

Boğa sperması motilite parametreleri üzerine dietilheksil fitalatın etkisi

Ruhi KABAKÇI¹, Ömer VARIŞLI², Abdulkadir KAYA², İktan BAŞTAN³, Seher ŞİMŞEK³

¹Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale/TÜRKİYE

²Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Kırıkkale/TÜRKİYE

³Türkiye Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Ankara/TÜRKİYE

Anahtar Kelimeler:

boğa
CASA
DEHP
motilite
sperma

Key Words:

bull
CASA
DEHP
motility
sperm

Geliş Tarihi: 23.10.2019
Kabul Tarihi: 16.12.2019
Yayın Tarihi: 31.12.2019
Makale Kodu: 637406

Sorumlu Yazar:
R. KABAKÇI
(ruhikabakci@gmail.com)

ORCID:

R. KABAKÇI: 0000-0001-9131-0933
Ö. VARIŞLI: 0000-0002-2777-3586
A. KAYA: 0000-0001-7903-4358
İ. BAŞTAN: 0000-0001-8155-1960
S. ŞİMŞEK: 0000-0002-5468-0844

Bu çalışmanın sonuçları, 13-14 Aralık 2018 tarihlerinde Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde gerçekleştirilen "Akdeniz Veteriner Hekimliği Kongresi-MEDVET2018" bilimsel toplantısında sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

ÖZ

Dietilheksil fitalat, sert yapılı plastiklere esneklik katmak amacıyla dünya genelinde yaygın bir şekilde kullanılan, çevresel toksik bir kimyasaldır. İçerisinde bulunduğu ve gevşek bağlarla tutunduğu ürünlerden kolayca ayrılarak çevreye yayılan dietilheksil fitalat sindirim, solunum ve deri teması yollarıyla insan ve hayvanların vücuduna geçmekte ve çeşitli toksik etkilere neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, dietilheksil fitalatın boğa sperması üzerine *in vitro* toksik etkisini, bilgisayarlı sperm analiz sistemi ile araştırmaktır. Boğalardan suni vajen ile elde edilen spermalar, fosfat tampon solüsyonu ile 50×10^6 /ml spermatozoa olacak şekilde sulandırıldı ve dimetil sülfoksitte çözödürülen dietilheksil fitalatın 0, 1, 10, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dozlarına maruz bırakılarak 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle 37 °C su banyosu içerisinde inkübe edildi. Her inkübasyon süresinin sonunda kontrol ve deneme gruplarından alınan sperma örneklerinin motilite parametreleri analiz edildi. Yapılan değerlendirme sonucunda, dietilheksil fitalatın çalışmada kullanılan düşük dozlarında, doğrudan spermatozoa üzerine toksik etkisi tespit edilemezken, bu etkinin yüksek konsantrasyonlarda zamanla ve doza bağlı olarak ortaya çıktığı belirlendi. Özellikle 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dietilheksil fitalat maruziyetinin spermatozoon hareketlilik parametrelerinden, ortalama yol hızı ve doğrusal hızı 2. saatten itibaren, total motilite ve progresif motiliteyi ise 3. saatten itibaren kontrol gruplarına göre önemli derecede azalttığı belirlendi ($p < 0.05$). *In vitro* olarak elde edilen sonuçlar dietilheksil fitalatın erkek üreme organlarında toksik birikimine bağlı olarak boğalarda spermatogenezisi etkiliye bileceğini yönündedir.

Effect of diethylhexyl phthalate on sperm motility parameters in bull

ABSTRACT

Diethylhexyl Phthalate is an environmentally toxic chemical commonly used in worldwide to make rigid plastics flexible. Due to its loosely bonded to plastic products, diethylhexyl phthalate easily leaches into the environment. After humans and animals exposure to diethylhexyl phthalate via digestion, respiration and skin contact, it causes various toxic effects in the body. The aim of this study was to investigate the *in vitro* toxic effect of diethylhexyl phthalate on bull semen motility via a computerized sperm analysis system. Semen collected from the bulls with artificial vagina were diluted with phosphate buffer solution to 50×10^6 /ml spermatozoa and incubated in a 37°C water bath for 1, 2, 3 and 4 h by exposing to 0, 1, 10, 100, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doses of diethylhexyl phthalate dissolved in dimethyl sulfoxide. At the end of each incubation period, the motility parameters of semen samples taken from control and experimental groups were analyzed. As a result of the evaluation, the toxic effects of diethylhexyl phthalate on the spermatozoa were not determined at low doses used in this study, but this effect occurred at high concentrations by the time. It was observed that exposure of diethylhexyl phthalate particularly at the doses of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ significantly decreased the velocity of average path and linear velocity parameters after 2 h, total motility and progressive motility parameters after 3 h compared to control groups ($p < 0.05$). The *in vitro* results suggest that toxic accumulation of diethylhexyl phthalate in male reproductive organs can affect fertility in bovine.

