



ISSN 0125 - 429 X

# MAJALAH ANDROLOGI INDONESIA

*The Journal of The Indonesian Society of Andrology*

|     |        |       |           |                   |
|-----|--------|-------|-----------|-------------------|
| MAI | No. 34 | Th. 7 | Juni 2010 | ISSN 0125 - 429 X |
|-----|--------|-------|-----------|-------------------|

- *Majalah Ilmiah tentang Andrologi di Indonesia*
- *Media Komunikasi Perkumpulan Andrologi Indonesia (PANDI) dan PERSANDI*
- *Terbit 4 kali setahun, Maret, Juni, September dan Desember*

**SUSUNAN DEWAN REDAKSI  
MAJALAH ANDROLOGI INDONESIA**

**MAJALAH ANDROLOGI INDONESIA,  
NO. 34, JUNI 2010**

**Pelindung : Ketua PP-PANDI**  
Dr. Indra G Mansur, DHES., SpAnd

**Pimpinan Redaksi.**  
Prof. Dr. K.M. Arsyad, DABK, SpAnd

**Redaksi Ahli/ Mitra Bestari :**  
Prof. Dr. MK Tadjudin, SpAnd  
Prof. DR. Dr. FX Arif Adimoelja, MSc., SpAnd  
Prof. DR. Dr. Nukman Moelok, SpAnd  
Prof. DR. Dr. J.A. Pangkahila, SpAnd  
DR. Oentoeng Soeradi  
Prof. DR. Dr. OS Tendean, SpAnd  
Dr. Aueky Hinting, Ph.D., SpAnd  
Prof. DR. Dr. Susilo Wibowo, MSc, SpAnd  
Prof. DR. Dr. Wahyuning Ramelan, SpAnd

**Redaksi Pelaksana :**  
Dr. N. Fauziah, M.Kes  
Sri Nita, SSI, MS

**Koresponden :**  
Dr. Kamajaya, MSc.  
PANDI Cabang Medan  
Dr. H. Abdullah Wali Nazution, DABK, SpAnd,  
PANDI Cabang Padang

Dr. Siti Hildani Thaib, MKes  
PANDI Cabang Palembang

Dr. Zulkarnain Sidi,  
PANDI Cabang Bandung

Dr. Indra G Mansur, DHES, PhD, SpAnd,  
PANDI Cabang Jakarta

Prof. DR. Dr. Susilo Wibowo, MSc, SpAnd  
PANDI Cabang Semarang

Dr. Dicky Moh. Rizal MKes  
PANDI Cabang Yogyakarta

Dr. Hudi Winarso, SpAnd,  
PANDI Cabang Surabaya

Prof. Dr. I Gusti Aman, SpAnd  
PANDI Cabang Denpasar

Dr. Eddy Karundeng, Sp.And,  
PANDI Cabang Manado

Dr. Wardihan Sinrang, MSc,  
PANDI Cabang Makassar

SK. PP/PANDI  
Nomor : SK-01/PP-PANDI/VII/2005  
10 Juni 2005

**MAJALAH ANDROLOGI INDONESIA,  
NO. 34, JUNI 2010**

**DAFTAR ISI**

|   |      |
|---|------|
| 1. Daftar Isi .....   | i    |
| 2. Dnri Redaksi .....   | ii   |
| 3. Artikel .....  | iii  |
| 3.1. Tinjauan Biomedik Terjadinya Disfungsi Ereksi Pada Pria Lansia<br>Kiagus M. Arsyad, Siti Hildani Thaib .....   | 1332 |
| 3.2. Pengaruh Lingkungan Terhadap Fungsi Reproduksi Pria<br>Taufiq RN .....   | 1327 |
| 4. Cuplikan   |      |
| 4.1. Prevalence of and risk factors for androgen deficiency in middle-aged men in Hong Kong<br>Samuel Yeung Shan Wong <sup>1,*</sup> Dicken C.C Chanb,<br>Athena Hong <sup>2</sup> , Jean Wooa, <sup>4</sup> .....  | 1339 |
| 4.2. Long-term safety and effectiveness of sildenafil I citrate in men with erectile dysfunction<br>James G McMurray <sup>1</sup> , Robert A Feldman <sup>2</sup> , Stephen M Auerbach <sup>3</sup> , Herb DeRiesthal <sup>4</sup> , Neal Wilson <sup>5</sup> , On behalf of the Multicenter Study Group <sup>6</sup> ..... | 1349 |
| 5. Lain-lain  |      |
| 5.1. Laporan Organisasi .....   | 1359 |
| 5.2. Informasi Kegiatan Ilmiah .....  | 1360 |
| 5.3. Petunjuk Bagi Penyumbang Artikel .....   | 1361 |
| 5.4. Laporan Pendanaan Majalah Andrologi Indonesia .....  | 1363 |
| 5.5. Formulir Pendaftaran Anggota PANDI .....   | 1364 |

**Sekretariat :**

Poniran

**Alamat Redaksi / Administrasi**  
Bagian Biologi Kedokteran dan Andrologi Fakultas Kedokteran  
Universitas Sriwijaya  
Jln. Dr. Muhammad Ali Komplek RSMH Km. 3,5 Palembang 30126.  
Telp. 0711-352342 Fax. 0711-373438.

**Alamat Rekening Majalah Andrologi Indonesia**  
Bank BCA Kantor Cabang Pembantu Kenten  
Jl. AKBP Cek Agus, Palembang 30114  
Paspur BCA No : 151.0133.095  
a/n. Dr. KHM. Arsyad, DABK, SpAnd  
Surat Izin Terbit : ISSN : 0126-429 X

## PENGARUH LINGKUNGAN TERHADAP FUNGSI REPRODUKSI PRIA

Taufiq RN

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang

### Abstrak

Implementasi iptek, selain memberi dampak pada peningkatan kesejahteraan manusia, juga menyumbangkan berbagai bahan buangan berbahaya termasuk environmental endocrine disruptors (EED). Peningkatan konsentrasi EED melebihi nilai ambang batas tentu sangat menurunkan kualitas lingkungan yang berpengaruh terhadap kesehatan secara umum atau secara khusus pada fungsi reproduksi pria. EED meliputi pestisida, detergent, logam berat, plasticizer, dan berbagai metabolit yang berasal dari tanaman.

