

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK FİZYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
(KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ İLE ORTAK PROGRAM)

LİNURON, KLORİDAZON VE METRİBUZİN'İN
GRANÜLOZA HÜCRE STEROİDOGENEZİSİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Metehan Eser KAHVECİ

Danışman
Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT

İkinci Danışman
Doç. Dr. Ebru ÇETİN

Doktora Tezi

Haziran 2022
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK FİZYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
(KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ İLE ORTAK PROGRAM)

LİNURON, KLORİDAZON VE METRİBUZİN'İN
GRANÜLOZA HÜCRE STEROİDOGENEZİSİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Hazırlayan

Metehan Eser KAHVECİ

Danışman

Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT

İkinci Danışman

Doç. Dr. Ebru ÇETİN

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
tarafından 119O020 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2022

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Metehan Eser KAHVECİ

İmza

X X X X

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Linuron, Kloridazon ve Metribuzin'in Granüloza Hücre Steroidogenezisi Üzerine Etkilerinin *İn-vitro* Araştırılması” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Metehan Eser KAHVECİ

Danışman

Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT

2. Danışman

Doç. Dr. Ebru ÇETİN

Veterinerlik Fizyolojisi ABD Başkanı

Doç. Dr. Ebru ÇETİN

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT ve Doç. Dr. Ebru ÇETİN danışmanlığında **Metehan Eser KAHVECİ** tarafından hazırlanan “**Linuron, Kloridazon ve Metribuzin'in Granüloza Hücre Steroidogenezisi Üzerine Etkilerinin *İn-vitro* Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veterinerlik Fizyolojisi** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... /...../

JÜRİ:

İmza

Danışman : Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT

.....

Üye : Prof. Dr. Meryem EREN

.....

Üye : Prof. Dr. Ebru YILDIRIM

.....

Üye : Prof. Dr. Tahir KARAŞAHİN

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Duygu YAMAN GRAM

.....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /...../

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Merhum dedemin benim için hayali olan ve babamın yarım bırakmak zorunda kaldığı doktora eğitimini almış olmamın gururunu yaşatan çok kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT hocama bu zorlu süreçte elimden tuttuğu, tezimin tüm aşamalarında bana kattığı deneyimleri ile akademik alanda gelişmem için desteklerini esirgemediği ve beni sabırla sürekli motive ettiği için çok teşekkür eder, en derin saygılarımı sunarım. Deneylerim sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ruhi KABAĞCI'ya, ayrıca ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Ebru ÇETİN ve Sayın Prof. Dr. Meryem EREN'e ve bugüne kadar üzerimde emeği olan diğer tüm hocalarıma teşekkür ederim. Bu yaşıma kadar destekleriyle beni yalnız bırakmayan değerli annem, babam ve kardeşime teşekkürlerimi bir borç bilirim. Fedakarlıkları ile beni teşvik ederek daima yanımda olan sevgili eşim Hülya ve biricik kızım Ayşe Zümral'ime sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca Doktora tezime 1002 projesi ile (109O020) destek olan TÜBİTAK'a bilimsel anlamda edindiğim bu güzel tecrübeye katkı sağladıkları için çok teşekkür ederim.

Metehan Eser KAHVECİ

Haziran 2022, KAYSERİ

LİNURON, KLORİDAZON VE METRİBUZİN'İN GRANÜLOZA HÜCRE STEROİDOGENEZİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI

Metehan Eser KAHVECİ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Fizyolojisi Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Haziran 2022

Danışmanlar: Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT, Doç. Dr. Ebru ÇETİN

ÖZET

Endokrin bozucu (EB) bileşikler, farklı sağlık problemlerine yol açması nedeniyle hem hayvanlar hem de insanlar için bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Bu çalışmada EB etkileri araştırılan pestisitlerin bir dalı olan ve bitkisel ürünlerin çoğunda verimi artırmak amacıyla kullanılan herbisitlerden linuron, kloridazon ve metribuzinin inek granüloza hücrelerinin canlılık düzeyi ile bu hücrelerden sentezlenen östrojen ve progesteron hormonları üzerine etkileri incelendi.

Bu amaçla ovaryumdaki foliküllerden izole edilen granüloza hücreleri 96 saat boyunca 10, 50 ve 250 μ M linuron; 10, 100 ve 1000 μ M kloridazon ve 25, 250 ve 2500 μ M metribuzine maruz bırakıldı. 48 ve 96. saatte hücre canlılıkları belirlenerek, medyumlarda östrojen ve progesteron düzeyleri ölçüldü. Elde edilen veriler GraphPad istatistik programında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi metodu ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde ise Tukey testi kullanıldı.

Linuronun hiçbir dozunun hücre canlılığına önemli derecede bir etkisi görülmezken, kloridazon ve metribuzinin özellikle en yüksek dozlarının hücre canlılığını azalttığı görüldü. Linuron, kloridazon ve metribuzine maruz kalan granüloza hücrelerinde östrojen salınımı 96. saatte 48. saate göre azaldı ($p<0.05$). Östrojen salınımı yönünden doz grupları arasındaki fark da her bir herbisit uygulamasında özellikle 96. saatte ve en yüksek uygulama gruplarında (250 μ M linuron, 1000 μ M kloridazon ve 2500 μ M metribuzin) oldu. En yüksek dozda linurona maruz kalan grupta 96. saatte progesteron düzeyi doza bağımlı olarak azalırken, kloridazon ve metribuzin gruplarında da en yüksek dozlarında inkübasyon süresi uzamasıyla bu azalma daha belirgin hale geldi.

Çalışmada özellikle yüksek dozlarda kloridazon ve metribuzinin sitotoksik etkiye sahip olduğu ve inkübasyon medyumuna steroid hormon sentezinin devamı için androstenedion eklenmesine rağmen üç herbisit de granüloza hücrelerinde östrojen salınımını azalttığı ortaya konulmuş olup, bu herbisitlerin testosteronun östrojene dönüşümünü engelleyerek androjen reseptör antagonisti gibi davrandığı düşünülmektedir. Ayrıca yüksek dozda linuron, kloridazon ve metribuzinin progesteron düzeyini de düşürdüğü belirlendiğinden ileriki çalışmalarda bu herbisitlerin steroid hormon sentez basamaklarındaki enzim yollarına etkilerinin araştırılması uygun olacaktır. Bu araştırma sonucunda linuron, kloridazon ve metribuzinin üreme hormonları üzerindeki endokrin bozucu etkisi gösterilerek insan ve hayvanlarda karşılaşılan üreme sistemi problemlerinde potansiyel bir neden olabileceği ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Granüloza hücresi; kloridazon; linuron; metribuzin; östrojen

IN-VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF LINURON, CHLORIDAZON AND METRIBUZIN ON GRANULOSA CELL STEROIDOGENESIS

Metehan Eser KAHVECİ

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Veterinary Physiology

PhD Thesis, June 2022

Supervisors: Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT, Doç. Dr. Ebru ÇETİN

ABSTRACT

Endocrine disrupting (ED) compounds have become a source of concern for both animals and humans as they cause a variety of health problems. In this study, the effects of linuron, chloridazon and metribuzin, which are herbicides, which are a branch of pesticides whose ED effects are investigated, and which are used to increase yield in most of the herbal products, on the viability level of cow granulosa cells and the estrogen and progesterone hormones synthesized from these cells were investigated.

For this purpose, granulosa cells isolated from follicles in the ovary were exposed to 10, 50 and 250 μ M linuron, 10, 100 and 1000 μ M chloridazon and 25, 250 and 2500 μ M metribuzin for 96 hours. Cell viability was determined at 48th and 96th hours, and estrogen and progesterone levels were measured in the media. The obtained data were evaluated with the variance analysis method in repeated measurements in the GraphPad statistical program. Tukey test was used to evaluate the difference between the groups.

While no dose of linuron had a significant effect on cell viability, it was observed that especially the highest doses of chloridazon and metribuzin decreased cell viability. Estrogen release in granulosa cells exposed to linuron, chloridazon and metribuzin decreased at 96th hour compared to 48th hour ($p < 0.05$). The difference between the dose groups in terms of estrogen release was also observed at the 96th hour of each herbicide application, and in the highest application groups (250 μ M linuron, 1000 μ M chloridazon and 2500 μ M metribuzin). While the progesterone level decreased in a dose-dependent manner at the 96th hour in the group exposed to the highest dose of linuron, this decrease became more pronounced in the chloridazon and metribuzin groups with the prolongation of the incubation period at the highest doses.

In the study, it was revealed that especially high doses of chloridazone and metribuzin have cytotoxic effects and although androstenedione is added to the incubation medium for the continuation of steroid hormone synthesis, all three herbicides decrease the release of estrogen in the granulosa cells, and it is thought that these herbicides act as androgen receptor antagonists by inhibiting the conversion of testosterone to estrogen. In addition, since it has been determined that high doses of linuron, chloridazon and metribuzin reduce progesterone levels, it would be appropriate to investigate the effects of these herbicides on the enzyme pathways in the steroid hormone synthesis steps in future studies. As a result of this research, the endocrine disrupting effects of linuron, chloridazon and metribuzin on reproductive hormones have been demonstrated, and it has been tried to be revealed that they may be a potential cause of reproductive system problems in humans and animals.

Keywords: Granulosa cell; chloridazon; linuron; metribuzin; estrogen

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İneklerde Ovaryum Fizyolojisi	3
2.1.1. Oogenez ve Folikülogenez.....	3
2.1.1.1. Foliküler Dalgalanma	5
2.1.2. Östrus Siklusu Dönemleri ve Hormonal Mekanizması.....	8
2.1.2.1. Proöstrus Dönemi	10
2.1.2.2. Östrus Dönemi.....	10
2.1.2.3. Metöstrus Dönemi	11
2.1.2.4. Diöstrus Dönemi.....	11
2.1.3. Steroit Hormonlar.....	12
2.1.4. Östrojen ve Progesteron Hormonları	13
2.1.5. Granüloza Hücrelerinde Östrojen ve Progesteron Sentezi.....	14
2.2. Pestisitler.....	15

2.3. Endokrin Bozucu Herbisitler	16
2.3.1. Linuron.....	18
2.3.1.1. Linuron'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	18
2.3.1.2. Linuron'un Kullanıldığı Alanlar	18
2.3.1.3. Linuron'a Maruziyet Yolları	19
2.3.1.4. Linuron'un Toksik Etkileri	19
2.3.1.5. Linuron'un Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	21
2.3.2. Kloridazon.....	21
2.3.2.1. Kloridazon'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	21
2.3.2.2. Kloridazon'un Kullanıldığı Alanlar	22
2.3.2.3. Kloridazon'a Maruziyet Yolları.....	23
2.3.2.4. Kloridazon'un Toksik Etkileri	23
2.3.2.5. Kloridazon'un Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	24
2.3.3. Metribuzin	24
2.3.3.1. Metribuzin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	24
2.3.3.2. Metribuzin'in Kullanıldığı Alanlar	25
2.3.3.3. Metribuzin'e Maruziyet Yolları	25
2.3.3.4. Metribuzin'in Toksik Etkileri	26
2.3.3.5. Metribuzin'in Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Araç ve Gereçler	30
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	30
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Hücrelerin İzolasyonu	31
3.2.2. Hücrelerin ekimi, uygulama gruplarının oluşturulması ve inkübasyonu ...	34
3.2.3. Canlılık testleri ve hormon örneklerinin toplanması.....	37
3.2.4. Hormon analizleri.....	38

3.2.5. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1. Linuron, Kloridazon ve Metribuzin'in Granüloza Hücrelerinin Canlılığına Etkileri	40
4.2. Hormon Analizleri	41
4.2.1. Linuron, Kloridazon ve Metribuzin'in Östrojen Salınımı Üzerine Etkileri.....	41
4.2.2. Linuron, Kloridazon ve Metribuzin'in Progesteron Salınımı Üzerine Etkileri.....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
5.1. Tartışma	43
5.2. Sonuç ve Öneriler	56
6. KAYNAKLAR	58
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μm	: Mikrometre
3 β -HSD	: 3 β -hidroksi steroid dehidrojenaz
17 β -HSD	: 17 β -hidroksi steroid dehidrojenaz
ADP	: Adenozin difosfat
AKT	: Serin/treonin protein kinaz
ALS	: Asetolakto sentetaz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AR	: Androjen reseptörü
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CEBPB	: CCAAT (sitozin - sitozin - adenozin - adenozin - timidin) artırıcı bağlayıcı protein beta
cm^3	: Santimetreküp
CO ₂	: Karbondioksit
CV-1	: Afrika yeşil maymun böbrek fibroblast hücre hattı
CYP11A1	: Kolesterol yan zincirini kıran enzim
CYP17A1	: 17 α -hidroksilaz enzimi
CYP19A1	: Östrojen sentetaz / aromataz enzimi
DDE	: Dikloro-difenil-dikloroetilen
DDT	: Dikloro-difenil-trikloroetan

DF	: Dominant folikül
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle medyumunu
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E2	: Östradiol
EPA	: Amerikan Çevre Koruma Ajansı
ER	: Östrojen reseptörü
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FBS	: Fetal buzağı serumu
FRTL-5	: Fischer rat tiroit hücre hattı
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
FSH-R	: Folikül uyarıcı hormon reseptörü
GEFs	: Guanin nükleotit değişim faktörleri
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
H295R	: İnsan adrenokortikal karsinom hücre hattı
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansülfonik asit
HepG2	: İnsan hepatoselüler karsinom hücre hattı
HL-60	: İnsan lösemi hücre hattı
HPTE	: 2,2-bis(4-hidroksifenil)-1,1,1-trikloroetan
HRAC	: Herbisit Direnci Eylem Komitesi
IARC	: Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFR	: İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü
InsI3	: İnsülin benzeri peptit 3
ITS	: İnsülin, transferrin ve sodyum selenit

KL	: Korpus luteum
kg	: Kilogram
LCS-1	: 4,5-dikloro-2-(3-metilfenil) piridazin-3-one
LH	: Lüteinleştirici hormon
LH-R	: Lüteinleştirici hormon reseptörü
LNCaP	: Prostatın lenf nodu karsinoması hücre hattı
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MN	: Mikronükleus
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NADPH oksidaz	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
P4	: Progesteron
PBS	: Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
PCNA	: Prolifere edici hücre nükleer antijen
PGE2	: Prostaglandin E2
PGF2 α	: Prostaglandin F2 α
PKA	: Protein kinaz
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
scc	: Yan zincir bölünmesi

SH-SY5Y	: İnsan nöroblastom hücre hattı
SOD	: Süperoksit dismutaz
StAR	: Steroidojenik akut düzenleyici
TCDD	: 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü
WST	: Suda çözünür tetrazolyum tuzu



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Linuron'un fiziksel ve kimyasal özellikleri	18
Tablo 3.2. Kloridazon'un fiziksel ve kimyasal özellikleri	22
Tablo 3.3. Metribuzin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri	25
Tablo 3.4. Granüloza hücrelerine uygulanan endokrin bozucu herbisitler ve dozları....	37



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Oogenez ve folikülogenez.....	5
Şekil 2.2.	Foliküler dalgalı östrus siklusu	6
Şekil 2.3.	Östrus siklusu dönemleri ve hormonal değişimler.....	9
Şekil 2.4.	Hipotalamus, hipofiz ve ovaryum arasındaki nöroendokrin ilişkiler.....	12
Şekil 2.5.	Adrenal bezlerde ve ovaryumlarda steroid hormonların biyosentezi	13
Şekil 2.6.	Steroid hormon sentezinde teka ve granüloza hücreleri arasındaki ilişki.. ...	14
Şekil 3.1.	Mezbahadan alınan ovaryumlar.	32
Şekil 3.2.	İzolasyon için ayrılan ovaryumlardan örnekler.....	32
Şekil 3.3.	Folikül sıvısının toplanması.	33
Şekil 3.4.	İzole edilen granüloza hücreleri.	34
Şekil 3.5.	Boyama sonrası hücre sayım cihazı lamında granüloza hücreleri ve canlılık oranları.	35
Şekil 3.6.	Pleytlerin işaretlenmesi ve hücre ekimi.	36
Şekil 3.7.	WST ölçümü için hazırlanmış pleyt.....	38
Şekil 4.1.	Farklı dozlarda linuron (A), kloridazon (B) ve metribuzin (C)'in granüloza hücrelerinin canlılığına etkisi.	40
Şekil 4.2.	Farklı dozlarda linuron (A), kloridazon (B) ve metribuzin (C)'in östrojen salımına etkisi.....	41
Şekil 4.3.	Farklı dozlarda linuron (A), kloridazon (B) ve metribuzin (C)'in progesteron salımına etkisi.....	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Her geçen gün artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyacını karşılayabilmek amacıyla tarımsal üretim miktarını artırmak için yabancı otlar, böcekler ve mantarlarla mücadelede çeşitli pestisitler kullanılmaktadır. Dünya genelinde kullanılan bu kimyasalların en büyük kısmını %42'lik bir oran ile yabancı otlara karşı kullanılan herbisitler oluşturmaktadır (Yiğit ve Kabakçı, 2020). Ülkemizde ise en son açıklanan verilere göre tarımsal ilaç kullanım miktarı son 10 yılda yaklaşık %39 oranında artarak 2020 yılında 53.672 tona ulaşmıştır. Bu miktarın 13.250 tonunun ise herbisitler olduğu açıklanmıştır (TÜİK, 2021).

Herbisitlerin dünyada yaygın şekilde kullanımı daha kaliteli ürün elde ederek üretim maliyetlerini düşürebilir ancak, biyolojik çeşitliliğe verdiği zararlar, suları kirleterek gerek insan sağlığına gerekse suda yaşayan canlılara yönelik olumsuz etkileri ve uzun yarı ömürleri nedeniyle vücutta birikerek oluşturdukları hasarlar düşünüldüğünde endişe verici sonuçlar doğurmaktadır (Yiğit ve Kabakçı, 2020). Uygunsuz ve dikkatsiz şekilde kullanılan bu kimyasallara aşırı maruziyet sonucu endokrin bozucu etkileri ile üreme sorunları da dahil olmak üzere pek çok olumsuz etkiler ortaya çıkmaktadır (Gupta, 2018).

Hayvanlar üzerinde yapılan birçok araştırmada, herbisitlere uzun süreli düşük doz maruziyetin, bağışıklık sisteminin baskılanması, hormonal bozukluklar, zeka geriliği, üreme ve gelişim anormallikleri ve hatta kanser gibi olumsuz etkilerle bağlantılı olduğu ve kuş popülasyonlarının azalmasına neden olduğu belirtilmiştir (Gupta, 2017). Östrus siklusunun bozulması, tekrarlayan yalancı gebelikler, fetal ölüm, hidronefroz, yarık damak, siklopi, diyafram fıtığı, iskelet ve iç organ malformasyonları gibi teratojenik etkiler de herbisit toksisitesinde görülen

semptomlardandır (Gupta, 2018). Hayvanların bu kimyasallara uzun süreli maruz kalmaları sonucunda, nörodejeneratif etkiler ve solunum problemleri dahil olmak üzere bir dizi sağlık problemine yol açabildiği de belirtilmiştir. Herbisitlerin insan sağlığı üzerindeki zararlı etkileri ise, bu bileşiklerin kimyasal sınıfı, doz, süre ve maruz kalma yolu gibi çeşitli faktörler tarafından belirlenmektedir (Marin-Morales ve ark., 2013).

İnsanlar için hayati öneme sahip besin maddelerinin kaynağı olan ve ülke ekonomisine yüksek katma değer sağlayan ineklerde üretkenlik oldukça önemlidir. Üretkenlik, sağlıklı bir üreme fizyolojisi varlığında mümkün olabilmektedir (Kabakçı ve Yiğit, 2019). Üreme sistemindeki problemler hayvanın döl verimini etkileyerek ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu kapsamda ovaryum işlevselliğinin korunması hayvanın üreme sağlığı için oldukça önemli bir faktördür. Endokrin bozucular vücuttaki hormonların salınımına etki ederek homeostatik dengeyi bozarlar (Gupta, 2017). Üreme sistemi üzerine endokrin bozucu etkisi belirlenen 20’den fazla herbisit bulunmakta ve bazı ülkelerde bunların bir kısmı kullanımdan kaldırılmışken, bazı ülkelerde kullanımına devam edilmektedir, (Mnif ve ark., 2011).

Araştırmanın konusu olan herbisitler de farklı sistemlerde endokrin bozucu etkileri olduğu bilinen kimyasallardır. Ancak bu herbisitlerin dişi üreme sisteminde endokrin bozucu olup olmadığına dair yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle bu çalışmada, günümüzde tarımsal ilaçlamada oldukça yaygın şekilde kullanılan pestisitlerden herbisit grubuna ait linuron, kloridazon ve metribuzinin inek granüloza hücreleri canlılığına ve bu hücreler tarafından sentezlenen östrojen ve progesteron hormonları üzerine etkilerinin *in vitro* ortamda araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilecek veriler ışığında bu herbisitlerin dişi üreme sistemi üzerine etkilerinin yorumlanması, insan ve hayvan sağlığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi, herbisit kullanımına karşı toplumsal bilinç geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İneklerde Ovaryum Fizyolojisi

Ovaryum fizyolojisi, hormonların etkisiyle ovaryum üzerinde oluşan foliküllerin gelişmesi, oositlerin olgunlaşması, ovulasyonun gerçekleşmesi, korpus luteum (KL)'un oluşması, östrojen ve progesteron hormonlarının salgılanması ve KL'un regrese olması süreçlerini kapsar (Kabakçı, 2017). Ovaryumlar steroid yapıdaki östrojen, progesteron ve oksitosin, relaksin, inhibin, aktivin gibi üreme hormonlarını salgılama işleviyle endokrin özellik taşır. Ayrıca doğum sonrasında büyüme ve ikincil cinsiyet karakterlerinin oluşumunu da kontrol eder (Schatten ve Constantinescu, 2008).

Ovaryum üreme fonksiyonlarını düzenleyen çok sayıda farklılaşmış hücre tipini içerir. Ovaryum üzerinde yer alan foliküller oositi çevreleyen özelleşmiş hücrelerden meydana gelir (Bristol-Gould ve Woodruff, 2006). Folikül duvarı dış katmanında teka hücreleri, iç katmanında ise granüloza hücreleri yer almaktadır. FSH ve LH reseptörleri barındıran granüloza hücreleri östrojen ve ovulasyonun hemen öncesinde de progesteron ve inhibin hormonlarını üretirler. LH reseptörlerine sahip teka hücreleri ise sonrasında androjenlere dönüşen progesteron hormonunu salgırlar (Yiğit ve ark., 2019).

