

**SIÇANLARDA BİSFENOL A İLE İNDÜKLENEN
POLİKİSTİK OVER SENDROMUNA KARŞI
FLORETİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATING THE PROTECTIVE EFFECTS OF
PHLORETIN AGAINST THE POLYCYSTIC OVARIAN
SYNDROME INDUCED BY BISPHENOL A IN RATS**

Nilüfer COŞKUN

PROF. DR. Nurhayat BARLAS

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

Sevgili Aileme...

ÖZET

SIÇANLARDA BİSFENOL A İLE İNDÜKLENEN POLİKİSTİK OVER SENDROMUNA KARŞI FLORETİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nilüfer COŞKUN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

Eylül 2020, 123 sayfa

Endokrin bozucular; endokrin sistem fonksiyonlarını etkileyerek organizmada ve organizmanın nesillerinde olumsuz sağlık etkileri oluşturan eksojen madde veya madde karışımlarıdır. Çalışmadaki amacımız, çevresel kaynaklı endokrin bozucu olan Bisfenol A'nın (BPA) ovaryumda oluşturabileceği polikistik over sendromuna (PKOS) karşı bir fitoöstrojen olan floretinin koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmaktır. Fitoöstrojenler bitkilerde doğal olarak bulunan östrojen hormonuna yapısal benzerlikleri nedeniyle fitoöstrojenler olarak bilinen bileşiklerdir. Araştırmamızda, 36 adet Wistar albino dişi sıçan kullanılmıştır. Her bir grupta 6 adet sıçan olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır. Gruplar şu şekilde planlanmıştır: 1. Grup: Mısır yağı, 2. Grup: 50 mg/kg/gün BPA, 3. Grup: 50 mg/kg/gün testosteron propiyonat, 4. Grup: 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin, 5. Grup: 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin, 6. Grup: 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin şeklindedir. Gruplara 15 gün boyunca önce floretin daha sonra BPA olacak şekilde subkutan uygulama yapılmış aynı zamanda smear örnekleri alınarak östrus döngüleri takip edilmiştir. Son verilen dozdan 24 saat sonra ovaryum, uterus, karaciğer ve böbrek dokuları alınmış ve doku takibinin ardından alınan ince kesitlerde ışık mikroskobu ile inceleme yapılmıştır. Bunun yanı sıra ovaryum dokusunda immünohistokimyasal boyamalar yapılarak CYP17A1 ve

CYP11A1 boyanmaları incelenmiştir. Sıçanların kalbinden alınan kandan elde edilen serum örneklerinden ALT (alanin aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), trigliserit, albümin, kreatinin, üre, glukoz biyokimya analizleri yapılmıştır. Hormon grubundan ise FSH (folikül uyarıcı hormon), LH (lüteinleştirici hormon), DHT (dihidrotestosteron), ERR α (östrojen), kortizol değerlerine bakılmıştır.

Histopatolojik incelemelerde, BPA grubu ovaryum dokularında çok sayıda kistik görünüm elde edilmiş, aynı şekilde smear döngüsünde uzamış diöstrus evreleri göze çarpmıştır. Koruyucu etki göstermesi beklenen floretin gruplarından 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin gruplarında ovaryumda kistik görünümün azaldığı görülmüştür. CYP11A1 ve CYP17A1 enzimleri testosteron artışına bağlı olarak pozitif kontrol grubu olan BPA'nın uygulandığı dokularda daha yoğun boyanmış olup, 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin gruplarında daha az boyanma olduğu tespit edilmiştir.

Böbrek ve karaciğer dokularında dejenerasyon, konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir. Serum üre değerleri, 50 mg/kg/gün BPA, 50 mg/kg/gün TP, 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin gruplarında kontrol grubuna göre artış göstermiş; serum albümin değerleri, 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin grubunda kontrol grubuna göre artış göstermiş; serum ALT ve AST değerleri ise tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermiştir. Serum FSH değerleri, kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı olarak azalmış; serum östrojen değerleri ve 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin gruplarında artış göstermiş; serum DHT değerleri ise kontrol grubuna göre tüm gruplarda artış göstermiştir. Serum kortizol değerlerinde ise sadece 50 mg/kg/gün BPA grubu ile kontrol grubu arasında fark meydana gelmiştir.

Sonuç olarak, BPA ile indüklenen PKOS modellemesinde, ovaryumda meydana gelen çok sayıda kistik folikül 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin gruplarında azalma göstermiş, bu azalma immünohistokimya boyamaları ve elde edilen serum örnekleri ile de desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A, fitoöstrojen, polikistik over sendromu, floretin, sıçan, endokrin bozucular

ABSTRACT

INVESTIGATING THE PROTECTIVE EFFECT OF PHLORETIN AGAINST THE POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME INDUCED BY BISFENOL A IN RATS

Nilüfer COŞKUN

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

September 2020, 123 pages

Endocrine disruptors are exogen substance or mixtures that cause an adverse effect in organism or organism's generation by impacting the function of endocrine system. In this study, it was examined whether phloretin, which is a phytoestrogen, has a protective effect against the polycystic over syndrome (PCOS) caused by the Bisphenol A (BPA) which is an industrial compound disrupting endocrine system. Phytoestrogens, however, are the naturally occurring plant compounds which have the similar structures to those of oestrogen. In our study, the thirty-six Wistar albino female rats were utilised. The rats were divided into six groups and each group consisted of six rats. The daily doses of ingredients given to each group are as follows. 1. group: Maize oil; 2. group: 50 mg/kg BPA; 3. group: 50 mg/kg testosterone propionate; 4. group: 50 mg/kg BPA+0.5 mg/kg phloretin; 5. group: 50 mg/kg BPA+5 mg/kg phloretin; 6. group: 50 mg/kg BPA+50 mg/kg phloretin.

These six groups have been given the subcutaneous injection of phloretin first, thereafter BPA for fifteen days. Also, the estrous cycles have been monitored by taking the smear

samples. Twenty-four hour after the last dose given, the tissue samples were taken from the ovary, uterus, liver and kidney. The thin sections, which were taken after the tissue follow-up, were analysed under the light microscope. Apart from that, CYP17A1 and CYP11A1 expressions were investigated by performing an immunohistochemical staining on the ovarian tissue. The biochemical analyses of ALT, AST, triglyceride, albumin, creatinine, ure and glucose were made on the serum samples acquired from the blood drawn from the rats' hearts. On the other hand, the levels of FSH, LH, DHT, $ERR\alpha$ and cortisol hormones were checked.

The histopathological evaluation indicated that the intense cystic appearances have been observed on the ovarian tissues in the BPA group. Similarly, prolonged diestrus phases have been detected in the smear cycle. It has been reported that the cystic appearances of ovaries in the fifth and sixth phloretin groups have diminished, as it was expected. The CYP11A1 and CYP17A enzymes have been stained intensively on the BPA positive control group tissues depending on the increase in testosterone whereas they were stained weakly in the fifth and sixth groups. Degeneration, congestion and mononuclear cell infiltration have been identified on the kidney and liver tissues. While the serum ure levels showed an increase in the second, third, fourth and fifth groups comparing to the control group, the serum albumin levels increased in the fifth group in contrast to the control group. The serum ALT and AST levels, however, were statistically significant in all groups in comparison with the control group. The serum FSH levels have decreased in all groups comparing to the control group. There was a rise in the serum oestrogen levels of the fifth and sixth groups. The serum DHT levels, on the other hand, showed an increase in all groups as opposed to the control group. Lastly, the serum cortisol level has differentiated only between the second and control groups.

As a conclusion, in this PCOS model induced by BPA, it has been recorded that the cystic follicles which were abundantly found on the ovaries have decreased in the fifth and sixth groups. This decrease has been confirmed with the serum samples obtained by the immunohistochemistry staining.

KEYWORDS: Bisfenol A, phytoestrogen, polycystic ovarian syndrome, phloretin, rat, endocrine disruptors

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren, karşılaştığım her zorlukta yanımda olan, bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, yanında kendimi her zaman mutlu hissettiğim kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Nurhayat BARLAS'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bilgisine her daim ihtiyaç duyacağım, sabrıyla her zaman örnek alacağım sevgili hocam Araş. Gör. Dr. Elif KARACAOĞLU'na verdiği emekleri ve paylaştığı bilgileri için çok teşekkür ederim.

Sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Handan SEVİM'e benimle geçirdiği her süre boyunca paylaştığı kıymetli bilgileri ve samimiyeti için sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım. (Proje No: 17619)

Yüksek lisans hayatımın en güzel kazanımlarından olan, azim ve çalışkanlığına her zaman saygı duyduğum sevgili Eda Nur İNKAYA'ya tüm emekleri, güzel arkadaşlığı ve daha birçoğu için sonsuz teşekkür ederim.

Arkadaşlıkları benim için hep en değerli olan, her zaman yanımda olduklarını bildiğim çok kıymetli Didem ÜZGÜN ve Songül TURHAN'a hayatımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Nazlı MAYDA, Beliz TAŞKONAK, Deniz TULUMCUOĞLU, Merve DEMİR, Mevlahan ÖZKAN, Selen SANİN, Ceren KAYI ve Ekin TOKGÖZ'e yardımları için çok teşekkür ederim.

Annem Hepsen COŞKUN ve babam ALİ COŞKUN'a eğitim hayatım boyunca verdikleri emek, sabır ve güven için sevgi ve saygılarımı sunarım. Her zaman örnek aldığım canım ablalarım Burcu COŞKUN ve Gülçin COŞKUN'a, desteklerini bir kez olsun eksik etmedikleri ve bana kattıkları her şey için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nilüfer COŞKUN

Eylül 2020, Ankara

İÇİNDEKİLER












ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Endokrin Bozucular.....	2
2.1.1. Bisfenol A (BPA).....	5
2.2. Fitoöstrojenler	10
2.2.1. Yapıları ve sınıflandırılmaları	11
2.2.2. Sağlık üzerine etkileri.....	13
2.2.3. Floretin..	14
2.3. Polikistik over sendromu.....	17
2.3.1. Nöroendokrin bozukluklar	19
2.3.2. İnsülin direnci.....	20
2.3.3. Ovaryum bozuklukları.....	20
2.3.4. Genetik faktörler	21
2.3.5. Adrenal hiperandrojenizmi.....	21
2.3.6. Çevresel etkiler.....	22
2.4. CYP11A1 ve CYP17A1.....	22
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1. Gereç.....	24
3.1.1. Kimyasal malzemeler.....	24
3.1.2. Deney hayvanlarının temini	24
3.1.3. Laboratuvar koşulları	25
3.2. Yöntem.....	25

3.2.1. Deney hayvanlarının gruplandırılması ve uygulama planı	25
3.2.2. Vücut ağırlığı, organ ve rölatif organ ağırlıkları.....	27
3.2.3. Besin ve su tüketimi.....	27
3.2.4. Östrus döngüsünün takibi	27
3.2.6. Histopatolojik incelemeler	28
3.2.7. İmmünohistokimyasal boyamalar	28
3.3. İstatistiksel değerlendirmeler	29
4. SONUÇLAR.....	31
4.1. Vücut Ağırlığı, Organ ve Rölatif Organ Ağırlıkları	31
4.2. Besin ve Su Tüketimi.....	35
4.3. Biyokimya analiz sonuçları	38
4.4. Hormon analiz sonuçları.....	45
4.5. Östrus döngüsü sonuçları.....	50
4.6. Histopatolojik Bulgular.....	64
4.6.1. Ovaryum Dokusuna Ait Bulgular	64
4.6.2. Uterus Dokusuna Ait Bulgular	70
4.6.3. Karaciğer Dokusuna Ait Bulgular	76
4.6.4. Böbrek Dokusuna Ait Bulgular	83
4.7. İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları.....	91
4.7.1. CYP11A1 Boyanması.....	91
4.7.2. CYP17A1 Boyanması.....	95
5. TARTIŞMA	98
6.SONUÇ	108
7. KAYNAKLAR	109
EKLER.....	119
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi	119
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	121
ÖZGEÇMİŞ	122














ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.BPA'nın kimyasal yapısı [10].....	5
Şekil 2.2.Endokrin bozulmaların hedefi steroid hormon reseptörleri ve ovaryum steroidojenik enzimlerdir. (ER: östrojen reseptörü, AR: androjen reseptörü, PR: progesteron reseptörü, LHR: lütenize hormon reseptörü, FSHR: folikül stimüle hormon reseptörü ve DHEA: dehidroepiandrosteron) [15]. (Ptak, Hoffmann ve Rak (2017)'den değiştirilmiştir).	7
Şekil 2.3.Floretinin kimyasal yapısı [44].	15
Şekil 3.1. Çalışmamızın şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.1. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait vücut ağırlık (g) değişim değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).....	31
Şekil 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarına ait başlangıç ve bitiş vücut ağırlığı (g) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^a Yağ kontrol grubundan, ^b BPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^c TP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^d BPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^e BPA 50 mg/kg/gün+Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^f BPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).....	32
Şekil 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarına ait % vücut ağırlığı değişimi değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^a Yağ kontrol grubundan, ^b BPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^c TP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^d BPA 50 mg/kg/gün+Floretin 5 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).....	32
Şekil 4.4. Kontrol ve uygulama gruplarına ait ortalama besin tüketimi (g) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^a Yağ kontrol grubundan, ^b BPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^c TP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^d BPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^e BPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^f BPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).	35
Şekil 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarına ait günlük besin tüketim (g) değerleri.....	36
Şekil 4.6. Kontrol ve uygulama gruplarına ait günlük su tüketim (ml) değerleri.	37

- Şekil 4.7. Kontrol ve uygulama gruplarına ait ortalama su tüketimi (ml) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^fBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$)..... 38
- Şekil 4.8. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait üre değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^cBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).. 40
- Şekil 4.9. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait trigliserid değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^bTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 5 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$)..... 40
- Şekil 4.10. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait kreatinin değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. 41
- Şekil 4.11. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait albümin değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cBPA 50 mg/kg/gün + Floretin 0,5 mg/kg/gün, ^dBPA 50 mg /kg/gün+Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg /kg/gün + Floretin 50 mg/kg/gün grubundan, grubundan istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$)..... 41
- Şekil 4.12. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait ALT değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$)..... 42
- Şekil 4.13. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait AST değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$)..... 42
- Şekil 4.14. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait glukoz değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan. 43
- Şekil 4.15. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait kortizol değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50

- mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatikselsel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).46
- Şekil 4.16. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait dihidrotestosteron değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, istatikselsel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).46
- Şekil 4.17. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait östrojen değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^fBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatikselsel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).47
- Şekil 4.18. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait FSH değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan istatikselsel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).47
- Şekil 4.19. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait LH değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.48
- Şekil 4.20. Yağ kontrol grubuna ait östrus normal görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : kornifiye epitel hücresi).50
- Şekil 4.21. Yağ kontrol grubuna ait proöstrus normal görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : çekirdekli epitel hücre).51
- Şekil 4.22. Yağ kontrol grubuna ait metaöstrus normal görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : çekirdekli epitel hücre,  : kornifiye epitel hücresi,  : lökosit).51
- Şekil 4.23. Yağ kontrol grubuna ait diöstrus normal görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). , ( : lökosit).52
- Şekil 4.24. BPA (pozitif kontrol) grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : kornifiye epitel hücresi).52
- Şekil 4.25. BPA (pozitif kontrol) grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : çekirdekli epitel hücre).53
- Şekil 4.26. BPA (pozitif kontrol) grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : çekirdekli epitel hücre,  : kornifiye epitel hücresi,  : lökosit).53

Şekil 4.27. BPA (pozitif kontrol) grubuna ait diöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (○ : lökosit).	54
Şekil 4.28. Testosteron propiyonat (pozitif kontrol) grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (➡ : kornifiye epitel hücresi).	54
Şekil 4.29. Testosteron propiyonat (pozitif kontrol) grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (➡ : çekirdekli epitel hücre).....	55
Şekil 4.30. Testosteron propiyonat (pozitif kontrol) grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X).). (➡ : çekirdekli epitel hücre, ➡ : kornifiye epitel hücresi, ○ : lökosit).....	55
Şekil 4.31. Testosteron propiyonat (pozitif kontrol) grubuna ait diöstrus döngüsünün görünümü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (○ : lökosit).....	56
Şekil 4.32. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (➡ : kornifiye epitel hücresi).	56
Şekil 4.33. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (➡ : çekirdekli epitel hücre).	57
Şekil 4.34. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (➡ : çekirdekli epitel hücre, ➡ : kornifiye epitel hücresi, ○ : lökosit).....	57
Şekil 4.35. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin grubuna ait diöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (○ : lökosit).....	58
Şekil 4.36. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (➡ : kornifiye epitel hücresi).....	58
Şekil 4.37. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (➡ : çekirdekli epitel hücre).	59
Şekil 4.38. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X).(➡ : çekirdekli epitel hücre, ➡ : kornifiye epitel hücresi, ○ : lökosit).	59
Şekil 4.39. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin grubuna ait diöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (○ : lökosit).....	60

Şekil 4.40. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( :kornifiye epitel hücresi).....	60
Şekil 4.41. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). ( : çekirdekli epitel hücre).....	61
Şekil 4.42. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : çekirdekli epitel hücre,  : kornifiye epitel hücresi,  : lökosit).	61
Şekil 4.43. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubuna ait diöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X).( : lökosit).	62
Şekil 4.44. Kontrol ve uygulama gruplarına ait östrus döngüleri.	63
Şekil 4.45.Yağ kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda primer folikül normal görünümü, (H&E boyama, 400X).....	64
Şekil 4.46. BPA pozitif kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda çok sayıda kistik folikül (), (H&E boyama, 40X).....	65
Şekil 4.47. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda kist görünümü (), (H&E boyama, 400X).	65
Şekil 4.48. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda çok sayıda kistik folikül (), (H&E boyama, 40X).....	66
Şekil 4.49. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda çok sayıda kistik folikül (), (H&E boyama, 40X).....	66
Şekil 4.50. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusunda çok sayıda kistik folikül (), (H&E boyama, 40X).....	67
Şekil 4.51. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusunda primer () ve antral folikül (), (H&E boyama, 400X).	67
Şekil 4.52. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusuna ait genel görünüm, KL: Korpus luteum, AF: Antral folikül (H&E boyama, 40X).....	68
Şekil 4.53. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusu genel görünümü, KL: Korpus luteum, AF: Antral folikül (H&E boyama, 40X).....	68

Şekil 4.54. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusunda antral folikül (→), (H&E boyama, 400X).	69
Şekil 4.55. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusu genel görünümü. KL: Korpus luteum, AF: Antral folikül (H&E boyama,40X).....	69
Şekil 4.56. Yağ kontrol grubuna ait uterus dokusunun normal görünümü (H&E boyama, 400X).	70
Şekil 4.57. Yağ kontrol grubuna ait uterus dokusunun normal görünümü (H&E boyama, 40X).	71
Şekil 4.58. BPA pozitif kontrol grubuna ait uterus dokusunda salgı bezleri (→) (H&E boyama, 400X).....	71
Şekil 4.59. BPA pozitif kontrol grubuna ait uterus dokusunda salgı bezlerinde artış (→), (H&E boyama, 100X).	72
Şekil 4.60. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait uterus dokusunda dejenerasyon (→), (H&E boyama, 200X).	72
Şekil 4.61. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubuna ait uterus dokusunda salgı bezleri (→), (H&E boyama, 400X).	73
Şekil 4.62. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubuna ait uterus dokusunda salgı bezleri (→), (H&E boyama, 200X).	73
Şekil 4.63. 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin uygulama grubuna ait uterus dokusunda salgı bezleri (→), (H&E boyama, 200X)	74
Şekil 4.64. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin uygulama grubuna ait uterus dokusu salgı bezleri (→), (H&E boyama, 200X).	74
Şekil 4.65. Yağ kontrol grubuna ait karaciğer dokusu genel görünümü (H&E boyama, 400X).	76
Şekil 4.66. BPA pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda hücrel dejenerasyon (→) ve kupfer hücrelerinde artış (→), (H&E boyama, 400X).	77
Şekil 4.67. BPA pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda hepatositlerde balonlaşma (→), (H&E boyama, 400X).	77
Şekil 4.68. BPA pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda sitoplazmik erime (→), (H&E boyama, 400X).	78

Şekil 4.69. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda binükleer çekirdekli hücreler (→) ve kondanse olmuş nükleuslar (→), (H&E boyama, 400X).	78
Şekil 4. 70. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusu kupfer hücrelerinde artış (→), (H&E boyama, 400X).	79
Şekil 4.71. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (→), (H&E boyama, 400X).	79
Şekil 4.72. 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda karaciğer dokusunda sinüzoidal genişleme (→), (H&E boyama, 200X).	80
Şekil 4.73. 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda karaciğer dokusunda yağlanma (→), (H&E boyama, 200X).	80
Şekil 4.74. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda karaciğer dokusunda konjesyon (→) ve hepatositlerde apoptotik çekirdekler (→) (H&E boyama, 200X).	81
Şekil 4.75. Yağ kontrol grubuna ait böbrek dokusunda normal görünüm (H&E boyama, 200X).	83
Şekil 4.76. Yağ kontrol grubuna ait böbrek dokusu normal görünümü, (H&E boyama, 400X).	84
Şekil 4.77. BPA pozitif kontrol grubuna ait böbrek dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (→) ve tübüler dejenerasyon (→), (H&E boyama, 400X).	84
Şekil 4.78. BPA pozitif kontrol grubuna ait böbrek dokusunda glomerular atrofi	85
Şekil 4.79. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait böbrek dokusunda glomerular atrofi (→) ve konjesyon (→), (H&E boyama, 400X).	85
Şekil 4.80. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait böbrek dokusunda konjesyon (→), (H&E boyama, 400X).	86
Şekil 4.81. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda Bowman kapsülünde genişleme (→), tübüler dejenerasyon (→) ve lümeneye atılmış hücre çekirdekleri (→), (H&E boyama, 200X).	86
Şekil 4.82. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda Bowman kapsülünde genişleme ile birlikte atrofi (→) ve tübüler dejenerasyon (→), (H&E boyama, 400X).	87
Şekil 4.83. 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda fibröz doku oluşumu (→), (H&E boyama, 400X).	87

Şekil 4.84. 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon (→),konjesyon (→),(H&E boyama, 400X) ..	88
Şekil 4.85. 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda tübüler dejenerason (→) ve lümene atılan hücreler (→) (H&Eboyama,400X).....	88
Şekil 4.86. 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon (→), Bowman kapsülünde genişleme (→) ve konjesyon (→) (H&E boyama, 400x.....	89
Şekil 4.87. Yağ kontrol grubuna ait CYP11A1 boyanması, (1000x).	91
Şekil 4.88. Pozitif kontrol grubu BPA'ya ait CYP11A1 boyanması, (1000x).	92
Şekil 4.89. Pozitif kontrol grubu TP'ye ait CYP11A1 boyanması, (1000x).	92
Şekil 4.90. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP11A1 boyanması, (1000X).....	93
Şekil 4.91. 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP11A1 boyanması, (1000X).....	93
Şekil 4.92. 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP11A1 boyanması, (1000X).....	94
Şekil 4.93. Yağ kontrol grubuna ait CYP17A1 boyanması, (1000x)	95
Şekil 4.94. Pozitif kontrol grubu BPA'ya ait CYP17A1 boyanması, (1000x).	95
Şekil 4.95. Pozitif kontrol grubu TP'ye ait CYP17A1 boyanması, (1000x).	96
Şekil 4.96. 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP17A1 boyanması, (1000X).....	96
Şekil 4.97. 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP17A1 boyanması	97
Şekil 4.98. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP17A1 boyanması, (1000X).....	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. BPA'nın moleküler şekli ve fizikokimyasal özellikleri.....	9
Çizelge 2.2. Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması [35].	13
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan doz grupları, uygulanan maddeler ve her bir gruptaki sıçan sayıları (n)..	26
Çizelge 4.1.Kontrol ve uygulama gruplarına ait gerçek organ ağırlıklarının (g) değerleri.	33
Çizelge 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rölatif organ ağırlıklarının (g/kg) değerleri.....	34
Çizelge 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarına ait serum biyokimya değerleri. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).	44
Çizelge 4.4. Kontrol ve uygulama gruplarına ait serum hormon değerleri. Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).	49
Çizelge 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarına ait ovaryum dokularında tespit edilen kistik folikül, korpus luteum ve uterus dokularında tespit edilen salgı bezi sayısı insidansları.	75
Çizelge 4.6.Kontrol ve uygulama gruplarına ait karaciğer dokusunda tespit edilen histopatolojik bulguların insidansları.	82
Çizelge 4.7. Kontrol ve uygulama gruplarına ait böbrek dokularında tespit edilen histopatolojik bulgu insidansları.	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µm	mikrometre
g	gram
mg	miligram
ml	mililitre
IU	International Unit

Kısaltmalar

EDC	Endokrin Bozucu Kimyasal
BPA	Bisfenol A
DAB	3,3' Diaminobenzidine
CYP11A1	Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1
CYP17A1	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase
PND	Doğum Sonrası Gün (Post Natal Day)
H&E	Hematoksilen&Eozin
OECD	Ekonomik İş Birliği ve Kalkınma Örgütü (Organisation for Economic Co-operation and Development)
AMH	Anti Müllerian Hormon
LH	Lüteinleştirici Hormon
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
PKOS	Polikistik Over Sendromu
EPA	United States Environmental Protection Agency
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon

1. GİRİŞ

Günlük yaşantımızda endokrin bozucu kimyasallara birçok yönden oldukça fazla miktarlarda maruz kalmaktayız. Bu kimyasalların düşük konsantrasyonlarda kadın ve erkeklerde üreme problemleri, gelişim bozukluğu ve kanser gibi çeşitli sağlık sorunlarına yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca obezite, diyabet ve endometriozis gibi bazı metabolik bozuklukların ortaya çıkmasında de etkili oldukları ileri sürülmektedir [1].

Polikistik over sendromu ailesel nedenlerle olabileceği gibi, çevresel kaynaklı endokrin bozucuların etkisi altında gelişebilmektedir. Doğurganlık çağındaki kadınların %5-10'unu etkilemekte olup, ovaryumlarda kiste, hormonal bozukluklara, diyabete, obeziteye, metabolik sendroma neden olabilmektedir [2].

Fitoöstrojen takviyeleri, hormon tedavisine alternatif olarak kabul edilmektedir. Esas olarak bitkilerden elde edilir ve insan endokrin sistemi tarafından üretilen östrojene benzeyen yapılara sahiptir. Östrojen reseptörlerine bağlanarak, östrojen eksikliğini telafi edebilmektedirler [3]. Çalışmamızda kullandığımız floretinin de östrojenik aktivitesi kanıtlanmıştır [4]. Bu yüzden üreme sistemi üzerinde potansiyel etkileri mevcuttur. Ayrıca antioksidan, antitümör ve antiinflamatuvar özelliği çalışılmış olup diyabetik sıçanlarda iyileştirme etkisi gözlenmiştir [5].

Bu çalışmadaki amacımız, polikistik over sendromuna neden olduğu bilinen BPA'nın dişi üreme sistemi üzerinde muhtemel olumsuz etkileri üzerine bir fitoöstrojen olan floretinin koruyucu etkilerini araştırmak ve bu hastalığa karşı alternatif iyileşme seçeneklerini sunmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Endokrin Bozucular

Kimyasallar günlük yaşantımızın vazgeçilmez bileşiklerini oluşturmaktadır. Bu bileşiklerin birçoğu özellikle endokrin bozucular olarak bilinenler, endokrin sistem (hormonlar) üzerinde zararlı etkilere sebep olabilmektedirler. Hormonlar, çok küçük miktarlarda ve ihtiyaç duyulduğunda salgılanarak vücudun büyümesini, gelişmesini, metabolizmasını, üremesini, bağışıklığını ve davranışlarını düzenleyen önemli moleküllerdir [6].

Endokrin bozucu bileşikler, A.B.D. Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından, vücutta homeostazın, üremenin, gelişmenin ve/veya davranışın korunmasından sorumlu olan doğal hormonların sentezini, salgılanmasını, taşınmasını, bağlanmasını ya da ortadan kaldırılmasını engelleyen kimyasallar olarak tanımlanmıştır [7]. Endokrin bozucu kimyasalların başlangıçta östrojen reseptörleri (ER'ler), androjen reseptörleri (AR'ler), progesteron reseptörleri de dahil olmak üzere nükleer hormon reseptörleri (steroid ve tiroid hormonlarını ve diğer bazı molekülleri tanımaktan sorumlu hücre içinde bulunan bir protein sınıfı) yoluyla etki gösterdiği düşünülmekteydi [3]. Günümüzde temel bilimsel araştırmalar göstermektedir ki hormon mekanizmaları başlangıçta kabul edilenden çok daha karmaşık ve kapsamlıdır. Bu nedenle, endokrin bozucu bileşikler etkilerini, reseptörleri hücre çekirdeğinde bulunan ve nükleusta olmayan steroid hormon reseptörleri (örneğin, membran ER'ler), nonsteroid reseptörleri (örneğin serotonin reseptörü, dopamin reseptörü, norepinefrin reseptörü gibi nörotransmitter reseptörleri), yetim reseptörleri (endojen ligandı henüz tanımlanmamış protein, örneğin aril hidrokarbon reseptörü) yoluyla steroid biyosentezi ve/veya metabolizmasında yer alan enzimatik yollar ve endokrin-üreme sistemleri üzerinde birleşen birçok başka mekanizma ile gösterebilirler [8]. Daha basit bir tanımlama ile endokrin bozucu kimyasallar ya da kimyasal karışımları normal hormon fonksiyonlarına zarar vermektedirler [7]. Böylece fiziksel açıdan bakıldığında endokrin bozucu bileşikleri, doğal ya da sentetik olsun, çevresel veya uygun olmayan gelişimsel maruziyet olduğunda organizmanın çevresi ile iletişim kurmasını ve cevap vermesini sağlayan hormonal ve homeostaz sistemlerini değiştiren bileşiklerdir, şeklinde tanımlayabiliriz [8].

A) Endokrin bozucu bileşikler iki kategori altında toplanabilir:

- a. Doğal olarak bulunanlar: İnsan ve hayvan besinlerinde bulunanlar (Fitoöstrojenler; genistein, daidzein vb.).
- b. Sentetik olarak üretilenler:
 - i. Endüstriyel solventler olarak kullanılan sentetik kimyasallar ve yan ürünleri (Poliklorlu bifeniller, polibromlu bifeniller, dioksinler vb.)
 - ii. Plastikler (BPA)
 - iii. Plastikleştiriciler
 - iv. Pestisitler
 - v. Fungisidler
 - vi. Bazı farmasötikler (diethylstilbestrol vb.)

B) Endokrin bozucu bileşikler ayrıca orijinlerine göre de gruplandırılabilir:

- a. Doğal ya da yapay hormonlar (Fitoöstrojenler, tiroid ilaçları, doğum kontrol hapları)
- b. Hormonal yan etkileri olan ilaçlar (naprokse, metoprolol)
- c. Endüstriyel ve ev kimyasalları (fitalatlar, alev geciktiriciler, alkilfenol etoksilat deterjanları, çözücüler, 1,4-dikloro-benzen ve poliklorlanmış bis-fenoller)
- d. Endüstriyel ve evsel işlemlerin yan ürünleri (polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), dioksinler, pentaklorobenzen vb. [7]).

Endokrin bozucuların etkilerinin anlaşılabilmesi için dikkate alınması gereken birkaç nokta vardır:

1. Maruziyet zamanı: Endokrin bozucuların yetişkinlerde ve fetüs gelişiminde veya bebeklerde farklı etkileri olabilir. Organizmanın geliştiği çevre (plasentalı memelilerde anne karnı, diğer omurgalılarda yumurta) ve dış çevre, ileriki yaşamında bir hastalık ya da işlev bozukluğu gelişme eğilimini belirlemek için bireyin genleriyle etkileşime girebilir. Bu eğilim aynı zamanda, organların önemli bir

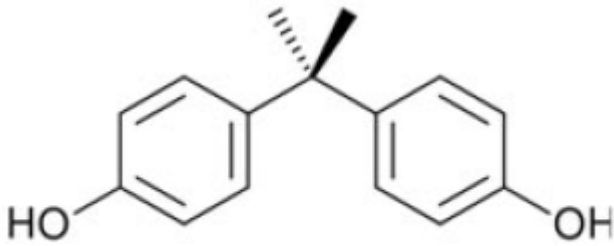
gelişme göstermeye devam ettiği fetal dönemden post natal erken gelişim dönemine kadar endokrin bozuculara maruz kalma durumuna da bağlıdır.

2. Endokrin bozucuların etkileri erken başlayabilir ve süreklilik gösterebilir: Endokrin bozucuların ergenlik sonrası dönemden ziyade erken gelişim döneminde daha fazla risk oluşturduğu yapılan araştırmalardan açıkça görülmektedir [7]. NIEHS tarafından (Ulusal Çevre Sağlığı Bilimleri Enstitüsü) yapılan araştırmalar endokrin bozucuların olumsuz sonuçlarının, doğrudan endokrin bozuculara maruz kalmasalar bile sonraki nesillere geçebileceğini göstermiştir. Mekanizmalar, DNA dizisini değiştirmeden gen fonksiyonunun değiştirebildiğini göstermektedir.
3. Maruziyet süresi: Endokrin bozuculardan kaynaklanan hastalıklar maruz kalma süresi boyunca belli olmayabilir. Yetişkinlikte veya sonraki dönemlerde yaşlanma sırasında ortaya çıkabilir. Maruz kalma ve hastalıkların ortaya çıkışı arasındaki gecikme, endokrin bozucu kimyasalların belirli hastalıklara katılımını belirlemede zorluk yaratır.
4. Diğer kirleticilerin katılımı: Çevre kirliliği tek bir bileşikten kaynaklanmamaktadır. Bu nedenle, eğer bireyler ve populasyonlar bir endokrin bozucu kimyasala maruz kalırsa, ortamda diğer çevre kirleticilerine de maruz kalma olasılığı yüksektir. Bu durumda farklı endokrin bozucu kimyasalların birlikte veya sinerjik etkileri ortaya çıkabilir.
5. Düşük doz etkileri: Son yirmi yıldan beri endokrin bozucular, bilim dünyasında ilginç ve dikkatleri çeken bir çalışma alanı olmuştur. Bu süre zarfında bilim insanları farklı tür çalışmalar yapıp hipotezlerini yayınlamışlardır. Bazı bilim adamları yüksek seviyede kimyasal kirlenmenin sağlığı ve farklı vücut sistemlerini etkilediğini ancak genel olarak insan vücudundaki sağlık üzerine etkisinin çok düşük olduğunu belirtmiştir. Ancak 2007-2011'de Flemish biyoizlem kampanyasında elde edilen sonuçlar, çok düşük dozlarda kadmiyum ve organoklorlu bileşiklere internal maruziyetin serum hormon seviyelerinde, eşeyssel olgunlaşmada, boy ya da beden kitle endeksinde değişikliklere neden olduğunu göstermektedir.
6. Endokrin bozucu kimyasalların konsantrasyonları: Endokrin bozucular çevreye çeşitli kaynaklardan girerler. Günümüzde, insanlar günlük yaşamda endokrin bozuculara maruz kalmaktadır çünkü bu bileşikler içme suyundan tüketilen ürünlere, ilaçlardan, yiyecek maddelerine vb. kadar tüm ürünlerde düşük dozlarda bulunmaktadır [7].

Uygarlaşma, endüstrileşme ve kentleşme kimyasalların çeşit ve dozlarına olan maruziyeti de devamlı hale getirmiştir. Günümüzde 800'e yakın endokrin bozucu etkinliği olan ve olma potansiyeli bulunan kimyasal vardır. Endokrin bozucular; plastik şişeler, metal yiyecek kutuları, deterjanlar, alev geciktiriciler, oyuncaklar, kozmetik ve böcek ilaçları da dahil olmak üzere birçok günlük üründe bulunabilmektedirler [6]. Bunlar arasında bisfenol A (BPA), fitalik asit esterleri (fitalatlar), heksaklorobenzen, poliklorlu bifeniller, diklorodifeniltrikloroetan ve metabolitleri, parabenler sayılabilir. Bu maddeler sahip oldukları fenolik yapılarından dolayı östrojen, androjen ve progesteron reseptörleri ile etkileşime geçebilirler [9].

2.1.1. Bisfenol A (BPA)

İlk olarak 1891'de Alexander Pavlovich Dianin tarafından sentezlenmiştir ve daha sonra 1930'da İngiliz bir kimyager olan Charles Edward Dodds tarafından yapay östrojen olarak tanınmıştır. BPA, iki metil grubuna bağlı iki fenil halkası tarafından oluşturulan bir difenilmetan türevidir. Bisfenol A ($C_{15}H_{16}O_2$), dünya çapında en çok üretilen kimyasallardan biridir [10].



Şekil 2.1.BPA'nın kimyasal yapısı [10].

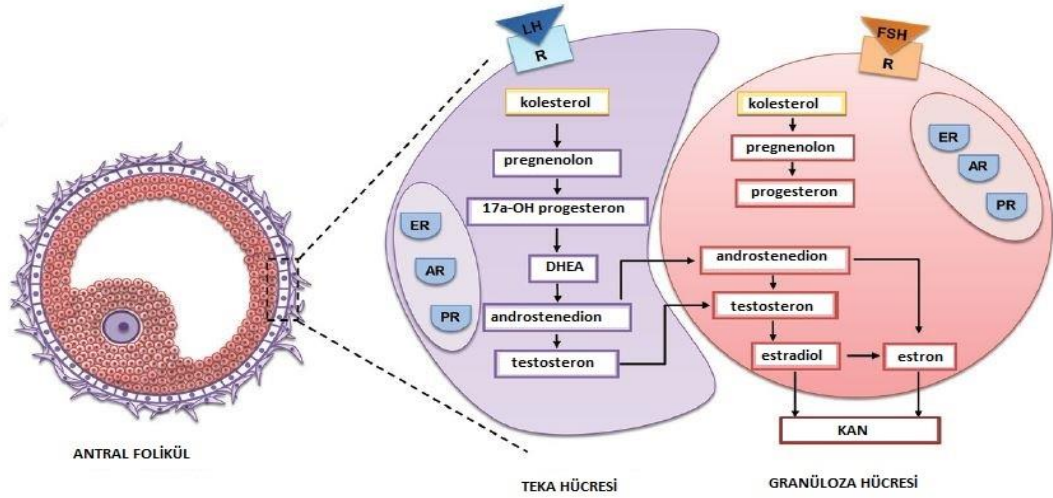
BPA, polikarbonat plastiklerin üretiminde ve epoksi reçinelerinin üretiminde esas olarak kullanılan bir kimyasaldır. Konserve kutularının iç yüzeyini kaplamada, yiyecek ve içecek paketlerinde, alüminyum yiyecek kutularının iç astarı ve yiyecek kutularında, şişe kapaklarında, biberonlarda, damacanalarda, dişçilikte ve diğer plastiklere karıştırılıp kullanılan oldukça yaygın bir kimyasaldır [6, 7]. Ayrıca polyester, polisülfon ve poliakrilat reçineleri, alev geciktiricilerde kullanım alanı vardır. Epoksi reçineler çeşitli konserve yiyecek ve içecekler için koruyucu astar olarak ve bebek maması için kullanılan kaplar da dahil olmak üzere cam kavanozlar ve şişeler için metal kapaklar

üzerine bir kaplama olarak kullanılmaktadır. Bu kullanımlar, tüketicinin besin yoluyla BPA'ya maruz kalmasına neden olmaktadır [12].

EPA tarafından önerilen BPA değerleri ise şu şekildedir: LOAEL; 50 mg/kg/gün, NOAEL; 5 mg/kg/gün, ADI; 50 µg/kg/gün. Yetişkinlerde her gün maruziyet ortalama; 0,5 µg/kg/gün olarak verilmiştir [8]. Endokrin bozucu kimyasalların steroid hormonlara moleküler benzerliği, hormonal homeostazinin bozulmasına yol açabilir. Bu da üreme fonksiyonlarında aksamaya neden olmaktadır. Anovulasyonun patogenezinde de rol almaktadırlar. Reseptör aracılı sinyal yollarını taklit ederler ve bunun sonucunda ovaryumda E₂ üretimini baskılayarak anovulasyona neden olurlar [13].

BPA'nın hayvanlar üzerindeki bazı etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır ve tekrarlı-doz hayvan çalışmalarında tanımlanan hedef organların bağırsak, karaciğer ve böbrekler olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte BPA, hormonal aktivitesi, fiziksel, nörolojik ve davranışsal gelişim üzerine potansiyel etkileri ile ilgili olarak endişeye neden olmuştur [12]. BPA nükleer steroid reseptörler ER α ve ER β 'ye bağlanarak ya da bazıları genomik olmayan yollar şeklinde zayıf östrojen etkisi göstermektedir. BPA'ya maruziyet hayatın farklı aşamalarında farklı şekillerde olabilmektedir. Dişi sıçanlarda, prenatal ya da postnatal periyod boyunca BPA'ya maruziyet üreme fizyolojisinde; pubertal dönemin başlama zamanına etkisi, erken vajinal açıklığın oluşması, östrus döngüsünün bozulması, uterus ağırlığında artış ve erken oogenesizde bozulma gibi etkilere neden olduğu ortaya çıkartılmıştır [14]. Oogenezin bozulması sonucunda ovaryum dokusunda antral foliküllerin artması ve fazla sayıda gelişmemiş foliküllerin olması oldukça önemlidir. Bu sonuçlar BPA'nın ovaryumun fonksiyonlarını değiştirebileceğine işaret etmektedir [14]. İn vivo olarak yapılan çalışmalar BPA'nın androjenik veya anti-androjenik aktivitesinin olduğunu göstermiştir. İnsanlarda ve diğer primatlarda oral yoldan verilen BPA, bağırsak duvarında ve karaciğerde ilk geçiş metabolizması sırasında hızlı bir şekilde emilmekte ve BPA, glukuronide dönüştürülmektedir. Az miktarda BPA ise sülfat konjugatına dönüştürülmektedir [7]. Oral olarak verilen BPA'nın %80'inden fazlasının 5 saat içinde vücuttan temizlendiği,

konjuge formlarının ise endokrin aktiviteden yoksun olduğu belirtilmektedir [12].



Şekil 2.2. Endokrin bozulmaların hedefi steroid hormon reseptörleri ve ovaryum steroidojenik enzimlerdir. (ER: östrojen reseptörü, AR: androjen reseptörü, PR: progesteron reseptörü, LHR: lütenize hormon reseptörü, FSHR: folikül stimüle hormon reseptörü ve DHEA: dehidroepiandrosteron) [15]. (Ptak, Hoffmann ve Rak (2017)'den değiştirilmiştir).

BPA üreme organlarında birikmekte ve endokrin sisteme zarar vermektedir. Popülasyon genelinde BPA yaklaşık 1-2 ng/ml miktarında olmak üzere foliküler sıvıda tespit edilmiştir [10]. Yapılan birkaç epidemiyolojik çalışmada BPA ile yetişkin veya fetüs ovaryumları arasında çeşitli anormallikler olduğuna dair korelasyonlar tanımlanmıştır. Ayrıca, maruziyet zamanlarına bağlı olarak folikülogenez ovulasyon ve lüteinizasyon farklı aşamalardan geçmektedir [15].

BPA erken postnatal dönem ve fetal zaman boyunca oogenezi ve folikül oluşumunu etkilemektedir. Folikül oluşumu boyunca, BPA çoklu oosit foliküllerin (multiple oocyte follicles=MOFs) sayısını artırdığı, granüloza hücrelerinin tekli tabakasının etrafında birden fazla oosit meydana getirdiği belirtilmektedir. BPA'nın ayrıca fare fetal ovaryumunda oogenezi bozduğu bunun da anöploid ve anormalliklerin artması şeklinde sonuçlandığı belirtilmiştir [10]. Sıçanların erken postnatal periyot boyunca BPA'ya maruziyeti primordial folikül rezervinin azalmasına ve MOFs insidansının artmasına neden olmaktadır. Ayrıca sıçanların gestasyonel ve neonatal periyot boyunca BPA ile

indüklenmesi yetişkinlikte PKOS benzeri sendromun açığa çıkmasına neden olduğu belirtilmektedir. PKOS üreme çağındaki kadınların en sık karşılaştığı endokrin bozukluklardan biridir. Hiperandrojenizm, insülin direnci ve kronik anovulasyon ile karakterizedir [15].

BPA üretiminin dünya çapında artması nedeniyle alternatif bileşiklerin geliştirilmesine gidilmiştir. Bunlardan ikisi Bisfenol S (BPS) ve Bisfenol F'dir (BPF). Her ikisi de şu anda kısıtlama olmadan kullanılmaktadır. Bu iki bileşikle ilgili mevcut toksikolojik veriler azdır ve potansiyel etkileri hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Günümüzde, çalışmalar BPS'nin yüksek dozlar kullanılarak genomik mekanizmalar yoluyla etkilerini bildirmiştir [11] fakat in vivo toksikolojisi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Her ne kadar BPS'nin plastik ambalajlardan ısıyla sızması daha az muhtemel olsa da yine de normal kullanım şartlarında küçük miktarlarda polimer kaçışının olduğu bildirilmiştir. Chen ve ark. yaptığı çalışmada 40 uM BPS, BPA'ya oranla 15 kat daha düşük östrojenik aktivite göstermiştir. Tüm alternatif bisfenol türevleri Star, hsd3 β , CYP17A1 ekspresyonunu azaltmıştır. Sadece birkaç çalışma BPS'nin gıdalarda, yabani yaşamda veya insanlarda düşük konsantrasyon aralıklarında bulunduğunu göstermektedir. Eladak ve ark, yaptığı çalışmada BPF ve BPS'nin testosteron sentezi üzerindeki etkisine bakmak için FeTA modelini kullanmışlardır. Bu çalışmanın sonuçları, BPF'nin benzer bir doz-cevap etkisine sahip olduğunu göstermiştir. 1000 nmol/L dozlarında testosteron seviyesinde önemli düşüş görüldüğü belirtilmiştir. Diğer çalışmalarda, farklı hücre modellerinde BPS'nin sitotoksik, genotoksik ve mutajenik etkileri ortaya konmuştur. BPS'ye maruziyetin hücre sinyal yollarını ve apoptozu etkilediği belirtilmiştir [16].

Çizelge 2.1. BPA'nın moleküler şekli ve fizikokimyasal özellikleri [17]

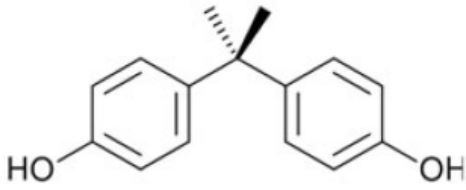
BPA

CAS No: 80-05-7

Kimyasal ismi: Bisfenol A

Moleküler formülü: $C_{15}H_{16}O_2$

Yapısal formülü:



Moleküler ağırlığı: 228,29 g/mol

Sinonimleri: 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl) propane, 4,4'-Isopropylidenediphenol

Fizikokimyasal Özellikleri

Özellik

Değer

Fiziksel durumu	Kristal, Bej
Koku	Kokusuz
Erime noktası	156-157°C
Kaynama noktası	250°C (5 hPa)
Nispi yoğunluk	1,2 g/cm ³ (25°C)
Buhar basıncı	-
Suda çözünürlüğü	120 mg/L (25 °C)
Kendiliğinden tutuşma sıcaklığı	510°C (1,013 hPa)

2.2. Fitoöstrojenler

Fitoöstrojenler (*fito*; Yunanca bitki kelimesinden gelmektedir) kıvııl yonca otlaklarından beslenen koyunların doğurganlık sorunları üzerine, koyunların beslenme alanı takip edildiğinde, otlakların fenolik bileşiklerden, diğler otlaklara göre daha yoğun olduğu görülmüştür. İlk kez 1940'lı yıllarda bitki kökenli bileşiklerin östrojenik bir etkiye sahip olabileceği gündeme gelmiştir. Daha sonra bu otlaklarda bulunan fenolik bileşiklerin ilk bulunan fitoöstrojenlerden olan izoflavonlar, farmononetin ve biokanın A'dan yüksek miktarda içerdii bildirilmiştir. Bitki kökenli östrojenlere ilgi, hormon yerine koyma tedavisinin gündeme gelmesi ile daha da artmıştır [18].

Fitoöstrojenler, bitkiler tarafından doğal olarak üretilen organik bileşiklerdir. Mantar öldürücü gibi davranabilen, zararlı otları engelleyen, bitki hormonlarını düzenleyen ve bitkileri ultraviyole ışınlarına karşı koruyabilen bitki kimyasallarıdır. 300'ün üzerinde farklı bitki türünde bulunurlar ve insanlar tarafından bitki metaryallerinin tüketimi ile de sindirime karışmaktadır [19]. Yapısal olarak bazı fitoöstrojenler insan ve hayvanların endojen östrojenlerine benzemektedir. Son araştırmalar, insanlar tarafından yenildiğinde östrojen agonistleri veya antagonistleri olarak da işlev görebileceklerini göstermektedir [20].