Pengaruh EED terhadap fungsi reproduksi pria dapat mengakibatkan infertilitas dan kelainan alat reproduksi. Pengaruh tersebut dilakukan melalui pengacauan aktivitas hormon dan kerusakan berbagai sel dalam testis. Kekacauan hormon berlangsung melalui 3 mekanisme: 1. Bersifat agonist atau antagonist; 2. Mengacaukan produksi, transport, metabolisme, dan sekresi hormon; 3. Mengacaukan fungsi reseptor hormon. Berbagai studi pada tikus jantan menunjukkan bahwa toksikan pestisida mampu mengacaukan perkembangan seksual dan onset pubertas melalui penghambatan sintesis dan aktivitas androgen. Limbah pembuangan yang berasal dari penggemukan ternak terbukti mengandung 17  $\beta$ -trenbolone yang bersifat antiandrogenik. Selain bersifat antiandrogenik pemaparan EED pada tikus jantan pada peripubertal terbukti dapat mengakibatkan perlambatan maturasi pubertas, mengurangi kelenjar seks aksesori dan pertumbuhan epididimis. EED juga terbukti menghambat spermatogenesis melalui perusakan blood testis barrier dan menyebabkan kerusakan berbagai sel seperti sel germinal, sel Leydig, sel peritubuler, bahkan sel Sertoli.

**Kata Kunci:** EED, Anti androgen, Infertilitas

### Pendahuluan

Interaksi antara manusia dengan lingkungan hidup di mana mereka tinggal, merupakan proses yang alami. Untuk mempertahankan kehidupan manusia memerlukan berbagai daya dukung yang berasal dari lingkungan seperti udara, air, makanan, papan, sandang, dan berbagai kebutuhan lain. Namun interaksi antara manusia dengan lingkungan tidak selalu memberikan keuntungan, tetapi terkadang bahkan mendatangkan kerugian. Hal ini disebabkan oleh udara yang dihirup, air yang

diminum, dan makanan yang disantap setiap hari, telah terkontaminasi oleh berbagai bahan kimia. Sekumpulan bahan kimia kontaminan seperti pestisida, detergent, logam berat, plasticizer, dan berbagai metabolit yang berasal dari tanaman berperan sebagai pengacau hormon. Oleh karena itu disebut *environmental endocrine disruptors* (EED). Bukti menunjukkan bahwa EED telah mencemari banyak specimen lingkungan, termasuk udara, air, tanah, endapan, bahkan makanan laut dengan kisaran konsentrasi antara  $10^0 - 10^1$  mg/L (mg/kg). Bukti tersebut menunjukkan bahwa EED, telah tersebar di



berbagai tempat di lingkungan sekitar manusia, bahkan diduga kuat telah mengkontaminasi tubuh manusia secara terus menerus.<sup>1</sup>

Implementasi iptek, selain memberi dampak pada peningkatan kesejahteraan manusia, juga menyumbangkan berbagai bahan buangan berbahaya termasuk EED. Peningkatan konsentrasi EED melebihi nilai ambang batas tentu sangat menurunkan kualitas lingkungan yang berpengaruh terhadap kesehatan secara umum atau secara khusus pada fungsi reproduksi pria. Perubahan kualitas lingkungan akibat peningkatan EED yang berlangsung secara cepat, merupakan ancaman bagi umat manusia. Hal ini disebabkan oleh kerusakan berbagai sel dalam Jaringan testis yang menjadi sasaran EED seperti sel peritubuler, sel germinal, sel Sertoli, dan sel Leydig yang berperan dalam pembentukan sperma (spermatogenesis) dan pembentukan hormon steroid (steroidogenesis). Steroidogenesis dilakukan oleh sel Leydig, sedangkan spermatogenesis dilakukan melalui interaksi antara sel spermatogonia, sel sertoli, sel Leydig, Follicle Stimulating Hormon (FSH) dan Luteinizing Hormon (LH) yang berlangsung dalam kontrol gonadotropin releasing hormon (GnRH). Interaksi berbagai sel, proses, dan hormon tersebut dikenal sebagai poros hypothalamus, hipofisis, dan testis.<sup>2,3</sup> Konsekuensi dari gangguan poros tersebut adalah kelainan alat reproduksi internal atau eksternal, penurunan kesuburan, dan bahkan penuaan pria secara dini.

Namun bagaimana dan seberapa besar pengaruh EED terhadap kelainan alat reproduksi pria, penurunan kesuburan, dan bahkan penuaan pria secara dini. Di bawah ini akan dibahas tentang fungsi testis dalam steroidogenesis, spermatogenesis, dan pembentukan alat reproduksi sehingga berpengaruh terhadap fungsi reproduksi (infertilitas), dan penuaan dini pada pria.

## Fungsi Testis

### 1. Steroidogenesis

Seperti diuraikan di atas bahwa salah satu peran penting testis adalah steroidogenesis. Steroidogenesis diperankan oleh sel Leydig yang terletak dalam compartemen interstitial testis dan pertama kali digambarkan oleh Frans Leydig pada th 1850. Sel Leydig terdiri dua generasi, yaitu sel Leydig fetal (SLF) dan sel Leydig dewasa (SLD).<sup>1</sup> SLF dibentuk dari sel Leydig stem sel (SSL) pada saat gestasi dengan tujuan memproduksi androgen untuk maskulinisasi embrio pria. Bersama dengan *relaxin like factor* berfungsi mengatur penurunan testis transabdominal. Testis kemudian berkembang yang diikuti oleh perkembangan SLF sehingga menjadi matur. Perkembangan SLF mencapai puncak kemampuan untuk membentuk testosterone (Te) pada saat sebelum lahir, yang pada saat itu sekresi Te merupakan peristiwa penting untuk perkembangan alat kelamin sekunder bayi pria. Beberapa saat sesudah lahir SLF mengalami involusi, sehingga kontribusi SLF terhadap sekresi Te dapat diabaikan.

