Test Kimyasalları

Hershberger metodunda (anti)androjenite için kısa-süreli bir *in vivo* tarama testi olarak, kastre immature erkek ratlar kullanılmaktadır. Androjenik bileşikler androjen-bağımlı dokuların (prostat gibi) ağırlıklarında artışa yol açacaklardır. Benzer şekilde; antiandrojenik kimyasallar testosteron-uygulanan immature kastre erkek ratlarda bu ağırlık artışını azaltacaklardır (43).

Hershberger Assay'de aşağıdaki test kimyasalları kullanılmaktadır:

- Testosteron (kuvvetli androjen)
- Metiltestosteron (kuvvetli androjen)
- Trenbolone (zayıf androjen)
- Flutamide (kuvvetli antiandrojen)
- Vinclozoline (zayıf antiandrojen)
- Procimidone (zayıf antiandrojen)
- Linuron (zayıf antiandrojen)
- *p,p'*-DDE (zayıf antiandrojen)
- Finasteride (5 α -redüktaz inhibitörü)

Hershberger metodu androjenler, antiandrojenler ve erkek seks hormon anabolizma inhibitörlerinin belirlenmesi için günümüzde duyarlı ve pratik bir test metodu olarak kullanılmaktadır (6, 43).

3.5.HERSHBERGER METODU ile ANDROJENİK ve ANTIANDROJENİK ETKİLERİ ARAŞTIRILACAK MADDELER

3.5.1. Endosulfan

Geniş spektrumlu bir pestisit olan Endosulfan, tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Organoklorlu yapısından dolayı doğada ve canlı organizmada birikme eğilimi gösterir (113). Organik klorlu pestisitler insan ve hayvanların vücut yağlarında su, yağmur suyu ve havadaki yoğunluğunun milyonlarca katına varan derişimlerde birirmektedir. Bu canlıların doğrudan temas sonucu (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 (125).

Endosulfan, son yıllarda Amerikan Çevre Koruma Teşkilatı (EPA - Environmental Protection Agency) tarafından toksisite riski yüksek pestisitler sınıfına dahil edilmiştir (8). Türkiye’de de yakın yıllara kadar yoğun şekilde kullanıldığı ve çevreyi kirlettiği bilinmektedir (32). Endosulfan’ın östrojenik etki gösterdiği farklı *in vivo* ve *in vitro* deney modellerinde gösterilmiştir (47). Ancak, androjenik ve anti-androjenik özellikleri erkek hayvan modellerinde test edilmemiştir. Erişkin erkek ratlarda yapılan bir çalışmada, oral yolla farklı dozlarda uygulanan Endosulfan’ın testis ve aksesuar seks organ ağırlıklarında azalma ile birlikte sperm motilitesini de baskıladığı gösterilmiştir (23). Endosulfan’ın ayrıca ratlarda plazma FSH ve LH düzeylerini azalttığı görülmüştür (95). Bu pestisit testiküler hasara yol açmakla birlikte, hücresel ve biyokimyasal toksisite açısından doz ve maruziyet süresinin belirleyici olduğu belirtilmektedir (22, 53).

3.5.2. Cypermethrin

Cypermethrin tip-II (alfa-siyano) pyrethroid grubuna ait, etkili sentetik bir insektisittir (12). Organoklorlu pestisitlerin yerine geçmesi amacıyla üretilen bu pestisit özellikle son 10 yılda yaygın şekilde kullanılmıştır. Pyrethroidlerin akut nörotoksik etkileri; nöronal hücre membranı üzerindeki etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bu bileşiklerin başlıca hedefi voltaj-bağımlı sodyum kanallarıdır (40). Pyrethroidler hücreye sodyum girişini artırır, membran repolarizasyonu ve kanalların kapanmasında gecikmeye yol açarak; sonuçta sinir iletiminde blokaja neden olurlar (76). Cypermethrin γ -aminobütirik asit reseptörünü inhibe ederek eksitabilite ve konvülziyonlara yol açar. Ayrıca nörotransmitterlerin yıkımında görevli bir enzim olan monoaminoksidazı ve sinir hücreleri tarafından kalsiyum alınımlarını inhibe eder. Bu etkiler; hücre membranlarındaki Na⁺-kanallarının açık kalması sonucu nöronlarda sürekli impulslara ve sonuçta hedef hücrenin ölümüne yol açar (40).

Son zamanlarda yayınlanan bir çalışmada, pyrethroid pestisitlerin insan östrojen reseptörüne bağlanma potansiyellerinin olduğu ve dolayısıyla östrojenik aktivite gösterebilecekleri ileri sürülmüştür (73). Cypermethrin'in östrojenik etkisinin olabileceği *in vitro* (MCF-7 hücrelerinde) deneyler ışığında ortaya konulmuştur (55, 63). Erkek ratlara oral yolla uygulanan cypermethrin'in testis histolojisini ve spermatogenezisi olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (35). Aynı çalışmada ölçülen serum LH ve testosteron düzeylerinde ancak en yüksek doz grubunda azalma gözlenmiştir. Bu bulgular ışığında cypermethrin'in anti-androjenik etki gösterebileceği düşünülmüş ve projemizde test edilecek kimyasal kirleticiler grubuna dahil edilmiştir.

3.5.3. 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) ve Trifluralin

2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ve trifluralin yaygın olarak kullanılan herbisitlerdir. 2,4-D'nin prostat kanser hücre kültürlerinde androjenik etki gösterdiği bildirilmiştir (62). 2,4-D kronik toksisite yönünden incelenmiş olmasına rağmen (19), erkek üreme fonksiyonları üzerine etkileri ile ilgili araştırmalar oldukça sınırlıdır. Tordon 75D isimli bir ticari karışımın testis histolojisi üzerine etkileri incelenmiş ve gözlenen toksik etkiler 2,4-D'ye atfedilmiştir (80). Tarımda 2,4-D spreyleyici olarak çalışan erkeklerde zaman içerisinde azospermi, nekrospermi ve teratospermi geliştiği bildirilmiştir (69). Bu herbisitinin androjenik ve antiandrojenik özellikleri *in vivo* modellerde henüz araştırılmamıştır. Trifluralin'in ülkemizde çok yaygın olarak kullanıldığı ve biyoakümülatif özellik gösterdiği bildirilmiştir (110). Bu kimyasal kirleticilerin yer altı sularına bulaşma riski olduğu bildirilmiştir (24, 124). Koyunlarda yapılan bir araştırmada, trifluralin'in serum LH düzeylerini anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (83). Bu herbisitinin insan sağlığı üzerine etkileri ile ilgili yapılan araştırmalar oldukça azdır; bugün itibarıyla androjenik ve anti-androjenik özelliklerini inceleyen çalışma ise mevcut değildir.

3.6.AMAÇ

Bu tez çalışması; Türkiye'de yaygın olarak kullanılan ve doğada uzun süre kalma potansiyeline sahip organoklorlu (endosulfan) ve pyrethroid (cypermethrin) pestisitler ile herbisitlerin (2,4-D ve trifluralin) peri-pubertal erkek rat modelinde androjen duyarlı dokular (prostat, bulbouretral bezler, seminal veziküller, m. Levator ani) ile serum LH ve testosteron düzeyleri üzerine androjenik ve anti-androjenik etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1 Deney Hayvanları

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden (FÜTDAM) temin edilen peri-pubertal 42 günlük erkek Sprague-Dawley ırkı ratlar kullanıldı ve çalışma FÜTDAM'da gerçekleştirildi. Ratlar standart şartlarda (21 ± 1 °C sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat aydınlatma ve 12 saat karanlık olmak üzere) 3'erli ve 4'erli gruplar halinde özel kafeslerde barındırıldı. Ratların beslenmesinde *ad libitum* standart pellet yem ve çeşme suyu kullanıldı.

Deney hayvanlarının seçimi, yapılan tüm ilaç uygulamaları ve cerrahi girişimler sırasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Bu çalışmada toplam 56 adet rat 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 rat xylazin+ketamin anestezisi altında total olarak (testisler + epididimis) kaste edildi. On günlük iyileşme süresinin sonunda ratların vücut ağırlıkları belirlendi ve yedi gruba daha ayrıldı:

Grup 2 (*Kastrasyon grubu*; n=7)

Grup 3 (*TP grubu*; n=7); 10 gün süreyle 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.

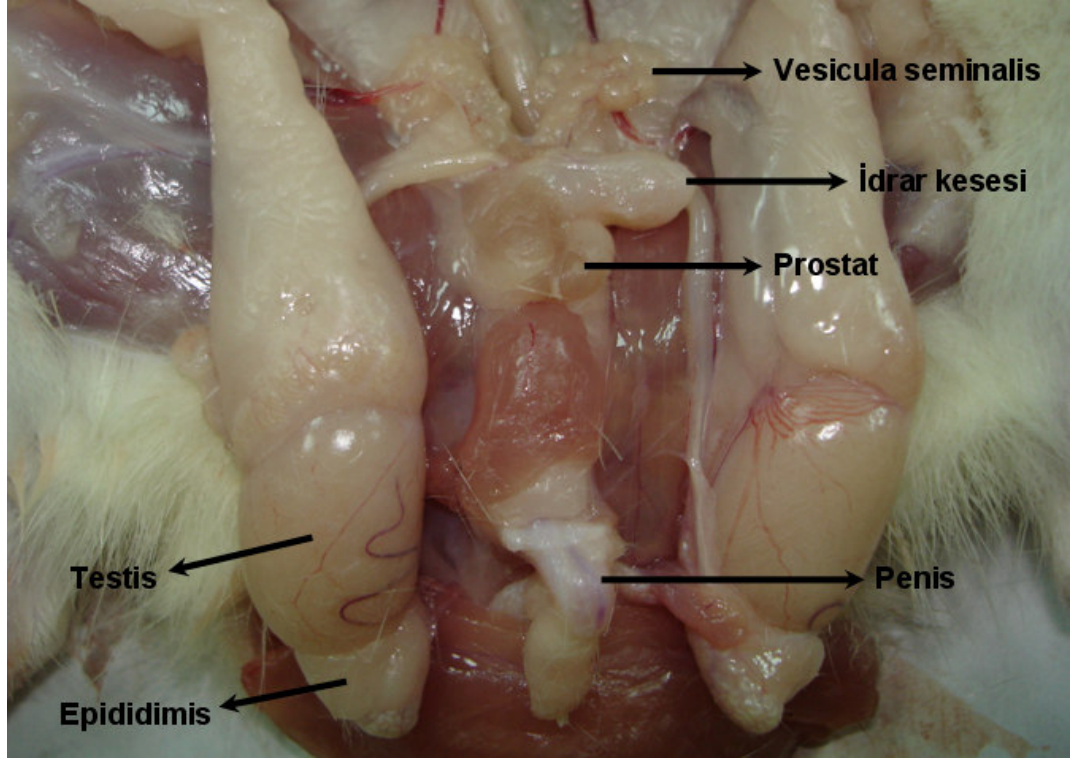
Grup 7 (TP+Cypermethrin grubu; n=7); 10 gün süreyle TP'ye ilaveten Cypermethrin 20 mg/kg/gün oral gavaj yöntemiyle uygulandı.