Östrojen reseptörlerinin iki tipi vardır: β reseptörler temelde endotelyumda, beyinde, kemikte, intestinal mukozada, böbrekte, meme parenkimasında, kemik iliğinde eksprese edilirken; α reseptörler temelde endometriyumda, meme kanser hücrelerinde ve ovaryum stromasında eksprese edilirler. Fitoöstrojenlerden genistein ve kumostrol, östrojen reseptör β izoformuna daha yüksek afinite ile bağlanır [21].

Diyetle alınan östrojenler (incelenen sisteme bağlı olarak 10^{-2} - 10^{-3} kat kadar) estradiol ya da estronla karşılaştırıldığında zayıf östrojenlerdir. Steroidal olmayan östrojenlerin Er β reseptörlerine öncelikli bağlandığı bilinmektedir. Bu da klasik steroidal östrojenlerden yolakların ayırt edilebilmesini sağlar. İzoflavonlar, sayısız hormonal olmayan etkilere sahiptir. Örneğin; genistein, protein tirozin kinaz için etkili bir inhibitördür ve hücre proliferasyonunu regüle eder. Bu da hücrelerde östrojen reseptörleri eksikliğinde fitoöstrojenlerin sinyal iletimi üzerindeki potansiyel biyolojik etkisini açıklamaktadır [22].

1970'lerin ortasından itibaren eczacılığın daha fazla gelişmeye başlamasıyla birlikte sentetik hormonların kullanımı yaygınlaşmıştır. Sentetik hormonlar ise endojen

hormonları taklit ederek menopozun etkilerini en aza indirmeyi hedeflemektedir. Fakat bu ilaçların tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan bir takım yan etkilerden dolayı insanlar yan etkisi daha az olan ya da hiç olmayan fitoterapik ya da bitkisel kaynaklı başka seçenekler aramaya başlamışlardır. Özellikle aile hikayesinde göğüs ve uterus kanseri olan hastalar bu sentetik hormonların kısıtlamalarına özellikle dikkat etmelidirler. Bu yüzden tamamlayıcı ve alternatif terapiler özellikle fitoöstrojen yönünden zengin bitkilerin kullanımı, çağdaş toplumlarda gittikçe artan bir trende dönüşmüştür [23]. Son 15 yıl içerisinde araştırmacılar, fitoöstrojenlerin modern sağlık hizmetindeki olası rollerini araştırmak için mevcut ilaçların ötesine bakmaya başlamışlardır [20].

Ferrante ve ark. yaptığı çalışmada, fitoöstrojenlerin menstrual migren profilaksisinde etkili bir tedavi gibi görüldüğünü ancak daha fazla hasta grubuyla çalışmaya ihtiyaç olduğunu belirtmiştir [24].

Lephart ve ark. yaptığı çalışmada; gebelikten yetişkinliğe kadar alınan fitoöstrojenlerin, plazma fitoöstrojen seviyesine, erkek sıçanlarda testosteron seviyesine ve seksüel dimorfik beyin gelişimine etkisi ve beyin yapısındaki apoptotik hücrelerin varlığına bakılmıştır. Sonuç olarak plazma fitoöstrojen seviyesi uygulama grubunda arttığı, testosteron seviyesinin ise anlamlı artış göstermediğini belirtmişlerdir. Özetle, kemirgenlerde, diyet fitoöstrojen alımının hormon hassasiyetini etkileyerek hipotalamik beyin gelişimini yetişkinlik boyunca değiştirdiği ileri sürülmüştür [25].

2.2.1. Yapıları ve sınıflandırılmaları

Fitoöstrojenler, doğal olarak meydana gelen steroidal yapıda olmayan fenolik bitki bileşikleridir ve 2 ana gruba ayrılırlar: Flavonoidler ve flavonoid olmayanlar. En çok bilinen alt grupları ise izoflavonlar ve kumestanlardır [26]. Flavonoidlere örnek olarak apigenin, fisetin, galangin, hesperetin, mirisetin, floretin verilirken flavonoid olmayanlar lignanları içerir [21, 22]. Hepsisi de memelilerde bulunan östrojen 17β -östradiol ile yapısal benzerliği paylaşan polifenollerdir. Paylaşılan özellikler, bir çift hidroksil grubunun ve östrojen reseptörü (ER) alt tip α ve β 'ye bağlanmak için gerekli olan bir fenolik halkanın varlığını içerir. Hidroksil gruplarının konumu, ER bağlama kabiliyetini ve transkripsiyonel aktivasyonu belirlemede önemli görünmektedir, maksimum potansiyel dört, altı ve yedi pozisyonlarda elde edilmiştir [23, 24].

Flavonoidler yapısal olarak kalkonlar ile ilişkilidir ve aynı zamanda ortak olarak her bitkide, meyve ve sebzelerde, fitokimyasalların dağılımında bol miktarda bulunurlar.

Flavonoidler kalkonların aksine antioksidan aktivitelerinden dolayı oksidatif stres ilişkili hastalıklarda kullanılmaktadır [31].

İzoflavonlar, başlıca soya ve kırmızı yoncada meydana gelen ikincil bitki bileşikleridir. Soya fasulyesi, soya tohumu ve kırmızı yonca özleri veya diğer izoflavon içeren preparatlar örneğin; gıda takviyeleri (diyet gibi özel tıbbi amaçlar için) eczanelerde, marketlerde, yiyecek dükkanlarında ticari olarak satılmaktadır. EFSA'ya ve BFR'ye göre soya izoflavonların dozları günlük 100 mg'a kadar olmak üzere 10 aya kadar sağlıklı menopoz sonrası kadınlar için kabul edilebilirdir. İzoflavonların östrojenik etki sergileyebileceği gerçeğine dayanarak bu ürünler 'menopoz semptomlarını hafifletebilen doğal bileşikler' olarak tanıtılmıştır [32].

Kalkonlar, heterosiklik bir C halkası olmayan flavonoidlerdir. Ayrıca bu flavonoid kategorisi, antikanser, antifungal, antibakteriyel, antiviral ve antiinflamatuvar özellikler gibi geniş bir biyoaktivite spektrumu gösterir [33].

Soya fasulyesi ürünlerinde yüksek konsantrasyonlarda genistein, daidzein ve glisitein gibi flavonoidler ve onların glikozile formları, genistin, daidzin ve glisit ve kısmen de biokanin A ve formononetin bulunmaktadır. Kumestanlar, biokanin A ve formononetin esas olarak yoncada tespit edilmiştir [34]. Flavonoid içeren diğer bitkiler baklagiller, meyve, lahana ve bazı ağaç türlerinin özodunudur [35]. Lignanlar yenilebilir bitkilerde (yani baklagiller, meyveler, tahıllar, fındık ve yağlı tohumlar gibi sebzelerde) ve ağaç türlerinde görülür. Bağırsakta, bitki lignanlarının bağırsak mikrobiyotası tarafından enterolignanlara, özellikle enterodiol ve enterolaktona dönüştürüldüğü bilinmektedir [36].

Diğer fitoöstrojen kaynaklarına örnek olarak akuatik ekosistemler verilebilir. Alg, siyanobakteriler ya da akuatik makrofitler bunlardan birkaçıdır [37].

Çizelge 2.2. Fitoöstrojenlerin sınıflandırılması [35].

FİTOÖSTROJENLER	FLAVONOİDLER	İzoflavonlar
		Kumestanlar
		Kalkonlar
		Flavonlar
		Antosiyanidinler
		Auronlar
		Prenil flavonoidler
	FLAVONOİD OLMAYANLAR	Lignanlar

2.2.2. Sağlık üzerine etkileri

Herhangi bir ilaca veya toksine benzer şekilde, fitoöstrojenlerin dozu veya alımı dokudaki aktif bölgedeki veya reseptördeki doza eşdeğer değildir. Diyet fitoöstrojenleri gastrointestinal sistemde (GIT) emilim, idrar, safra, dışkı ve sütte biyotransformasyon, dağılım ve atılım süreçlerine girer. Fitoöstrojenlerin etkileri, maruz kalan türler, cinsiyet, doz ve maruz kalma süresi özellikle üreme gelişimi süresindeki zamanlamaya göre değişebilir [38].

Fitoöstrojen içeren takviye ve gıdaların sağlığa etkilerini inceleyen birçok klinik ve epidemiyolojik çalışma yapılmıştır [39]. Epidemiyolojik araştırmalar, diyetin kanser insidansını (örneğin meme, prostat kanseri) ve diğer dejeneratif bozuklukları (örneğin postmenopozal osteoporoz) önlediği yönünde kanıtlar sağlamıştır. İnsan örneklerinde lignan ve izoflavonoidlerin tanım ve tespiti sonucu, düşük kanser insidansı olan bölgelerde yaşayan deneklerin plazmasında bol miktarda bitkisel kaynaklı östrojenik bileşikler tespit edilmiştir [40]. Laboratuvar sonuçları her ne kadar fitoöstrojenlerin karsinogenik ve aterosklerotik hastalıkların inhibitörü olarak görünse de insan diyetinde

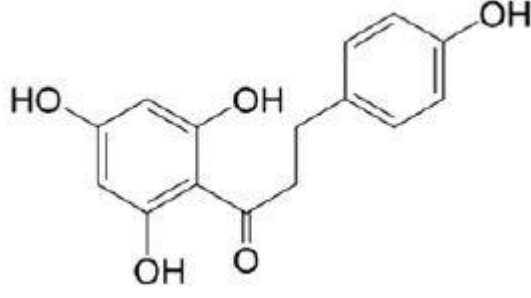
miktar ve kalite açısından varlıklarına ilişkin çalışmaların eksikliğini tamamlanması gerekmektedir [41].

Soya, hayvanların diyetinde doğal olarak bulunan en büyük protein kaynağıdır (fitoöstrojen aralığı: 200-800 ug/g). Fitoöstrojenler, yaşa bağlı hastalıklara (kardiyovasküler ve osteoporoz) ve hormona bağlı kanserlere (örneğin meme ve prostat kanserleri) karşı koruyucu ajanlar olarak tanınmıştır. Bu östrojen taklitleri östrojen reseptörlerini ($\beta>a$) bağlar ve bu özellik görünüşte sağlığı teşvik edici etkilerinde rol oynar. Bununla birlikte, fitoöstrojenlerin beyin yapısı ve işlevi üzerindeki etkisi açıklığa kavuşturulmaya devam etmektedir [25].

Fitoöstrojenler, soya tüketen popülasyonlarda düşük meme kanseri insidansını ortaya koyan epidemiyolojik gözlemlerin ardından kanser koruyucu ajanlar olarak önerilmiştir. Bununla birlikte, daha sonra yapılan araştırmalar, muhtemelen uzun vadeli insan diyet denemelerinin olmaması nedeniyle, meme kanserinde fitoöstrojenlerin önleyici bir rolünü tespit edememiştir. Mevcut kısa vadeli çalışmalar fitoöstrojen tüketimi ile uygun bir steroid hormon profili arasında bir ilişki olduğunu gösterse de meme hücresi proliferasyonu üzerindeki kesin etkiler belirsizliğini korumaktadır. Meme kanseri kemoprevensiyon diyet fitoöstrojenlerin rolü sonuçsuz kalsa da kemirgen çalışmaları teşvik edici soya ürünleri antitümör aktivitelere sahip olabileceğini düşündürmektedir. [42].

2.2.3. Floretin

Floretin (2', 4', 6' -trihidroksi-3-(4-hidroksifenil)-propiyofenon) [43], fitoöstrojen sınıflandırmasında flavonoid grubunun üç kalkon türevinden (butein, marein, floretin) biridir. Kalkonlar flavonoidlerin sekonder metabolizmalarının öncülüdür fakat flavonoidlerin tersine reaktif α,β -doymamış karbonil grubu içerirler bu yüzden sitoprotektif proteinlerin de potansiyel indükleyicileridir [19]. Yapısal olarak ilişkili bileşiklerle karşılaştırıldığında, floretinin antioksidan farmakoforunun 2, 6-dihidroksiasetofenon olduğunu ortaya koymuştur. 2,6-dihidroksiasetofenonun güçlü aktivitesi, tautomerizasyon yoluyla radikalinin stabilizasyonundan kaynaklanmaktadır. Dihidrokkalkon floretindeki antioksidan farmakofor, yani 2,6-dihidroksiasetofenon grubu, daha önce flavonoidlerde bildirilen antioksidan farmakoforlardan farklıdır [33].



Şekil 2.3.Floretinin kimyasal yapısı [44].

Floretin, elma kabuğunda bulunan dihidrokalkon flavonoididir. Bu fitopolifenol yüksek antioksidan özellik göstermektedir bu yüzden de oksidatif stres mekanizmasının tedavisinde kullanışlı olabilir. Antioksidan, antitümör ve antiinflamatuvar özellikler de dahil olmak üzere geniş biyolojik aktiviteler uygular ve vasküler endotel disfonksiyonunu ve karaciğer hasarını hafifletir. Ayrıca, bazı çalışmalar floretinin kardiyovasküler rahatsızlıklarda, kanserde, iskemi reperfüzyon hasarında, nörodejenerasyonda farmakoterapik olarak kullanılabileceğini göstermiştir [39, 38].

Son yapılan araştırmalar flavonoidlerin (floretin ve naringenin) adipositlerde adipogenez ve lipoliz üzerine önemli bir etkisini ortaya koymuştur [46]. Önceki çalışmalar, floretinin yağ asitleri translokaz (FAT/CD36) proteini bloke ederek yağ asidi alımını inhibe ettiğini ve bu nedenle adipositlerde substrat kullanılabilirliğini ve lipid birikimini azalttığını göstermiştir. Floretinin, bağışıklık ve anjiyogenezdeki işlevlerine ek olarak, yağ birikimini ve metabolizmasını düzenlediği, CD36 için bir antagonist olduğu bildirilmektedir [46].

Floretin elma, çilek ve diğer meyvelerde bulunmaktadır ve majör kronik hastalıklarda riski azalttığı görülmüştür [47]. Floretinin belirgin geniş koruyucu yetenekleri, bu polifenolün bazı kimyasal özellikleri ile tutarlıdır. Spesifik olarak, floretin bir antioksidan olarak işlev görebilen ve toksik serbest oksijen/azot radikallerini yakalayabilen bir aromatik flavonoiddir. Ek olarak, floretin enol fonksiyonlu bileşiğe dönüşebilen bölgeye (örneğin, A halkası üzerinde C-3 enol) sahiptir [45].

Tirozin kinazların hücre çoğalmasında, farklılaşmasında, düzenlenmesinde ve bazı kanser dokularında aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. Yang ve ark. yaptığı bir çalışmada floretinin epidermal büyüme faktörü reseptörü tirozin kinazı baskıladığı görülmüştür [19].

Çalışmalar, floretinin oral uygulamasının kan şekeri seviyelerini önemli ölçüde azalttığını ve diyabetik sıçanlarda dislipidemiği iyileştirdiğini göstermiştir [5].

Floretinin, Pepck1, Acs11, Glut4, Lipin1 ve Perilipin de dahil olmak üzere lipogenez ve trigliserid depolamasında yer alan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlediğini gösterilmiştir [48].

Shu ve arkadaşları, domuz primer adipositleri kullanarak, laktat çıktısını düşürürken glikoz kullanımını ve esterleşmemiş yağ asitlerini arttırmada güçlü bir floretin aktivitesi bildirmişlerdir [49]. Ayrıca peroksinitrit atma ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonunda güçlü bir antioksidandır [33].

Antioksidaz aktivitesi, glikoz taşıyıcılarının düzenlenmesi ve tümör hücrelerinde apoptozu indüklemeye yeteneği dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyona sahiptir [44].

Yapılan çalışmalar floretinin preadipositlerde adipogenezini kolaylaştırabileceğini ve olgun adipositlerde lipolizi destekleyebileceğini göstermektedir. Birkaç in vivo çalışma, floretin uygulanmasının diyabetik kemirgen modellerinde hiperglisemi, insülin direnci ve obeziteyi iyileştirdiğini göstermiştir [46].

Birçok rapor, floretin ve florizinin antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve glikoz taşınmasını inhibe edebileceğini, anti-inflamatuar etkileri olabileceğini fakat mekanizmasının belirsizliğini koruduğunu göstermektedir [44].

Alsanea ve ark. yaptığı bir çalışmada, floretin yüksek yağlı diyetle düzenli beslenen ve obez farelere haftada iki kez intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Floretin uygulamasının sonuçları vücut ağırlığı ve bileşimi, karaciğerdeki yağ içeriği, glikoz ve lipid metabolizması ve insülin direnci üzerine etkileri izlenmiş ve kontrol hayvanlarıyla karşılaştırılmıştır. Floretin uygulaması, yüksek yağlı diyetle indüklenen kilo alımını önemli ölçüde engellemiş ancak obez hayvanlarda kilo kaybına neden olmamıştır. Glikoz homeostazını, insülin duyarlılığını ve karaciğerde lipid birikimini hafifletmiştir. Floretinin glikoz ve lipid metabolizmasını ve inflamasyonu düzenlemedeki faaliyetleri, floretinin metabolik homeostazın korunmasında anti-hiperglisemik ve anti-hiperlipidemik bir madde olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar obezitenin azaltılması ve metabolik homeostazın korunması için floretin kullanımını doğrudan desteklemektedir [50].

GLUT4 ve PI3K/AKT sinyal yolları, enerji durumunun kilit sensörleridir ve glikoz ve lipid metabolizmasını düzenlerler. Floretin, GLUT4 translokasyonunu ve ekspresyonunu teşvik ederek PI3K/AKT yolunu aktive ettiği, böylece glikoz tüketimini ve toleransını iyileştirdiği bildirilmiştir. Shen ve ark. yaptığı çalışmada yüksek yağ ve yüksek şeker içeriği ile 8 hafta besledikleri deney hayvanlarına floretin, metformin ve floretin+metformini oral gavaj yöntemiyle verdikten sonra elde edilen sonuçlara göre; floretin+metformin verilen grupta kan glukoz seviyesi, glukoz toleransı ve insülin direnci iyileşmiştir. Buna ilave olarak, bu kombinasyon lipid birikimini azaltmış, adipoz doku, pankreas, karaciğerdeki patolojik değişiklikleri azaltmış ve tip 2 diyabet olan sıçanlarda karaciğer ve iskelet kasında IRS-1, PI3K, P-AKT ve GLUT4 ekspresyonunu artırmıştır [43].

2.3. Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık çağındaki kadınlarda %5-10 oranında görülen, birçok faktörün aynı anda görüldüğü, etiyojisi tam olarak anlaşılammış bir endokrin sistem bozukluğudur [2]. İlk kez 1935’de Stein ve Leventhal tarafından hirsut, adet görmeyen, obezite ve yumurtalıklarında kist olan 7 kadında tanımlanmıştır [51]. 2003 Rotterdam kriterlerine göre; az ya da hiç adet görmeme, hiperandrojenemi, polikistik over morfolojisi durumlarından en az iki tanesine sahip olan kadınlar polikistik over sendromlu olarak değerlendirilirler [52]. Sendromun özellikleri klinik, endokrin ve metabolik olarak 3 kategori altında değerlendirilebilir.

Klinik özellikleri; menstrual düzensizlikler, hirsutizm, akne, saç dökülmesi ve kısırılıktır. Endokrin özellikleri; androjen ve luteinize edici hormon seviyelerinin yükselmesidir. Metabolik özellikleri ise; insülin direnci, obezite, lipid abnormalitesi, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklardır [53].

PKOS’un patogenezi hakkında ileri sürülen bazı teoriler ise şunlardır:

- a. İnsülin direncine ve hiperinsüline neden olan benzersiz insülin hareketliliği ve salınımı
- b. Aşırı LH salınımına ve sıklığına neden olan nöroendokrin bir bozukluk
- c. Androjen sentezi defekti sonucu ovaryumlarda artmış androjen salınımı
- d. Kortizol metabolizmasının değişmesi sonucu adrenalde fazla androjen üretimi [54].

PKOS ergenlikten önce ya da ergenlik boyunca meydana gelebilir. Çalışmalar, PKOS'lu hastalardaki gonadotropin salgılatıcı hormon artışının, lutenize edici hormonun artışına neden olduğunu göstermiştir. LH reseptör ekspresyonlarının erken meydana gelmesi, sırayla foliküllerin erken olgunlaşmasına bu da yumurtalıkta androjen üretiminin artmasına neden olmaktadır. Öte yandan insülin direnci de LH ile birlikte yumurtalığın steroidojenik cevabını stimüle ettiği için androjen üretimi artıyor olabilir. Zamanından önce androjen üretimi, PKOS'da antral folikül gelişiminin durmasının nedeni olabilir. Polikistik overlerde primer ve sekonder foliküllerin sayısının önemli ölçüde arttığı bildirilmektedir. Oluşan bu foliküllerin atretik olmayıp, gelişimlerinin duraksadığı gösterilmiştir. Ayrıca bu foliküllerin gonadotropik uyarıya cevap verdiği ve steroid sentezinde aktif olduğu ileri sürülmüştür. Fakat oluşan foliküllerin atreziden nasıl kurtulduğu ve yetersiz dominant folikül gelişiminin nedeni henüz açıklanamamıştır [55]. Buna ilave olarak, anormal yumurtalık da foliküler engellemeye neden olmaktadır çünkü PKOS'lu hastalar en yüksek FSH sınırına erişirler. Örneğin, PKOS'da antimüllerian hormonun (AMH) serum ve ekspresyon seviyelerinin FSH aktivitesinin bölgesel inhibitörü olarak gösterilmektedir. PKOS durumunda bu sebep ve etkiyi ayırt etmek zordur çünkü folikülogenez kendini blokladığı için lokal inhibitörlerin üretiminin artmasına neden olabilir [50]. Folikülogenezdeki etkilerin yanı sıra androjenler adiposit fonksiyonları üzerinde çoklu etki gösterebilirler. Menapoz öncesi sağlıklı kadınlardan elde edilen adipositler kullanılarak yapılan in vitro çalışmada, testosterona maruz bırakılmış adipositler, bozulmuş insülin aracılı glikoz alımını ortaya koymuştur. Buna ilave olarak adipoz doku, doğum öncesi dönem boyunca ya da neonatal dönemde androjenle programlı bir şekilde maruz bırakıldığında adipoz dokunun artmasına ve bozulmuş glukoz toleransına neden olduğu hayvan deneylerinde gösterilmiştir [56].

PKOS gelişim sürecinde; küçük, büyümesi durmuş antral foliküller ile karakterizedir. PKOS'da östrojen seviyesi azalmakta buna karşın progesteron seviyesi artmaktadır. LH/FSH oranı ise normal çıkabilir [57].

Polikistik over sendromu dahil birçok hastalığın patogenezinde eser elementlerin rolü yakın zamanda açıklanmıştır. Lucidi ve arkadaşları krom pikolinat takviyesinin PKOS'lu yetişkinlerde glikoz toleransını artırdığını ve insülin duyarlılığını ve yumurtlama oranlarını daha da geliştirdiğini belirtmiştir. Bu olumlu gelişmelerin temelde insülin hassasiyetine kromun etkisiyle olduğu belirtilmiştir. Ya da bilinmeyen

mekanizmalar neden olmuş olabilir. Krom pikolinat üç değerlikli kromdan oluşmakta, pikolinik asit ile birleştirilen bir eser element bağırsak emilimini arttırmaktadır. Yüksek seviyelerde krom pikolinat alımı ile herhangi bir yan etki bildirilmemiştir [58].

Demirel ve ark. yaptığı çalışmada *Corylus avellana* tohum yağının polikistik over sendromunda gonadotropinleri düzenleyerek, steroid ve serum lipid parametrelerini ve antioksidan aktivitesi özelliği ile PKOS tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. *Corylus avellana* tohum yağının varisli damarlar, hemoroid, diyabet ve jinekolojik bozukluklarda da kullanıldığı gösterilmiştir [59].

Kakadia ve ark. yaptığı çalışmada letrozol indüklü polikistik over sendromunda *Vitex negundo L.* tohumlarının etkisine bakmıştır. Sonuçlara bakıldığı zaman; *Vitex negundo L.*'nin ovaryumda pozitif etki gösterdiği, glukoz toleransını ve bozulmuş östrus döngüsünü, LH/FSH oranını, steroidojenik enzimlere ve kardiyovasküler parametrelere düzenleyici etki gösterdiği belirtilmiştir [25]. Bu durum *Vitex negundo L.*'nin insülin direncini ve hiperglisemiyi büyük oranda düzeltmesine bağlanmıştır. Ayrıca linoleik asit gibi östrojenik bileşiklerin antiandrojenik ve östrojenik etki göstermesine bağlı olarak polikistik over sendromunun iyileşmesine katkı sağlamış olabileceği söylenmektedir [25].

D vitamini PKOS'lu kadınlarda adjuvan tedavi (koruyucu tedavi olarak uygulanan kemoterapi, hormon tedavisi ya da akıllı ilaç tedavisi) olarak da kullanılabilir. D vitamini uygulamasının glikoz metabolizması üzerindeki olumlu etkileri ve kardiyovasküler komplikasyonların azaltılması olarak bilinmektedir ancak D vitamini henüz PKOS tedavisinde yaygın olarak kullanılmamaktadır [60].

2.3.1. Nöroendokrin bozukluklar

LH hipersekresyonu PKOS için karakteristiktir. Yükselmiş LH seviyesine, GnRH stimülasyonuna artan hipofizin hassasiyetinin kısmen neden olduğuna inanılmaktadır. Bu durum artan LH salınımı ve frekansı ile anlaşılmıştır [51].

İmmünoaktif LH'nin normal olduğu PKOS'lu birçok hastada biyoaktif LH'nin arttığına dair kanıtlar vardır. Marshall ve ark. GnRH'nin değişmiş hipotalamik salgılanmasının bir göstergesi olarak LH'ın salgılanmasına odaklanmıştır. Gonadotropin sentezini ve sekresyonunu korumak için bir pulsatil GnRH uyarıcısının gerekli olmasına rağmen, gonadotropin alt ünite gen ekspresyonunu ve hipofiz LH ve FSH sekresyonunu belirleyen GnRH atımlarının düzensiz bir sıklığı ve genliği olduğuna inanılmaktadır. Bu

nedenle, yumurtlama döngülerinde, foliküler faz sırasında GnRH frekansındaki bir artış, LH dalgalanmasından önce LH sentezini desteklerken, yumurtlamanın ardından luteal steroidler, FSH sentezini desteklemek için GnRH atımlarını yavaşlatır. PKOS'da LH/GnRH atımları sürekli hızlıdır ve hiperandrojenemi ve bozulmuş foliküler maturasyon da LH sentezini destekler. Ancak azalmış hipotalamik duyarlılığın altında yatan mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır [54].

2.3.2. İnsülin direnci

Polikistik over sendromuna sahip olan kadınların yaklaşık %50-90'ı insülin direncine sahiptir. İnsülin direncine karşı cevap olarak hiperinsülinemi gelişmekte ve bunun sonucunda yumurtalık teka hücrelerinde ortak bir gonadotropin olarak luteinize edici hormon (LH) ile sinerjistik olarak etkileşime girmektedir. Sonuçta CYP17'nin (yumurtalık androjen biyosentezinde anahtar bir enzim olan P450c17a'yı kodlar) aktivasyonu, androjenlerin üretilmesini ve salınmasını artırır. Yumurtalık içinde insülin ayrıca antral öncesi folikül gelişiminin durmasını da sağlar. Hiperinsülinemi ayrıca, LH salınımının sıklığının artırılmasını, adrenal P450c17a aktivitesinin uyarılmasını ve hepatik eşey hormonu bağlayıcı globulin üretimini baskılanmasını içeren başka ekstra yumurtalık pleiotropik etkilerine de sahiptir [61].

2.3.3. Ovaryum bozuklukları

Hirsutizm ve yumurtlama düzeninde bozulmalar ilk menstrüasyon döngüsünden sonra başlar ve PKOS'lu bazı kadınlarda menopoza öncesi yıllarda iyileşen şiddetli oligomenore veya amenore şeklinde ortaya çıkabilir [51].

Oligomenore/anovulasyon klinik olarak büyük endişe yaratmaktadır ve PKOS'lu kadınlarda %70-80 aralığında görülmektedir. PKOS'da anovulasyon folikülgenезin bozulması ile karakterizedir. PKOS'da foliküler defekt, hızlandırılmış erken foliküler büyüme ve baskın folikül seçimine doğru sonraki aşamaların bozulmasından oluşmaktadır [62]. Normal folikülogenezde büyüme faktörleri [ör. (GDF-9), (BMP-15)] primordiyalden primer aşamaya geçişi uyarırken, FSH baskın folikül seçimine doğru sonraki folikülogenez aşamalarını düzenler. Folikülogenez boyunca, androjenler ve insülin LH ile birlikte sinerjistik etki gösterirler [62]. FSH ve AMH (Anti-Müllerian Hormon) arasındaki denge, baskın folikülün seçiminde ve sonrasında aromataz aktivitesi için önemli olabilir. Baskın folikülün artan östradiol üretimi, FSH

seviyelerini baskılayarak, alt foliküllerin ölümüne neden olmakta ve tek yumurtlama ile sonuçlanmaktadır [59].

PKOS, aslında androjen fazlalığı nedeniyle küçük foliküllerin birikmesi ile karakterizedir. Azalan oosit büyüme faktörleri, özellikle GDF9 ve BMP15, erken folikülogenezin artmasına katkıda bulunur. Küçük foliküllerin fazlalığı, foliküler FSH cevabının engellenmesine neden olan AMH seviyesinin artmasına sebep olmaktadır. Zayıflatılmış FSH duyarlılığı ve granülosa hücrelerinin erken luteinizasyonu baskın folikül seçimini bozar ve foliküler birikmeye neden olur [62].

2.3.4. Genetik faktörler

PKOS'un genetik faktörlerden etkilendiği çok açıktır. Ailesel olgu kümelenmesi birçok çalışmada tanımlanmıştır. En önemli destekleyici kanıtlar. PKOS semptomlarının benzerliğinin özdeş olmayan ikiz çiftlerden çok daha büyük benzerlikler sağladığıdır. Kalıtım şekli belirsizdir ancak sendromun klinik ve biyokimyasal heterojenitesi göz önüne alındığında, PKOS'un tek bir gen tarafından temsil edilmediği görülmektedir. Kompleks bir endokrin hastalık olduğundan poligenik ve oligogenik olma olasılığı daha yüksektir [63].

İyi çalışılan genlerden biri *SIRT-1* genidir. *SIRT-1* geni ürünleri DNA hasarını düzenler. Sitokin gen polimorfizmi PKOS'lu hastalarda gözlenmiştir. PKOS ve obezite ile TLR2, S450S ve ICAM1, K469E polimorfizimleri arasında ilişki bulunmuştur. DNA metilasyonu ve RNA sentezinde metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) hayati bir rol oynamaktadır. MTHFR, C677T ve A1298C arasındaki ilişkinin varyasyonları PKOS için risk faktörü oluşturmaktadır. LH salınımları PKOS'lu hastalarda değişmektedir. LH β -alt ünitelerinin genetik varyasyonları bu hastalarda gösterilmiştir [64].

2.3.5. Adrenal hiperandrojenizmi

CYP17A1'in varsayılan düzensizliği ile adrenal hiperandrojenizmin PKOS'da genetik olarak belirlenmiş bir özellik olduğunu öne süren kanıtlar vardır [56]. Kortizolün artmış periferik mekanizması da fonksiyonel adrenal hiperandrojenizmini desteklemektedir. Özellikle 5α -redüktaz tarafından kortizolün inaktivasyonunun artırılması ya da kortizonun 11-beta-hidroksisteroid gen 1 tarafından bozulmuş reaktivasyonu, adrenokortikotropik hormon (ACTH) baskılanma geri bildirimini azalmasına yol açabilir. Özellikle, insülin direnci kortizol üretiminin etkisi olmadan, kortizolün artmış 5α -redüktaz etkisini bir dereceye kadar açıklayabilir [62].

2.3.6. Çevresel etkiler

Çevrenin PKOS patogenezindeki rolü son zamanlarda atmosferde yaygın olan ve tüm hormon duyarlılık sistemlerine müdahale etme potansiyeline sahip geniş bir endüstriyel kimyasallar kategorisini içerecek şekilde genişlemiştir. Endokrin bozucu kimyasallar olarak bilinen bu ajanlar kan-kemik hormon metabolizması ile etkileşime girerek onların sentez ve sekresyonuna müdahalede bulunabilirler [2]. PKOS'un patofizyolojisi hala tam olarak anlaşılmamıştır ve çok faktörlü görünmektedir. PKOS'lu kadınların abartılı gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) puls üretici aktivitesine sahip olduğu ve bunun sabit olduğu gösterilmiştir [5]. LH yükselmesi ise foliküler gelişimi bozar ve yumurtalık androjen üretimini artırır. Buna ilave olarak, BPA'nın yumurtalık teka-interstisyel hücrelerde androjen sentezini doğrudan uyarabildiği de kanıtlanmıştır. Ayrıca, BPA insan eşey hormonu bağlayıcı globülin (SHBG) ile etkileşime girerek eşey steroidlerini SHBG'den uzaklaştırarak serbest testosteron miktarını artırmaktadır [10]. Hiperinsülinemi PKOS'lu kadınlarda sık görülen bir özelliktir ve genellikle obezitenin varlığı da bu duruma eşlik etmektedir. PKOS'lu kadınların visceral adipoziteye sahip olma olasılığı daha yüksektir [65]. Yapılan birçok çalışma ile BPA ile BMI (vücut kitle endeksi) arasındaki pozitif ilişki gösterilmiştir. Kandaraki ve ark. 100 sağlıklı, 71 PKOS hastası kadın ile yaptıkları bir çalışmada; PKOS patofizyolojisinde BPA ve androjenlerin kontrol grubuna göre pozitif anlamlı sonuçlar verdiğini gözlemlenmiştir [66]. Çevresel kimyasallardan kaynaklanan endokrin sistemin bozulması PKOS'un patogenezinde katkıda bulunabilir. İnsanda fetüslerin androjen benzeri EDC'lere uterus maruz kalması, metabolik bozukluklarla birlikte yetişkinlikte PKOS ile sonuçlanması olasıdır [67]. BPA ile yapılan birçok in vitro ve hayvan çalışmaları sonucu, PKOS ile benzer metabolik gelişim ve ovaryum disfonksiyonları meydana gelmiştir [62]. PKOS'lu kadınlar üreme sistemi açısından sağlıklı kadınlarla karşılaştırıldığında daha yüksek BPA seviyelerine sahip olduğu bilinmektedir ve bunun nedenini anlamak için de daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu açıktır [68].

2.4. CYP11A1 ve CYP17A1

CYP11A1, adrenal bezlerde, gonadlarda, plasentada ve merkezi sinir sisteminde bol miktarda ifade edilir. CYP11A1'in adrenal ve gonad spesifik ekspresyonu, transkripsiyon faktörü steroidojenik faktör-1 (SF-1) tarafından kontrol edilir. SF-1'in iki tane fonksiyonel bağlanma bölgesi vardır. İnsan CYP11A1 promotörünün -40 ve -1600

bölgelerinde bulunan P (proksimal) ve U (upstream), gen ekspresyonu için önemlidir [69].

CYP17A1 steroid hormonların mekanizmasında kilit rol oynamaktadır. Steroidojenik yolaktaki önemli bir enzimdir ve progesterinler, mineralokortikoidler, glukokortikoidler, androjenler ve östrojenleri ürettiği bilinmektedir. CYP17 tek nükleotid polimorfizmleri, farklı etnik gruplarda PKOS, meme kanseri, Cushing sendromu ve prostat kanseri gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir [70].

Polikistik overlerde, teka hücrelerinden androstenedion ve progesteron üretiminin normal teka hücrelerine kıyasla önemli derecede arttığı bilinmektedir. Bu steroidogenezdeki defektten kaynaklı olabilmektedir [71]. Polikistik over sendromunda bazı genlerin bu defekt ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında CYP11A1, mitokondrinin iç zarında bulunur ve kolesterolün pregnenolona dönüşmesini sağlar. CYP17A1 ise progesteronu androstenediona dönüştürür, düz endoplazmik retikulumda ve teka hücrelerinde bulunur [72]. Buna rağmen PKOS grubunda hem granüloza hem de interstisyel hücrelerde de CYP17A1 ve CYP19A1 aktivitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir [72].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasal malzemeler

Çalışmada kullanılan Bisfenol A (CAS No:80-05-7) (%99) ve floretin (CAS No:60-82-2) (%99) Sigma Aldrich (ABD) firmasından, testosteron propiyonat (%97) Hangzhou Dayang Chemicals (Çin) firmasından temin edilmiştir.

Biyokimyasal analizlerden; kreatinin, albümin, ALT (alanin aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), üre, trigliserid ELISA kitleri ELABSCIENCE (Çin) firmasından, glukoz kiti ise BT LAB firmasından sağlanmıştır. Hormon analizlerinden; DHT (dihidrotestosteron), LH (lutenize edici hormon), FSH (folikül stimüle edici hormon), kortizol ve $ERR\alpha$ (östrojen) kitleri ELABSCIENCE firmasından temin edilmiştir.

İmmünohistokimya boyama için; Rabbit-CYP11A1 (Cat No: BT-AP09802) anti rat ve Rabbit-CYP17A1 (CAT No: BT-AP09803) anti rat primer antikorları BT LAB (Çin) firmasından sağlanmıştır. Boyama için kullanılan peroxidase detection kit (CAT. No. 36000) ve goat anti rabbit HRP/DAB (Horseradish Peroxidase – 3'3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) kiti Sigma Aldrich (ABD) (Cat. No. 65-6120) firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Deney hayvanlarının temini

Son yıllarda polikistik over sendromu hayvan modellerinde geliştirilmektedir. Bu model hayvanlardan en avantajlı görüleni ise sıçanlardır. Bu hayvanların kısa üreme döngüsüne sahip olması, barındırma şartlarına ve ortamına kolay uyum sağlayabilmesi, stabil genetiklerinin olması gibi özellikleri çalışmalarda avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle çalışmamız 28 günlük, ortalama 130-150 gram ağırlıklarında, 36 adet Wistar albino (*Rattus norvegicus*) dişi sıçanlar ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılacak sıçanlar rastgele gruplandırılmıştır. Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden 2018/47-04 sayılı onayı ile alınmıştır.

3.1.3. Laboratuvar koşulları

15 günlük deney süresince laboratuvar sıcaklığı yaklaşık $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, nisbi nemi 48 ± 3 olarak ayarlanmıştır. $20\times 40\times 22$ cm boyutlarında, ızgara kapaklı, polikarbonat kafesler kullanılmıştır. Fotoperiyot 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneyde içme suyu olarak çeşme suyu kullanılmış (günlük 100 ml), yem normal pelet yem (günlük 50 mg) olarak verilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney hayvanlarının gruplandırılması ve uygulama planı

Çalışmada, dişi sıçanlara 28. günde (PND 28: postnatal day 28) uygulama yapılmaya başlanmıştır. Bu yaş aralığını seçmedeki amaç; prepubertal periyod (ergenlik öncesi) üreme sisteminin ve hormonların aktif olarak geliştiği bir dönemdir ve bu dönemde kemirgen ve insanlarda seksüel farklılaşma boyunca kimyasalların etkisi oldukça büyüktür. Bu nedenle prepubertal sıçanlar ile çalışmaya başlanmıştır. Sıçanlar her bir uygulama grubuna rastgele dağıtılmıştır. Her grupta kullanılacak hayvan sayısı için daha önceki benzer çalışmalar temel alınmış ve istatistiksel olarak anlamlı çıkması beklenen en küçük örneklem genişliği 6 olarak belirlenmiştir. Çalışma boyunca günlük olarak vücut ağırlıkları, tüketilen yem ve su miktarları takip edilmiştir. Diseksiyon esnasında çıkarılan dokular zarar verilmeden tartılıp kaydedilmiştir. BPA ve floretin belirlenen dozlarda, önce floretin sonra BPA olacak şekilde yarım saat arayla mısır yağında çözdürülerek deri altı enjeksiyon (subkutan) ile sıçanlara verilmiştir. Literatür araştırması temel alınarak subkutan uygulamasına (PKOS modeli oluşturabilmek için) ve doz miktarına karar verilmiştir [73]. Floretin dozları ise insanların günlük alabileceği fitoöstrojen dozlarına göre seçilmiştir. Floretin elma kabuğunda 80-420 mg/kg, suyunda 3-223 mg/l ve taze çilekte ise 2-5 mg/kg oranlarında bulunmaktadır [7]. Uygulama süresi 15 gün olarak planlanmıştır. 15 gün süre boyunca uygulama her gün aynı saatlerde yapılmıştır. Son verilen dozdan 24 saat sonra PND. 44. günde sıçanlar ketamin/ksilazin anestezisi altında iken servikal dislokasyon ile öldürülmüşlerdir.

Deney grupları;

1. Pozitif kontrol grubu; 50 mg/kg/gün BPA verilen grup,
2. 50 mg/kg/gün testosteron propiyonat verilen bir diğer pozitif kontrol grubu,
3. Negatif kontrol grubu; mısır yağı verilen grup

4. Düşük doz grubu; önce 0,5 mg/kg/gün floretin daha sonra 50 mg/kg/gün BPA verilen grup
5. Orta doz grubu; önce 5 mg/kg/gün floretin daha sonra 50 mg/kg/gün BPA verilen grup
6. Yüksek doz grubu; önce 50 mg/kg/gün floretin daha sonra 50 mg/kg/gün BPA verilen grup şeklindedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan doz grupları, uygulanan maddeler ve her bir gruptaki sıçan sayıları (n).

GRUPLAR	n	DOZLAR
<i>Taşıyıcı Kontrol Grubu (mısır yağı)</i>	6	0,1 ml
<i>BPA grubu (Pozitif kontrol grubu)</i>	6	50 mg /kg/gün
<i>Testosteron Propionat (Pozitif kontrol grubu)</i>	6	50 mg /kg/gün
<i>Uygulama grubu 1</i>	6	50 mg /kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin
<i>Uygulama grubu 2</i>	6	50 mg /kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin
<i>Uygulama grubu 3</i>	6	50 mg /kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin

3.2.2. Vücut ağırlığı, organ ve rölatif organ ağırlıkları

Uygulama süresi sona erdiğinde deney hayvanları ketamin/ksilazin ile anestezi altında iken servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülen sıçanlardan ovaryum, uterus, böbrek ve karaciğer, dokulara zarar vermeden çıkartılarak tartılmıştır. Bu tartımlar sonucunda sıçanların vücut ağırlığındaki artış ve organ ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

3.2.3. Besin ve su tüketimi

Çalışma süresince deney hayvanlarına standart sıçan pelet yem ve çeşme suyu *ad libitum* olarak verilmiştir. Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları, besin ve su tüketimleri günlük olarak takip edilmiştir.

3.2.4. Östrus döngüsünün takibi

Vajinal smear tekniği, uygulamanın kolay yapılabilmesi ve doğru biyolojik sonuçlar vermesinden dolayı östrus fazını belirlemede güvenilir bir metottur [74]. Sıçandaki östrojen hareketliliği, vajinal epitelindeki hücre proliferasyonu ve keratinizasyonunu etkilemektedir. Epitel morfolojisi ve hücre tipi karakterizasyonu östrus döngüsü fazı ve sıçandaki üreme hormonları seviyeleri ile ilişkilidir. Östrus fazında, epitelyum skuamözdur, tabakalı ve çekirdekli keratinize hücreler ile kaplıdır. Meteöstrusta, epitelyum skuamözdür ve keratin tabakası kaybolmuştur [23].

15 günlük süre boyunca her gün sabah 09.00-09.30 saatleri arasında sıçan kuyruğunun dibinden tutularak, vajen 50 µl serum fizyolojik ile 2-3 kez aynı pipette geri çekilerek yıkanmıştır. Pipet içeriği lamlara koyulmuş ve yayma preparat haline getirildikten sonra kendi halinde (havada) kurutulmaya bırakılmıştır. Örnekler tamamen kuruduktan sonra %70'lik etanol ile fikse edilmiş ve toluidin mavisi ile 5-7 dakika boyanmıştır. Boyamanın kalıcı olabilmesi adına entellan ile kapatılmıştır.

3.2.5. Hormon ve biyokimya analizleri

Hormon ve biyokimya analizlerinde diseksiyon esnasında sıçanların kalbinden enjektör ile alınan kan, jelli vakumlu tüplere alınmıştır. Serum eldesi için tüpler +4°C'de 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5810R cihazında) edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra jelin üzerinde kalan serum alınmış ve serumda ALT, AST, üre, trigliserit, kreatinin, albümin, glukoz, DHT, LH, FSH, ERR α , kortizol miktarları ELISA kitleri

kullanılarak saptanmıştır. Analizler BIOTEK uQuant (ABD) spektrofotometre cihazında yapılmıştır.

3.2.6. Histopatolojik incelemeler

Deney bitiminde sıçanlardan çıkartılan karaciğer, böbrek, ovaryum ve uterus dokuları %10'luk formol fiksatifinde 24 saat süre ile fikse edildikten sonra 24 saat akan suda yıkanmış ve ardından %70'lik alkole alınmıştır. Doku takibinden sonra parafine gömülerek bloklanan dokulardan Leica marka mikrotomda 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Lamlara alınan preparatlar Hematoksilen Eosin (H&E) ile boyanmış, Leica (RM2125RT) ışık mikroskobunda incelenmiş ve görüntülemesi ise Pixera Pro 150ES görüntüleme programı ile yapılmıştır.

3.2.7. İmmünohistokimyasal boyamalar

Diseksiyon esnasında alınan ovaryumlar %10'luk nötral formol solüsyonunda tespit edilmiştir. Tespit süresi dolan dokular bu kez 24 saat akarsu altında yıkanması için bırakılmıştır. Rutin preparasyon işlemlerinden geçirilen dokular parafin ile bloklanmıştır. Bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alınıp poly-lysine kaplı lamlara immünohistokimyasal boyama için koyulmuştur. Doku sınırları Pap-pen kullanılarak belirlenmiştir. İmmünohistokimya boyama esnasında dokuların kurummasını önlemek amacıyla tüm aşamalar 'humidity chamber' ile çalışılmıştır.

- Deparafinizasyon

- Dokular etüvde 1 saat süreyle parafinin erimesi için bekletilmiştir.

- Ksilen solüsyonunda 10 dakika bekletilmiştir.