2.1.1. Oogenez ve Folikülogenez

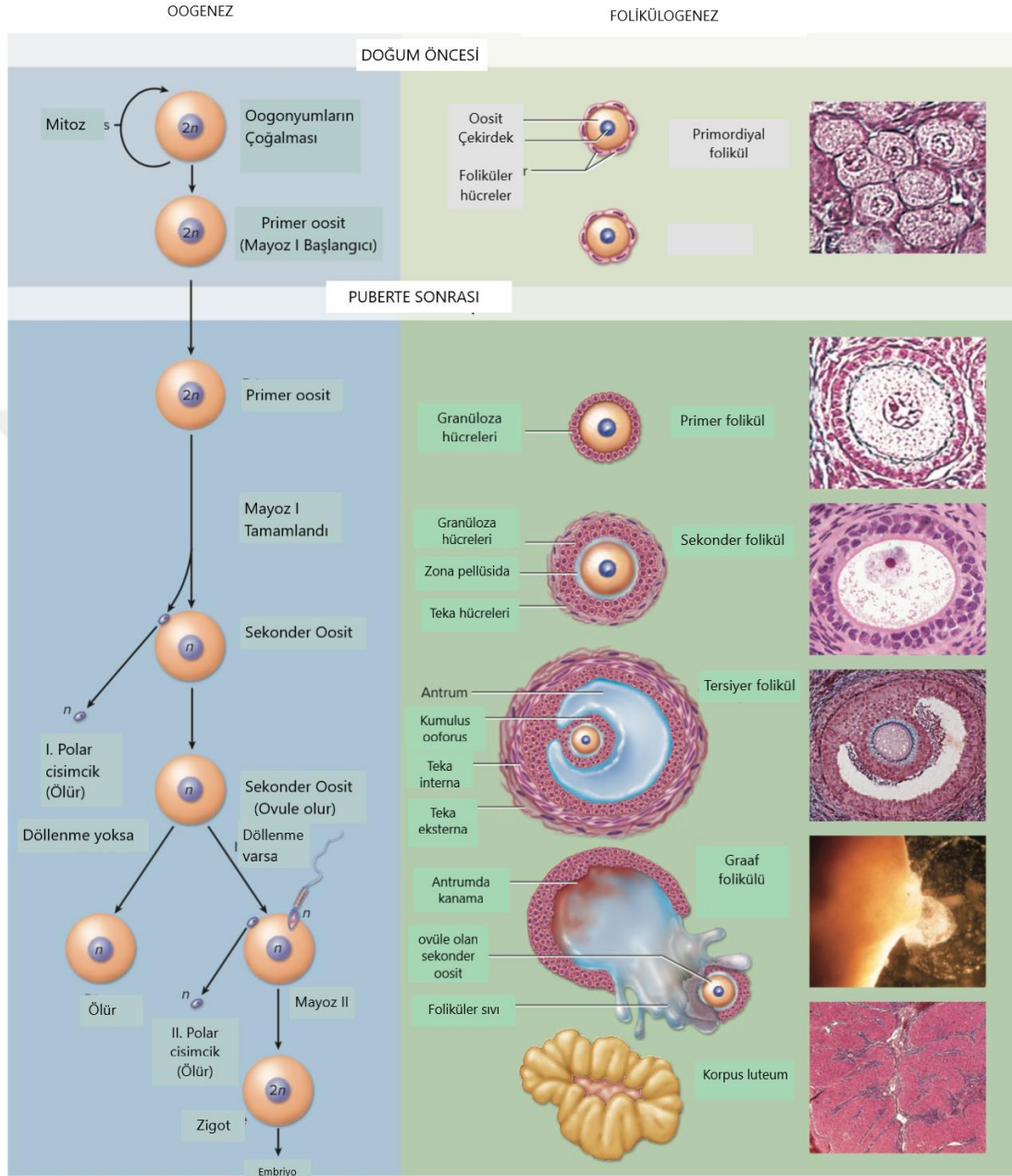
Oositlerin çoğalma, gelişme ve olgunlaşma aşamaları ile ilgili olaylara oogenez adı verilir. Oositlerin kökeni, fertilizasyonun 19. gününden sonra embriyonal endoderm katmanı çevresinde gelişen primordiyal germ hücreleridir. Bu hücreler fetal dönemde çok sayıda mitoz bölünmeye uğrar ve oogonyumları oluşturur. Oogonyumlar ineklerde gebeliğin 75-80. günlerinde birinci mayoz bölünme aşamasına girer ancak,

bölünme tamamlanmaz ve profaz safhasında durur. Bu aşamada primer oosit adını alan hücreler pubertaya kadar beklerler (Adams ve ark., 2008; Kabakçı, 2017).

Oogenez ve folikülogenez eşzamanlı gelişen süreçlerdir. Ovaryum folikülleri oositlerin beslenmesi ve gelişmesi için uygun ortamı sağlayan fonksiyonel yapılardır. Primer oositin çevresi tek katlı yassı epitelle sarılarak primordiyal folikül oluşur. Dişi buzağının yeni doğduğu dönemde, her bir ovaryumda yaklaşık 200-500 bin primordiyal folikül/primer oosit bulunur ve bu miktar yaşam boyu ihtiyacının çok üzerindedir. Bununla birlikte, bu sayı puberta sonrası her siklusta azalmaya başlar ve ergin ineklerde yaklaşık 60 bine, yaşlı ineklerde ise birkaç bine kadar düşer (Kabakçı, 2017).

Puberta sürecine girilmesiyle her östrus siklusunda ortalama 300 primordiyal folikül periyodik şekilde, ovule olmak üzere gelişmeye başlar. Ancak bunlardan bir tanesi gelişimini tamamlayarak ovule olabilirken diğerleri geriler. Gelişim sürecinde primordiyal foliküller sırasıyla primer, sekonder, preantral ve antral/tersiyer folikül evrelerinden geçerek olgunlaşır. Folikül büyüdükçe çevresindeki hücreler dönüşerek teka eksterna, teka interna ve granüloza hücrelerinden oluşan katmanlar şekillendirir. Gevşek bağ dokudan oluşan teka eksterna folikülü dışardan sarar ve ona destek olur. Teka interna LH'nın etkisi altında androjenleri üretirken, granüloza hücreleri de foliküler gelişme için gerekli olan östrojen, inhibin ve folikül sıvısını üretir. Bu süre zarfında folikülün merkezinde antrum adı verilen bir boşluk oluşmaya başlar. Bu aşamadaki foliküle antral/tersiyer folikül adı verilir (Kabakçı, 2017). Antral folikül gelişimi sonlarına doğru FSH ve östrojen hormonları, granüloza hücreleri üzerinde LH reseptörleri oluşumunu uyarır. Diğer yandan FSH reseptörleri de gerileme sürecindedir. Böylece folikül, artan düzeyde LH tarafından domine edilerek Graaf folikülüne dönüşür. Ovulasyon öncesi LH'nın ani artışı, folikül duvarını enzimatik olarak tahrip eden çeşitli kollajenaz ve prostaglandinlerin miktarında artışa neden olur ve Graaf folikülünü patlatır ve sekonder oosit ovaryumdan atılır. Ovulasyonu indükleyen LH salınımı, eşzamanlı olarak, profaz safhasında bekleyen primer oositi birinci mayoz bölünmesine devam etmesi için uyarır ve bölünme ovulasyonun hemen öncesinde tamamlanır. Sonuçta diploid (2n) kromozomlu sekonder oosit ile birinci polar cisimcik meydana gelir. Ovulasyon esnasında başlayan ikinci mayoz bölünme ise döllenme esnasında tamamlanır ve haploid (n) kromozomlu oosit ile

ikinci polar cisimcik şekillenir. Böylece oogenez sonucunda bir adet primer oositten bir adet olgun oosit meydana gelmiş olur (Alaçam, 2010) (Şekil 2.1).

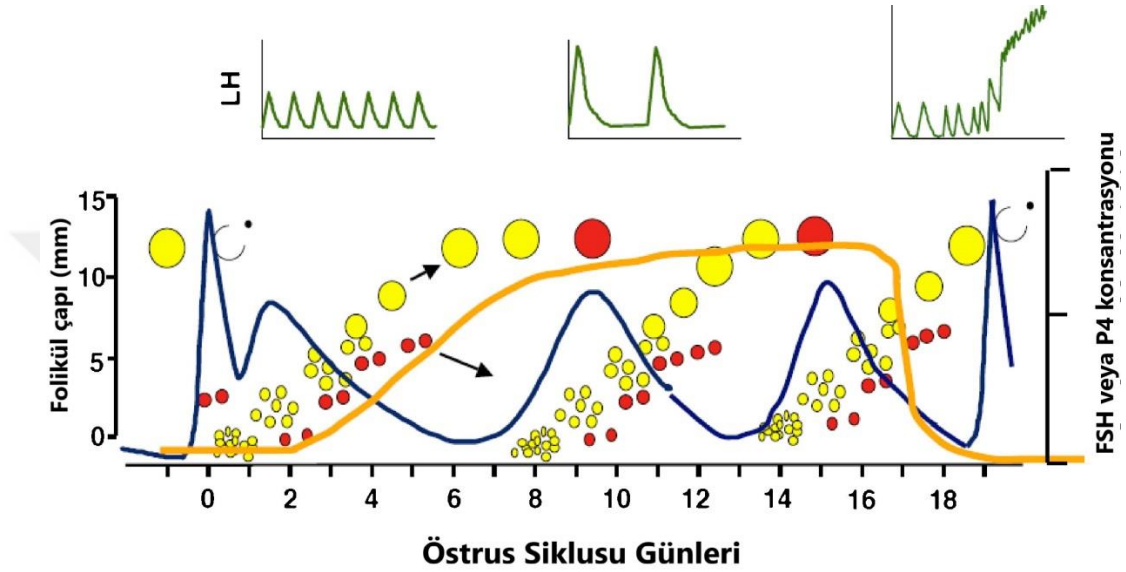


Şekil 2.1. Oogenez ve folikülogenez (Saladin, 2018)

2.1.1.1. Foliküler Dalgalanma

Ovaryum foliküllerinin büyümesi, gelişmesi ve olgunlaşması, çiftlik hayvanlarında yüksek üreme verimliliği için temel süreçlerdir. Fetal gelişim sırasında sabit sayıda oluşturulmuş primordiyal folikül ile başlayan ovaryan folikül büyümesi, 3-4 aylık bir

süre alır ve gonadotropinden bağımsız ve gonadotropine bağımlı aşamalar halinde gerçekleştirilir. İneklerde gonadotropin bağımlı foliküler büyüme, bir östrus döngüsü için 2 veya 3 foliküler dalga hareketi ile şekillenir (Şekil 2.2). Her bir büyüme dalgası, folikülün oluşumunu, seçilmesini ve dominant hale gelişini ve sonrasında dominant folikülün ovule olması veya atreziye olması evrelerini kapsamaktadır (Forde ve ark., 2011).



Şekil 2.2. Foliküler dalgalı östrus siklusu (Forde ve ark., 2011)

Hem FSH hem de LH, ovaryum folikülü gelişiminde önemli bir role sahiptir. Foliküllerin hipotalamus, hipofiz ve eşey hormonlarının (östradiol ve inhibin) negatif ve pozitif geri besleme mekanizmalarına dahil olduğu düşünüldüğünde, bu hormonların sığırlarda östrus döngüsünün düzenlenmesinde yönetici bir rolü olduğu anlaşılmaktadır (Forde ve ark., 2011).

Gonadotropine bağımlı folikül gelişimi, FSH konsantrasyonlarında geçici bir artış ile tipik olarak ≥ 5 mm çaplarında 5-20 folikülden oluşan bir folikül topluluğunun ortaya çıkmasıyla başlamış olur. Folikül dalgasının 3. gününe kadarki süreç foliküllerin granüloza hücrelerine lokalize FSH reseptörleri (FSH-R) ile FSH'ya bağımlı folikül büyümesinin başladığını gösterir. FSH konsantrasyonlarındaki bu geçici artış, ayrıca ovaryum foliküllerinin granüloza hücrelerinde androjeni östrojene dönüştüren aromataz enzim aktivitesinde (P450arom; CYP19) bir artışa da yol açar. Folikül topluluğunda artan çapı ile beliren folikül, dominant foliküldür (DF) ve en büyük

sağlıklı folikül olarak kabul edilir. Bu büyüme, foliküler sıvı östradiol ve inhibin konsantrasyonlarının da artmasına neden olur. Östradiol ve inhibin, negatif geri besleme yoluyla ön hipofiz bezinden salınan FSH'yı baskılar. Folikül gelişiminin farklı aşamalarında sağlıklı foliküllerin teka ve granüloza hücrelerinde bulunan LH-R'nin çoğalmasıyla, DF granüloza hücreleri üzerindeki LH reseptörlerine daha da duyarlı hale gelir ve azalan FSH konsantrasyonlarına rağmen büyümeye devam eder (Forde ve ark., 2011).

Erken luteal faz sırasında daha az genlikte ve daha yüksek frekanslı (20–30 atım/24 saat) LH atımları meydana gelirken, orta luteal dönemde LH atımları daha büyük genliğe ve daha düşük frekansa sahiptir (6–8 atım/24 saat). Her iki atım da DF'nin nihai olgunlaşması ve devamında ovule olması için yetersizdir. Bunun sonucunda östrus döngüsünün luteal fazında üretilen DF atreziye uğrar, E2 ve inhibin üretimi azalır ve hipotalamus/hipofiz üzerindeki negatif geri besleme bloğu ortadan kalkar, FSH salgısı artar ve yeni bir folikül dalgası ortaya çıkar (Forde ve ark., 2011).

Diğer foliküllere kıyasla yüksek konsantrasyonlarda östradiol üretimi, DF'nin belirleyici bir özelliğidir ve folikül çapındaki görünür farklılıklardan önce gelir. Büyüyen foliküllerden östradiol üretimi, yeterli LH atım frekansına bağlıdır. LH'nın teka hücrelerindeki reseptörlerine bağlanması, bir dizi reaksiyon yoluyla kolesterolün testosterona dönüşmesini sağlar. Daha sonra testosteron, granüloza hücrelerine difüze olur ve aromataz enzimi tarafından östrojenlere dönüştürülür (Şekil 2.6). Östradiol, folikül gelişimi üzerinde sadece lokal bir etkiye sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda hipotalamus ve hipofiz bezi üzerine pozitif geri besleme mekanizması yoluyla sistemik bir role de sahiptir. Östrus döngüsünün foliküler fazı sırasında, progesteron konsantrasyonları bazal seviyedeysen, ovulasyon öncesi DF tarafından üretilen bu yüksek östradiol konsantrasyonu, hipotalamustan bir GnRH dalgalanmasına neden olur. Ardından oluşan LH dalgalanması, DF'nin nihai olgunlaşmasını ve ovulasyonunu uyarmak için yeterli genlik ve frekanstadır. Ayrıca artan östradiol konsantrasyonu, başarılı çiftleşme için gerekli olan östrus davranışlarının ortaya çıkmasını da sağlamaktadır (Forde ve ark., 2011).

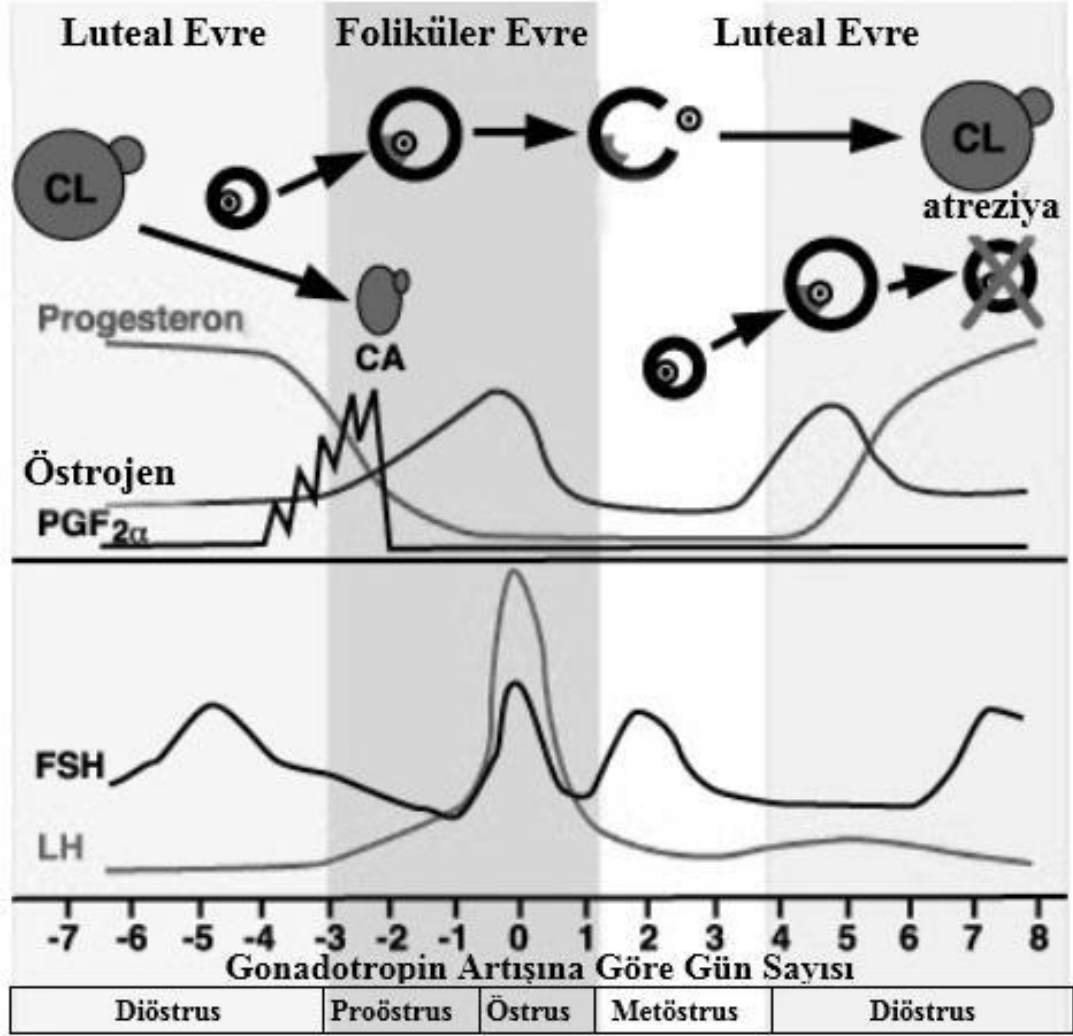
İki ligand IGF-I ve IGF-II, iki reseptör IGFR-I ve IGFR-II ve çok sayıda bağlayıcı protein ve proteazdan oluşan insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ailesi, ovaryum

folikülünde IGF-I'in biyoyararlanımından sorumludur. IGF-I, hipotalamus ve hipofizde östradiol kaynaklı negatif geri besleme mekanizmasını etkileyerek, seleksiyona uğrayan folikülün granüloza hücreleri tarafından LH-R'nin erken edinilmesini ve dolayısıyla folikül seçim sürecini kolaylaştırır. Ayrıca, oluşacak olan DF'nin büyümesine, çoğalmasına ve steroidojenik kapasitesine katkıda bulunur (Forde ve ark., 2011).

Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF) ailesi ise TGF, anti-müllerian hormon, inhibinler, aktivinler ve kemik morfogenetik proteinleri, TGF reseptörleri, aktivin reseptörü benzeri kinaz, alkalın fosfataz, aşağı akımı sinyalleme molekülleri gibi ligandlar da dahil olmak üzere yapısal olarak ilişkili 30'dan fazla protein içerir. Bu proteinler ilk olarak foliküler sıvıda salgılanan FSH modülasyonları yoluyla tanımlanmıştır. Bunlardan aktivin foliküler sıvıda östradiol üretimini artırabilirken follistatin, aktivinlerin pozitif steroidojenik etkilerini engeller. İnhibinler ise ön hipofizden salgılanan FSH'nın baskılanmasında ve östrus döngüsünün düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (Forde ve ark., 2011).

2.1.2. Östrus Siklusu Dönemleri ve Hormonal Mekanizması

Östrus siklusu, dişi hayvanların belirli bir süre için çiftleşmeyi kabul etmelerini ve dolayısıyla fertilizasyonun gerçekleşmesini sağlayan döngüsel ovaryum aktivitesini temsil eder (Forde ve ark., 2011). İnekler, mevsime bağlı olmayan poliöstrik hayvanlardır. Dolayısıyla yılın her döneminde östrus gösterebilmektedirler (Fails ve Magee, 2018).



Şekil 2.3. Östrus siklusu dönemleri ve hormonal değişimler (Anonim, 2022a).

Düvelerde östrus siklusları puberta dönemi ile başlar (Forde ve ark., 2011). Bu dönem ırk ve beslenme şekline göre değişmekle birlikte düveler, yetişkin vücut büyüklüğünün yaklaşık üçte ikisine ulaştıklarında ortaya çıkmaktadır. Düvelerde östrus siklusu ortalama 20 gün, ineklerde ise ortalama 21 gün civarı seyretmektedir (Fails ve Magee, 2018). Siklus, ilk 4-8 günü foliküler faz ve sonraki 14-18 günü de luteal faz olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Foliküler faz korpus luteumun regrese olması ile ovulasyon başlangıcına kadar geçen dönemdir ve proöstrus ve östrus safhaları bu faz içerisinde gerçekleşmektedir. Ovaryum foliküllerinin gelişimi, ovulasyon ve sonrasında oositin döllenmesine imkân verilecek şekilde ovidukta atılması olayları da foliküler faz aşamasında meydana gelmektedir. Luteal faz ise

ovulasyonun ardından korpus luteumun şekillendiği dönemdir ve siklusun metöstrus ve diöstrus safhalarını kapsamaktadır (Forde ve ark., 2011) (Şekil 2.3).

2.1.2.1. Proöstrus Dönemi

İneklerde proöstrus, gebeliğin şekillenmemesi ile önceki döngüde oluşan korpus luteumun uterustan salınan PGF2 α etkisiyle regrese olmasını takiben bir veya iki gün devam eden bir dönemdir (Fails ve Magee, 2018). Korpus luteumun gerilemesiyle birlikte bu dokudan sentezlenen progesteron seviyesi önemli ölçüde azalmıştır. Bu azalma hipotalamustan GnRH salınımını uyarır. Portal kan dolaşımı ile hipofizin ön lobuna gelen GnRH, buradan gonadotropinlerin (FSH ve LH) salınımını başlatır (Forde ve ark., 2011). Bu gonadotropinler ovaryuma gelerek foliküler gelişimi ve dolayısıyla foliküllerden östrojen salınımını başlatırlar. Böylelikle foliküler faza girilmiş olur. Foliküler büyümenin son olgunlaşma aşamaları bu faz içinde gerçekleşir. Foliküllerden emilerek kana geçen östrojenler, tübüler genital organlarda damarlaşmayı ve hücre gelişimini arttırarak östrus ve gebelik için hazırlık oluşturur. Proöstrusun sonlarına doğru ise çiftleşmeye hazırlık başlar (Fails ve Magee, 2018). Bu aşamada, uterus hafifçe genişler, endometriyumda konjesyon ve ödem gözlenir, uterus bezleri salgı aktivitesi artar. Vajinal mukoza hiperemik hale gelir ve yüzeysel katmanları kornifiye olur. Vulvada ise ödem, hiperemi ve sanguinöz akıntı gibi dış belirtiler gözlemlenir (Noakes ve ark., 2018).

2.1.2.2. Östrus Dönemi

Çiftleşmenin kabul edildiği bu dönem, ovulasyonun hemen öncesinde olgun foliküllerden salgılanan östrojenin artışı ile başlatılmaktadır. Genel olarak 12 ila 24 saat süren dönem, ineklerde ortalama 18 saat, düvelerde ise biraz daha kısa bir zaman dilimini oluşturmaktadır. Kızgınlık dönemi olarak da bilinen bu dönem, başka bir inek veya boğa tarafından üzerine atlanıldığında hareket etmeden duracağı süre olarak da tanımlanabilir (Fails ve Magee, 2018). Hayvan genellikle erkeği arar ve kendisiyle çiftleşmesine izin verir. Uterus, servikal ve vajinal bezler artan miktarda mukus salgılar ve bu salgı şeffaf vajinal akıntı halinde dışardan gözlemlenebilir. Ayrıca vajinal epitel ve endometriyum hiperemik ve konjesyone hale gelir ve serviks

gevşer. Östrus belirtileri başlangıcından 24 ila 32 saat sonra ovulasyon meydana gelir (Fails ve Magee, 2018; Noakes ve ark., 2018).

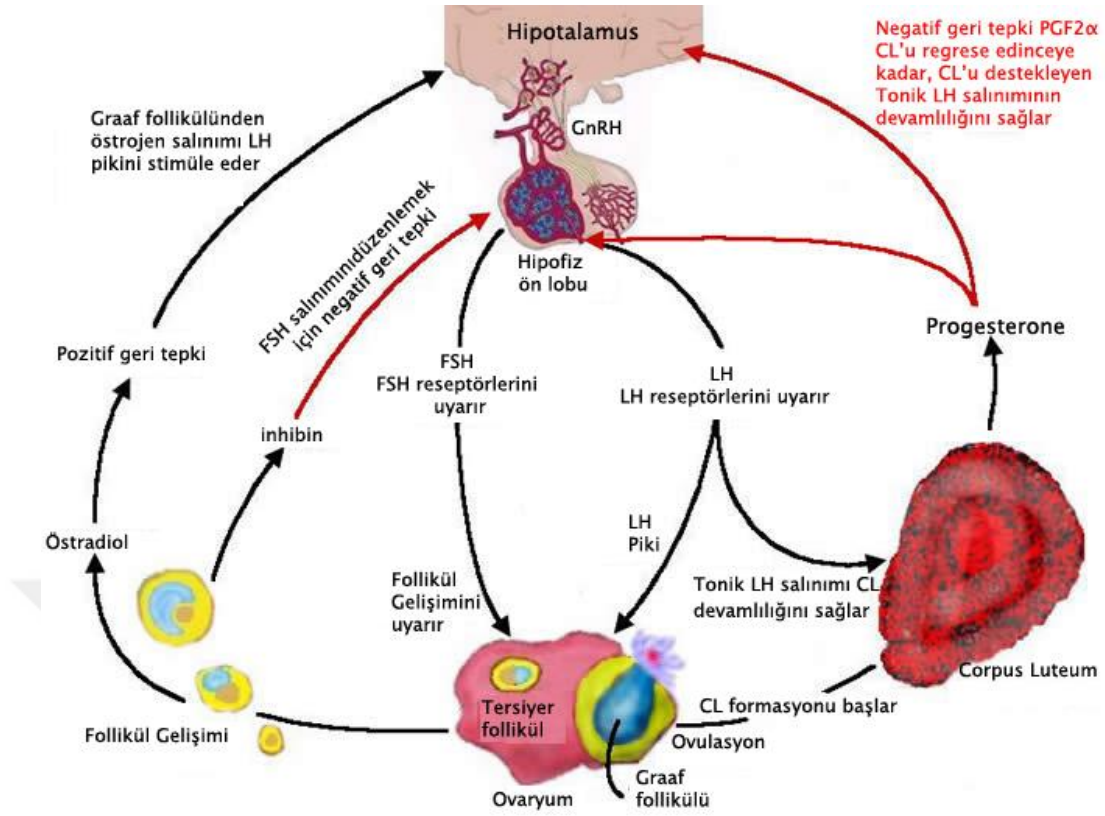
2.1.2.3. Metöstrus Dönemi

Çiftleşme isteğinin son bulması, korpus luteum fonksiyonunun egemen olduğu metöstrus döneminin başlamasına işaret etmektedir. Bu dönem yaklaşık 3-4 gün sürmektedir. Ovulasyon normal olarak inekte östrus bitiminden yaklaşık 10 ila 14 saat sonra metöstrus dönemi içerisinde görülmektedir. Ovulasyon ile folikül kollabe olarak önce korpus hemorajikuma, ardından korpus luteuma dönüşür. Bu süreçte folikül içindeki granüloza ve teka hücreleri de lüteinleşme evresine girer ve serum östrojen seviyesi azalırken progesteron seviyesi artar. Bu artış ile uterus üzerinde önemli değişiklikler meydana gelir. Endometriyal zar kalınlaşır, uterus bezleri büyür ve uterus kaslarında gelişim artışı gözlemlenir. Böylece gebeliğin oluşumu ve sürdürülmesine veya yeni bir östrus siklusuna hazırlık yapılmış olur. Plazma östrojen seviyesi azaldıkça dış genital organlar östrus öncesi durumuna geri döner. Servikal ve vajinal bezlerden salgılanan mukus miktarında bir azalma meydana gelir (Forde ve ark., 2011; Fails ve Magee, 2018; Noakes ve ark., 2018).