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

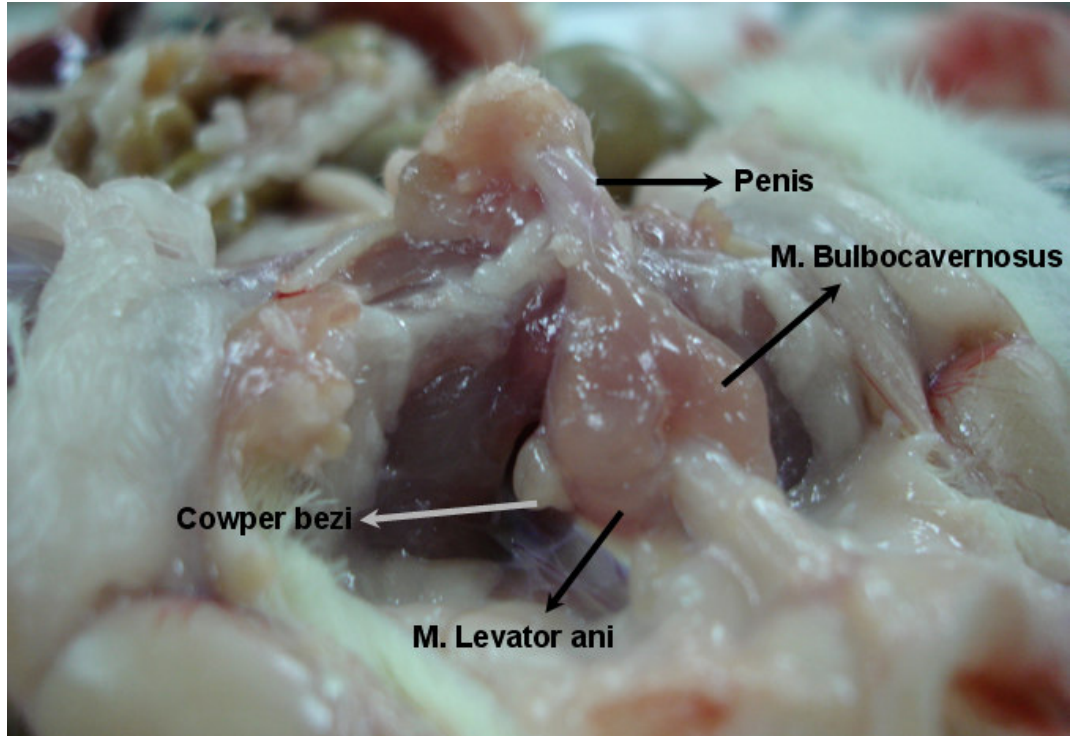
4.2. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

On günlük deney süresi sonunda tüm hayvanların vücut ağırlıkları tekrar belirlendi. Son uygulamadan 24 saat sonra ratlar dekapite edildi ve kan örnekleri toplandı. Tüm hayvanların prostat bezi, bulbouretral (cowper) bezleri ve seminal veziküller ile musculus levator ani (mLA) hemen diseke edilerek hassas terazide tartıldı. Seminal vezikül ve prostatın diseksiyonu Şekil 5'te; cowper bezi ve m. levator ani diseksiyonu ise Şekil 6'da gösterilmiştir. Hayvanların ayrıca karaciğer ve böbrekleri de alınarak ağırlıkları belirlendi.

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 yapılncana kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 5. Hershberger metodunda ratlarda prostat ve seminal veziküllerin diseksiyonu.



Şekil 6. Hershberger metodunda ratlarda m.levator ani ve cowper bezlerinin diseksiyonu.

4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan bütün kimyasal maddeler (Flutamid, Endosulfan, Cypermethrin, 2,4-D ve Trifluralin) analitik saflıkta olup, Sigma-Aldrich (USA) firmasından temin edilmiştir.

4.4. Serum Testosteron Düzeylerinin Ölçümü

Serum testosteron düzeyleri sadece sham ve kastrasyon gruplarında; Dia.Metra marka kit (Italy) kullanılarak ELISA yöntemi ile ölçüldü.

Bu kompetitif immünoenzimatik kolorimetrik metodun prensibi; serum örneğindeki testosteronun (antijen); mikrotelate'lerde (solid faz) bulunan sınırlı sayıdaki anti-testosteron (antikor)'a bağlanmak için horseradish peroksidaz testosteron (enzimle işaretleli antijen) ile yarışması esasına dayanmaktadır. İnkubasyondan sonra solid-faz yıkama ile bağılı/serbest testosteron seperasyonu gerçekleştirilir. Enzim substratı (H_2O_2) ve TMB-substrat ilave edilir. Maksimum renk oluşumu için gerekli süre sonunda enzim reaksiyonu durdurulur ve absorbanlar belirlenir. Örneklerdeki testosteron konsantrasyonları seri standartların sonuçlarına göre hesaplanır. Rengin yoğunluğu, örnekteki testosteron konsantrasyonu ile ters orantılıdır (DiaMetra-Italy).

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 teyid edilmesi idi. Hersherber metodunda

androjenik ve anti-androjenik maddelerin belirlenmesinde primer sonlanma noktası aksesuar seks organ ağırlıklarının belirlenmesidir; testosteron ve LH düzeyleri ise ilave parametreler olarak ölçülebilmektedir (56, 60).

4.5. Serum LH ve FSH Düzeylerinin Ölçümü

Rat LH ve FSH düzeyleri hassas ve kompetitif ELISA yöntemi ile ölçüldü. Pappa ve ark. (81) tarafından bildirilen metod modifiye edilerek kullanıldı. Saf hormonlar ve primer antikorlar A.F. Parlow, NIDDK'dan temin edildi. Rat LH'sı standart olarak kullanılarak; rat-LH kaplı plate'lere anti-LH antikorunun bağlanması ile rat serumlarında LH ölçümü gerçekleştirildi. Renk oluşumu ve miktarın belirlenmesi için; Streptavidin ile işaretlenmiş, tavşan IgG'sine karşı oluşan keçi IgG'si kullanıldı.

Serum FSH düzeyleri de rat LH düzeylerinin ölçümü için açıklanan aynı yöntem ile belirlendi (81).

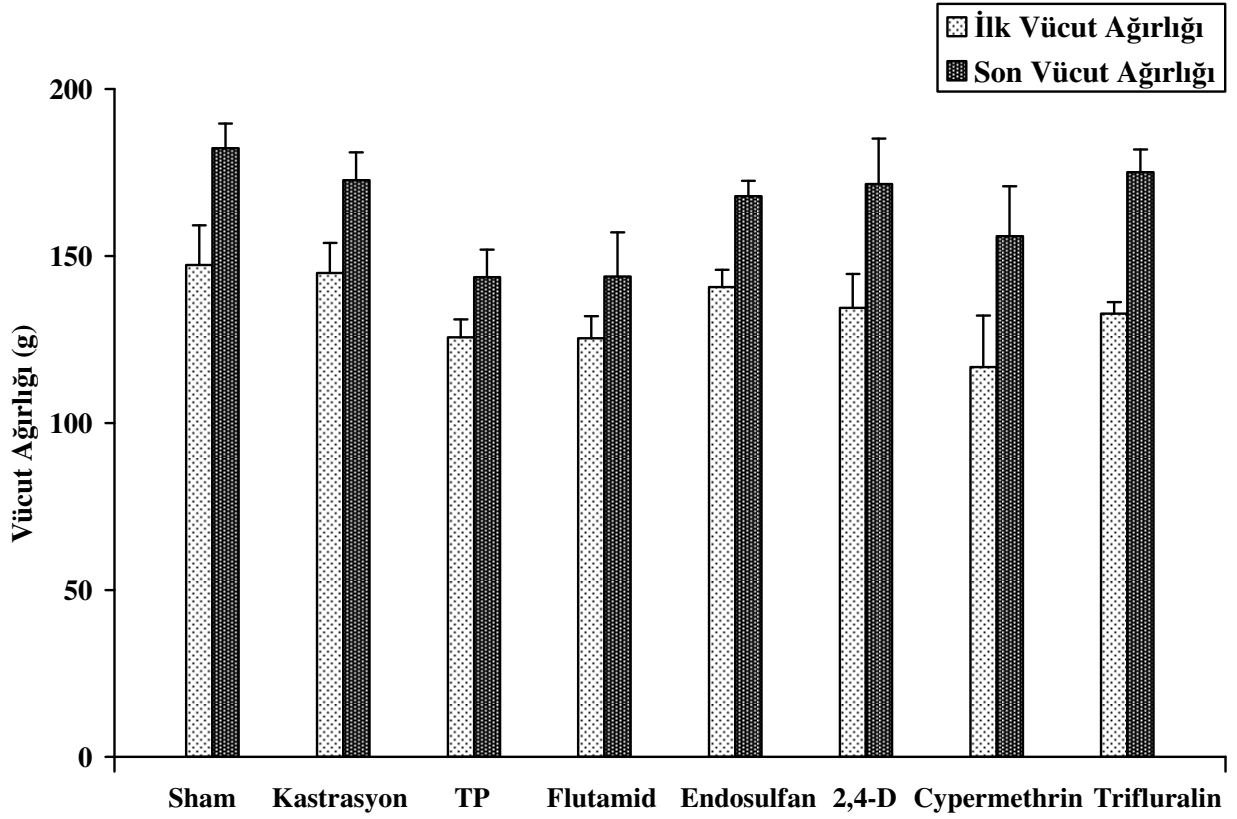
4.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler, One-way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve Post hoc Tukey testi kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. SPSS for Windows 12.0 paket programından yararlanıldı.

5. BULGULAR

5.1. İlk ve Son Vücut Ağırlıkları

Hershberger deneyinde kontrol grupları ile Flutamid, Endosulfan, 2,4-D, Cypermethrin ve Trifluralin uygulanan test gruplarında deneyin başlangıcı ve sonundaki vücut ağırlığı değerleri Şekil 7’de sunulmuştur.

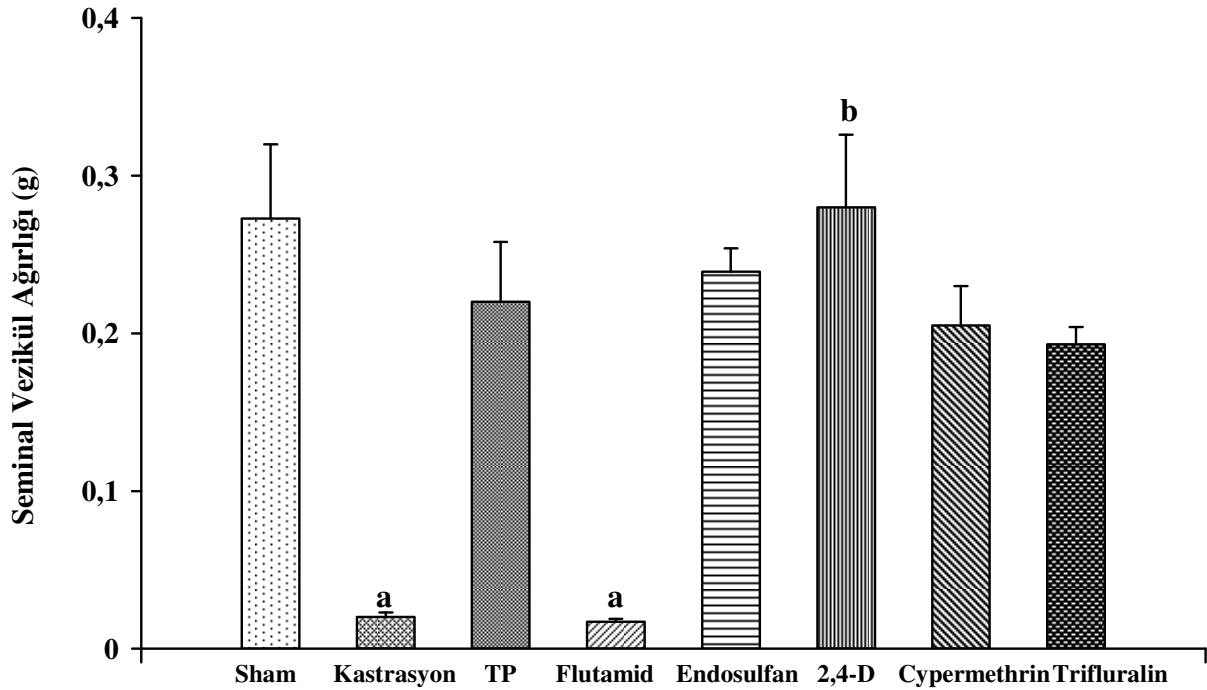


Şekil 7. Hershberger deneyinde kontrol grupları ile test gruplarında deneylerin başlangıcı ve sonundaki vücut ağırlıkları (Ort±SD).