Sesudah lahir SLD berkembang dari SSL melalui transisi dari sel Leydig progenitor (SLP) dan sel Leydig immatur (SLI). SLP bersifat sementara dan mampu memperbanyak diri sampai pada jumlah yang dibutuhkan. SLP juga mempunyai sifat seperti stem sel sehingga mampu mempertahankan jumlah selnya dengan *self-renewing divisions*. Namun demikian SLP tetap mempunyai perbedaan dengan stem sel, yaitu terletak pada kemampuan mitosisnya yang rendah dan membentuk sel progenitor dalam jumlah yang terbatas. SLP juga mampu mengekspresikan mRNA dan protein yang berhubungan dengan fungsi steroidogenesis (CYP11A1, 3 $\beta$ HSD, 17 $\alpha$ HSD/17-20 HL.

5 $\alpha$  reductase), reseptor LH, dan menghasilkan androsteron dan androgen sebagai produk akhir.<sup>4</sup> SLP kemudian menjalani transisi menuju SLI dan SLD. SLI mempunyai lebih banyak retikulo endothelial halus (REH), lebih banyak cytoplasmic lipid droplet, dan berbagai enzim terutama enzim yang berperan dalam sintesis androgen. SLI kemudian mengalami transisi menuju SLD. Secara morfologi SLD ditandai oleh lebih banyak REH, lipid droplet, dan enzim steroidogenesis. Dibanding dengan SLP dan SLI, SLD merupakan populasi sel Leydig yang paling dominan.

SLD berkembang dari sel precursor masenchym (SSL) berlangsung di bawah pengaruh luteinizing hormone (LH), insulin growth factor 1 (IGF 1), transforming growth factor (TGF  $\alpha$ ;  $\beta$ ), interleukin (IL)1, dan fibroblast growth factor (FGF).<sup>2,5</sup> Dalam kehidupan fetal perkembangan SLF seperti diuraikan di atas, dan juga sel Sertoli tidak tergantung pada gonadotropin, sedangkan perkembangan SLD pada saat pubertas sangat bergantung pada gonadotropin. Bukti menunjukkan bahwa gonadotropin disekresi secara nyata pada saat pubertas.<sup>6</sup> (Nieslah) Bukti lain juga memberi gambaran bahwa pria dengan chromosome 46XY yang mengalami inaktivasi reseptor LH akibat mutasi, menyebabkan sel Leydig mengalami hipoplasia, bahkan agenesis.<sup>7</sup> Studi ini membuktikan bahwa LH mempunyai peran yang sangat vital dalam perkembangan sel Leydig pada saat pubertas. Selain itu, selama perkembangan sel Leydig dari SLP, SLI, sampai SLD juga terjadi ekspresi gen. Hasil riset dengan menggunakan metode analisis cDNA array menunjukkan bahwa terdapat 1176 gen yang terekspresi selama perkembangan sel Leydig. Ekspresi gen tersebut menggambarkan 24 kelompok fungsi gen yang terdiri dari apoptosis dan protein siklus sel, regulator ekstraseluler, heat shock,

protein signaling intraseluler, enzim metabolisme, oncogen, transporter, dan factor transkripsi. Dari 1176 gen tersebut, 513 teridentifikasi pada SLP, 423 teridentifikasi pada SLI, dan 581 teridentifikasi pada SLD.<sup>8</sup> Dibanding SLP, gen yang mengkode mRNA Rcl, suatu gen sasaran dari c myc yang jumlahnya berlimpah pada SLP, menurun 4 kali lipat pada SLD. Di sisi lain konsentrasi gen yang mengkode mRNA yang berhubungan dengan kapasitas steroidogenesis meningkat 2 kali lipat pada SLD. Gen yang dimaksud adalah gen yang mengkode biosintesis Te seperti CYP17, 3 $\beta$ HSDI, CYP11A1. Bukti tersebut menunjukkan bahwa SLD mempunyai fungsi penting dan utama dalam steroidogenesis.

Sel Leydig, dalam rangka steroidogenesis mensintesis Te, DHT, dan estriol dari kolesterol yang diambil dari darah atau dari sintesis intrasel secara denovo dari asetil Co.A atau kolesterol. Te disintesis dalam jumlah besar, sedangkan DHT dan estriol disintesis dalam jumlah sedikit. Sebanyak 3 – 10 mg Te (95%) disekresi setiap hari, sedangkan sebanyak 500  $\mu$ g Te disekresi oleh kelenjar adrenal secara langsung atau oleh konversi androstenedion menjadi Te. Sel Leydig juga mensekresi dehidrotestosteron (DHT) sebanyak 70  $\mu$ g perhari, sedangkan sisanya berasal dari konversi Te menjadi DHT oleh enzim 5  $\alpha$  reductase. Dikenal ada dua tipe enzim 5  $\alpha$  reductase, yaitu tipe 1 dan tipe 2. Tipe 1 dikode oleh chromosome 5p15 dan terdapat pada jaringan nongenital. Sedangkan tipe 2 dikode oleh chromosome 2p23, terdapat pada prostat dan jaringan seksual lain. Selain Te dan DHT, sel Leydig juga mensekresi estradiol secara langsung sebanyak 7  $\mu$ g, sedangkan 17  $\mu$ g berasal dari konversi Te menjadi estriol 17  $\beta$  oleh CYP19 aromatase di jaringan perifer, dan 22  $\mu$ g berasal dari reduksi estron oleh 17  $\beta$  hidroksteroide



dehidrogenase. Biosintesis Te dari kolesterol seperti disebut di atas dapat melalui dua lintasan. Lintasan pertama melalui "5 dan lintasan kedua melalui "4. Di dalam testis manusia lintasan "5 lebih dominan dan terlibat dalam pemecahan rantai samping pregnenolon, reduksi group 17 keto, dan oksidasi cincin A. Sementara lintasan "4 oksidasi cincin A mendahului pemecahan rantai samping dan reduksi group 17 keto.<sup>7,9</sup> Te adalah androgen utama yang beredar dalam sirkulasi darah pria, di samping dehidroepiandrosteron (DHEA) dan androstenedion yang merupakan androgen lemah.