2.1.2.4. Diöstrus Dönemi

İneklerde yaklaşık 12-16 gün süren bu dönemde KL tamamen fonksiyoneldir ve yüksek seviyede progesteron salgılar. Progesteron negatif feedback ile hipotalamustan GnRH ve hipofizden FSH ve LH salınımını inhibe ederek foliküler gelişimi engeller (Kabakçı, 2017). Ayrıca progesteron etkisiyle uterus bezleri hipertrofi ve hiperplaziye uğrar, serviks daralır, genital sistem sekresyonları azalır ve yapışkan hale gelir, vajinal mukoza soluklaşır (Noakes ve ark., 2018).

Diöstrusun sonlarına doğru maksimum boyutuna ulaşan KL, herhangi bir gebelik durumu oluşmaması sonucu uterus endometriyumundan salınan PGF2 α etkisiyle gerileme sürecine girer ve buna bağlı olarak progesteron seviyesi azalır. Bu azalma ile hipotalamus ve hipofiz üzerindeki baskı kalkar ve yeni bir siklus başlamış olur (Forde ve ark., 2011) (Şekil 2.4).



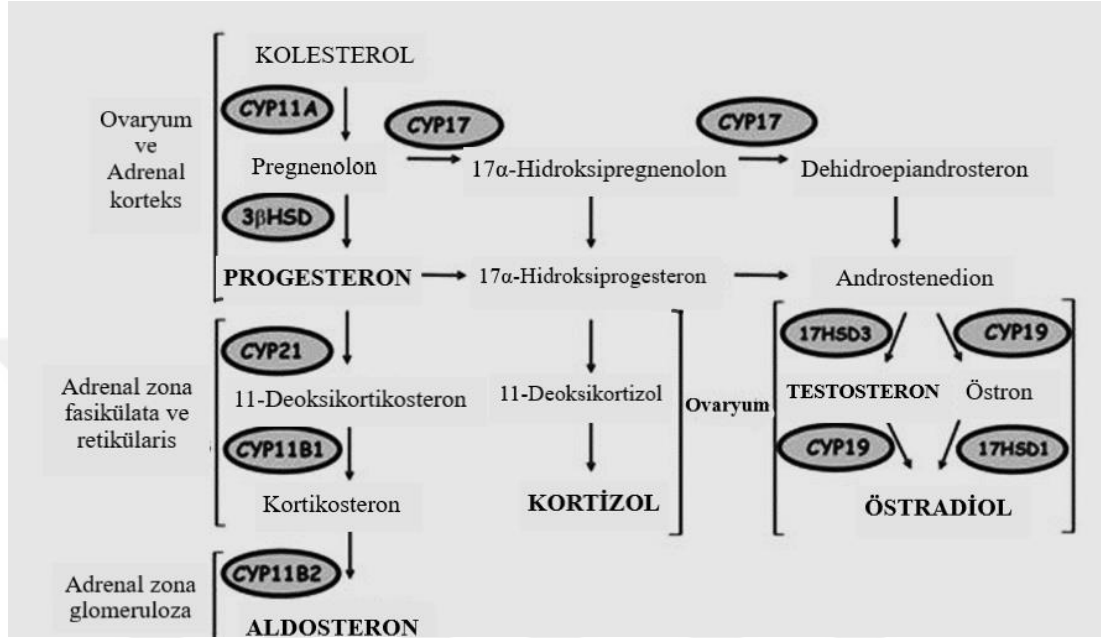
Şekil 2.4. Hipotalamus, hipofiz ve ovaryum arasındaki nöroendokrin ilişkiler (Anonim, 2022b).

2.1.3. Steroit Hormonlar

Steroid hormonlar gonadal ve adrenokortikal olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Temel gonadal steroidler östradiol, progesteron ve testosteron iken bunlarla benzer fizyolojik aktivite gösteren metabolitleri (östrojenler, projestinler ve androjenler) de bu gruba dahildir. Temel adrenokortikal steroidler ise aldosteron ve kortizoldur. Fizyolojik fonksiyonları oldukça farklı olsa da steroid hormonların ovaryum, testis ve adrenal bezde sentezlenmeleri sürecinde izlenen yol ortaktır. Tüm steroid hormonların ön maddesi kolesteroldür (Reece ve ark., 2015) (Şekil 2.5).

Asetattan sentezlenen veya kandan alınan kolesterol, hücrelerde pregnenolona ve sonrasında progesterona dönüştürülür. Progesterondan da üç farklı yolla aldosteron, kortizol ve andojenler üretilir. Östradiol ise androjenlerden elde edilmektedir. Ancak bu sentez mekanizmaları dokuda gerekli enzim varlığında çalışabilmektedir (Reece ve ark., 2015).

Bu kimyasal reaksiyonların çoğu tek yönlü çalışır. Örneğin, östradiol testosterona, testosteron da progesteron ve kolesterole dönüşemez. Steroidogenez yalnızca gonadlar ve adrenal kortekste sınırlı kalmayıp karaciğer, kaslar ve adipoz dokuda da gerçekleşmektedir (Reece ve ark., 2015).



Şekil 2.5. Adrenal bezlerde ve ovaryumlarda steroid hormonların biyosentezi (Payne ve Hales, 2004)

2.1.4. Östrojen ve Progesteron Hormonları

Östrusun fiziksel ve psikolojik belirtilerinin oluşumunda, dişilerde genital kanalın gebeliğe hazırlanmasında, laktopoez ve galaktojez süreçlerinde önemli rol oynayan östrojenler, ovaryum, plasenta, adrenal korteks ve az miktarda da testisten salgılanan steroid yapıda hormonlardır. Ovaryum folikülleri duvarından östradiol (primer östrojen), östron ve östriol olarak salınırlar. Dişilerde üreme organlarının gelişmesi ve seksüel karakterlerin belirginleşmesi, siklus sırasında hipotalamusa pozitif geri tepki ile gonadotropinlerin kontrolü gibi fonksiyonlarının yanı sıra vitamin ve mineral metabolizmaları üzerine de anabolik etkileri mevcuttur (Alaçam, 2010).

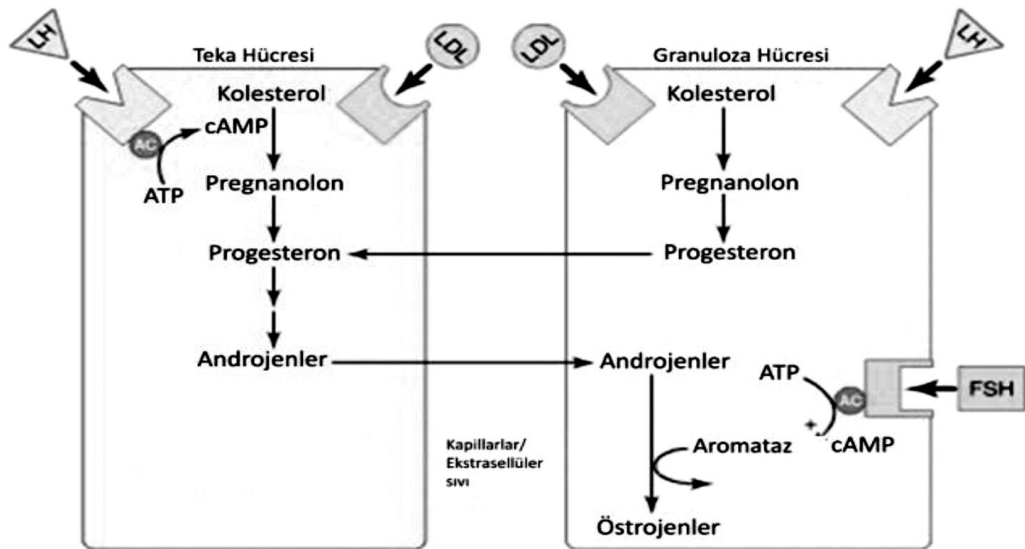
Vücudun ve özellikle üreme sisteminin önemli hormonlarından biri olan progesteron (P4), östrus döngüsünün düzenlenmesi ve embriyonun uterus duvarına tutunması gibi kritik süreçlerde görev alması nedeniyle steroid hormonlar arasında da önemli bir yere sahiptir. Çoğunlukla KL ve gebelik sırasında plasenta tarafından sentezlenen P4,

düşük miktarlarda adrenal korteks, testis ve ovaryum foliküllerinde de üretilmektedir. En önemli işlevi uterus kontaksiyonlarını önleyerek ve endometriyal doku gelişimini uyarak embriyonun implantasyonunu ve gebeliğin devamını sağlamaktır. Bunun yanında ovulasyona katkıda bulunmak, süt sentezi için meme dokusunun lobular ve alveoler yapısını geliştirmek ve doğum öncesi süt proteinleri üretimini engellemek, beyinde cinsel davranışları kontrol eden sinyalleri düzenlemek gibi önemli etkilere de sahiptir (Kabakçı ve Yiğit, 2019).

2.1.5. Granüloza Hücrelerinde Östrojen ve Progesteron Sentezi

Foliküler gelişimde önemli görevler üstlenen hormonlardan östrojen, granüloza hücreleri tarafından sentezlenirken, progesteron hem granüloza hem de teka hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Östrojen, folikülde granüloza hücrelerinin çoğalmasını uyarak FSH ve LH'nın etkisini kolaylaştırır (Hsueh ve ark., 1984).

Lüteinleştirici hormonun teka hücrelerindeki reseptörlerine bağlanması ile kolesterol pregnanolona çevrilir ve bir dizi öncül işlemlerden geçtikten sonra androjenler üretilir. Daha sonra androjenler granüloza hücrelerine geçiş yaparlar. Bu sırada granüloza hücrelerinde bulunan reseptörüne bağlanan FSH ise aromataz enzimi aktivitesini uyarak teka hücresinden gelen androjenlerin östrojenlere çevrilmesini sağlar (Drummond, 2006) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Steroit hormon sentezinde teka ve granüloza hücreleri arasındaki ilişki. (Dariyerli, 2011).

LDL: Düşük yoğunluktaki lipoprotein, cAMP: Siklik AMP, ATP: Adenozin trifosfat

Ovulasyondan hemen önce preantral folikülün granüloza hücreleri tarafından FSH'ya yanıt olarak düşük seviyelerde progesteron üretilir. Folikül uyarıcı hormon bu etkiyi P450 enziminin salınımını artırarak gerçekleştirir (Hillier, 2001). Sitokrom P450 enzimi (CYP11A), progesteron sentezinin ilk adımlarından biri olan kolesterolün pregnenolona dönüştürülmesinde rol oynar. Bununla birlikte FSH, pregnenolonu progesterona dönüştüren 3 β -HSD enziminin sentezlenmesini de uyarmaktadır (Hsueh ve ark., 1984).

2.2. Pestisitler

İnsan ve hayvan vücudu ile bitki ve cansız nesnelerin üzerinde ya da çevresinde yaşayan, bunun yanı sıra besin maddelerinin üretilmesinde, hazırlanmasında, depolanmasında ve tüketimi esnasında besin değerini azaltan veya hasara uğratan zararlıların etkisiz hale getirilmesi amacıyla kullanılan maddeler pestisit olarak sınıflandırılır (Kaya ve ark., 2002). Gelecekte tüm dünyada kendini ciddi ölçüde hissettirecek olan açlık sorunu, ekosistemde birim alandan daha fazla ürün alınmasıyla tolere edilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla kullanılan pestisitler ürün kaybına sebep olan hastalık etkenlerinin etkisiz hale getirilmesi için tarımsal üretimde, bahçecilikte, balık yetiştiriciliğinde, ormancılıkta, kereste korumacılığında, endüstriyel böcek kontrolünde, gıdaların saklanması, hayvancılıkta ve toplum hijyeninde yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Çağatay ve Çobanoğlu, 1997). Günümüzde binden fazla etken maddenin karışımı ile elde edilen yaklaşık 35.000 çeşit pestisit preparatı bulunmaktadır (Palüzar, 2013) ve bu sayıya her geçen gün yeni ruhsat alanlar eklenmektedir (Yiğit ve Kabakçı, 2020).

Pestisitlerin tarım alanlarındaki zararlılara karşı aşırı miktarda ve bilinçsiz bir şekilde kullanılması hava, su, toprak ve besin maddelerinin kontaminasyonuna yol açar. Bunun sonucunda da besin zincirine giren ve son tüketici durumundaki insanlara kadar bütün canlılar pestisit kalıntılarına maruz kalır (Kaya ve ark., 2002). Bu kalıntılar, etkileri irritasyondan dermatite, sistemik emilime bağlı olarak ölüme kadar değişebilen akut zehirlenmelere (Çağatay ve Çobanoğlu, 1997) ya da pestisit üretilen ve uygulanan alanlarda çalışma veya pestisit kalıntısı bulunan gıdaların az oranlarda defalarca alımı ile kanser, doğum anomalileri, nörotoksisite, nörodavranışsal bozukluklar, endokrinolojik ve immünolojik anormallikler ve fertilité üzerinde

istenmeyen durumlar ortaya çıkaran kronik zehirlenmelere neden olurlar (Palüzar, 2013; Chiali ve ark., 2013). Pestisitler, kullanıldıkları zararlı gruplarına ya da hedef alınan organizmaya göre; tarım alanlarındaki yabancı otlara karşı kullanılan herbisitler, mantar zararlılarına karşı kullanılan fungusitler ve böceklerle karşı kullanılan insektisitler olarak sınıflandırılırlar (Tiryaki ve ark., 2010). Herbisitler dünya genelinde kullanılan pestisitlerin %42'sini oluştururken, %27 oranında insektisitler, %22 oranında fungusitler, %9 oranında da dezenfektanlar ve diğer tarım kimyasalları kullanılmaktadır (Yiğit ve Kabakçı, 2020).

2.3. Endokrin Bozucu Herbisitler

Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre 2009 yılında 5.961 ton olan herbisit kullanımı 2020'de 13.250 ton olmuştur (TÜİK, 2021). Ülkemiz bu rakamlar ile 1990-2017 yılları arasında dünyada ilk 10 ülkenin gerisinde kalsa da pestisit ve herbisitlerin zararlı etkileri üzerine yapılan çalışmalar bilinçli tarım ilacı kullanımını üzerinde daha çok çalışılması gereken bir konu haline getirmiştir (Yiğit ve Kabakçı, 2020).

Herbisitler, kullanıldıkları alanlarda toprak erozyonu azaltmakta ancak, bununla birlikte herbisitlere dirençli yabancı otların gelişmesine de sebep olmaktadır. Ayrıca bu alanlara yakın bölgelerde yaşayan kuşların ve yararlı böceklerin barındığı bitkileri de yok etmeleri sonucu doğal dengeyi tahrip etmektedirler. Tarımsal üretimde yabancı ot temizliği insan eliyle veya makineyle yapıldığında üreticiler için bir maliyet oluşturur. Herbisit kullanımı bu maliyeti düşürebilir fakat gerek doğadaki canlı çeşitliliğine gerekse suları kirletmeleri ve/veya canlı vücudunda kalıntı bırakmaları nedeniyle insanlara ve suda yaşayan canlılara verdikleri onarılamaz hasarlar oldukça kaygı vericidir (Eyhorn ve ark., 2015).

Herbisitler ticari olarak ilk defa 1946 yılında kullanılmıştır fakat, bu kimyasalların zararlarına dair endişeler 2015 yılında Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından herbisit glifosat'ın kanserojen olarak ilan edilmesiyle başlamıştır (Yiğit ve Kabakçı, 2020).

Endokrin bozucu kimyasallar, zararlı etkileri nedeniyle yaklaşık son 20 yıldır dikkat çeken heterojen bir madde grubudur. Amerikan Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından, vücutta birçok fizyolojik süreci kontrol eden hormonların üretimine,

salınmasına, taşınmasına, metabolizmasına ve atılımına müdahale ederek homeostazisi bozan ekzojen ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Üreme sistemi göz önüne alındığında, bu kimyasallar etkilerini östrojen veya androjen aracılı işlevleri etkileyerek gösterirler. Endokrin bozucuların özellikle endojen maddeleri taklit ederek hormon reseptörlerini etkiledikleri ve endokrin regülasyonunun bozulmasına sebep oldukları iyi bilinmektedir. Bu hormon reseptörleri arasında endokrin bozucuların en çok etkileşime girdiği östrojen reseptörleri, androjen reseptörleri, tiroit hormon reseptörleri ve peroksizom proliferatör aktive reseptörleri bulunmaktadır. Ayrıca nükleer reseptörlerle etkileşimleri protein transkripsiyonu ve translasyonunda değişikliklere neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra, oksidatif stresi, DNA, lipid ve protein hasarını indükleyebildikleri, aynı zamanda birçok epigenetik modifikasyona ve sonucunda da kansere sebep olabildikleri belirtilmektedir (Köse ve ark., 2020).

Erkek ve dişi üreme hormonları üzerinde endokrin bozucu etki gösterdiği belirlenen alaklor, atrazin, diaminoklorotriazin, glifosat, klorofenoksi asitler, linuron, metribuzin, propazin, simazin, sodyum-n-metil-ditiyokarbamat, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) gibi 20'den fazla herbisit mevcuttur (Gupta, 2017).

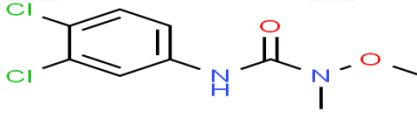
Herbisit Direnci Eylem Komitesi (HRAC) tarafından 2018 yılında açıklanan verilere göre etki şekilleri bakımından dünyada en yaygın kullanılan herbisitler; fotosentezi inhibe edenler, Asetolakto Sentetaz (ALS) enzimini engelleyenler, uzun zincirli yağ asitlerini inhibe ediciler, Protoporfirinojen Oksidaz enzimini inhibe edenler, mikrotubullerin birleşimini engelleyenler ve bitki büyüme hormonunu taklit ederek etki gösterenlerdir. Ülkemizde son yıllarda en fazla kullanım izni verilen herbisitler ise ALS enzimi inhibitörleri, Asetil CoA Karboksilaz inhibitörleri, fotosentezi engelleyenler ve bitki büyüme hormonunu taklit edenlerdir. Bu araştırmada kullanılan linuron, kloridazon ve metribuzin fotosentezi inhibe eden, sırasıyla üre ve tiyoüre, piridazinon ve triazinon grubuna dahil herbisitlerdir (Yiğit ve Kabakçı, 2020).

2.3.1. Linuron

2.3.1.1. Linuron'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Linuron, kokusuz, beyaz renkli, kristal formda bulunur ve suda çok az çözünmektedir (Chen, 2014). Linuron'a ait diğer genel bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Linuron'un fiziksel ve kimyasal özellikleri (Pubchem, 2021b)

Genel Adı	Linuron
IUPAC Adı	3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-
Diğer isimleri	Methoxydiuron
	N'-(3,4-Dichlorophenyl)-N-methoxy-N-methylurea
CAS Numarası	330-55-2
EC Numarası	206-356-5
Moleküler Formülü	C₉H₁₀Cl₂N₂O₂
Moleküler Ağırlığı	249.09 g/mol
Kimyasal Yapısı	
Renk / Form	Beyaz / Kristal
Kokusu	Kokusuz
Yoğunluğu	1,49 g/cm ³ (20 °C)
Buhar Basıncı	1.43x10 ⁻⁶ mm Hg (25 °C)
Kaynama Noktası	180-190 °C
Erime Noktası	93 °C
Sudaki Çözünürlüğü	75 mg/l (25 °C)

2.3.1.2. Linuron'un Kullanıldığı Alanlar

Linuron, tek yıllık ve çok yıllık geniş yapraklı ve çimenli yabancı otları kontrol etmek için bitkilerde yetiştirme öncesi ve sonrası kullanılan fenilüre grubu bir herbisittir. Hedefi yabancı otlarda fotosentezi engellemektir. Soya fasulyesi, pamuk, patates, mısır, fasulye, bezelye, kışlık buğday, kuşkonmaz, havuç ve meyve bitkilerine uygulanmaktadır (Chen, 2014).

2.3.1.3. Linuron'a Maruziyet Yolları

Linuron, deriye temas yoluyla vücuda girebildiği gibi, birincil maruziyet yolu kontamine besin kaynaklarının (yiyecek veya su) oral yolla alınması olarak kabul edilmektedir. Kabul edilebilir günlük alım miktarı 0.005 mg/kg/gündür (Chen, 2014).

Linuronun orta derecede kalıcı olduğu, yarı ömrünün 30 ila 150 gün arasında değiştiği belirtilmiştir. Ayrıca organik içeriği düşük topraklarda etkinliğinin arttığı, emilim ve mikrobiyal bozunma süreçleri ile yeraltı suyuna göçünün sınırlandığı; bu nedenle de daha çok yüzey sularına karışabileceği bildirilmiştir (Chen, 2014).

Linuronun da dahil olduğu poliüre herbisitlerine genel olarak sığırların, koyun, kedi ve köpeklerden daha duyarlı olduğu da bildirimler arasındadır (Gupta, 2012).

2.3.1.4. Linuron'un Toksik Etkileri

Linuron etkisini androjen reseptörü antagonisti olarak, androjen reseptörüne bağlanmak için testosteron ile rekabet ederek gösterir. Fare dokularında konsantrasyonla orantılı olarak dihidrotestosteron tarafından indüklenen androjen reseptörü transkripsiyonunu rekabetçi bir şekilde bloke ettiği bildirilmiştir (Chen, 2014).