GİRİŞ

Fitalatlar, polivinil klorür türü sert yapılı plastiklere esneklik katmak için, yaygın bir şekilde kullanılan sentetik kimyasallardır (1). Dietilheksil fitalat (DEHP), plastikleştirici olarak kullanılan fitalatların en yaygın bulunan alt sınıfıdır (2). Dünya genelinde yılda 3 milyon tondan fazla üretilmekte olan fitalatlar arasında, başta plastik ürünler olmak üzere oyuncak, kozmetik ve ilaç sanayi gibi çeşitli ürünlerde değişik oranlarda kullanılan

DEHP, yıllık üretim hacminin yaklaşık 2 milyon ton olmasıyla, en yaygın bulunan fitalat sınıfını oluşturmaktadır (3). DEHP 2010 yılında da %54'lük pazar payı ile en yüksek üretim hacmine sahip kimyasal olmuştur (4). Masa örtüleri, mobilya ve yer döşemeleri, duş perdeleri, bahçe hortumları, yağmurluk, plastik bebek ve oyuncaklar, ayakkabı, tıbbi tüpler ve yüzme havuzları da DEHP'in kullanıldığı ürünler arasında yer almaktadır (5). Bu tür plastikler ürünler %1 ila %40 oranında DEHP içerebilmektedir (6). Dietilheksil fitalat, ayrıca, kayganlaştırıcı-

lar, yapıştırıcılar ve köpük gidericilerde de sıklıkla kullanılmakla beraber, parfüm ve saç spreylere gibi kozmetik ürünlerin, ahşap kaplamaların ve pestisit türü ilaçların yapısına çözücü ve matris (kalıp) olarak katılmaktadır (7).

Plastiklere kovalent olmayan gevşek bağlarla bağlanan ftalatlar, bu tür ürünlerden güneş ışınları, mikroorganizmalar ve çeşitli kimyasal süreçlerle ayrılarak hava, toprak ve tarım arazileri, doğal ve atık su kaynakları ve tortular (sedimentler) gibi çevresel ortamlara geçmektedir/sızmaktadır (5). Farklı sığır çiftliklerinde yapılan bir çalışmada, çiftlik etrafında bulunan toprak, su, gübre ve silajda değişen oranlarda DEHP tespit edildiği, ve bunların sindirim yoluyla hayvanların vücuduna alındığı belirtilmiştir (8). İnsan ve çiftlik hayvanları, günlük hayatları içerisinde sindirim, solunum ve deri teması yoluyla potansiyel olarak bu bileşiklere maruz kalmaktadırlar (9). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kan, idrar ve anne sütü gibi bazı vücut sıvılarında DEHP tespit edilmiştir (10). Sığırlardan alınan benzer vücut sıvıları ve doku örneklerinde de DEHP bulunduğu bildirilmiştir (11).

Daha önce yapılan bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla, DEHP ve onun birincil metaboliti olan monoetilheksil ftalat (MEHP) başta üreme fizyolojisi olmak üzere kalp, karaciğer, böbrek beyin gibi hayati organlarda da çeşitli hasarlara neden olduğu ortaya konmuştur (12-15).

Yeni doğan ve yetişkin erkek fareler ile yapılan diğer bazı çalışmalarda ise DEHP'in testis ağırlığını, spermatogonya ve pürifer spermatosit gibi spermatozoanın öncü hücrelerini ve sertoli hücresi gibi spermatogenezde rol alan destek hücrelerinin de sayısını azalttığı tespit edilmiş. Ayrıca spermatozoon canlılığını, motilite ve progresif motilitesini, yoğunluğunu azalttığı saptanmıştır (16-19). DEHP'in balıklarda spermatozoonun motilite ve hızını (20), insanlarda spermatozoon canlılık ve motilitesini doz ve zamana bağlı olarak düşürdüğü rapor edilmiştir (16). Ayrıca, DEHP'in insan veya fare testis hücre hatlarında sitotoksik etkisi de saptanmıştır (21). Erkek çocuklarda görülen kriptorşidizm ve hipospadiasis ile yetişkin erkeklerde görülen testis kanseri ve spermatozoon kalitesindeki düşüş gibi önemli üreme bozuklukları da DEHP maruziyeti ile ilişkilendirilmektedir (22).

Yapılan literatür taramasında DEHP'in insan, balık ve laboratuvar hayvanlarında spermatozoon üzerindeki toksik etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla araştırıldığı, ancak çiftlik etrafında bulunan toprak, su, gübre ve silajlarda değişen oranlarda DEHP tespit edilmesine rağmen (8) boğa sperması üzerine etkileriyle ilgili bilgilerin oldukça sınırlı olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla yapılan bu çalışmada, *in vitro* DEHP maruziyetinin boğa spermatozoon hareketliliği üzerine etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma Aldrich (USA)'den tedarik edilmiştir. Çalışmada, Kırıkkale Üniversitesi Yerel Etik Kurulu onaylı (Karar No: 16/10) proje ile Ankara Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü'ndeki sağlıklı ve üreme problemi olmayan Esmer ırkı boğalardan (n=5), suni vajen kullanılarak cam tüplere toplanan