5.2. 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 dönmesini 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 ($p<0.01$).

Hershberger deneyinde kontrol grupları ile Flutamid, Endosulfan, 2,4-D, Cypermethrin ve Trifluralin uygulanan test gruplarındaki ratlara ait seminal vezikül ağırlığı değerleri Şekil 8'de gösterilmiştir.



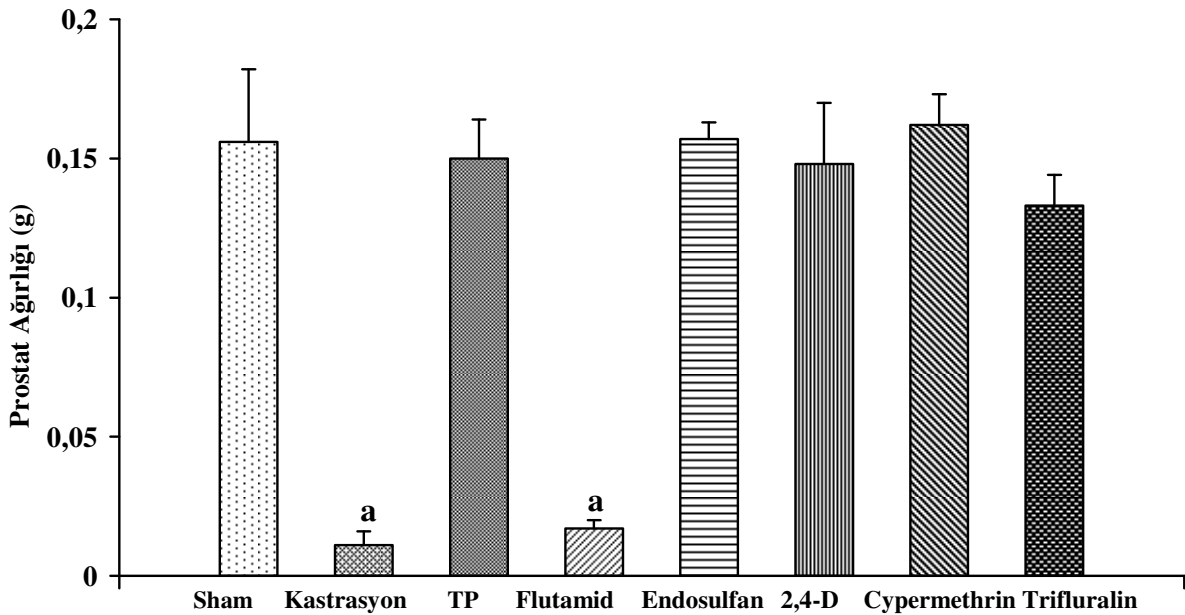
Şekil 8. Hershberger deney gruplarında Seminal vezikül ağırlıkları (Ort±SD).

a: $p<0.001$ sham grubuna göre; b: $p<0.01$ TP grubuna göre.

5.3. 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 ($p>0.05$).

Hershberger deneyinde kontrol grupları ile Flutamid, Endosulfan, 2,4-D, Cypermethrin ve Trifluralin uygulanan test gruplarında prostat bezi ağırlığı değerleri Şekil 9'da gösterilmiştir.



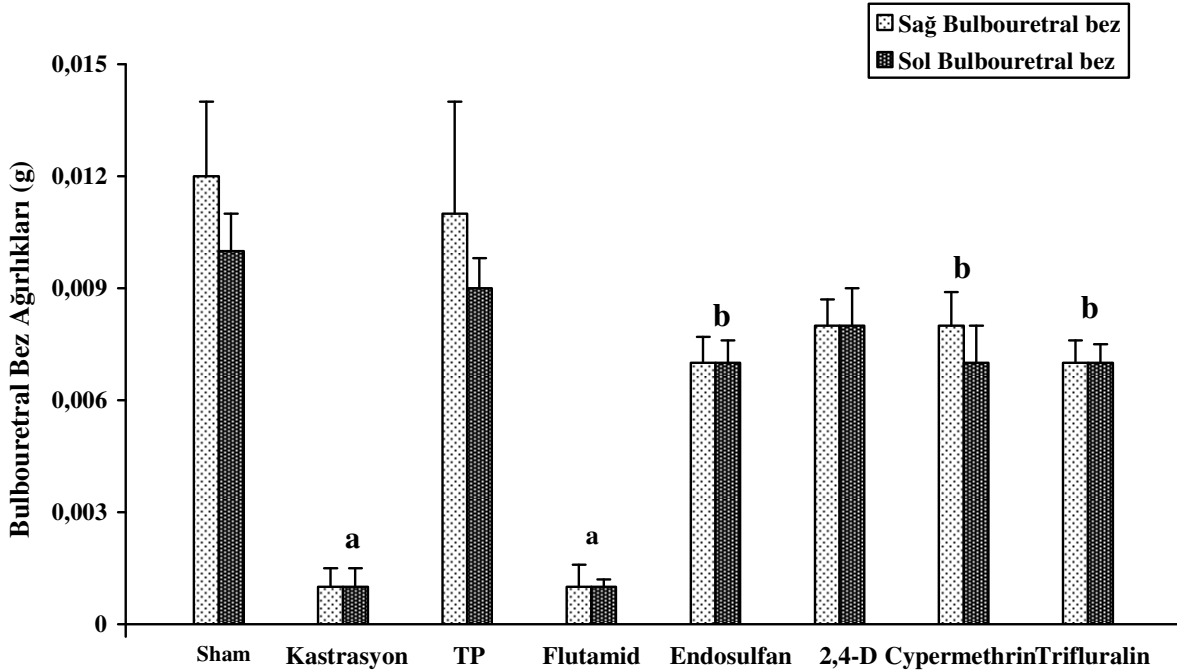
Şekil 9. Hershberger deney gruplarında Prostat bezi ağırlıkları (Ort±SD).

a: $p<0.001$ sham grubuna göre.

5.4. 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 anlamlı bir değişikliğe neden olmadı.

Hershberger deneyinde kontrol grupları ile Flutamid, Endosulfan, 2,4-D, Cypermethrin ve Trifluralin uygulanan test gruplarında sağ ve sol bulbouretral bezlerin ağırlıkları Şekil 10'da gösterilmiştir.



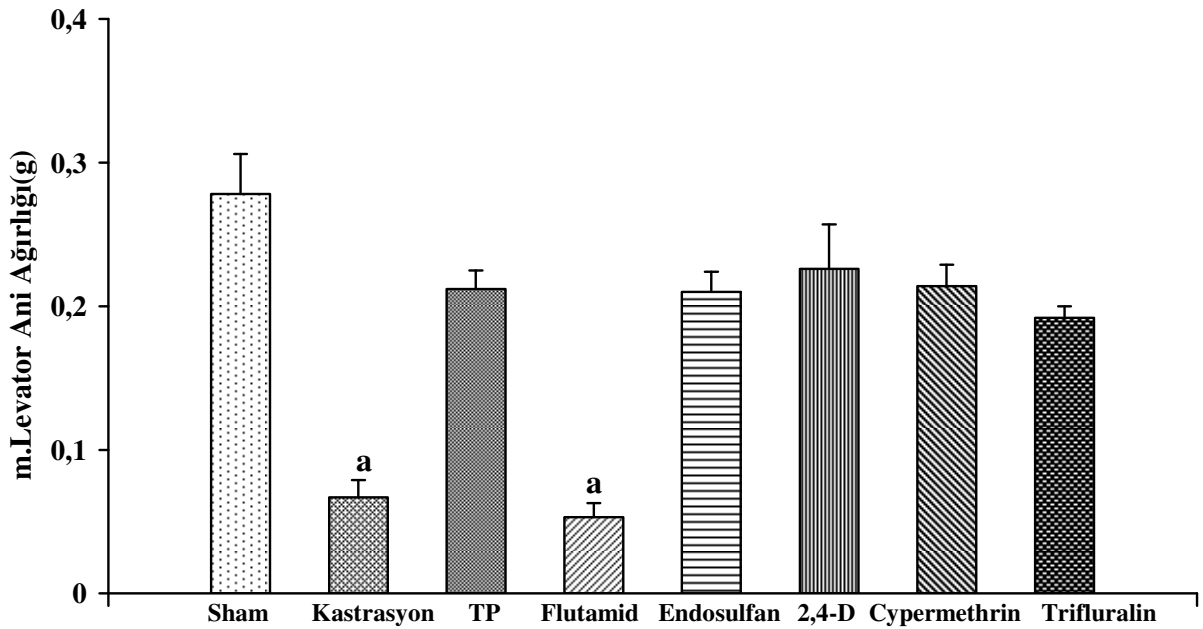
Şekil 10. Hershberger deney gruplarında sağ ve sol bulbouretral bez ağırlıkları (Ort±SD).

a: $p<0.001$ sham grubuna göre; b: $p<0.01$ TP grubuna göre.

5.5. Musculus Levator Ani Ağırlıkları

Kastrasyon, mLA 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 mLA ağırlığında TP grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı görüldü.

Hershberger deneyinde kontrol grupları ile Flutamid, Endosulfan, 2,4-D, Cypermethrin ve Trifluralin uygulanan test gruplarında mLA ağırlığı değerleri Şekil 11'de gösterilmiştir.