- Rehidratasyon

- saf alkol 5 dakika

- %95 alkol 5 dakika

- %85 alkol 5 dakika

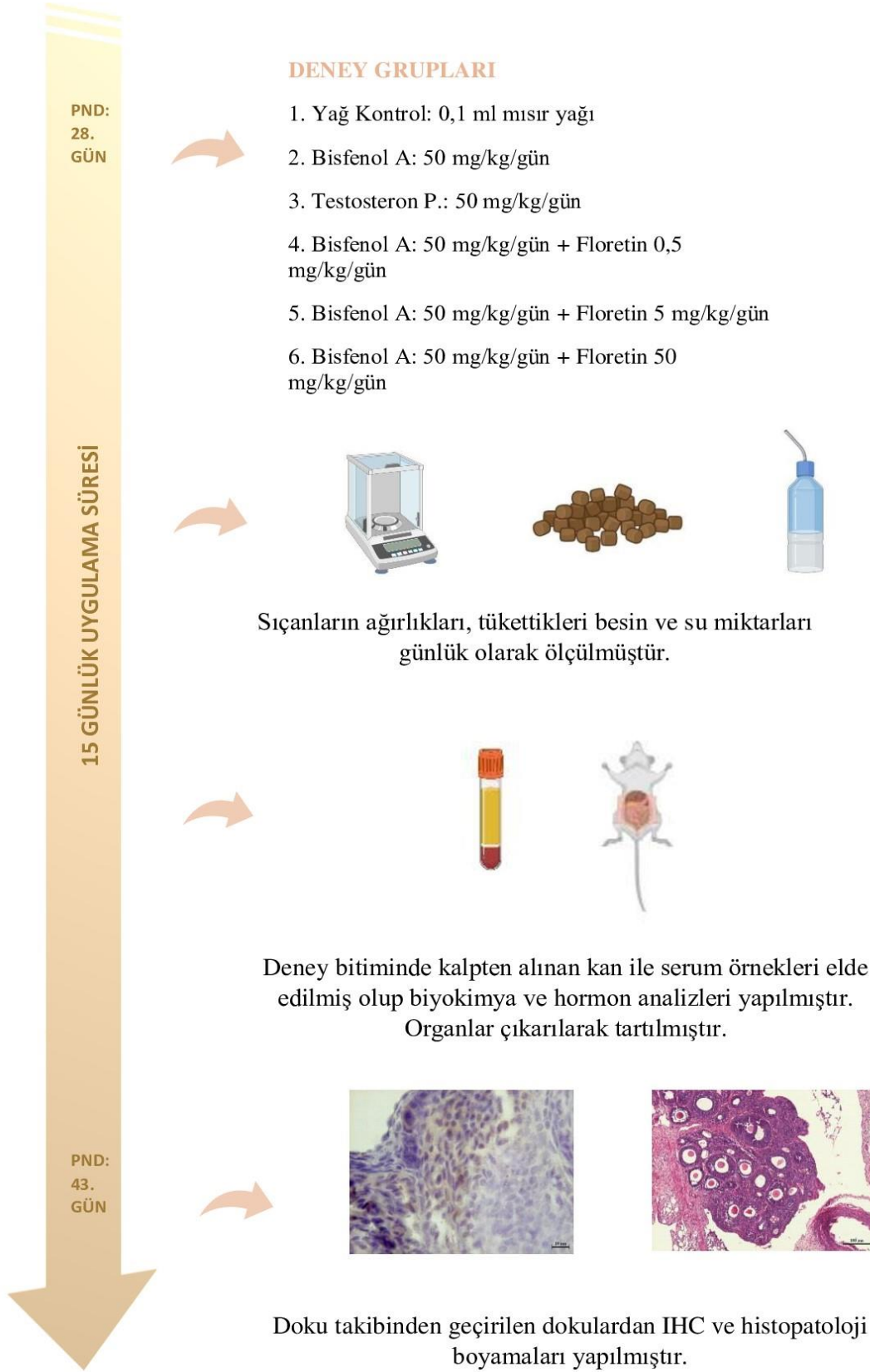
- %70 alkol 5 dakika

- %50 alkol 5 dakika

- ultra saf su 5 dakika
 - Antijen retrieval
- Sitrat buffer (pH=6) içinde 30 dakika kaynatılmıştır.
 - Endojen peroksidaz aktivitesi kitten çıkan solüsyon ile 30 dakika boyunca yapılmıştır.
 - Serum bloklama kit içerisinden çıkan solüsyon ile 30 dakika boyunca yapılmıştır.
 - Primer antikorlardan;
- CYP11A1, 1:200 oranında seyreltilerek 24 saat boyunca +4°C’de bekletilmiştir.
- CYP17A1, 1:200 oranında seyreltilerek 24 saat boyunca +4°C’de bekletilmiştir.
 - Sekonder antikor, 1:500 oranında seyreltilerek 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
 - Kromojen olarak kullanılan DAB 30 dakika bekletilmiştir.
 - Çekirdek boyaması hematoksilin ile 15 saniye kadar yapılmış olup sonrasında lamalar entellan ile kapatılmıştır.

3.3. İstatistiksel değerlendirmeler

Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics 23 istatistiksel programında yapılmıştır. Uygulama gruplarının negatif kontrol grubuna göre değerlendirilmesi ANOVA ile yapılmıştır. Histopatolojik verilerin değerlendirilebilmesi için de Fisher Exact Testi uygulanmıştır. Tüm verilerin istatistiksel önem kontrolü $P \leq 0,05$ düzeyinde yapılmıştır.



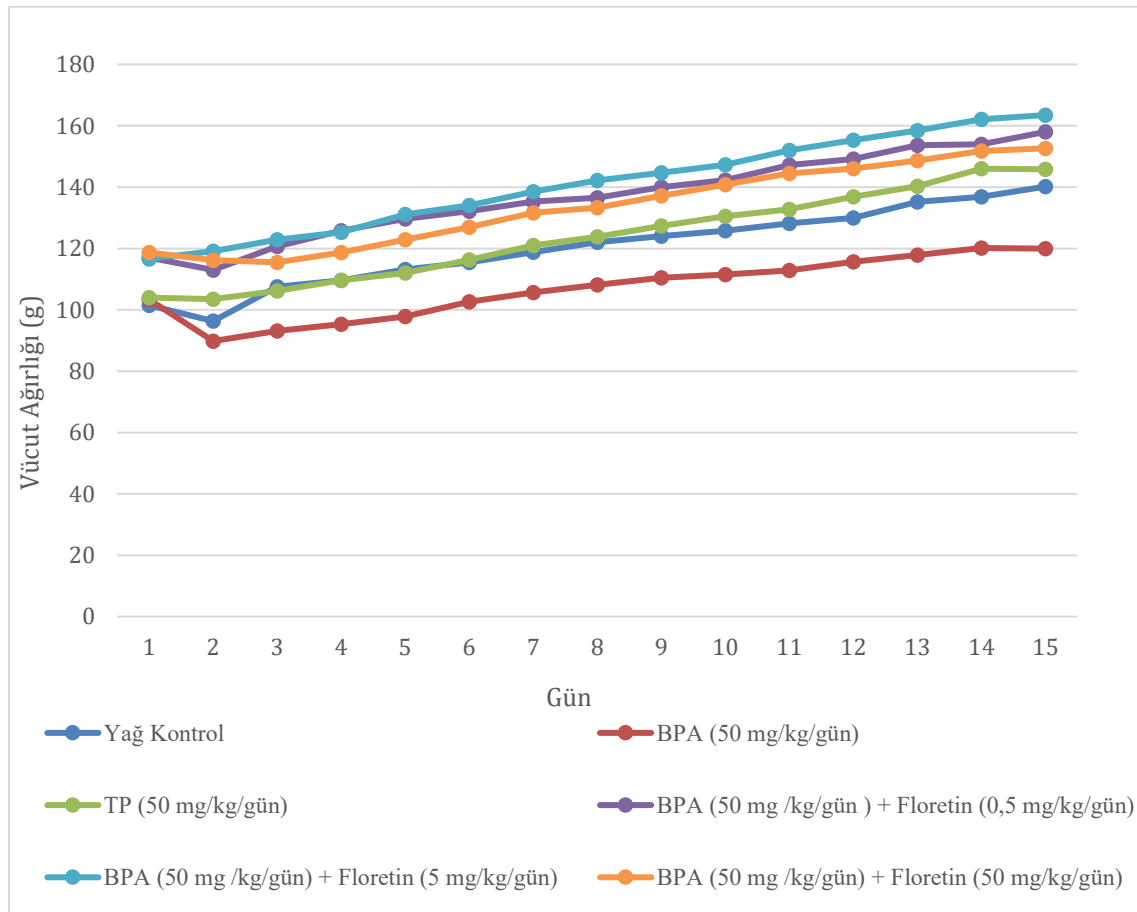
Şekil 3.1. Çalışmamızın şematik gösterimi

4. SONUÇLAR

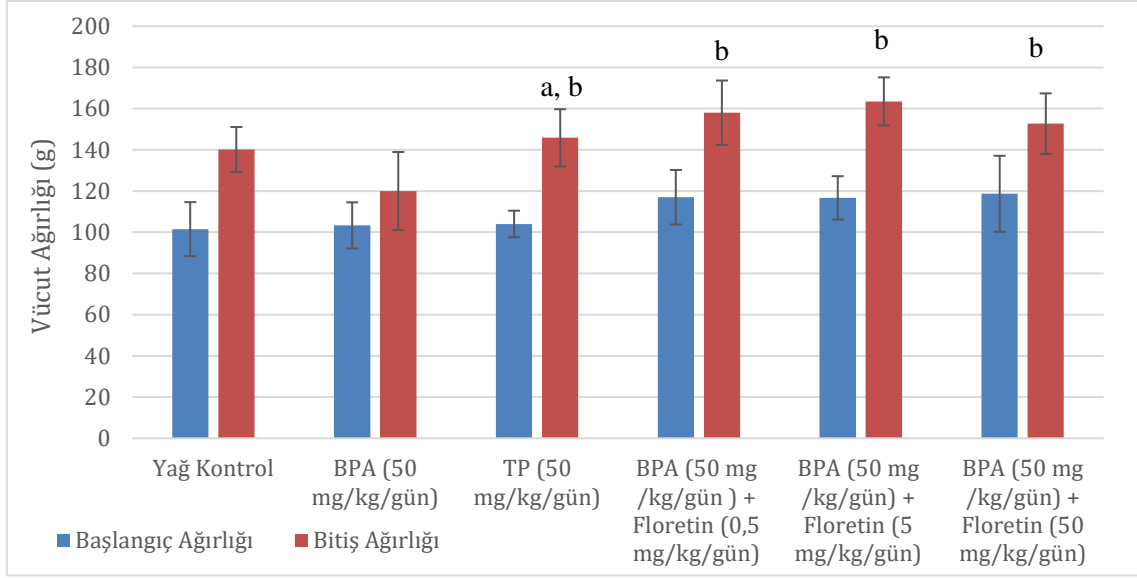
Elde edilen sonuçlar; vücut ağırlığı, organ ve rölatif organ ağırlığı, besin ve su tüketimi, biyokimya analizleri, hormon analizleri, östrus döngüsü, histopatolojik bulgular ve immünohistokimyasal bulgular şeklinde verilmiştir.

4.1. Vücut Ağırlığı, Organ ve Rölatif Organ Ağırlıkları

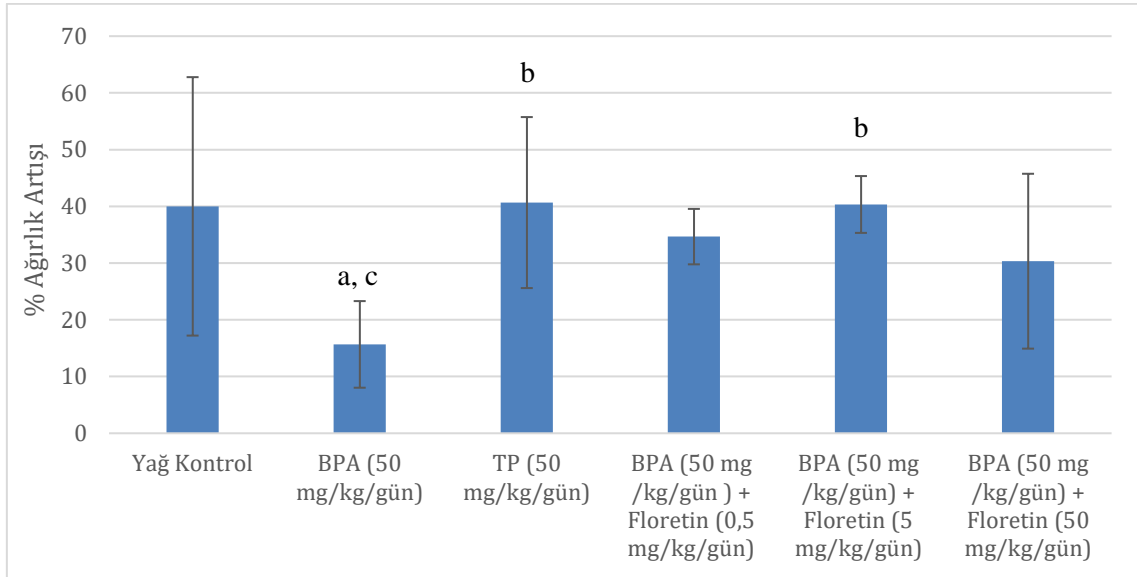
Kontrol ve uygulama gruplarına ait vücut ağırlıkları değerleri Şekil 4.1’de, başlangıç ve bitiş ağırlıkları Şekil 4.2’de, % ağırlık artışı Şekil 4.3’de verilmiştir. Dokulara ait organ ağırlıkları Çizelge 4.1’de ve rölatif organ ağırlıkları ise Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Başlangıç vücut ağırlıkları arasında bir fark gözlenmezken bitiş ağırlıkları arasında BPA 50 mg/kg/gün ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Organ-rölatif organ ağırlığı açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardır.



Şekil 4.1. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait vücut ağırlık (g) değişim değerleri. Değerler ortalama olarak verilmiştir.



Şekil 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarına ait başlangıç ve bitiş vücut ağırlığı (g) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^fBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).



Şekil 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarına ait % vücut ağırlığı değişimi değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).

Çizelge 4.1.Kontrol ve uygulama gruplarına ait gerçek organ ağırlıklarının (g) değerleri.

	Kontrol Grupları			Uygulama Grupları		
	Yağ	BPA (50 mg /kg/gün)	TP (50mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin (0,5mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin (5 mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin(50mg/kg/gün)
Sol ovaryum	0,07±0,01	0,06±0,01	0,08±0,01	0,10±0,02 ^{a,b,f}	0,07±0,01	0,06±0,01
Sağ ovaryum	0,08±0,01	0,05±0,01	0,07±0,01	0,08±0,02	0,07±0,05	0,06±0,13
Sağ böbrek	0,75±0,10	0,59±0,04 ^a	0,75±0,07 ^b	0,73±0,08 ^b	0,72±0,05	0,64±0,08
Sol böbrek	0,72±0,05	0,6±0,03 ^c	0,77±0,09 ^b	0,73±0,09 ^b	0,69±0,04	0,61±0,07 ^c
Uterus	0,61±0,22	0,35±0,12 ^a	0,63±0,09 ^b	0,4±0,05 ^c	0,46±0,05	0,47±0,15
Karaciğer	6,91±0,87	6,09±0,73	6,68±0,59	7,79±0,90 ^b	8,05±0,73 ^{b,c}	7,9±0,54 ^b

Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg /kg/gün + Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg /kg/gün + Floretin 5 mg/kg/gün grubundan , ^fBPA 50 mg /kg/gün + Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi p≤0,05).

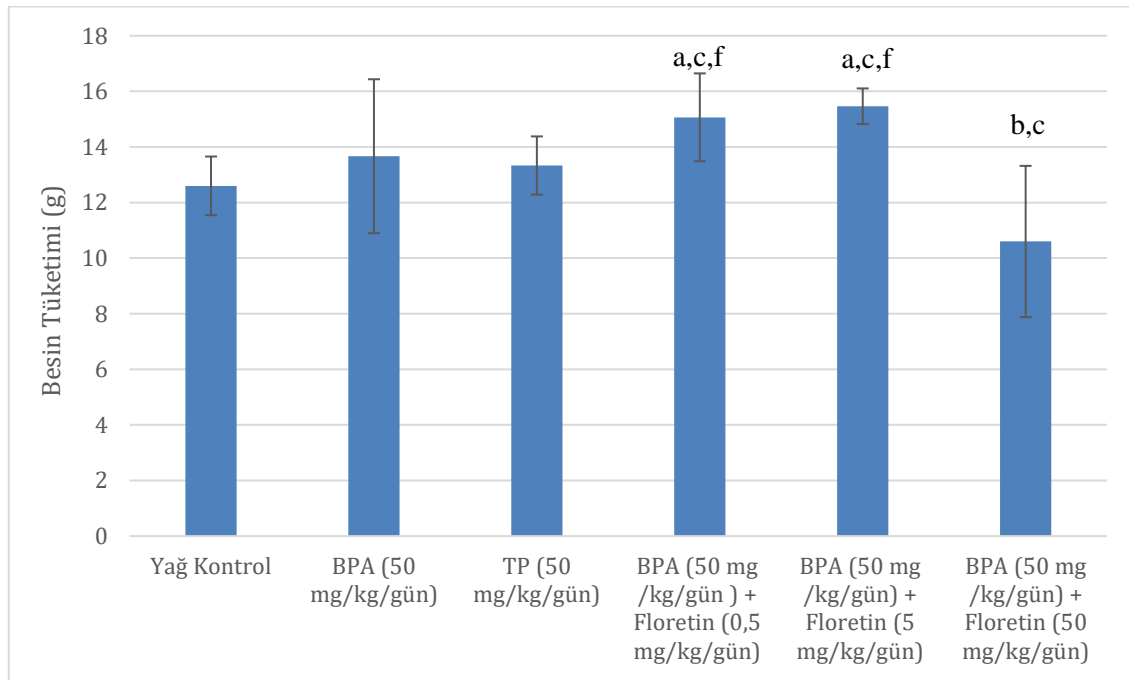
Çizelge 4.2. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rölatif organ ağırlıklarının (g/kg) değerleri.

	Kontrol Grupları			Uygulama Grupları		
	Yağ	BPA (50 mg/kg/gün)	TP (50 mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin (0,5mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin (5 mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin(50mg/kg/gün)
Sol ovaryum	0,51±0,12	0,53±0,09	0,56±0,08	0,62±0,16	0,48±0,12	0,40±0,12
Sağ ovaryum	0,57±0,08	0,47±0,10	0,49±0,06	0,51±0,18	0,47±0,05	0,41±0,08
Sağ böbrek	5,37±0,42	5,03±0,69	5,19±0,36	4,53±0,80	4,62±0,57	4,22±0,50 ^a
Sol böbrek	5,17±0,21	5,07±0,60	5,3±0,47	4,53±0,85	4,41±0,39	4,04±0,49 ^{a,b,c}
Uterus	4,33±1,39	2,96±1,05	4,42±1,12	2,46±0,41	2,99±0,43	3,14±1,10
Karaciğer	49,22±3,39	51,14±4,44	46,16±5,34	47,56±2,89 ^{b,c}	51,32±1,45	52,11±5,64

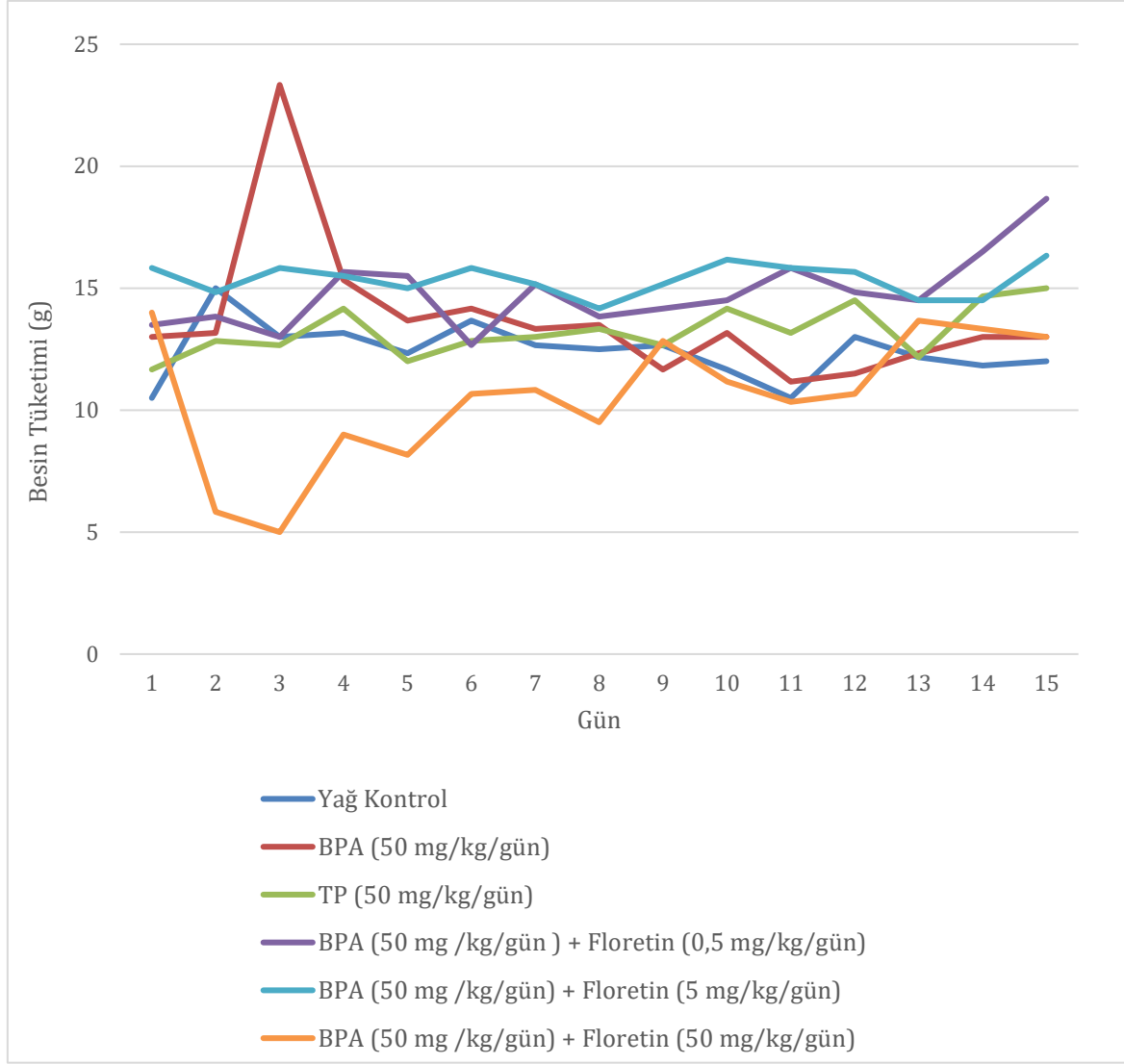
Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg /kg/gün + Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı, (Önemlilik düzeyi p≤0,05).

4.2. Besin ve Su Tüketimi

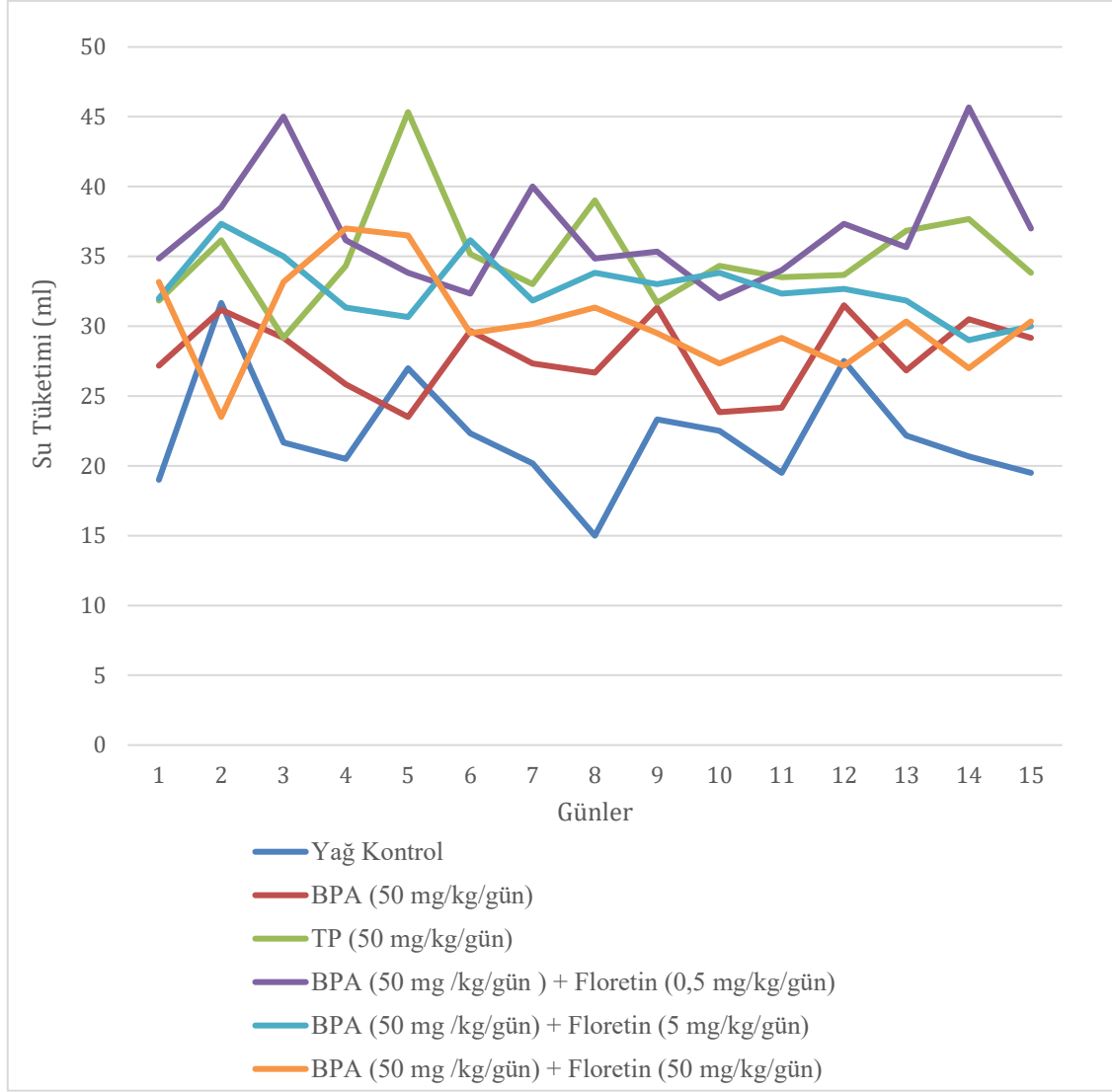
Kontrol ve uygulama gruplarına ait ortalama besin tüketimi Şekil 4.4’de, günlük besin tüketimi Şekil 4.5’de, günlük su tüketimi Şekil 4.6’da, ortalama su tüketimi Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Ortalama su ve besin tüketimleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar meydana gelmiştir.



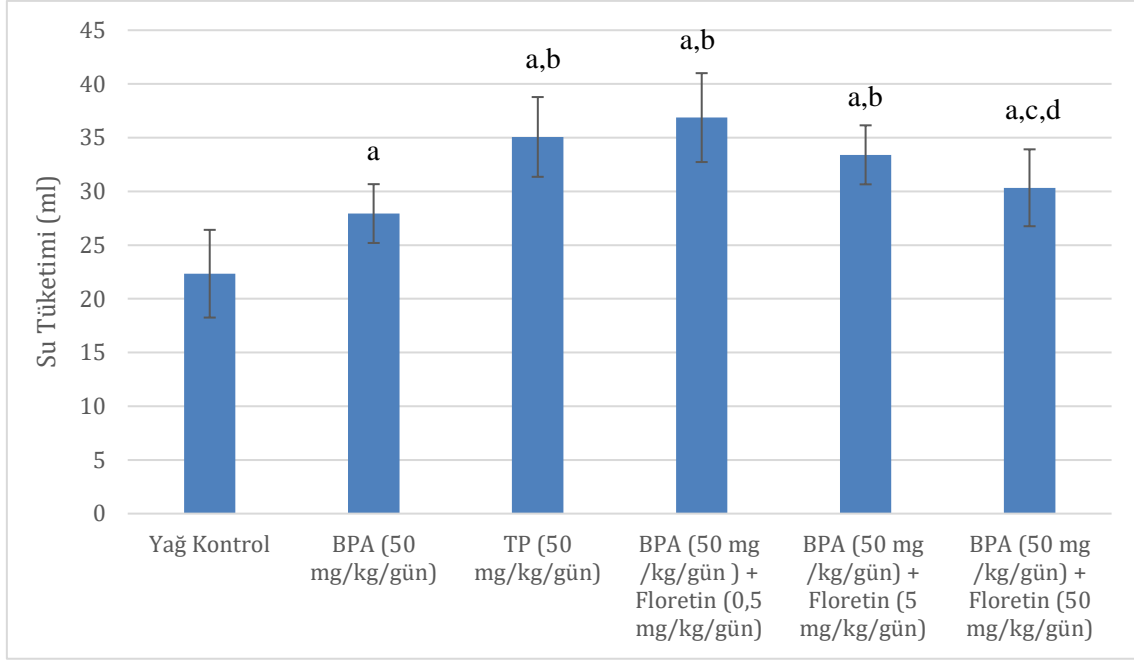
Şekil 4.4. Kontrol ve uygulama gruplarına ait ortalama besin tüketimi (g) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^fBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).



Şekil 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarına ait günlük besin tüketim (g) değerleri. Değerler ortalama olarak verilmiştir.



Şekil 4.6. Kontrol ve uygulama gruplarına ait günlük su tüketim (ml) değerleri. Değerler ortalama olarak verilmiştir.



Şekil 4.7. Kontrol ve uygulama gruplarına ait ortalama su tüketimi (ml) değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^fBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).

4.3. Biyokimya analiz sonuçları

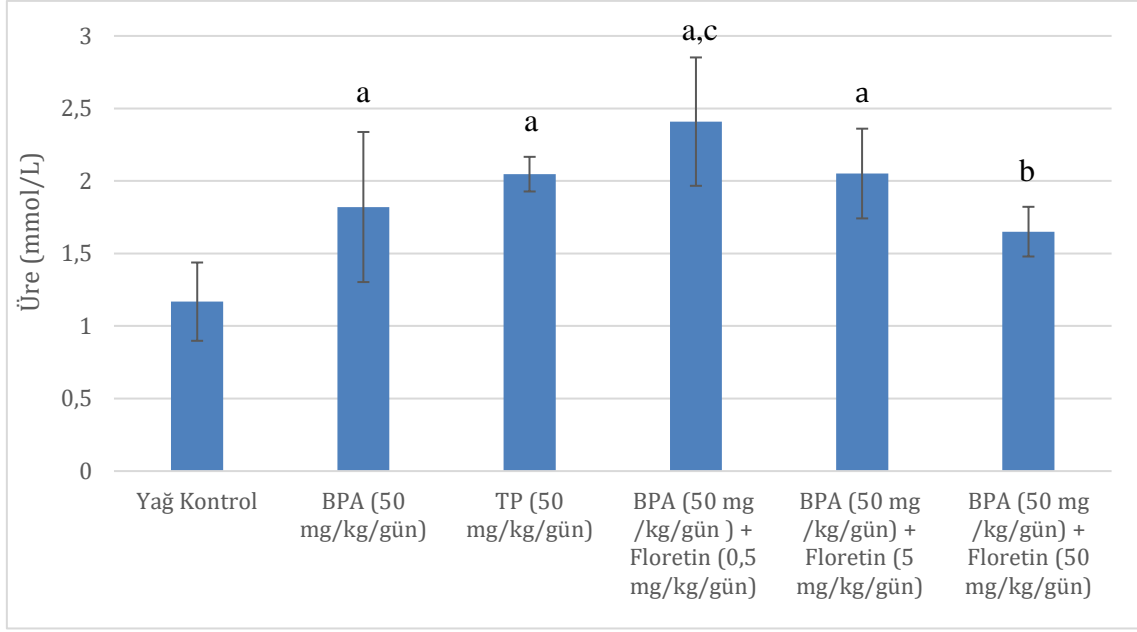
Kontrol ve uygulama gruplarına ait biyokimya sonuçları Çizelge 4.3’de ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Serum üre değerleri Şekil 4.8’de, serum trigliserid değerleri Şekil 4.9’da, serum kreatinin değerleri Şekil 4.10’da, serum albümin değerleri Şekil 4.11’de, serum ALT Şekil 4.12’de ve AST değerleri Şekil 4.13’de, serum glukoz değerleri ise 4.14’de gösterilmiştir.

Serum trigliserit değerlerine bakıldığında; BPA pozitif kontrol grubu ve testosteron propiyonat pozitif kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu, BPA pozitif kontrol grubunda yağ uygulama grubuna oranla bir artışın olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. Uygulama gruplarından 50 mg /kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin grubu ise testosteron propiyonat pozitif kontrol grubundan ve

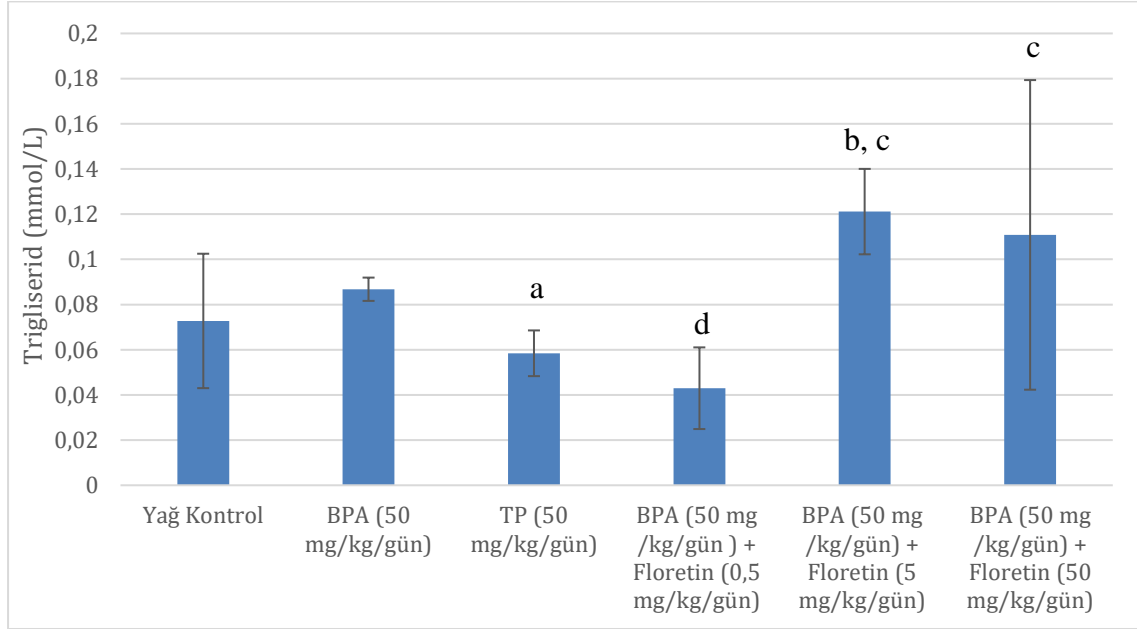
50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir artış ortaya koymuştur.

Serum albümin seviyeleri incelendiğinde; testosteron propiyonat pozitif kontrol grubu ve 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin grubu ve 50 mg /kg/gün BPA+ 50 mg/kg/gün floretin uygulama gruplarından anlamlı bir artış göstermiştir. 50 mg /kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin grubu ise yağ kontrol grubundan ve 50 mg /kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin grubundan anlamlı bir artış meydana getirmiştir. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin grubunda ise diğer gruplara göre değerlerde bir azalmanın olduğu görülmektedir.

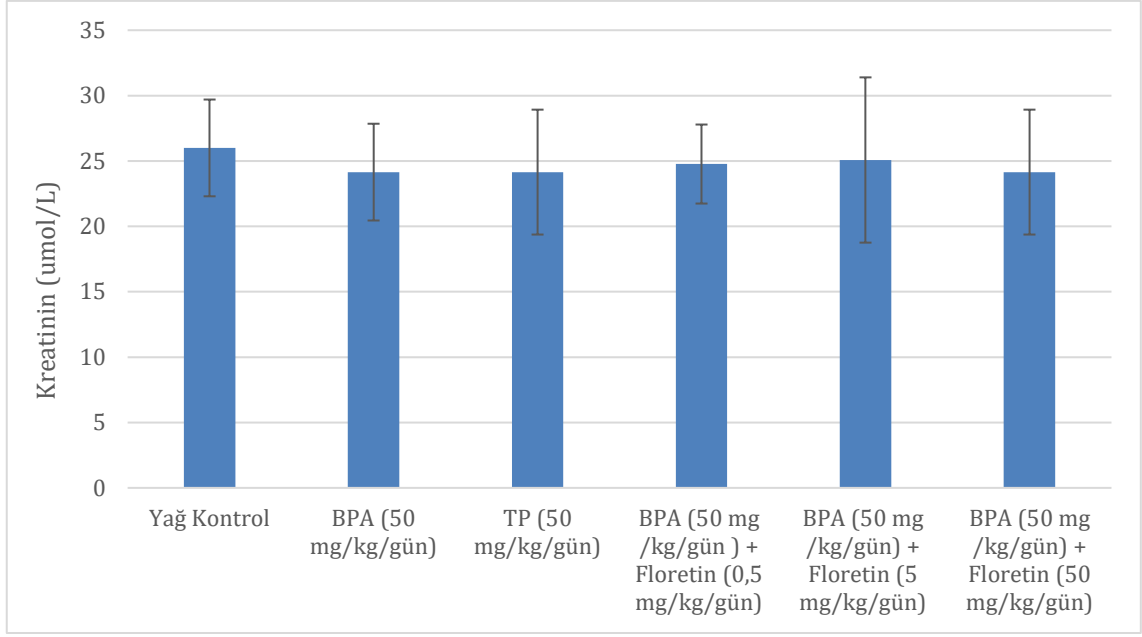
Serum ALT değerlerinde tüm uygulama gruplarında taşıyıcı kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gösterdiği, serum AST değerlerinde ise taşıyıcı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Kreatin seviyeleri incelendiğinde; gruplar arası anlamlı bir farkın meydana gelmediği görülmektedir. Üre değerleri incelendiğinde ise, testosteron propiyonat pozitif kontrol grubu, BPA pozitif kontrol grubu, 50 mg /kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin, 50 mg /kg/gün BPA+5mg/kg/gün floretin gruplarındaki artış taşıyıcı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin grubundaki artış, 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubuna göre anlamlı bulunmuştur.



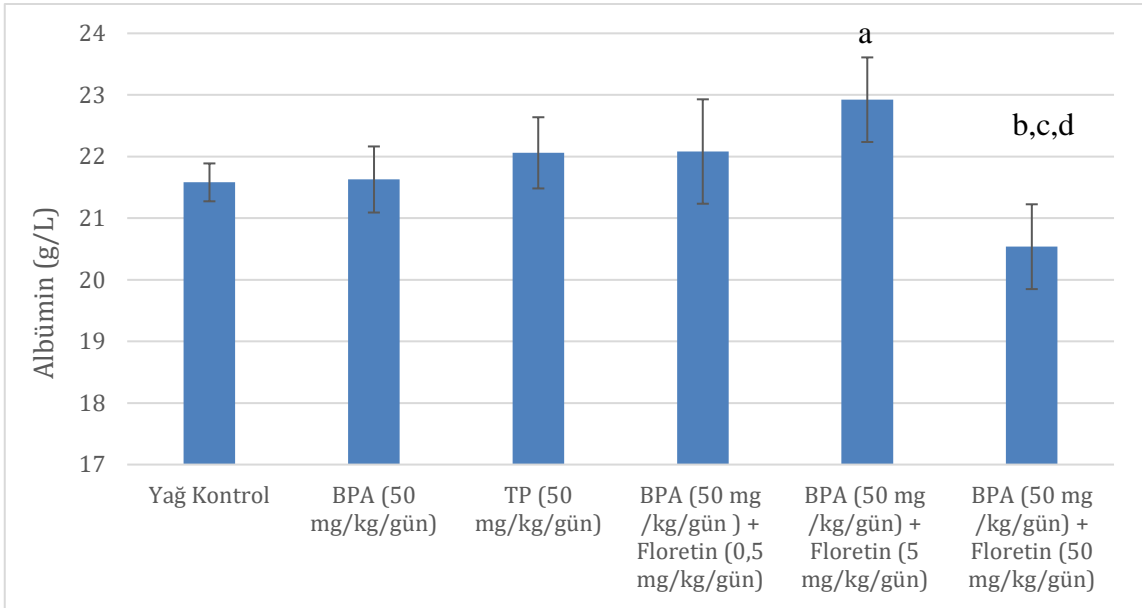
Şekil 4.8. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait üre değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^cBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $\leq 0,05$).



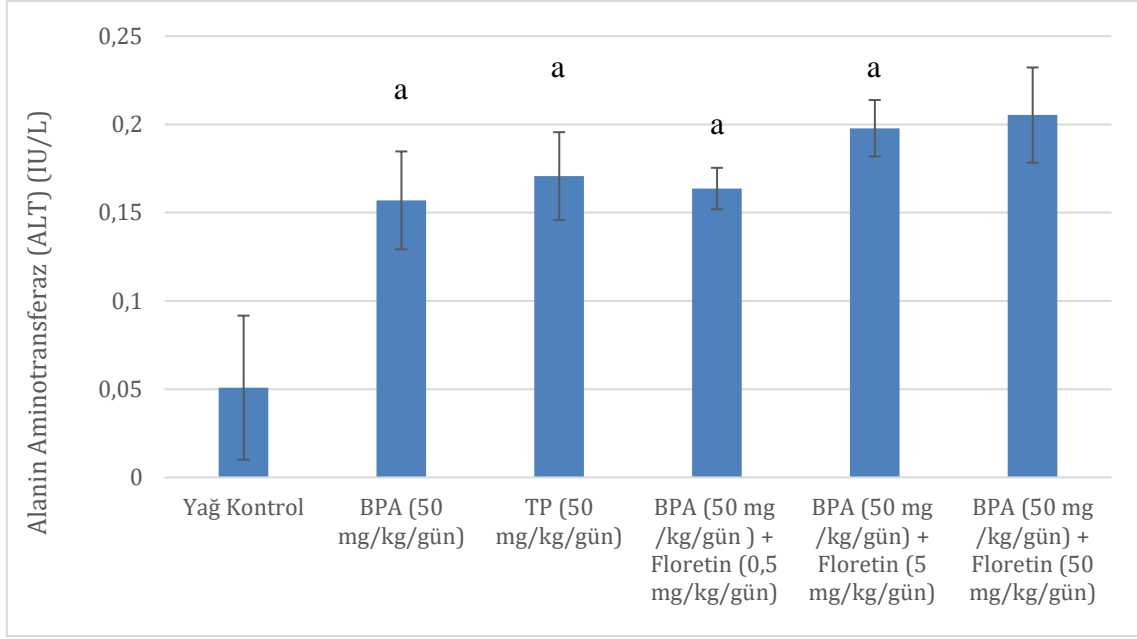
Şekil 4.9. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait trigliserid değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^bTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 5 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $\leq 0,05$).



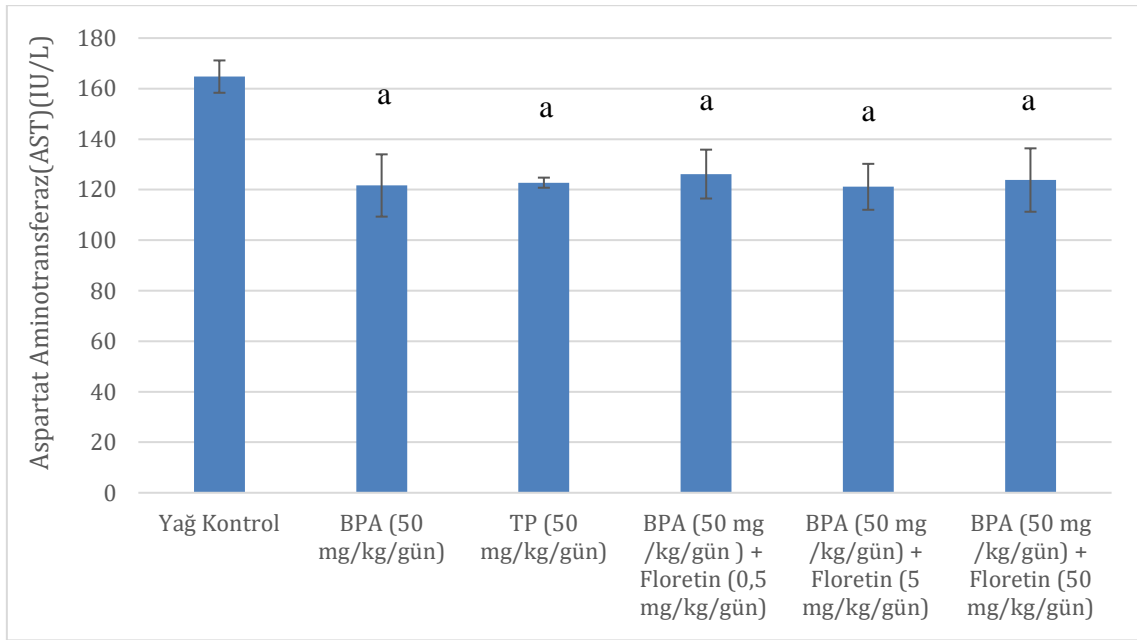
Şekil 4.10. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait kreatinin değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.



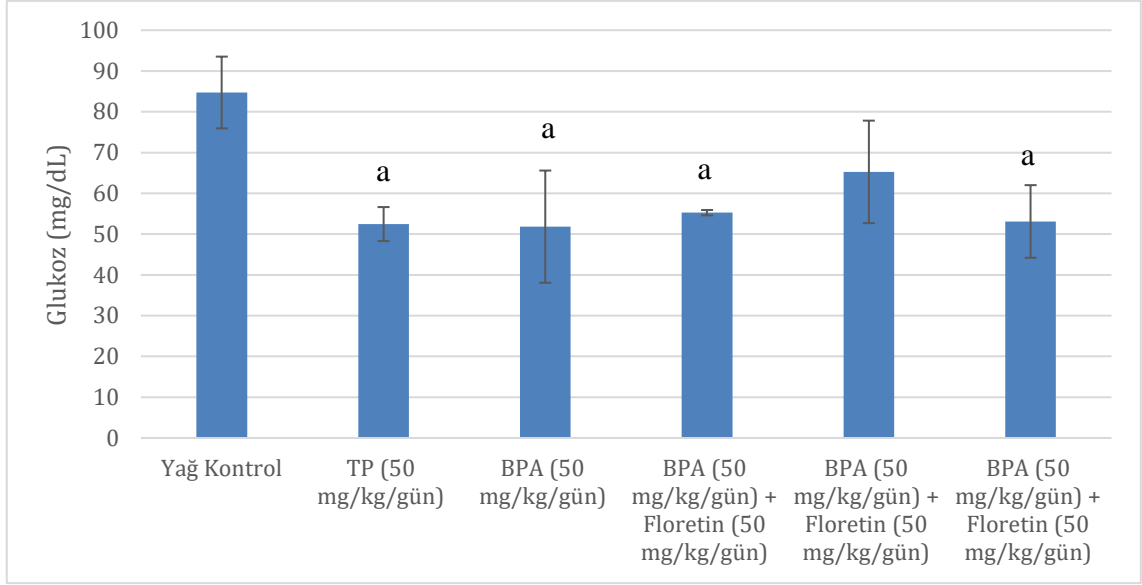
Şekil 4.11. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait albümin değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 50 mg/kg/gün grubundan, istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).



Şekil 4.12. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait ALT değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).



Şekil 4.13. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait AST değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).



Şekil 4.14. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait glukoz değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).

Çizelge 4.3. Kontrol ve uygulama gruplarına ait serum biyokimya değerleri.

	Kontrol grupları			Uygulama grupları		
	Yağ	BPA (50mg/kg/gün)	TP (50mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin(0,5mg/kg/gün)	BPA(50mg/kg/gün) + Floretin(5mg/kg/gün)	BPA(50mg/kg/gün) + Floretin(50mg/kg/gün)
ALT (IU/L)	0,05±0,04	0,15±0,02 ^a	0,17±0,02 ^a	0,16±0,01 ^a	0,19±0,01 ^a	0,20±0,02 ^a
AST (IU/L)	164,74±6,39	121,64±12,33 ^a	122,75±2,00 ^a	126,15±9,67 ^a	121,12±9,09 ^a	123,79±12,55 ^a
ALBUMIN (g/L)	21,58±0,30	21,62±0,53	22,06±0,57	22,08±0,84	22,92±0,68 ^a	20,53±0,68 ^{c,d,e}
GLUKOZ (mg/dL)	84,73±8,8	52,46±4,17 ^a	41,83±13,76 ^a	55,26±0,66 ^a	65,26±12,57	53,1±8,91 ^a
KREATİNİN (µmol/L)	26,00±3,7	24,15±3,70	24,15±4,77	24,76±3,02	25,07±6,31	24,15±4,77
TRİGLİSERİD(mmol/L)	0,07±0,02	0,08±0,00	0,05±0,01 ^b	0,04±0,01	0,12±0,01 ^{c,d}	0,11±0,06
ÜRE (mmol/L)	1,16±0,26	1,82±0,51 ^a	2,04±0,11 ^a	2,40±0,44 ^a	2,05±0,30 ^a	1,6±0,17 ^d

Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg /kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg /kg/gün+ Floretin 5 mg/kg/gün grubundan , ^fBPA 50 mg/kg/gün + Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi p≤0,05).