Katsanou ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada da gebeliğin 6-21. günleri arasında 1.5-50 mg/kg c.a./gün linuron verilen sıçanların erkek yavrularında steroid hormonların sentezine aracılık eden StAR, Cyp11A1, Cyp17A1 gibi genlerin ekspresyon düzeylerinde bir farklılık görülmediği bildirilmiştir. Ding ve ark. (2017) ise oral gavajla gebeliğin 13-18. günleri arasında günde bir kez 50, 100, 150 ve 200 mg/kg linuron verilen annelerden doğan erkek yavru ratlarda Leydig hücrelerinde testosteron sentezinden sorumlu P450scc, 3 β -HSD ve prolifer edici hücre nükleer antijen (PCNA) ekspresyonlarında azalma görmüşlerdir. Gebeliğin 13-18. günlerinde de oral olarak günlük 12.5, 25, 50 ya da 75 mg/kg linuron verilen ratlarda, 50 ve 75 mg/kg'lık dozların androjene bağlı dokularda malformasyonlar oluşturarak fetal testosteron seviyelerinin önemli ölçüde azalttığını ancak, Insl3, Cyp11A1, Cyp17A1 ve StAR mRNA ekspresyonlarının değişmediği, fetal testislerin *in vitro* ortamda 1–300 μ M linuron ile inkübe edilmesi sonucunda 30 μ M ve üzeri dozda linuronun testosteron seviyesini önemli ölçüde azalttığı da bildirimler arasındadır (Wilson ve

ark., 2009). McIntyre ve ark. (2000) da gebeliğin 12-21 günleri arasında uterus içi günlük 12.5, 25, 50 mg/kg verdikleri ratlarda linuronun en düşük dozda dahi androjen antagonisti gibi hareket ederek erkek yavrularda androjen bağımlı dokularda malformasyonlara neden olduğunu, testosteron kaynaklı reproduktif gelişmeyi baskıladığını bildirmişlerdir. Linuronun hem *in vivo* hem de *in vitro* etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda da bir androjen reseptör antagonisti olduğu gösterilmiştir (Fang ve ark., 2003; Lambright ve ark., 2000). Cook ve ark. (1993)'nın erkek ratlara 2 hafta süre ile 200 mg/kg linuron verdikleri bir araştırmada erkek eklenti bezleri ağırlıklarının kontrol grubuna göre azaldığı, seksüel olgunluğa ulaşmış ratlarda serum E2 ve LH düzeyinin arttığı ve artan LH ile birlikte Leydig hücre tümörü oluşumunun indüklendiği belirlenmiştir. Ayrıca linuronun androjen reseptörlerine bağlanarak testosteron ile yarıştığı ve bu şekilde antiandrojenik etki yaptığı ortaya konulmuştur. Gebeliğin 12-20. günleri arasında uterus içi 50 mg/kg/gün linurona maruz bırakılan erkek rat fetüslerinde epididimis ve vas deferenste malformasyonlar oluşmuş, linuronun büyüme faktörü sinyali ve doku morfogenezinden sorumlu genlerin ekspresyon düzeyini değiştirdiği belirlenmiştir (Turner ve ark., 2003).

Schmutzler ve ark. (2007) ise bir sıçan tiroit modeli olan FRTL-5 hücrelerine linuron uygulayarak yaptıkları çalışmada, linuronun tiroit reseptör agonisti olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada; linuronun 200 mg/kg dozda mide entübasyonu ile gebe ratlara gebeliğin 6-15. günleri arasında verilmesi sonucunda fetüslerde göğüs kemiği, kaburgalar ve ekstremitelerde defektlere yol açması gibi teratojenik etkiler olduğu belirlenmiştir (Khera ve ark., 1978).

Atrazin ve linuronun genotoksik etkilerini belirlemek için tek başına ve kombinasyon halinde *in vitro* test edildiği bir çalışmada 0.5 µg/ml linuron ve 0.0005 µg/ml atrazine maruz kalan insan lenfositlerinde önemli kromozom hasarı gözlenmiştir (Roloff ve ark., 1992). Beagle ırkı köpeklerle yapılan kronik toksisite çalışmalarında, linuron kırmızı kan hücresi tahribatına ve karaciğer ağırlığında değişikliklere neden olduğu, sıçanların kullanıldığı uzun süreli çalışmalarda ise, testis tümörleri, kırmızı kan hücresi hasarı ve büyüme geriliğine yol açtığı kaydedilmiştir. Kronik uygulamalarında farelerde karaciğer tümörlerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar, vücut ağırlığında azalma ve artan karaciğer ağırlıkları rapor edilmiştir (Chen, 2014).

İnsan prostat (LNCaP) hücre hattına 100 µM dozda uygulanan linuronun önemli ölçüde sitotoksik etki gösterdiği de bildirimler arasındadır (Lorenzetti ve ark., 2010).

Koyunlarda yapılan çalışmalarda da linuronun, hipohemoglobinemi ve hipoproteinemi, hematüri ve ataksi, enterit, karaciğer dejenerasyonu ve kas distrofisi ile birlikte eritrositoz ve lökositoya neden olduğu belirtilmiştir (Gupta, 2018).

2.3.1.5. Linuron'un Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

İnek luteal hücreleri üzerine linuronun etkilerini inceleyen bir araştırmada 50 µM'lık dozun progesteron sekresyonu üzerine etkisinin olmadığı, 100 ve 200 µM'lık dozların ise progesteron salınımını baskıladığı gösterilmiştir (Bilmen ve ark., 2016).

İnekten elde edilen miyometriyal, endometriyal, granüloza ve luteal hücrelerle yapılan bir çalışmada (Wrobel ve Mlynarczuk, 2017) da 0.1, 1 ve 10 ng/ml dozlarındaki linuronun 72 saat sonra en yüksek dozda dahi hücreler için toksik etki göstermediği ve canlılıklarını etkilemediği bildirilmiştir. Aynı araştırmada herbisit in myometriyumda ve endometriyumda prostaglandin F2α (PGF2α) sentezini etkilemediği, sadece en düşük dozunun endometriyumda prostaglandin E2 (PGE2) salınımını azalttığı ve bütün dozlarının da bazal ve oksitosin uyarımlı myometriyal kontraksiyonları zayıflattığı bulgular arasındadır. Linuronun granüloza hücrelerinde oksitosin ve östrojen salınımına etki etmediği ancak, 0.1 ve 10 ng/ml dozlarda testosteron sekresyonunu uyarıcı etki gösterdiği, luteal hücrelerde ise 0.1 ve 10 ng/ml'lik dozda oksitosin salınımını arttırdığı ve 1 ng/ml'lik dozda progesteron sentezini baskıladığı da bildirilmektedir.

Linuronun farklı dozlarda diğer endokrin bozucu kimyasallarla karışımının perinatal olarak gebe ratlara uygulandığı bir çalışmada (Johansson ve ark., 2016) ise plazma prolaktin düzeylerinde azalma, ovaryum ağırlıklarında düşme ve östrus döngüsünde düzensizleşme görülmüştür.

2.3.2. Kloridazon

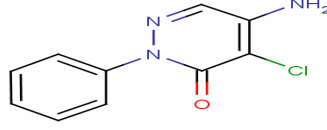
2.3.2.1. Kloridazon'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Organoklor grubu herbisitlerden kloridazon (5-amino-4-kloro-2-fenilpiridazin-3 (2H)-one), BASF Aktiengesellschaft tarafından 1960'ların başında geliştirilen bir

kimyasaldır, günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sistemik yaprak ve toprak herbisiti olan bu pridazinon bileşiği, bitkilerde fotosentezi engelleyerek etki göstermektedir (Suwalsky ve ark., 1998).

Kloridazonun toprakta kalıcılığı, karanlık ve aerobik koşullarda yüksek olabilmekte, su ve toprakta çevresel bozunması fotoliz desteği ile gerçekleşmektedir (Tomlin, 2006). Kloridazon'a ait bazı genel bilgiler Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kloridazon'un fiziksel ve kimyasal özellikleri (Pubchem, 2021a)

Genel Adı	Kloridazon
IUPAC Adı	5-amino-4-chloro-2-phenylpyridazin-3-one
Diğer isimleri	(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl) methanol
	Pyrazon
	5-amino-4-chloro-2-phenyl-3 (2H)-pyridazinone
CAS Numarası	1698-60-8
EC Numarası	216-920-2
Moleküler Formülü	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O
Moleküler Ağırlığı	221.64 g/mol
Kimyasal Yapısı	
Renk / Form	Renksiz / Katı
Kokusu	Kokusuz
Yoğunluğu	1.54 g/cm ³ (20 °C)
Buhar Basıncı	4.50x10 ⁻⁷ mm Hg (20 °C)
Kaynama Noktası	312,2 °C (760 mm Hg)
Erime Noktası	206 °C
Sudaki Çözünürlüğü	400 mg/l (20 °C)

2.3.2.2. Kloridazon'un Kullanıldığı Alanlar

Kloridazon, çoğunlukla şeker pancarlarının yetiştirildiği tarım alanlarındaki tarla akça çiçeği, büyük ballıbabı, kaz ayağı, hardal ve yakup otu gibi geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmek için yetiştirme öncesi ve sonrası kullanılan bir organoklorin herbisittir. Ayrıca soğanlı bitkiler ve güller de dahil olmak üzere süs bitkilerinde de kullanılmaktadır (Sánchez-Martín ve Sánchez-Camazano, 1991).

2.3.2.3. Kloridazon'a Maruziyet Yolları

Kloridazona maruziyet genellikle oral, dermal ve inhalasyon yollarıyla gerçekleşmektedir. Kloridazon hem üretimi aşamasında çeşitli atıklar yoluyla hem de bazı sebze ve süs bitkilerinde herbisit olarak kullanılması ile çevreye doğrudan salınabilmektedir, 20 °C'de 4.5×10^{-7} mm Hg'lık bir buhar basıncında havaya karışması halinde, kloridazon atmosferde hem buhar hem de partikül fazlarında bulunabilir. Buhar fazlı kloridazon, fotokimyasal olarak üretilen hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek atmosferde bozunacaktır; havadaki bu reaksiyonun yarı ömrünün 10 saat olduğu tahmin edilmektedir. Partikül fazlı kloridazon ise ıslak veya kuru çökeltme yoluyla atmosferden uzaklaştırılmaktadır. Kloridazon, simüle edilmiş güneş ışığında 150 saatlik bir yarı ömür sergilemiş ve bu nedenle güneş ışığı ile doğrudan fotolize duyarlı olabileceği belirtilmiştir (Pubchem, 2021a). Kloridazon çeşitli toprak tiplerinde hareket edebilir veya toprakta ve suda kalıcılık gösterebilir. Toprakta fotoliz yarı ömrü 69 gün iken, aerobik toprakta yarı ömür 90 ile 152 gün arasındadır. Kloridazonun fotoliz ile suda bozunma süresi ise 12,5 gün olarak belirlenmiştir. Topraktan yüzeye veya yeraltı sularına taşınması mümkündür ve bu nedenle su kaynaklarında kirliliğe neden olabilecek kirleticiler kategorisindedir (USEPA, 2005).

2.3.2.4. Kloridazon'un Toksik Etkileri

Kloridazonun rat, fare ve köpeklerde de vücut ağırlığını etkilediği, karaciğer ve böbreklerde toksisiteye neden olduğu, köpeklerde çok yüksek dozun çok kısa bir sürede gastrik mukozayı etkilediği bilinmektedir (EFSA, 2016).

Kloridazonun insan eritrositleri hücre zarına olumsuz etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 0,1 mM dozun eritrositlerde çentik oluşumunu tetiklediği ortaya konulmuştur (Suwalsky ve ark., 1998).

Kromozom hasarlarının araştırıldığı *in vitro* çalışmalarda ; 7×10^{-6} M, 7×10^{-5} M ve 7×10^{-4} M konsantrasyonlardaki kloridazonun koyun ve sığır periferik lenfositlerinde mikronükleus (MN) indüksiyonu üzerine etkili olduğu, ayrıca sığır lenfositlerinde kromozom anomalilerine ve kardeş kromatit değişikliklerine neden olduğu tespit edilmiştir (Piesova, 1998; Šivikova ve ark., 1999). Kloridazonun DNA hasarının

değerlendirilmesi yoluyla genotoksik potansiyeli araştırılmış, spektrofotometri ve spektropolarimetri ile izlenmiş ve DNA molekülünde önemli konformasyonel değişiklikler oluşturduğu rapor edilmiştir (Mehd ve ark., 2009). Ayrıca kloridazon gibi bir pridazinon türevi olan LCS-1'in 250 µM dozda, bir antioksidan olan SOD1 enzimini inhibe ederek insan lösemi (HL-60) hücrelerinin canlılıklarını azalttığı da bildirimler arasındadır (Steверding ve Barcelos, 2020).

2.3.2.5. Kloridazon'un Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Kloridazonun üreme ve gelişimsel etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, rat fetüslerinin rezorbsiyonuna neden olduğu ve hamster fetüslerinde ise kaburga ve kuyruk anomalilerine yol açtığı belirtilmektedir (Schardein, 2000). Ayrıca ratlarda yapılan bir çalışmada, uterus epitel hücrelerinde hipertrofiye sebep olduğu ve neonatal ratlarda vajinanın açılma süresini kısaltarak östrojenik etkiler oluşturduğu (Vargová ve ark., 1995) bildirilmiş olup, bu etkilerini östrojen reseptörlerine bağlanarak gösterdiği düşünülmektedir (Kojima ve ark., 2004).

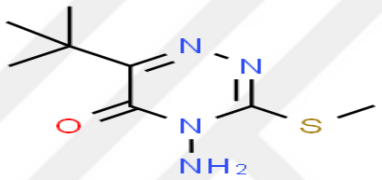
2.3.3. Metribuzin

2.3.3.1. Metribuzin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Metribuzin (4-amino-6-(1,1-dimetil-etil)-3(metiltio)-1,2,4-triazin-5(4H)-1), metiltiotriazin kimyasal türevlerine ait, duyarlı bitki türlerinin fotosentezini engelleyen seçici bir herbisittir (Fountoulakis ve ark., 2010).

Metribuzin'e ait bazı genel bilgiler Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Metribuzin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri (Pubchem, 2021c)

Genel Adı	Metribuzin
IUPAC Adı	4-amino-6- <i>tert</i> -butyl-3-methylsulfanyl-1,2,4-
Diğer İsimleri	4-amino-6- <i>tert</i> -butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one
	4-amino-6- <i>tert</i> -butyl-3-(methylsulfanyl)-1,2,4-triazin-5(4H)-one
	4-Amino-6-Tert-Butyl-3-(Methylthio)-1,2,4-
CAS Numarası	21087-64-9
EC Numarası	244-209-7
Moleküler Formülü	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS
Moleküler Ağırlığı	214.3 g/mol
Kimyasal Yapısı	
Renk / Form	Beyaz / Kristal
Kokusu	Zayıf karakteristik koku
Yoğunluğu	1,28 g/cm ³ (20 °C / 4 °C)
Buhar Basıncı	4.35x10 ⁻⁷ mmHg (20 °C)
Kaynama Noktası	132 °C
Erime Noktası	126,2 °C
Sudaki Çözünürlüğü	1050 mg/l (20 °C)

2.3.3.2. Metribuzin'in Kullanıldığı Alanlar

Metribuzin, geniş yapraklı yabani otları ve çimenli yabancı ot türlerini seçici olarak kontrol etmek için bitkilerde yetiştirme öncesi ve sonrası için kullanılan geniş spektrumlu bir herbisittir. Genellikle soya fasulyesi, patates, mercimek, bezelye, domates, yonca, kuşkonmaz, mısır, hububat ve şeker kamışı gibi ürünlere uygulanır (Roberts, 1998; Chiali ve ark., 2013).

2.3.3.3. Metribuzin'e Maruziyet Yolları

Genel popülasyonun bu herbisite maruz kalması, herbisit ile muamele edilen gıdaların tüketilmesiyle ortaya çıkabilir. Gıdalarda herbisitlerin varlığı, hem akut

hem de kronik etkileri olabileceğinden büyük bir endişe kaynağıdır (Alavanja ve ark., 2004; Bassil ve ark., 2007).

Suda eriyebilirliğinin çok yüksek olmasından dolayı metribuzin yer altı sularına karışma ihtimali en yüksek olan herbisitlerden biri olarak bildirilmiştir (USEPA, 2003). Milano’da yapılan bir çalışmada (Loffredo ve ark., 2021) toprağın en üstteki 0-5 cm’lik tabakasında da konsantrasyonu 5.84 µg/g olarak bulunmuştur ve bu bölgedeki bitkilerin kök ve filizlerinde de az miktarlarda metribuzin tespit edilmiştir.

2.3.3.4. Metribuzin'in Toksik Etkileri

Hem dişi hem de erkek Sprague-Dawley sıçanlara içme suları ile metribuzinin verildiği bir çalışmada dişilerde hipertirodiye neden olduğu, erkeklerde de tiroksin ve somatotropin seviyesini artırdığı belirlenmiştir (Porter ve ark., 1993).

In vitro ortamda insan ve sıçan dalak lenfositleri metribuzine maruz bırakıldığında düşük konsantrasyonların (1-10 µM) lenfosit proliferasyonu için sitokin üretimini aktive ettiği, yüksek konsantrasyonların (25-100 µM) ise, lenfosit proliferasyonunun ve sitokinlerin doza bağlı inhibisyonunu indüklediği, oksidatif stres indüksiyonu ile immünomodülatör özellik gösterdiği gözlenmiştir (Medjdoub ve ark., 2011). Medjdoub ve ark. (2016)’nın insan lenfosit kültürleri ile yaptıkları benzer bir araştırmada da 50 µM dozda metribuzinin lenfositlerin proliferasyonu için gerekli uyarımı sağlayan sitokin sekresyonunu azaltarak immunsupresif etki oluşturduğu gösterilmiştir. Değişik dozlarda metribuzin (0.3-1000 mg/L) ve triazin türevi ametrinin (1.5-1000 mg/L) doğrudan insan lenfosit kültürlerine eklendiği başka bir deneyde ise 48 saat sonrası, 1.5 mg/L ve üzerindeki metribuzin ve 6.5 mg/L ve üzerindeki ametrinin hücresel ölümü meydana getirdiği tespit edilmiştir (Flores-Maya ve ark., 2005).

İnsanların diyet yoluyla maruz kalmasını taklit eden dozlarda kronik metribuzin maruziyetinin *in vivo* etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, erkek ve dişi sıçanlara 3 ay boyunca düşük dozlarda (1,3 mg/kg, 13 mg/kg) metribuzin içeren bir patates diyeti verilmiş, vücut ağırlığı, gıda alımı ve plazma glikozu, trigliserit, üre, kreatinin, ALT ve AST seviyelerinde artış gibi biyokimyasal parametrelerde olumsuz değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda bile organ

fonksiyonları üzerinde fizyolojik bozulmaya yol açan olumsuz etkileri tespit edilmiştir (Chiali ve ark., 2013).

Altmış günlük erkek Wistar sıçanlarına günlük olarak uygulanan yüksek dozlarda yine bir triazin türevi atrazinin (50 veya 200 mg/kg/gün), bu bireylerin serumundaki androstenedion, testosteron, östradiol, östron, progesteron ve kortikosteron gibi çeşitli hormon seviyelerinde hafif artışlara neden olduğu gözlemlenmiştir (Modic, 2004).

Pestisitlerin insan mineralokortikoid reseptörlerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Zhang ve ark., 2018), atrazin metaboliti disisopropil atrazin ve yine triazin grubu herbisitlerden terbutilazinin aldosteron antagonisti olduğunu, insan vasküler düz kas hücrelerinde mineralokortikoide yanıt veren aldosteron kaynaklı Alk (alkalin fosfataz) gen ekspresyonunu %50'den fazla artırdığını göstermişlerdir.

Sprague-Dawley sıçanlarında 25, 100 ve 200 mg/kg/gün dozlarında atrazinin teratojenik ve embriyotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada (Wu ve ark., 2007), doğum öncesi maruziyet ile herbisit en yüksek dozu, yeni doğan erkek sıçanların %10.23'ünde hipospadias ve en düşük dozu ise bazı bireylerde çeşitli embriyotoksik hasarlara neden olmuştur.

Genotoksisitelerini araştırmak için, farelerin intraperitoneal enjeksiyonla maksimum tolere edilen dozlara kadar triazinlere maruz bırakıldığı bir çalışmada, atrazin ve siyanazinin lökositlerde DNA hasarında doza bağlı artışa neden olduğu gösterilmiştir (Tennant ve ark., 2001). Atrazin ayrıca kemirgenlerde sitogenetik hasarları indüklemeye yeteneğini değerlendirmek için test edilmiş ve 20 ppm dozda atrazin sıçanların içme sularına katıldığında kromozom sapmalarının sayısında artış ile anomalilere neden olduğu gözlemlenmiştir (Meisner ve ark., 1992).

İnsan nöroblastom (SH-SY5Y) hücre hattına değişik konsantrasyonlarda (5-25-50 µg/mL) muamele edilen atrazinin 24 saatlik inkübasyonun ardından 25 µg/mL (yaklaşık 116 µM) dozda hücre canlılığını önemli oranda azalttığı belirtilmiştir (Abarikwu ve Farombi, 2015).

2.3.3.5. Metribuzin'in Dişi Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Metribuzin'in üreme sistemi üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanılamasa da metribuzin gibi triazin türevi bir herbisit olan atrazinin 0.1, 1 ve 10 ng/ml dozlarında inek uterus ve ovaryum hücrelerine uygulandığı bir çalışmada granüloza hücreleri için sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir. Endometriyum ve myometriyumda prostaglandin F2 α (PGF2 α) salınımını etkilemezken, yalnızca en düşük dozunun endometriyumdan salınan prostaglandin E2 (PGE2) seviyesini düşürdüğü ve yüksek dozda ise spontan ve oksitosin kaynaklı myometriyal kontraksiyonları azalttığı gösterilmiştir. Granüloza hücrelerinde atrazinin 1 ng/mL dozda oksitosin salınımını ve tüm dozlarda da testosteron ve östrojen salınımını artırdığı, luteal hücrelerde ise en yüksek dozunun progesteron salınımını azalttığı bildirilmiştir (Wrobel ve Mlynarczuk, 2017).

Domuz granüloza hücrelerinin 0.1, ve 10 μ M dozda atrazin ile 48 saat inkübe edildiği *in vitro* bir çalışmada da atrazinin granüloza hücre canlılığını ve proliferasyonunu etkilemediği, 0.1 μ M dozda östrojen sentezini azaltırken, 10 μ M dozda progesteron sentezini artırdığı gözlemlenmiştir (Basini ve ark., 2012).

Ayrıca atrazinin 2 mg/kg dozunun domuzlarda ovaryumlarda multipl kistlere ve persistent KL'a neden olduğu, serum östradiol düzeyini düşürürken progesteron seviyesini artırdığı (Gojmerac ve ark., 1996; Gojmerac ve ark., 1999), ratlara *in vivo* uygulanan 300 mg/kg dozun yeni oluşmuş korpus luteumda serum progesteronunu artırdığı, StAR, Cyp11A1 ve 3 β -HSD ekspresyonlarını artırırken 17 β -östradiole dönüşümü sağlayan 17- β HSD'yi düşürdüğü gösterilmiştir (Taketa ve ark., 2011).