spermatozoonların bir kısmı kullanıldı. Yapılan ilk muayenede canlılık ve hareketlilik oranı %75 ve üzerinde olan spermatozoonlar çalışmaya dâhil edildi. Spermatozoonların sayısı otomatik hücre sayım cihazı (Accucell Photometer, IVM Technologies) ile belirlendi ve önceden $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'ye ısıtılmış PBS ile $50\times 10^6/\text{ml}$ oranında yine aynı cihaz yardımıyla sulandırıldı. Daha sonra spermatozoonlar 3'er ml olacak şekilde tüplere bölündü. DEHP dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözdürülerek 1 mg/ml stok solüsyonu hazırlandı ve ardından spermatozoonlar, 3 ml'lik tüplerde DEHP'in 1, 10, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarına maruz bırakılarak $37\pm 1^\circ\text{C}$ ısı ve %5 CO_2 + %95 O_2 atmosfer ortamında 1, 2, 3, veya 4 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol grubu PBS içerisinde sulandırıldı, pozitif kontrol için %0.1 DMSO ilave edilerek ikinci bir grup oluşturuldu. Deney grupları oluşturulduktan hemen sonra (0. saat) ve inkübasyon periyotlarının (1-4. saat) sonunda her bir deneme grubundaki spermatozoonların hareketliliği bilgisayarlı sperma analiz sistemi (CASA) kullanılarak incelendi. Bu amaçla her gruptan alınan 20 μl ($4\times 5 \mu\text{l}$) spermatozoon örneği, CASA cihazının (IVOS I, IVM Technologies) önceden ısıtılmış tek kullanımlık özel hücre sayım lamininin kamarasına koyuldu ve her alanda en az 200 hücre olmak üzere, 6 farklı mikroskop alanından otomatik olarak spermatozoon hareketlilik analizleri yapıldı. Bu sistem ile spermatozoonlar, total motilite (% - MOT) ve progresif motilite (% - PMOT) oranları, ortalama rota hızı ($\mu\text{m}/\text{sn}$ - VAP), düz-çizgi hızı ($\mu\text{m}/\text{sn}$ - VSL), eğri-çizgi hızı ($\mu\text{m}/\text{sn}$ - VCL), başın lateral yer değiştirme amplitüdü, yalpalama (μm - ALH), çapraz kesişme frekansı (kesişme/sn - BCF) gibi başın yüzme hareketleri, linearite [(VSL/VCL x 100) - LIN] ve straightness [(VSL/VAP x 100) STR] parametreleri bakımından değerlendirildi. Bu parametrelerden VAP, VSL, STR ve LIN spermatozoonların ileri hareketleri hakkında bilgi verirken, VCL, ALH ve BCF spermatozoonların kuvveti hakkında bilgi vermektedir (21).

Tüm parametreler için elde edilen veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi Graphpad Prism 6.0 paket programı ile gerçekleştirildi. Bu değerler arasındaki farklılığın hesaplanmasında tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA), farkın anlamlı olduğu gruplar arasındaki önemliliğin kontrolü için ise Tukey testi kullanıldı.

BULGULAR

In vitro ortamda değişik dozlardaki DEHP (1-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)'a 1-4 saat süreyle maruz bırakılan boğa spermatozoonunun motilite parametreleri Tablo 1-6 da verilmiştir. Elde edilen verilere göre, DEHP'in düşük dozlarda ($\leq 250 \mu\text{g}/\text{ml}$) spermatozoon hareketliliği üzerine anlamlı bir etkisi gözlenmedi ($p>0.05$). En yüksek doz olan 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik dozun ise 2. saatten itibaren VAP (Tablo 1) ve VSL'yi (Tablo 2), 3. saatten itibaren de MOT (Tablo 3) ve PMOT'yi (Tablo 4) kontrol grubuna göre doz ve zaman bağlı olarak önemli derecede düşürdüğü belirlendi ($p<0.05$). VCL parametresi sadece en yüksek doz grubunda 1. saatten itibaren sayısal olarak azaldığı gözlemlendi (Tablo 5) ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). CASA cihazıyla elde edilen diğer spermatozoon hareketlilik parametrelerinden ALH, BCF, STR ve LIN değerlerinde ise gerek sayısal gerekse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 6).

Tablo 1. Dietilheksil ftalatın ortalama rota hızı üzerine etkisi.
Table 1. Effect of diethylhexyl phthalate on average route velocity.

GRUP	VAP (Ortalama Rota Hızı) $\mu\text{m/s}\Omega$				
	0. Saat	1. Saat	2. Saat	3. Saat	4. Saat
Kontrol-PBS	119.5 \pm 9.6	135.3 \pm 4.5	127.9 \pm 2.4	129.5 \pm 4.0	127.2 \pm 1.4
Kontrol-DMSO	126.7 \pm 5.1	133.8 \pm 3.2	131.3 \pm 1.8	130.5 \pm 3.1	128.4 \pm 3.1
1 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	121.6 \pm 6.8	127.8 \pm 7.6	136.7 \pm 1.4	121.1 \pm 4.6	128.7 \pm 3.1
10 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	118.9 \pm 5.7	120.1 \pm 5.9	119.2 \pm 2.3	108.9 \pm 2.1	126.7 \pm 6.4
100 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	126.6 \pm 7.0	128.0 \pm 9.2	122.4 \pm 6.7	127.4 \pm 6.8	123.9 \pm 4.2
250 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	122.8 \pm 4.5	129.2 \pm 4.3	121.3 \pm 6.6	117.7 \pm 7.0	119.9 \pm 2.7
500 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	121.3 \pm 7.2	119.2 \pm 6.4	102.3 \pm 0.9 #	80.1 \pm 3.8 *##	72.1 \pm 2.3 **###