4.4. Hormon analiz sonuçları

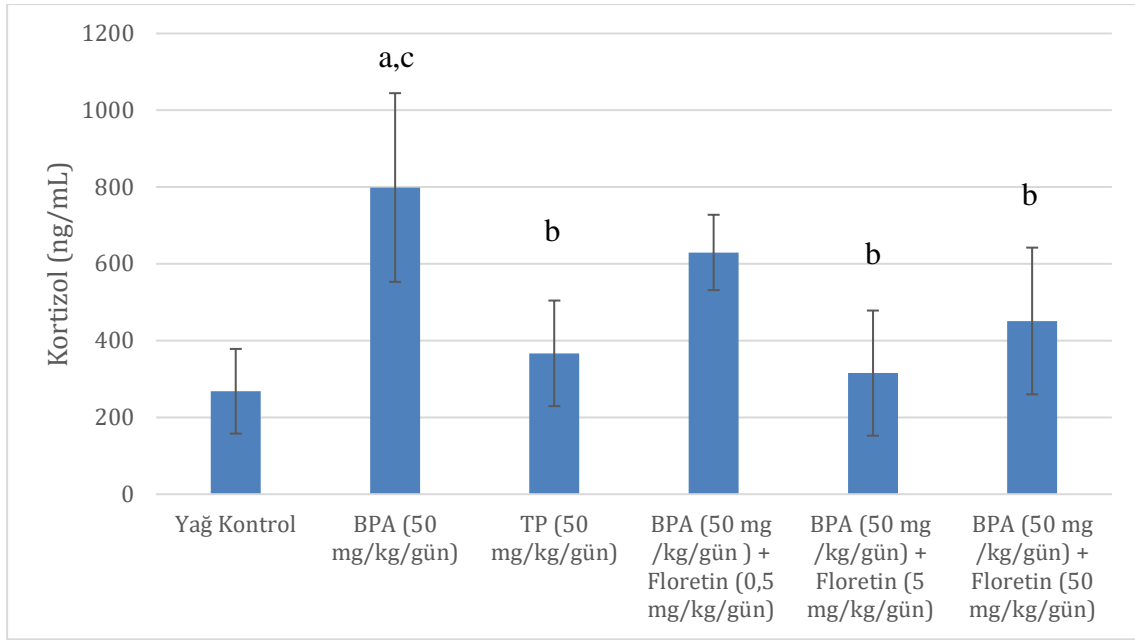
Serum örneklerinden FSH, LH, ERR α , DHT ve kortizol seviyeleri analiz edilmiştir. Değerler standart sapma \pm ortalama şeklinde verilmiştir. Serum hormon seviyeleri Şekil 4.15 – Şekil 4.19’da gösterilmiştir.

FSH seviyesi, tüm gruplarda yağ kontrol grubundan farklı olarak anlamlı bir azalış göstermiştir. LH değerleri ise, tüm gruplarda yağ kontrol grubuna göre bir azalma göstermiş fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

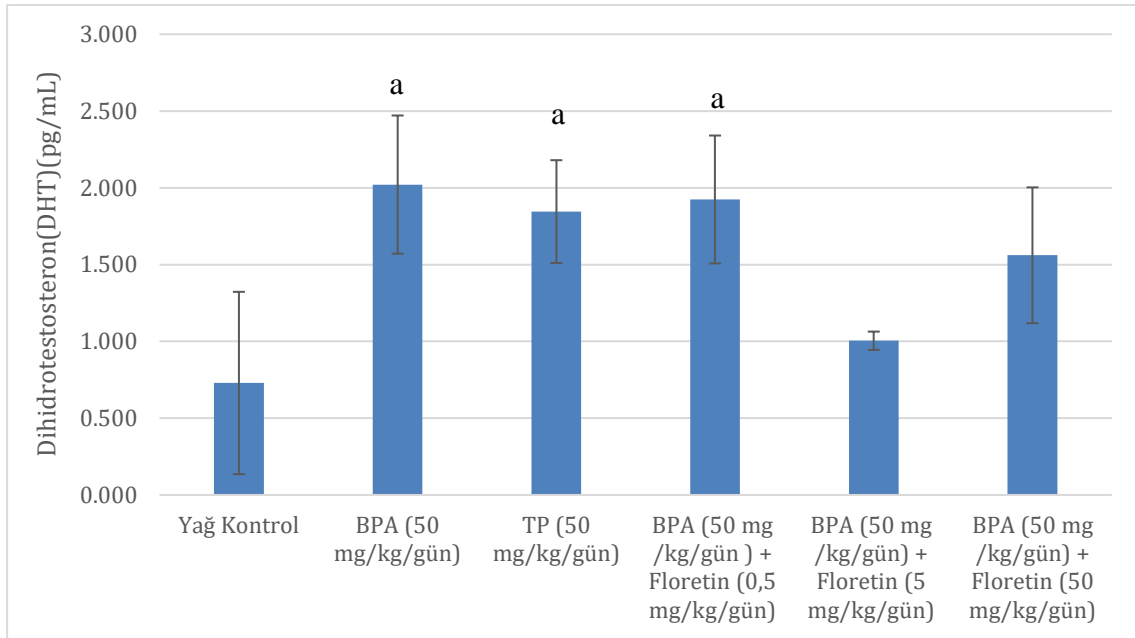
ERR α seviyesinde, 50 mg/kg/gün BPA+ 50 mg/kg/gün floretin grubunda pozitif kontrol grupları ve uygulama gruplarından farklı olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir. 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin grubunda ise pozitif kontrol gruplarından farklı olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir.

DHT seviyesi incelendiğinde, BPA pozitif kontrol grubunda, testosteron propiyonat grubunda ve 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin grubunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin grubunda ve 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda ise diğer uygulama gruplarına oranla anlamlı olmayan bir azalma saptanmıştır.

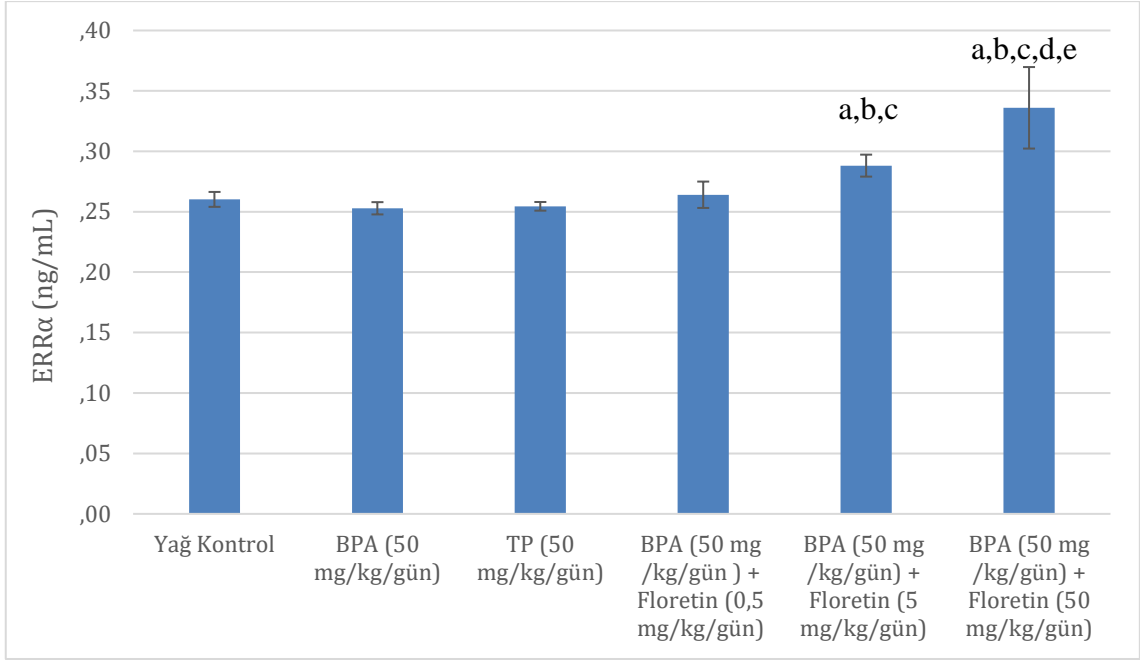
Kortizol değerleri, BPA pozitif kontrol grubunda artış göstermiştir. 50 mg/kg/gün BPA ile 50 mg/kg/gün TP, 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin, 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişimler olmuştur.



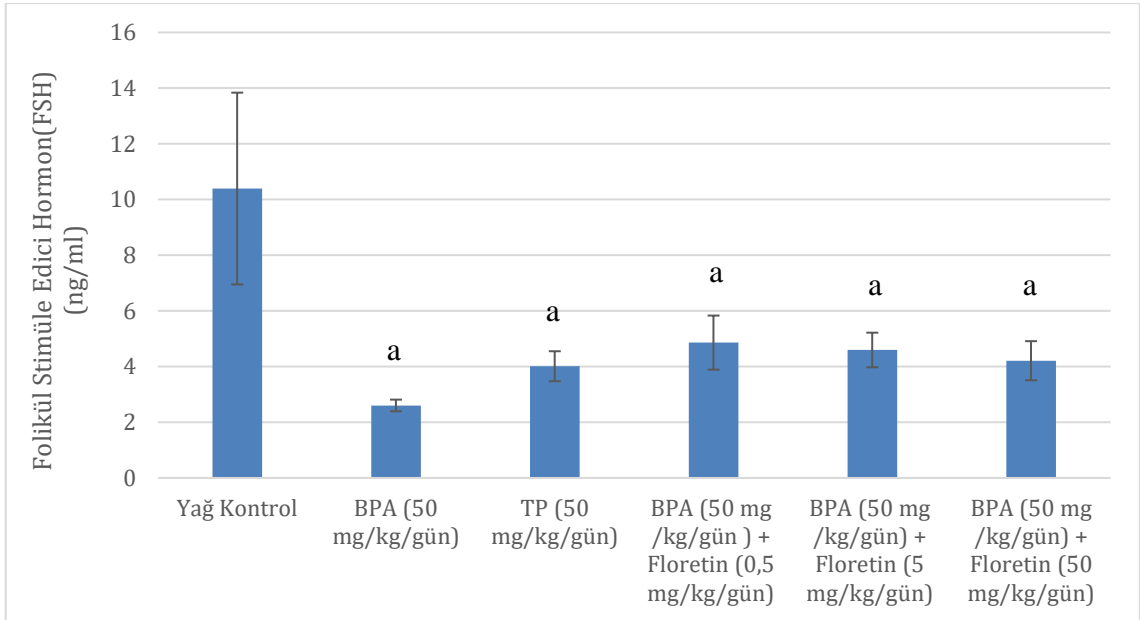
Şekil 4.15. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait kortizol değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı. (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).



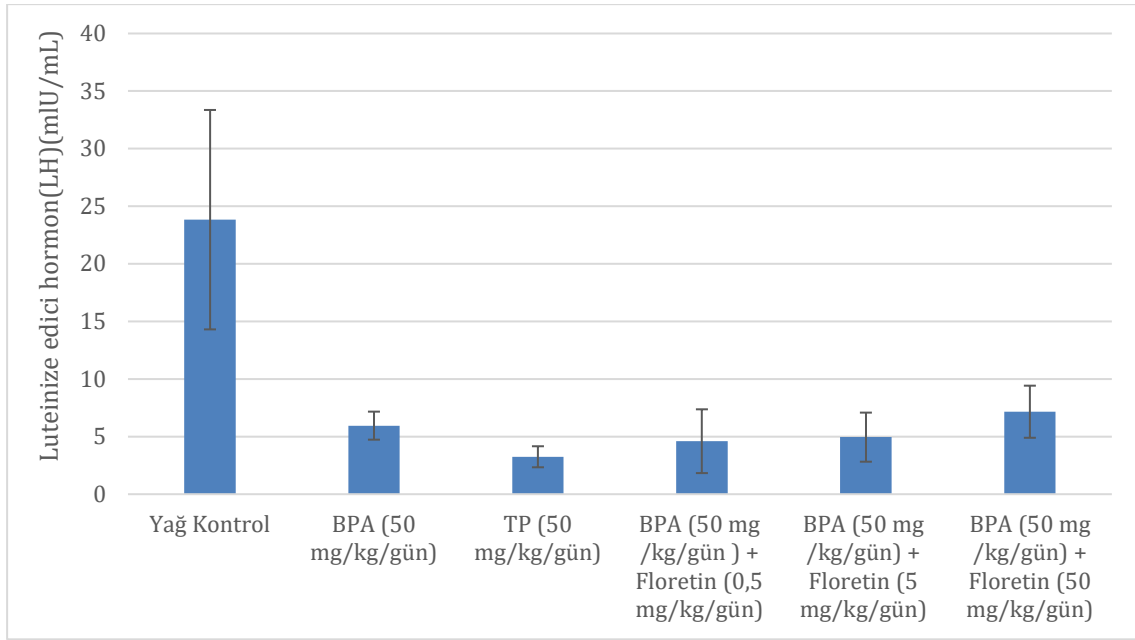
Şekil 4.16. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait dihidrotestosteron değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).



Şekil 4.17. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait östrojen değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün+ Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^fBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).



Şekil 4.18. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait FSH değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).



Şekil 4.19. Yağ kontrol ve uygulama gruplarına ait LH değerleri. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir

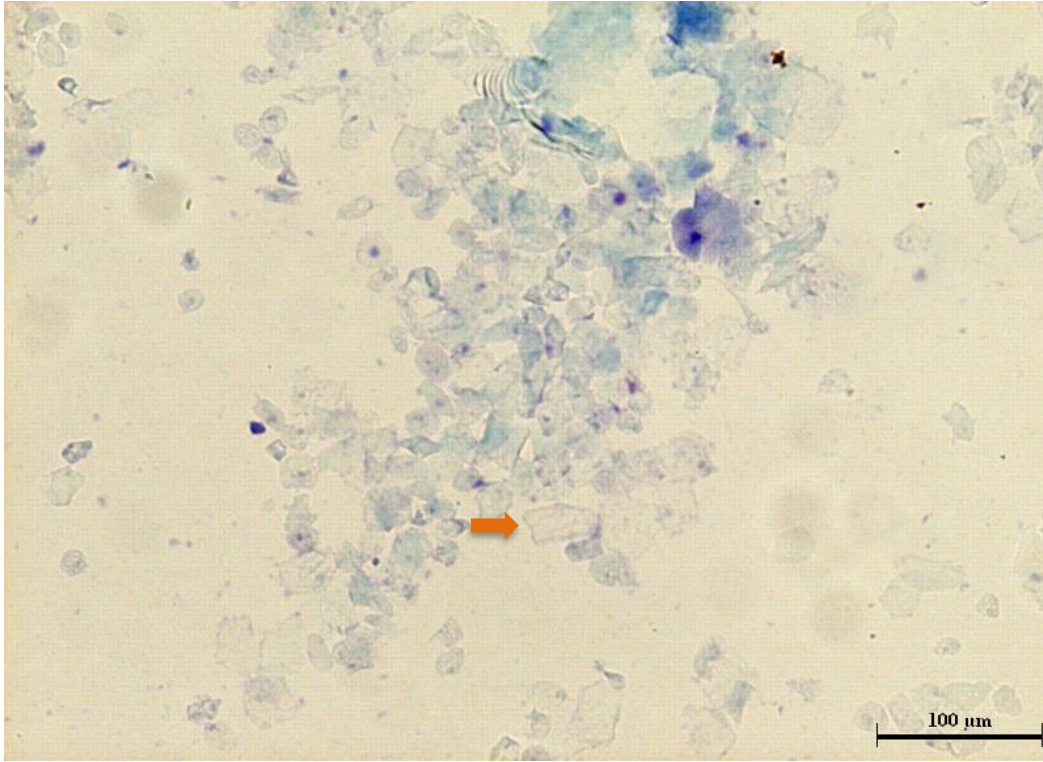
Çizelge 4.4. Kontrol ve uygulama gruplarına ait serum hormon değerleri.

	Kontrol grupları			Uygulama grupları		
	Yağ	BPA (50 mg /kg/gün)	TP (50 mg /kg/gün)	BPA (50 mg /kg/gün) + Floretin (0,5mg/kg/gün)	BPA (50 mg /kg/gün) + Floretin (5mg/kg/gün)	BPA (50 mg /kg/gün) + Floretin (50mg/kg/gün)
DHT (pg/mL)	729,06±593,53	2021±449,87 ^a	1845,33±334,65 ^a	1924±416,38 ^a	1004,13±59,64	1560,66±442,32
FSH (IU/L)	13,17±0,48	2,60±0,21 ^a	4,01±0,53 ^a	5,40±1,03 ^a	5,22±1,49 ^a	4,82±0,98 ^a
LH (mIU/mL)	23,83±9,52	5,95±1,21	3,24±0,91	4,60±2,76	4,95±2,13	7,16±2,26
KORTİZOL (ng/mL)	268,10±110,30	958,90±126,39 ^a	210,17±67,51 ^b	629,66±98,11	276,20±116,09 ^b	405,60±194,31 ^b
ÖSTROJEN (ng/mL)	0,26±0,00	0,25±0,00	0,25±0,00	0,26±0,01	0,28±0,00 ^{a,b,c}	0,33±0,03 ^{a,b,c,d,e}

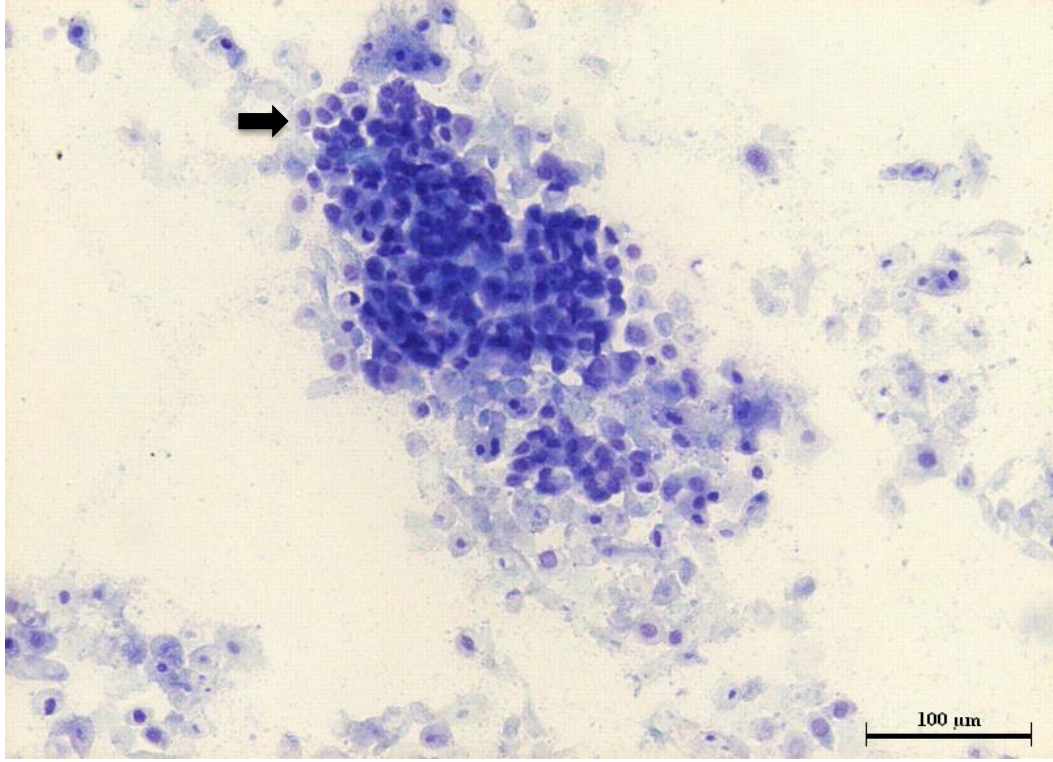
Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün+Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün + Floretin 5 mg/kg/gün grubundan, ^fBPA 50 mg/kg/gün + Floretin 50 mg/kg/gün grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi p≤0,05).

4.5. Östrus döngüsü sonuçları

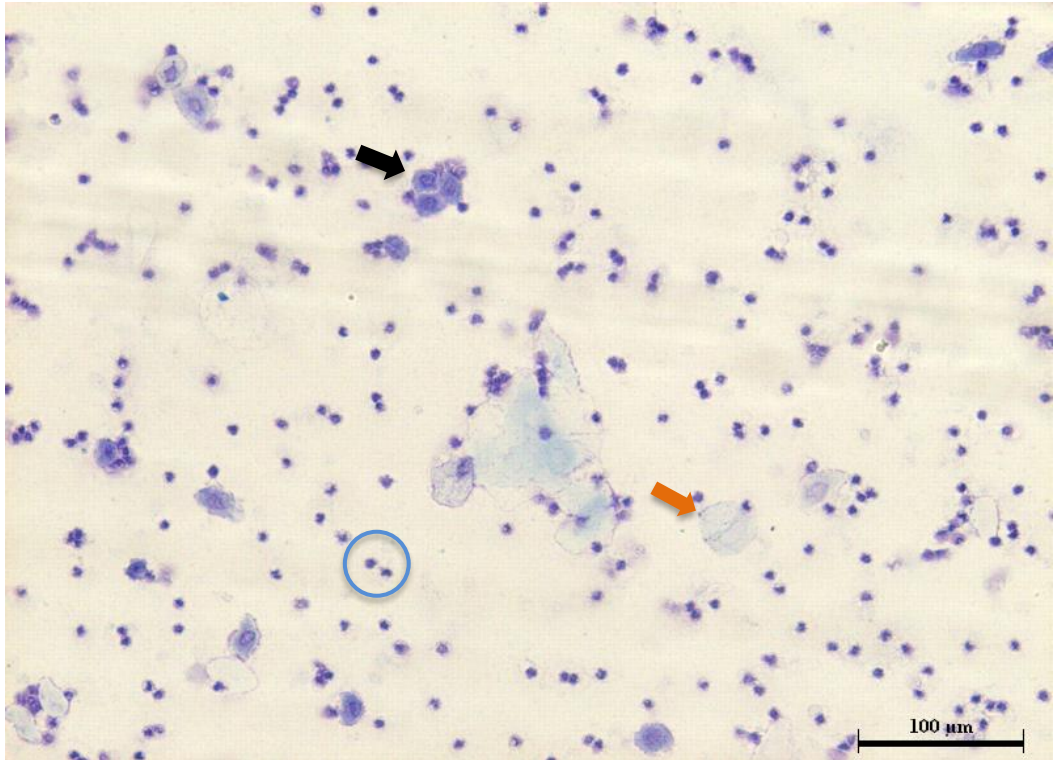
Kontrol grubuna ait smear görüntüleri Şekil 4.20–23’de verilmiştir. BPA (pozitif kontrol) grubuna ait smear görüntüsü Şekil 4.24 – 27’de, testosteron propiyonat (pozitif kontrol) grubuna ait smear görüntüsü Şekil 4.28–31’de verilmiştir. Uygulama gruplarına ait smear görüntüleri ise sırasıyla Şekil 4.32-43’de aşağıda verilmiştir. Smear döngülerine ait grafik Şekil 4.44’de gösterilmiştir. Şekiller üzerinde östrus, proöstrus, metaöstrus ve diöstrus döngülerine ait 3 hücre tipi gösterilmiştir. Hücre yoğunluğunun %90’ını kornifiye hücrelerin oluşturduğu faza östrus; yoğunluğu çekirdekli epitel hücrelerinin belirlediği faza proöstrus; kornifiye, çekirdekli epitel hücresi ve lökositlerin aynı anda görüldüğü faza metaöstrus; en fazla lökositlerin görüldüğü evre ise diöstrus olarak kabul edilmiştir.



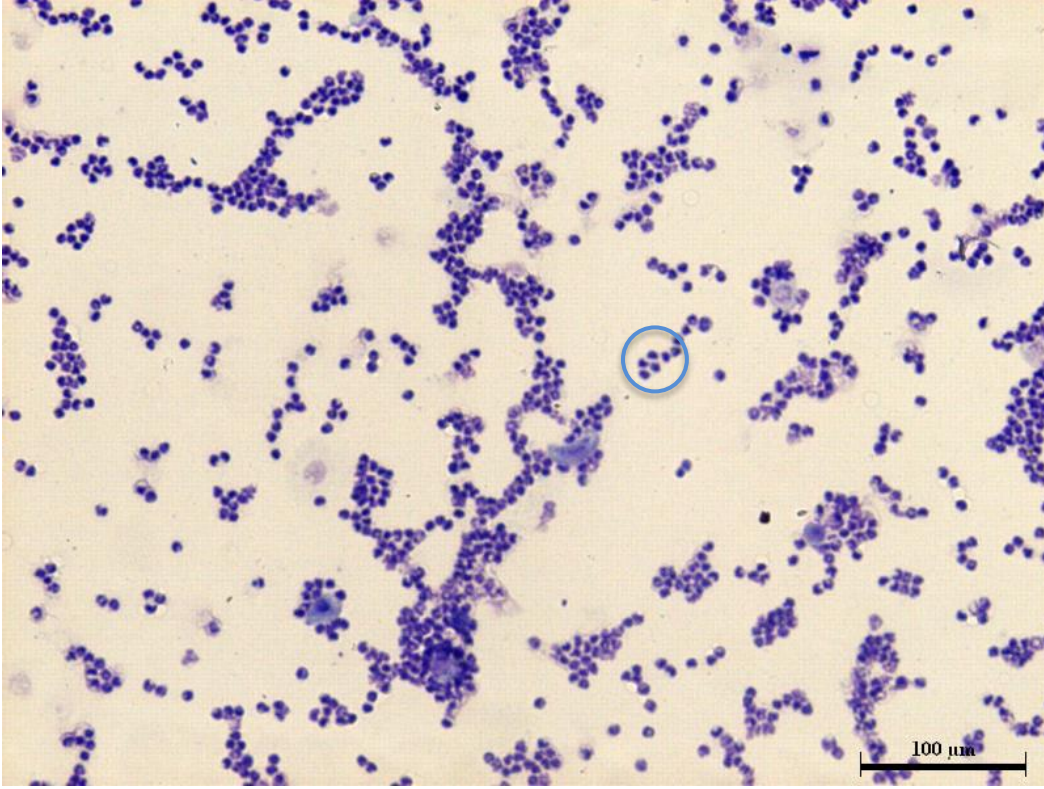
Şekil 4.20. Yağ kontrol grubuna ait östrus normal görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (→ : kornifiye epitel hücresi).




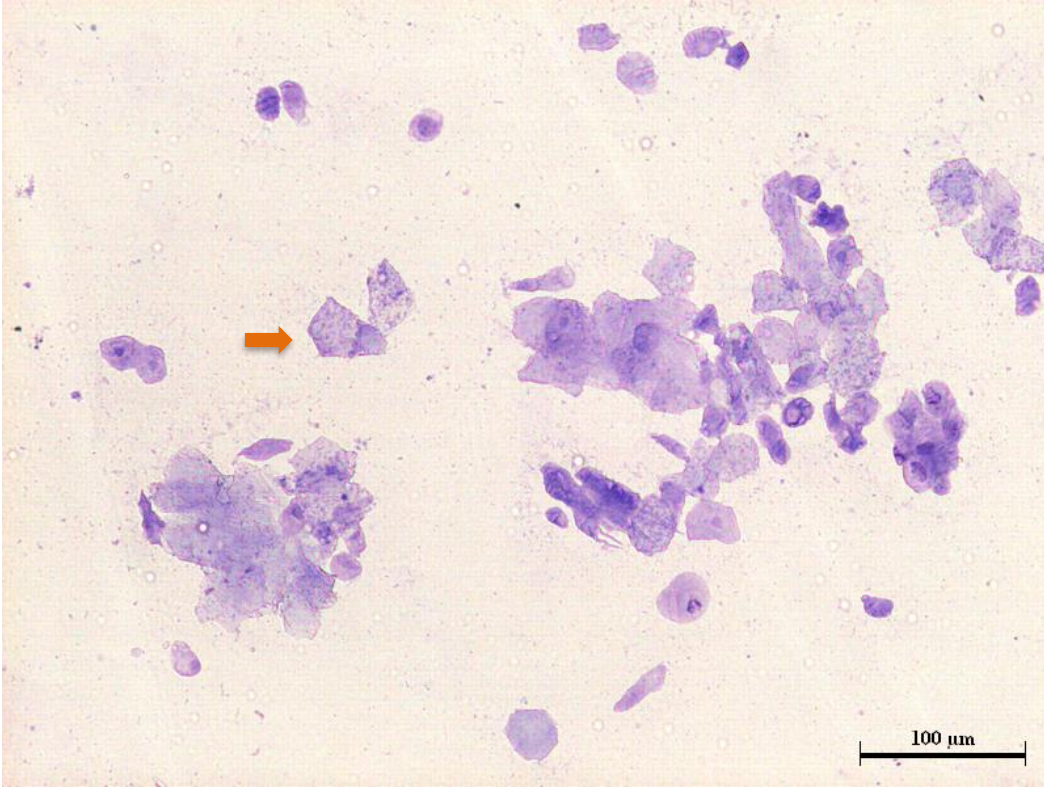
Şekil 4.21. Yağ kontrol grubuna ait proöstrus normal görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (**➡** : çekirdekli epitel hücre).




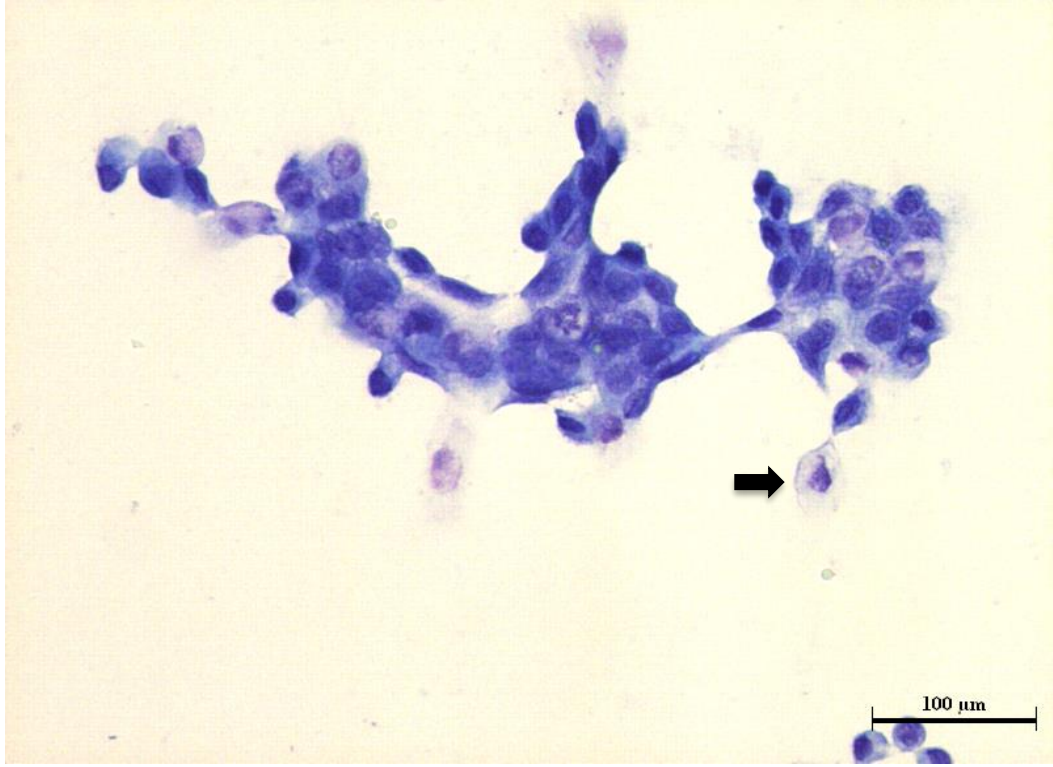
Şekil 4.22. Yağ kontrol grubuna ait metaöstrus normal görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (**➡** : çekirdekli epitel hücre, **➡** : kornifiye epitel hücresi, **○** : lökosit).



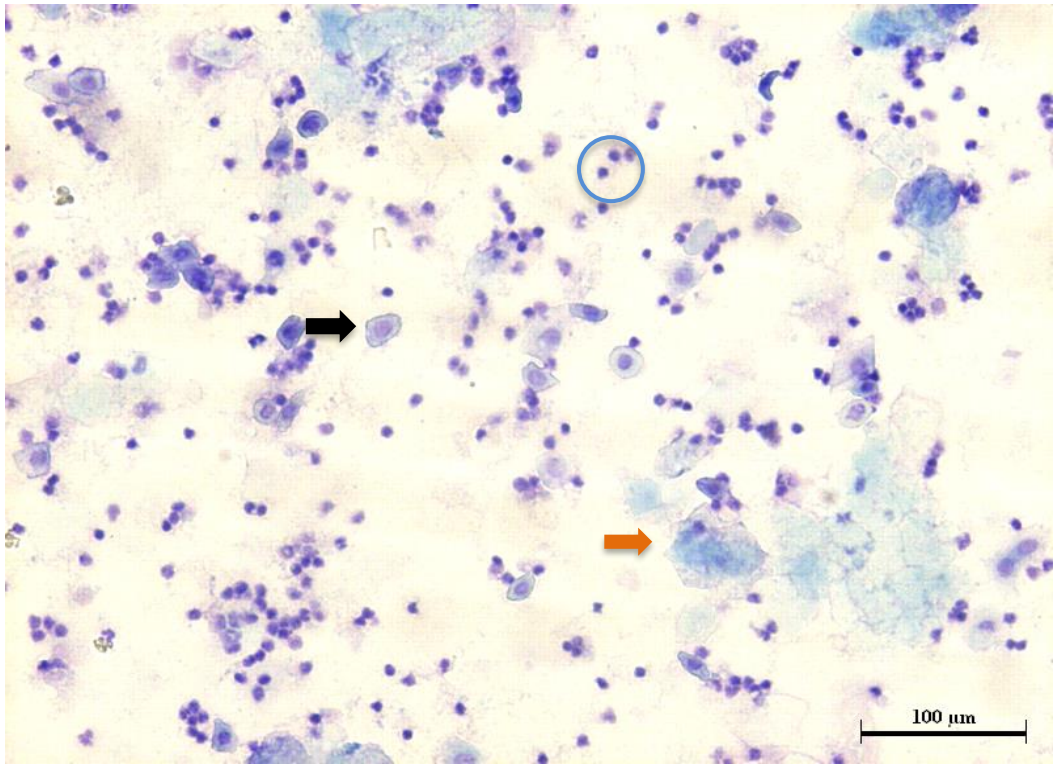
Şekil 4.23. Yağ kontrol grubuna ait diöstrus normal görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X), ( : lökosit).



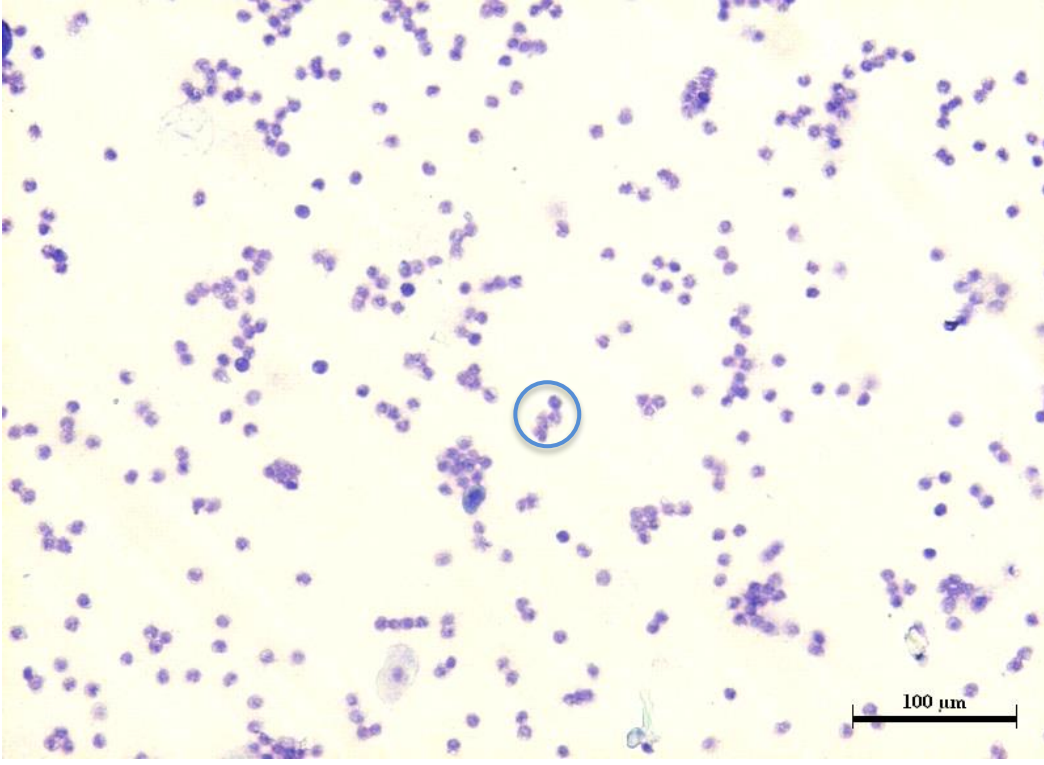
Şekil 4.24. BPA (pozitif kontrol) grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : kornifiye epitel hücresi).



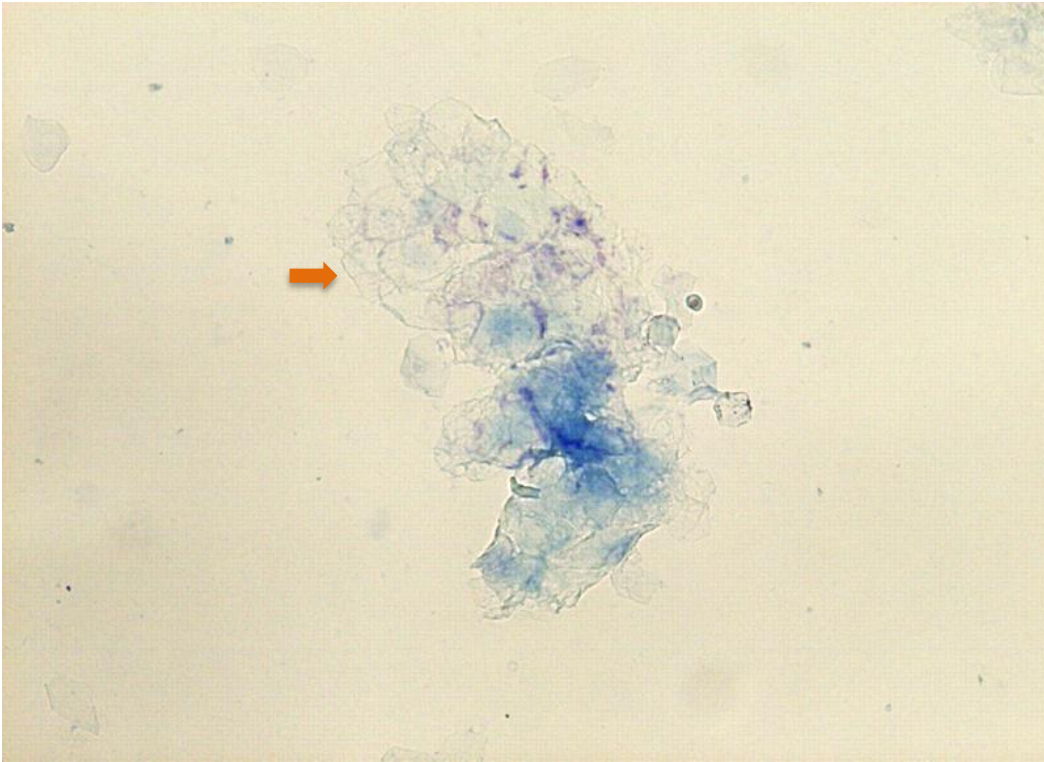
Şekil 4.25. BPA (pozitif kontrol) grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (■: çekirdekli epitel hücre).



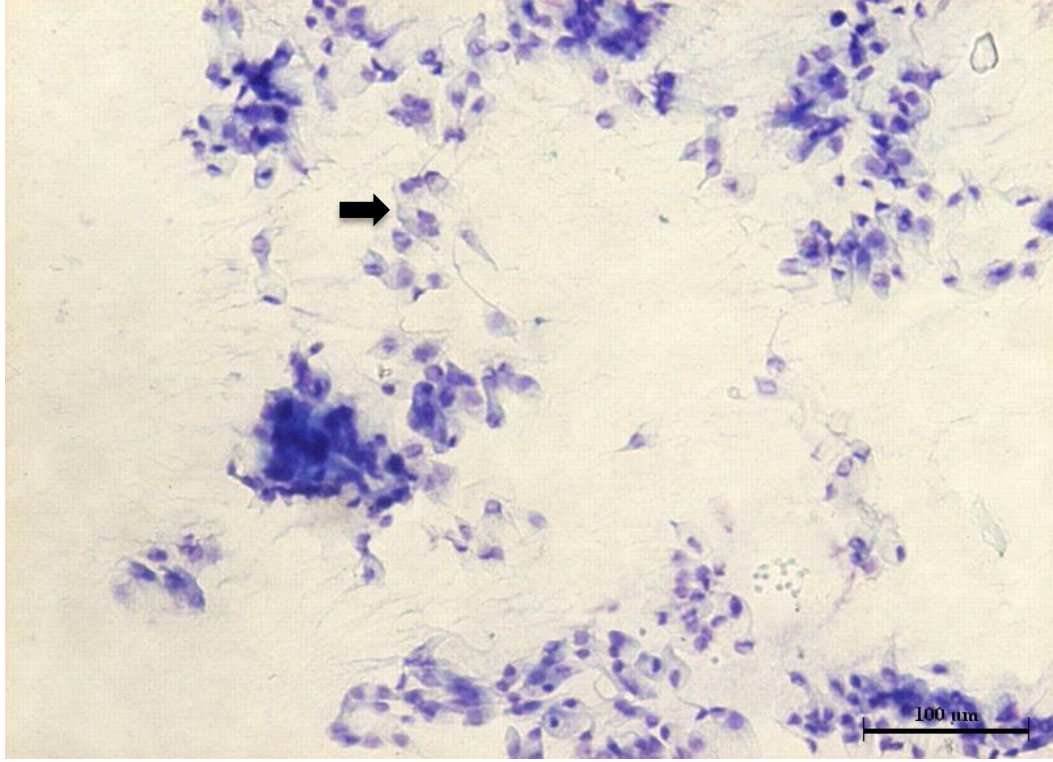
Şekil 4.26. BPA (pozitif kontrol) grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (■: çekirdekli epitel hücre, ■: kornifiye epitel hücresi, ○ : lökosit).



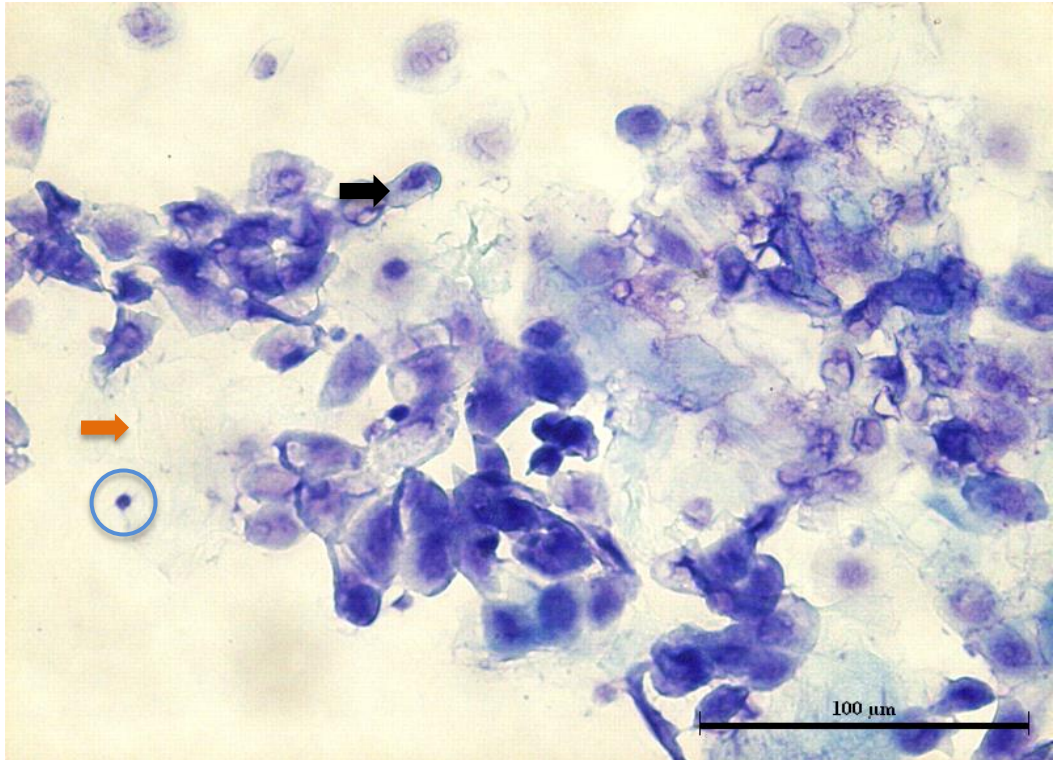
Şekil 4.27. BPA (pozitif kontrol) grubuna ait diöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (○ : lökosit).



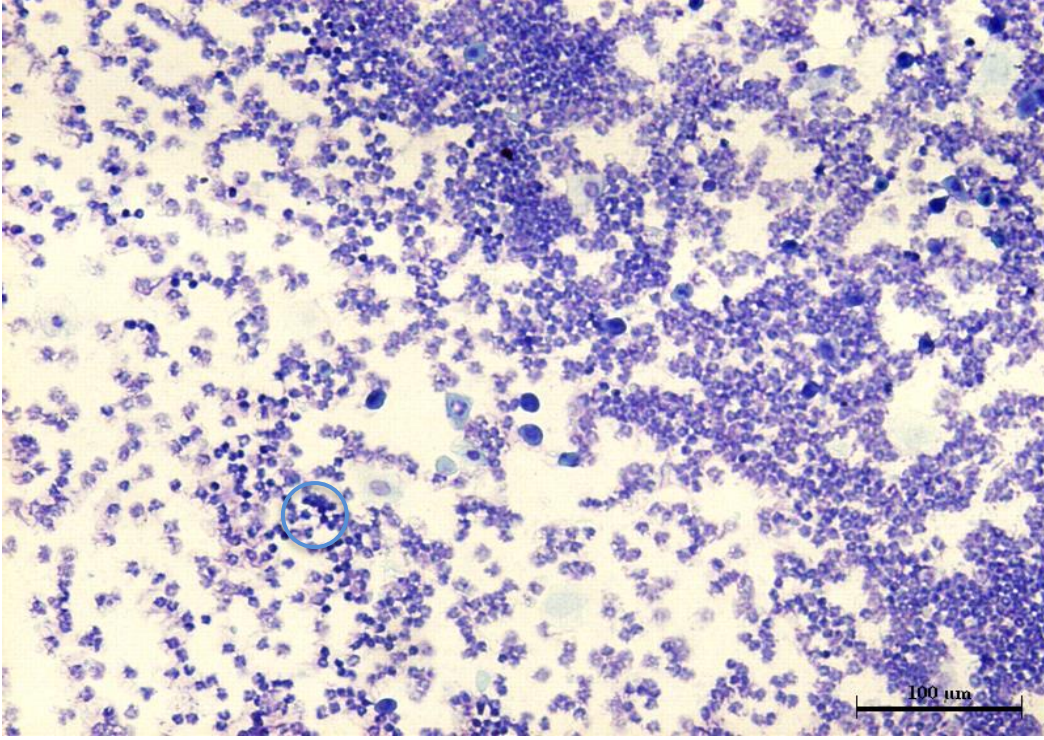
Şekil 4.28. Testosteron propiyonat (pozitif kontrol) grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (→ : kornifiye epitel hücresi).




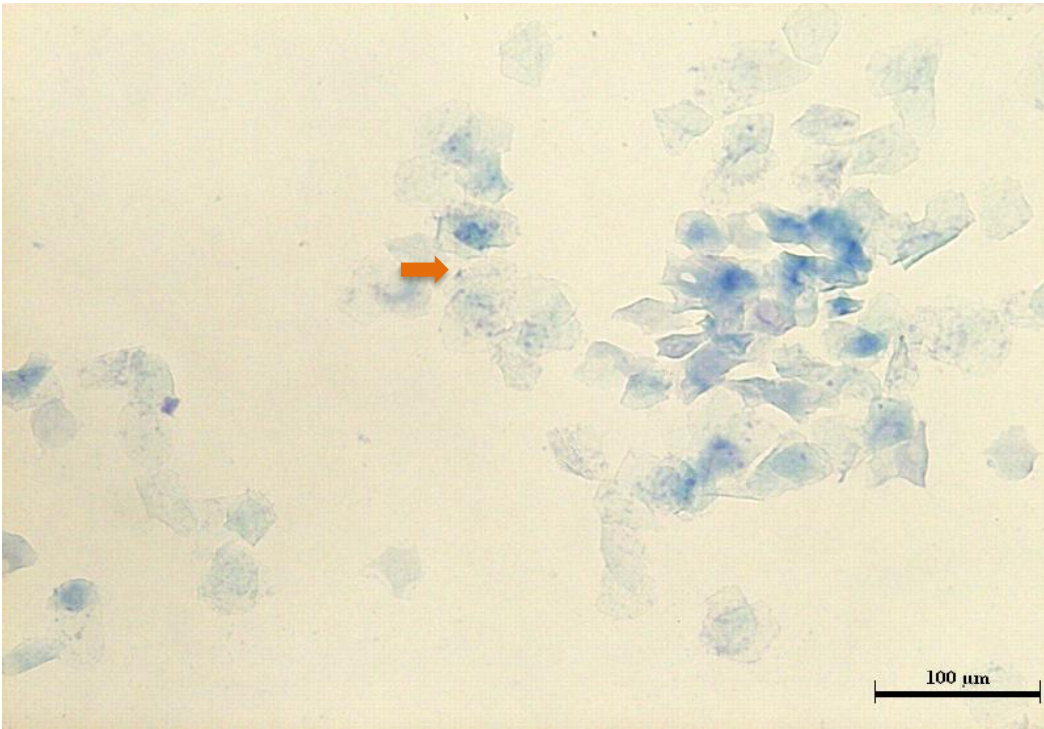
Şekil 4.29. Testosteron propiyonat (pozitif kontrol) grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (■: çekirdekli epitel hücre).