Pogrmic-Majkic ve ark. (2014)'nın yaptıkları çalışmada FSH ile uyarılan rat primer granüloza hücreleri 20 μ M atrazine maruz bırakılınca, hücrelerde FSH duyarlılığını artırarak cAMP, AKT ve CEBPB sinyallerinde ve progesteron üretiminde belirgin bir artışa neden olduğu görülmüş, ayrıca luteal markırlar olan StAR ve Cyp11A1 ekspresyonunda aşırı artış ve progesteron/östradiol oranında bozulmalara rastlanılmıştır. Benzer bir çalışmada da aynı dozda atrazin uygulamasının Cyp19A1 ve LH-R (LH reseptörü) ekspresyonunu azalttığı ve bu nedenle östradiol üretiminde de azalma olduğu bildirilmiştir (Fa ve ark., 2013). Tinfo ve ark. (2011) ise 10 ve 30 μ M atrazinin rat granüloza hücrelerinde testosteronu östradiole dönüştüren aromataz

enzimi aktivitesini ve östradiol üretimini, 1-30 μ M dozda ise progesteron üretimini artırdığını bildirmişlerdir. Holloway ve ark. (2008) da insan granüloza hücreleri ile yaptıkları çalışmada östradiol sentezini artırdığı bulgusuna ulaşmışlardır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

1. Hepa filtreli hava filtrasyon cihazı (Light Process, UV-FAN M2/55P-H-JON)
2. Biyolojik hava kabini (Esco Class II BSC)
3. Karbondioksitli inkübatör (Binder, CB 150)
4. Santrifüj cihazı (Hettich, EBA 21)
5. Ultra saf su cihazı (Millipore, Elix-5, Synergy 185)
6. Hassas terazi (Sartorius, CP225D)
7. Vorteks (Stuart, SA8)
8. Çalkalamalı su banyosu (Julabo, SW23)
9. Isıtmalı manyetik karıştırıcı (IKA-RET, Basic)
10. Masaüstü buharlı sterilizatör (Systec, 2540EL)
11. Paketleme cihazı (Euroseal, 2001 Plus)
12. Etüv (Nüve, EN 055)
13. Otomatik hücre sayım cihazı (Life Technologies, Countess II)
14. Mikropleyt okuyucu (Thermo Scientific, Multiskan Go)
15. Mikroplak çalkalayıcı (Isolab, I.613.11.001)
16. Otoanalizör (Roche Diagnostics, Cobas e601)

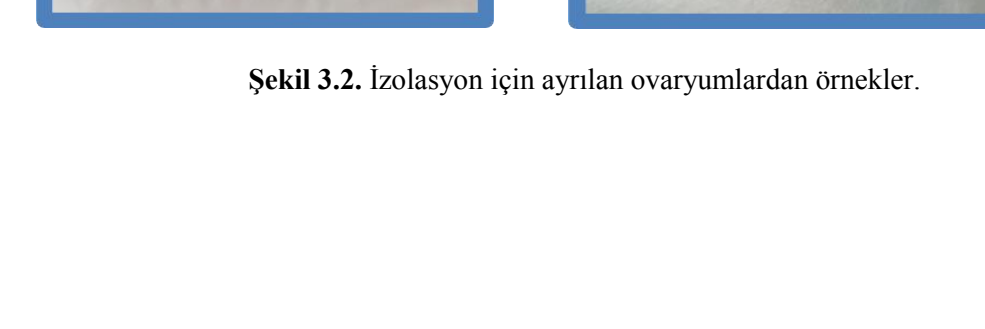
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu / F-12 Ham Besin Karışımı (Sigma, D6421, ABD)
2. Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu / F-12 Ham Besin Karışımı (Fenol kırmızısı içermeyen) (Sigma, D6434, ABD)
3. ITS Premiks (Sigma, I3146, ABD)
4. Antibiyotik/ Antimikotik Solüsyon (Sigma, A5955, ABD)
5. Yenidoğan Buzağı Serumı (Sigma, N4637, ABD)
6. Tripan Mavisi Solüsyonu (Sigma, T8154, ABD)
7. L-Glutamin (Sigma, G7513, ABD)
8. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu Tableti (Sigma, P4417, ABD)
9. Pursept(R)-AF Yüzey dezenfektanı (Sigma, Z637386, ABD)
10. Deoksiribonükleaz (Sigma, D5025, ABD)
11. 4-Androstene-3, 17-dione (Sigma, 46033, ABD)
12. Dimetil Sülfoksit (Sigma, D2650, ABD)
13. Etanol (Sigma, 34870, ABD)
14. WST-1 kiti (Abcam, ab155902, İngiltere)
15. Linuron (Sigma, 36141, ABD)
16. Kloridazon (Sigma, 45385, ABD)
17. Metribuzin (Sigma, 36165, ABD)

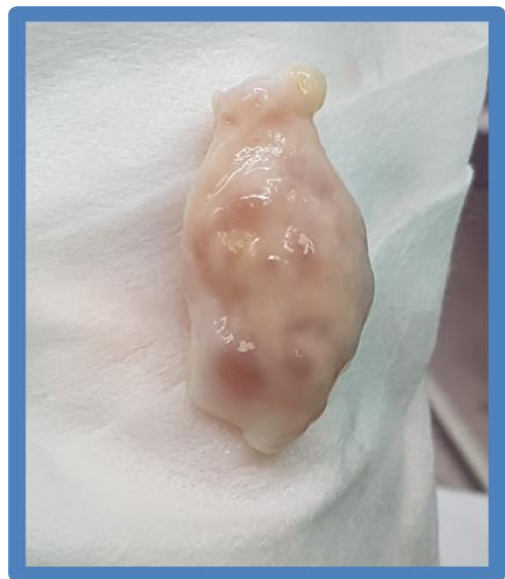
3.2. Yöntem

3.2.1. Hücrelerin İzolasyonu

Araştırmaya hazırlık amacıyla deneyden bir gün önce; tüm cam ve metal malzemeler tek tek paketlenerek otoklavda sterilize edildi, steril plastik malzemeler hazırlandı, laboratuvar dezenfekte edildi ve ultra saf su ile PBS (Phosphate Buffered Saline)

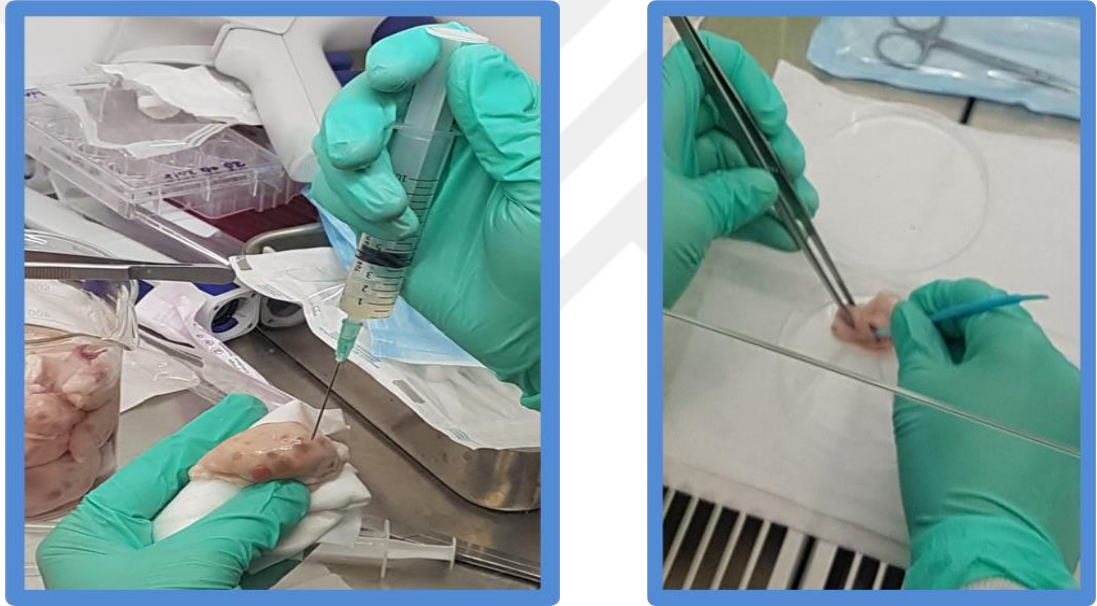


Şekil 3.2. İzolasyon için ayrılan ovaryumlardan örnekler.



32

Hücreler Glistler ve ark. (2001)'nın granüloza hücre izolasyonu yöntemi modifiye edilerek izole edildi. Ovaryumlar çözelti berraklaşana kadar defalarca PBS çözeltisi ile yıkandı (Şekil 3.2). Yüzey dezenfeksiyonunu sağlamak için %70'lik etanolden geçirilen ovaryumlar, biyolojik hava kabini içine, antibiyotikli steril PBS içeren bir behere nakledildi. Ovaryum üzerindeki 3-6 mm çapındaki foliküllerden 21 gauge kanüllü enjektör ile folikül sıvıları aspire edildi ve antibiyotikli PBS içeren falkon tüpe aktarıldı. Ayrıca steril bir petri üzerinde, sıvısı aspire edilmiş foliküllerde kalan granüloza hücrelerini toplayabilmek için, foliküller steril bir bistüri ile ikiye ayrıldı ve iç kısımları plastik öze ile nazıkçe kazındı ve PBS ile yıkanarak petrideki yıkama sıvısı tüpe aktarıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Folikül sıvısının toplanması.

Tüplerde toplanan hücre süspansiyonu, içindeki oositlerden elimine etmek için 100µm'lik süzgeçten filtre edildi. Hücreler 1000 g'de 5 dakika santrifüje edilerek PBS ile 2 kez yıkandı. Santrifüj işlemi sonunda pellet kırıldı. Daha sonra kan hücrelerini hemolize etmek için üzerine 2 ml steril distile su ilave edilerek 10 sn beklendi ve tüp 15 ml'ye kadar PBS ile tamamlanarak tekrar 1000 g'de 5 dk santrifüje edildi. Santrifüj işlemi sonrası tekrar hücre pelleti kırıldı.

Yıkama esnasında parçalanmış hücrelerden açığa çıkan DNA kalıntıları, granüloza hücrelerinin birbirine yapışmasına neden olmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak

için, %0,004 oranında DNAaz enzimi içeren antibiyotikli PBS özeltisi ile tüp 15 ml'ye kadar tamamlandı. Sonrasında yine 1000 g'de 5 dk santrifüje edildi ve 1 ml süspansiyon kalacak şekilde süpernatant atıldı. Geriye kalan hücre pelleti yine kırıldı ve toplam 1 ml hücre süspansiyonu olacak şekilde medyumla homojenize edildi (Şekil 3.4)



Şekil 3.4. İzole edilen granüloza hücreleri.

3.2.2. Hücrelerin ekimi, uygulama gruplarının oluşturulması ve inkübasyonu

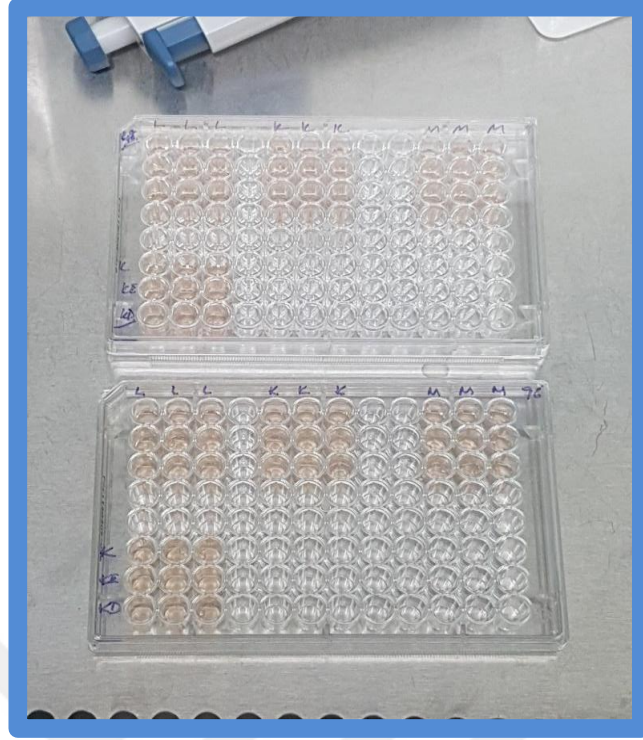
Hücre sayımı ve canlılık oranını belirlemek amacıyla tripan mavisı solüsyonu (%0,4'lük) kullanıldı. Tripan mavisı; canlılığını kaybetmiş hücrelerin zarlarından içeri girerek hücreyi maviye boyamakta iken, canlı hücre membranından geçememekte ve hücreler saydam-sarımsı-beyaz renkte görünmektedir. Bu işlem için homojenize edilmiş 1 ml hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak 20 µl tripan mavisı ile karıştırıldı. Otomatik hücre sayım cihazı lamına aktarılarak 5 dk bekletildi ve lamın cihazda okutulması sonucu 1 ml hücre süspansiyonundaki canlı hücre sayısı belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Boyama sonrası hücre sayım cihazı lamında granüloza hücreleri ve canlılık oranları.

Deney düzeneği hazırlamak amacıyla, 96 kuyucuklu hücre kültürü pleytleri 48 ve 96 saatlik inkübasyonlar için ayrı ayrı olacak şekilde; kontrol grubu, linuron, kloridazon ve metribuzinin düşük, orta ve yüksek dozları için 3'er kuyucuk olacak şekilde işaretlendi.

Hücrelerin ekimi için önceden oda ısısına getirilen kimyasallar ile medyum hazırlandı. Bu amaçla granüloza hücreleri için uygun besi yeri olan 15 mM HEPES'li DMEM F12-HAM içerisine; inkübasyon süresince hücrelerin pleyt tabanına yapışmaları, yeterince beslenebilmeleri, ayrıca hücre kaybının önlenmesi için %10 FBS (Fetal Buzağı Serum), %1 L-glutamin, olası bakteri ve mantar kontaminasyon risklerini en aza indirmek için ise %1 antibiyotik-antimikotik solüsyonu eklendi. Hazırlanmış olan medyumdan pleytte işaretli tüm kuyucuklara 100'er µl konuldu. Daha sonra her kuyucuğa 2×10^4 hücre eklendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Pleytlerin işaretlenmesi ve hücre ekimi.

Homojen bir dağılım olması için pleytler mikropalak çalkalayıcı ile hafifçe çalkalandı. Sonrasında pleytler %5 CO₂ içeren 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde hücrelerin yapışması için 24 saat inkübe edildi.

24 saatlik inkübasyon sona ermeden 1-2 saat önce hücrelere uygulanacak endokrin bozucu bileşikler içeren medyum hazırlandı. Bunun için, öncelikle kontrol ve deneme gruplarında steroid hormonların sentezinin devamını sağlamak amacıyla 0,001 M'lık androstenedion stok çözeltisi ile, 10⁻⁷ M androstenedion içeren DMEM F12-HAM medyumunu hazırlandı. Bu medyuma %1 antibiyotik-antimikotik, %1 L-glutamin ve granüloza hücrelerini çoğaltmak amacıyla %1 ITS premiksi (10 µg/ml insulin, 5,5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml sodyum selenit) eklendi. Hazırlanan medyum kontrol grubunda ve endokrin bozucu herbisitlerin uygulama dozlarının hazırlanmasında kullanıldı. Uygulama dozları yapılan ön çalışmalar ile belirlendi.

Öncelikle linuron, kloridazon ve metribuzinin stok solüsyonları hazırlandı. Herbisitlerin çözündürülmesinde linuron için saf etil alkol, kloridazon ve metribuzin için steril DMSO (Dimetilsülfoksit) kullanıldı. Tüm gruplarda çözücü oranları en

fazla %0,1 olacak şekilde ayarlandı. Stok çözeltiler belli oranlarda medyumla sulandırılarak uygulama dozları elde edildi (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Granüloza hücrelerine uygulanan endokrin bozucu herbisitler ve dozları.

Linuron	Kloridazon	Metribuzin
10 µM	10 µM	25 µM
50 µM	100 µM	250 µM
250 µM	1000 µM	2500 µM

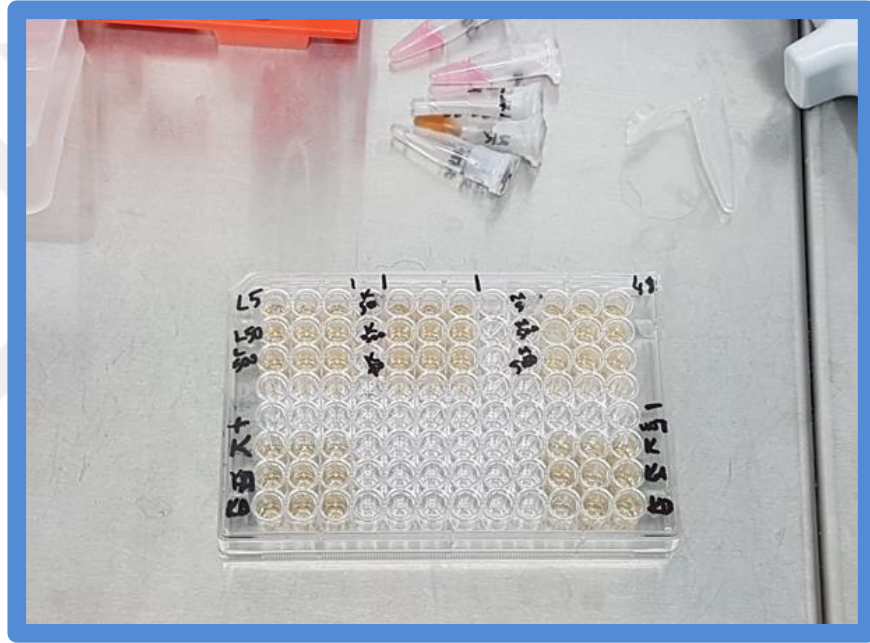
İlk 24 saatlik inkübasyon sonunda eski medyum atıldı ve pleyte yapışan hücreler üzerine her kuyucuk için 100'er µl yukarıda verilen dozlarda endokrin bozucu içeren medyum, kontrol medyumu ve %0,1 etil alkol/DMSO içeren medyum eklendi. Sonrasında pleytler 48 saat daha inkübe edildi.

3.2.3. Canlılık testleri ve hormon örneklerinin toplanması

Kırk sekiz saat inkübasyon sonrasında pleytler inkübatörden çıkarıldı. Hormon analizi için medyumlar mikrotüplere toplandı ve analiz yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Pleytte kalan hücrelere WST testi yapıldı. 96 saat inkübasyon için işaretlenmiş pleytlere yeniden kontrol medyumu, %0,1 etil alkol/DMSO içeren medyum ve farklı dozlardaki endokrin bozucu içeren medyumlar eklenerek 48 saat daha inkübasyon için etüve konuldu.

Sitotoksite düzeyini belirlemek amacıyla uygulanan WST testinde, bir tetrazolyum bileşiği olan WST-1'in hücre medyumuna eklenip inkübe edilmesi sonucunda; WST-1 içeriğindeki tetrazolyum tuzları yalnızca canlı hücrelerden elektron alarak indirgenmekte ve formazan denilen yapıya dönüşerek renk değişikliği oluşturmaktadır, bu değişim de kolorimetrik olarak ölçülerek hücrelerdeki canlılık düzeyi belirlenmektedir. Bu amaçla hormon analizi için medyumu alınmış 48 saatlik pleyt kuyucuklarına 100'er µl %10 antibiyotik-antimikotik solüsyonu, %10 ITS premiksi, %10 L-glutamin içeren fenol redsiz DMEM F12-HAM (Sigma, D6434, ABD) medyum hazırlanarak eklendi. Ayrıca 9 yeni kuyucuğa 3'er tekrar olmak üzere blank olarak hücre içermeyen medyum ve %0,1 etil alkol/DMSO içeren medyum ilave edildi. Ardından tüm kuyucuklara WST-1 kitinden 10'ar mikrolitre eklenerek

ışık almayacak şekilde folyo ile sarılarak 4 saat inkübatörde bırakıldı (Şekil 3.7). İnkübasyon sonunda pleyt karanlık ortamda mikropleyt okuyucuya konularak 450 nm ve 650 nm'ye karşı absorbans değerleri ölçüldü. Net absorbanslar (abs450-abs650)-blank formülüne göre hesaplandı. Bu değerler, canlılığının %100 olduğu farz edilen kontrol gruplarıyla kıyaslanarak endokrin bozucu bileşiklerin canlılık üzerine etkisini belirlemede kullanıldı. Canlılık oranı = uygulama grubunun absorbansı / kontrol grubunun absorbansı x100 formülüne göre hesaplandı. 96 saat inkübe edilen pleyt için de medyum örnekleri alımı ve WST testi aynı şekilde tekrarlandı.



Şekil 3.7. WST ölçümü için hazırlanmış pleyt.

3.2.4. Hormon analizleri

Östrojen ve progesteron hormon ölçümleri Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında elektrokemiluminesans yöntemi ile ticari kitlerle yapıldı (Roche Cobas e601 otoanalizör). Bu yöntemde örnek ve biotinize hormon spesifik antikor immunkompleks oluşturmak için inkübe edilir ve hormon miktarına bağlı olarak immunkompleks oluşur. Streptavidin kaplı mikropartiküller ve rutenyum kompleksi ile kaplanmış bir hormon türevi bu karışıma eklenir ve antikor-hapten kompleksi oluşur. Bütün kompleks streptavidin-biotin etkileşimi yardımıyla katı faza yapışmaya başlar. Reaksiyon karışımı ölçüm hücrelerine aspire edilir ve

kemilüminesans ışımaya neden olan elektrotlara voltaj uygulanır. Işıma yoğunluğu kaydedilir ve bu da numunenin hedeflenen analitinin miktarının belirlenmesini sağlar.

Yukarıda sayılan tüm uygulamalar istatistiksel doğruluğu artırmak amacıyla her bir grup için 3 kez tekrarlandı.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

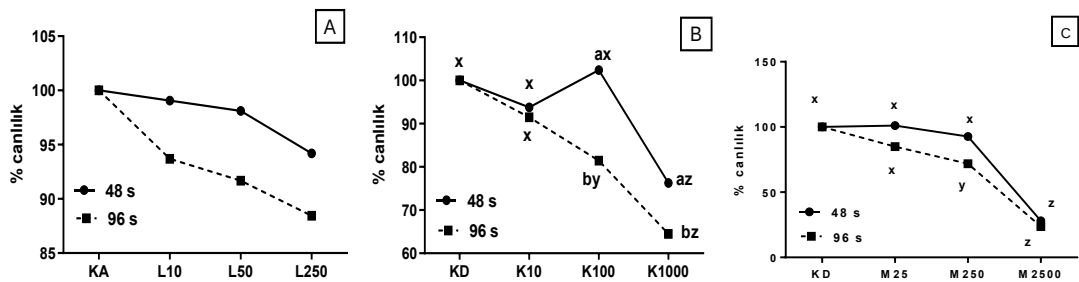
Araştırma sonunda elde edilen veriler GraphPad 6.0 (La Jolla, CA, USA) istatistik programında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi metodu ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde ise Tukey testi kullanıldı. $P < 0.05$ düzeyi anlamlı olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Linuron, Kloridazon ve Metribuzin'in Granüloza Hücrelerinin Canlılığına Etkileri

Linuronun çözücüsü olarak kullanılan %0,1'lik alkol ve kloridazonla metribuzinin çözücüsü olan %0,1'lik DMSO içeren medyumla inkübe edilen hücrelerin canlılık oranları hem 48 hem de 96 saatte %100 olarak kabul edildi ve deneme gruplarının canlılıkları kontrol grubuna oranlanarak belirlendi (Şekil 4.1 A-C).

Linuronun 10, 50 ve 250 μ M dozlarına maruz kalan hücrelerin canlılığında hem 48 hem de 96. saatlerde bir fark bulunamadı. Kloridazonun 10 μ M'lık dozunda inkübasyon süresinin ilerlemesiyle granüloza hücrelerinin canlılığı üzerine herhangi bir etki görülmedi. Ancak 100 ve 1000 μ M'lık kloridazon dozlarında canlılık 96. saatte 48. saate oranla önemli düzeyde azaldı (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.05$). Bunun yanı sıra kloridazonun 1000 μ M'lık dozundaki canlılık, hem 48 ve hem de 96. saatlerde kontrol, 10 ve 100 μ M'lık dozlarla kıyaslandığında azaldı (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.05$ ve $p<0.001$).



Şekil 4.1. Farklı dozlarda linuron (A), kloridazon (B) ve metribuzin (C)'in granüloza hücrelerinin canlılığına etkisi.

a, b: Her doz grubunda 48. ve 96. saatler arasındaki önemli gösterir ($P < 0.05$). x, y, z: Kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıkları gösterir ($P < 0.05$).

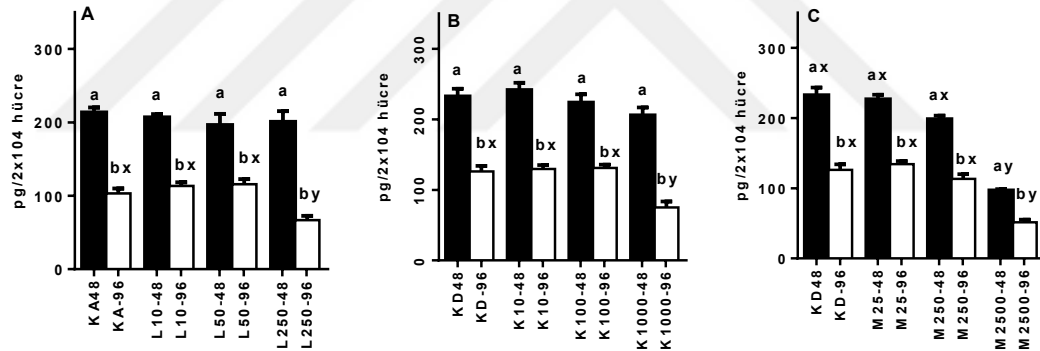
Metribuzin uygulama gruplarında ise 25 μ M'lık dozda 48. ve 96. saatte kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı değişmezken, 250 μ M'lık dozda 96. saatteki hücre

canlılığı 48. saatteğine göre azaldı ($p<0.05$), 2500 μM 'lık dozda ise hem 48 hem de 96. saatte diğer doz grupları ile kıyaslandığında hücre canlılığı önemli derecede azaldı ($p<0.001$).

4.2. Hormon Analizleri

4.2.1. Linuron, Kloridazon ve Metribuzin'in Östrojen Salınımı Üzerine Etkileri

Şekil 4.2 A-C'de görüldüğü gibi linuron, kloridazon ve metribuzine maruz kalan granüloza hücrelerinde östrojen salınımı 96. saatte 48. saate göre azaldı ($p<0.05$). Linuron ve kloridazon uygulama grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise 48. saatte östrojen salınımında bir fark görülmezken, 96. saatte en yüksek dozdaki uygulama grubunda (250 μM linuron ve 1000 μM kloridazon) hormon düzeyi kontrol ve diğer uygulama gruplarına göre azaldı ($p<0.05$). Metribuzin grubunda da 2500 μM 'lık dozda östrojen düzeyi hem 48 hem de 96. saatte hem kontrol hem de 25 μM ve 250 μM 'lık doza göre azaldı ($p<0.001$).