Pengaturan sekresi Te dilakukan oleh mekanisme umpan balik dan stimulasi yang berjalan dalam poros hipotalamus, hipofisis, dan testis. Te disekresi secara pulsatil, diurnal, dan menurut ritme sirkadian. Konsentrasi Te tertinggi pada saat sehabis bangun tidur pagi, dan terendah pada sore dan malam hari. Sebagian besar Te yang berada dalam sirkulasi terikat oleh SHBG dengan afinitas yang tinggi dan terikat oleh albumin dengan afinitas yang rendah. Afinitas ikatan Te dan DHT terhadap SHBG 4 kali lipat lebih kuat dibanding ikatannya terhadap albumin. Akibat ikatan tersebut, hanya tinggal sekitar 0.5% - 3% Te yang tidak terikat. Te pada pria terutama diikat oleh albumin (50% - 68%), sedangkan yang terikat oleh SHBG jauh lebih kecil (30% - 45%). Te pada wanita 70% diikat oleh SHBG dan 25% diikat oleh albumin. Mengacu pada uraian tersebut maka bioavailabilitas Te adalah Te yang tidak terikat ditambah Te yang terikat oleh albumin. Selama ini para pakar berpendapat bahwa Te yang mempunyai efek biologis adalah Te bebas.<sup>10</sup> Pendapat tersebut didasarkan pada fenomena bahwa Te adalah lipofilik, sehingga dengan mudah masuk ke dalam sel secara difusi. Sementara ikatan antara Te dengan albumin akan lepas dalam berbagai konsentrasi dan

menjadi bioavailabilitas Te pada saat kompleks ikatan tersebut sampai pada kapiler.<sup>11</sup> Hipotesis ini menjadi tidak pasti ketika Sakiyama dkk mampu membuktikan bahwa androgen yang terikat oleh albumin dan SHBG adalah representasi mayoritas bioavailabilitas androgen dalam sirkulasi yang ditujukan pada testis dan prostat. Bukti menunjukkan bahwa megalin, yang merupakan salah satu anggota dari family reseptor low density lipoprotein terlihat mampu memfasilitasi endositosis SHBG yang mengikat Te melalui lubang endositotic.<sup>12</sup> Bukti tersebut diperkuat oleh studi lain yang menunjukkan bahwa binatang yang mengalami defisiensi megalin mengalami resistensi terhadap sebagian aksi androgen.<sup>13</sup>

Biosintesis dan sekresi berbagai hormon tersebut oleh sel Leydig sangat dipengaruhi oleh LH. LH adalah hormon glikoprotein yang diproduksi oleh hipofisis anterior setelah mendapat rangsangan dari GnRH. Baik LH maupun GnRH adalah hormon yang termasuk dalam katagori hydrophilic, oleh karena itu mempunyai reseptor di permukaan sel target. Untuk meneruskan signalnya, kedua hormon tersebut menggunakan second massanger (SM) yang berbeda. GnRH menggunakan SM  $Ca^{++}$  dan fosfatidil inositol, sementara LH menggunakan SM cAMP. Setelah kedua hormon tersebut masing-masing berikatan dengan reseptor pada sel target, maka baik GnRH maupun LH menyebabkan perubahan konformasional. Perubahan konformasional akibat pengaruh GnRH mengakibatkan peningkatan aktivitas protein G, fosfolipase C, diasilgliserol, inositol, proteinkinase C, dan peningkatan  $Ca^{++}$ . Di sisi lain perubahan konformasional akibat pengaruh LH menyebabkan peningkatan aktivitas protein G, cAMP, dan proteinkinase A. Baik GnRH maupun LH, meskipun menggunakan SM yang berbeda, namun keduanya berakhir

pada pembentukan fosfoprotein yang mempunyai efek fisiologis.<sup>14</sup>

Khusus untuk LH selain mampu meningkatkan aktivitas berbagai protein seperti tersebut di atas, untuk meningkatkan biosintesis Te, LH juga mempunyai tempat pengikat utama pada rantai samping enzim CYP11A1 yang berperan mengkonversi kolesterol menjadi pregnenolon.<sup>7,9</sup> Ketersediaan kolesterol dan pengaturan biosintesis Te tidak dapat terwujud tanpa kehadiran protein *steroidogenesis acut regulatory* (STAR), yang berfungsi sebagai transporter atau penyedia kolesterol untuk CYP11A1 yang terletak pada membran dalam mitokondria.<sup>7,9</sup> Hal ini terbukti bahwa protein mitokondria yang buruk mempunyai implikasi pada pengaturan biosintesis Te pada sel Leydig yang buruk pula. Terkait dengan penyediaan kolesterol pada mitokondria, ada informasi menarik yang menyebutkan bahwa, reseptor benzodiazepine perifer diduga kuat bertindak sebagai protein pengikat kolesterol dalam memediasi transport kolesterol. Dugaan tersebut didasarkan pada bukti bahwa reseptor benzodiazepine perifer berada dalam konsentrasi tinggi pada membran luar mitokondria.<sup>7</sup> Mengacu pada informasi tersebut maka reseptor benzodiazepine perifer juga dimasukkan ke dalam family STAR. Berdasarkan pada uraian di atas, maka biosintesis Te memerlukan ketersediaan kolesterol, protein STAR, keutuhan poros hypothalamus, hypofisis, dan sel leydig testis, beserta berbagai reseptor dalam jumlah dan ukuran yang memadai.

## **2. Spermatogenesis**

Spermatogenesis adalah proses pembentukan spermatozoa dari spermatogonia dalam tubulus seminiferus yang berlangsung melalui tiga tahap. Bermula dari