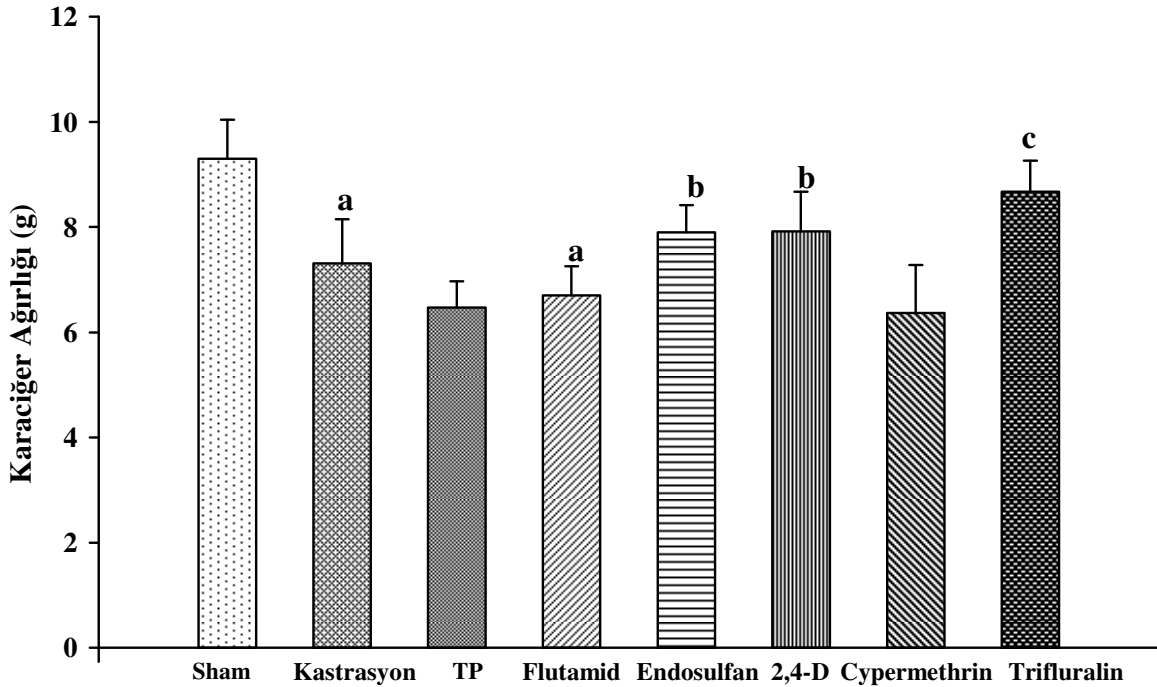
Şekil 11. Hershberger deney gruplarında m. Levator ani ağırlıkları (Ort±SD).

a: $p<0.001$ sham grubuna göre.

5.6. Karaciğer Ağırlıkları

Hershberger deney gruplarından kastrasyon yapılan ve flutamid uygulanan gruplarda karaciğer ağırlıklarının sham grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.001$). Uygulanan test kimyasallarından Endosulfan, 2,4-D ($p<0.01$) ve Trifluralin ($p<0.001$) ise karaciğer ağırlıklarını TP grubuna göre anlamlı şekilde artırdı. Cypermethrin uygulaması ise karaciğer ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşturmadi.

Hershberger deneyinde kontrol grupları ile Flutamid, Endosulfan, 2,4-D, Cypermethrin ve Trifluralin uygulanan test gruplarındaki ratlara ait karaciğer ağırlıkları Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Hershberger deney gruplarında karaciğer ağırlıkları (Ort $\pm$ SD).

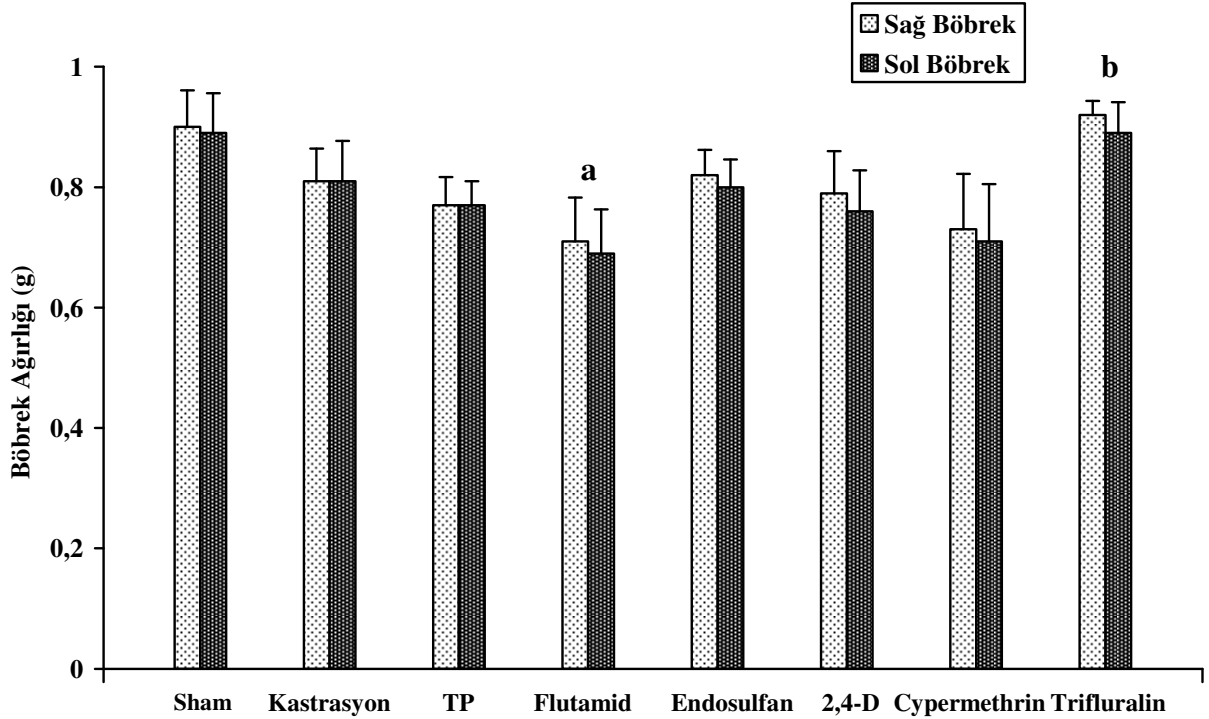
a: $p<0.001$ sham grubuna göre; **b:** $p<0.01$ TP grubuna göre;

c: $p<0.001$ TP grubuna göre.

5.7. Sağ ve Sol Böbrek Ağırlıkları

Hershberger deneyinde kastrasyonun sağ ve sol böbrek ağırlıklarında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı; referans anti-androjen olan flutamid uygulanmasının ise böbrek ağırlıklarını sham grubuna göre anlamlı şekilde azalttığı görüldü ($p<0.001$). Uygulanan test kimyasallarından ise sadece Trifluralin sağ ve sol böbrek ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı artışa yol açarken ($p<0.05$); diğer test bileşikleri anlamlı bir farklılığa yol açmadı.

Hershberger deneyinde kontrol grupları ile Flutamid, Endosulfan, 2,4-D, Cypermethrin ve Trifluralin uygulanan test gruplarındaki ratlara ait sağ ve sol böbrek ağırlıkları Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 13. Hershberger deney gruplarında sağ ve sol böbrek ağırlıkları (Ort±SD).

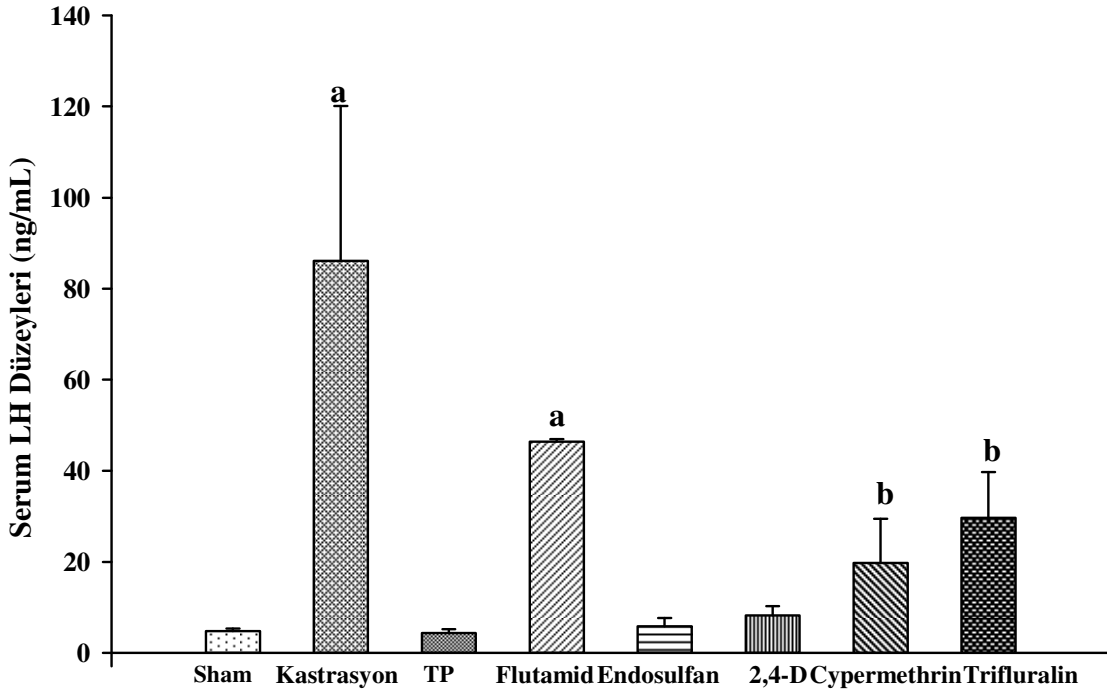
a: $p<0.001$ sham grubuna göre; **b:** $p<0.05$ TP grubuna göre.

5.8. 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 belirtilmiştir.

5.9. 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 Cypermethrin ve Trifluralin uygulaması ile görülen LH artışı istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$).

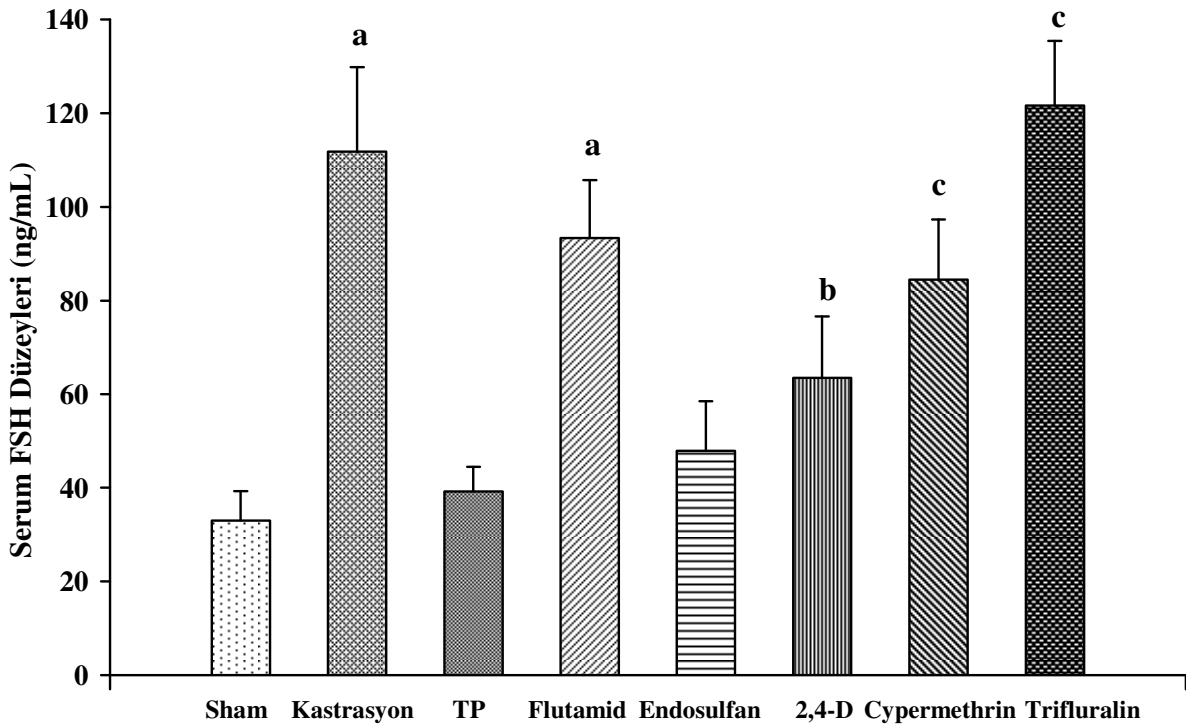


Şekil 14. Hersberger deney gruplarında serum LH düzeyleri (Ort $\pm$ SD).