Veriler ortalama değer \pm SEM olarak verilmiştir. * sütunlar arası, # satırlar arası istatistiki farkı göstermektedir. * p<0.05, ** p<0.01, # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001.
Data are given as mean \pm SEM. * shows the statistical difference between columns, # shows the statistical difference between rows. * p<0.05, ** p<0.01, # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001.

Tablo 2. Dietilheksil ftalatın düz çizgi hız üzerine etkisi.
Table 2. Effect of diethylhexyl phthalate on straight line velocity

GRUP	VSL (Düz Çizgi Hızı) $\mu\text{m/s}\Omega$				
	0. Saat	1. Saat	2. Saat	3. Saat	4. Saat
Kontrol-PBS	96.4 \pm 1.8	105.8 \pm 1.7	102.9 \pm 3.0	101.5 \pm 2.2	91.7 \pm 3.5
Kontrol-DMSO	101.3 \pm 1.1	116.0 \pm 8.2	105.0 \pm 3.9	98.0 \pm 1.7	97.7 \pm 0.9
1 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	94.8 \pm 2.3	98.1 \pm 1.7	106.7 \pm 4.5	90.0 \pm 4.9	98.1 \pm 3.5
10 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	90.8 \pm 2.4	95.5 \pm 1.5	75.4 \pm 3.6	71.3 \pm 5.3	76.2 \pm 5.7
100 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	78.7 \pm 21.7	105.1 \pm 1.8	94.4 \pm 1.4	93.4 \pm 3.1	83.6 \pm 7.1
250 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	94.0 \pm 8.6	104.5 \pm 2.6	92.2 \pm 1.4	90.5 \pm 0.5	88.7 \pm 2.3
500 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	96.1 \pm 0.5	74.3 \pm 9.2	63.7 \pm 9.9 *#	60.6 \pm 2.9 *##	58.9 \pm 4.4 *###

Veriler ortalama değer \pm SEM olarak verilmiştir. * sütunlar arası, # satırlar arası istatistiki farkı göstermektedir. * p<0.05, # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001.
Data are given as mean \pm SEM. * shows the statistical difference between columns, # shows the statistical difference between rows. * p<0.05, # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001.

Tablo 3. Dietilheksil ftalatın total motilite üzerine etkisi.
Table 3. Effect of diethylhexyl phthalate on total motility

GRUP	MOT (Motilite) %				
	0. Saat	1. Saat	2. Saat	3. Saat	4. Saat
Kontrol-PBS	83.0 \pm 1.8	88.0 \pm 1.8	84.3 \pm 0.5	87.0 \pm 0.7	83.6 \pm 2.3
Kontrol-DMSO	79.9 \pm 4.2	83.5 \pm 0.7	81.6 \pm 1.4	83.2 \pm 1.5	82.0 \pm 1.3
1 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	86.9 \pm 1.1	90.5 \pm 1.6	88.3 \pm 0.5	85.4 \pm 1.8	82.4 \pm 2.2
10 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	89.9 \pm 2.2	82.5 \pm 1.7	82.2 \pm 1.9	80.8 \pm 1.1	85.8 \pm 1.3
100 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	72.3 \pm 10.0	86.6 \pm 0.7	86.8 \pm 0.8	80.6 \pm 4.9	82.8 \pm 3.2
250 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	77.5 \pm 3.8	83.0 \pm 0.5	88.0 \pm 0.8	84.4 \pm 1.4	82.4 \pm 1.4
500 $\mu\text{g/ml}$ DEHP	83.3 \pm 1.5	86.3 \pm 1.6	75.0 \pm 2.5	70.8 \pm 0.5*##	63.3 \pm 2.4***###

Veriler ortalama değer \pm SEM olarak verilmiştir. * sütunlar arası, # satırlar arası istatistiki farkı göstermektedir. ** p<0.01, *** p<0.001, ## p<0.01, ### p<0.001.
Data are given as mean \pm SEM. * shows the statistical difference between columns, # shows the statistical difference between rows. ** p<0.01, *** p<0.001, ## p<0.01, ### p<0.001.