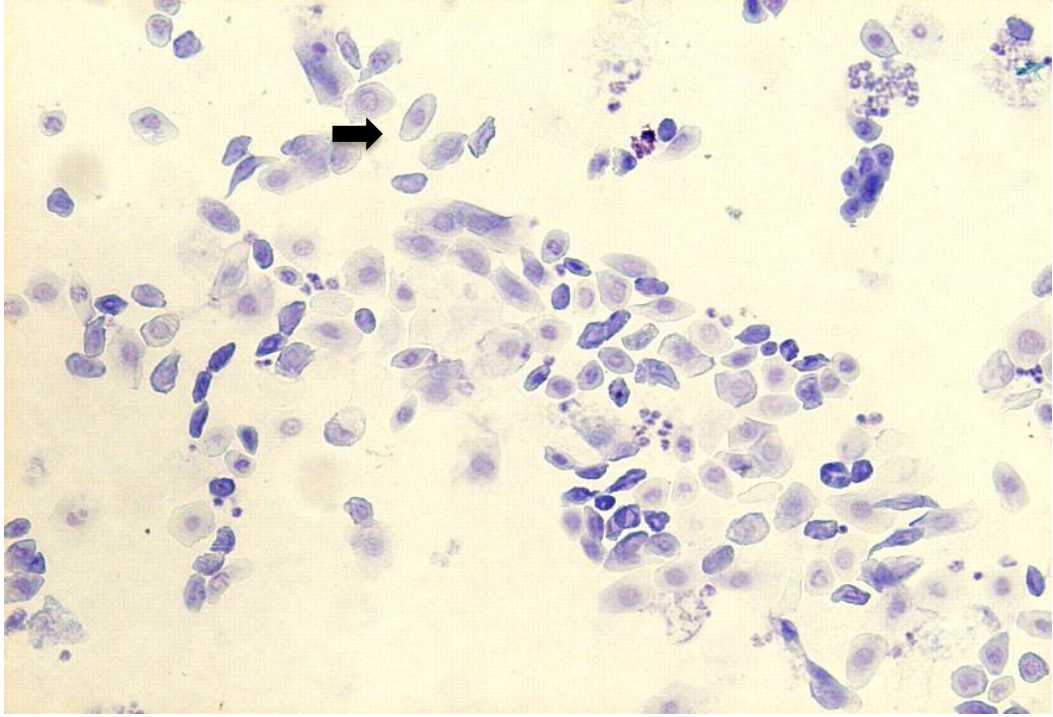
Şekil 4.30. Testosteron propiyonat (pozitif kontrol) grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (■: çekirdekli epitel hücre, ■: kornifiye epitel hücresi, ○: lökosit).



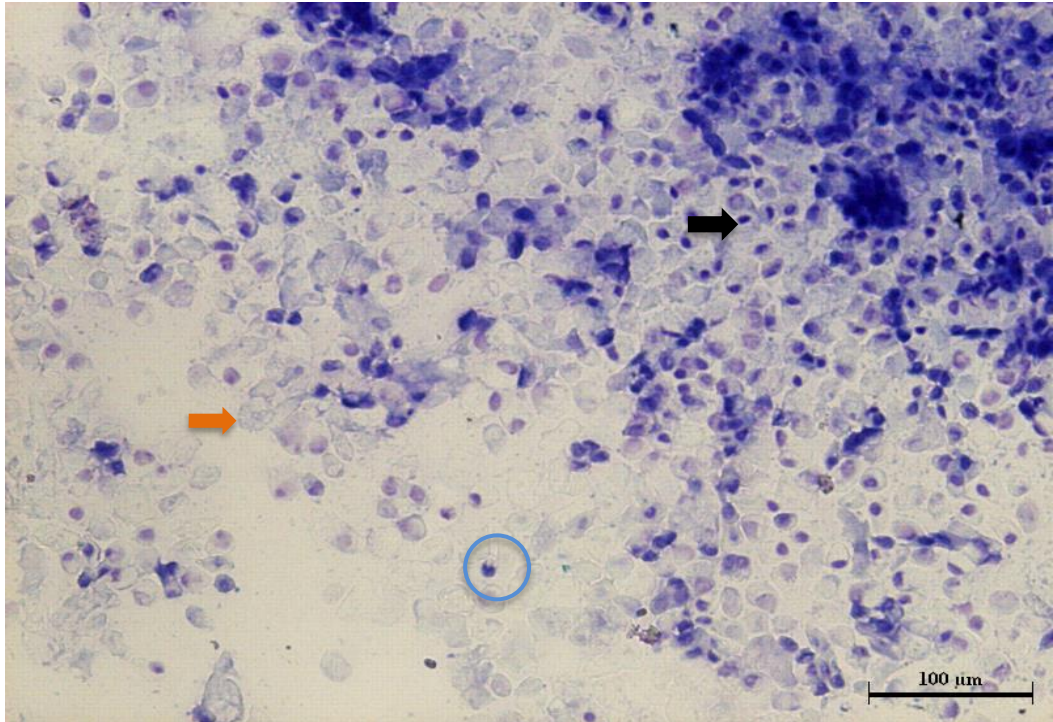
Şekil 4.31. Testosteron propiyonat (pozitif kontrol) grubuna ait diöstrus döngüsünün görünümü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : lökosit).



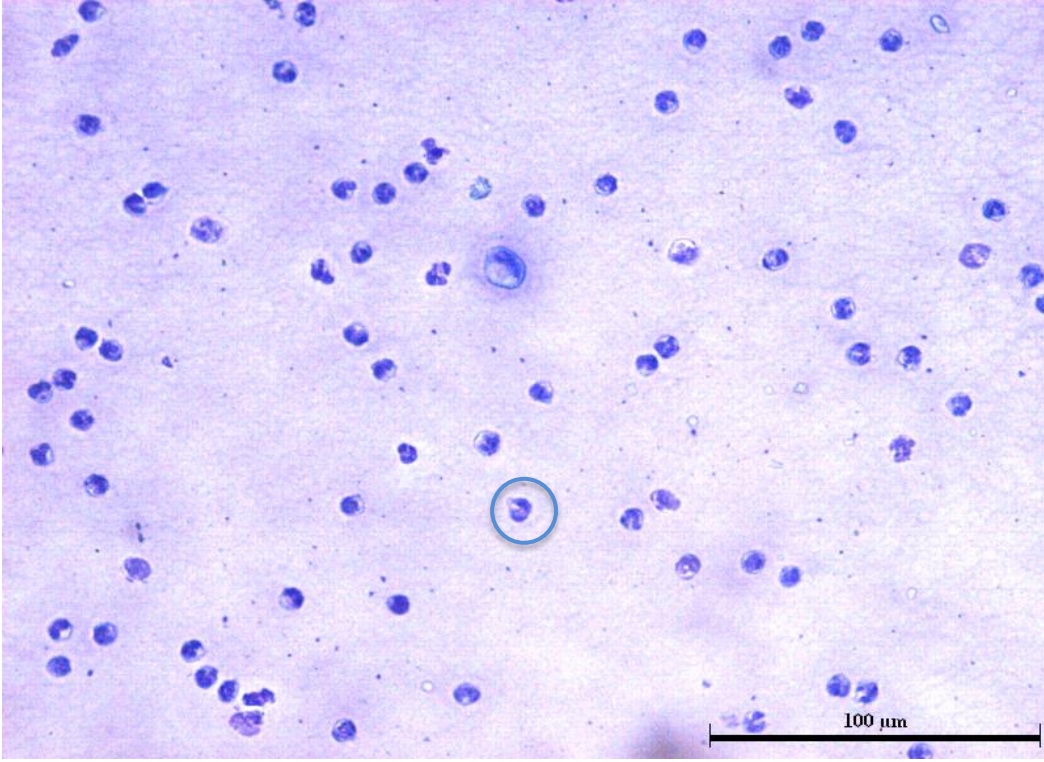
Şekil 4.32. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). ( : kornifiye epitel hücresi).



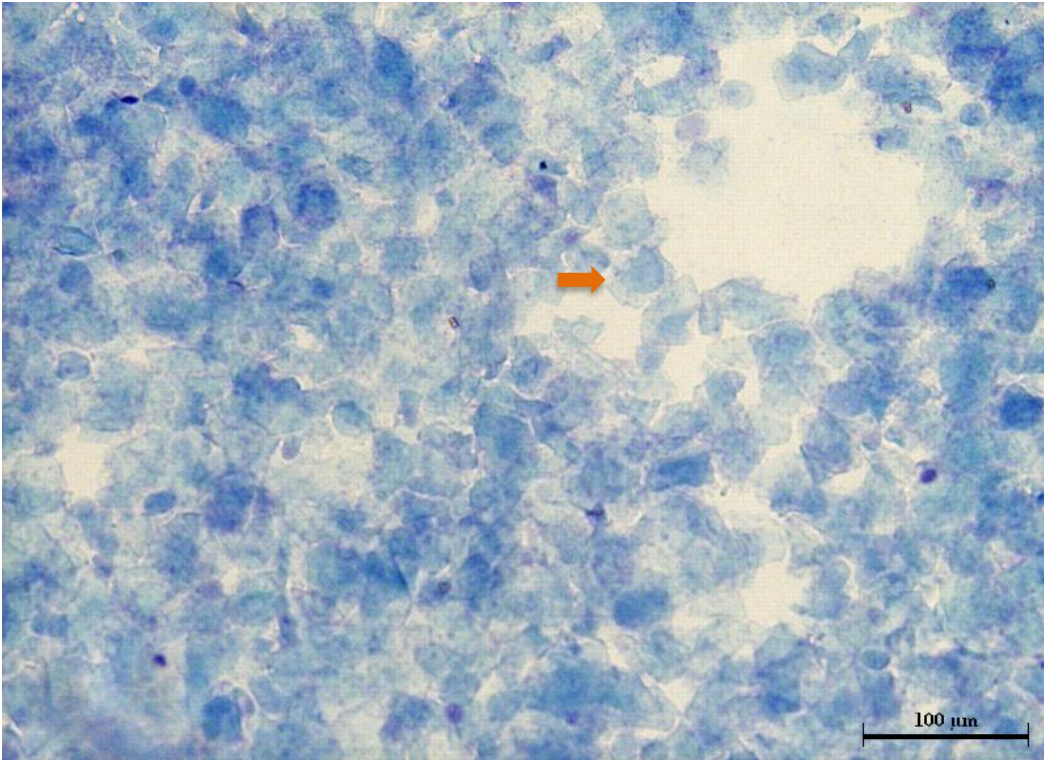
Şekil 4.33. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (➡: çekirdekli epitel hücre).



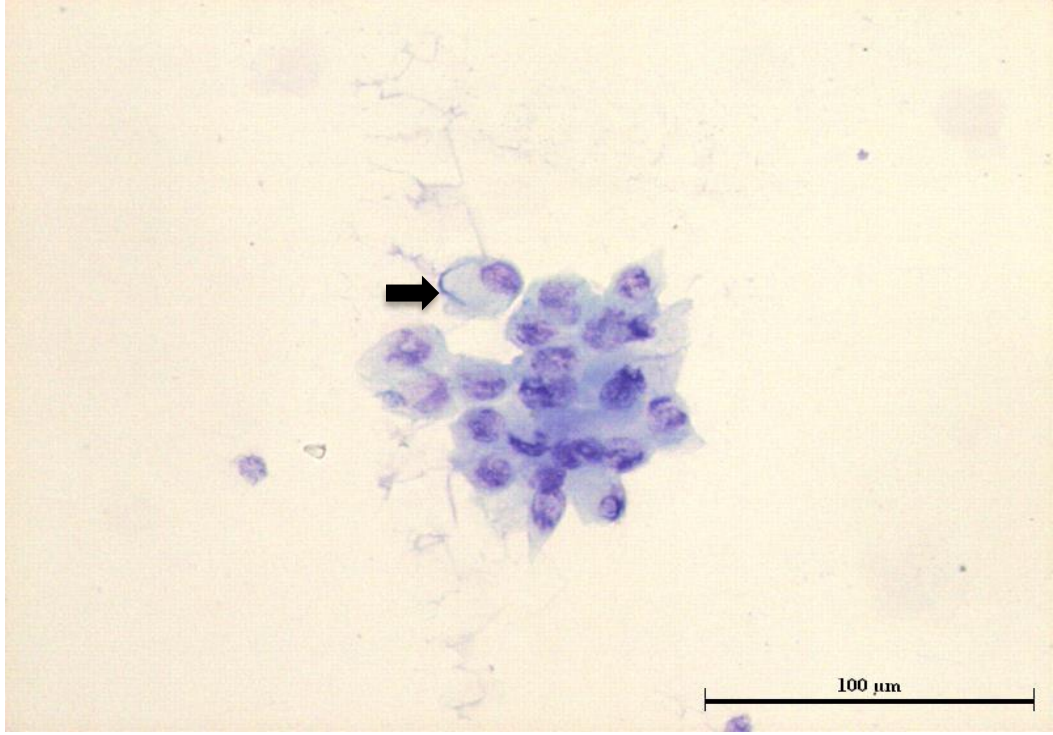
Şekil 4.34. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (➡: çekirdekli epitel hücre, ➡ : kornifiye epitel hücresi, ○ : lökosit).



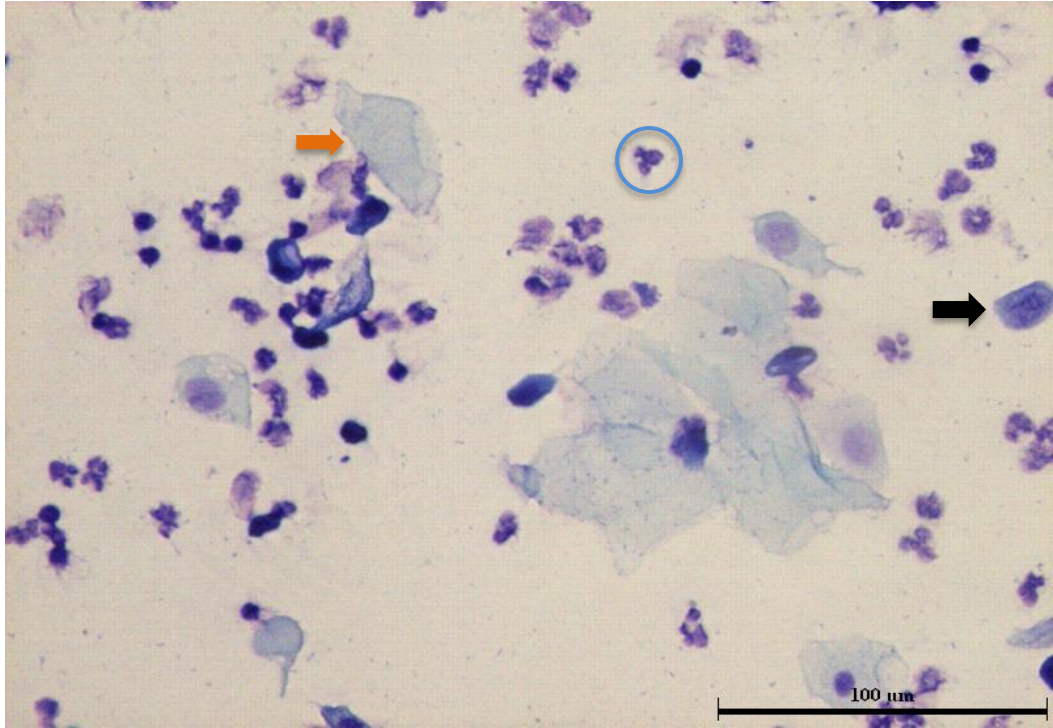
Şekil 4.35. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin grubuna ait diöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (○: lökosit).



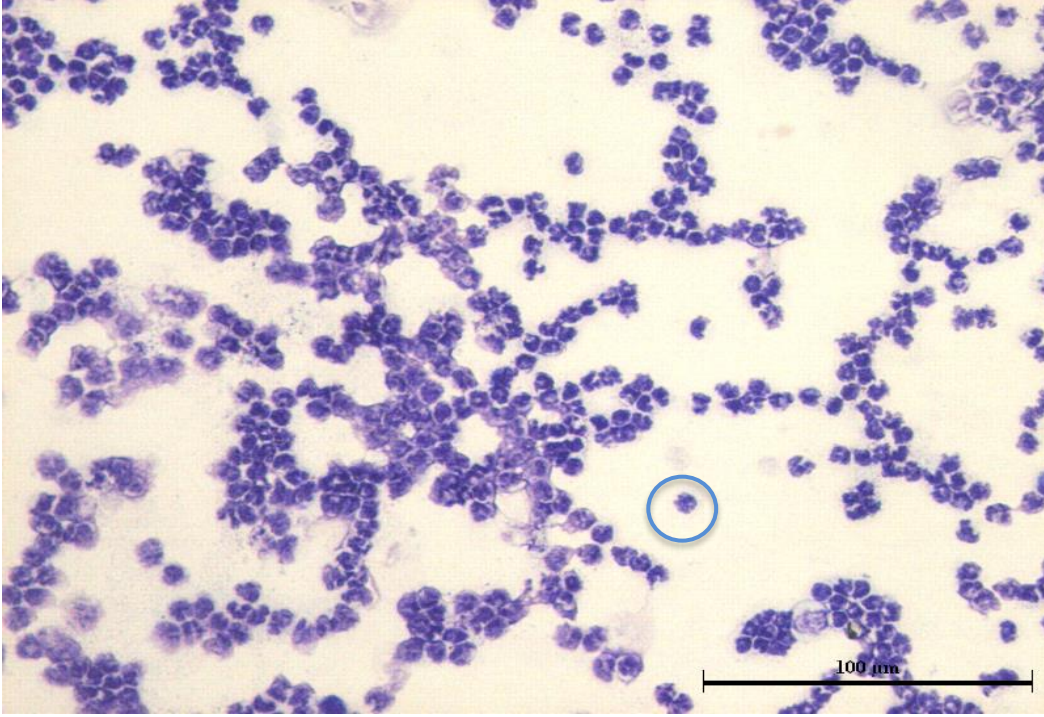
Şekil 4.36. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (➡ : kornifiye epitel hücresi).



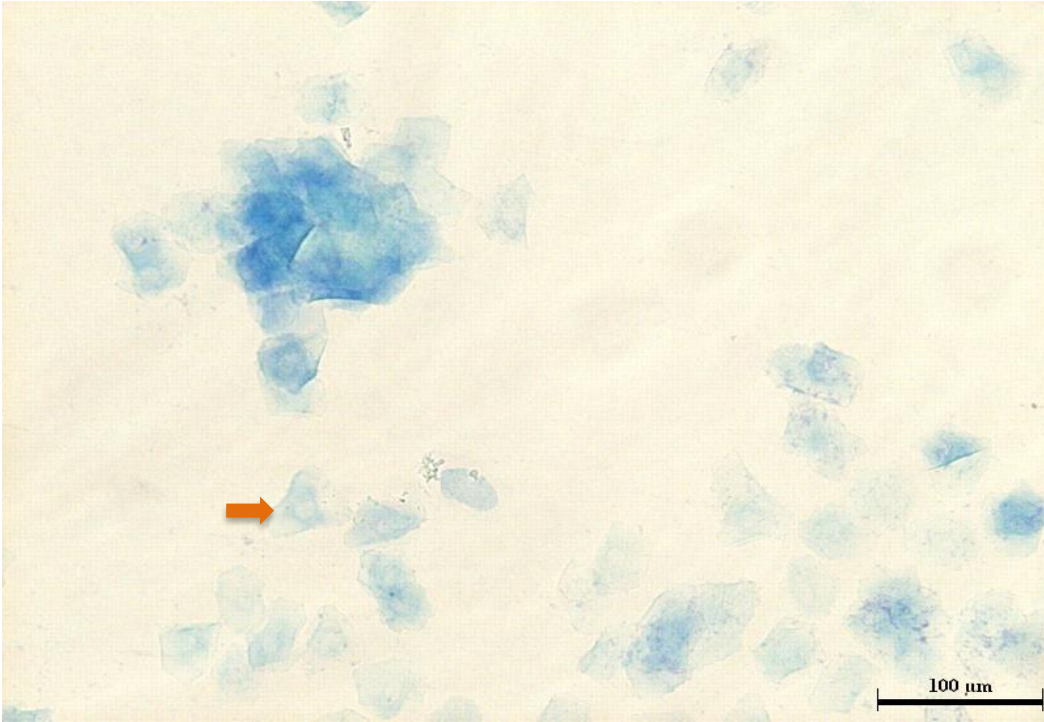
Şekil 4.37. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (■: çekirdekli epitel hücre).



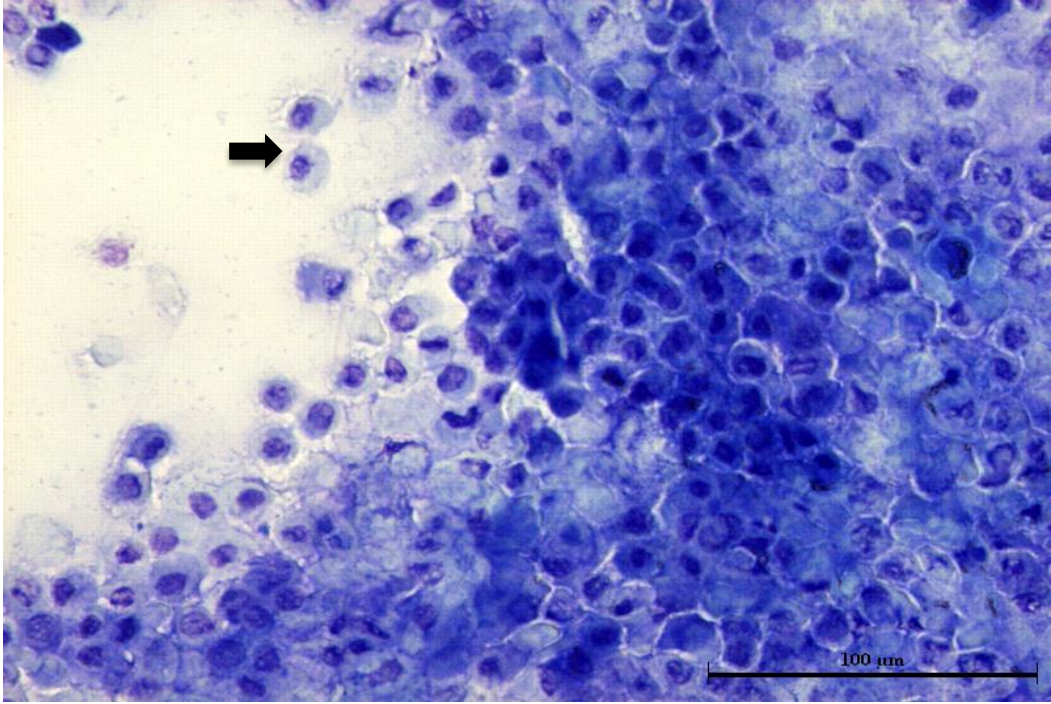
Şekil 4.38. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (■: çekirdekli epitel hücre, ■: kornifiye epitel hücresi, ○: lökosit).



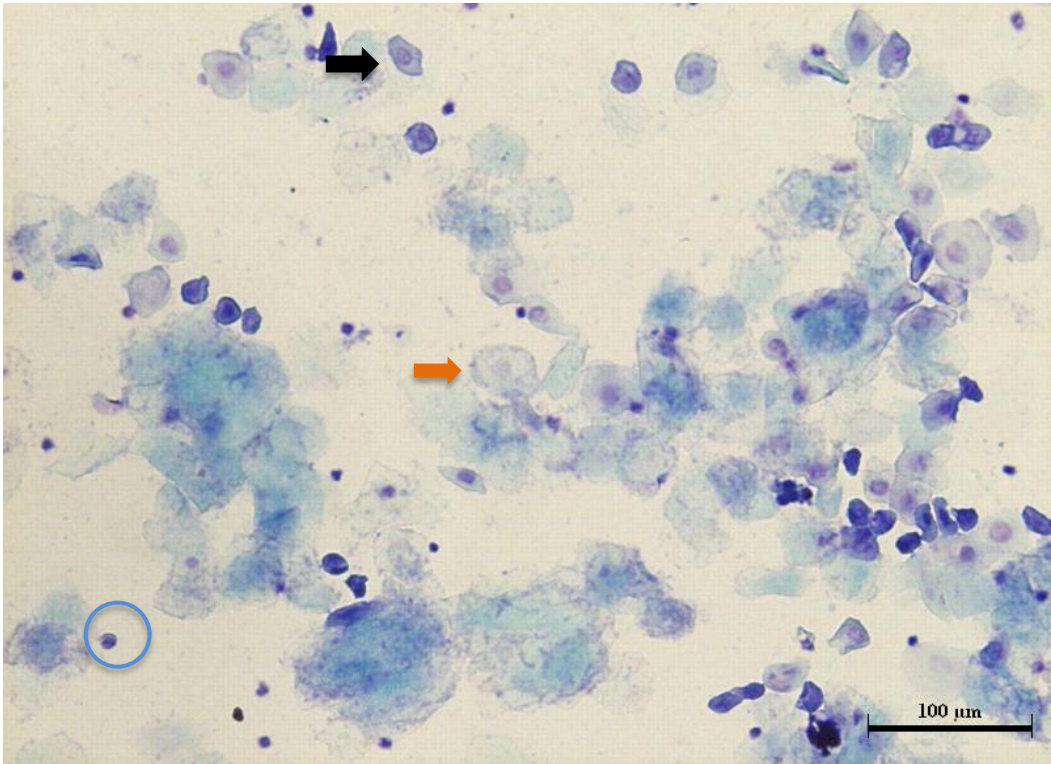
Şekil 4.39. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin grubuna ait diöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (○ : lökosit).



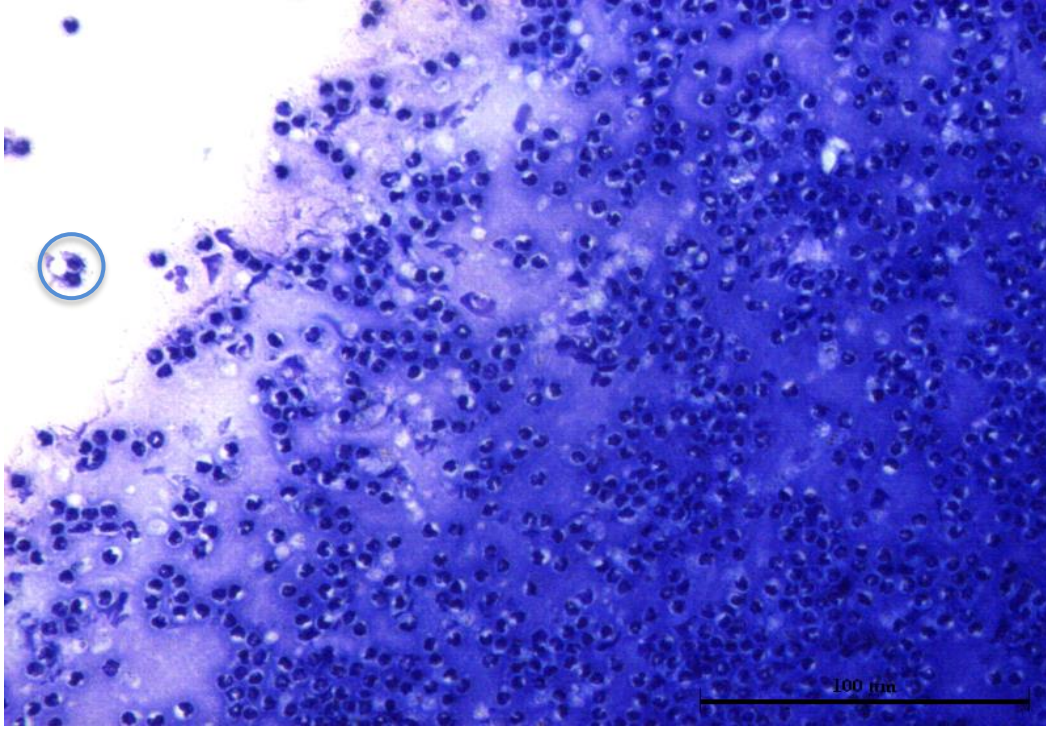
Şekil 4.40. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubuna ait östrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (➔ : kornifiye epitel hücreleri).



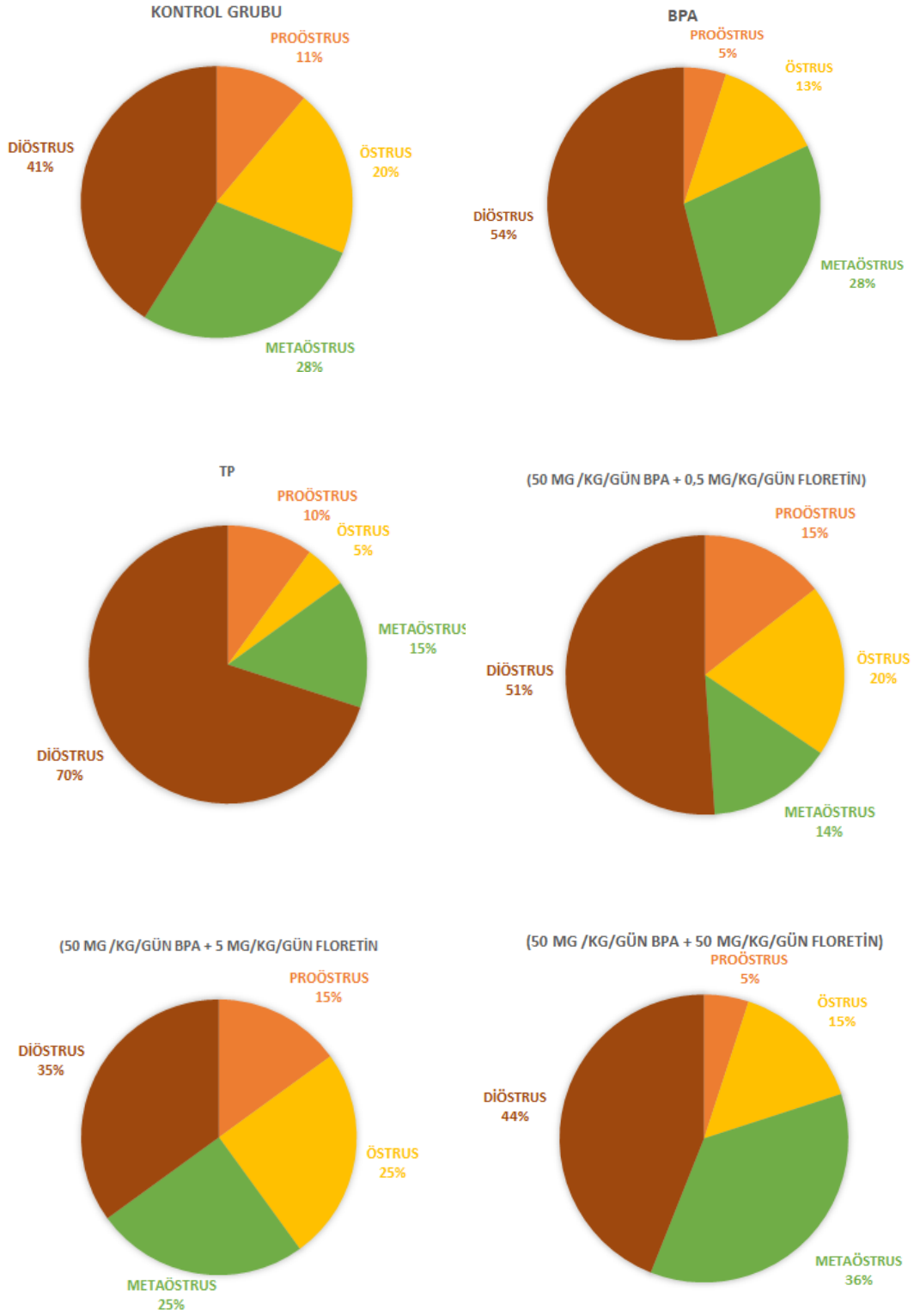
Şekil 4.41. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubuna ait proöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (**➡** : çekirdekli epitel hücre).



Şekil 4.42. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubuna ait metaöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 200X). (**➡** : çekirdekli epitel hücre, **➡** : kornifiye epitel hücresi, **○** : lökosit).



Şekil 4.43. Uygulama grubu 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubuna ait diöstrus görüntüsü. (Toluidine blue boyaması, 400X). (○ : lökosit).

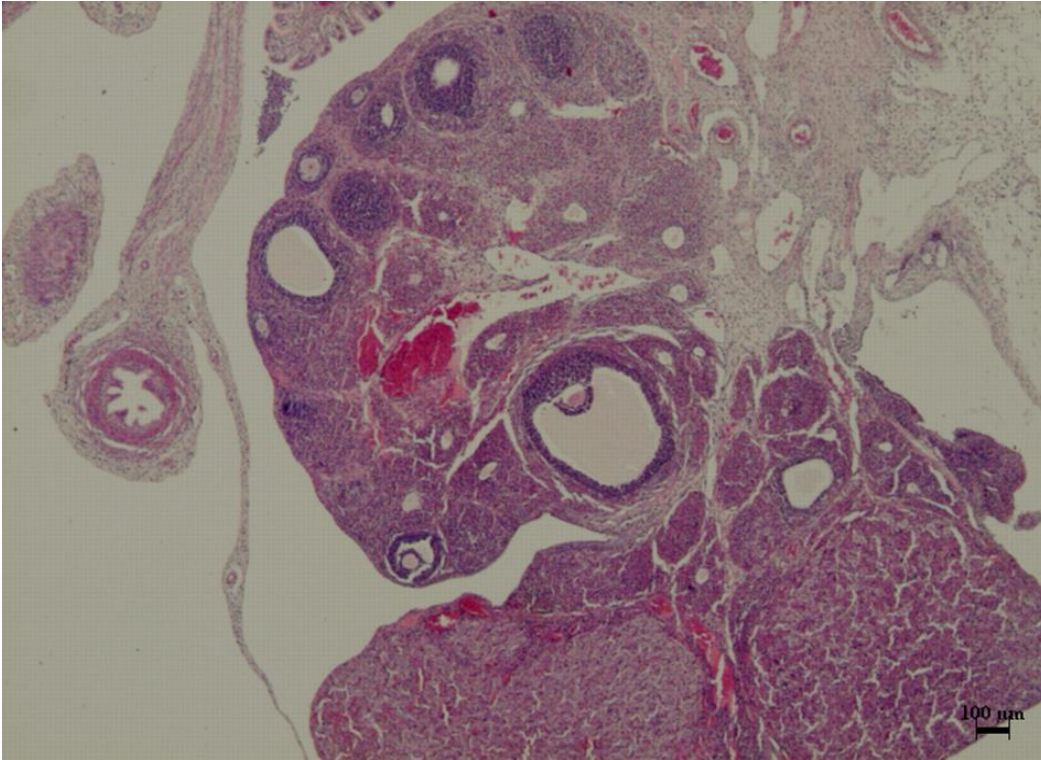


Şekil 4.44. Kontrol ve uygulama gruplarına ait östrus döngüleri.

4.6. Histopatolojik Bulgular

4.6.1. Ovaryum Dokusuna Ait Bulgular

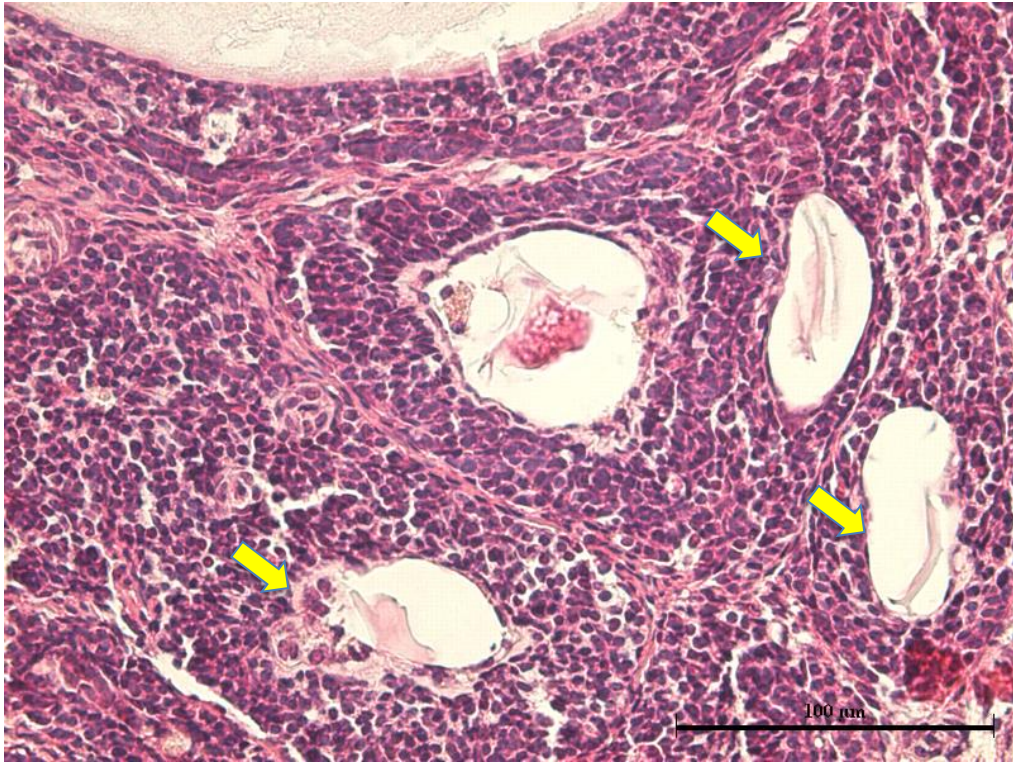
Kontrol grubuna ait normal ovaryum doku görüntüsü Şekil 4.45’de verilmiştir. BPA pozitif kontrol grubunda (Şekil 4.46) ve testosteron propiyonat pozitif kontrol grubunda çok sayıda kistik görünüm elde edilmiştir (Şekil 4.47-49). Uygulama gruplarından olan 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin grubunda ise pozitif kontrol gruplarına oranla daha az sayıda kistik görünüm gözlenmiştir (Şekil 4.53 ve Şekil 4.55). Ovaryuma ait kist sayılarının yer aldığı insidans değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir.



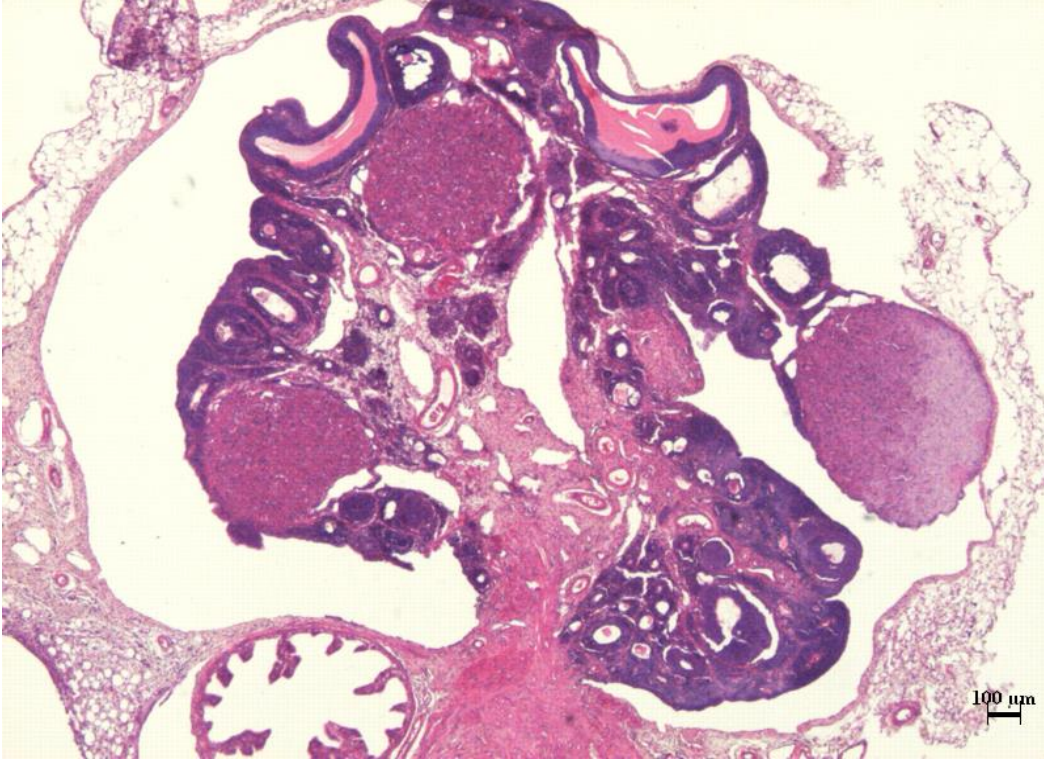
Şekil 4.45.Yağ kontrol grubuna ait ovaryum dokusu normal görünümü, (H&E boyama, 40X).



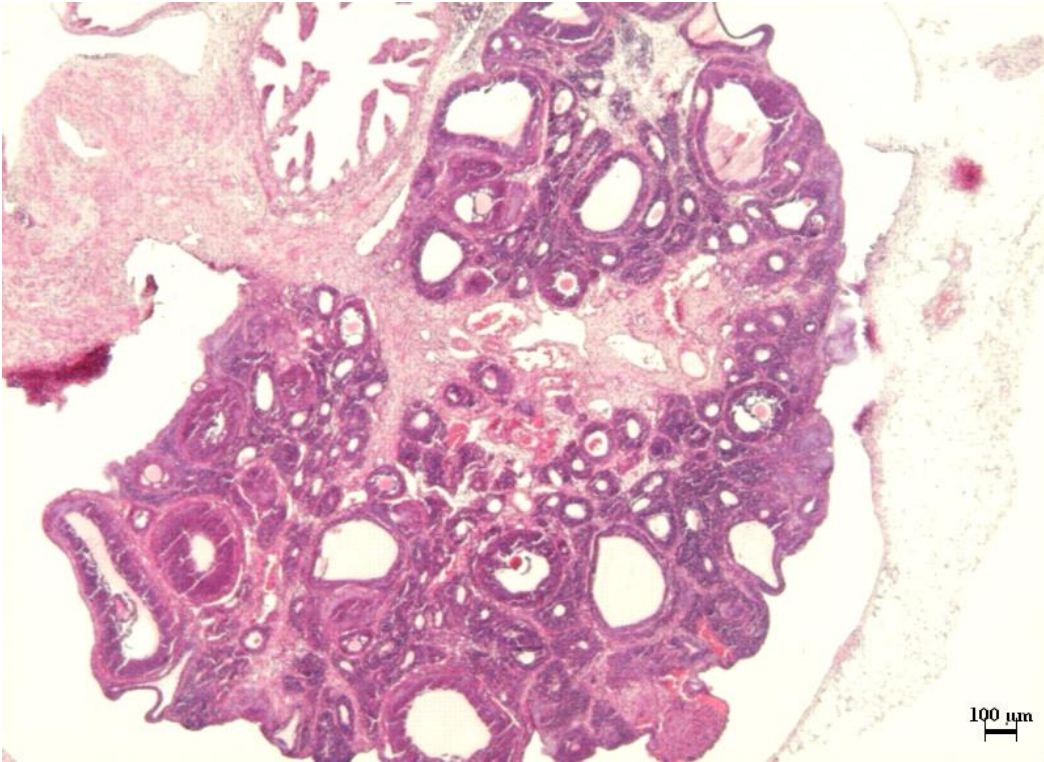
Şekil 4.46. BPA pozitif kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda çok sayıda kistik folikül (⇒), (H&E boyama, 40X).



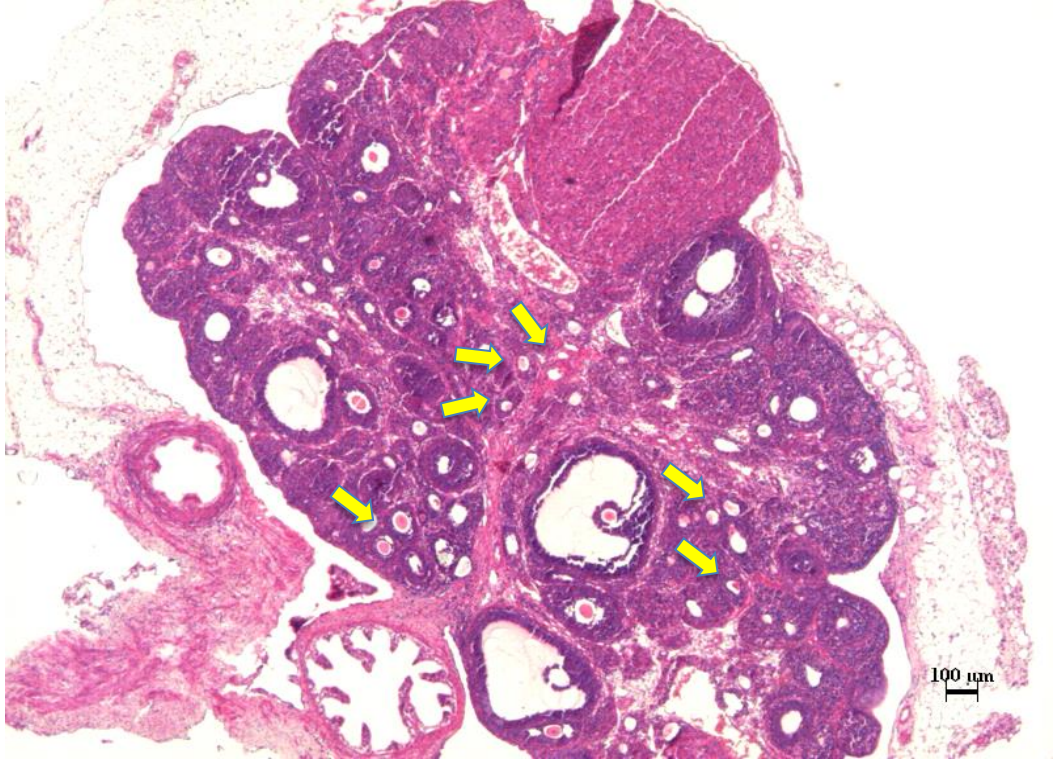
Şekil 4.47. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda kist görünümü (⇒), (H&E boyama, 400X).



Şekil 4.48. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait ovaryum dokusu (H&E boyama, 40X).



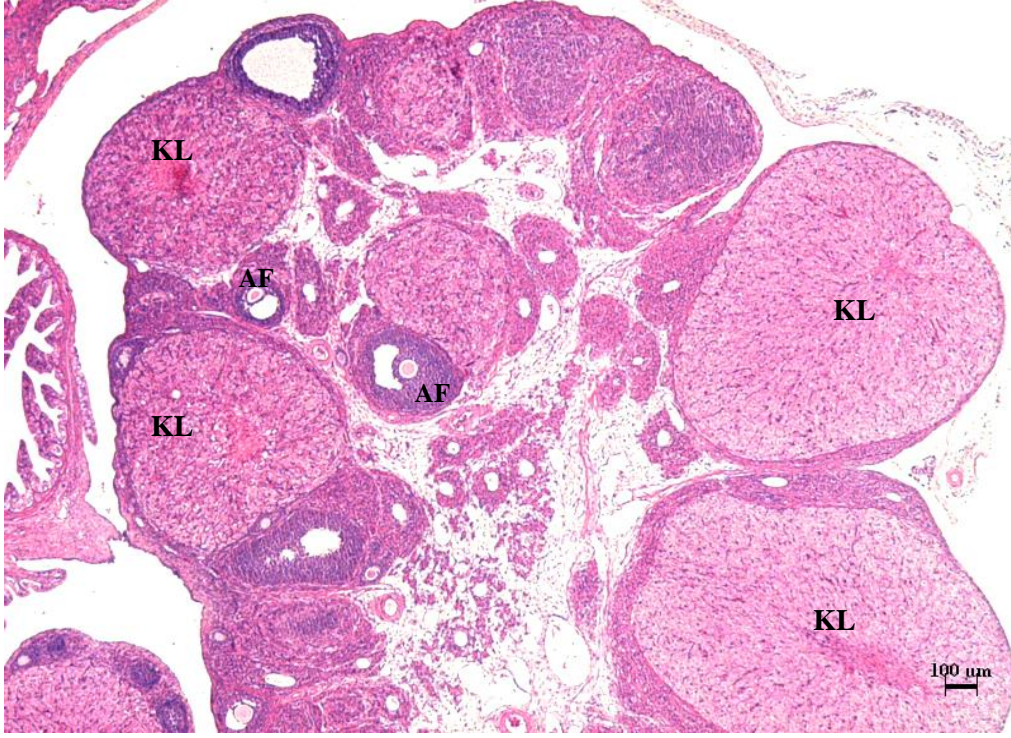
Şekil 4.49. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait ovaryum dokusu (H&E boyama, 40X).