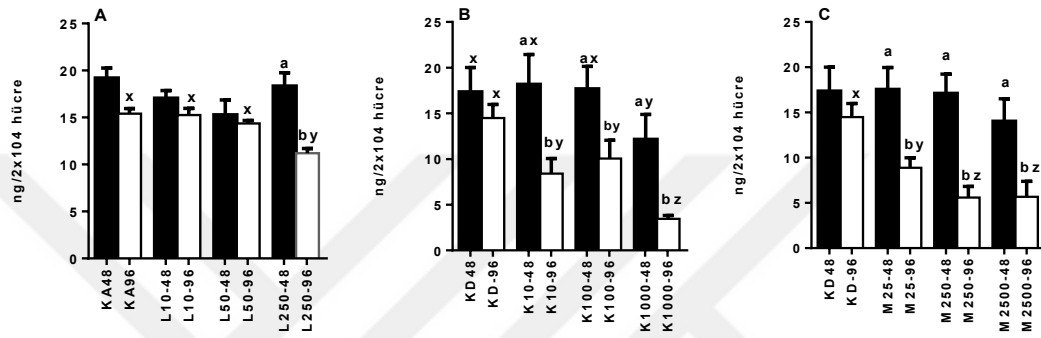
Şekil 4.2. Farklı dozlarda linuron (A), kloridazon (B) ve metribuzin (C)'in östrojen salınımına etkisi.

a, b: Her doz grubunda 48. ve 96. saatler arasındaki önemi gösterir ($P < 0.05$). x, y: Kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıkları gösterir ($P < 0.05$).

4.2.2. Linuron, Kloridazon ve Metribuzin'in Progesteron Salınımı Üzerine Etkileri

Linurona maruz kalan granüloza hücrelerinde 250 μM 'lık dozda 96. saatteki progesteron düzeyi 48. saate oranla azaldı ($p<0.001$). 48. saatte hiçbir uygulama grubunun progesteron değerleri arasında istatistiksel bir anlam gözlenmedi. 96. saatte ise 250 μM Linuron grubunda kontrol, 10 ve 50 μM 'lık gruplara göre progesteron düzeyi azaldı ($p<0.05$). Kloridazon ve metribuzin uygulama gruplarının hepsinde 96.

saatteki progesteron düzeyleri 48. saate göre azaldı ($p<0.001$). 48. saatte sadece en yüksek kloridazon dozundaki uygulama grubunda (1000 μM) progesteron düzeyi azalırken ($p<0.05$), 96. saatte bütün uygulama gruplarının progesteron düzeyleri kontrol grubuna göre düştü. Metribuzin uygulanan grupta ise 48. saatte progesteron düzeyleri değişmezken, 96. saatteki progesteron düzeyleri 25, 250 ve 2500 μM 'lık grupta kontrol grubuna göre $P<0.001$ düzeyinde azaldı. 250 ve 2500 μM 'lık uygulamalardaki azalma ise daha belirgin oldu (Şekil 4.3 A-C).



Şekil 4.3. Farklı dozlarda linuron (A), kloridazon (B) ve metribuzin (C)'in progesteron salınımına etkisi.

a, b: Her doz grubunda 48. ve 96. saatler arasındaki önemi gösterir ($P < 0.05$). x, y, z: Kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıkları gösterir ($P < 0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Dünyada yaygın bir kullanım alanı olan herbisitler daha kaliteli ürün elde ederek üretim maliyetlerini düşürebilir. Ancak, biyolojik çeşitliliğe, suları kirleterek gerek insan sağlığına gerekse sulara yaşayan canlılara verdiği zararlar, yağ dokuda birikerek oluşturduğu hasarlar ve uzun yarı ömürleri düşünüldüğünde kullanımları kaygı vericidir.

Ovaryum işlevselliğinin korunması hayvanın üreme sağlığı için oldukça önemli bir faktördür. Üreme sistemindeki problemler hayvanın döl verimini etkileyerek ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Endokrin bozucu etkisi olduğu bilinen 20'ye yakın herbisit bulunmaktadır (Gupta, 2017) ve bu herbisitler ilaçlama yoluyla tarımsal ürünlerde ve doğaya karışarak suda kalıntı bırakmalarından dolayı bu ürünleri tüketen doğadaki canlıların ve bu canlıları tüketen insanların sağlığı için de potansiyel bir risk kaynağı oluşturmaktadırlar (Mnif ve ark., 2011).

Bu araştırmada tarımsal ilaçlamada yaygın şekilde kullanılan herbisitlerden dişi üreme fizyolojisi üzerine etkilerine dair oldukça kısıtlı sayıda literatür bulunan linuron, kloridazon ve metribuzinin inek granüloza hücreleri canlılığına ve bu hücreler tarafından sentezlenen östrojen ve progesteron hormonları üzerine etkilerinin *in vitro* ortamda araştırılması amaçlanmıştır.

Yapılan literatür taramasında, araştırma konusu olan endokrin bozucu herbisitlerden linuron, kloridazon ve metribuzinin dişi üreme sistemi üzerine direkt veya dolaylı etkileriyle ilgili rat (Porter ve ark., 1993; Vargová ve ark., 1995; Johansson ve ark., 2016), hamster (Kojima ve ark., 2004) ve inek (Bilmen ve ark., 2016; Wrobel ve Mlynarczuk, 2017)'lerde oldukça sınırlı sayıda *in vivo* ve *in vitro* araştırmaya rastlanmış, ancak bu araştırmalardan granüloza hücreleri üzerinde çalışılan yalnızca

bir çalışmaya ulaşılabilmektedir. Wrobel ve Mlynarczuk (2017) tarafından yapılan bu çalışmada sadece çok düşük dozlardaki linuronun inek granüloza hücreleri canlılığına ve bu hücrelerden salınan östrojen üzerine etkileri araştırılmıştır. Dolayısıyla çalışmamız inek granüloza hücre kültüründe linuron, kloridazon ve metribuzinin hücre canlılığı, östrojen ve progesteron sentezi üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

Araştırmada kullanılan herbisit dozları yapılan ön denemeler sonucunda, linuron için 10, 50, 250 μM , kloridazon için 10, 100, 1000 μM ve metribuzin için 25, 250, 2500 μM olarak belirlenmiştir.

Mevcut araştırmada granüloza hücrelerine uygulanan 10, 50, 250 μM linuron konsantrasyonlarının hem 48. hem de 96. saatte hücreler için toksik etki göstermeyip canlılıklarını etkilememesi, *in vitro* ortamda 0.1, 1 ve 10 ng/ml (yaklaşık olarak 0.0004, 0.004 ve 0.04 μM) dozlarındaki linuronun inek myometriyum ve endometriyum hücreleri ve ovaryum granüloza ve luteal hücrelerine uygulandığı çalışmanın (Wrobel ve Mlynarczuk, 2017) bulguları ile paraleldir. Nitekim anılan çalışmada uygulanan dozların çalışmamızdaki dozlardan oldukça düşük olması ve inkübasyon süresinin 72 saat olduğu düşünüldüğünde, çalışmamız linuronun granüloza hücreleri canlılığını daha yüksek dozda ve daha uzun süre inkübasyonla bile etkilemediğini ortaya koymaktadır. Lambright ve ark. (2000)'nın yaptıkları *in vitro* çalışmada da linuronun 10 μM 'lık dozunun maymun böbrek hücresi olan CV-1 hücrelerinde sitotoksik etki göstermediğini vurgulamışlardır. Buna rağmen linuronun erkek ratlarda Leydig hücrelerinde hücre proliferasyonu sırasında DNA sentezi için bir belirteç olan PCNA proteini ekspresyonlarında azalmaya (Ding ve ark., 2017), androjene bağlı dokularda malformasyonlara neden olduğunu (McIntyre ve ark., 2000; Wilson ve ark., 2009), Leydig hücre tümörü oluşumuna yol açtığını (Cook ve ark., 1993) bildiren *in vivo* araştırmalar da mevcuttur. Ayrıca, *in vitro* ortamda yapılan çalışmalarda Roloff ve ark. (1992)'nin insan lenfositlerine uyguladıkları 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (yaklaşık 2 μM) linuronun kromozom hasarına yol açtığı, Lorenzetti ve ark. (2010)'nın ise insan prostat adenokarsinom hücrelerine uyguladıkları 100 μM linuronun önemli oranda sitotoksik etki gösterdiği bulgularına ulaşılmıştır. Farklı dokularda olumsuz etkilerinin görüldüğü linuronun araştırmamızda granüloza hücre canlılığına etkisinin görülmemesi yapılan araştırmalardaki canlı türleri, hücre tipleri

ve hücrelerin linurona maruz kalma süresi gibi farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Pestisitlerin toksisitesinden sorumlu asıl mekanizma halen tam olarak çözülememiş olsa da artan reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS/RNS) sistemik oksidatif stresi tetiklenmesinin anahtar rol oynadığı bildirilmektedir. Ortaya çıkan toksisiteden sorumlu olduğu bilinen iki ana ROS kaynağı, mitokondri ve NADPH oksidaz enzimleridir (Kalyanaraman ve ark., 2016). Linuron gibi tiyoüre grubuna dahil bir herbisit olan diuron ile yapılan çalışmalarda oksidatif fosforilasyonu (Owen ve Halestrap, 1993), glukoneogenezisi inhibe ettiği ve mitokondriyal ATP/ADP oranını azalttığı öne sürülmüştür (da Silva Simões ve ark., 2017). Rat karaciğer mitokondrisinin izole edildiği başka bir *in vitro* çalışmada da diuronun hücre solunumunu ve mitokondriyal membrana bağlı enzim aktivitelerini inhibe ettiği görülmüştür. Diuron toksisitesinde ROS'un muhtemel mekanizma olduğu da bildirimler arasındadır (Huovinen ve ark., 2011; Kao ve ark., 2019). İnsan karaciğeri ölümsüz HepG2 hücrelerinde de diuron dozuna bağımlı bir ROS üretimi gösterilmiştir (Kao ve ark., 2019). Diuronla elde edilen bu sonuçlara göre, araştırmamızda uyguladığımız linuron dozlarının granüloza hücreleri canlılığını etkilememesi bu dozlarda linuronun granüloza hücrelerinde ROS üretimini değiştirmedeği sonucuna bağlanabilir.

Araştırmamızın bulgularına göre, granüloza hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon sonrası kloridazonun sadece en yüksek (1000 μ M) dozu kontrol grubuna kıyasla sitotoksik etki göstermiş ve 96. saatte de bu etki orta (100 μ M) dozdan itibaren görülmeye başlamıştır. Literatür taramalarında kloridazonun herhangi bir türde üreme hücreleri canlılığına etkisini araştıran *in vivo* veya *in vitro* çalışmaya rastlanmamış olup, farklı türlere ait farklı hücrelerle yapılan *in vitro* sitotoksik ve genotoksik çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalarda ise 100 μ M dozda kloridazonun insan eritrositlerinde çentik oluşumuna neden olduğu (Suwalsky ve ark., 1998), 7-70-700 μ M dozlarda koyun ve sığır periferik lenfositlerinde mikronükleus (MN) indüksiyonu üzerine etkili olduğu, ayrıca sığır lenfositlerinde kromozom anomalilerine ve kardeş kromatit değişikliklerine yol açtığı bulgularına ulaşılmıştır (Piesova, 1998; Šivikova ve ark., 1999). Kloridazon gibi bir pridazinon türeviden olan LCS-1'in 250 μ M dozda, bir antioksidan olan süperoksit dismutaz

enzimini kodlayan SOD1 geni ekspresyonunu inhibe ederek HL-60 hücrelerinin canlılıklarını azalttığı da bildirimler arasındadır (Steverding ve Barcelos, 2020). Hücrede mitokondriyal enerji üretimi esnasında oluşan serbest radikallere karşı temel savunmada önemi rol oynayan süperoksit dismutaz enziminin engellenmesi, hücrede serbest radikallerin birikmesine yol açarak oksidatif stres ve hücre hasara neden olmaktadır (Aslankoç ve ark., 2019). Dolayısıyla araştırmamızda kloridazon ile oluşan sitotoksik etki bu nedenle oluşmuş olabilir. Ayrıca anılan çalışmalarda her ne kadar hücrelerin elde edildiği tür ve kullanılan hücre çeşidi farklı olsa da uygulanan dozlar bakımından çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Araştırmada uyguladığımız metribuzinin 25 μM 'lık en düşük dozunun 48. ve 96. saatte kontrol grubuna kıyasla granüloza hücre canlılığını etkilememesi, metribuzin gibi triazin türevi olan atrazinin 10 ng/ml (yaklaşık 0,05 μM) dozlarda inek myometriyum ve endometriyum hücreleri ve ovaryum granüloza ve luteal hücreleri ile 72 saat inkübe edildiği (Wrobel ve Mlynarczuk, 2017) ve 0,1, ve 10 μM dozda atrazinin domuz granüloza hücreleri ile 48 saat inkübe edildiği (Basini ve ark., 2012) *in vitro* çalışmaların bu dozlarda hücre canlılığını etkilemediği bulgularıyla uyumludur. İnkübasyon süreleri çalışmamıza göre daha kısa olan bu iki çalışma, metribuzinin 25 μM konsantrasyonundan daha düşük seviyelerde de granüloza hücre canlılığını etkileyebileceği olasılığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda uyguladığımız metribuzinin 250 μM 'lık orta dozu ile yalnızca 96. saatte ($p < 0.05$), 2500 μM 'lık yüksek dozu ile hem 48. hem de 96. saatte hücre canlılığı önemli derecede azalmıştır ($p < 0.001$). Metribuzinin hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkilerini araştıran sadece birkaç *in vitro* araştırmaya ulaşılabilmiş olup, bu araştırmalar da lenfositler ile yapılmıştır. Medjdoub ve ark. (2011)'nın insan ve rat dalak lenfositlerine 48 saat inkübasyonla uyguladıkları 1-10 μM metribuzinin lenfosit proliferasyonunu artırdığı ancak, 25-100 μM dozda oksidatif stres ve DNA hasarına neden olduğu ve lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği, yine aynı araştırmacıların (Medjdoub ve ark., 2016) insan lenfosit kültürleri ile yaptıkları benzer bir araştırmada da 50 μM metribuzinin lenfositlerin proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir. Metribuzinin farklı dozlarda (0,3-1000 mg/L) doğrudan insan lenfositleri ile 48 saat kültüre edildiği başka bir çalışmada ise, 1,5 mg/L (yaklaşık 7 μM) ve üzerindeki dozların hücrelerde ölüme neden olduğu tespit edilmiştir (Flores-

Maya ve ark., 2005). Değişik türlere ait lenfositlerle yapılan bu çalışmalarda uygulanan dozların etkileri, çalışmamızdaki orta ve yüksek dozun etkileri ile kısmen benzerlik taşısa da düşük dozlardaki etkileri ile çalışmamızdan farklı sonuçlara sahiptir. Aynı zamanda Medjdoub ve ark. (2011)'nın insan lenfositlerinde düşük dozlarda bildirdiği etkiler, Flores-Maya ve ark. (2005)'nin bulguları ile çelişmekte olup bu dozlardaki etkinin lenfositlerdeki güvenilirliği düşündürücüdür. Yapılan *in vivo* çalışmalarda ise, ratlara 440, 220 ve 110 mg/kg dozlarında haftada 2 gün oral olarak 3 ay süre ile subkronik metribuzin uygulanmasıyla akciğer, karaciğer ve böbreklerde sitotoksik etki oluşturduğu, mitokondriyal elektron transportu ve fosforilasyon üzerine olumsuz etki ettiği de bildirimler arasındadır (Abou Mosallam, 2016). Karaciğer hücrelerindeki toksisitesi Samir ve Asma (2018) tarafından da gösterilmiştir.

Benzer şekilde triazin türevi olan diğer herbisitlerin farklı hücrelerde sitotoksik etkilerine dair *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, 25 ve 50 µg/mL (yaklaşık 116 ve 232 µM) atrazinin insan nöroblastom (SH-SY5Y) hücrelerinde (Abarikwu ve Farombi, 2015), 6.5 mg/L ve üzeri dozda ametrinin insan lenfositlerinde ölüme yol açtığı (Flores-Maya ve ark., 2005), 0.0005 µg/ml (yaklaşık 0.002 µM) (Rolloff ve ark., 1992) ve 0.01, 0.1, 1 µg/mL dozlarında atrazinin insan lenfositlerinde, 20 ppm dozda ise fare kemik iliği hücrelerinde önemli kromozom hasarına neden olduğu (Meisner ve ark., 1992), atrazin ve siyanazinin fare lökositlerinde DNA hasarına sebep olduğu (Tennant ve ark., 2001) bildirilmiştir. Genel olarak orta ve yüksek dozda metribuzin ile gözlemlediğimiz sonuçları destekleyen bu araştırmalara rağmen, çalışmamızda 25 µM'lık en düşük dozda metribuzinin granüloza hücrelerini etkilememesi bu hücrelerin bahsi geçen hücrelere göre metribuzine daha dayanıklı olduğunu gösterebilir.

Ayrıca, metribuzinin, inkübasyon süreleri dikkate alındığında orta dozdan itibaren hücre canlılığını kloridazon ile benzer şekilde azalttığı fakat metribuzinde bu etkinin özellikle yüksek dozda daha güçlü olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamız hem kloridazon hem de metribuzinin granüloza hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini değerlendiren ilk çalışma olma özelliğine sahiptir. Bu alanda çalışma yapılmasına daha fazla ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Araştırmada hücrelerin canlılık oranlarını ölçmede kullanılan WST assay, mitokondriyal dehidrojenazın aktivitesini ölçen bir canlılık testidir. Çalışmamızda linuron uygulamasında canlılığın değişmemesi, kloridazonun 100 ve 1000 μM 'lık dozlarında süreye bağlı, 48 ve 96. saatte de en yüksek dozda (1000 μM) canlılığın azaldığının görülmesi; metribuzinde de canlılığın 48. saatte en yüksek dozda (2500 μM), 96. saatte de hem 250 hem de 2500 μM 'lık dozda azalması, bu gruplardaki hücrelerde mitokondriyal fonksiyonun kloridazon ve metribuzinin kullanılan dozları tarafından bozulduğunun bir göstergesidir. Bu herbisitlerin sitotoksik etkilerinin oluşmasında mitokondriyal toksisite muhtemelen en önemli mekanizmadır. ROS üretimi de hücre canlılığını etkileyen önemli bir faktör olup, hücre tiplerinin ve herbisitlerle onların metabolitleri arasında ROS üretiminde farklılık görülebilir (Mohammed ve ark., 2020). Araştırmamızda kullanılan kimyasalların granüloza hücrelerinin canlılığı üzerindeki farklı etkileri de bu nedene bağlanabilir.

Endokrin bozucular doğal hormonların bağlanacakları reseptörlere bağlanıp onları taklit ederek veya reseptörlere bağlanmadan onların sentezine, salgılanmasına, atılmasına ve görevlerine müdahale ederler. Üreme sistemi üzerine etkili olanlar ise foliküllerdeki östrojen üretimi ve ovulasyon problemlerine ya da progesteron salınımını olumsuz etkileyip düşüklere yol açarak steroid hormon sentezini bozabilirler (Gregoraszcuk, 2002).

Mevcut araştırmada linuronun, 48. saatte tüm konsantrasyonlarda granüloza hücrelerinde östrojen ve progesteron sentezini etkilemediği, 96. saatte ise 250 μM 'lık en yüksek uygulama dozunda her iki hormon düzeyini azalttığı ($p<0.05$) belirlenmiştir. Daha önce yapılan benzer *in vitro* çalışmalarda, 0.1-10 ng/ml (yaklaşık 0,0004-0,04 μM) linuron ile 72 saat inkübe edilen inek granüloza hücrelerinde (Wrobel ve Mlynarczuk, 2017) ve 2.5, 25 ve 250 $\mu\text{g/L}$ (yaklaşık 0.01, 0.1 ve 1 μM) linuron ile 12 saat inkübe edilen kocakafa golyan balığı (*Pimephales promelas*) ovaryumlarında (Ornostay ve ark., 2013) östrojen sekresyonunun değişmediği bildirilmiştir. Özellikle Wrobel ve Mlynarczuk (2017)'un elde ettiği bu bulgular 48. saatte tüm dozlarda, 96. saatte 10 ve 50 μM linuron ile bulduğumuz sonuçlarla paralel olsa da uyguladıkları doz çalışmamızdan oldukça düşük ve inkübasyon süresi çalışmamızdan kısadır. Aynı çalışmada 0.1 ve 10 ng/ml linuronun granüloza hücrelerinde testosteronu artırıcı etki gösterdiği görülmüş ve bu sonuç

linuronun inek granüloza hücrelerinde androjenlerin östrojene dönüşümünü engelleyebileceği şeklinde açıklanmıştır. Bunun aksine, linuronun erkek ratlarda üreme sistemine etkilerini araştıran *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda testosteron sekresyonunu önemli düzeyde azalttığı (Ding ve ark., 2017; Wilson ve ark., 2009) bulgularına ulaşılsa da androjen reseptör antagonisti olduğu (Cook ve ark., 1993; Lambright ve ark., 2000; McIntyre ve ark., 2000) bulgularını bildiren *in vivo* çalışmalar ağırlık kazanmaktadır. Bu çalışmalarda da belirtildiği gibi antiandrojenik maddelerin bazıları androjen reseptörlerine bağlanmak için androjenlerle yarışır, androjen reseptörlerinin (AR) DNA'ya bağlanmasını inhibe ederler ve gerek *in vivo* gerekse *in vitro* androjen bağımlı gen ekspresyonlarını değiştirirler. Linuron antiandrojenik bir etkiyle androjen reseptörlerine yarışmalı olarak bağlanır. Dolayısıyla çalışmamızda en yüksek dozda (250 μ M) linuronun inkübasyon süresi uzadıkça 96. saatte etkisinin belirginleşmiş ve Wrobel ve Mlynarczuk (2017)'un yukarıdaki açıklamasına paralel şekilde granüloza hücrelerindeki androjen reseptörlerine bağlanarak testosteronun östrojene dönüşümünü engellemiş olabileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte Cook ve ark. (1993) tarafından 2 hafta süre ile 200 mg/kg dozda linuronun, seksüel olgunluğa ulaşmış erkek ratlarda serum E2 ve LH düzeyini artırdığı ve artan LH ile birlikte Leydig hücre tümörü oluşumunun indüklendiği, *in vitro* ortamda testosteron ile inkübe edilmiş ventral prostat sitozolünde androjen reseptörlerine bağlanarak testosteron ile yarıştığı, Stoker ve ark. (2000) tarafından da linuronun erkek ratlarda puberte yaşını geciktirdiği, aksesuar cinsiyet organlarının ağırlıklarını azalttığı belirtilmiş ve bu bulguların altında yatan nedenin linuronun AR antagonisti olmasından başka, MSS-hipotalamus-hipofiz ve gonadlar arasındaki ilişkiyi değiştirmesi ve steroid katabolizmasını artırması olabileceği sonucuna varılmıştır.

Literatür taramasında linuronun granüloza hücrelerinden salınan progesteron seviyelerine etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamış olup, linurona 72 saat maruz bırakılan inek luteal hücrelerinde 0.1 ng/ml (yaklaşık 0,0004 μ M) doz ile etkilenmeyen progesteron düzeyinin, 1 ng/ml'lik doz (yaklaşık 0,004 μ M) ile baskılandığını bildiren çalışma (Wrobel ve Mlynarczuk, 2017), inkübasyon süresi ve kullanılan hücrelerin farklı oluşu göz ardı edildiğinde doza paralel şekilde etkinin

oluşması yönüyle çalışmamıza benzemekte olsa da linuronun 10 ng/ml'lik (yaklaşık 0,04 μ M) en yüksek dozda progesteron üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı bulgusu ile çalışmamızdan farklılık göstermektedir. Yine inek luteal hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada (Bilmen ve ark., 2016) da inek granüloza hücrelerine uyguladığımız linuronun 50 μ M'lık orta dozu aynı inkübasyon sürelerinde sonuçlarımızla benzer şekilde progesteron sekresyonunu etkilememiş, fakat 100 ve 200 μ M'lık dozlarda hem 48. saatte hem de 96. saatte progesteron salınımını önemli oranda baskılayarak fark oluşturmuştur. Dolayısıyla araştırmamızda 48. saatte 250 μ M dozda bile görmediğimiz bu baskılayıcı etkinin anılan çalışmada 100 μ M dozdan itibaren görülmesi, linuronun granüloza hücrelerine kıyasla luteal hücrelerde progesteronu azaltıcı etkisinin daha belirgin olduğunu gösterebilir.