TARTIŞMA

Günlük hayattaki birçok plastik bazlı üründe yoğun bir şekilde kullanılan DEHP, içerisinde bulunduğu ürünlerden kolayca ayrılarak doğaya yayılmaktadır (5). Hava, su ve toprağı kontamine eden DEHP buradan sindirim, solunum ve direkt temas yoluyla canlıların vücuduna geçmekte ve biyobirikime uğramaktadır. Nitekim sığırların süt ve yağ dokusu gibi bazı dokularında DEHP tespit edildiği bildirilmiştir (23, 24). Daha önce yapılan

çalışmalarda, birçok doku ve organı etkileyen bu kimyasalın üreme dokuları üzerine de toksik etkisinin olduğu rapor edilmiştir (16-18, 21). Nitekim *in vivo* olarak değişik dozlarda uygulanan DEHP'in ratlarda (21), farelerde (17, 18) ve boğalarda (26) testis dokusunda hasara neden olduğu ve testis ağırlığını düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca DEHP maruziyetinin spermatozoon üretim merkezi olan seminifer tubulleri hasara uğrattığı (19), spermatozoon depolama ve taşıma bölümleri olan epididimis ve vas deferens hücreleri üzerine sitotoksik etkiye neden

Tablo 4. Dietilheksil fitalatın progresif motilite üzerine etkisi.
Table 4. Effect of diethylhexyl phthalate on progressive motility.

PMOT (Progresif Motilite) %					
GRUP	0. Saat	1. Saat	2. Saat	3. Saat	4. Saat
Kontrol-PBS	53.7 ± 4.7	56.0 ± 5.5	58.3 ± 4.1	58.2 ± 3.2	54.0 ± 0.9
Kontrol-DMSO	49.2 ± 5.8	59.7 ± 5.5	57.9 ± 5.5	51.8 ± 4.1	51.4 ± 1.4
1 µg/ml DEHP	52.8 ± 5.3	58.4 ± 6.6	60.0 ± 6.3	55.0 ± 2.3	52.6 ± 4.0
10 µg/ml DEHP	54.8 ± 5.2	56.7 ± 4.6	54.8 ± 2.2	50.2 ± 1.6	55.4 ± 2.5
100 µg/ml DEHP	53.0 ± 7.9	57.5 ± 5.4	55.5 ± 4.1	48.2 ± 2.9	46.4 ± 1.7
250 µg/ml DEHP	53.4 ± 5.6	57.2 ± 6.9	55.3 ± 5.1	56.1 ± 5.6	44.0 ± 2.0
500 µg/ml DEHP	50.3 ± 2.9	46.5 ± 0.5	48.5 ± 1.3	32.2 ± 0.1*#	29.3 ± 1.9 **#

Veriler ortalama değer ± SEM olarak verilmiştir. * sütunlar arası, # satırlar arası istatistikî farkı göstermektedir. *p<0.05, **p<0.01, #p<0.05.

Data are given as mean ± SEM. * shows the statistical difference between columns, # shows the statistical difference between rows. * p <0.05, ** p <0.01, # p <0.05.

Tablo 5. Dietilheksil Fitalatın eğri-çizgi hızı üzerine etkisi.
Table 5. Effect of diethylhexyl phthalate on curve-line velocity

VCL (Eğri-Çizgi Hızı) µm/sn					
GRUP	0. Saat	1. Saat	2. Saat	3. Saat	4. Saat
Kontrol-PBS	195.6 ± 18.2	239.3 ± 16.4	218.4 ± 11.6	226.2 ± 15.3	228.2 ± 6.6
Kontrol-DMSO	209.3 ± 19.3	215.9 ± 13.6	227.0 ± 9.1	233.9 ± 8.2	231.0 ± 8.6
1 µg/ml DEHP	209.9 ± 21.9	218.7 ± 24.0	234.4 ± 10.0	214.0 ± 12.0	228.9 ± 8.0
10 µg/ml DEHP	206.5 ± 17.5	208.3 ± 18.5	176.3 ± 20.1	167.7 ± 13.8	197.8 ± 25.5
100 µg/ml DEHP	200.2 ± 35.8	228.9 ± 21.6	215.6 ± 17.0	219.2 ± 21.5	212.6 ± 20.3
250 µg/ml DEHP	205.3 ± 17.5	218.7 ± 16.1	172.2 ± 32.4	206.1 ± 17.7	218.4 ± 4.7
500 µg/ml DEHP	197.3 ± 32.7	185.4 ± 28.0	174.0 ± 12.3	147.7 ± 7.0	148.2 ± 12.3

Veriler ortalama değer ± SEM olarak verilmiştir, p>0.05.

Data are given as mean ± SEM. p <0.05.

Tablo 6. Dietilheksil Fitalatın yalpalama (ALH), çapraz keşişme frekansı (BCF), ortalama rotanın doğrusallığı (STR) ve eğri-çizgi rotanın doğrusallığı (LIN) üzerine etkisi.
Table 6. Effect of diethylhexyl phthalate on amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross-frequency (BCF), linearity of the average route (STR) and linearity of the curve-line route (LIN).