replikasi spermatogonia, yang diikuti oleh miosis, dan spermiogenesis.<sup>15</sup> Replikasi spermatogonia ditandai oleh pembelahan mitosis untuk membuat spermatogonia bertambah banyak. Terdapat tiga type spermatogonia pada fase ini yaitu tipe A gelap, tipe A pucat, dan tipe B. Dalam keadaan normal spermatogonia type A gelap tidak menjalani proliferasi, dan berfungsi sebagai stem sel. Stem sel tersebut akan mengalami proliferasi ketika terjadi kerusakan atau pengurangan sel spermatogonia secara bermakna oleh berbagai sebab. Di sisi lain spermatogonia tipe A pucat mengalami diferensiasi menjadi tipe B. Spermatogonia tipe B kemudian mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi spermatosit primer dalam fase miosis preleptoten yang secara aktif membentuk DNA. Dalam fase kedua, spermatosit primer yang diploid mengalami pembelahan miosis. Pembelahan miosis terdiri dari dua pembelahan secara berturut-turut dari spermatosit primer yang diikuti oleh hanya satu duplikasi kromosom. Akhir dari pembelahan miosis adalah pembentukan empat spermatid yang mempunyai kromosom haploid. Fase akhir dari spermatogenesis adalah spermiogenesis, yang ditandai oleh perubahan dan perkembangan struktur spermatid. Spermatid yang merupakan sel bundar kemudian mengalami pemanjangan menjadi spermatozoa setelah menyelesaikan fase spermiogenesis. Selama spermiogenesis spermatid mengalami kondensasi kromatin, pembentukan struktur nucleus sel, pembentukan flagellum, dan ekspulsi sebagian besar sitoplasma. Selain itu pada fase spermiogenesis 85% histon dari nucleus diganti dengan protamin yang memungkinkan pengemasan DNA secara ketat, sehingga tidak mudah diserang oleh oksidan. Penggantian histon oleh protamin membutuhkan pemecahan sementara spermatozoa yang diinduksi oleh enzim



topoisomerase II dan akan ditutup kembali oleh enzim yang sama. Kelainan pada pengemasan DNA akibat defisiensi protamin dapat menyebabkan DNA rentan dari serangan oksidatif sehingga DNA mengalami kerusakan.<sup>16</sup>

Secara umum spermiogenesis dibagi menjadi 4 fase yaitu: fase golgi, cap, acrosomal, dan maturasi.<sup>2</sup> Fase golgi ditandai oleh kemunculan gelembung acrosom dan kesimetrisan ukuran craniocaudal. Sedangkan fase cap ditandai oleh pemanjangan spermatid dan perkembangan acrosom yang meliputi separoh sampai duapertiga bagian cranial spermatid. Dalam fase acrosomal nucleus sel mengalami kondensasi dan sel mengalami pemanjangan. Sebagian besar histon hilang selama kondensasi dan transkripsi gen menurun. Chromatin nucleus menjadi terkondensasi secara ekstrim, sehingga menggambarkan secara tidak langsung bahwa protein yang diperlukan untuk spermiogenesis sudah harus ditranskripsikan sebelumnya. Selain itu flagellum yang merupakan kompleks aksonema yang terdiri dari dua singlet dalam dan 9 mikrotubulus luar ganda, matang pada fase acrosomal ini. Sedangkan fase maturasi ditandai oleh pengeluaran sisa sitoplasma atau residual body. Residual body kemudian difagosit oleh sel Sertoli yang mempunyai fungsi regulasi. Spermatid yang telah memanjang bersama dengan residual body mempengaruhi fungsi sekresi sel Sertoli untuk memproduksi cairan tubuler, inhibin, androgen binding protein, dan interleukin 1. Setelah residual body mengalami degradasi, spermatozoa kemudian menjalani spermiasi atau pelepasan spermatozoa ke lumen tubuler.<sup>2</sup> Spermiasi dipengaruhi terutama oleh modifikasi hormon, temperatur, dan toksin, yang tingkat sensitifitasnya sampai sekarang belum diketahui. Spermatozoa yang tidak menjalani spermiasi difagosit oleh sel Sertoli dengan akibat oligospermia atau azoospermia.

Spermatid yang masih bundar dan yang sudah memanjang telah mempunyai informasi lengkap untuk kepentingan fertilisasi. Oleh karena itu penggunaan metode *intra cytoplasmic sperm injection* (ICSI) dengan spermatid dimungkinkan dapat menghasilkan fertilisasi jika spermatozoa tidak ditemukan atau azoospermia.<sup>2</sup> Manusia menyelesaikan seluruh proses spermatogenesis dalam 74 hari, yang diikuti oleh pematangan spermatozoa di dalam epididimis selama 21 hari.<sup>15</sup>

Spermatogenesis sebagaimana diuraikan di atas memerlukan interaksi sel Leydig, sel Sertoli, dan sel spermatogonia yang bersinergi dengan hormon FSH dan LH. Konsentrasi tinggi Te dalam testis memegang peranan penting dalam inisiasi dan pemeliharaan spermatogenesis. Konsentrasi tinggi Te sangat dipengaruhi oleh LH seperti diuraikan di atas. Sementara FSH bekerja pada sel Sertoli untuk membentuk berbagai protein dan growth factor seperti androgen binding protein, inhibin, activin, factor stem sel, plasminogen activator, transferin, glikoprotein tersulfatasi, lactate, dan pembentukan blood testis barrier (BTB). Pembentukan BTB berlangsung pada saat sel Sertoli berhenti membelah dan spermatosit primer menjalani pembelahan miosis. Akibat pembentukan BTB epithelium menjadi terpisah dua yaitu bagian basal untuk sel germinal muda dan adluminal untuk sel germinal yang lebih tua (spermatosit primer).<sup>2</sup> Selama pubertas terjadi peningkatan kadar FSH yang menyebabkan sel Leydig menjadi peka terhadap rangsangan LH. Sekali spermatogenesis berlangsung dalam testis dewasa maka sel Sertoli menjadi kurang responsive terhadap FSH. Berbagai studi menunjukkan bahwa orang dewasa yang mengalami hipogonadotropik hipogonadism baik secara spontan atau diinduksi dan sebelumnya telah mengalami pubertas,



ternyata pemberian LH secara tunggal mampu mereinisiasi spermatogenesis. Pria yang dibuat hipogonadotropik dengan pemberian Testosteron, spermatogenesis dapat diinisiasi kembali dengan pemberian HCG atau FSH secara tunggal. Sementara itu pemberian kombinasi HCG dan FSH berhubungan dengan peningkatan densitas spermatozoa dibanding pemberiannya secara tunggal. Mengacu pada uraian tersebut maka penambahan FSH pada dewasa untuk reinisiasi dan pemeliharaan spermatogenesis menjadi tidak penting, tetapi berguna untuk meningkatkan respon spermatogenik terhadap LH atau HCG. Di lain pihak pada pria yang mengalami hipogonadotropik sejak sebelum pubertas, pemberian LH secara tunggal tidak cukup untuk menginisiasi spermatogenesis. Penambahan FSH pada subyek yang sama ternyata mampu menginisiasi spermatogenesis. Oleh karena itu tampak di sini bahwa FSH mempunyai peran penting dalam memprogram mesin spermatogenesis pada saat pubertas. Sekali pemrograman mesin berlangsung dan spermatogenesis mengalami inisiasi, maka LH secara tunggal cukup untuk mempertahankan dan menginisiasi kembali spermatogenesis.<sup>3</sup>