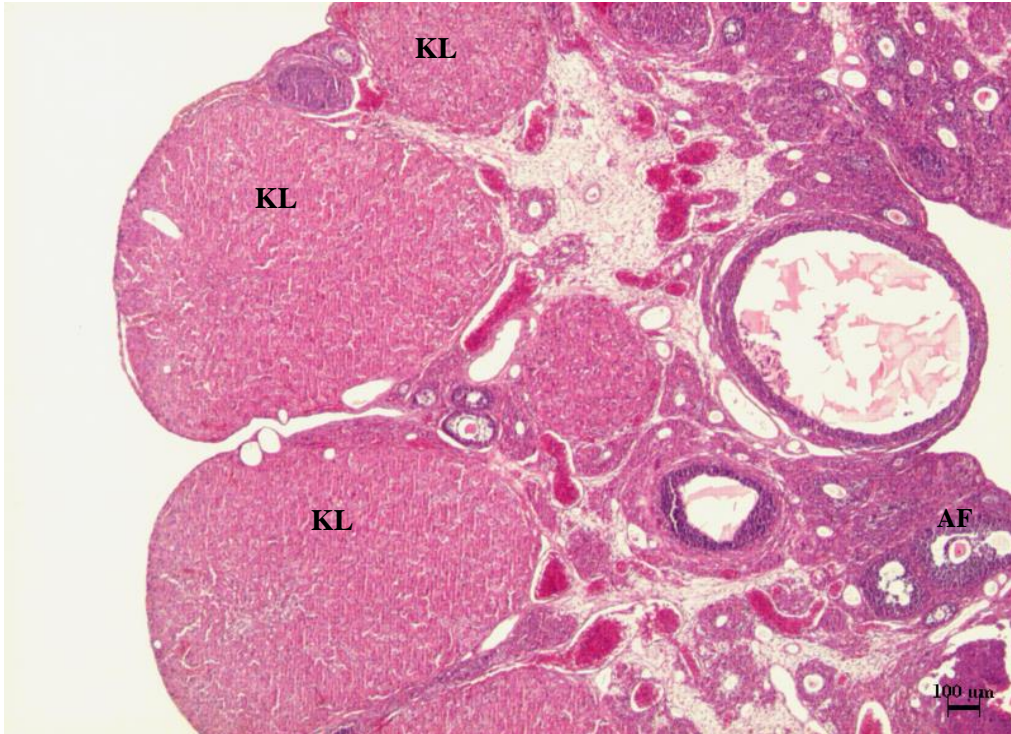
Şekil 4.50. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusunda çok sayıda kistik folikül (→), (H&E boyama, 40X).



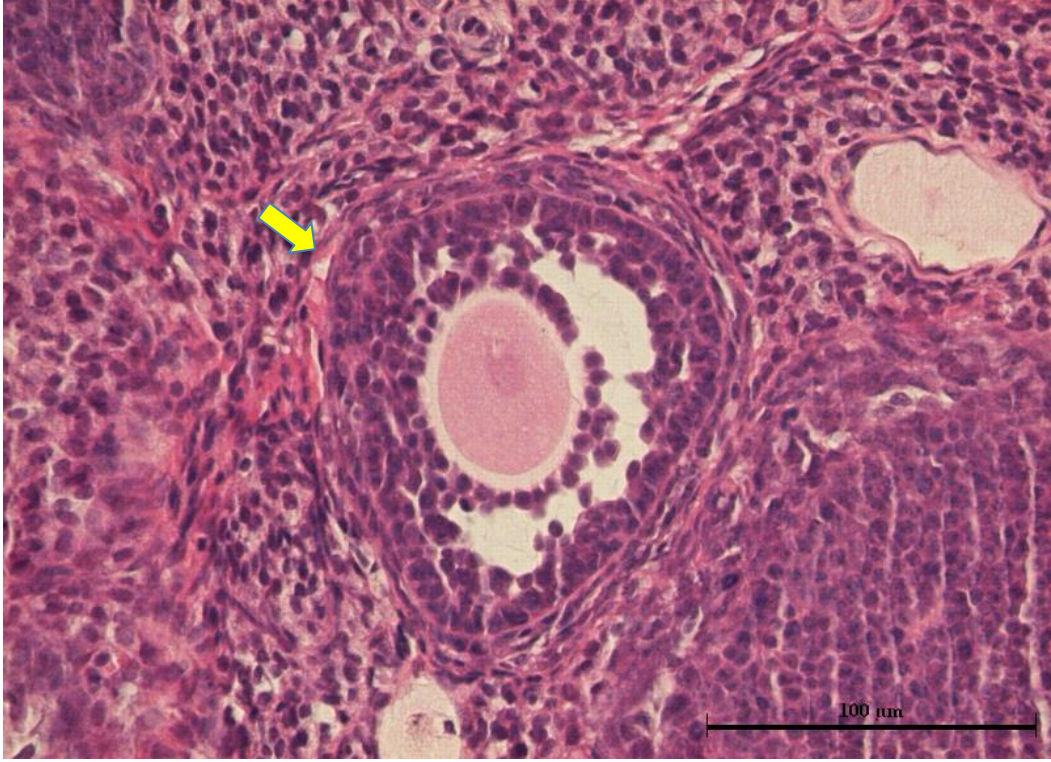
Şekil 4.51. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusunda primer (→) ve antral folikül (→), (H&E boyama, 400X).



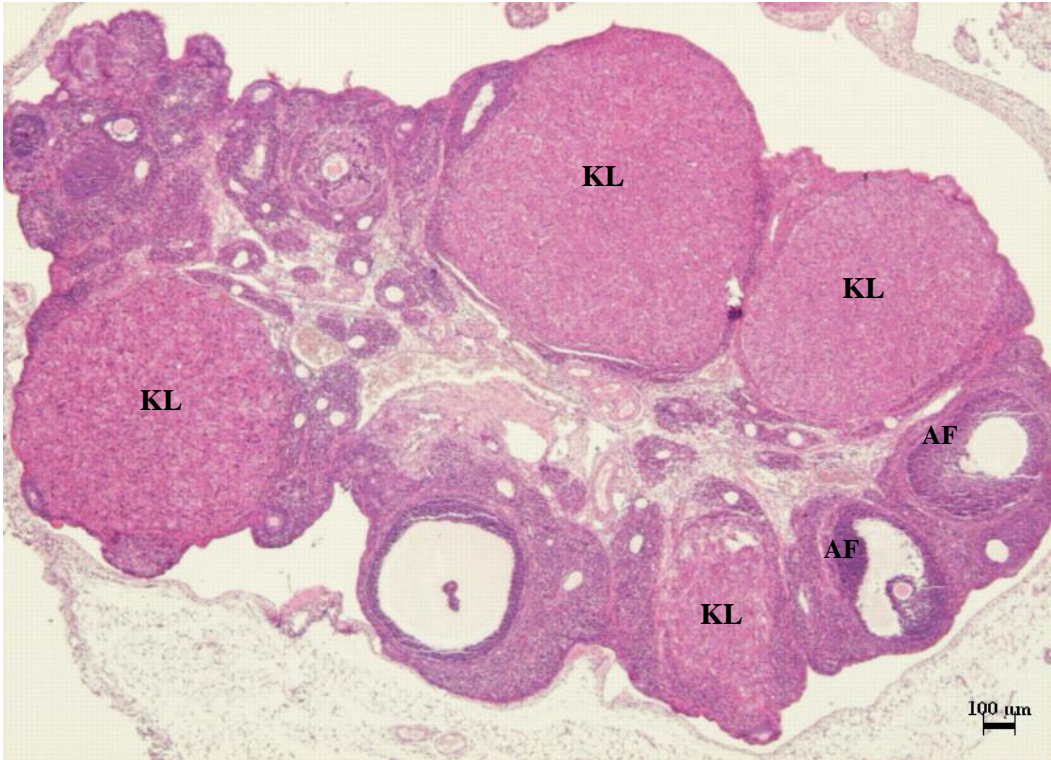
Şekil 4.52. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusuna ait genel görünüm, KL: Korpus luteum, AF: Antral folikül (H&E boyama, 40X).



Şekil 4.53. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusu genel görünümü, KL: Korpus luteum, AF: Antral folikül (H&E boyama, 40X).



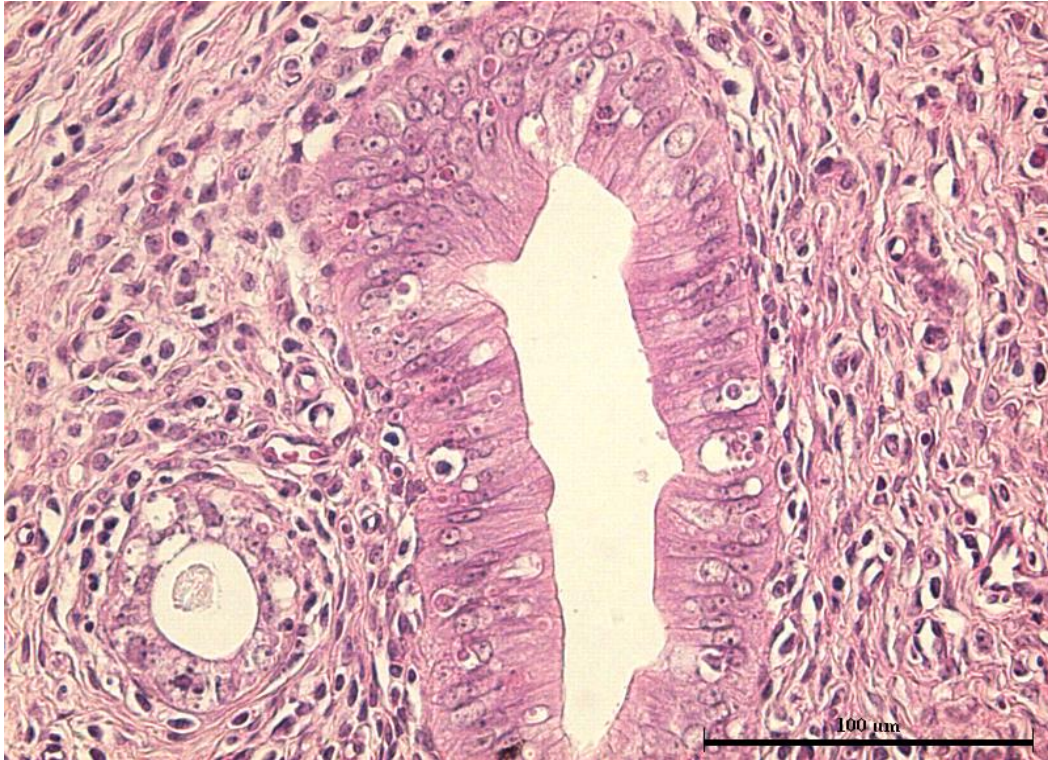
Şekil 4.54. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusunda antral folikül (→), (H&E boyama, 400X).



Şekil 4.55. Uygulama grubuna 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin ait ovaryum dokusu genel görünümü. KL: Korpus luteum, AF: Antral folikül (H&E boyama, 40X).

4.6.2. Uterus Dokusuna Ait Bulgular

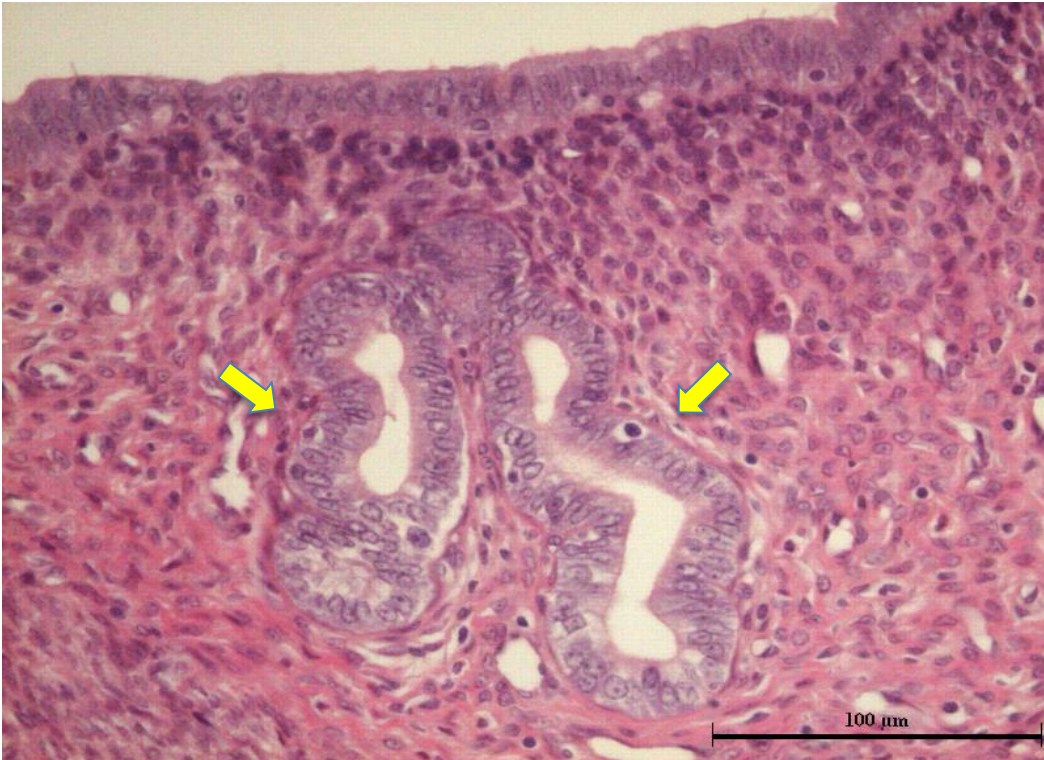
Kontrol grubuna ait normal histolojik görünüm Şekil 4.56 ve Şekil 4.57’de gösterilmiştir. BPA pozitif kontrol grubunda salgı bezlerinde artış görülürken, testosteron propiyonat pozitif kontrol grubunda dejenerasyonların meydana geldiği tespit edilmiştir. Uygulama gruplarına ait histolojik görüntüler Şekil 4.61–64’de verilmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarına ait salgı bezlerindeki artışı gösteren insidans değerleri Çizelge 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.56. Yağ kontrol grubuna ait uterus dokusunun normal görünümü (H&E boyama, 400X).



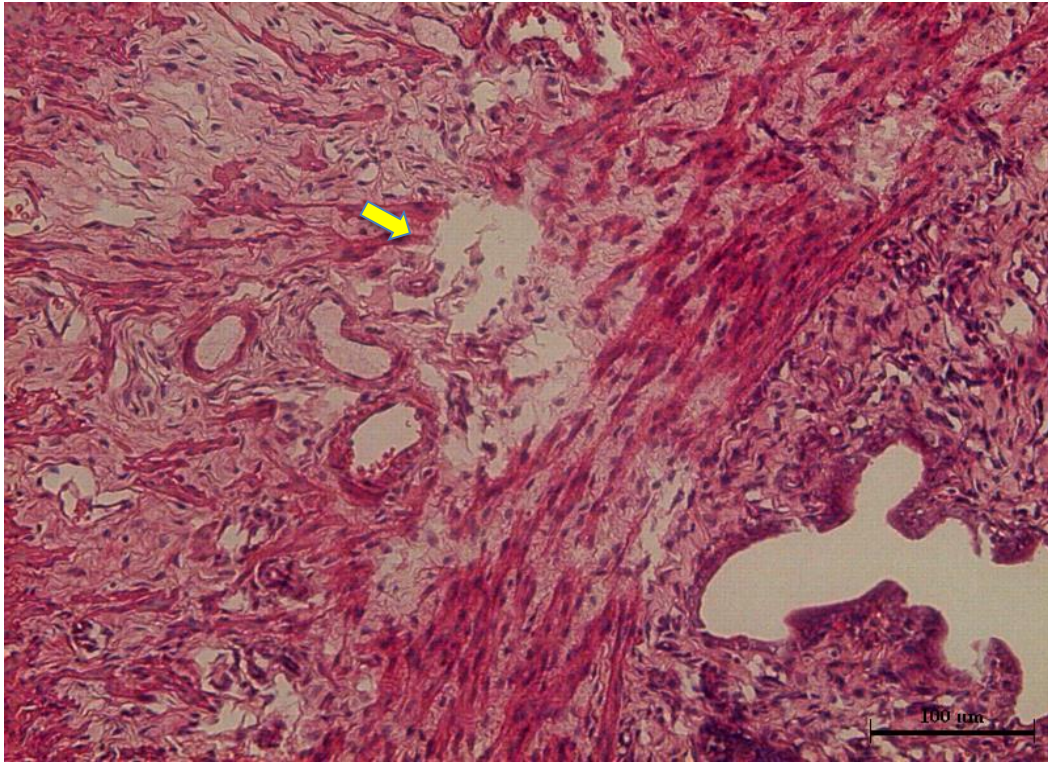
Şekil 4.57. Yağ kontrol grubuna ait uterus dokusunun normal görünümü (H&E boyama, 40X).



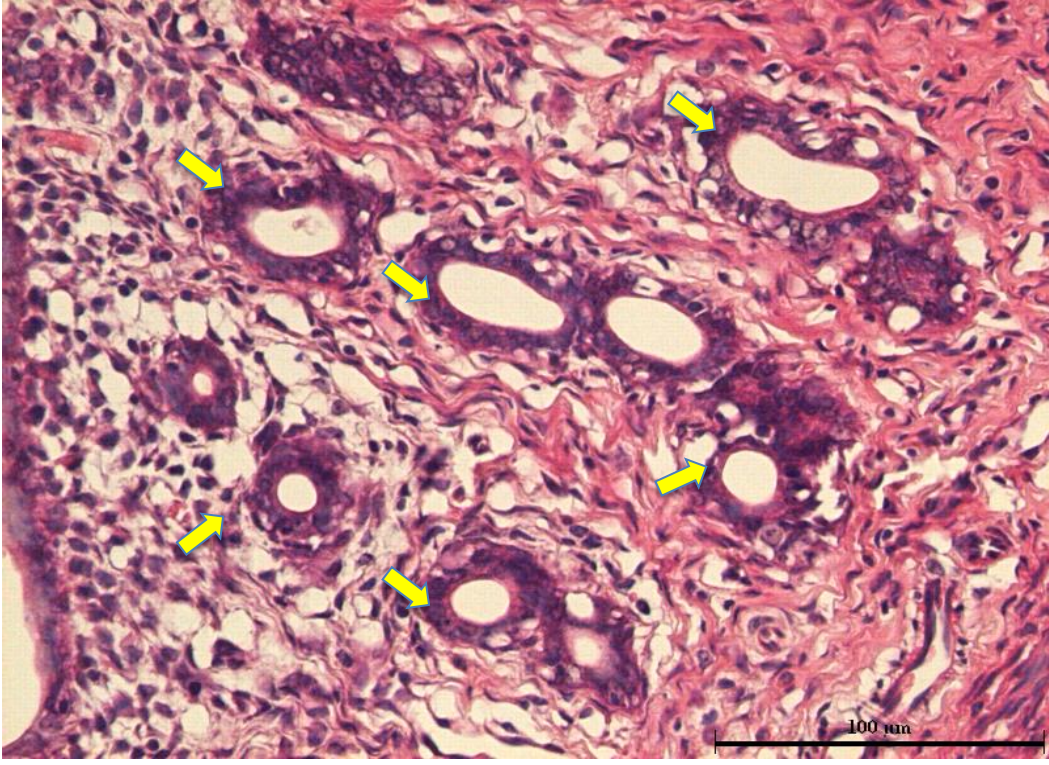
Şekil 4.58. BPA pozitif kontrol grubuna ait uterus dokusunda salgı bezleri (→) (H&E boyama, 400X).



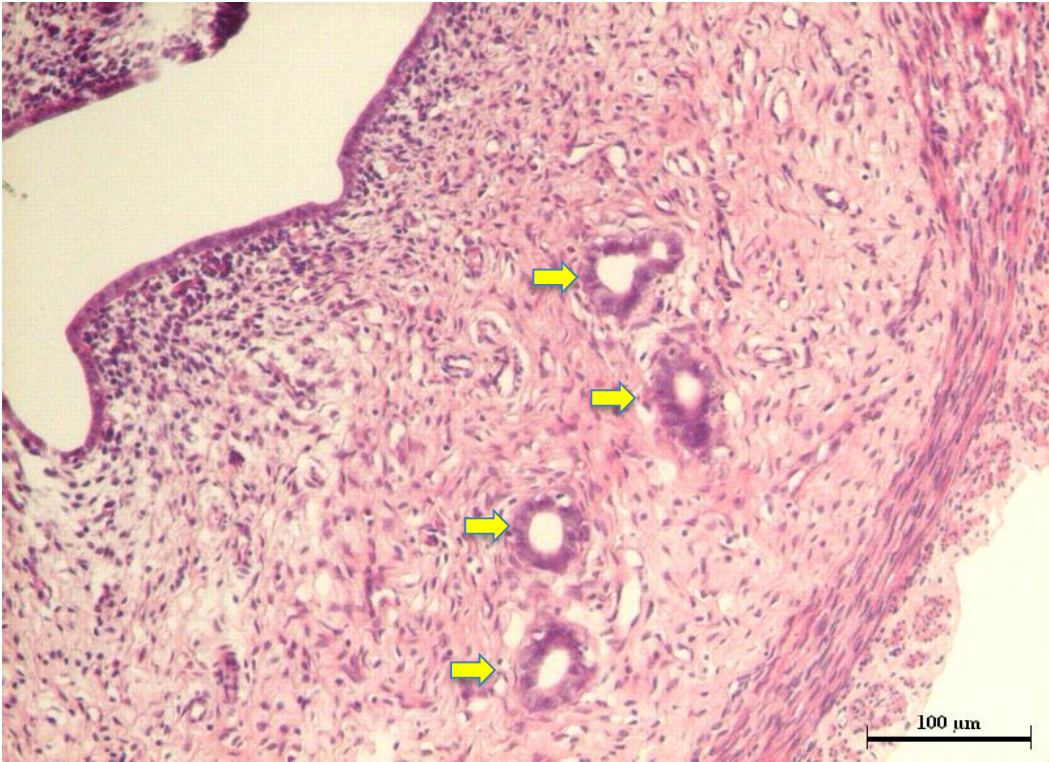
Şekil 4.59. BPA pozitif kontrol grubuna ait uterus dokusunda salgı bezlerinde artış (→), (H&E boyama, 100X).



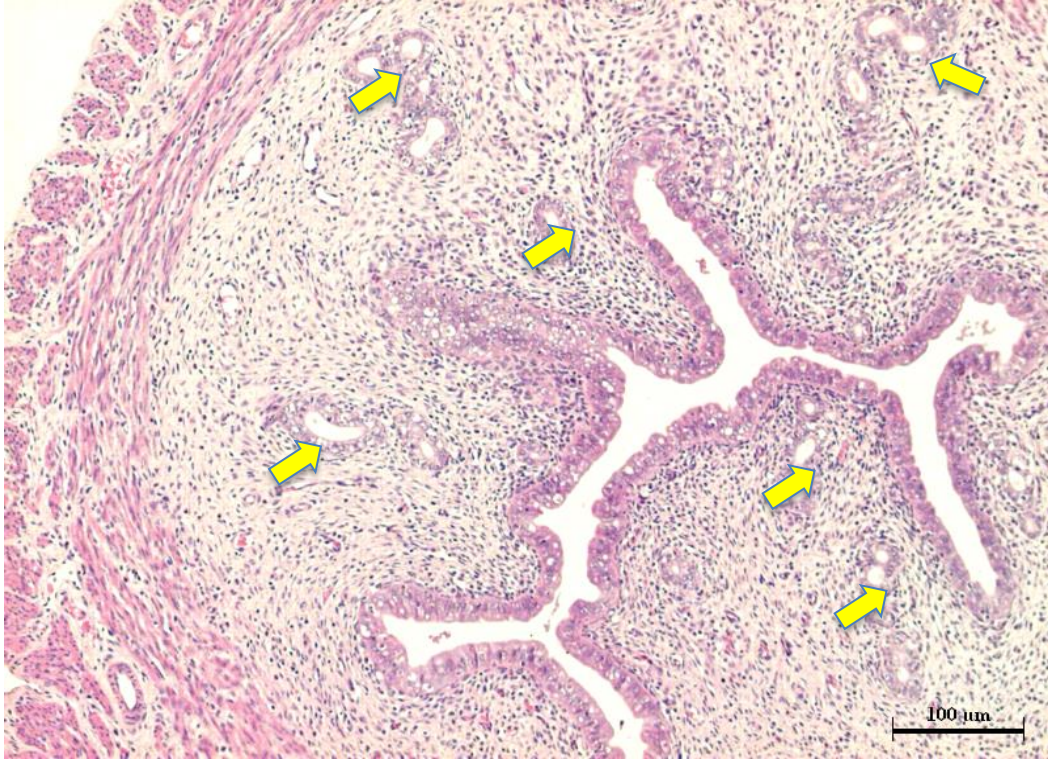
Şekil 4.60. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait uterus dokusunda dejenerasyon (→), (H&E boyama, 200X).



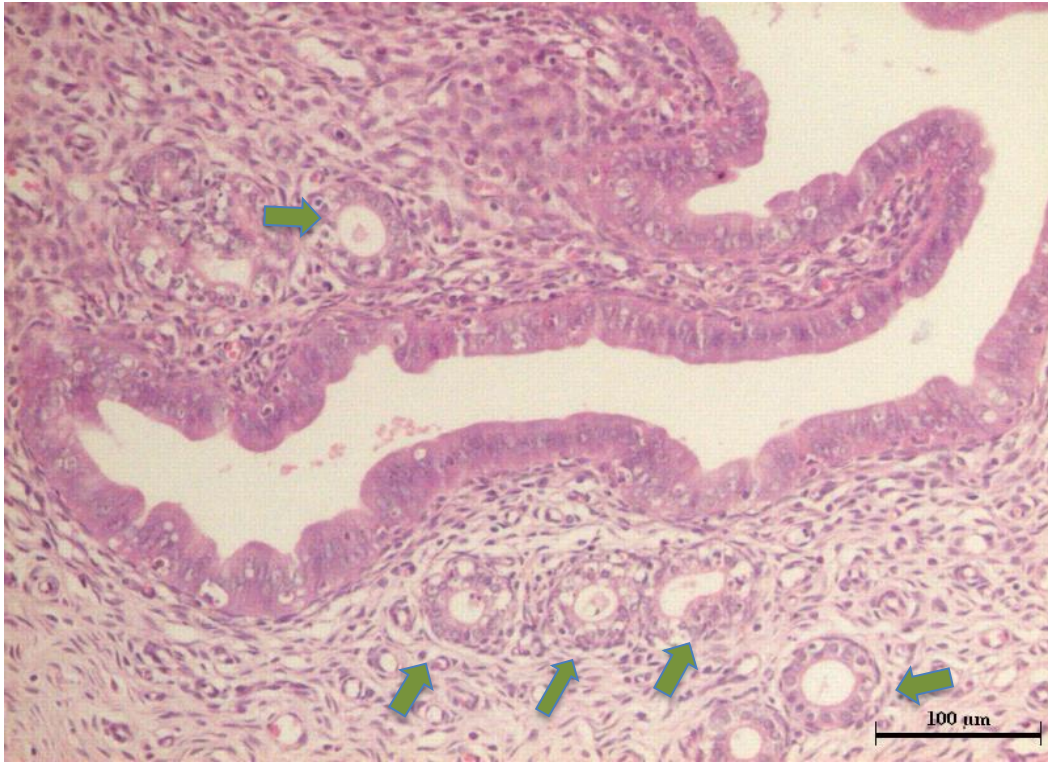
Şekil 4.61. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubuna ait uterus dokusunda salgı bezleri (→), (H&E boyama, 400X).



Şekil 4.62. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubuna ait uterus dokusunda salgı bezleri (→), (H&E boyama, 200X).



Şekil 4.63. 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin uygulama grubuna ait uterus dokusunda salgı bezleri (→), (H&E boyama, 100X)



Şekil 4.64. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin uygulama grubuna ait uterus dokusu salgı bezleri (→), (H&E boyama, 200X).

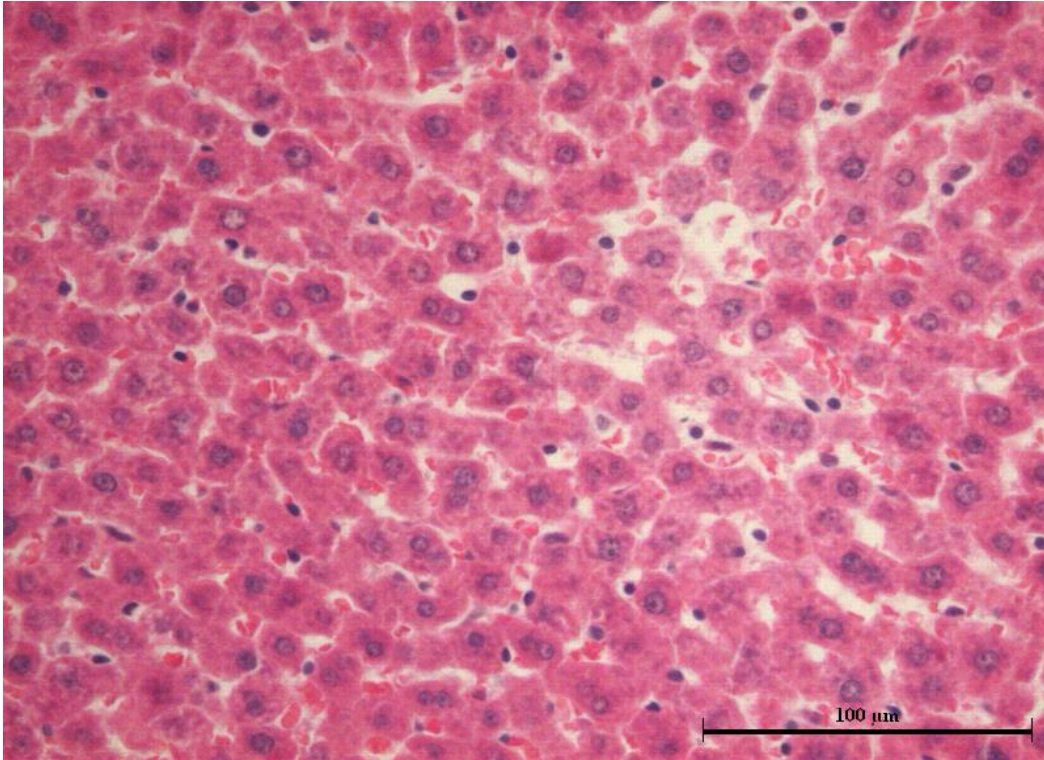
Çizelge 4.5. Kontrol ve uygulama gruplarına ait ovaryum dokularında tespit edilen kistik folikül, korpus luteum ve uterus dokularında tespit edilen salgı bezi sayısının insidansları.

BULGULAR	Kontrol grupları			Uygulama grupları		
	Yağ	BPA (50 mg/kg/gün)	TP (50 mg/kg/gün)	BPA (50mg/kg/gün) + Floretin(0,5mg/kg/gün)	BPA(50mg/kg/gün) + Floretin(5mg/kg/gün)	BPA(50mg/kg/gün) + Floretin(50mg/kg/gün)
KİSTİK FOLİKÜL	0,67±0,81	10±2,09 ^{a,c,e}	13,50±2,42 ^{a,b,d,e}	7,33±1,50 ^{a,c,f}	3,83±0,40 ^{a,b,c,d}	3,50±2,07 ^{b,c,d,e}
KORPUS LUTEUM SAYISI	5,67±2,80	1,67±1,03 ^{a,f}	2,00±1,09 ^{a,f}	3,00±0,89 ^f	4,83±1,47	7,33±3,01 ^{b,c,d}
SALGI BEZİ SAYISI	5,00±0,00	13,83±9,72	9,00±0,89 ^e	11,67±8,61 ^e	23,00±7,04 ^{a,c,d}	16,00±5,17

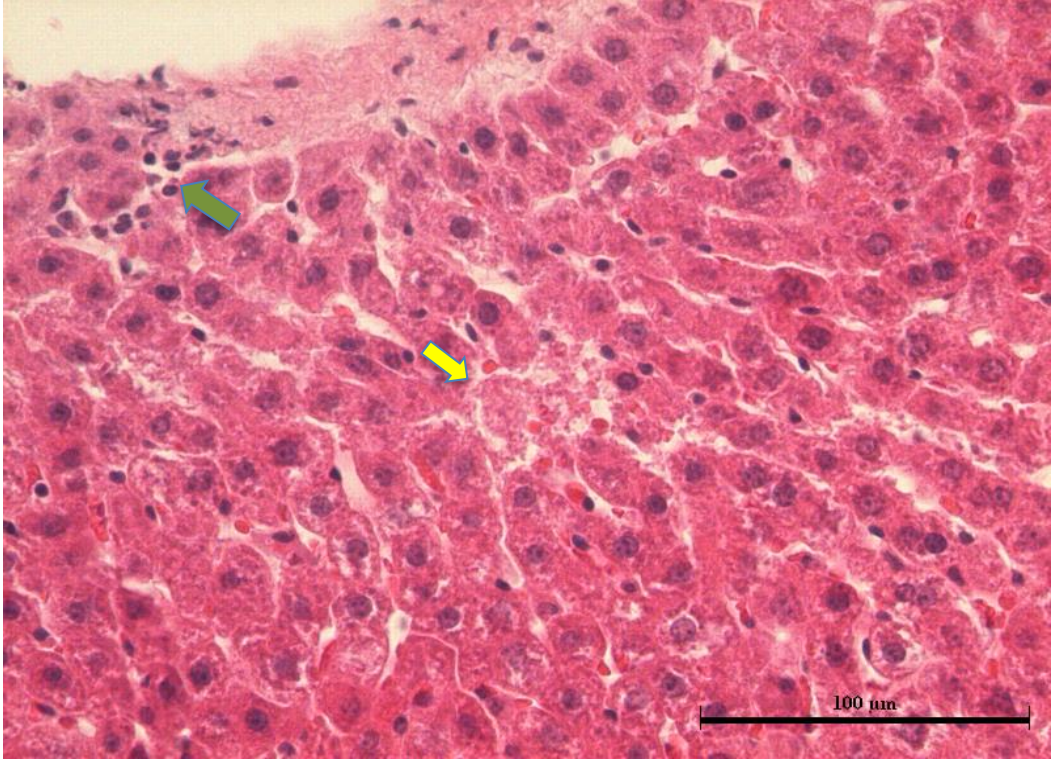
Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. ^aYağ kontrol grubundan, ^bBPA (50 mg/kg/gün) grubundan, ^cTP (50 mg/kg/gün) grubundan, ^dBPA 50 mg/kg/gün + Floretin 0,5 mg/kg/gün grubundan, ^eBPA 50 mg/kg/gün + Floretin 5 mg/kg/gün, ^fBPA 50 mg/kg/gün+Floretin (50mg/kg/gün) grubundan istatistiksel olarak farklı (Önemlilik düzeyi p≤0,05)

4.6.3. Karaciğer Dokusuna Ait Bulgular

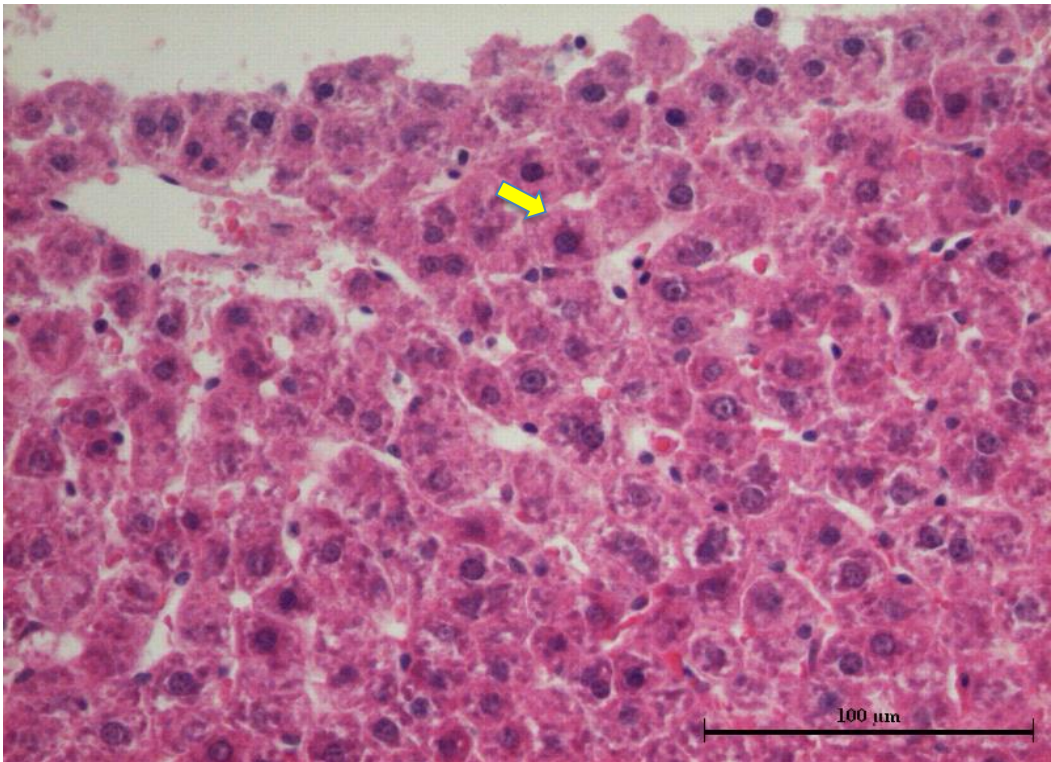
Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü Şekil 4.65’de gösterilmiştir. BPA (50 mg/kg/gün) pozitif kontrol grubunda, konjesyon, sinüzoidal genişleme, mononükleer hücre infiltrasyonu görülmüştür. Uygulama grubu olan 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubunda ise histopatolojik bulgular en az seviyede tespit edilmiştir.



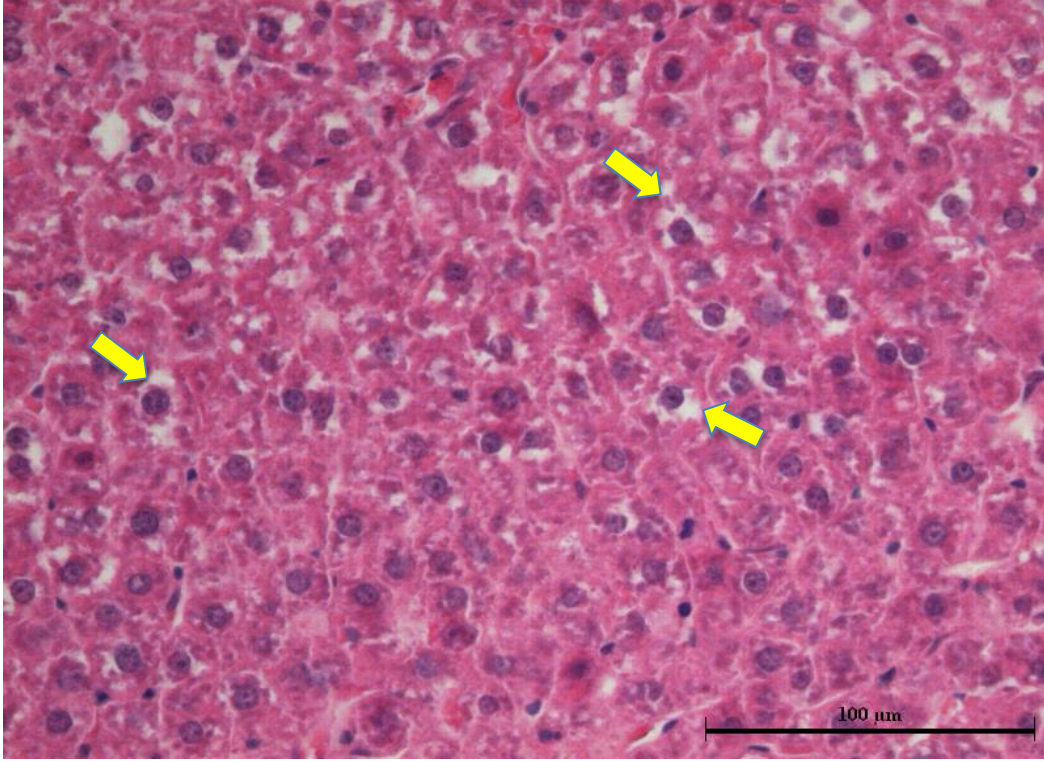
Şekil 4.65. Yağ kontrol grubuna ait karaciğer dokusu genel görünümü (H&E boyama, 400X).



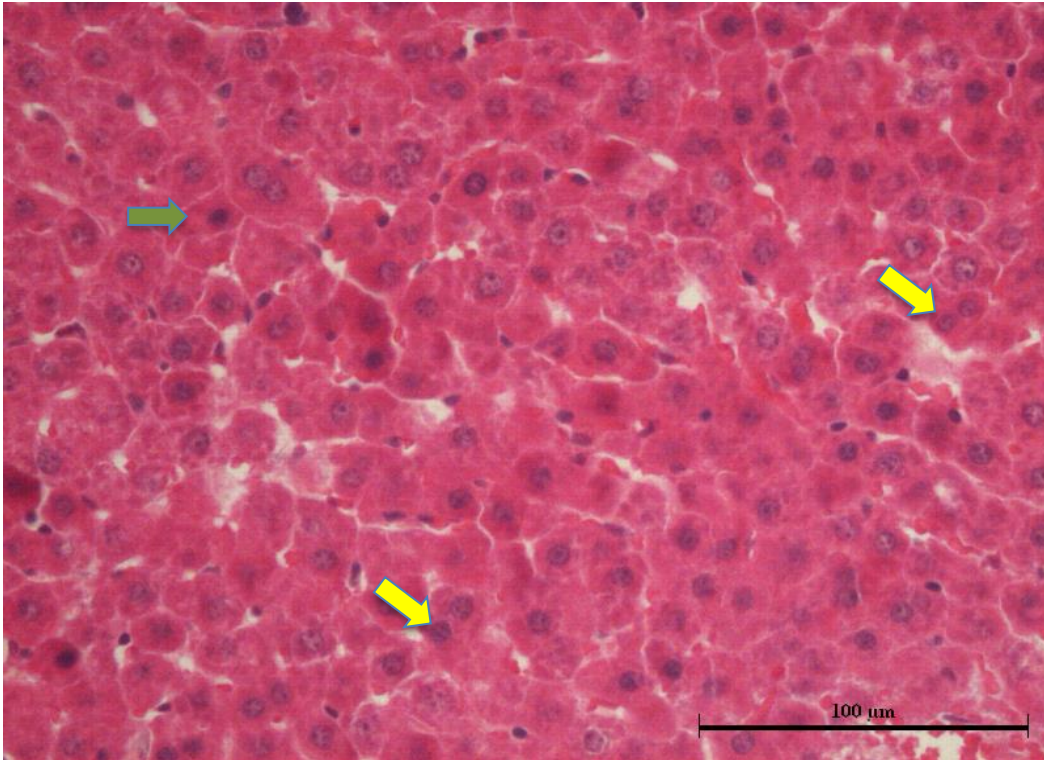
Şekil 4.66. BPA pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda hücresel dejenerasyon (→) ve kupfer hücrelerinde artış (→), (H&E boyama, 400X).



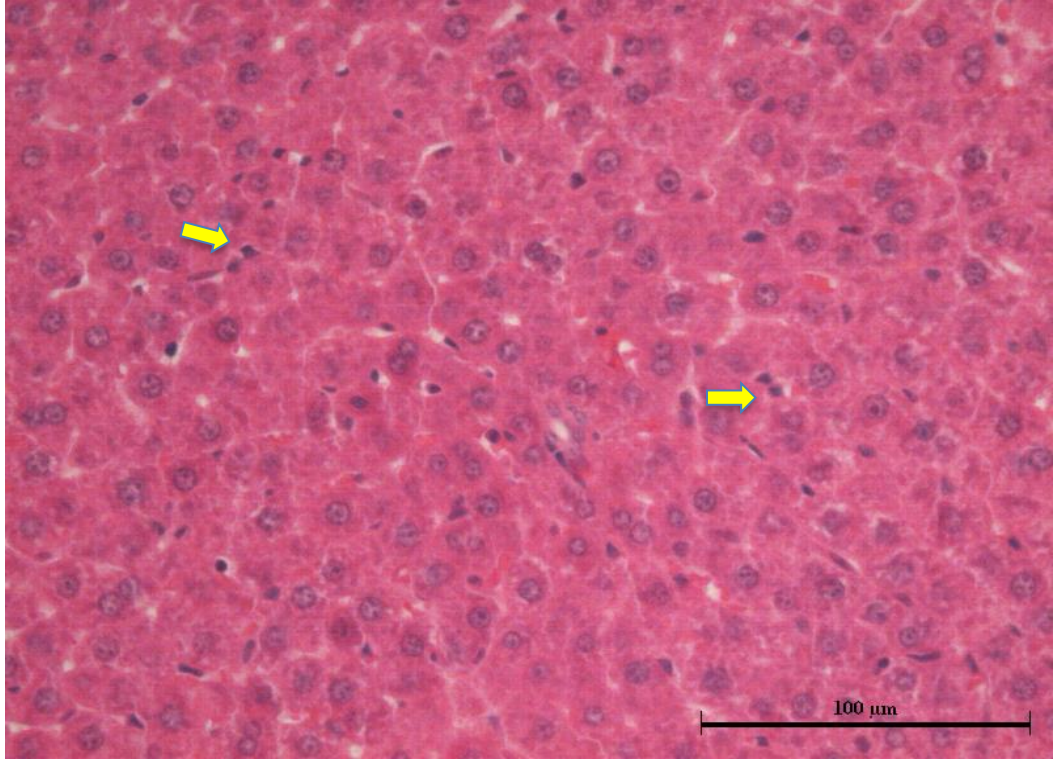
Şekil 4.67. BPA pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda hepatositlerde balonlaşma (→), (H&E boyama, 400X).



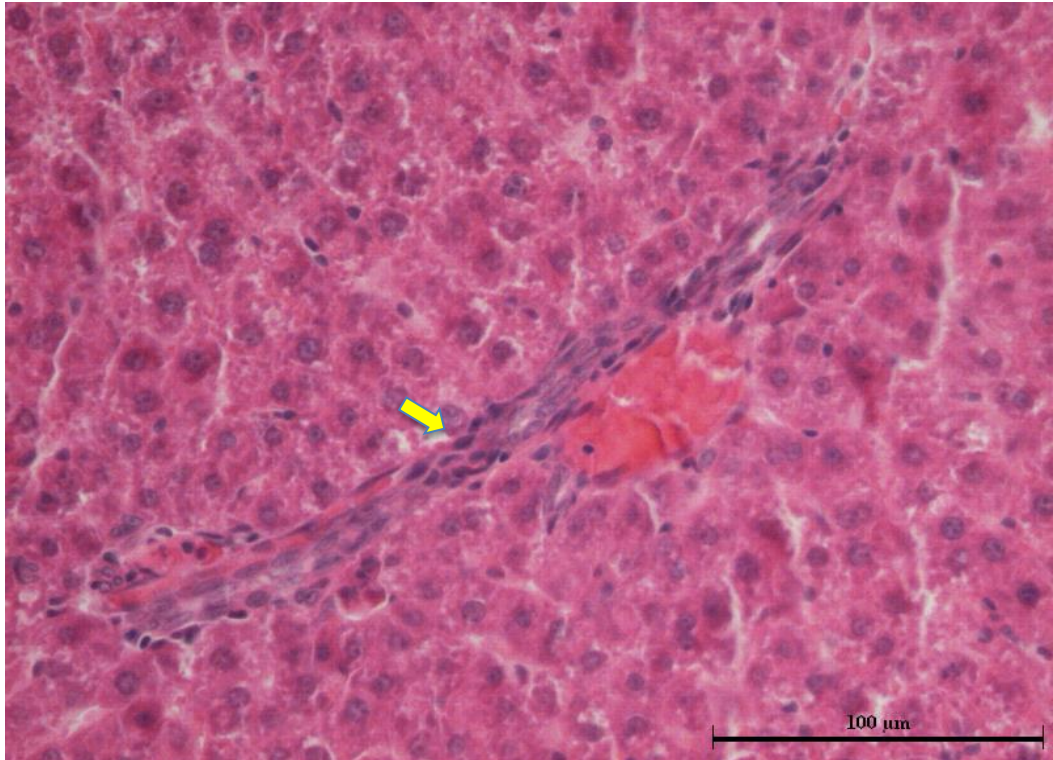
Şekil 4.68. BPA pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda sitoplazmik erime (→), (H&E boyama, 400X).