GRUP	ALH (Yalpalama) µm		BCF (Çapraz keşişme adet/sn)		STR (Stragthnes)		LIN (Linearite)	
	1. Saat	4. Saat	1. Saat	4. Saat	1. Saat	4. Saat	1. Saat	4. Saat
Kontrol-PBS	8.7 ± 0.8	9.2 ± 0.3	26.0 ± 1.5	21.0 ± 1.1	76.7 ± 2.9	70.2 ± 3.8	46.8 ± 4.0	40.2 ± 2.9
Kontrol-DMSO	9.0 ± 0.8	9.4 ± 0.3	26.8 ± 1.2	22.4 ± 0.7	79.9 ± 4.0	75.4 ± 1.2	47.9 ± 4.3	42.8 ± 1.2
1 µg/ml DEHP	8.4 ± 1.0	9.2 ± 0.4	26.1 ± 1.7	22.6 ± 0.7	76.0 ± 3.9	75.2 ± 2.0	45.9 ± 3.9	43.4 ± 2.0
10 µg/ml DEHP	8.2 ± 0.6	8.5 ± 0.7	23.5 ± 0.8	21.1 ± 0.8	78.9 ± 3.4	75.6 ± 1.1	46.6 ± 3.5	42.8 ± 1.0
100 µg/ml DEHP	8.7 ± 0.8	9.2 ± 0.3	26.9 ± 2.2	18.6 ± 0.9	77.8 ± 4.2	71.2 ± 2.0	47.1 ± 4.1	40.0 ± 1.3
250 µg/ml DEHP	8.3 ± 0.7	9.3 ± 0.2	25.4 ± 1.6	21.0 ± 1.0	79.9 ± 4.4	73.3 ± 2.7	48.7 ± 4.1	39.6 ± 1.6
500 µg/ml DEHP	8.0 ± 0.7	7.6 ± 0.4	21.9 ± 0.3	22.0 ± 0.8	71.8 ± 0.8	72.9 ± 1.3	40.1 ± 0.4	39.8 ± 0.8

Veriler ortalama değer ±SEM olarak verilmiştir, p>0.05.

Data are given as mean ± SEM. p <0.05.

olduğu rapor edilmiştir (26). Laboratuvar hayvanları çevresel kirlenmelerin olumsuz etkilerini ortaya koymak için araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılsa da, ekonomik değerleri ve ihtiyaç duyulan üretkenliklerinden dolayı, çevresel kirlenmelerin etkisinin çiftlik hayvanlarında da çalışılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmamızda, DEHP'in

boğa spermatozoonlarındaki MOT, PMOT, VAP ve VSL gibi spermatozoon kalitesiyle ilgili önemli parametreleri etkilediği ortaya konmuştur.

Dietilheksil fitalatın testis dokusu üzerine yaptığı olumsuz etkilerinin yanı sıra, direkt spermatozoon kalitesi üzerine de etkile-

ri rapor edilmiştir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada 5.73– 57.3 µg/ml DEHP'in doz ve zamana bağlı olarak spermatozoon canlılık ve hareketliliğini düşürdüğü rapor edilmiştir (25). Araştırmacılar çalışmalarında, kullanılan tüm DEHP dozlarının inkübasyonun 12. saatinden itibaren spermatozoonun motilitesini, 96. saatten itibaren ise canlılığını düşürdüğünü belirtmişlerdir, mevcut çalışmada ise sadece en yüksek doz (500 µg/ml) 2. saatten itibaren spermatozoon kalite parametrelerini önemli derecede etkilemiştir. Glombik ve ark. (2014) farelere uyguladıkları 30 mg/kg DEHP'in spermatozoon hareketliliğini önemli oranda düşürdüğünü; (17) 40 µg/kg DEHP'in farelerde spermatozoon canlılığı ve motilitesini düşerken, anormal spermatozoon sayısında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Bununla beraber 14 gün boyunca 2 g/kg/gün DEHP'e maruz kalan farelerde, spermatozoon canlılık ve motilitesinin yanı sıra, PMOT ve serum testosteron düzeyinin de önemli oranda düştüğü belirtilmiştir (18). Benzer şekilde ratlarda da 4 haftalık oral DEHP uygulaması sperm CASA parametrelerinden MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP, LIN ve STR'ı önemli oranda düşürmüştür (21). Daha önce yapılan bu çalışmaların bulguları bizim bulgularımızla da uyumludur. Nitekim çalışmamızdan elde edilen bulgular DEHP'in 500 µg/ml'lik dozunun 2. saatten itibaren VAP ve VSL'yi; 3. saatten itibaren de MOT ve PMOT'yi kontrol grubuna göre doz ve zaman bağlı olarak önemli derecede düşürdüğü belirlendi. VCL parametresinin ise en yüksek doz grubunda 1. saatten itibaren sayısal olarak azaldığı ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi.