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

5.10. 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 bulunmadı.



Şekil 15. Hersherberger 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.

Tablo 2. Tüm gruplara ait ilk ve son vücut ağırlıkları, androjen duyarlı dokular (prostat, bulbouretral bezler, seminal veziküller, m. Levator ani) ile karaciğer ve böbrek ağırlıkları (g cinsinden).

	Grup 1 (Sham) n=7	Grup 2 (Kastrasyon) n=7	Grup 3 (TP Grubu) n=7	Grup 4 (Flutamid) n=7	Grup 5 (Endosulfan) n=7	Grup 6 (2,4-D) n=7	Grup 7 (Cypermethrin) n=7	Grup 8 (Trifluralin) n=7
İlk Vücut Ağırlığı	147.28±11.91	144.85±9.08	125.71±5.28	125.42±6.57	140.71±5.18	134.42±10.22	116.71±15.48	132.71±3.54
Son Vücut Ağırlığı	182.28±7.36	172.71±8.32	143.71±8.24	143.85±13.20	167.85±4.67	171.57±13.55	155.85±14.97	175.14±6.76
Seminal Vezikül	0.273±0.047	0.020±0.003 ^a	0.220±0.038	0.017±0.002 ^a	0.239±0.015	0.280±0.046 ^b	0.205±0.025	0.193±0.011
Prostat Bezi	0.156±0.026	0.011±0.005 ^a	0.150±0.014	0.017±0.003 ^a	0.157±0.006	0.148±0.022	0.162±0.011	0.133±0.011
Sağ Bulbouretral Bez	0.012±0.002	0.001±0.0005 ^a	0.011±0.003	0.001±0.0006 ^a	0.007±0.0007 ^b	0.008±0.0007	0.008±0.0009 ^b	0.007±0.0006 ^b
Sol Bulbouretral Bez	0.01±0.001	0.001±0.0005 ^a	0.009±0.0008	0.001±0.0002 ^a	0.007±0.0006 ^b	0.008±0.001	0.007±0.001 ^b	0.007±0.0005 ^b
M. Levator Ani	0.278±0.028	0.067±0.012 ^a	0.212±0.013	0.053±0.010 ^a	0.210±0.014	0.226±0.031	0.214±0.015	0.192±0.008
Karaciğer	9.30±0.74	7.31±0.84 ^a	6.47±0.50	6.70±0.56 ^a	7.90±0.52 ^b	7.92±0.75 ^b	6.37±0.91	8.67±0.59 ^c
Sağ Böbrek	0.90±0.061	0.81±0.054	0.77±0.047	0.71±0.073 ^a	0.82±0.042	0.79±0.070	0.73±0.092	0.92±0.023 ^d
Sol Böbrek	0.89±0.066	0.81±0.067	0.77±0.040	0.69±0.073 ^a	0.80±0.046	0.76±0.068	0.71±0.095	0.89±0.051 ^d

a: p<0.001 sham grubuna göre; **b:** p<0.01 TP grubuna göre; **c:** p<0.001 TP grubuna göre; **d:** p<0.05 TP grubuna göre.

Tablo 3. Tüm gruplara ait serum LH ve FSH düzeyleri.

	Grup 1 (Sham) <i>n=7</i>	Grup 2 (Kastrasyon) <i>n=7</i>	Grup 3 (TP Grubu) <i>n=7</i>	Grup 4 (Flutamid) <i>n=7</i>	Grup 5 (Endosulfan) <i>n=7</i>	Grup 6 (2,4-D) <i>n=7</i>	Grup 7 (Cypermترین) <i>n=7</i>	Grup 8 (Trifluralin) <i>n=7</i>
LH (ng/mL)	4.81±0.54	86.11±34.01 ^a	4.34±0.86	46.40±7.19 ^a	5.81±1.88	8.27±2.00	19.77±9.64 ^b	29.61±10.07 ^b
FSH (ng/mL)	33.02±6.30	111.84±17.97 ^a	39.22±5.22	93.34±12.34 ^a	47.88±10.61	63.51±13.14 ^b	84.48±12.84 ^c	121.64±13.78 ^c

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

6. 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 (17, 94) bu ilgi ve araştırmanın sayısını artırmıştır.

Önceki zamanlarda sperm konsantrasyonlarında 60 milyon/ml değerleri, daha sonraları 40 milyon/ml değerleri normal olarak kabul edilirken; 2000 yılında Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 20 milyon/ml değerleri normal olarak değerlendirilmeye başlanılmıştır (123). Carlsen ve ark'nın (17) 1938, ile 1991 yılları arasında yapılan 61 çalışmayı kapsayan meta-analizinde; sperm konsantrasyonlarının 1940'larda 113 milyon/ml'den 1990'da 66 milyon/ml'ye düştüğü belirtilmiştir. Erkek fertilitesi bir ölçüde sperm sayısı ile ilişkili olduğundan, bu durumun erkek fertilitesinde de bir azalmayı yansıttığı düşünülebilir. Bu değişikliklerin biyolojik önemi, beraberinde testiküler kanser, kriptorşidizm, hipospadias gibi genitoüriner anomalilerin insidansında görülen artış ile vurgulanmış ve erkek gonadal fonksiyonu üzerine ciddi sonuçlar oluşturan faktörlerin artan etkisi ileri sürülmüştür (17).

Endokrin sistemi etkileme potansiyeline sahip kimyasal maddeler genel olarak "endokrin bozucular" (endocrine disrupters) olarak adlandırılmaktadır (88, 103). Günümüzde çok sayıda çevresel kirleticinin endokrin bozucu özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir (59). 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 üreme sistemindeki anormalliklerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir (111). Bugün, erkek üreme fonksiyon bozukluklarında kimyasal kirleticilere mesleki ve çevresel maruziyet gibi epidemiyolojik faktörler de sorgulanmaktadır.

Doğada yıkımlanmadan uzun süre kalabilen ve lipofilik özellikleri nedeniyle canlı organizmada yağ dokusunda depo edilebilen pestisitlerin de endokrin bozucu etkilere sahip olabilecekleri bildirilmiştir (27, 102). Bazı pestisitlerin biyoakümülatif özellikte olduğu ve yaygın kirlenmeye neden oldukları bilinmektedir. Son 30 yıl boyunca DDT başta olmak üzere lindan, endosulfan, aldrin, metoksiklor ve heptaklor gibi birçok pestisitün üretim ve kullanımı yasaklanmıştır (113). Buna rağmen, bu bileşiklere çevredeki kalıcılıkları nedeniyle günümüzde insan ve hayvanların çeşitli dokularında rastlanmaktadır (18). Bir tarım ülkesi olan ülkemizde de pestisitler yaygın olarak kullanılmış ve birçok tarım alanı, nehir, göl ve deniz tonlarca madde ile kirletilmiştir (66, 112). Bu nedenle ve biyoakümülyasyon faktörü de göz önüne alındığında, bu bileşiklerin halen ülkemizde maruz kalınan kimyasalların başında yer aldığı görülmektedir (28, 38). DDT ve benzeri pestisitlerin yasaklanmış olmasına rağmen, günümüzde halen stoklarda olduğu ve bilinçsiz ve/veya kaçak olarak kullanıldığı tahmin edilmektedir (27). Ülkemizde çeşitli grup (organoklorlu, organoforsfat ve pyrethroid) pestisitlerin kullanım yoğunlukları ile yıllara ve bölgelere göre dağılımı Delen ve ark. (32) tarafından sunulan raporda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Biz bu tez çalışmasında 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 ratlara uygulandığı *in vivo* bir yöntem olan Hershberger metodunu kullandık (6, 7). Buna göre; 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 (60).

Çalışmamızda beklediğimiz şekilde kastrasyon; incelenen bütün aksesuar seks organlarının (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 artmasına ve sham grubu değerlerine dönmesini sağladı ($p<0.001$). TP uygulaması sonucu aksesuar seks organ ağırlıklarında meydana gelen bu artış; kullanılan protokolün duyarlılığını doğrulamaktadır (67). Yine beklediğimiz şekilde; referans androjen (TP) ile birlikte referans antiandrojen olarak Flutamid uygulanan pozitif kontrol grubunda da tüm aksesuar seks organlarının ağırlıklarının, TP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ve kastrasyon grubu değerlerine düştüğü görüldü. Bu durum; referans anti-androjen olarak uygulanan Flutamidin anti-androjenik özelliğini ortaya koyan, literatürle uyumlu (56, 78) ve beklenen bir sonuçtur.

Çalışmamızda Flutamid uygulanan grupta serum LH ve FSH düzeylerinin sham grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmektedir ($p<0.001$). Yapılan çeşitli çalışmalarda da kuvvetli anti-androjen olan flutamidin serum LH düzeylerini artırırken, serum testosteron düzeylerinde herhangi bir değişiklik oluşmadığı görülmüştür (56, 126). Flutamid gibi AR antagonistleri, AR'ya

bağlanıp androjenlerin etkisini bloke ederek intrasellüler androjenik stimulusun azalmasına ve sonuçta androjen-bağımlı dokuların gelişiminde değişikliklere ve ağırlıklarında azalmaya yol açarlar (56, 78). İntrasellüler androjenik stimulusun azalması ise anterior hipofizden gonadotropinlerin (LH ve FSH) salınımını artırmaktadır.

Çalışmamızda uyguladığımız test kimyasallarından Endosulfan; tüm dünyada yaygın olarak kullanılan, organoklor yapısından dolayı doğada ve canlı organizmalarda birikme eğilimi gösteren geniş spektrumlu bir pestisittir (113). Endosulfan'ın östrojenik etki gösterdiği farklı *in vivo* ve *in vitro* deney modellerinde gösterilmekle birlikte (47); androjenik ve antiandrojenik özellikleri erkek hayvan modellerinde test edilmemiştir. Endosulfan östrojenik özellik göstererek erkeklerde aksesuar seks organlarının farklılaşmasını ve fonksiyonlarını etkilemektedir (115). Erişkin erkek ratlarda yapılan bir çalışmada; oral yolla ve farklı dozlarda (5, 10, 15 mg/kg) uygulanan Endosulfan'ın testis ve aksesuar seks organ ağırlıklarında azalma ile birlikte cauda epididimiste sperm sayısı ile intra-testiküler spermatid sayılarını azalttığı; sperm dansite ve motilitesini de baskıladığı gösterilmiştir (23, 95). Serum testosteron seviyesi ise ancak en yüksek doz (15 mg/kg) uygulanan ratlarda azalmıştır. Sperm motilisindeki inhibisyon, azalan androjen seviyesine atfedilmiştir (22). Bu durum sorbitol dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz, γ -glutamil transpeptidaz ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz gibi spesifik testiküler marker enzim aktivitelerindeki artış ile ilişkilendirilmiştir (95). Endosulfan ayrıca 3- β -hidroksisteroid dehidrogenaz ve 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzim aktivitelerini değiştirerek testiküler fonksiyonlarda bozukluğa yol açmakta ve testiküler androjen biyosentezini de

inhibe etmektedir (22, 53). Otuz günlük uygulama ile endosulfanın ratlarda 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 (22). Endosulfanın ayrıca plazma FSH, LH ve testosteron düzeylerini de azalttığı ve testiküler hasara yol açtığı ortaya konulmuştur (22, 95). Endosulfanın hücresel ve biyokimyasal toksisitesi açısından doz ve maruziyet süresinin önemli belirleyici olduğu belirtilmektedir (53, 95).