#### ***Environmental Endocrine Disruptors (EED) dan Aktivitas Androgen***

Menurut World Health Organization (WHO) definisi EED adalah substansi tunggal atau campuran yang berasal dari luar yang mengubah system endokrin dan menyebabkan penurunan status kesehatan suatu organism, keturunannya, atau (sub)populasi.<sup>17</sup> EED dapat bersumber dari bahan sintetis atau alami. Berbagai zat kimia yang berasal dari bahan sintetis dan termasuk dalam katagori EED diantaranya adalah dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) dan metabolitnya, zat tersebut termasuk dalam polutan organik

persisten; dioxin, bisphenol A, dan polychlorinated biphenyl (PCB), termasuk dalam senyawa industry; insektisida chlorinasi, imidazole, dan triazole, termasuk dalam kelompok pestisida; phthalate, constituent filter ultra violet, dan paraben, termasuk dalam kelompok senyawa yang secara luas digunakan untuk kosmetika; juga logam berat.<sup>18</sup> Di sisi lain EED juga dapat berasal dari bahan natural berupa hormon manusia atau binatang seperti phyto atau mycoestrogen yang ditemukan pada limbah pabrik atau rumah tangga, peternakan binatang, dan dari makanan atau unsur makanan.<sup>19</sup> Berbagai bukti menunjukkan bahwa EED seperti disebut di atas dapat menyebabkan perubahan endokrin dalam tubuh organisme. Study yang dilakukan oleh Sumpter & Jobling th 1995 menunjukkan bahwa ikan jantan yang hidup di daerah muara sungai yang merupakan pintu keluar pembuangan limbah mengalami feminisasi.<sup>20</sup> Di lain pihak study Vos et al th 2000 memberi gambaran bahwa gastropoda betina yang hidup di perairan pantai mengalami maskulinisasi akibat tributyltin.<sup>21</sup> Merujuk pada studi tersebut maka dapat dinyatakan bahwa EED dapat berefek sebagai androgenic maupun estrogenic. Secara umum mekanisme pengaruh EED menurut sifat dan aktifitas molekulnya dibagi menjadi 3 golongan:

1. Bersifat agonist atau antagonist;
2. Mengacaukan produksi, transport, metabolisme, dan sekresi hormone;
3. Mengacaukan fungsi reseptor hormone.<sup>18,22</sup>

EED yang berasal dari pestisida lebih bersifat androgen reseptor antagonist. Terbukti pemberian vincosolin sebagai pestisida fungisida dan metabolitnya secara invitro maupun invivo secara kompetitif mampu menghambat ikatan androgen dengan reseptornya sehingga terjadi hambatan ekspresi gen yang tergantung androgen. Pemaparan EED (vincosolin) yang bersifat

antagonis androgen pada janin dalam uterus menunjukkan kelainan pada anak berupa gangguan perkembangan alat reproduksi yang bersifat patognomonik. Percobaan pada tikus jantan yang mendapatkan vincosolin dengan dosis 30 mg/hr dan 100 mg/hr pada peripubertal masing-masing dapat mengakibatkan perlambatan maturasi pubertas, dan mengurangi kelenjar seks assesori dan pertumbuhan epididimis. Pemberian vincosolin meskipun mampu meningkatkan kadar LH pada dosis 30 mg/hr dan kadar Te pada dosis 100 mg/hr. Namun di sisi lain terjadi penghambatan terhadap pertumbuhan kelenjar prostat, vesicular seminalis, otot levator ani, dan bulbocavernosus, yang tergantung Te.<sup>18,23</sup> Hal ini menggambarkan bahwa, meskipun vincosolin mampu meningkatkan sekresi Te namun sifat antagonis androgen reseptor dari vincosolin lebih menonjol. Pemberian vincosolin selama perkembangan seksual pada tikus menunjukkan demaskulinisasi dan feminisasi pada anak tikus jantan dengan indikator pemendekan jarak anogenital sehingga menyerupai kelamin betina pada saat lahir, hipospadia, testis ektopik, dan tidak terbentuk kelenjar assesori. Vincosolin bahkan tetap berefek pada dewasa. Terbukti pada tikus jantan dewasa pemaparan vincosolin mampu menurunkan berat prostat.<sup>23</sup> Berbagai studi lain pada tikus jantan juga menunjukkan bahwa toksikan pestisida mampu mengacaukan perkembangan seksual dan onset pubertas melalui penghambatan sintesis androgen.<sup>24</sup> Lebih jauh studi dari berbagai Negara di dunia menunjukkan bahwa pembuangan limbah dari pabrik pulp dan penggilingan kertas memberikan petunjuk ada aktivitas androgenic dari vincosolin, terbukti mampu merubah ikan betina menjadi maskulin. Limbah yang bersifat anti androgen juga berasal dari pembuangan limbah peternakan untuk penggemukan ternak yang

mendapatkan 17  $\beta$ -trenbolone untuk memacu pertumbuhan.<sup>25</sup> Mengacu pada uraian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa EED dan hasil metabolisemenya lebih dominan bersifat anti androgen melalui antagonis terhadap reseptor androgen.

Perlu ditekankan bahwa pencemaran dan penyebaran EED sudah memprihatinkan. Berbagai ahli bahkan menyatakan bahwa penyebaran EED sudah menyebar merata di berbagai tempat di dunia melalui rantai makanan. Hal ini didasarkan pada bukti bahwa dalam tubuh beruang kutub sudah mengandung berbagai zat kimia seperti PCB, pemadam kebakaran terbrominasi, dan berbagai zat yang mengganggu fungsi reproduksi dan immune.