Fertilizasyonun başarıya ulaşmasında spermatozoonun hareketliliği ve sahip olduğu organellerin fonksiyonlarını yeterli düzeyde yerine getireyor olması oldukça önemlidir. Özellikle ATP üretim merkezi olması bakımından mitokondri spermatozoon hareketliliği ile doğrudan ilişkilidir (27). Mitokondrinin birçok toksik madde için hedef yapı olduğu bildirilmektedir (28). Bragadin ve ark. (1999) toksik bir bileşik olan nonilfenolün düşük dozlarda bile mitokondride ATP üretimini baskıladığını ortaya koymuşlardır. Dibütil fitalat ve DEHP gibi fitalat esterlerinin de mitokondri ile plazma membran bütünlüğünü bozduğu ve DNA hasarına neden olduğu belirtilmektedir (19, 30, 31). Dietilheksil fitalatın spermatozoon motilitesi üzerindeki etkileriyle ilgili olası bir diğer mekanizma ise oksidatif stres kaynaklı olabilir. Çünkü DEHP'in testis dokusu dahil çeşitli hücre tiplerinde oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (12, 13, 32, 33). Her ne kadar düşük düzeydeki reaktif oksijen türleri spermatozoon hareketliliği ve kapasitasyonu için gerekli olsa da, artan reaktif oksijen türleri ve membran lipid peroksidasyon miktarı spermatozoon hareketliliğinde düşüşe hatta ilerleyen süreçte hücre ölümüne neden olabilmektedir (19). Ancak DEHP'in boğa spermatozoonu üzerindeki etkilerinin plazma membran bütünlüğü, mitokondri fonksiyonu, DNA hasarı ve apoptozis açısından incelenerek hücre altı moleküler düzeyde de ortaya konması gerekmektedir.

Yurdakök ve ark. (2019) DEHP dahil farklı fitalat türevleriyle boğa spermatozoonu üzerine yaptıkları bir araştırmada, fitalatların spermatozoon üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ve total spermatozoon hareketliliğini düşürdüğü belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada; CASA cihazı kullanılsa da, semen

kalite belirteci olarak yalnızca total spermatozoon hareketliliği (MOT) değerlendirmeye alınmış ve 1, 100 ve 200 µg/ml DEHP'in boğa spermatozoon hareketliliğini 0. saatten itibaren azalttığı, 10 µg/ml dozunun ise hareketliliği artırdığı bildirilmiştir (34). Spermatozoon hareketleri hakkında daha hassas bilgiler veren CASA cihazı kullanılarak yapılan mevcut çalışmada ise, yalnızca 500 µg/ml DEHP'in MOT, PMOT, VAP, VSL ($p<0.05$) ve VCL parametrelerini ($p>0.05$) etkilediği saptanmıştır. *İn vitro* ortamda gerçekleştirilen deneyler oldukça hassas ve kompleks çalışmalardır. Dolayısıyla, Lukáčová ve ark. (2015) DEHP'in boğa spermatozoon motilitesini daha düşük dozlarda düşürdüğünü ortaya koymaları, spermatozoon elde edilen boğa ırkının veya kullanılan cihazların ve analiz yöntemlerinin farklılığından kaynaklanabilir (35, 36). Özellikle canlıların fizyolojik birçok fonksiyonlarını belirleyen ve etkileyen genetik yapının spermatozoon kalitesi, hareketliliği veya dayanıklılığı üzerine de etkili olduğu bilinmektedir (35). Ayrıca bu çalışmanın bulgularına göre 500 µg/ml DEHP'in; Lukáčová ve ark. (2015) çalışmasına göre ise 1, 100 ve 200 µg/ml DEHP'in boğa spermatozoon motilitesini düşürdüğü tespit edilirken, 10 µg/ml DEHP'in spermatozoon hareketliliğini artırdığı yönündeki bulgular DEHP'in boğa spermatozoonu üzerindeki etkileriyle ilgili şüpheler uyandırmaktadır. Dolayısıyla bu konuda yapılacak daha ileri ve detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Çıkar Çatışmaları

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

KAYNAKLAR

1. Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Gericke C, Grote K, Golombiewski A, et al. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology*. 2006;228(1):85-97.
2. Hannon PR, Flaws JA. The effects of phthalates on the ovary. *Front Endocrinol*. 2015;6:8.
3. NTP-CERHR. NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP). NIH Publication; 2006. Report No.: 06-4476 Contract No.: 06-4476.
4. Ceresana. Plasticizers – Study: Market, Analysis, Trends | Ceresana 2016 [updated 2016. Available from: <http://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/plasticizers/>.
5. ATSDR. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Atlanta: Agency for Toxic Substances & Disease Registry; 2002 [updated 2002. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/TF.aspx?id=377&tid=65>.
6. Lorz PM, Towae FK, Enke W, Jäckh R, Bhargava N, Hillesheim W. Phthalic acid and derivatives. In: Wiley VCH, editor. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 6th ed: Wiley Online Library; 2007.