Fetal gonadal farklılaşma sırasında endosulfana maruziyetin ilişkili testiküler enzimler aracılığıyla spermatogenezi etkilediği; sperm sayısında azalma ile birlikte testis, epididimis ve seminal vezikül ağırlıklarında da azalmaya yol açarken, prostat ağırlıklarının ise değişmediği bildirilmiştir (97). Diğer bir çalışmada da düşük dozda (0.5 ve 1.5 mg/kg) Endosulfan'a pre- ve post-natal olarak maruz kalan ratların erkek yavrularının üreme sisteminde patolojik etkiler gözlenmediği bildirilmiştir (29). Leydig hücre kültürlerinde 1-1000 nM dozlarında uygulanan endosulfan, testosteron serbestlenmesini anlamlı şekilde etkilememiştir (74). Wilson ve ark. ise endosulfanın erkek farelerde testosteron biyotransformasyon ve klerensini artırdığını bildirmişlerdir (120). Bu çalışmada uygulanan 7.5 ve 15 mg/kg dozundaki endosulfan, p450 enzimleri aracılığı ile testosteronun hidroksilasyonunu uyarak klerensini artırmıştır. Ancak testosteron klerensindeki artış, kompanse edici mekanizmalar sayesinde, bu hormonun serum düzeylerini anlamlı şekilde değiştirmemiştir.

Çalışmamızda Endosulfan'ın seminal vezikül, prostat ve mL A ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı değişiklikler meydana getirmezken; sağ ve sol

bulbouretral bez değerlerinde TP grubuna göre anlamlı azalmaya neden olduğu görülmüştür. Çalışmamızdan elde edilen bu sonuç; endosulfanın bulbouretral bezler üzerine anti-androjenik etkisini ortaya koymaktadır. Bu etkinin sadece bulbouretral bezlerde görülüp diğer androjen-duyarlı seks organlarında bulunmaması; doku ve reseptör düzeyinde farklı etkileşimlerden kaynaklanıyor olabilir. Örneğin; mL A gelişimi testosteron, prostat gelişimi ise DHT'a bağımlı iken; seminal vezikül gelişimi ise hem testosteron hem de DHT-bağımlıdır (67). Yapılan bir çalışmada Endosulfanın plazma LH ve FSH düzeylerini azalttığı ortaya konulmuştur (95). Bizim çalışmamızda ise Endosulfanın LH ve FSH düzeylerinde hafif bir artış oluşturmakla birlikte, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Endosulfan'ın bulbouretral bez ağırlığı üzerinde tespit ettiğimiz anti-androjenik etkisi göz önüne alınırsa; LH ve FSH düzeylerinde artış beklenebilirdi. Bu durum; zayıf anti-androjenik etki gösteren Endosulfan'ın uygulanan doz veya süre içerisinde gonadotropin salınımını uyaracak düzeyde etki oluşturmamış olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Bu çalışmada etkisi araştırılacak diğer bir kimyasal madde ise sentetik bir pyrethroid insektisit olan Cypermethrin'dir. Cypermethrin'in erkek ratlarda fertilité ve reproduksiyon üzerine etkilerinin incelenmesi için yapılan bir çalışmada 12 hafta boyunca üç farklı dozda cypermethrin uygulanan erkek ratlarda epididimal ve testiküler sperm sayıları ile günlük sperm üretiminin azaldığı görülmüştür. Cypermethrin uygulamasının testis histolojisinde de; seminifer tübüllerin sayısında azalma, etrafında hemoraji alanları, aralarında bağ doku birikimi ile lümende prematür spermatidlerin bulunması gibi anomalilere yol açtığı görülmüştür. Bu ratlarda ayrıca serum testosteron, FSH ve LH düzeylerinin

azaldığı; testis, seminal vezikül ve preputial bez ağırlıklarının ise arttığı belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda cypermethrin'in erkek ratlarda üreme fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar; Cypermethrin'in testisler üzerine doğrudan etki gösterdiği ve androjen biyosentez pathway'inin etkilediği şeklinde açıklanmıştır (35).

Son zamanlarda yayınlanan bir çalışmada ise pyrethroid pestisit ve metabolitlerinin insan östrojen reseptörüne bağlanma potansiyellerinin olduğu ve dolayısıyla östrojenik aktivite gösterebilecekleri ileri sürülmüştür (73). Yapılan çeşitli *in vitro* (MCF-7 insan meme kanseri hücreleri ile) deneyler ışığında da cypermethrin ve çeşitli diğer pyrethroid insektisitlerin östrojenik etki gösterebilecekleri bildirilmiştir (55, 63). Hamster ovaryum hücreleri kullanılarak *in vitro* reporter gen assay ile 200 pestisitinin östrojen ve androjen reseptör aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada da Cypermethrin'in ER α - östrojen reseptörü agonistik aktivite göstererek, östrojenik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (64).

Chen ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; pyrethroid insektisidlerden cypermethrin, fenvalerate ve permethrin'in MCF-7 hücre proliferasyonunu, bu hücrelerde PS2 mRNA ekspresyonunu indükledikleri ve [3 H] östradiolün ER'ye bağlanmasını inhibe ederek ER-spesifik agonist yanıt oluşturdıkları ortaya konulmuştur (21). Yeni yayınlanan bir çalışmada ise CV-1 hücrelerinde AR-aracılı luciferase reporter gen assay kullanılarak cypermethrin, fenvalerate ve permethrin'in androjenik ve anti-androjenik özellik gösterip göstermedikleri araştırılmıştır. Her üç pyrethroidin de luciferase ekspresyonunu inhibe ettiği, DHT-tarafından indüklenen AR-aracılı gen transkripsiyonunu baskıladıkları

ortaya konularak; bu pestisitlerin *in vitro* olarak zayıf anti-androjenik etki gösterdikleri belirtilmiştir (104).

Çalışmamızda androjenik/anti-androjenik özellikleri araştırılacak maddelerden Trifluralin, doğada yaygın olarak kullanılan, yearaltı sularına bulaşma riski bulunan ve biyoakümülatif özelliğe sahip bir herbisittir (110, 124). Ancak bu herbisitinin insan sağlığı üzerine etkileri ile ilgili yapılan araştırmalar oldukça sınırlı sayıda olup; androjenik/anti-androjenik özelliklerini inceleyen çalışma ise mevcut değildir. Yapılan bir araştırmada Trifluralin'in dişi koyunlarda serum LH konsantrasyonlarını anlamlı şekilde azalttığı, vücut ağırlıklarında ise herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür (83).

Çalışmamızda Cypermethrin ve Trifluralin de Endsoulfan'a benzer şekilde; incelenen androjen-duyarlı aksesuar seks organlarından sadece Bulbouretral bez ağırlıklarında TP grubuna göre anlamlı azalmaya yol açtı. Bu durum; bu iki kimyasalın da anti-androjenik özellik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Anti-androjenik hormon patternine uygun şekilde (78); Cypermethrin ve Trifluralin uygulanan gruplarda serum LH ve FSH düzeylerinin TP grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmektedir. Bu durum daha önce de belirtildiği şekilde; anti-androjenlerin AR'ye bağlanarak intrasellüler androjenik stimulusu azaltmaları, androjen duyarlı doku ağırlıklarında azalmaya yol açmaları ve anterior hipofizden LH ve FSH salınımını artırmaları şeklinde açıklanan ve beklenen bir sonuçtur.

Diğer test maddemiz 2,4-D de doğada yaygın olarak kullanılan bir herbisittir. 2,4-D'nin insan ve hayvanlarda embriyotoksikite ve teratojeniteden; nöro-, immuno- ve hepato-toksikiteye kadar değişen toksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (10, 20). 2,4-D veya metaboliti 2,4-diklorofenol'ün ratlara

uygulanmasının ventral prostat, cowper bezi ve glans penis ağırlıklarında artışa yol açtığı ve sitokrom P450-aracılı testosteron metabolizmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (61). Başka bir çalışmada ise 2,4-D'nin prostat kanser hücre kültürlerinde muhtemelen AR'nin nükleusa translokasyonunu artırarak; androjen indüklü transaktivasyon ve androjenik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (62). 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 (80). Lerda ve Rizzi ise; tarımda 2,4-D spreyleyici olarak çalışan erkeklerde zaman içerisinde azospermi, nekrospermi ve teratospermi geliştiğini bildirmişlerdir (69). Hormonal etki açısından incelendiğinde ise; herbisit 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 (42).

Çalışmamızda 2,4-D'nin; uygulanan diğer test kimyasallarının aksine seminal vezikül ağırlıklarında anlamlı artışa yol açması, bu maddenin androjenik etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. 2,4-D grubuna ait hormon düzeylerinde bakıldığında ise; LH düzeylerinin %90 gibi bir oranda artmış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. FSH düzeyleri ise 2,4-D uygulanan grupta TP grubuna göre anlamlı şekilde yüksekti. 2,4-D'nin seminal vezikül ağırlığı açısından agonist, serum FSH düzeyleri açısından antagonist etki şeklinde ortaya çıkan bu farklı yanıtı; hedef dokuda

aktivite bağımlı farklılıklardan kaynaklanabilir (örn: mikst agonist/antagonist aktivite). Bu duruma; uterus üzerinde agonist, meme üzerinde antagonist etki gösteren mikst ER agonist/antagonisti tamoksifen örnek olarak verilebilir (57).

Çalışmamızda karaciğer ve böbrek ağırlıkları ele alındığında ise Endosulfan, 2,4-D ve Trifluralin'in karaciğer ağırlıklarında anlamlı artışa yol açarken; sadece Trifluralin'in böbrek ağırlıklarında anlamlı artış oluşturulduğu görüldü. Hershberger metodunda androjenik ve anti-androjenik özelliklerin değerlendirilmesinde primer sonlanma noktası androjen-duyarlı doku ağırlıklarının belirlenmesini kapsamaktadır. Karaciğer, böbrek ve adrenal bez ağırlıkları ile serum hormon düzeylerinin ölçümü ise opsiyonel sonlanma noktaları olup; androjenik/anti-androjenik etkinin belirlenmesinde değil de kimyasal aracılı endokrin etkilerin doğrulanmasında daha ileri bilgi sağlamak ve etki mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olmak amacıyla isteğe bağlı olarak değerlendirmeye alınmaktadır (56, 60). Hershberger metodu ile maddelerin androjenik/antiandrojenik özelliklerinin incelendiği çeşitli çalışmalarda da androjenik yada antiandrojenik maddelerin karaciğer, böbrek ve adrenal bez ağırlıklarında herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür (56, 60, 67). Yapılan çeşitli çalışmalarda da Cypermethrin'in karaciğer ATPaz aktivitesini azalttığı, hepatositlerde sitoplazmik hipertrofiye, nekroz ve inflamasyona yol açtığı ortaya konulmuş (37) ve önemli bir hepatotoksik pestisit olduğu belirtilmiştir (1). Yine 2,4-D'nin de nöro-, immuno- ve hepato-toksik etkilere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (10, 20). Bizim çalışmamızda çok yüksek dozları uygulanmamasına rağmen Endosulfan, 2,4-D ve Trifluralin'in karaciğer ağırlığında artışa yol açması, yine Trifluralinin böbrek ağırlığında artış

oluşturması bu maddelerin hepatotoksik veya nefrotoksik özelliklere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu dokularda histopatolojik inceleme yada serum örneklerinde çeşitli enzim tayinleri yapılmadan böyle bir sonuca varılamamaktadır.