#### ***Environmental Endocrine Disruptors (EED) dan Spermatogenesis***

Blood testis barrier yang dibentuk oleh sel Sertoli memisahkan tubulus seminiferus menjadi bagian basal dan adluminal, menyebabkan spermatosit, spermatid, dan spermatozoa terlindung dari berbagai ancaman yang berasal dari sirkulasi. Toksikan seperti cadmium chloride, phthalet, dan biophenyl A yang berasal dari lingkungan dapat merusak blood testis barrier sehingga menyebabkan kerusakan sel germinal, sel Sertoli, sel peritubuler, bahkan sel Leydig.<sup>1,25</sup> Persoalan serius timbul ketika paparan toksikan menyebabkan kerusakan pada sel Sertoli. Kerusakan sel Sertoli bersifat irreversible karena tidak mempunyai pool stem sel sehingga tidak mampu memperbaharui diri. Berbeda dengan sel Sertoli, kerusakan sel Leydig bersifat reversible. Hal ini disebabkan karena sel Leydig mempunyai pool stem sel, sehingga meskipun terjadi kerusakan akibat terpapar oleh toksikan, masih dapat memperbaharui diri.<sup>1</sup> Kerusakan berbagai sel dalam testis akibat



toksikan juga tergantung pada fase sel tersebut terpapar. Paparan terhadap populasi sel stem mempunyai akibat lebih berat daripada paparan terhadap sel yang telah berdiferensiasi lengkap. Sebagai contoh zat kimia busulphan menyebabkan kematian sel stem termasuk sel spermatogonia. Sementara ethane dimethane sulphonate membunuh sel Leydig yang sudah matur, namun tetap membiarkan sel stem hidup sendirian. Dalam beberapa keadaan paparan toksikan terhadap stem sel Leydig dapat bertahan cukup lama. Seperti toksikan yang memapar SLF bayi dalam kandungan dapat bertahan sampai sesudah lahir dengan indikator penurunan produksi Te yang tetap bertahan sampai sesudah lahir.

Toksikan lain yang perlu diperhatikan adalah bahan pembuat plastic phthalates. Bukti dari studi epidemiologi menggambarkan bahwa pria yang dilahirkan oleh wanita yang terpapar phthalates selama kehamilan, terjadi peningkatan kejadian genital malformasi dan disfungsi spermatogenesis. Kejadian tersebut termasuk kelainan testis yang dikenal sebagai testicular dysgenesis syndrome (TDS) yang juga berpotensi menjadi keganasan akibat pengaruh lingkungan.<sup>26</sup> Studi pada binatang coba menunjukkan bahwa sasaran utama phthalates dalam testis adalah sel Leydig dan tubulus seminiferus. Mengingat sel Leydig adalah penghasil Te, oleh karena itu perkembangan organ kelamin sekunder dan spermatogenesis mengalami disfungsi bila sel Leydig terpapar oleh phthalates. Berbagai bukti pada tikus menunjukkan bahwa pemaparan phthalates terhadap sel Leydig mampu menginduksi kejadian cryptorchidism, hypospadias, kegagalan spermatogenesis, dan penurunan fertilitas pada pria.<sup>1,27</sup> Selain itu paparan phthalate terhadap bayi laki-laki menyebabkan jarak anogenital, suatu parameter ketergantungan androgen pada pria, mengalami pemendekan.<sup>1,28</sup>

Konsekuensi dari pemendekan jarak anogenital adalah peningkatan prevalensi cryptorchidism dan mikropenis.<sup>28,29</sup> Susu yang terkontaminasi oleh phthalates juga menyebabkan hambatan terhadap peningkatan Te post natal pada bayi laki-laki. Berbagai kelainan organ reproduksi laki-laki akibat phthalates sebagaimana tersebut di atas disebabkan oleh kerusakan fungsi sel Leydig yang diikuti oleh penurunan kadar Te. Periode sensitive terhadap paparan phthalates terjadi pada saat dalam kandungan dan saat laktasi.<sup>30</sup>

Phthalates sekarang tersebar dalam lingkungan dengan kisaran konsentrasi antara  $10^{-9}$  sampai  $10^{-1}$  mg/L sehingga kemungkinan sudah memapar masyarakat secara terus menerus meskipun dengan dosis yang rendah. Penelitian pada tikus jantan menunjukkan bahwa efek phthalate terhadap sel testis khususnya pada populasi SLF dan SLD bersifat bifasik. Dalam dosis rendah (1-5 mg/kg/hr) phthalate meningkatkan produksi Te melalui peningkatan populasi sel leydig,<sup>1,31</sup> atau secara langsung merangsang produksi Te.<sup>32</sup> Peningkatan Te sudah cukup untuk memacu kejadian pubertas dini. Di lain pihak phthalates menghambat produksi Te oleh SLF dan SLD, yang diikuti oleh kejadian abnormalitas saluran reproduksi ketika diberikan dalam dosis tinggi. Kejadian ini berlangsung setelah 6, 12, dan 18 bulan setelah dipapar oleh phthalates selama dalam kandungan. Mekanisme yang mendasari sifat bifasik tidak sepenuhnya jelas. Diduga kuat peningkatan kadar Te disebabkan oleh hyperplasia sel leydig akibat rangsangan estrogen. Dugaan ini didasarkan pada peningkatan ekspresi dan aktivitas sel Leydig setelah dipapar oleh phthalate dan konsisten dengan peningkatan jumlah sel Leydig adalah peningkatan kadar LH. Kapasitas steroidogenik sel Leydig normal kembali setelah 28 hari dipapar phthalate dosis rendah akibat penurunan jumlah sel Leydig.

## Kesimpulan

Interaksi antara manusia dengan lingkungan eksternal tidak selalu memberikan keuntungan, tetapi terkadang bahkan mendatangkan kerugian. Udara yang dihirup, air yang diminum, dan makanan yang disantap setiap hari, telah terkontaminasi oleh berbagai bahan kimia yang disebut EED meliputi pestisida, detergent, logam berat, plasticizer, dan berbagai metabolit yang berasal dari tanaman mencemari lingkungan manusia.

EED mengacaukan aktivitas hormon melalui 3 mekanisme yaitu: 1. Bersifat agonist atau antagonist; 2. Mengacaukan produksi, transport, metabolisme, dan sekresi hormone; 3. Mengacaukan fungsi reseptor hormon. Akibat pemaparan EED pada janin dalam uterus menunjukkan kelainan pada anak berupa gangguan perkembangan alat reproduksi yang bersifat patognomonik. Pemaparan vincosolin pada tikus jantan pada peripubertal dapat mengakibatkan perlambatan maturasi pubertas, dan mengurangi kelenjar seks assesori dan pertumbuhan epididimis. EED juga menghambat spermatogenesis dengan merusak blood testis barrier sehingga menyebabkan kerusakan sel germinal, sel Sertoli, sel peritubuler, bahkan sel Leydig.