7. NTP. Report on Carcinogens. National Toxicology Program, Research Triangle Park; 1998.
8. Fierens T, Van Holderbeke M, Willems H, De Henauw S, Sioen I. Phthalates in Belgian cow's milk and the role of feed and other contamination pathways at farm level. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(8):2945-53.
9. Grossman D, Kalo D, Gendelman M, Roth Z. Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Cell Biol Toxicol.* 2012;28(6):383-96.
10. Hines EP, Calafat AM, Silva MJ, Mendola P, Fenton SE. Concentrations of phthalate metabolites in milk, urine, saliva, and Serum of lactating North Carolina women. *Environ Health Perspect.* 2009;117(1):86-92.
11. Kalo D, Hadas R, Furman O, Ben-Ari J, Maor Y, Patterson DG, et al. Carryover Effects of Acute DEHP Exposure on Ovarian Function and Oocyte Developmental Competence in Lactating Cows. *PLoS One.* 2015;10(7):1-25.
12. Erkekoglu P, Giray BK, Kızılgün M, Rachidi W, Hininger-Favier I, Roussel A-M, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced renal oxidative stress in rats and protective effect of selenium. *Toxicol Mech Method.* 2012;22(6):415-23.
13. Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray BK, Rachidi W, Kızılgün M, Hininger-Favier I, et al. The effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on rat liver in relation to selenium status. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;95(1):64-77.
14. Posnack NG, Swift LM, Kay MW, Lee NH, Sarvazyan N. Phthalate exposure changes the metabolic profile of cardiac muscle cells. *Environ Health Perspect.* 2012;120(9):1243.
15. Aung KH, Win-Shwe TT, Kanaya M, Takano H, Tsukahara S. Involvement of hemeoxygenase-1 in di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis of Neuro-2a cells. *J Toxicol Sci.* 2014;39(2):217-29.
16. Pant N, Pant A, Shukla M, Mathur N, Gupta Y, Saxena D. Environmental and experimental exposure of phthalate esters: the toxicological consequence on human sperm. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30(6):507-14.
17. Zhang GL, Zhang XF, Feng YM, Li L, Huynh E, Sun XF, et al. Exposure to bisphenol A results in a decline in mouse spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 2013;25(6):847-59.
18. Bahrami N, Goudarzi M, Hosseinzadeh A, Sabbagh S, Reiter RJ, Mehrzadi S. Evaluating the protective effects of melatonin on di (2-ethylhexyl) phthalate-induced testicular injury in adult mice. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:515-23.
19. Glombik K, Basta-Kaim A, Sikora-Polaczek M, Kubera M, Starowicz G, Styrna J. Curcumin influences semen quality parameters and reverses the di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular damage in mice. *J Pharmacological Reports.* 2014;66(5):782-7.
20. Golshan M, Hatef A, Socha M, Milla S, Butts IA, Carnevali O, et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate disrupts pituitary and testicular hormonal functions to reduce sperm quality in mature goldfish. *Aquat Toxicol.* 2015;163:16-26.
21. Kwack SJ, Lee B-M. Comparative cytotoxicity and sperm motility using a computer-aided sperm analysis system (CASA) for isomers of phthalic acid, a common final metabolite of phthalates. *J Toxicol Env Heal A.* 2015;78(16):1038-50.
22. Virtanen H, Rajpert-De Meyts E, Main K, Skakkebaek N, Toppari J. Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;207(2):501-5.
23. Jarošová A. Phthalic acid esters (PAEs) in the food chain. *J Czech J Food Sci.* 2006;24:223-31.
24. Krejčíková M, Jarošová A. Phthalate in cow milk depending on the method of milking. *J Medelnet.* 2013:592-6.
25. Pant J, Ranjan P, Deshpande SB. Bisphenol A decreases atrial contractility involving NO-dependent G-cyclase signaling pathway. *J Appl Toxicol.* 2011;31(7):698-702.
26. Yurdakok-Dikmen B, Stelletta C, Tekin K, Kuzukiran O, Daskin A, Filazi A. Effects of phthalates on bovine primary testicular culture and spermatozoa. *Cytotechnology.* 2019:1-13.
27. Wassarman PM. Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol.* 2005;204(2):388-91.
28. Lukac N, Lukacova J, Pinto B, Knazicka Z, Tvrdá E, Massanyi P. The effect of nonylphenol on the motility and viability of bovine spermatozoa in vitro. *J Environ Sci Health A.* 2013;48(8):973-9.
29. Bragadin M, Perin G, Iero A, Manente S, Rizzoli V, Scutari G. An in vitro study on the toxic effects of nonylphenols (NP) in mitochondria. *Chemosphere.* 1999;38(9):1997-2001.
30. Wilson VS, Lambright C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G, et al. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol Lett.* 2004;146(3):207-15.
31. Yuh IS, Cheong HT, Kim JT, Park IC, Park CK, Yang BK. Effects of Endocrine Disruptors (NP, DBP and BPA) on Sperm Characteristics and Development of IVF Embryos in Pig. *J Anim Sci Technol.* 2013;55(4):237-47.
32. Erkekoglu P, Rachidi W, Yuzugullu OG, Giray B, Favier A, Ozturk M, et al. Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di (2-ethylhexyl)-

- phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;248(1):52-62.
33. Abdel-Kawi SH, Hashem KS, Abd-Allah S. Mechanism of diethylhexylphthalate (DEHP) induced testicular damage and of grape seed extract-induced protection in the rat. *Food Chem Toxicol.* 2016;90:64-75.
34. Lukáčová J, Jambor T, Knazická Z, Tvrdá E, Lukác N. Bis (2-Ethylhexyl) Phtalate Affects Spermatozoa Motility During Short-Term In Vitro Cultivation. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences.* 2015;4:73.
35. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology.* 2016;85(1):47-64.
36. Mortimer D, Mortimer ST. Computer-aided sperm analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. In: Carrell DT, Aston KI, editors. *Spermatogenesis. Methods in Molecular Biology.* 1st ed: Humana Press, Totowa, NJ; 2013. p. 77-87.