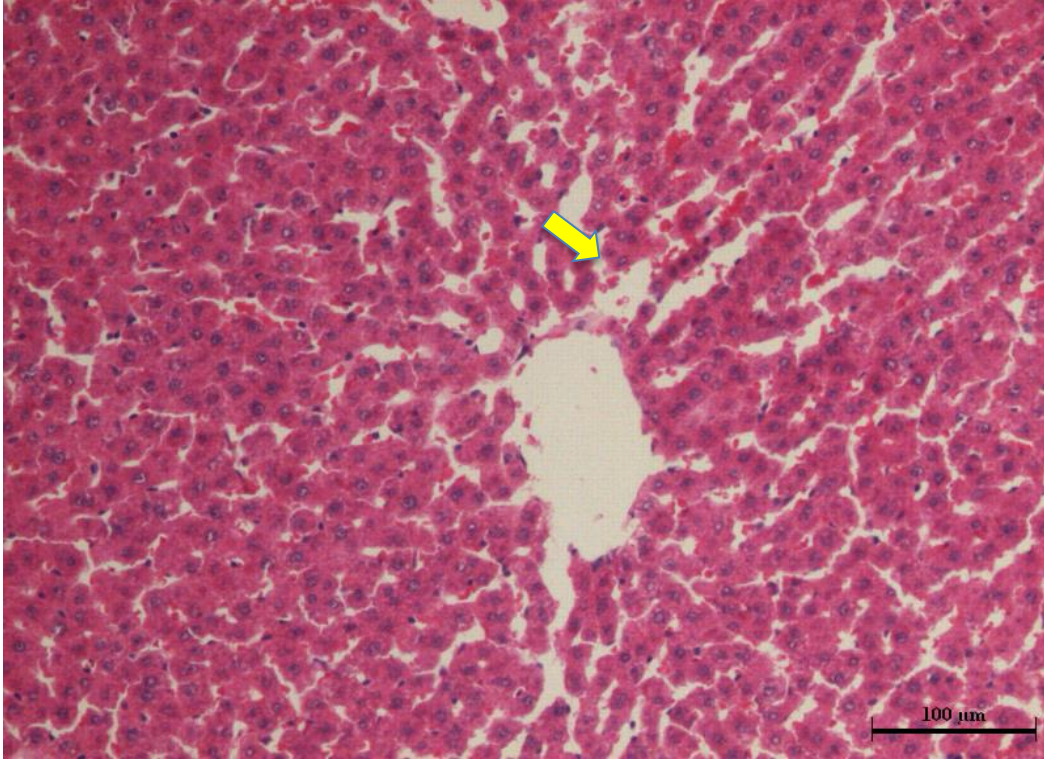
Şekil 4.69. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda binükleer çekirdekli hücreler (→) ve kondanse olmuş çekirdekler (→), (H&E boyama, 400X).



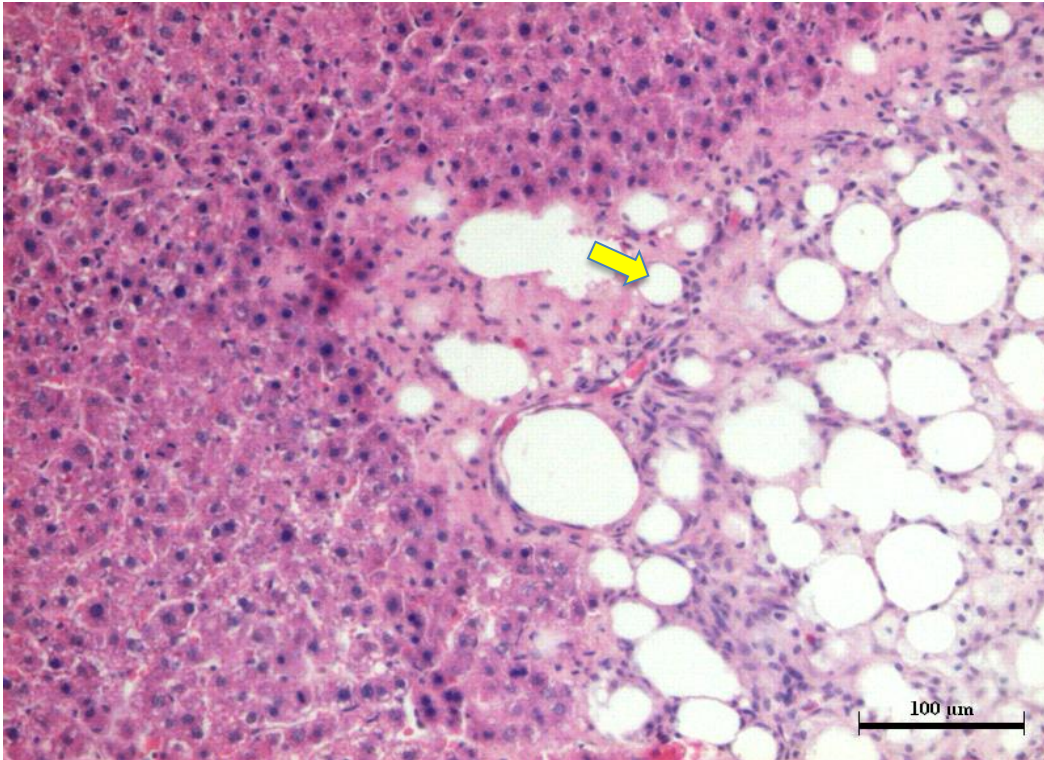
Şekil 4. 70. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusu kupfer hücrelerinde artış (→), (H&E boyama, 400X).



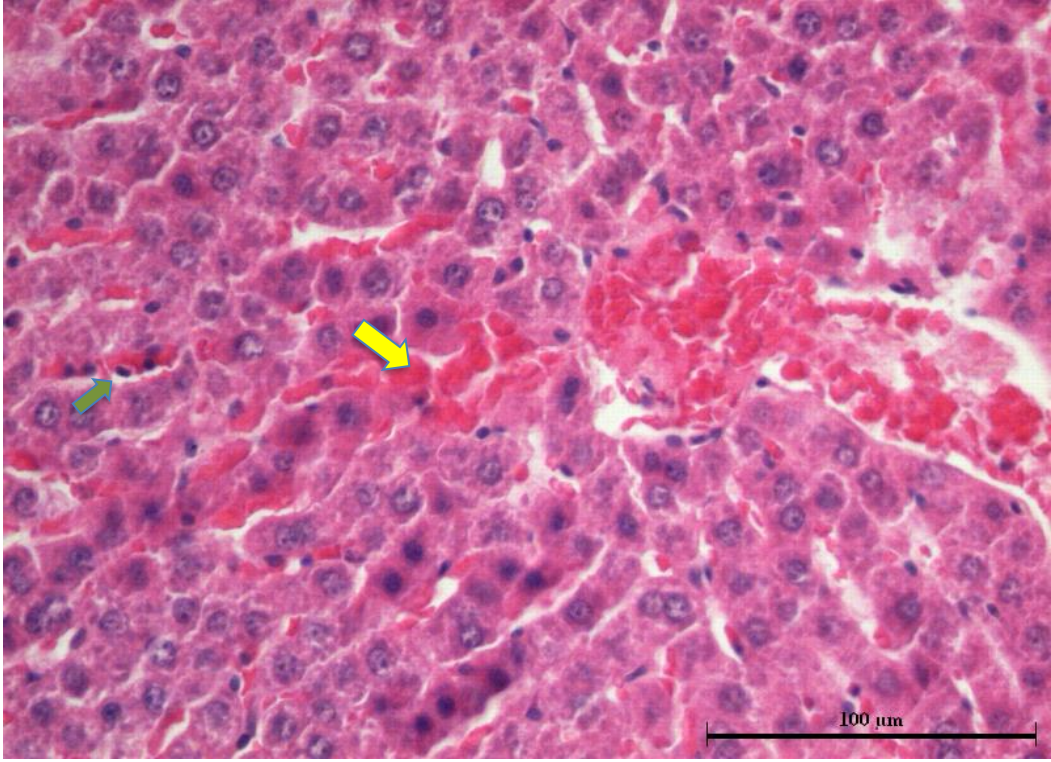
Şekil 4.71. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (→), (H&E boyama, 400X).



Şekil 4.72. 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda karaciğer dokusunda sinüzoidal genişleme (→), (H&E boyama, 200X).



Şekil 4.73. 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda karaciğer dokusunda yağlı nekroz (→), (H&E boyama, 200X).



Şekil 4.74. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda karaciğer dokusunda konjesyon (→) ve kondanse olmuş çekirdekler (→) (H&E boyama, 400X).

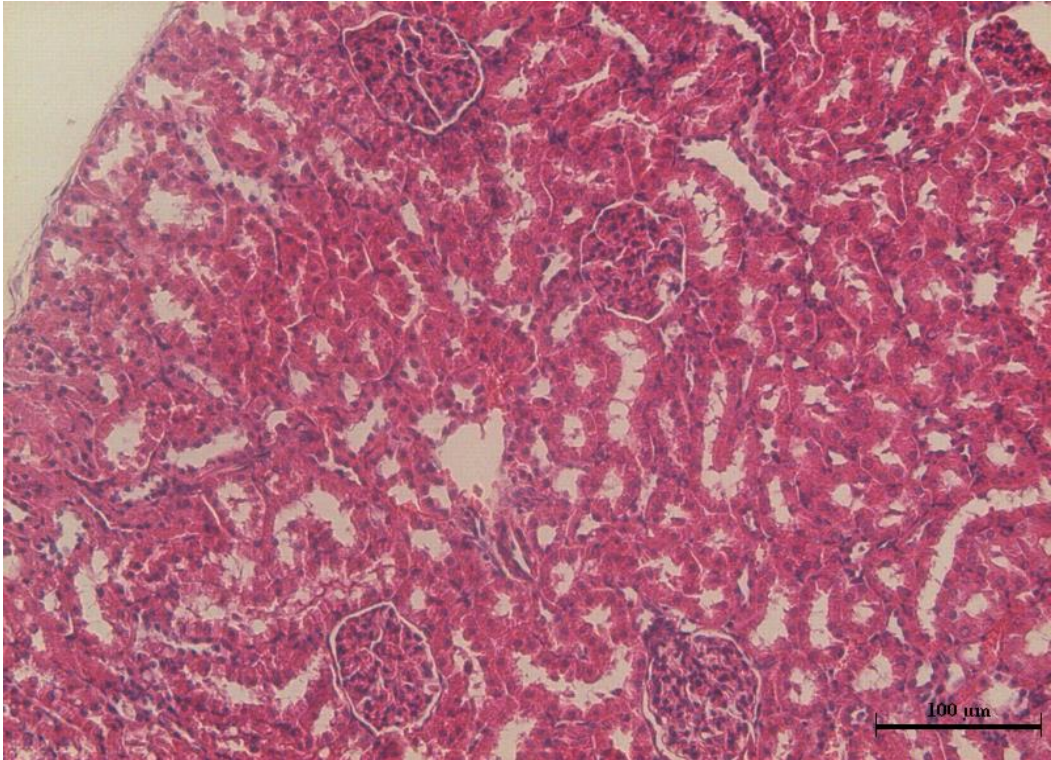
Çizelge 4.6.Kontrol ve uygulama gruplarına ait karaciğer dokusunda tespit edilen histopatolojik bulguların insidansları.

	Kontrol grupları		Uygulama grupları		
	Yağ	BPA (50 mg/kg/gün)	TP (50 mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin (0,5 mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin (50 mg/kg/gün)
Konjesyon	0/6	4/6*	0/6	1/6	1/6
Sinüzoidal Genişleme	0/6	4/6*	1/6	5/6*	3/6
Ödem	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6
Hepatik Parankimada Dejenerasyon	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6
Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	1/6	2/6	1/6	0/6	0/6
Hepatositlerde Balonlaşma	0/6	4/6*	0/6	1/6	0/6
Sitoplazmik erime	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
Yağlanma	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6

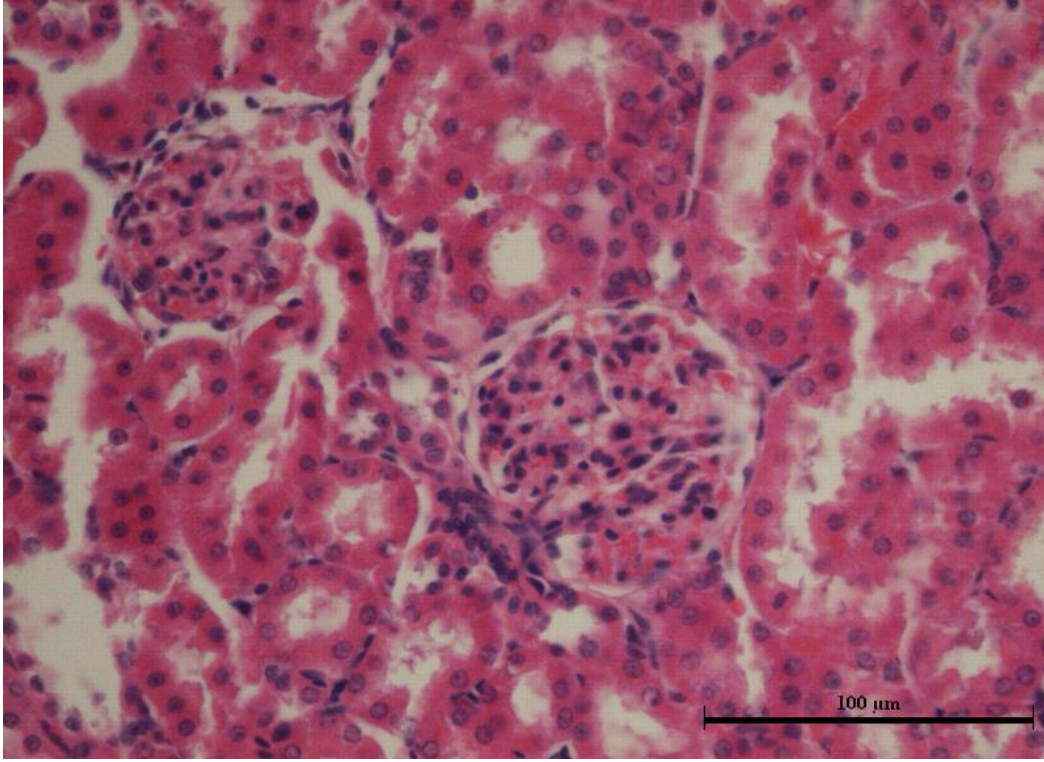
Değerler histopatolojik bulgu gözlenen sıçan/grupta incelenen sıçan sayısı şeklinde verilmiştir. * yağ kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı, (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).

4.6.4. Böbrek Dokusuna Ait Bulgular

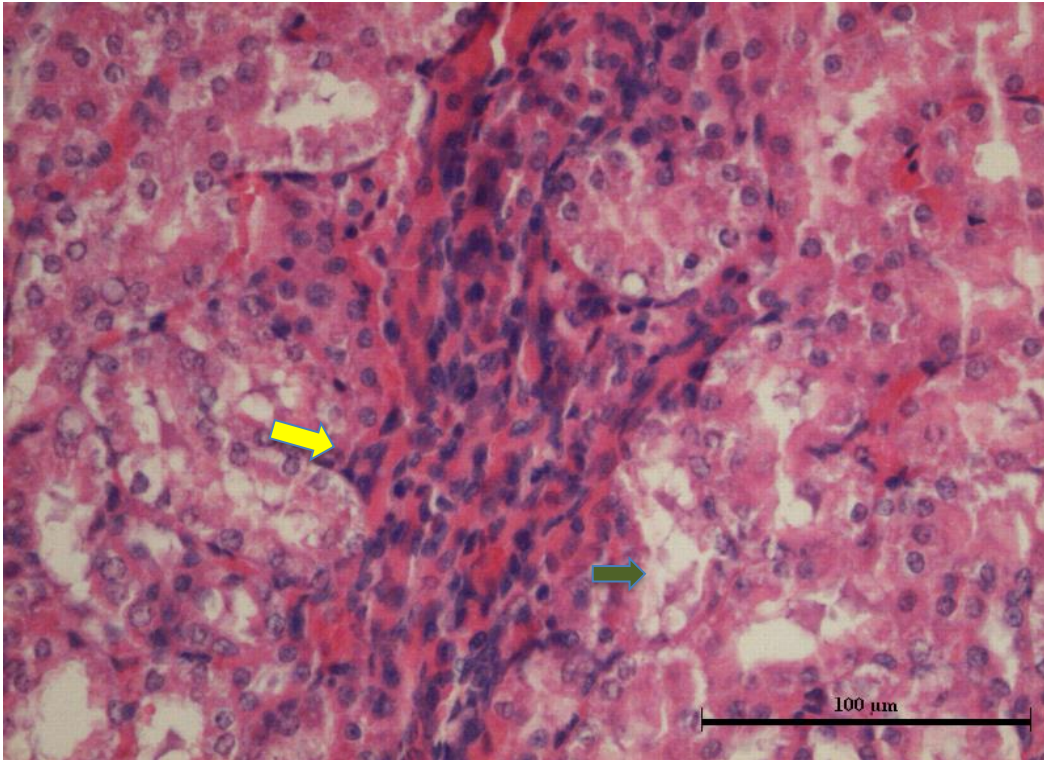
Kontrol grubu böbrek dokusuna ait histolojik görüntüler Şekil 4.75 ve 4.76'da verilmiştir. BPA (50 mg /kg/gün) grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 4.77), tübüler dejenerasyon (Şekil 4.77); TP (50 mg /kg/gün) grubunda, glomerular atrofi (Şekil 4.79), konjesyon (Şekil 4.79-80) verilmiştir. Uygulama gruplarında en çok Bowman kapsülünde genişleme, konjesyon ve glomerular atrofi tespit edilmiştir.



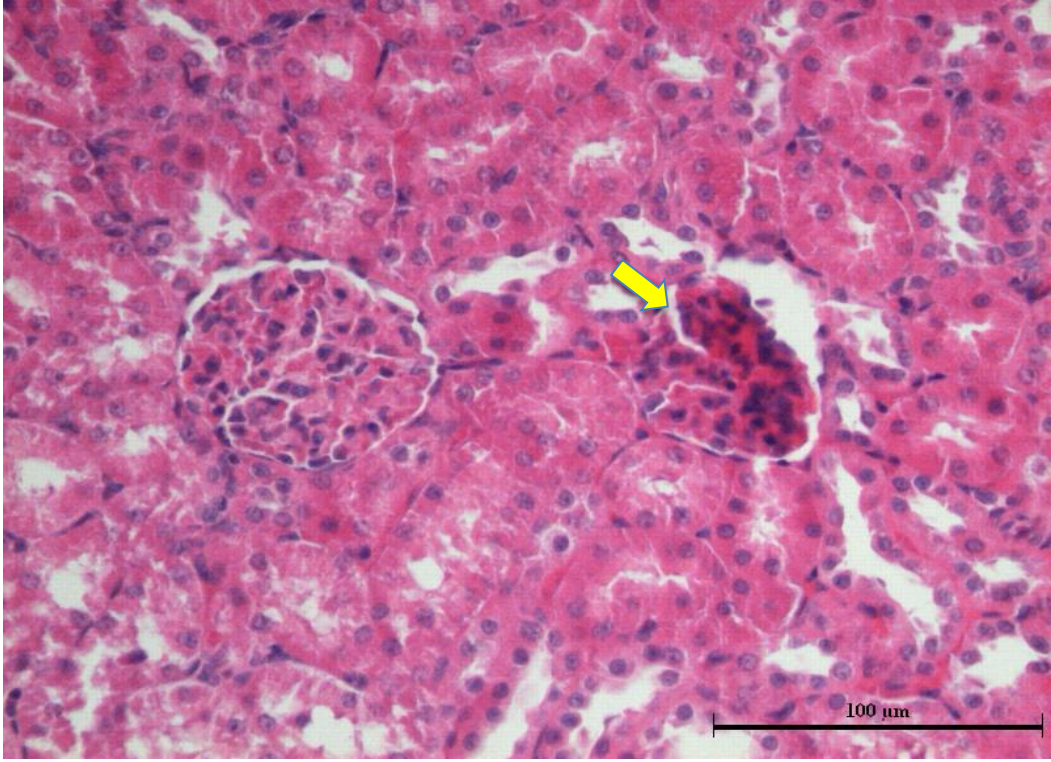
Şekil 4.75. Yağ kontrol grubuna ait böbrek dokusunda normal görünüm (H&E boyama, 200X).



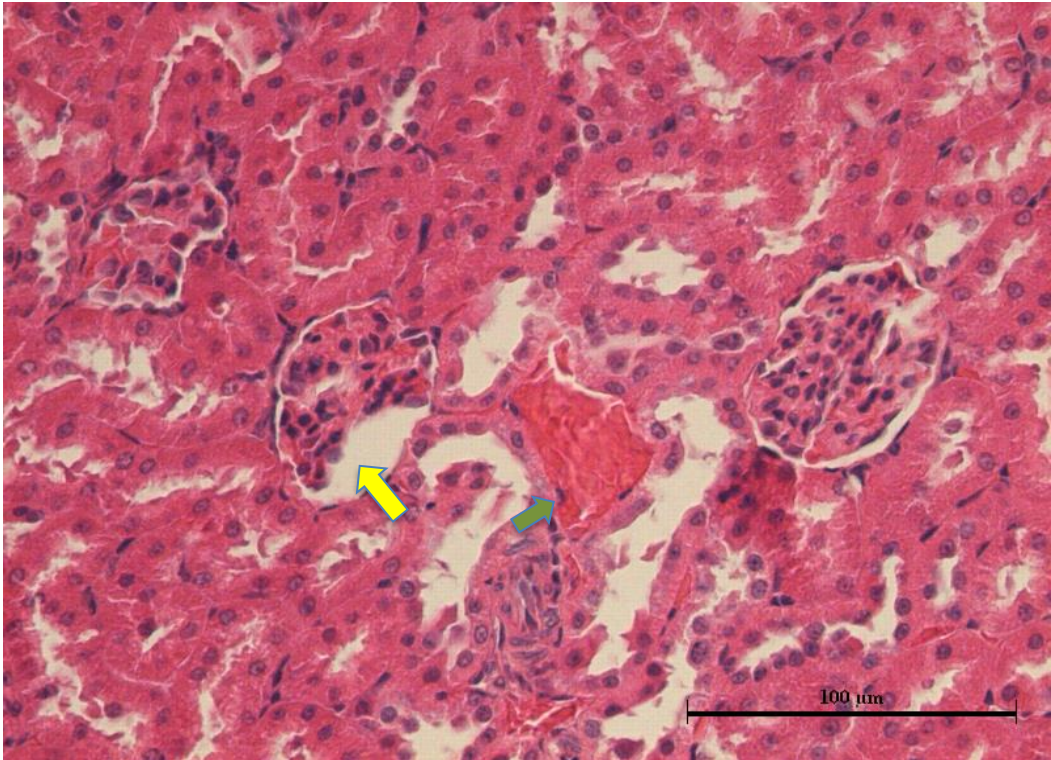
Şekil 4.76. Yağ kontrol grubuna ait böbrek dokusu normal görünümü, (H&E boyama, 400X).



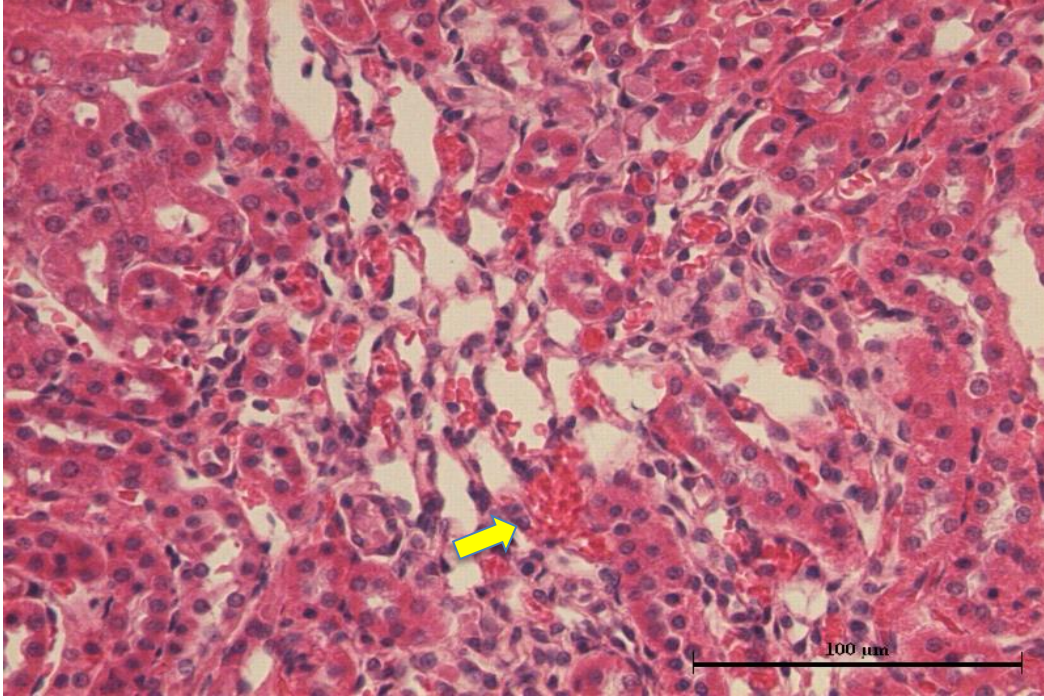
Şekil 4.77. BPA pozitif kontrol grubuna ait böbrek dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (→) ve tübüler dejenerasyon (→), (H&E boyama, 400X).



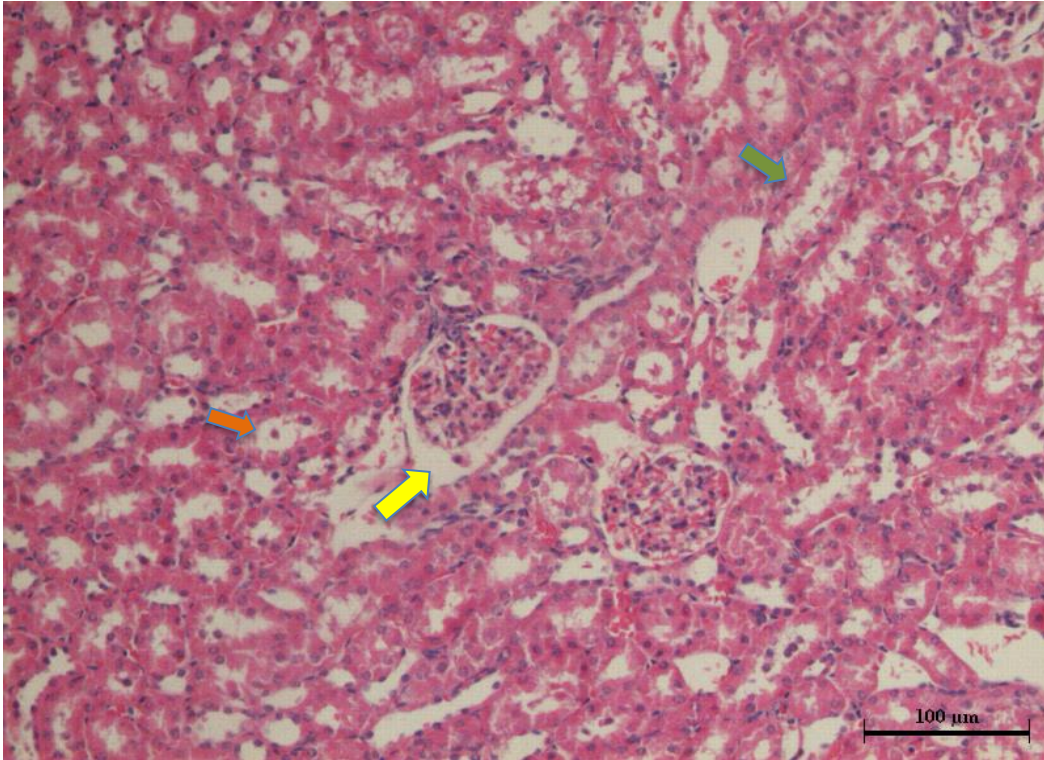
Şekil 4.78. BPA pozitif kontrol grubuna ait böbrek dokusunda Bowman Kapsülünde genişleme (→), (H&E boyama, 400X).



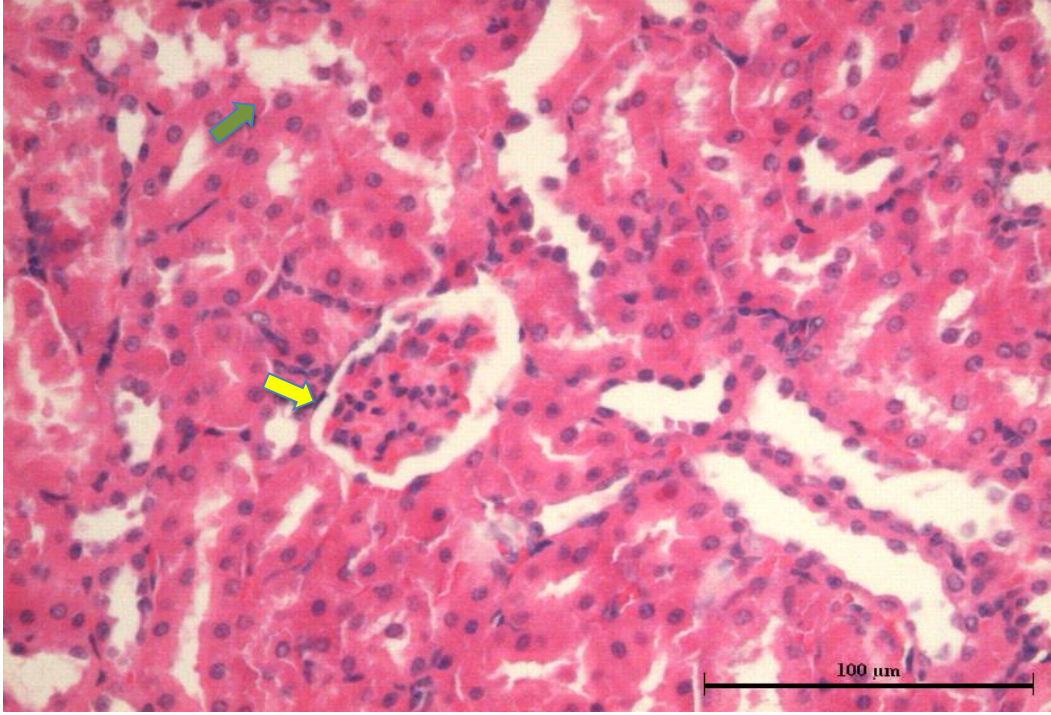
Şekil 4.79. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait böbrek dokusunda Bowman Kapsülünde genişleme (→) ve konjesyon (→), (H&E boyama, 400X).



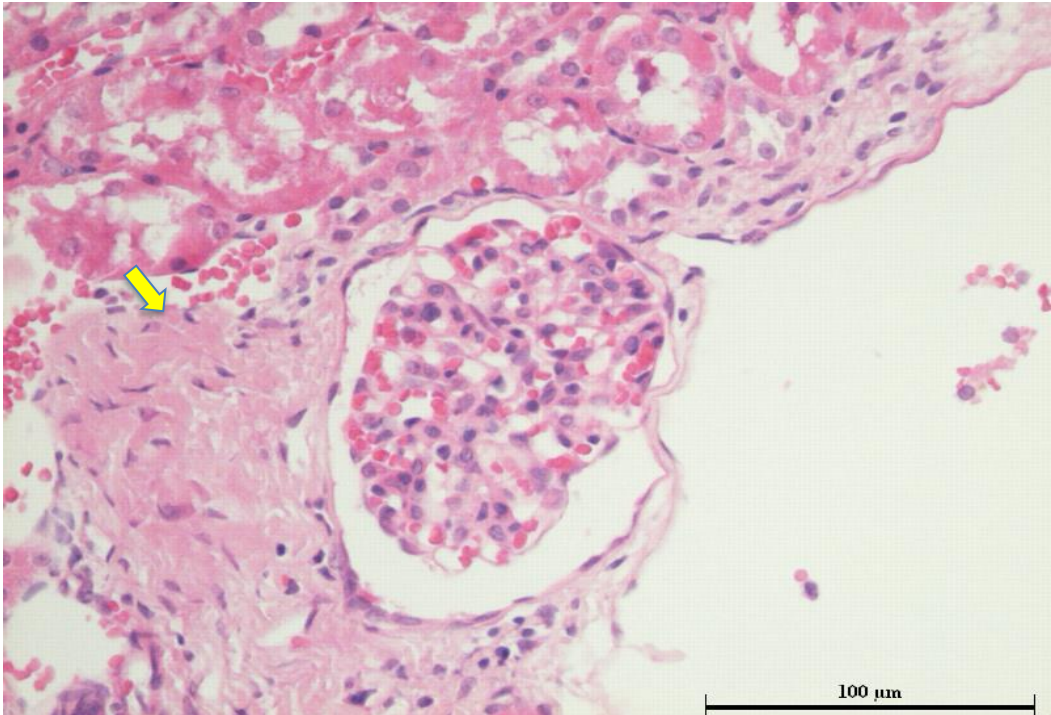
Şekil 4.80. Testosteron propiyonat pozitif kontrol grubuna ait böbrek dokusunda konjesyon (→), (H&E boyama, 400X).



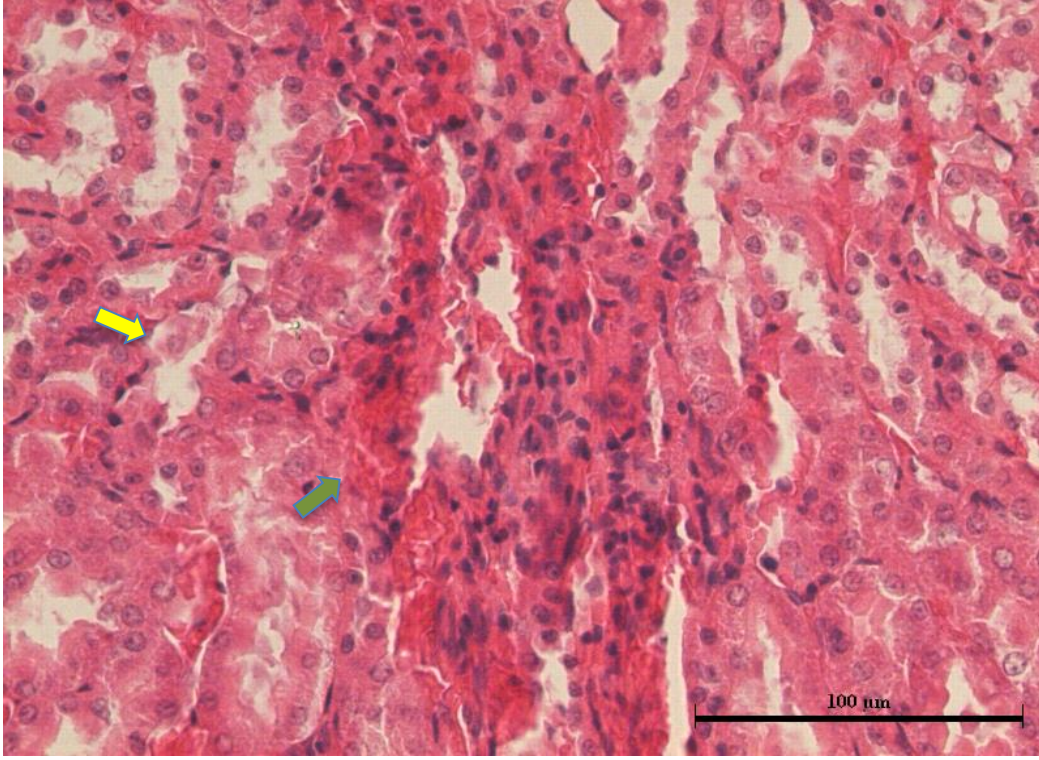
Şekil 4.81. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda Bowman kapsülünde genişleme (→), tübüler dejenerasyon (→) ve lümeneye atılmış hücre çekirdekleri (→), (H&E boyama, 200X).



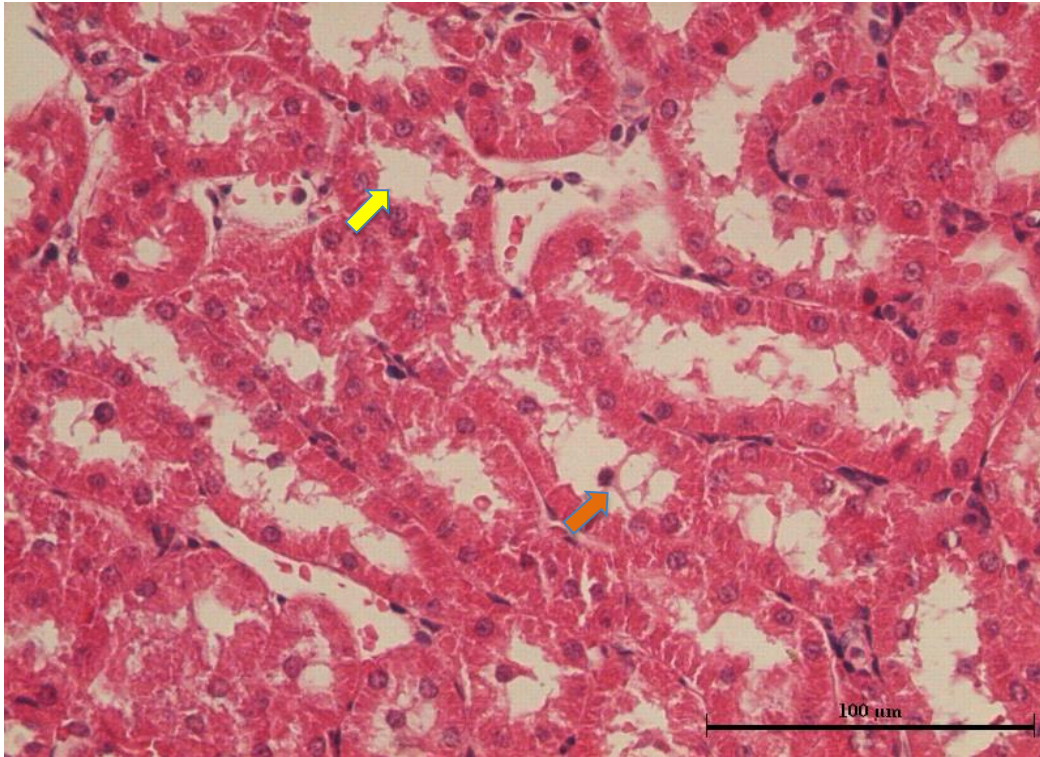
Şekil 4.82. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda Bowman kapsülünde genişleme (⇨) ve tübüler dejenerasyon (⇨), (H&E boyama, 400X).



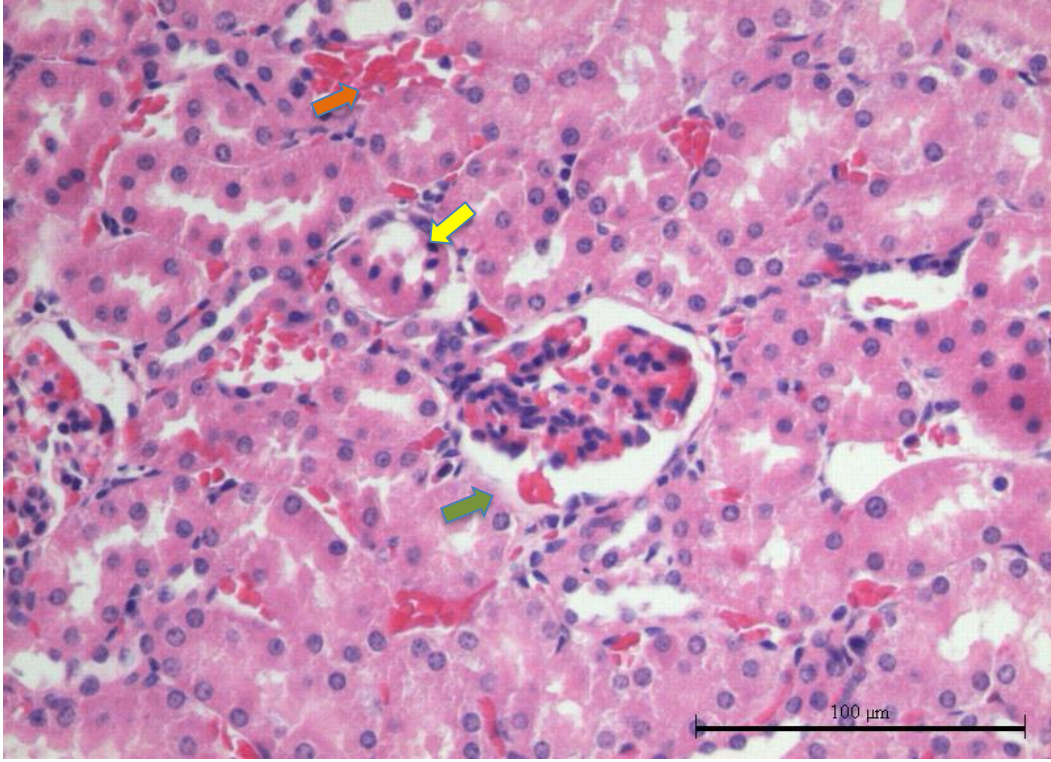
Şekil 4.83. 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda fibröz doku oluşumu (⇨), (H&E boyama, 400X).



Şekil 4.84. 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon (→),konjesyon (→),(H&E boyama, 400X)



Şekil 4.85. 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda tübüler dejenerason (→) ve lümene atılan hücreler (→) (H&E boyama,400X).



Şekil 4.86. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda böbrek dokusunda tübüler dejenerasyon (→), Bowman kapsülünde genişleme (→) ve konjesyon (→) (H&E boyama, 400x)

Çizelge 4.7. Kontrol ve uygulama gruplarına ait böbrek dokularında tespit edilen histopatolojik bulguların insidansları.

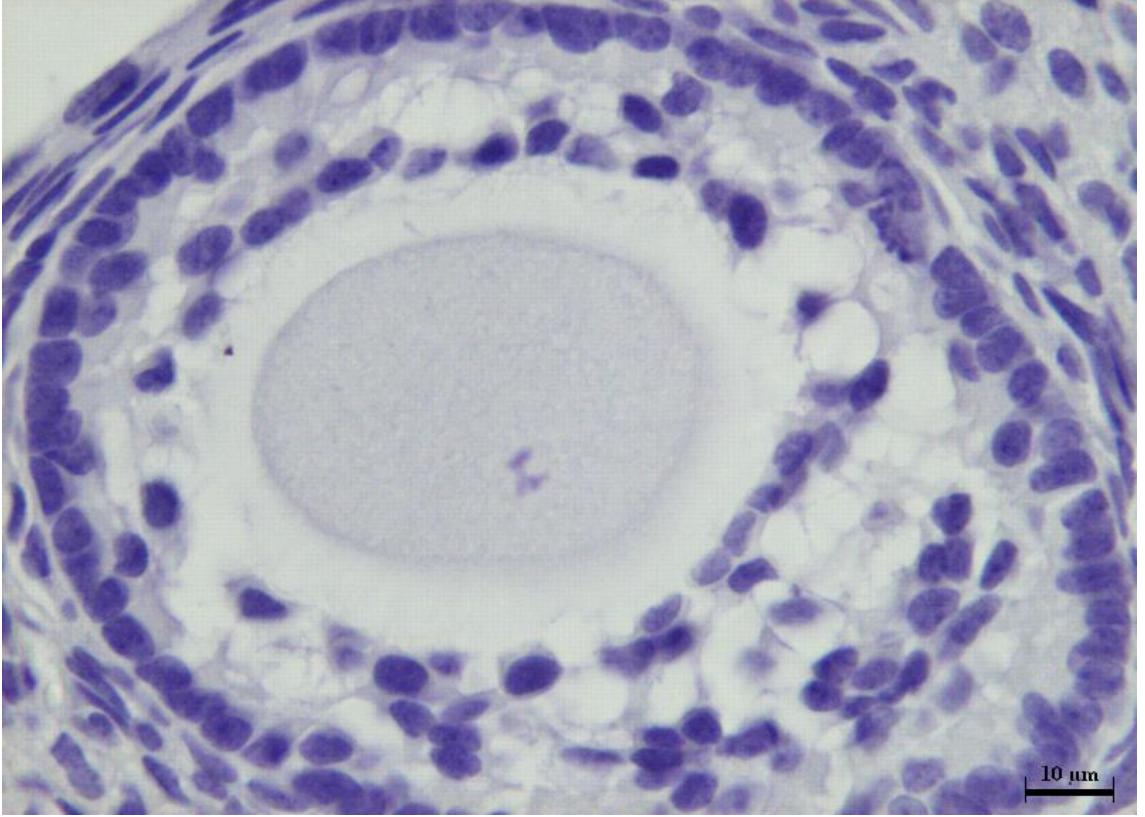
	Kontrol grupları			Uygulama grupları		
	Yağ	BPA (50 mg/kg/gün)	TP (50 mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin(0,5mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin(5mg/kg/gün)	BPA (50 mg/kg/gün) + Floretin(50mg/kg/gün)
Bowman Kapsülünde Genişleme	1/6	1/6	2/6	6/6*	2/6	4/6*
Tübüler Dejenerasyon	0/6	5/6*	2/6	3/6	4/6*	4/6*
Konjesyon	0/6	3/6	1/6	3/6	4/6*	3/6
Lümen Hücre Atılması	0/6	3/6	1/6	1/6	1/6	2/6
Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	0/6	1/6	2/6	2/6	1/6	2/6
Fibröz Doku Oluşumu	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6	2/6

Değerler histopatolojik bulgu gözlenen sıçan/grupta incelenen sıçan sayısı şeklinde verilmiştir. * yağ kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı, (Önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$).

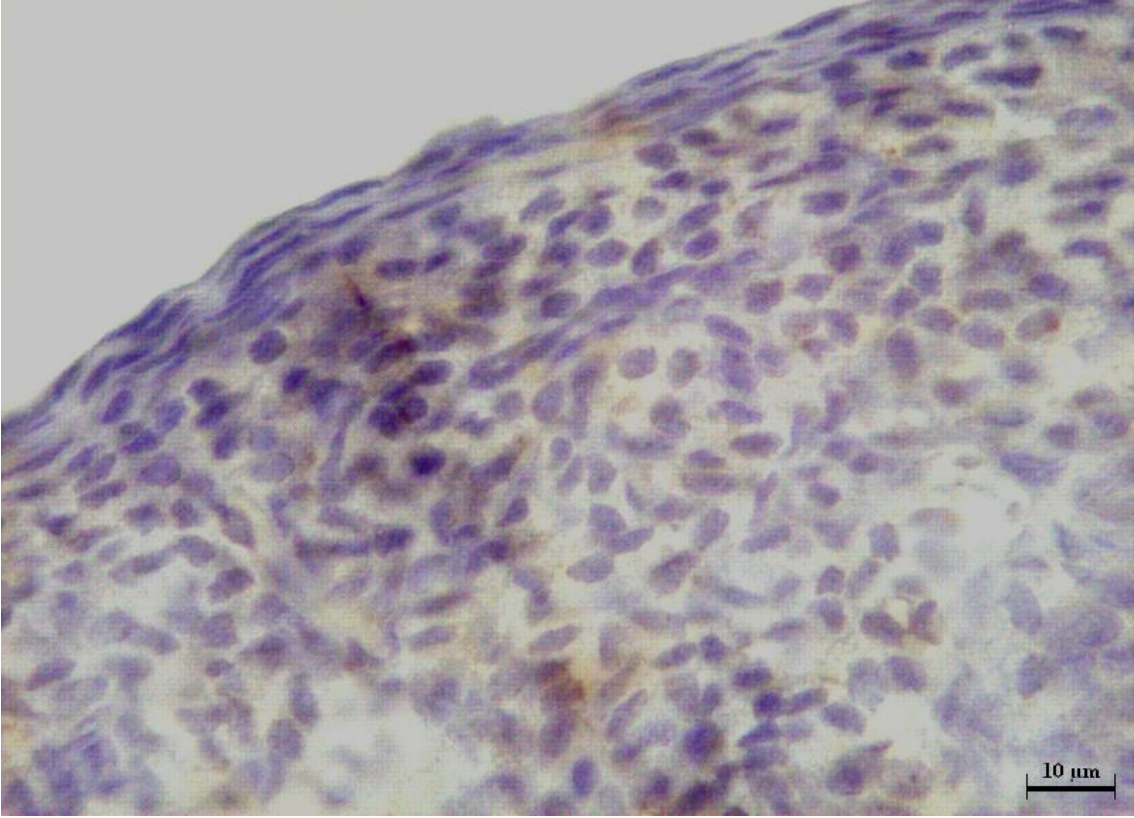
4.7. İmmünohistokimyasal Analiz Sonuçları

Ovaryum dokularında yapılan immünohistokimyasal boyamalardan CYP11A1 Şekil 4.87-Şekil 4.92 arasında gösterilmiştir. Bir diğer antikor olan CYP17A1 ise Şekil 4.93-Şekil 4.98 arasında gösterilmiştir. CYP11A1 ve CYP17A1'in pozitif kontrol gruplarında daha yoğun boyandığı görülmüştür.