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

7. KAYNAKLAR

1. Aldana L, Tsutsumi V, Craigmill A, Silveira MI, de Mejia EG. α -tocopherol modulates liver toxicity of the pyrethroid cypermethrin. *Toxicol Lett.* 125: 107-116.
2. Allolio B, Arlt W. (2002). DHEA treatment: myth or reality? *Trends Endocrinol Metab.* 13(7): 288-294.
3. Amaral Mendes JJ. (2002). The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem Toxicol.* 40: 781-788.
4. Anderson J. (2003). The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer. *BJU Int.* 91: 455-461.
5. Ankley GT, Johnson RD, Toth G, Fomar LC, Detenbeck NE, Bradbury SP. (1997). Development of a strategy for assessing the echological risk of endocrine disruptors. *Rev Toxicol.* 1: 231-267.
6. Ashby J, Lefevre PA. (2000). Preliminary evaluation of the major protocol variables fort he Hershberger castrated male rat assay fort he detection of androgens, antiandrogens and metabolic modulators. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31: 92-105.
7. Ashby J. (2003). The leading role and responsibility of the international scientific community in test development. *Toxicol Lett.* 140-141: 37-42.
8. 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.
9. Baker VA. (2001). Endocrine disrupters--testing strategies to assess human hazard. *Toxicol In Vitro.* 15: 413-419.
10. Barnekow DE, Hamburg AW, Puvanesarajah V, Guo M. (2000). Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in laying hens and lactating goats. *J Agr Food Chem.* 49: 156-163.

11. Berrevoets CA, Umar A, Brinkmann AO. (2002). Antiandrogens: selective androgen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol.* 198: 97-103.
12. Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev.* 24: 93-106.
13. Brinkmann AO. (2001). Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol. Cell Endocrinol.* 179: 105-109.
14. Brinkmann AO. Androgen physiology: receptor and metabolic disorders. The American Association of Clinical Endocrinologists. www.endotext.org/male/male3/male3.pdf Eriřim: 05.07.2007.
15. Brooks AN. (1998). Natural and antropogenic environmental oestrogens: The scientific basic for risk assessment; comparative physiology of the reproductive endocrine system in laboratory rodents and humans. *Pure Appl Chem.* 70: 1633-1646.
16. Burtis CA, Ashwood ER. (1999). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd edition. WB Saunders Company, USA.
17. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 305(6854): 609-613.
18. Carpenter DO. (1998). Polychlorinated biphenyls and human health. *Int J Occup Med Environ Health*, 11: 291-303.
19. Charles JM, Bond DM, Jeffries TK, Yano BL, Stott WT, Johnson KA, Cunny HC, Wilson RD, Bus JS. (1996). Chronic dietary toxicity/oncogenicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rodents. *Fundam Appl Toxicol.* 33: 166-172.
20. Charles JM. Hanley TR Jr, Wilson RD, van Ravenzwaay B, Bus JS. (2001). Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its forms. *Toxicol Sci.* 60: 121-131.

21. Chen H, Xiao J, Hu G, Zhou J, Xiao H, Wang X. (2002). Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J Toxicol Environ Health A*, 65: 1419-1435.
22. Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. (1999). Chronic effect of endosulfan on the testicular function of rat. *Asian J Androl*. 1: 203-206.
23. Choudhary N, Joshi SC. (2003). Reproductive toxicity of endosulfan in male albino rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 70: 285-289.
24. Colborn T. (2004). Commentary: setting aside tradition when dialing with endocrine disruptors. *ILAR Journal*. 45: 394-400.
25. Connor K, Ramamoorthy K, Moore M, Mustain M, Chen I, Safe S, Zacharewski T, Gillesby B, Joyeux A, Balaguer P. (1997). Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: structure-activity relationship. *Toxicol Appl Pharmacol*. 145: 111-123.
26. Curtin D, Jenkins S, Farmer N, Anderson AC, Haisenleder DJ, Rissman E, Wilson EM, Shupnik MA. (2001). Androgen suppression of GnRH-stimulated rat LHbeta gene transcription occurs through Sp1 sites in the distal GnRH-responsive promoter region. *Mol Endocrinol* 15: 1906-1917.
27. Çok İ ve Öztok U. (2003). Çevremizdeki Kimyasalların Üreme Sistemi Üzerine Etkileri. *Sağlık ve Toplum Dergisi*, 3: 9-18.
28. Çok İ, Donmez MK and Karakaya AE. (2004). Levels and trends of chlorinated pesticides in human breast milk from Ankara residents: comparison of concentrations in 1984 and 2002. *Bull Environ Contam Toxicol*, 72: 522-529.
29. Dalsenter PR, de Araujo SL, de Assis HC, Andrade AJ, Dallegrave E. (2003). Pre and postnatal exposure to endosulfan in Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*, 22: 171-5.
30. Danzo BJ. (1998). The effects of environmental hormones on reproduction. *Cell Mol Life Sci*. 54:1249-1264.

31. Daston GP, Cook JC, Kavlock RJ. Uncertainties for endocrine disrupters: our view on progress. (2003). *Toxicol Sci.* 74: 245-252.
32. Delen N, Durmuşoğlu E, Güncan A, Güngör N, Turgut C ve Burçak A. (2005). Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi, Ankara, pp. 1-21.
33. Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. (1992). Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol.* 88(1-3): 15-22.
34. Dorfman RI. (1969). Androgens and anabolic agents and Antiandrogens. In: Dorfman RI, editor. *Methods in hormone research.* vol. IIA. New York: Academic Pres; 1969; 151-249.
35. Elbetieha A, Da’as SI, Khamas W, Darmani H. (2001). Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. *Arch Environ Contam Toxicol.* 41: 522-528.
36. El-Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaiemi I. (1998). Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod.* 58: 116-123.
37. El-Toukhy MA, Girgis RS. (1993). *In vivo* and *in vitro* studies on the effect of larvin and cypermethrin on adenosine triphosphate activity of male rats. *J Environ Sci Health B.* 28: 599-619.
38. Erdogrul O, Covaci A, Kurtul N and Schepens P. (2004). Levels of organohalogenated persistent pollutants in human milk from Kahramanmaras region, Turkey. *Environ Int.* 30: 659-666.
39. 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.

40. Farag AT, Goda NF, Shaaban NA, Mansee AH. (2007). Effects of oral exposure of synthetic pyrethroid, cypermethrin on the behavior of F1-progeny in mice. *Reprod Toxicol.* 23: 560-567.
41. Gao W, Bohl CE, Dalton JT. (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev.* 105: 3352-3370.
42. Garry VF, Tarone RE, Kirsch IR, Abdallah JM, Lombardi DP, Long LK, Burroughs BL, Barr DB, Kesner JS. (2001). Biomarker correlations of urinary 2,4-D levels in foresters: genomic instability and endocrine disruption. *Environ Health Perspect.* 109: 495-500.
43. Gelbke H.P, Kayser M, Poole A. (2004). OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology.* 205: 17-25.
44. George FW, Wilson JD. (1994). Sex determination and differentiation. *The Physiology of Reproduction*. Chapter 1 (Knobil E, Neill JD), Raven Press Ltd, New York.
45. Gillatt D. (2006). Antiandrogen treatments in locally advanced prostate cancer: are they all the same? *J Cancer Res Clin Oncol.* 132 (Suppl. 1): S17-S26.
46. Gray LE Jr, Wilson V, Noriega N, Lambright C, Furr J, Stoker TE, Laws SC, Goldman J, Cooper RL, Foster PM. (2004). Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. *ILAR J.* 45: 425-437.
47. Grunfeld HT, Bonefeld-Jorgensen EC. (2004). Effect of *in vitro* estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels. *Toxicol Lett.* 51: 467-480.
48. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. WB Saunders International Edition, 1996.
49. Handelsman DJ. Androgens. *The American Association of Clinical Endocrinologists*. www.endotext.org/male/male2/maleframe2.htm. Eriřim: 05.07.2007.

50. Hershberger LG, Shipley EG, Meyer RK. (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle methods. *Proc Soc Exp Biol Med.* 83: 175-180.
51. Hiipakka RA, Liao S. (1998). Molecular mechanism of androgen action. *Trends Endocrinol Metab.* 9: 317-324.
52. Huben RP, Perrapato SD. (1991). Drug therapy of prostatic cancer. *Drugs Aging.* 1: 353-363.
53. Jaiswal A, Parihar VK, Kumar MS, Manjula SD, Krishnanand BR, Shanbhag R, Unnikrishnan MK. (2005). 5-aminosalicylic acid reverses endosulfan-induced testicular toxicity in male rats. *Mutat Res.* 585: 50-59.
54. Joshi SC, Jain GC, Lata M. (1994). Effects of ketoconazole (an imidazole antifungal agent) on the fertility and reproductive function of male mice. *Acta Eur Fertil.* 25: 55-58.
55. Kakko I, Toimela T, Tahti H. (2004). Oestradiol potentiates the effects of certain pyrethroid compounds in the MCF7 human breast carcinoma cell line. *Altern Lab Anim.* 32: 383-390.
56. Kang IH, Kim HS, Shin JH, Kim TS, Moon HJ, Kim IY, Choi KS, Kil KS, Park YI, Dong MS, Han SY. (2004). Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron and p,p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology.* 199: 145-159.
57. Kangas L. (1992). Agonistic and antagonistic effects of antiestrogens in different target organs. *Acta Oncol.* 31: 143-146.
58. Kelce WR, Lambright CR, Gray LE, Roberts KP. (1997). Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: *in vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142: 192-200.
59. Kelce WR, Wilson EM. (1997). Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J Mol Med.* 75: 198-207.