Ayrıca yapılan *in vivo* çalışmalarda kolesterolden progesterona ve ondan da testosterona dönüşüm sürecinde etkili olan enzim ve proteinlerin gen ekspresyonları da değerlendirilmiştir. Linuronun erkek yavru ratlara etkilerini incelemek üzere gebe ratlara uygulandığı çalışmalarda *Ins13*, *StAR* mRNA ve *Cyp11A1*, *Cyp17A1* ekspresyonlarını etkilemediği (Wilson ve ark., 2009; Katsanou ve ark., 2020) bulguları çalışmamızda uyguladığımız linuronun düşük ve orta dozdaki etkileri ile uyum içerisindedir. Steroit hormonların sentezi dişi hayvanlarda farklı hücrelerde gerçekleşse de mekanizmaları temelde aynıdır. *Ins13* ve *Cyp17A1* progesterondan androstenedion üretiminde *StAR* ve *Cyp11A1* ise kolesterolün pregnenolona dönüşümü sürecinde rol oynamaktadır. Androstenedion testosterona ve ardından östrojene, pregnenolon ise progesterona dönüşmektedir. Bulgularımızda da belirtildiği üzere düşük ve orta dozda linuron hem östrojen hem de progesteron düzeyini etkilememiştir. Bu yönleriyle yukarıda anılan çalışmalar farklı tür ve cinsiyette yapılmış olsalar da çalışmamızın bu sonuçlarını desteklemektedir.

Buna rağmen çalışmamızda yüksek dozda linuron ile gözlemlediğimiz östrojen ve progesteron seviyelerinde azalma bulgularını destekleyen araştırmalar da mevcuttur. Gebe ratlara linuronun uygulandığı bir araştırmada (Ding ve ark., 2017) erkek yavru ratlarda P450scc ve 3 β -HSD enzimleri ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Nitekim P450scc'nin kolesterolün pregnenolona, 3 β -HSD'nin ise pregnenolonun progesterona dönüşümünde etkili olduğu bilinmektedir. Oysa P450scc ailesinden

olan Cyp11A1'in ve 3 β -HSD öncesinde rol oynayan StAR proteininin yukarıdaki çalışmalarda linuron ile etkilenmediği bildirilmiştir. Buradaki ayrılığın doz farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla her ne kadar erkek hayvanlarda yapılan ve farklı bulguları bildiren çalışmaların bir kısmı sonuçlarımızı desteklese de özellikle inek luteal hücreleri ile yapılan çalışmalar linuronun farklı hücreleri farklı sürelerde etkileyebileceğini göstermesi bakımından önemlidir. Araştırmamızda gözlemlediğimiz 250 μ M dozda linuronun östrojen ve progesteron sentezini azaltıcı etkisi doz ve inkübasyon süresi arttıkça linuronun östrojen ve progesteron üretiminde etkili olan bazı enzimlerin ekspresyonunu baskılamaya başladığını gösterebilir. Bu konuda özellikle granüloza hücreleriyle yapılacak olan daha ayrıntılı çalışmaların bulgularımızı destekleyebileceğini düşünmekteyiz.

Araştırmamızda linuron ile benzer şekilde yalnızca 96. saatte en yüksek dozdaki (1000 μ M) kloridazonun östrojen sentezini baskıladığı ($p < 0.05$) belirlenmiştir. Bununla birlikte inkübasyonun 48. saatinde yalnızca en yüksek dozda (1000 μ M), 96. saatinde ise tüm dozlarda (10, 1000, 1000 μ M) kloridazonun granüloza hücrelerinin progesteron sentezini baskıladığı ortaya konulmuş olup, 48. saatte linuron ve metribuzinin hiçbir doz grubunda progesteron sentezinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmemesine rağmen kloridazonun en yüksek dozu ile görülen azalma, hücrelerin bu dozda kloridazona kısa süreli maruziyetinin dahi progesteron üretimini baskıladığını göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Yapılan literatür taramalarında kloridazonun ratlarda uterus epitel hücrelerinde hipertrofiye sebep olduğunu ve neonatal ratlarda vajinanın açılma süresini kısaltarak östrojenik etkiler oluşturduğunu belirten *in vivo* çalışma (Vargová ve ark., 1995) dışında üreme hormonlarına etkilerine dair herhangi bir araştırmaya ulaşamamıştır. Ancak kloridazonla aynı organoklorin grubu pestisitlerle yapılan ve bulgularımızı destekler nitelikte aşağıda belirtilen çalışmalar mevcuttur.

Domuz foliküler hücrelerinde p,p'-DDT'nin (0,4-4 μ g/ml) E2 üretimini azalttığı, 4 μ g/ml dozda DDT izomerleri (p,p'- ve o,p'-DDT) ve DDE izomeri p,p'-DDE ile progesteron sentezi azalırken diğer izomer o,p'-DDE ile bu etkinin görülmediği çalışma (Wójtowicz ve ark., 2007) bulguları bir yandan sonuçlarımız ile uyum içerisindeyken aynı çalışmada o,p'-DDT ve o,p'-DDE'nin 0,004 ila 4 μ g/ml dozlarda aromataz aktivitesi ve E2 sentezini artırdığı ancak östrojen reseptörü beta (ERbeta)

ekspresyonunu azalttığı bulgusu östrojen artmış olsa da bağlanacağı reseptörlerin azalması nedeniyle etkilerinin engellenebileceğini göstermesi bakımından hipotezimizi desteklemektedir. Diğer yandan (100 ng/ml) DDE'nin insan granüloza hücrelerinde testosteronu östradiole dönüştüren aromataz enzimini artırdığı (Younglai ve ark., 2004) belirtilmiş, domuz granüloza hücrelerinde ise 0.3–320 µg/ml dozda progesteron sentezini bloke ettiği ve buna cAMP sentezi ve Cyp11A1 ekspresyonunu baskılamasının eşlik ettiği bildirilmiştir (Chedrese ve Feyles, 2001; Crellin ve ark., 2001). Buna göre DDE'nin öncelikle cAMP oluşumunu engellediği ve dolayısıyla kolesterolü pregnenolona dönüştüren Cyp11A1 ekspresyonunun azalmasına yol açtığı ve steroidogenezisi bu mekanizmayla değiştirdiği düşünülebilir.

Organoklorlu pestisitlerden metoksiklor ile yapılan çalışmalarda da 250-500 mg/kg dozun inkübe edilen rat ovaryumlarında E2 ve testosteron üretimini azalttığı, gebe ratlarda implantasyonu bozduğu ve serum progesteron düzeylerini düşürdüğü (Cummings ve Laskey, 1993) belirtilirken, 0.1–3.5 ng/ml dozun domuz granüloza hücrelerinde bazal ve FSH ile uyarılan progesteron üretimini azalttığı, ancak yukarıda belirttiğimiz DDE bulgusunun aksine cAMP seviyelerini değiştirmeden Cyp11A1 transkriptinin seviyelerini artırdığı gösterilmiş ve bu durumda metoksiklorun steroit sentezinde kolesterolün pregnenolona dönüşümü öncesi bir basamağı bloke edebileceği öne sürülmüştür (Chedrese ve Feyles, 2001; Crellin ve ark., 2001). Ayrıca fare antral foliküllerinde metoksiklorun (1-100 µg/ml) StAR, 3β-HSD, Cyp11A1, Cyp17A1, Cyp19A1 mRNA'ların ekspresyonunu azalttığını ve ardından ana cinsiyet steroitlerinde düşüşler olduğunu (Basavarajappa ve ark., 2011), bunun yanı sıra metoksiklora (20 µg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün) fetal ve neonatal maruziyetin östrojen reseptörü-2 (ESR2) ekspresyonunu baskılayarak ratlarda ovaryum disfonksiyonuna neden olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Armenti ve ark., 2008; Zama ve Uzun, 2009). Diğer taraftan metoksiklorun metaboliti HPTE'nin (500 mg/kg) fare ovaryum ve uterus dokularında antiandrojenik etki gösterdiği de bildirimler arasındadır (Waters ve ark., 2001).

Yapılan diğer *in vivo* çalışmalarda, Straube ve ark. (1999) kloridazonun da içinde bulunduğu bir grup pestisit ilaçlamasında çalışan erkeklerde maruziyetten 1 gün sonra testosteron ve östradiol düzeyinin düştüğünü, aylarca kronik maruziyette ise

testosteron düzeyinin arttığını ve östrojenin düşmeye devam ettiğini bildirmiş, Haake ve ark. (1987) ise çeşitli organoklorlu pestisitlere maruz bıraktıkları ratlarda benzer bulgulara ulaşmış ve bu değişikliklerin nedenini pestisitler tarafından enzimlerin indüksiyonu sonucu oluşan testosteron metabolitlerinin aromataz sistemini inhibe etmesine bağlamışlardır. Benzer şekilde Tomczak ve ark. (1981) da organoklorlu pestisitlerden insektisit heksaklorosikloheksanın üretim biriminde çalışan erkek işçilerin 8 yıl bu kimyasala maruziyeti ile serum LH düzeylerinin arttığını, FSH düzeylerinde önemli bir değişim gözlenmezken testosteron düzeylerinin biraz düştüğünü belirtmişlerdir.

Kloridazon ve onun bağlı olduğu organoklorlu pestisitler grubundaki kimyasallar ile yapılan çalışmaların bir kısmı her ne kadar araştırmada ulaştığımız bulguları desteklese de bu çalışmalarda uygulanan kimyasalların metabolitleri ile bile farklı bulgulara ulaşıldığının görülmesi, benzer kimyasal bileşime sahip herbisitlerin aynı etkileri göstermeyebileceğini ifade etmesi bakımından önem taşımaktadır. Araştırmamızda östrojen ve progesteron üretim basamaklarında rol oynayan enzim ifadelerine bakılmadığından kesin bir sonuca varılamamış ancak, yapılan literatür incelemelerine göre kloridazonun 1000 μM 'lık dozda östrojen sentezini baskılamasının ve inkübasyonun 48. saatinde en yüksek dozda (1000 μM), 96. saatinde ise tüm dozlarda (10, 1000, 1000 μM) progesteron sentezini azaltıcı etkisinin altında yatan mekanizmanın bu dozlarda kloridazonun androjen reseptör antagonisti gibi davranarak östrojen ve progesteron üretiminde etkili olan bazı enzimlerin aktivitelerini engellemesiyle ilgili olabileceğini ve ileride yapılacak daha ayrıntılı çalışmalarla bulgularımızın desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Linuron ve kloridazondan farklı olarak, inkübasyonun 48. saatinde metribuzinin en yüksek dozu (2500 μM) östrojen salınımını belirgin düzeyde ($p < 0.001$) azaltıcı etki göstermiş ve bu etkinin zamanla arttığı 96. saatte gözlemlenmiştir. Progesteron salınımı ise 48. saatte değişmemiş 96. saatte 250 ve 2500 μM dozda daha da belirgin olmak üzere azalmıştır ($p < 0.001$). Metribuzinin dişi ratlarda hipertiroidiye sebep olduğu, erkek ratlarda ise tiroksin ve somatotropin düzeylerini artırdığı *in vivo* çalışma (Porter ve ark., 1993) dışında endokrin etkilerine dair daha önce yapılan herhangi bir araştırmaya ulaşamamış olup, metribuzin gibi triazin türevi atrazin

farklı dozlarda östrojen ve progesterona etkisini değişik türlerde inceleyen benzer *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bulunmaktadır.

Basini ve ark. (2012)'nın domuz granüloza hücrelerinde 0.1 μ M dozda atrazinin 48 saatlik inkübasyon sonrası östrojen sentezini azalttığı, 10 μ M dozda ise östrojeni etkilemezken progesteron sentezini artırdığı, Wrobel ve Mlynarczuk (2017)'un inek granüloza hücrelerinde atrazin ile 72 saatlik inkübasyon sonrası 0.1-10 ng/ml (yaklaşık 0,0005-0,05 μ M) dozda östrojen düzeyini artırdığı ancak aynı inkübasyon süresinde 10 ng/ml (yaklaşık 0,05 μ M) dozda atrazinin luteal progesteron sentezini baskıladığı bulguları mevcuttur. Wrobel ve Mlynarczuk (2017) çalışmasında granüloza hücrelerinden salınan testosteron düzeyini de ölçmüş ve atrazinin testosteronu artırdığını, östrojen artışının da bundan kaynaklandığını ileri sürmüştür. Tinfo ve ark. (2011) tarafından ise 10 ve 30 μ M atrazinin 24 saatlik inkübasyon sonrası rat granüloza hücrelerinde testosteronu östradiole dönüştüren aromataz enzimi aktivitesini ve östradiol üretimini artırdığı, 1-30 μ M dozda da progesteron sentezini artırdığı belirlenmiştir. Bunun aksine, yine rat granüloza hücrelerinde 20 μ M atrazinin Cyp19A1 (aromataz) ile birlikte östradiol üretimini azalttığı (Fa ve ark., 2013), bazal progesteron seviyesini etkilemediği ancak FSH ile uyarılmış hücrelerde FSH duyarlılığını artırarak progesteron üretiminde belirgin bir artışa neden olduğu, progesteron/östradiol oranında bozulmalara yol açtığı bildirilmiştir (Pogrmic-Majkic ve ark., 2014). İnsan granüloza hücrelerinde 1–10 μ M atrazinin aromataz enzimi aktivitesini artırdığı da bildirimler arasındadır (Holloway ve ark., 2008).

Yapılan *in vivo* çalışmalarda ise, 2 mg/kg atrazinin domuzlarda serum östradiol düzeyini düşürürken progesteronu artırdığı (Gojmerac ve ark., 1996), dişi ratlara uygulanan 300 mg/kg dozun androstenedionun testosterona dolayısıyla da 17 β -östradiole dönüşümü sağlayan 17- β HSD'yi azalttığı ancak serum progesteronunu artırdığı gösterilmiştir (Taketa ve ark., 2011). Bu iki araştırma atrazinin progesteron seviyesini artırırken östrojen oluşumunu azaltması ile androjen reseptör antagonisti etkisi gösterebileceğini ortaya koyması bakımından önem taşımaktadır. Diğer yandan erkek ratlarda yapılan *in vivo* çalışmada ise (Modic, 2004), yüksek dozlarda (50 veya 200 mg/kg/gün) atrazinin serum östradiol, östron ve progesteron hormonları yanı sıra

androstenedion, testosteron ve kortikosteron hormonları seviyesini de doza bağı artırdığı bildirilmiştir.

Taketa ve ark. (2011) ve Pogrmic-Majkic ve ark. (2014)'nın yaptıkları çalışmalar atrazinin progesteron düzeyini artırmasında steroidogenesis sürecinde yer alan enzim ve proteinlerin (StAR, Cyp11A1, 3 β -HSD, cAMP, AKT, CEBPB) ekspresyonlarını artırarak etkili olduğunu gösterse de Wrobel ve Mlynarczuk (2017)'un yaptıkları çalışma dışında anılan tüm çalışmalar inekten farklı hayvan türlerinde yapılmıştır. Tüm bu çalışmalarda metribuzinden farklı olarak atrazin uygulandığı ve *in vitro* çalışmalarda granüloza hücrelerinin çalışmamızdakinden farklı inkübasyon sürelerine maruz kaldığı görülmektedir. Bununla birlikte Pogrmic-Majkic ve ark. (2014)'nın çalışmasına göre, atrazin 20 μ M dozda rat granüloza hücrelerinde bazal progesteron seviyelerini etkilememesine rağmen FSH ile uyarılan hücrelere aynı dozda uygulandığında progesteron seviyelerini artırdığı bulgusu FSH etkisine bağlanabilir. Rat primer granüloza hücrelerine yine 20 μ M dozda uygulanan atrazinin LH-R ekspresyonunu azalttığını gösteren bir diğer çalışma (Fa ve ark., 2013) da bulgularımızı destekler niteliktedir. Nitekim LH'nın reseptörlerine bağlanması hücre içi cAMP'nin ve onun hedefi protein kinaz (PKA) ve cAMP guanin nükleotit değişim faktörlerinin (cAMP-GEFs) aktivasyonuna yol açar. Bu da ERK 1/2 yolağını aktive ederek progesteron sekresyonunu dolayısıya steroidogenezi düzenler (Chin ve Abayasekara, 2004)

Bu çalışmaların yanı sıra insan H295R adrenokortikal karsinom hücrelerine uygulanan atrazin, simazin ve propazinin aromataz enzimi aktivitesini doza bağı olarak (0-30 μ M) yaklaşık 2.5 katına çıkardığı ve böbreküstü bezinden salınan östrojen üretimini artırabileceğine dikkat çekilen (Sanderson ve ark., 2000) ve disizopropil atrazin ve terbütihazinin insanlarda aldosteron antagonisti olduğunun gösterildiği (Zhang ve ark., 2018) çalışmalar da triazin türevi herbisitlerin steroidogeneze etkilerini ortaya koyması bakımından önem taşımaktadır.

Her ne kadar triazin grubundaki herbisitlerle yapılan çalışmaların bir kısmı metribuzin ile ulaştığımız bulguları desteklese de özellikle atrazinle yapılan çalışmaların da birbiriyle çeliştiği görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde metribuzinin 2500 μ M'lık dozda östrojen sentezi üzerine ve

inkübasyonun 96. saatinde özellikle 250 ve 2500 μM 'lık dozda belirgin olmak üzere progesteron sentezi üzerine olan baskılayıcı etkisinin bu dozlarda metribuzinin diğer steroid endokrin bozucular gibi androjen reseptör antagonisti gibi davranarak ve östrojen ve progesteron sentezinde rol oynayan bazı enzimlerin ifadelerini baskılamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bu konuda daha ayrıntılı çalışmalarla sonuçların desteklenmesine ihtiyaç olduğu görülmektedir.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada, özellikle yüksek dozlarda kloridazon ve metribuzinin granüloza hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olduğu ve inkübasyon medyumuna steroid hormon sentezinin devamı için androstenedion eklenmesine rağmen üç herbisit de maruziyet süresi uzadıkça östrojen salınımını azalttığı ortaya konulmuş olup, bu herbisitlerin androjen reseptör antagonisti gibi davranarak testosteronun östrojene dönüşümünü engellediği düşünülmektedir. Ayrıca yüksek dozda linuronun 96. saatte, kloridazon ve metribuzinin ise süre ve doza bağlı olarak progesteron düzeyini düşürdüğü belirlendiğinden daha sonra yapılacak çalışmalar ile sentez basamağındaki enzim yollarına etkilerinin araştırılması uygun olacaktır.

Sonuç olarak mevcut çalışma, kloridazon ve metribuzinin granüloza hücreleri canlılığı ve steroidogenezisi üzerine, linuronun ise granüloza hücrelerinde progesteron düzeyi üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır. Çalışmamız ayrıca daha önce linuronla yapılmış çalışmalarda kullanılan dozlardan daha geniş bir aralıkta linuronun etkilerini gösteren bir araştırma olmuştur. Yapılan denemelerle ortaya çıkan sonuçlar, bu herbisitlerin özellikle yüksek dozlarının ve uzun süreli maruziyetlerinin üreme fizyolojisi açısından büyük öneme sahip olan ovaryum hücreleri üzerinde etkili olabileceğini ve bu hücrelerin salgıladıkları hormonları olumsuz etkileyebileceğini göstermiştir. Bu yönüyle çalışma sonuçlarının hayvanlarda ve dolayısıyla belki de insanlarda görülen muhtemel üreme sistemi problemlerinin nedeni olabileceği düşünülmektedir.

Konuyla ilgili yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, mevcut *in vitro* çalışmadan elde edilen bu bulgular ile endokrin bozucu herbisitlerin insanların beslenmesinde önemli yer tutan ve ekonomik değeri olan çiftlik hayvanlarında gerçek etkilerinin ortaya çıkarılabilmesi açısından *in vivo* çalışmalarla da desteklenmesinin faydalı

olacağı düşünülmektedir. Ayrıca üreme sağlığının tüm canlılarda neslin devamı için önemi düşünüldüğünde, tarımda giderek yaygınlaşan bu kimyasal uygulamalarının sınırlandırılması ve bu konuda toplum bilincinin oluşturulması için yasal düzenlemeler yapılmasının yararlı olacağı yadsınamaz bir gerçektir.



6. KAYNAKLAR

- Abarikwu SO, Farombi EO. Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway. *Pestic Biochem Physiol*, 2015; 118: 90-98.
- Abou Mosallam MSaE. Cytotoxicity of some pesticides in experimental animals, Master's Thesis, Mansoura University, Mansoura 2016; 113.
- Adams G, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 2008; 69: 72-80.
- Alaçam E. Evcil Hayvanlarda Doğum ve Infertilite 7. Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara 2010.
- Alavanja MC, Hoppin JA, Kamel F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu Rev Public Health*, 2004; 25: 155-197.
- Anonim. (2022a). Estrous cycle. Erişim: [http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lab/lab7/lab7_2003/cycle.html] Erişim Tarihi: 15 Mart 2022.
- Anonim. (2022b). İneklerde reproduktif fizyoloji. Erişim: [<https://www.hormonuzmani.com/reproduction-cattle/hormonal-regulation.asp>] Erişim Tarihi: 15 Mart 2022.
- Armenti AE, Zama AM, Passantino L, Uzumcu M. Developmental methoxychlor exposure affects multiple reproductive parameters and ovarian folliculogenesis and gene expression in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008; 233: 286-296.
- Aslankoç R, Demirci D, Ümmahan İ, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, Savran EŞ, Yılmaz B. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fak Derg*, 2019; 26: 362-369.
- Basavarajappa MS, Craig ZR, Hernández-Ochoa I, Paulose T, Leslie TC, Flaws JA. Methoxychlor reduces estradiol levels by altering steroidogenesis and metabolism in mouse antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011; 253: 161-169.
- Basini G, Bianchi F, Bussolati S, Baioni L, Ramoni R, Grolli S, Conti V, Bianchi F, Grasselli F. Atrazine disrupts steroidogenesis, VEGF and NO production in swine granulosa cells. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012; 85: 59-63.

- Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole D, Kaur JS, Kerr K. Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Can Fam Physician*, 2007; 53: 1704-1711.
- Bilmen FS, Arikan S, Simsek O, Atmaca N, Kalender H, Essiz D, Kabakci R. In vitro Effects of Linuron on Luteal Progesterone Synthesis. *Acta Physiol*, 2016; 218: 49-49.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 2006; 66: 5-13.
- Chedrese PJ, Feyles F. The diverse mechanism of action of dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and methoxychlor in ovarian cells in vitro. *Reprod Toxicol*, 2001; 15: 693-698.
- Chen G. Linuron. In: Wexler P, Anderson B D, Gad S C, Hakkinen P J B, Kamrin M, Peyster A D, Locey B, Pope C, Mehendale H M , Shugart L R (eds), *Encyclopedia of Toxicology*. Oklahoma State University, Stillwater, OK, USA 2014; p.: 83-84.
- Chiali F, Merzouk H, Merzouk S, Medjdoub A, Narce M. Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pestic Biochem Physiol*, 2013; 106: 38-44.
- Chin E, Abayasekara D. Progesterone secretion by luteinizing human granulosa cells: a possible cAMP-dependent but PKA-independent mechanism involved in its regulation. *J Endocrinol*, 2004; 183: 51-60.
- Cook J, Mullin L, Frame S, Biegel L. Investigation of a mechanism for Leydig cell tumorigenesis by linuron in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993; 119: 195-204.
- Crellin N, Kang H, Swan C, Chedrese P. Inhibition of basal and stimulated progesterone synthesis by dichlorodiphenyl-dichloroethylene and methoxychlor in a stable pig granulosa cell line. *Reproduction (Camb)*, 2001; 121: 485-492.
- Cummings AM, Laskey J. Effect of methoxychlor on ovarian steroidogenesis: role in early pregnancy loss. *Reprod Toxicol*, 1993; 7: 17-23.
- Çağatay G, Çobanoğlu Z. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No: 52 Pestisitler. İlköz Matbaası, Ankara 1997.
- Da Silva Simões M, Bracht L, Parizotto AV, Comar JF, Peralta RM, Bracht A. The metabolic effects of diuron in the rat liver. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017; 54: 53-61.
- Dariyerli N. Gebelik Öncesi Kadın Fizyolojisi ve Kadın Hormonları. In: Hall J E (ed), *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji*. 12. ed. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye 2011; p.: 993.
- Ding H, Zheng W, Han H, Hu X, Hu B, Wang F, Su L, Li H, Li Y. Reproductive toxicity of linuron following gestational exposure in rats and underlying mechanisms. *Toxicol Lett*, 2017; 266: 49-55.
- Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006; 4: 1-11.