Perlu ditekankan bahwa pencemaran dan penyebaran EED sudah memprihatinkan. Berbagai ahli bahkan menyatakan bahwa penyebaran EED sudah menyebar merata di berbagai tempat di dunia melalui rantai makanan.

## Kepustakaan

1. Zhang Y, Ge R, Hardy MP. Androgen-forming stem Leydig cells: Identification, function and therapeutic potential. *Disease Markers* 24, 2008. P. 277 - 86.
2. Weinbauer GF, Simoni JGM, Nieslag E. Physiology of Testicular Function. In: Nieslag E, Behre HM eds. *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer-Verlag Berlin Heiderberg, 1997, p. 25 - 40.
3. Bhasin S. Hormonal Regulation of Germ Cell Development. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders Elsevier, 2008, p. 650 - 51.
4. Ge RS, Hardy MP. Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differentiation of rat Leydig cells. *Endocrinology* 139, 1998. P. 3787 - 95.
5. Liri T, dkk. Rapid GDP release from Gsa in patients with gain and loss of endocrine function. *Nature* 371, 1994.p. 164 - 68
6. Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. In: Nieslag E, Behre HM eds. *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer-Verlag Berlin Heiderberg, 1997, p. 25 - 55.
7. Bhasin S. Androgen Production in Human Male. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders Elsevier, 2008, p. 646 - 47
8. Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Chen H, Zirkin BR, Hardy MP. Gene expression in rat Leydig cells during development from the progenitor to adult stage: A cluster analysis, *Biol Reprod* 72, 2005. P. 1405 - 15.
9. Weil PA. Many Hormones are Made from Cholesterol-The Diversity of Endocrin System. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell



- VW, Weil PA eds. *Harpers Illustrated Biochemistry*, 28<sup>th</sup> edition. The McGraw-Hill Companies 2009, p. 429 – 33.
10. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev*, 1989; 10: 232 – 274. Cited from ref no. 2.
  11. Sakiyama R, Pardrige WM, Musto NA. Influx of Testosterone Binding globulin (TeBG) and TeBG-bound sex steroid hormones into rat testis and prostate. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 67, p. 98 – 103.
  12. Nakhla AM, Rosner W. Stimulation of Prostate cancer growth by androgens and estrogens through the intermediacy of sex hormone binding globulin. *Endocrinology*, 1996; 137, p. 4126 – 29.
  13. Hammes A, Andreasen TK, Spoelgen R, et al. Role of Endocytosis in Cellular Uptake of Sex Steroid. *Cell*, 2005; 122, p. 751 – 62.
  14. Bhasin S. Mechanism of Androgen Action. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders Elsevier, 2008, p. 649.
  15. Bhasin S. Germ Cell Development in The Testis-Physiologic Regulation of Testicular Function: Sex Steroid Production and Action. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders Elsevier, 2008, p. 650.
  16. Tunc MO. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *RBM Online* vol 18 no 6. 2009 761 68
  17. World Health Organization. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors, eds. T. damstra, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Kraak VD. Geneva. 2002.
  18. Lavicoli I, Fontana L, Bergamaschi A. The effect of metals as endocrine disruptors. *Journal of technology and environmental health*, part B, 12. 2009, p. 206 – 23.
  19. Goksoyr A. Endocrine disruptors in the marine environment: mechanism of toxicity and their influence on reproductive process in fish. *Journal of technology and environmental health*, part A, 69. 2006, p. 175 – 84.
  20. Sumpter JP, Jobling S. vitellogenesis as biomarker for estrogenic contaminants of the aquatic environment. *Environ Health Perspect*. 103 (suppl 7), 1995, p. 173 - 78.
  21. Vos JG, Dybing E, Greim HA, et al. health effects of endocrine disrupting chemical on wild life, with special reference to the European situation. *Crit rev. toxicol*, 2000, p. 71 - 133.
  22. Rotchel JM, Ostrander GK. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *J. toxicol. Environ. Health B*, 6, 2003, p. 453 - 95.
  23. Gray LE, Ostby J, Furr J, et al. Effects of environmental anti androgens on reproductive development in experimental animals. *Human Reproduction Update* 7, 2001, p. 248 – 64.
  24. Parks LG, Ostby J, Orlando EF, et al. masculinization of female mosquitofish in Kraft mill effluent contaminated

- Fennholloway river is associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicological sciences* 62, 2001, p. 257 – 67.
25. Orlando EF, Kolok AS, Binzick GA, at al. endocrine disruptors effect of cattle feedlot effluent on an aquatic sentinel species, the fathead minnow. *Environmental Health Perspective* 112, 2004, p. 353 – 58.
  26. Skakkebaek NE, De Meyts ER, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspect. *Human Reprod*, 16, 2001, p. 972 -78
  27. Ge RS, Chen GR, Tanrikut C, Hardy P. phthalates ester toxicity in Leydig cells: developemental timing and dosage consideration. *Reprod Toxicol*, 23, 2007, 366 – 73.
  28. Marsee K, Woodruff TJ, Axelrad DA, at al. estimated daily phthalates exposure in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environ Health Perspect*, 114, 2006, p. 805 – 09.
  29. Mahood IK, Scott HM, Brown R, at al. In Utero Exposure to Di(n-butyl)phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult Endpoint and their dose sensitivity. *Environmenal Health Perspectives*, 115, 2007, p. 55 - 60.
  30. Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Critical periode for adwers effect on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-buthylphthalates during late pregnancy. *Toxicol Lett*, 111, 2000, p. 271 – 78.
  31. Akingbemi BT, Ge R, Klinfelter GR, at al. phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad sci USA*, 101, 2004, p. 775 – 80.
  32. Ge RS, Chen GR, Dong Q, at al. Biphasic effect of postnatal exposure to diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats. *J androl*, 28, 2007, p. 513 - 20