60. Kennel PF, Pallen CT, Bars GR. (2004). Evaluation of the rodent Hershberger assay using three reference endocrine disruptors (androgen and antiandrogens). *Reprod. Toxicol.* 18: 63-73.
61. Kim HJ, Kim WD, Kwon TH, Kim DH, Park YI, Dong MS. (2002). Mechanism of phenoxy compounds as an endocrine disruptor. *J Toxicol Pub Health* 18: 331-339.
62. Kim HJ, Park YI, Dong MS. (2005). Effects of 2,4-D and DCP on the DHT-induced androgenic action in human prostate cancer cells. *Toxicol Sci.* 88: 52-59.
63. Kim IY, Shin JH, Kim HS, Lee SJ, Kang IH, Kim TS, Moon HJ, Choi KS, Moon A, Han SY. (2004). Assessing estrogenic activity of pyrethroid insecticides using *in vitro* combination assays. *J Reprod Dev.* 50: 245-255.
64. Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niiyama K, Kobayashi K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect.* 112: 524-531.
65. Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R. (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J.* 26: 1306-1314.
66. Kurt PB and Ozkoc HB. (2004). A survey to determine levels of chlorinated pesticides and PCBs in mussels and seawater from the Mid-Black Sea Coast of Turkey. *Mar Pollut Bull*, 48: 1076-1083.
67. Lee BM, Koo HJ. (2007). Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates. *J Toxicol Environ Health A.* 70: 1365-1370.
68. Lee HJ, Chang C. (2003). Recent advances in androgen receptor action. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 1613-1622.
69. Lerda D, Rizzi R. (1991). Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Mutat Res.* 262: 47-50.
70. Lindzey J, Kumar MV, Grossmann M, Young C, Tindall DJ. (1994) Molecular mechanisms of androgen action. *Vitam Horm.* 49: 383-423.

71. Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Gilio B, Gandini L, Dondero F, Jannini EA, Lenzi A. (2005). Androgens and fertility. *J Endocrinol Invest.* 28: 51-55.
72. Massaad C, Entezami F, Massade L, Benahmed M, Olivennes F, Barouki R, Hamamah S. (2002). How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 100: 127-137.
73. McCarthy AR, Thomson BM, Shaw IC, Abell AD. (2006). Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. *J Environ Monit.* 8: 197-202.
74. Muroño EP, Derk RC, de Leon JH. (2001). Differential effects of octylphenol, 17beta-estradiol, endosulfan, or bisphenol A on the steroidogenic competence of cultured adult rat Leydig cells. *Reprod Toxicol*, 15: 551-60.
75. Namer M. (1988). Clinical applications of antiandrogens. *J Steroid Biochem.* 31: 719-729.
76. Nasuti C, Cantalamessa F, Daly CJ, McGrath JC. (2007). Alterations in rabbit aorta induced by types I and II pyrethroids. *Environ Toxicol Pharmacol.* 23: 250-253.
77. Neri RO. (1976). Antiandrogens. *Adv. Sex Horm Res.* 2: 233-262.
78. O'Connor JC, Frame SR, Davis LG, Cook JC. (1999). Detection of the environmental antiandrogen p,p'-DDE in CD and Long-Evans rats using a Tier 1 screening battery and a Hershberger assay. *Toxicol. Sci.* 51: 44-53.
79. O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM, Huhtaniemi I. (1998). Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology.* 139: 1141-1146.
80. Oakes DJ, Webster WS, Brown-Woodman PDC, Ritchie HE. (2002). Testicular changes induced by chronic exposure to the herbicide formulation, Tordon 75D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram) in rats. *Reprod Toxicol.* 16: 281-289.
81. Pappa A, Seferiadis K, Marselos M, Tsolas O, Messinis IE. (1999). Development and application of competitive ELISA for rat LH and FSH. *Theriogenology*, 51(5): 911-926.

82. Randall VA. (1994). Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 8: 405-431.
83. Rawlings NC, Cook SJ, Waldbillig D. (1998). Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *J Toxicol Environ Health A.* 54: 21-36.
84. Raynaud JP, Bouton MM, Moguilewsky M, Ojasoo T, Philibert D, Beck G, Labrie F, Mornon JP. (1980). Steroid hormone receptors and pharmacology. *J. Steroid Biochem.* 12: 143-157.
85. Rittmaster RS, Magor KE, Manning AP, Norman RW, Lazier CB. (1991). Differential effect of 5 α -reductase inhibition and castration on androgen-regulated gene expression in rat prostate. *Mol. Endocrinol.* 5: 1023-1029.
86. Roy AK, Chatterjee B. (1995). Androgen action. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 5(2): 157-176.
87. Safe S, Connor K, Ramamoorthy K, Gaido KK, Maness S. (1997). Human exposure to endocrine-active chemicals: hazard assessment problems. *Regul Toxicol Pharmacol.* 26: 52-58.
88. Safe S. (2002). Environmental estrogens: roles in male reproductive tract problems and in breast cancer. *Rev Environ Health.* 17: 253-262.
89. Sawaya ME, Hordinsky MK. (1993). The antiandrogens. When and how they should be used. *Dermatol Clin.* 11: 65-72.
90. Schröder FH. (1993). Cyproterone acetate--mechanism of action and clinical effectiveness in prostate cancer treatment. *Cancer.* 72(12 Suppl): 3810-3815.
91. Sciarra F, Toscano V, Concolino G, Di Silverio F. (1990). Antiandrogens: clinical applications. *J Steroid Biochem Molec. Biol.* 37: 349-362.
92. Shao TC, Kong A, Cunningham GR. (1994). Effects of 4-MAPC, a 5 α -reductase inhibitor, and cyproterone acetate on regrowth of the rat ventral prostate. *Prostate.* 24: 212-220.

93. Sharpe RM, Skakkebaek NE. (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract. *Lancet*, 341(8857): 1392-1395.
94. Sharpe RM. (2003) The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? *Int J Androl*. 26(1): 2-15.
95. 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 J Exp Biol*. 28: 953-956.
96. Singh SM, Gauthier S, Labrie F. (2000). Androgen receptor antagonists (Antiandrogens): structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem*. 7: 211-247.
97. Sinha N, Adhikari N, K Saxena D. (2001). Effect of endosulfan during fetal gonadal differentiation on spermatogenesis in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 10: 29-32.
98. Smith DF, Toft DO. (1993). Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol*. 7: 4-11.
99. So AI, Hurtado-Coll A, Gleave ME. (2003). Androgens and prostate cancer. *World J Urol*. 21: 325-337.
100. Soloway MS, Matzkin H. (1993). Antiandrogenic agents as monotherapy in advanced prostatic carcinoma. *Cancer*. 71(3 Suppl): 1083-1088.
101. Stocco DM, Clark BJ. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*. 17: 221-244.
102. Stoker TE, Parks LG, Gray LE, Cooper RL. (2000). 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. Crit Rev Toxicol*, 30: 197-252.
103. Sumpter JP. (1998). Xenoendocrine disrupters--environmental impacts. *Toxicol Lett*. 102-103: 337-342.

104. Sun H, Xu XL, Xu LC, Song L, Hong X, Chen JF, Cui LB, Wang XR. (2007). Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. *Chemosphere*. 66: 474-479.
105. Sunahara GI, Pak RC, Bellward GD. (1987). Effect of flutamide on hepatic cytosolic methyltrienolone (R1881) binding kinetics and testosterone responsive hepatic drug and steroid metabolism in the adult rat. *Biochem Pharmacol*. 36: 3571-3577.
106. Synder BW, Winneker RC, Batzold FH. (1989). Endocrine profile of WIN 49596 in the rat: a novel androgen receptor antagonist. *J Steroid Biochem*. 33: 1127-1132.
107. Şah C. (2007). Anti-aging hormon olan dehidroepiandrosteronsülfatın suçarlarda uzun süre kullanımının androjen bağımlı organlardan prostat ve testis üzerine etkileri. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ABD, Uzmanlık Tezi.
108. Tammela T. (2004). Endocrine treatment of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 92: 287-295.
109. Tindall DJ, Chang CH, Lobl TJ, Cunningham GR. (1984). Androgen antagonists in androgen target tissues. *Pharmac Ther*. 24: 367-400.
110. Tiryaki O, Yucel U, Sezen G. (2004). Biodegradation of trifluralin in Harran soil. *J Environ Sci Health B*. 39: 747-756.
111. Toppari J, Haavisto AM, Alanen M. (2002). Changes in male reproductive health and effects of endocrine disrupters in Scandinavian countries. *Cad Saude Publica*, 18: 413-420.
112. Turgut C. (2003). The contamination with organochlorine pesticides and heavy metals in surface water in Kucuk Menderes River in Turkey, 2000-2002. *Environ Int*, 29: 29-32.
113. Vallack HW, Bakker DJ, Brandt E et al. (1998). Controlling persistent organic pollutants- what's next? *Environ Toxicol Pharmacol*, 6: 143-175.
114. Vogelzang NJ, Kennealey GT. (1992). Recent developments in endocrine treatment of prostate cancer. *Cancer*. 70 (4 Suppl): 966-976.

115. Wade MG, Desaulniers D, Leingartner K, Foster WG. (1997). Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes *in vitro* and *in vivo*. *Reprod Toxicol*, 11: 791-798.
116. Wakeling AE, Furr BJA, Glen AT, Hughes LR. (1981). Receptor binding and biological activity of steroidal and nonsteroidal antiandrogens. *J. Steroid Biochem.* 15: 355-359.
117. Waring RH, Harris RM. (2005). Endocrine disrupters: a human risk? *Mol Cell Endocrinol.* 244: 2-9.
118. Wilson JD, Griffin JE, Russel DW. (1993). Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev.* 14: 577-593.
119. Wilson JD. (2001). The role of 5alpha-reduction in steroid hormone physiology. *Reprod Fertil Dev.* 13(7-8): 673-678.
120. Wilson VS ve LeBlanc GA. (1998). Endosulfan elevates testosterone biotransformation and clearance in CD-1 mice. *Toxicol and Applied Pharmacol*, 148: 158-168.
121. Wong C, Kelce WR, Sar M, Wilson EM. (1995). Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem.* 270: 19998-20003.
122. Wong HY, Burghoorn JA, Van Leeuwen M, De Ruiter PE, Schippers E, Blok LJ, Li KW, Dekker HL, De Jong L, Trapman J, Grootegoed JA, Brinkmann AO. (2004). Phosphorylation of androgen receptor isoforms. *Biochem J.* 383: 267-276.
123. World Health Organization (2000). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
124. Xue N, Xu X, Jin Z. (2005). Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. *Chemosphere.* 61: 1594-1606.

125. Yalvaç M. (2005). Doktora Tezi. Göksu deltası sucul ekosisteminde endosülfan ve methamidophos pestisitlerinin kalıntı düzeylerinin araştırılması.Mersin Üniversitesi, Çevre Mühendisliği AD, 2005.
126. Yamada T, Kunimatsu T, Sako H. (2000). Comparative evaluation of a 5-day Hershberger assay utilizing mature male rats and pubertal male assay for detection of flutamide's antiandrogenic activity. *Toxicol Sci.* 53: 289-296.
127. Yamada T, Sunami O, Kunimatsu T, Kamita Y, Okuno Y, Seki T, Nakatsuka I, Matsuo M. (2001). Dissection and weighing of accessory sex glands after formalin fixation, and a 5-day assay using young mature rats are reliable and feasible in the Hershberger assay. *Toxicology.* 162: 103-119.
128. Yamasaki K, Sawaki M, Takatsuki M. (2001). Strain sensitivity differences in the Hershberger assay. *Reprod. Toxicol.* 15: 437-440.
129. Yoshida S, Yamada H, Sugawara I, Takeda K. (1998) Effect of dibromochloropropane (DBCP) on the hormone receptors of the male rat reproductive system. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62(3): 479-483.

8. ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Bingöl’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Tekirdağ’da tamamladım. 1995 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde yüksek öğrenimime başladım ve 2001 yılında bu fakülteden mezun oldum. Askerlik görevimi takiben, 2003 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım. Evli ve bir çocuk babasıyım.