- Efsa. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance foramsulfuron. EFSA Journal, 2016; 14: 4421.
- Eyhorn F, Roner T, Specking H. Reducing pesticide use and risks-What action is needed? Briefing paper: Helvetas, Swiss Intercooperation, 2015.
- Fa S, Pogrmic-Majkic K, Samardzija D, Glisic B, Kaisarevic S, Kovacevic R, Andric N. Involvement of ERK1/2 signaling pathway in atrazine action on FSH-stimulated LHR and CYP19A1 expression in rat granulosa cells. Toxicol Appl Pharmacol, 2013; 270: 1-8.
- Fails AD, Magee C. Anatomy and Physiology of Farm Animals. John Wiley & Sons, 2018.
- Fang H, Tong W, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong H, Xie Q, Perkins R, Owens W, Sheehan DM. Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. Chem Res Toxicol, 2003; 16: 1338-1358.
- Flores-Maya S, Gómez-Arroyo S, Calderón-Segura ME, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski SM, De La Cruz LG. Promutagen activation of triazine herbicides metribuzin and ametryn through Vicia faba metabolism inducing sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro and in V. faba root tip meristems. Toxicol In Vitro, 2005; 19: 243-251.
- Forde N, Beltman M, Lonergan P, Diskin M, Roche J, Crowe M. Oestrous cycles in Bos taurus cattle. Anim Reprod Sci, 2011; 124: 163-169.
- Fountoulakis M, Makridis L, Pirounaki E, Chroni C, Kyriacou A, Lasaridi K, Manios T. Fate and effect of linuron and metribuzin on the co-composting of green waste and sewage sludge. Waste Manage, 2010; 30: 41-49.
- Glister C, Tannetta DS, Groome NP, Knight PG. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. Biol Reprod, 2001; 65: 1020-1028.
- Gojmerac T, Kartal B, Ćurić S, Žurić M, Kušević S, Cvetnić Ž. Serum biochemical changes associated with cystic ovarian degeneration in pigs after atrazine treatment. Toxicol Lett, 1996; 85: 9-15.
- Gojmerac T, Uremović M, Uremović Z, Ćurić S, Bilandžić N. Reproductive disturbance caused by an S-triazine herbicide in pigs. Acta Vet Hung, 1999; 47: 129-135.
- Gregoraszczuk EL. Dioxin exposure and porcine reproductive hormonal activity. Cad Saude Publica, 2002; 18: 453-462.
- Gupta PK. Herbicides and fungicides. Reproductive and Developmental Toxicology. Elsevier, 2017; p.: 657-679.
- Gupta PK. Toxicity of herbicides. Veterinary Toxicology. Elsevier, 2018; p.: 553-567.
- Gupta RC. Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles. Academic Press, San Diego 2012.

- Haake J, Kelley M, Keys B, Safe S. The effects of organochlorine pesticides as inducers of testosterone and benzo [a] pyrene hydroxylases. *Gen Pharmacol*, 1987; 18: 165-169.
- Hillier S. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, 2001; 179: 39-46.
- Holloway AC, Anger D, Crankshaw DJ, Wu M, Foster WG. Atrazine-induced changes in aromatase activity in estrogen sensitive target tissues. *J Appl Toxicol*, 2008; 28: 260-270.
- Hsueh AJ, Adashi E, Jones PB, Welsh Jr TH. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, 1984; 5: 76-127.
- Huovinen M, Loikkanen J, Myllynen P, Vähäkangas KH. Characterization of human breast cancer cell lines for the studies on p53 in chemical carcinogenesis. *Toxicol In Vitro*, 2011; 25: 1007-1017.
- Johansson HKL, Jacobsen PR, Hass U, Svingen T, Vinggaard AM, Isling LK, Axelstad M, Christiansen S, Boberg J. Perinatal exposure to mixtures of endocrine disrupting chemicals reduces female rat follicle reserves and accelerates reproductive aging. *Reprod Toxicol*, 2016; 61: 186-194.
- Kabakçı R. Endokrin bozucu bileşiklerin sıgır luteal hücre kültüründeki progesteron sentezi üzerine etkileri, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale 2017; 80.
- Kabakçı R, Yiğit AA. İneklerde Luteal Progesteron Biyosentezi ve Moleküler Kontrol Mekanizması. *Vet Farma Toks Bulten*, 2019; 10: 125-134.
- Kalyanaraman B, Hardy M, Zielonka J. A critical review of methodologies to detect reactive oxygen and nitrogen species stimulated by NADPH oxidase enzymes: implications in pesticide toxicity. *Curr Pharmacol Rep*, 2016; 2: 193-201.
- Kao CM, Ou W-J, Lin H-D, Eva AW, Wang T-L, Chen SC. Toxicity of diuron in HepG2 cells and zebrafish embryos. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019; 172: 432-438.
- Katsanou ES, Batakis P, Spyropoulou A, Schreiber E, Bovee T, Torrente M, Gómez MM, Kumar V, Domingo JL, Machera K. Maternal exposure to mixtures of dienestrol, linuron and flutamide. Part II: Endocrine-related gene expression assessment on male offspring rat testes. *Food Chem Toxicol*, 2020; 144: 111603.
- Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Pestisitler. *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*. Medisan Yayınevi, Ankara 2002; p.: 385-535.
- Khera K, Whalen C, Trivett G. Teratogenicity studies on linuron, malathion, and methoxychlor in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1978; 45: 435-444.
- Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niiyama K, Kobayashi K. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect*, 2004; 112: 524-531.

- Köse Ö, Erkekoğlu P, Gümüşel B. Endokrin Bozucu Kimyasalların Prostat Bezi Üzerine Etkileri. *J Lit Pharm Sci*, 2020; 9(1): 18-30.
- Lambright C, Ostby J, Bobseine K, Wilson V, Hotchkiss A, Mann P, Gray Jr L. Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicol Sci*, 2000; 56: 389-399.
- Loffredo E, Picca G, Parlavecchia M. Single and combined use of Cannabis sativa L. and carbon-rich materials for the removal of pesticides and endocrine-disrupting chemicals from water and soil. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021; 28: 3601-3616.
- Lorenzetti S, Marcoccia D, Narciso L, Mantovani A. Cell viability and PSA secretion assays in LNCaP cells: a tiered in vitro approach to screen chemicals with a prostate-mediated effect on male reproduction within the ReProTest project. *Reprod Toxicol*, 2010; 30: 25-35.
- Marin-Morales MA, Ventura-Camargo BDC, Hoshina MM. Toxicity of Herbicides: Impact on Aquatic and Soil Biota and Human Health. In: Price A, Kelton J (eds), *Herbicides: Current Research and Case Studies in Use*. InTech, Rijeka, Croatia 2013; p.: 399-443.
- McIntyre BS, Barlow NJ, Wallace DG, Maness SC, Gaido KW, Foster PM. Effects of in utero exposure to linuron on androgen-dependent reproductive development in the male Crl: CD (SD) BR rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000; 167: 87-99.
- Medjdoub A, Merzouk AS, Merzouk H, Baghli I. Effects of Vitamin C and NADH on in Vitro Proliferative Function of Human Lymphocytes Exposed to Pesticides (Mancozeb and Metribuzin). *J Food Eng*, 2016; 6: 169-176.
- Medjdoub A, Merzouk AS, Merzouk H, Chiali F, Narce M. Effects of Mancozeb and Metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pestic Biochem Physiol*, 2011; 101: 27-33.
- Mehd K, Soheila K, Hamideh R, Hossein P. DNA binding studies of Chloridazon. *N Biotechnol*, 2009: S366-S367.
- Meisner LF, Belluck DA, Roloff BD. Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine in vivo and in vitro. *Environ Mol Mutagen*, 1992; 19: 77-82.
- Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health*, 2011; 8: 2265-2303.
- Modic WM. The Role of Testicular Aromatase in the Atrazine Mediated Changes of Estrone and Estradiol in the Male Wistar Rat, Master's Thesis, Nc State University, Raleigh, North Carolina 2004; 61.
- Mohammed AM, Huovinen M, Vähäkangas KH. Toxicity of diuron metabolites in human cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2020; 78: 103409.

- Noakes DE, Parkinson TJ, England GC. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics-E-Book. Elsevier Health Sciences, 2018.
- Ornostay A, Cowie AM, Hindle M, Baker CJ, Martyniuk CJ. Classifying chemical mode of action using gene networks and machine learning: a case study with the herbicide linuron. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2013; 8: 263-274.
- Owen MR, Halestrap AP. The mechanisms by which mild respiratory chain inhibitors inhibit hepatic gluconeogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1993; 1142: 11-22.
- Palüzar H. Pestisitlerin vücut savunma sistemi enzimleri üzerine etkilerinin in vitro incelenmesi, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne 2013; 122.
- Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*, 2004; 25: 947-970.
- Piesova E. In vitro induction of micronuclei in sheep and bovine lymphocytes after exposure to chloridazon. *Acta Vet*, 1998.
- Pogrmic-Majkic K, Samardzija D, Fa S, Hrubik J, Glisic B, Kaisarevic S, Andric N. Atrazine enhances progesterone production through activation of multiple signaling pathways in FSH-stimulated rat granulosa cells: evidence for premature luteinization. *Biol Reprod*, 2014; 91: 124, 1-10.
- Porter WP, Green S, Debbink N, Carlson I. Groundwater pesticides: interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. *J Toxicol Environ Health, A: Curr Iss*, 1993; 40: 15-34.
- Pubchem. (2021a). Kloridazon | C10H8ClN3O Pubchem Open Chemistry Database. Erişim: [\[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chloridazon#section=Chemical-and-Physical-Properties\]](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chloridazon#section=Chemical-and-Physical-Properties) Erişim Tarihi: 25 Aralık 2021.
- Pubchem. (2021b). Linuron | C9H10Cl2N2O2 Pubchem Open Chemistry Database. Erişim: [\[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linuron#section=Chemical-and-Physical-Properties\]](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linuron#section=Chemical-and-Physical-Properties) Erişim Tarihi: 25 Aralık 2021.
- Pubchem. (2021c). Metribuzin | C8H14N4OS Pubchem Open Chemistry Database. Erişim: [\[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metribuzin#section=Chemical-and-Physical-Properties\]](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metribuzin#section=Chemical-and-Physical-Properties) Erişim Tarihi: 25 Aralık 2021.
- Reece WO, Erickson HH, Goff JP, Uemura EE. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. John Wiley & Sons, 2015.
- Roberts TR. *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Insecticides and Fungicides*. Royal Society of Chemistry, 1998.

- Roloff BD, Belluck DA, Meisner LF. Cytogenetic studies of herbicide interactions in vitro and in vivo using atrazine and linuron. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1992; 22: 267-271.
- Saladin KS. *Anatomy & Physiology* (8th ed). McGraw-Hill Education, New York 2018.
- Samir D, Asma S. Triazinone herbicide metribuzin induced acute liver injury: A study of animal model. *J Acute Dis*, 2018; 7: 152.
- Sánchez-Martín MJ, Sáánchez-Camazano M. Adsorption of chloridazon by soils and their components. *Weed Sci*, 1991; 39: 417-422.
- Sanderson JT, Seinen W, Giesy JP, Van Den Berg M. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol Sci*, 2000; 54: 121-127.
- Schardein J. *Chemically Induced Birth Defects*. CRC Press, 2000.
- Schatten H, Constantinescu GM. *Comparative Reproductive Biology*. Wiley Online Library, 2008.
- Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, Radovic B, Kovacs G, Stemmler L, Nobis I, Bacinski A, Mentrup B, Ambrugger P. Endocrine disruptors and the thyroid gland—a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect*, 2007; 115: 77-83.
- Šivikova K, Dianovský J, Piešova E. Chromosome damage in cultured bovine peripheral lymphocytes induced by herbicide chloridazon. *Acta Vet Brno*, 1999; 68: 105-110.
- Steverding D, Barcelos Y. Cytotoxic Activity of LCS-1 is not Only due to Inhibition of SOD1. *Drug Res*, 2020; 70: 57-60.
- Stoker TE, Parks LG, Gray LE, Cooper RL. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Crit Rev Toxicol*, 2000; 30: 197-252.
- Straube E, Straube W, Krüger E, Bradatsch M, Jacob-Meisel M, Rose H-J. Disruption of male sex hormones with regard to pesticides: pathophysiological and regulatory aspects. *Toxicol Lett*, 1999; 107: 225-231.
- Suwalsky M, Benites M, Villena F, Norris B, Quevedo L. The organochlorine herbicide chloridazon interacts with cell membranes. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1998; 120: 29-35.
- Taketa Y, Yoshida M, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yamate J, Nishikawa A. Differential stimulation pathways of progesterone secretion from newly formed corpora lutea in rats treated with ethylene glycol monomethyl ether, sulpiride, or atrazine. *Toxicol Sci*, 2011; 121: 267-278.
- Tennant AH, Peng B, Kligerman AD. Genotoxicity studies of three triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. *Mutat Res-Genet Toxicol Environ Mutag*, 2001; 493: 1-10.

- Tinfo NS, Hotchkiss MG, Buckalew AR, Zorrilla LM, Cooper RL, Laws SC. Understanding the effects of atrazine on steroidogenesis in rat granulosa and H295R adrenal cortical carcinoma cells. *Reprod Toxicol*, 2011; 31: 184-193.
- Tiryaki O, Canhilal R, Horuz S. Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üni Fen Bil Ens Fen Bil Derg*, 2010; 26: 154-169.
- Tomczak S, Baumann K, Lehnert G. Occupational exposure to hexachlorocyclohexane. *Int Arch Occup Environ Health*, 1981; 48: 283-287.
- Tomlin CDS. Chloridazon. In: Tomlin C D S (ed), *The Pesticide Manual*. 14. ed. BCPC Publication, Alton, Hampshire, UK 2006; p.: 169-170.
- Turner KJ, McIntyre BS, Phillips SL, Barlow NJ, Bowman CJ, Foster PM. Altered gene expression during rat Wolffian duct development in response to in utero exposure to the antiandrogen linuron. *Toxicol Sci*, 2003; 74: 114-128.
- Tüik. (2021). Tarımsal İlaç Kullanımı İstatistikleri. Erişim: [<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/DownloadIstatistikselTablo?p=EkNEXChouamVISM9HnwGVcvLen3kfsFOkgPwUbpTwxUWgeKYFGSsAGIbfJk/dccg>] Erişim Tarihi: 9 Ocak 2022.
- Usepa. (2003). Candidate Contaminant List Regulatory Determination Support Document for Metribuzin. Washington, D.C.: U.S.Environmental Protection Agency Standards and Risk Management Division Office of Water. Erişim: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-09/documents/support_cc1_metribuzin_ccl_regdet.pdf] Erişim Tarihi: 4 Ocak 2022.
- Usepa. (2005). Reregistration Eligibility Decision (RED) Document for Pyrazon. Washington, D.C.: U.S.Environmental Protection Agency Archive Document. Erişim: [https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/pyrazon_red.pdf] Erişim Tarihi: 25 Aralık 2021.
- Vargová M, Zeljenková D, Gajdová M. Estrogenic effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett*, 1995; 78: 82-82.
- Waters KM, Safe S, Gaido KW. Differential gene expression in response to methoxychlor and estradiol through ER α , ER β , and AR in reproductive tissues of female mice. *Toxicol Sci*, 2001; 63: 47-56.
- Wilson VS, Lambright CR, Furr JR, Howdeshell KL, Gray Jr LE. The herbicide linuron reduces testosterone production from the fetal rat testis during both in utero and in vitro exposures. *Toxicol Lett*, 2009; 186: 73-77.
- Wójtowicz A, Kajta M, Gregoraszczuk E. DDT-and DDE-induced disruption of ovarian steroidogenesis in prepubertal porcine ovarian follicles: a possible interaction with the main steroidogenic enzymes and estrogen receptor beta. *J Physiol Pharmacol*, 2007; 58: 873-885.
- Wrobel MH, Mlynarczyk J. The inhibition of myometrial contractions by chlorinated herbicides (atrazine and linuron), and their disruptive effect on the secretory

- functions of uterine and ovarian cells in cow, in vitro. *Pestic Biochem Physiol*, 2017; 142: 44-52.
- Wu Y, Li S, Xin Z, Wang Y, Shou K, Gao H, Li Y. The establishment of hypospadias rat model and embryoteratogenic test of Atrazine. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 2007; 23: 340-343.
- Yiğit AA, Böyük G, Kabakçı R. Dişi Ratlarda Üreme Fizyolojisi. *Dicle Üni Vet Fak Derg*, 2019; 12: 163-167.
- Yiğit AA, Kabakçı R. Türkiye’de 2019 Yilından Bu Yana Ruhsat Almış Bazı Herbisitlerin Üreme Üzerine Etkileri-I. In: Evereklioglu C (ed), Sağlık Bilimleri Alanında Akademik Çalışmalar-II. 1 ed. Gece Kitaplığı, Ankara 2020; p.: 125-144.
- Younglai EV, Holloway AC, Lim GE, Foster WG. Synergistic effects between FSH and 1, 1-dichloro-2, 2-bis (P-chlorophenyl) ethylene (P, P'-DDE) on human granulosa cell aromatase activity. *Hum Reprod*, 2004; 19: 1089-1093.
- Zama AM, Uzumcu M. Fetal and Neonatal Exposure to the Endocrine Disruptor Methoxychlor Causes Epigenetic Alterations in Adult Ovarian Genes. *Endocrinology*, 2009; 150: 4681-4691.
- Zhang J, Huang X, Liu H, Liu W, Liu J. Novel pathways of endocrine disruption through pesticides interference with human mineralocorticoid receptors. *Toxicol Sci*, 2018; 162: 53-63.

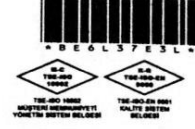
EKLER

EK

Evrak Tarih ve Sayısı: 12/04/2018-E.2657



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 60821397-010.99-
Konu : Etik Kurul Kararı

SAYIN AYŞE ARZU YİĞİT

İlgi : a) Etik Kurul Kararı
b) 12.04.2018 tarih ve E.7735 sayılı dilekçe.

5.02.2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin 8.Maddenin , (k) bendinin 2.fıkrasında yer alan '**Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar ile yapılan prosedürler.**' ibaresi kullanılmış olup,"**Linuron,Kloridazon ve Metribuzin'in Granüloza Hücre Steroidogenezisi Üzerine Etkilerinin in vitro Araştırılması**" isimli projenizde deney materyali olarak «mezbaha atık ürünlerinden inek ovaryum dokusu kullanılması nedeniyle Yönetmeliğin ilgili maddesi kapsamında değerlendirmiş ve etik kurul onayına gerek duyulmamıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır

Prof.Dr.Siyami KARAHAN
Etik Kurulu Başkanı

Belgenin Aslı
Elektronik İmzalıdır

Evrakı Doğrulamak İçin : <http://dogrulama.kku.edu.tr/envision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE6L37E3L>

Merkez Yerleşke 71450 Yahşihan/Kırıkkale
Telefon No: 0 (318) 357 42 42 Faks:
E-Posta: Internet Adresi:www.kku.edu.tr

Bilgi için: Hakan BAYRAM
Unvan: Memur
Telefon No: 03183574242-1467



Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır. Evrak Doğrulaması <http://do>

LİNURON, KLORİDAZON VE METRİBUZİN'İN GRANÜLOZA HÜCRE STEROİDOGENEZİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%3	%3	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	www.gecekitapligi.com İnternet Kaynağı	%1
3	Özge KÖSE, Pınar ERKEKOĞLU, Belma KOÇER GÜMÜŞEL. "The Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Prostate Gland", Journal of Literature Pharmacy Sciences, 2020 Yayın	<%1
4	ataman-kimya.com İnternet Kaynağı	<%1
5	www.lookchem.cn İnternet Kaynağı	<%1
6	19january2021snapshot.epa.gov İnternet Kaynağı	<%1
7	es.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Metehan Eser KAHVECİ
Uyruğu: Türkiye (T.C.)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Halen
Lisans	Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi	2012
Lise	Erzurum Mecidiye Anadolu Lisesi	2006

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013-Halen	Ordu Üniversitesi, Ulubey Meslek Yüksekokulu Veterinerlik Bölümü, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı	Öğretim Görevlisi
2014-Halen	Ordu Üniversitesi, Deney Hayvanları Ünitesi	Sorumlu Yönetici- Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngilizce

PROJELERİ

1. Linuron, Kloridazon ve Metribuzin'in Granüloza Hücre Steroidogenezi Üzerine Etkilerinin İn-vitro Araştırılması, TÜBİTAK 1002, **Araştırmacı**, 2019 - 2020.
2. Karayaka Koyunlarında Araçla Taşıma Stresinin Meydana Getirebileceği Etkilerin Araştırılması, ODÜ BAP, **Araştırmacı**, 2018 - 2020.
3. Karayaka Koyunlarında Koç Katım Öncesi Ana Yaşı, Canlı Ağırlık, Vücut Kondisyon Puanlamasının Gebelik Süresi, Döl Verimi, Yavru Doğum Ağırlığı, Sütten Kesim Ağırlığı (90. Gün) ve Yaşama Gücüne Etkisi, ODÜ BAP, **Araştırmacı**, 2016 – 2017.
4. Taze Sulandırılmış ve Dondurulmuş Karayaka Koç Spermaları için Propolis Ekstraktının Depolama Süresi Üzerine Etkileri, ODÜ BAP, **Araştırmacı**, 2016 – 2017.

YAYINLARI

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. TOZLU ÇELİK HİLAL, ASLAN FATİH AHMET, KAŞKO ARICI YELİZ, KAHVECİ METEHAN ESER, KİPER İBRAHİM (2021). Determining the factors affecting the gestational length in sheep. Archives Animal Breeding, 64, 83-89., Doi: 10.5194/aab-64-83-2021
2. TOZLU ÇELİK HİLAL, ASLAN FATİH AHMET, US ALTAY DİLER, KAHVECİ METEHAN ESER, KONANÇ KALBİYE, NOYAN TEVFİK, AYHAN SERTAÇ (2021). Effects of transport and altitude on hormones and oxidative stress parameters in sheep. PLOS ONE, 16(2), 1-11., Doi: 10.1371/journal.pone.0244911
3. TOZLU ÇELİK HİLAL, ASLAN FATİH AHMET, KAŞKO ARICI YELİZ, KAHVECİ METEHAN ESER, KİPER İBRAHİM (2019). Karayaka Koyunlarında Gebelikte Kondisyon Puanı ve Transabdominal Ultrasonografi Yönteminin Kullanımı Üzerine Bir Araştırma. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 7(11), 1789-1794., Doi: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i11.1789-1794.2616>
4. ASLAN FATİH AHMET, TOZLU ÇELİK HİLAL, KAŞKO ARICI YELİZ, KONANÇ KALBİYE, KAHVECİ METEHAN ESER, KİPER İBRAHİM (2019).

Ordu İli Halk Elinde Yetiştirilen Karayaka Koçlarının Spermatolojik Parametreleri Değerlendirilmesi. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 7(11), 1877-1881., Doi: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i11.1877-1881.2851>

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. TOZLU ÇELİK HİLAL, ASLAN FATİH AHMET, KAŞKO ARICI YELİZ, KAHVECİ METEHAN ESER, KİPER İBRAHİM (2020). Koyunlarda Doğumdan Sonraki Bazı Özelliklerin Yavrunun Sütten Kesim Ağırlığı Üzerine Etkisi. 3. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, 527-534. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. YİĞİT AYŞE ARZU, KAHVECİ METEHAN ESER, KABAKÇI RUHİ (2021). Metribuzinin İnek Granülosa Hücre Steroidogenezi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. 46. Ulusal Fizioloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

KATILDIĞI KURS, ÇALIŞTAY VE SEMİNERLER

1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulları Eğitim Semineri, Tarım ve Orman Bakanlığı Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu, 2018.
2. Proje Hazırlama Eğitimi Çalıştayı, Ordu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2016.
3. İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, Ordu Üniversitesi Ulubey Meslek Yüksekokulu, 2016.
4. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu, Ordu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 2015.
5. Etkin Öğretim Teknikleri Kursu, Odüsem, 2013.
6. Sığırlarda Rektovaginal Yöntemle Suni Tohumlama Sertifikası Kursu, Giresun İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, 2012.
7. Hizmetiçi Eğitim Sertifikası Kursu, Giresun Veteriner Hekimleri Odası, 2012.

ÜYELİKLERİ

2015-Halen Ordu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Üyeliği

2014-Halen Ordu Üniversitesi Hayvan Refahı Birimi Üyeliği

VERDİĞİ DERSLER

Temel Fizyoloji, Temel Anatomi, İmmunoloji-Seroloji, Farmakoloji-Toksikoloji, Parazitoloji, Viroloji, Epidemiyoloji, Sığır Yetiştiriciliği, Çiftlik Hayvanlarında Beslenme Hastalıkları, Buzağı ve Sığır Hastalıkları, Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Kedi ve Köpek Hastalıkları, Laboratuvar Hayvanları Yetiştiriciliği ve Sağlığı, Klinik Uygulamalar, Farmasötik ve Biyomedikal Analiz, Suni Tohumlama ve Embriyo Transferi, Genel Biyokimya, Genel Kimya, Et ve Ürünleri Teknolojisi, Hayvan Besleme, Genel Zootečni, Yemler Bilgisi ve Teknolojisi.