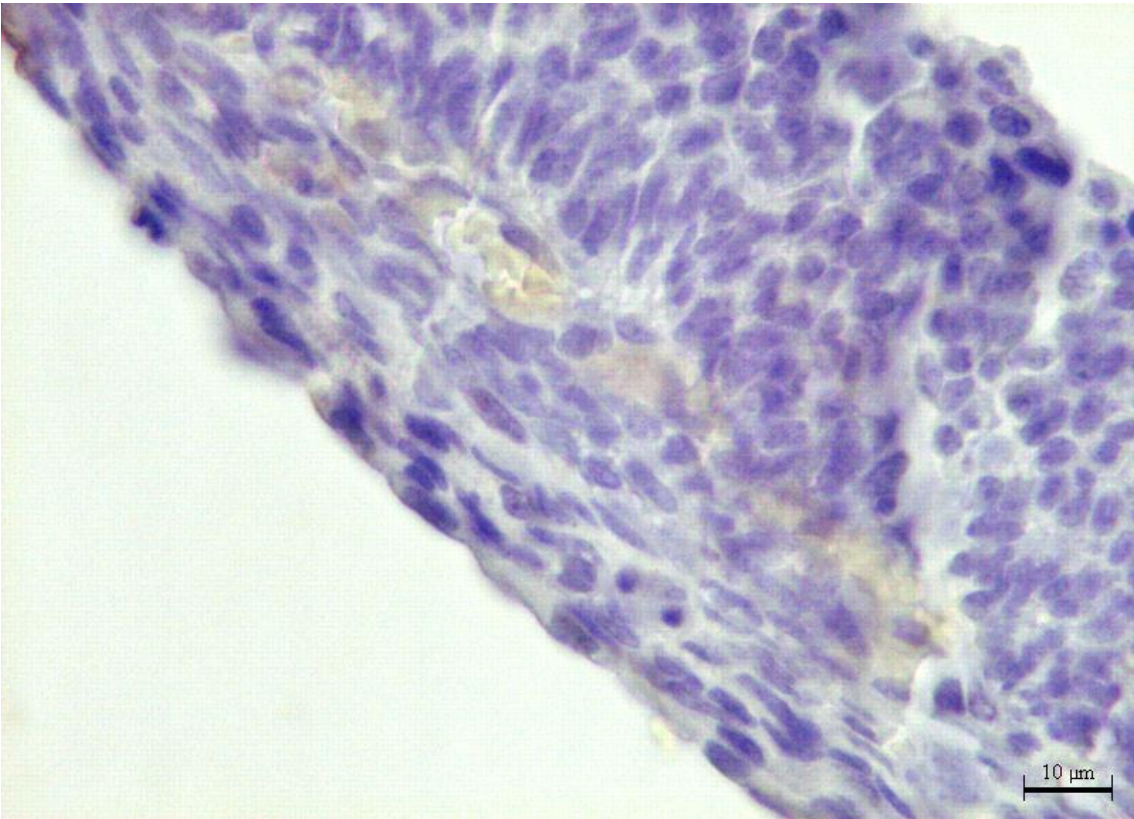
4.7.1. CYP11A1 Boyanması



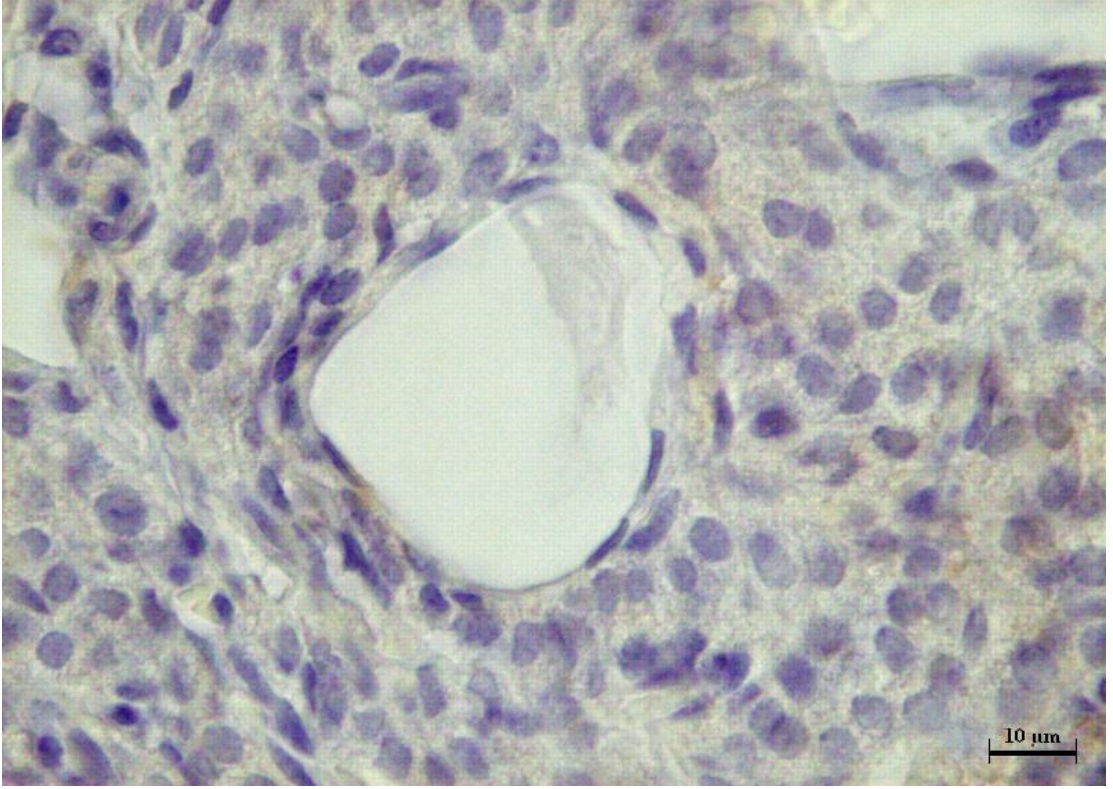
Şekil 4.87. Yağ kontrol grubuna ait CYP11A1 boyanması, (1000X).



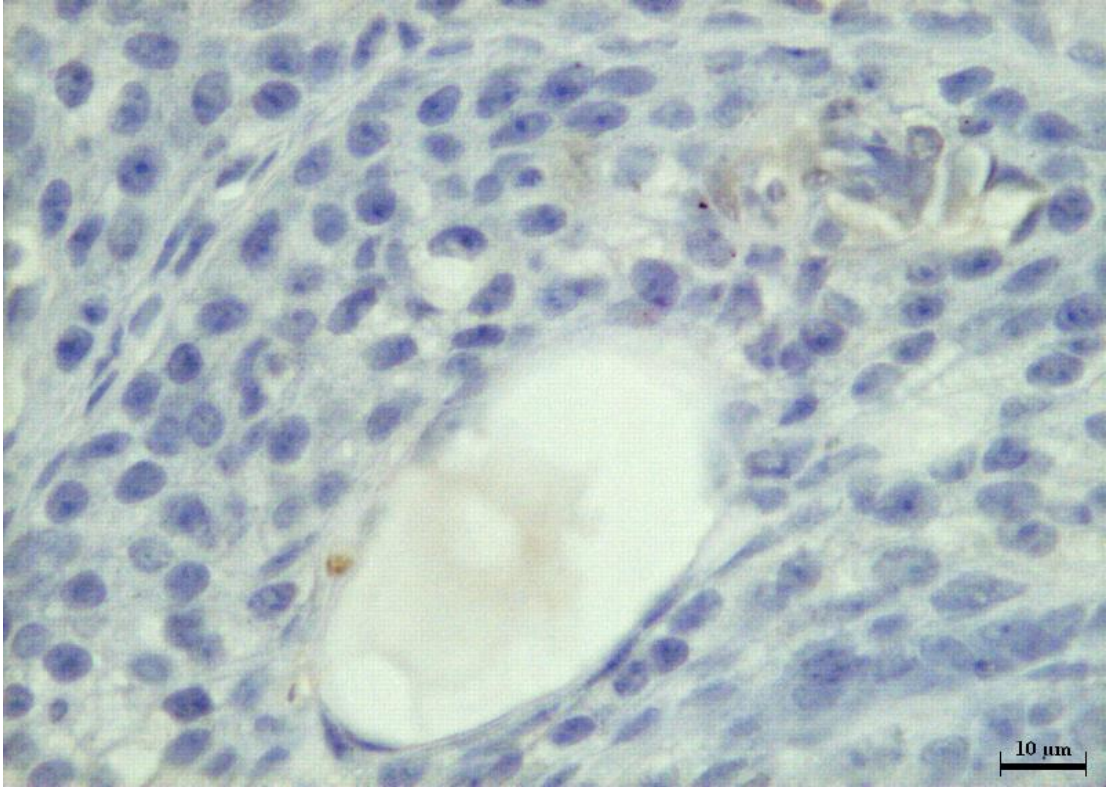
Şekil 4.88. Pozitif kontrol grubu BPA'ya ait CYP11A1 boyanması, (1000X).



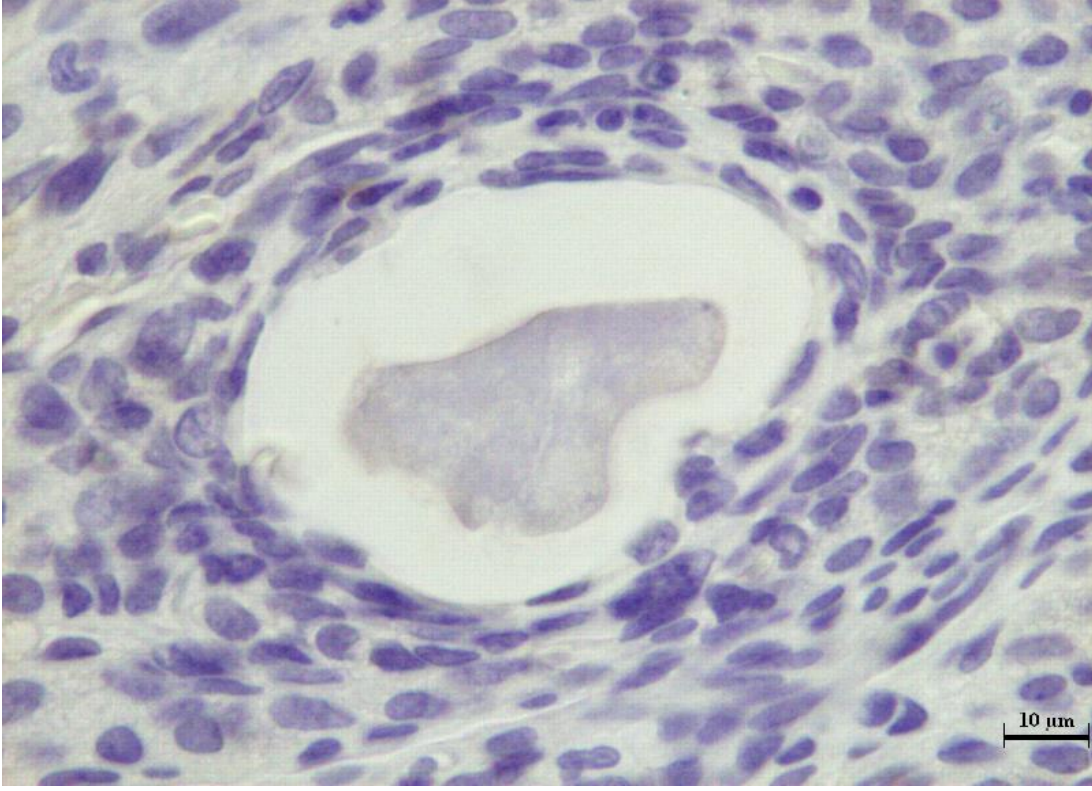
Şekil 4.89. Pozitif kontrol grubu TP'ye ait CYP11A1 boyanması, (1000X).



Şekil 4.90. 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP11A1 boyanması, (1000X).

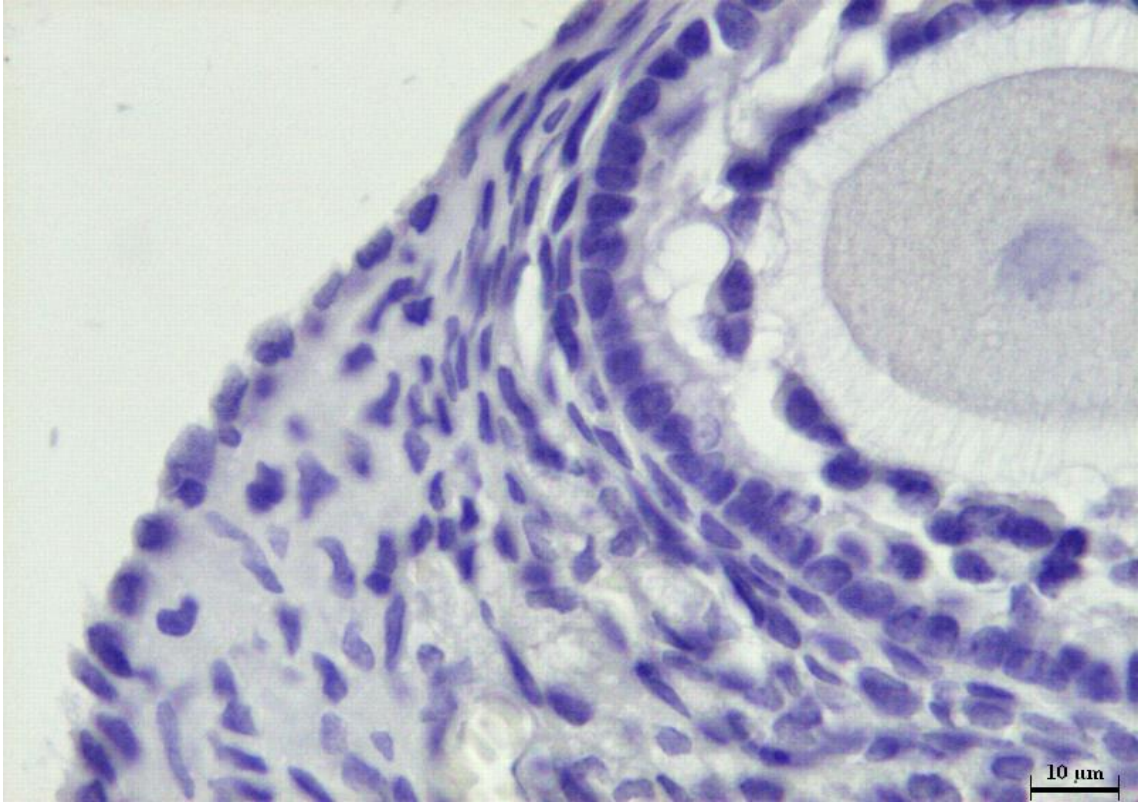


Şekil 4.91. 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP11A1 boyanması, (1000X).

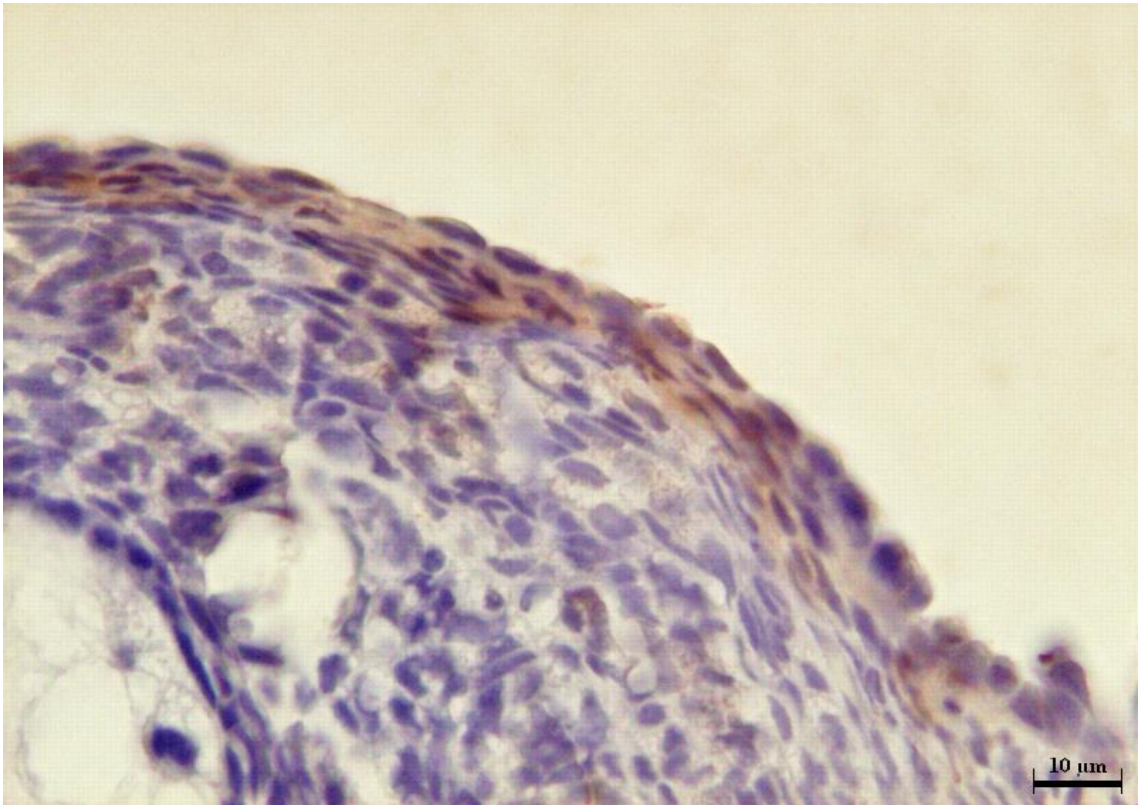


Şekil 4.92. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP11A1 boyanması, (1000X).

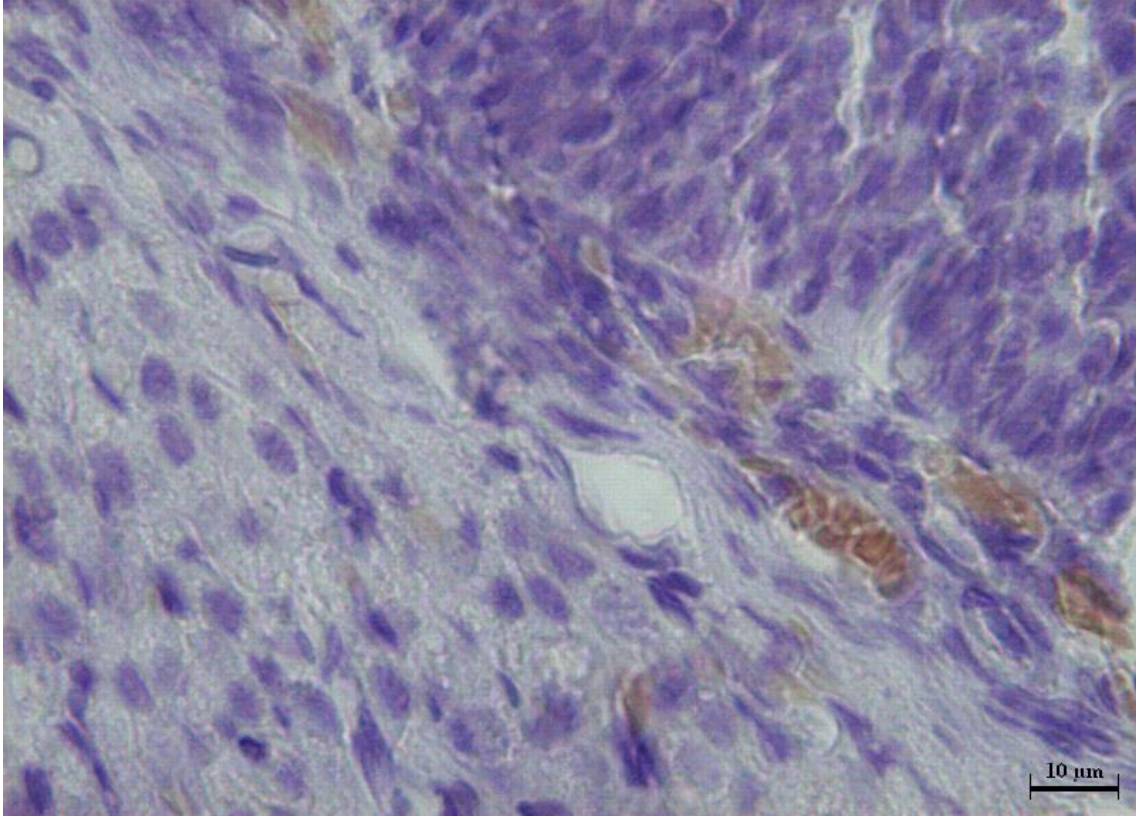
4.7.2. CYP17A1 Boyanması



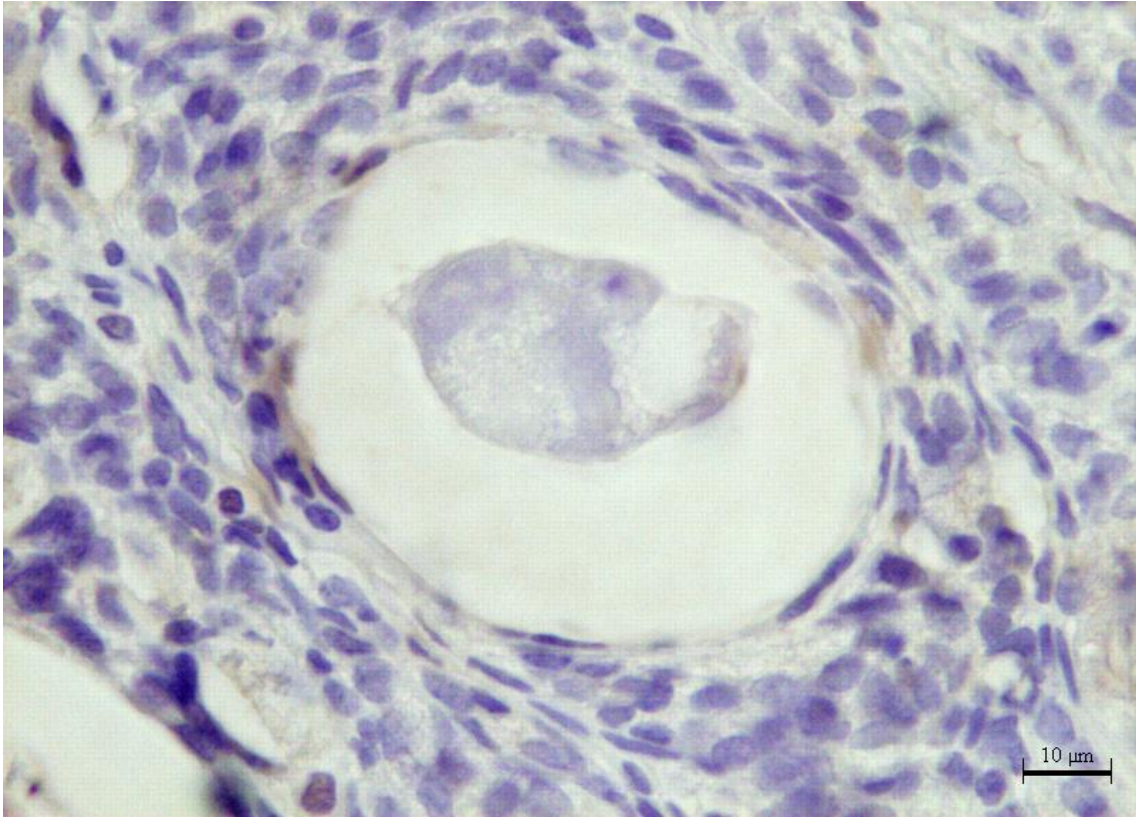
Şekil 4.93. Yağ kontrol grubuna ait CYP17A1 boyanması, (1000X)



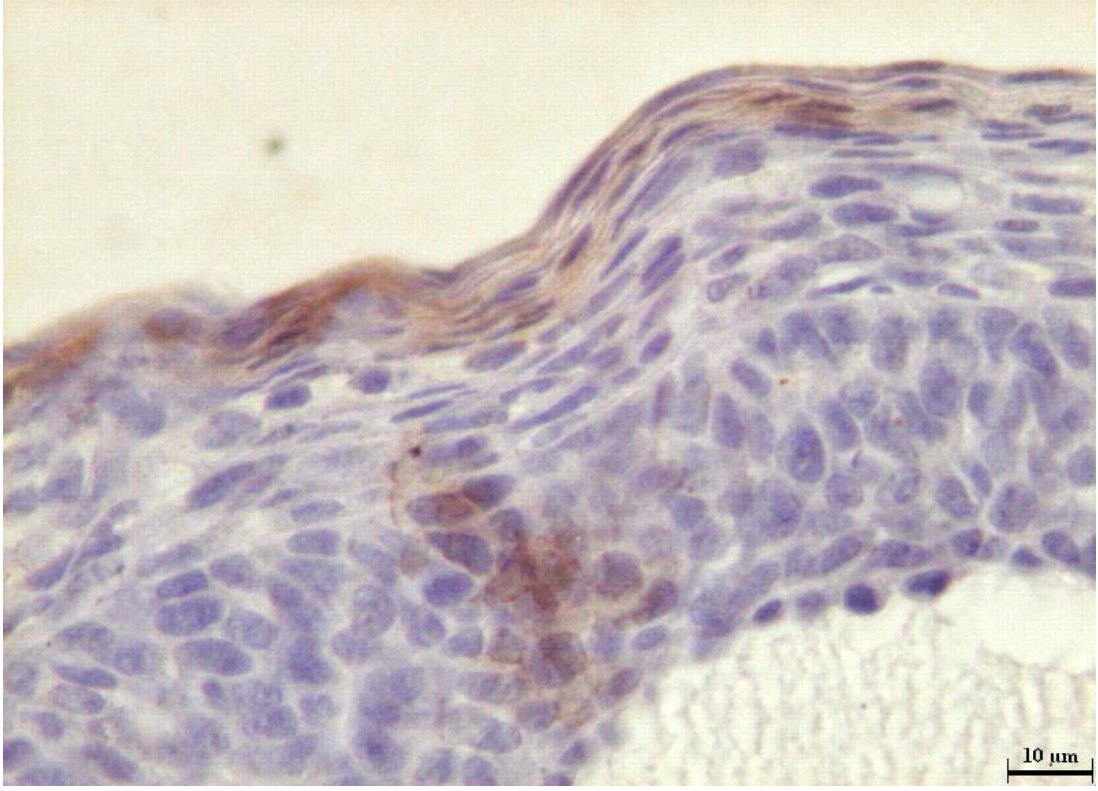
Şekil 4.94. Pozitif kontrol grubu BPA'ya ait CYP17A1 boyanması, (1000X).



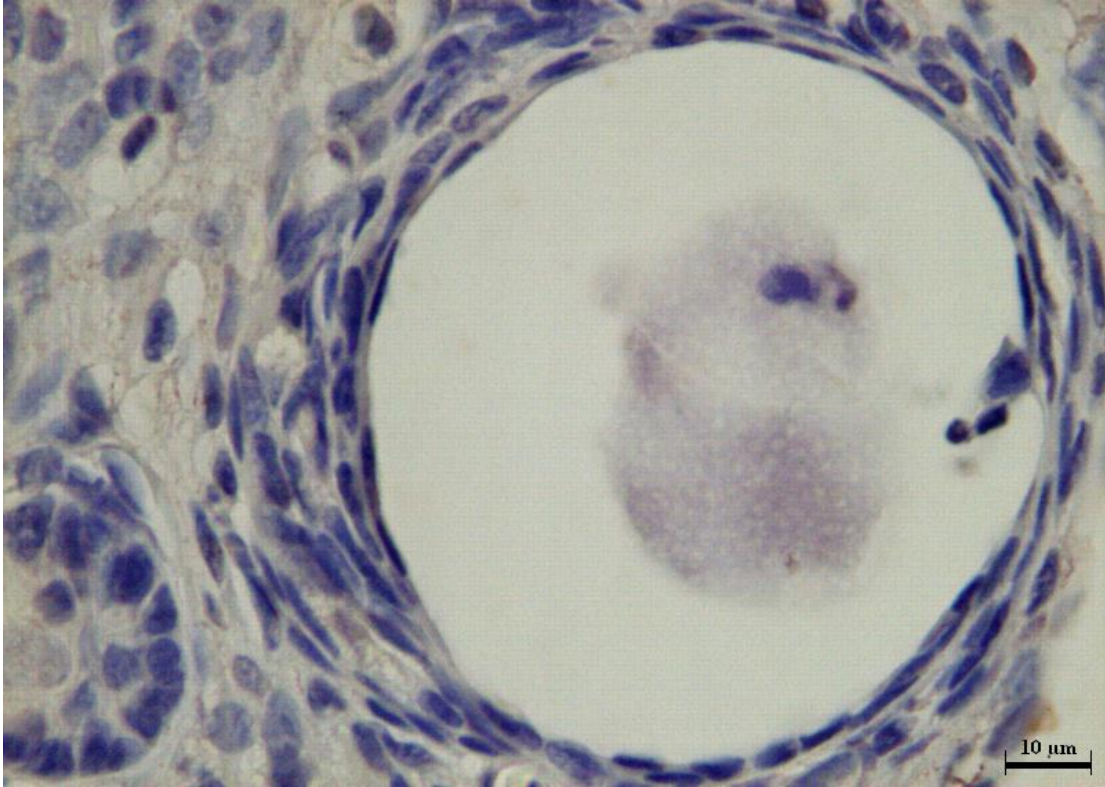
Şekil 4.95. Pozitif kontrol grubu TP'ye ait CYP17A1 boyanması, (1000X).



Şekil 4.96. 50 mg/kg/gün BPA + 0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP17A1 boyanması, (1000X).



Şekil 4.97. 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP17A1 boyanması, (1000X).



Şekil 4.98. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda CYP17A1 boyanması, (1000X).

5. TARTIŞMA

Endokrin bozucu kimyasallar, normal homeostaz, üreme ve gelişimden sorumlu olan endojen hormonların sentezine, salgılanmasına, taşınmasına, metabolizmasına ve/veya etkisine müdahale eden eksojen bileşiklerdir [75]. Son on yılda, bilim insanları, bu konuda söz sahibi olan kurumlar, hükümetler halkı endokrin bozucular olarak bilinen kimyasallara ilişkin ciddi sağlık tehlikeleri konusunda uyarmaktadırlar [76].

Bisfenol A (BPA), ambalaj, gıda kutuları, şişeler, plastik su boruları, makbuzlar, kozmetik ve sağlık ekipmanlarında plastiği bağlamak veya sertleştirmek için kullanılan endokrin bozucu potansiyele sahip en yaygın endüstriyel bileşiklerden biridir. BPA'ya insan maruziyeti esas olarak gıda ürünlerinin tüketimi, tozun solunması ve transdermal temas gibi çeşitli yolları içermektedir. Fenolik yapısı nedeniyle, BPA'nın östrojenik reseptörlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Bu nedenle, BPA'ya maruz kalmak doğurganlığı etkileyebilir, östrojene bağlı neoplazmların (yani meme ve rahim kanseri) gelişmesine ve ayrıca insülin direnci, obezite gibi çeşitli metabolik bozukluklara yol açabilir [77].

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınların %5-10'unu etkileyen yaygın bir metabolik hastalıktır. Polikistik over sendromunun majör karakteristik özellikleri arasında, anovulasyon, hiperandrojenizm, ovaryumda birikmiş çok sayıda kistik foliküller bulunmaktadır. Bunların yanı sıra üreme anormallikleri, obezite, insülin direnci, dislipidemiya, tip 2 şeker hastalığı ve artmış kardiyovasküler rahatsızlıklar PKOS hastalarında sıklıkla gözlenmektedir [78].

Yapılan birçok çalışma PKOS ve BPA arasındaki ilişkiyi net bir şekilde ortaya koymaktadır. BPA'nın PKOS'a neden olduğu yapılan hayvan çalışmaları ve PKOS hastası kadınlar üzerinde yapılan incelemelerle açıklığa kavuşturulmuştur [76, 77].

Buradan yola çıkarak çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak BPA kullanılmıştır. BPA ve PKOS arasındaki ilişkiyi özetlemek adına yapılan çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

Konieczna ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada, toplam 106 PKOS hastası ve 80 sağlıklı kadın hasta ile çalışılmıştır. Çalışmada hastalar arasında yaş, vücut kitle indeksi, serum glukoz ve insülin konsantrasyonu gibi önemli farklılıkların olmamasına dikkat edilmiştir. Hastalardan alınan serum örneklerinde kontrol gruplarına oranla yüksek

seviyede BPA'nın varlığına rastlanmıştır. Çalışma sonunda PKOS'lu hastalarda LH konsantrasyonu önemli derecede artmış, E2 konsantrasyonu azalmış, testosteron ve LDL-C konsantrasyonları da yüksek bulunmuştur. Serum total kolestrol, HDL-C, trigliserid konsantrasyonları arasında ise bir fark bulunamamıştır [77].

Kandaraki ve ark. 71 PKOS hastası, 100 sağlıklı hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, serum BPA değerleri sağlıklı kadınlara oranla PKOS'lu kadın hastalarda önemli derecede yüksek bulunmuştur [79].

Rashidi ve ark. yaptığı 51 PKOS'lu hasta ve 51 kişilik kontrol grubundan (sağlıklı bireyler) alınan sonuçlarda, serum BPA değerleri PKOS grubunda önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, BPA'yı endokrin bozucu kimyasal olarak göstermiş ve PKOS gelişimi için risk faktörlerinden biri olabileceğini belirtmiştir [80].

Çalışmalar, BPA'ya maruz kalmanın sıçanlarda PKOS gelişimine yol açtığını bildirmiştir. Neonatal dönemde yüksek BPA seviyesine (500 µg) maruz kalınması, gonadotropin salgılayan hormonun (GnRH) salımın artmasına, testosteron konsantrasyonlarında artışa ve yetişkinlikte polikistik overin ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmiştir [81].

Yang ve ark. yaptığı bir çalışmada, yaygın olarak bulunan iki endokrin bozucu kimyasal, bisfenol A (BPA) ve tributiltinin (TBT), yenidoğan dişi sıçanlarda PKOS oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Doğum sonrası (postnatal day) 1-16 günleri arasında dişi sıçanlara TBT (10 ve 100 ng/kg/d), BPA (50 ug/kg/d) ve ikisinin karışımı (TBT 100 100 ng/kg/d ile BPA 50 ug/kg/d) uygulanmıştır. TBT, BPA ve TBT, BPA ve TBT+BPA uygulaması sonucunda, düzensiz östrus döngüsü, daha az korpus luteum ve antral foliküllerin varlığı, daha fazla atretik foliküller ve kistler ile anormal yumurtalık gelişiminin görüldüğü belirtilmiştir. Bunlara ilave olarak, serum testosteron ve luteinize hormon seviyeleri anlamlı olarak yükselirken, TBT100, BPA 50 ve TBT+BPA uygulamalarından sonra serum eşey hormonu bağlayıcı globulin seviyesinde bir azalmanın olduğu gözlenmiştir [82].

Fernandez ve ark. yaptığı çalışmada, PND 1-10 günleri arasında BPA'nın 500 ug/50 uL, 50 ug/50 uL ve 5 ug/50 uL dozları uygulanmış ve sıçanların ergin dönemlerinde yapabileceği etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar şu şekildedir; BPA'ya neonatal maruz kalma, serum testosteron ve östradiol seviyelerinde artışa, yetişkinlikte progesteronda bir azalma ve in vitro GnRH sekresyonunda bir değişikliğe neden olduğu

belirtilmiştir BPA 500 ug/50uL dozuna maruz kalan sıçanlarda, yumurtalık morfolojisinde değişim ve çok sayıda kist görülmüştür. BPA 50 ug/50 uL dozuna maruz bırakılan sıçanlarda doğurganlık azalırken, BPA 500 ug/50uL dozu uygulanan hayvanlarda infertilite gözlenmiştir. Sonuç olarak, cinsel farklılaşma döneminde yüksek dozda BPA'ya maruz kalma, dişi sprague–Dawley sıçanlarında hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenini değiştirmiştir. Bu sonuçlar, polikistik over sendromunun gelişimi ile sıçanlarda yüksek dozda BPA ile yenidoğan maruziyetini ilişkilendirmesi açısından önemli sonuçlara sahiptir. Bu bulguların insan sağlığına uygunluğunu belirlemek için, insan maruziyetleriyle daha tutarlı dozlar ve uygulama yolları üzerine çalışmalara ihtiyaç olduğu da vurgulanmıştır [83].

PKOS'un etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, PKOS ile ilişkili fenotiplerin etiyolojisi ve gelişimi hakkında bilgi edinmek için çeşitli hayvan modelleri oluşturulmuştur. Androjenler PKOS'un sebeplerinden biri olarak kabul edilmekte ve bu nedenle hayvanların androjenizasyonu, PKOS'a benzeyen semptomları indüklemek için en sık kullanılan yaklaşımdır. Prenatal veya prepubertal androjen uygulaması, anovülasyon, kist benzeri foliküller, artan LH seviyeleri, artan adiposit ve insülin duyarsızlığı dahil olmak üzere PKOS'un birçok özelliği ile sonuçlanmaktadır [56].

Çalışmamızda kullanılan bir diğer pozitif kontrol grubumuz ise testosteron propiyonattır. TP'nin sıçanlara intraperitoneal, 10 mg/kg dozunda postnatal olarak uygulanması, PKOS'un karakteristik özelliklerini, yani düzensiz östrus döngüselliğini, yüksek testosteron ve insülin seviyelerini, kistik foliküllerin varlığını, progesteron seviyesini düşürdüğünü, kontrollere kıyasla korpus luteum sayısını azalttığı yapılan çalışma ile gösterilmiştir [81].

Testosteron propiyonat uygulaması ile PKOS oluşturulmuş sıçanlar, düşük yoğunluklu lipoproteindeki artışa bağlı olarak obezite riski ile karşı karşıya kaldıkları belirtilmektedir [84].

Postnatal dönemde testosteron propiyonat ile indüklenen PKOS modelinde ovaryumda; büyük kistik foliküller ya da atretik foliküller ve ovaryumda teka hücrelerinin luteinizasyonu görülmüştür. Serum testosteron, LH ve prolaktin (PRL) seviyeleri artarken progesteron ve estradiol (E2) seviyeleri kontrol grubuna göre azalmıştır [85].

Wild ve ark. yayınladığı meta-analiz çalışmasına göre trigliserid seviyesi %95 güven aralığında PKOS hastası kadınlarda yüksek bulunmuştur. HDL-kolesterol

konsantrasyonun ise düşük, buna karşın LDL-kolesterol konsantrasyonu ise yüksek çıkmıştır. PKOS'ta dislipidemiya yaygın olmasına rağmen, erken değişikliklere odaklanması gerekmektedir (trigliserid ve düşük HDL gibi) ki bunlar da metabolik sendrom bileşenleri olması açısından önem taşımaktadır [86].

Fitoöstrojenler, endojen östrojen moleküllerine benzer bir moleküler şekle ve yapıya sahip bitki bileşikleridir ve östrojen reseptörlerine rekabetçi bir şekilde bağlanarak daha güçlü östrojen ve östrojen metabolitlerinin bağlanmasını önlerler [87]. Floretin, fitoöstrojen sınıflandırmasında kalkonlar sınıfında yer almaktadır. Floretin, antioksidan aktivitesi, glikoz taşıyıcılarının düzenlenmesi ve tümör hücrelerinde apoptozu indüklemeye yeteneği de dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyona sahiptir [44].

Yapılan bu çalışmada pozitif kontrol grubu, 50 mg /kg/gün BPA ile oluşturulan PKOS'a karşılık uygulama gruplarının yani bir fitoöstrojen olan floretinin 0,5 mg/kg/gün floretin, 5 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün floretin dozlarının koruyucu etkisinin olup olmadığı ortaya konmak istenmiştir. Testosteron propiyonat (50 mg /kg/gün) ise bir diğer pozitif kontrol grubu olarak seçilmiş fakat sadece PKOS'a dair etkileri gözlemlenmiş olup bu grupta herhangi bir floretin uygulaması yapılmamıştır. Çalışma kapsamında her gün aynı saatte intraperitoneal olarak önce floretin dozları uygulanmış, üzerinden 30 dakika geçtikten sonra BPA dozları uygulanmıştır. Çalışmaya PND 28. Günde başlanmış, 43. günde ise son bulmuştur.

Deney sonunda besin ve su tüketimi açısından gruplar arası farklılıklar olduğu görülmüştür. Besin tüketiminin 15,47 gram ile en çok 50 mg/kg/gün BPA+ 5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda tüketildiği görülmüştür. Bu artış floretin uygulamasından kaynaklanmış olabilir. Çünkü floretin kan şekeri seviyesini önemli ölçüde azaltmaktadır [48] ve sıçan bu eksikliği daha çok yem tüketerek karşılamış olabilir. Su tüketimi ise en çok 36,87 ml ile 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin uygulama grubunda kaydedilmiştir.

Deney gruplarının başlangıç ağırlıkları arasında bir fark bulunmamaktadır. Deney bitiminde elde edilen verilere bakıldığında ise vücut ağırlıkları arasında fark olduğu gözlenmiştir. Ayrıca organ ve rölatif organ ağırlıkları arasında da farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Vücut ağırlığında en yüksek artış pozitif kontrol grubu BPA'da 124,83 gram ile kaydedilmiştir. Bu sonuç yapılan diğer çalışmalar ve PKOS'un karakteristik fenotipi ile uyumlu sonuçlar vermektedir [88][77]. Uygulama grupları olan floretin

gruplarında ise vücut ağırlıklarının düştüğü gözlenmiştir. Gruplar arası bu farklılık, floretinin bilinen glukoz transporter inhibitörü olması ve adipogenez üzerindeki etkisinden kaynaklanmış olabilir. Floretin uygulanan iv vitro çalışmalarda PPAR gama (peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama) ekspresyonu arttığı ve fare 3T3-L1 preadipositlerinde ve domuz primer adipositlerinde adiposit farklılaşmasını teşvik ettiği belirtilmektedir [44]. Bu sonuçlar, floretinin preadipositlerde adipogenezini kolaylaştırabileceğini ve olgun adipositlerde lipolizi teşvik edebileceğini göstermektedir. Bazı in vivo çalışmalar, floretin uygulamasının diyabetik kemirgen modellerinde hiperglisemi, insülin direnci ve obeziteyi iyileştirdiğini göstermiştir [46].

Klinik ve deneysel olarak kortizoldeki aşırı artış, kan basıncındaki artış ve ara metabolizmada köklü değişikliklere yol açmaktadır. Bu da karakteristik olarak obeziteyi, insülin direncini ve lipid metabolizmasındaki değişimleri içermektedir [89]. Çalışmamızdaki sonuçlara bakıldığında kortizol seviyesi en yüksek BPA grubunda görülürken floretin uygulama grupları arasında belirgin bir düşüş tespit edilmiştir. Bu sonuç, vücut ağırlığının düşmesindeki etmenler ile örtüşmektedir.

BPA'nın iki farklı testosteron hidroksilazın (2- ve 6-hidroksilaz) aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği, testosteron katabolizmasının azalmasına ve dolaylı olarak artan testosteron konsantrasyonlarına yol açtığı bildirilmiştir [90]. Konieczna ve ark. PKOS'lu hastalar üzerinde yaptıkları çalışmalar sonunda hastalardan elde edilen serum örneklerinde testosteron değerlerinin yüksek çıktığını bildirmişlerdir [77]. Fernandez ve ark. yaptığı çalışmada 500µg BPA uygulamasında serum testosteron seviyelerinin arttığını göstermişlerdir. Bu da çalışmamız ile uyumlu sonuç vermektedir. Çalışmamızın sonucunda pozitif uygulama grubu olan BPA'nın en yüksek dihidrotestosteron seviyesine sahip olduğu görülmüştür. Floretin uygulanan gruplarda ise bu seviyeler düşmüş, 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin grupları arasında BPA ile istatistiksel olarak anlamlı olmayan fakat belirgin azalmaların meydana geldiği tespit edilmiştir.

İncelenen bir diğer hormon olan östrojende ise yağ kontrol grubu ve pozitif kontrol grupları arasında farklılıklar gözlenmemiş olmasına rağmen, floretin uygulanan gruplar ile pozitif kontrol grupları arasında istatistiksel olarak artış görülmüştür. Fitoöstrojenler, memeli östrojen 17β-östradiol ile yapısal benzerliği paylaşan polifenollerdir. Ortak özellikleri, bir çift hidroksil grubunun ve östrojen reseptörü (ER) alt tiplerine α ve β bağlanması için gerekli olan bir fenolik halkanın varlığını içermesidir. Hidroksil

gruplarının konumu, ER bağlanma kabiliyetinin belirlenmesinde önemli görünmektedir [42]. Gruplar arasındaki bu farklılık fitoöstrojen uygulamasından kaynaklanmış olabilir.

Hipotalamustan salgılanan GnRH salınımının bozulması PKOS sorunlarından biridir. GnRH, FSH ve LH salınımı için hipofizi uyarmaktadır. Bu iki hormon menstrual döngünün sağlanması için temeldir. PKOS'ta bu hormonların yetersizliği nedeni ile yumurta oluşmaz ya da foliküllerden salgılanamaz. Döngü bozulur ve yumurtlayamama meydana gelir [91]. Konieczna ve ark. PKOS hastası kadınlarla yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna ait serum LH seviyelerinin 6,6 IU/L iken, PKOS hastalarında 8,1 IU/L olarak ölçüldüğünü belirtmişlerdir. Bu oran FSH kontrol grubunda 6,7 IU/L iken PKOS hastalarında 6,4 IU/L olarak kaydedilmiştir. LH'nin PKOS'ta yükseldiği bilinmektedir [92]. Çalışmamızdaki LH konsantrasyonları incelendiğinde BPA pozitif kontrol grubuna oranla, 50 mg/kg/gün BPA+5 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün BPA+0,5 mg/kg/gün floretin gruplarında bir azalma meydana gelmiş fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. FSH sonuçlarında ise negatif kontrol grubu diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı olmakla birlikte diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. FSH sonuçları yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur PKOS'ta FSH oranı çoğu zaman sabit kalabilmektedir [9][93].

Üre, böbrek fonksiyonlarını yorumlamak için önemli bir parametredir. Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında negatif kontrol grubu ile 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubu hariç tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Fitoöstrojenler dokuda birikmeyip kolay metabolize olduğundan ve vücuttan kısa sürede atıldığından böbrekte görülen histopatolojik bulguların fitoöstrojen kaynaklı değil, BPA kaynaklı olduğu düşünülmektedir [94][39].

Androjen fazlalığının dolaşımdaki yüksek yoğunluklu lipoproteini düşürdüğü ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolünü arttırdığı bilinmektedir [95]. Fakat çalışmalar arasında LDL-C konsantrasyonları arasında farklılıklar görülmüştür. Bu durum birçok farklı etkenden kaynaklanmış olabilir. Örneğin; etnik gruplar, sendromun şiddeti (anovuluar-ovuluar formlar), beslenme kalitesi ve vücut ağırlığı gibi. PKOS'lu hastalarda lipid değerleri arttıkça kardiyovasküler risk de kişiden kişiye farklı derecelerde sorun olabilmektedir. Elde edilen verilerden, PKOS'daki lipid değişikliklerinin, aynı mekanizma tarafından mı gerçekleştiği veya lipid

metabolizmasındaki değişikliklerin ifadelerinin farklılığından mı kaynaklandığını anlamak zordur [96].

Yapılan meta-analiz alışmaları PKOS'ta HDL-konsantrasyonlarının azaldığını buna karşın trigliserid değerlerinin arttığını göstermektedir [77][97]. Çalışmamızda trigliserid sonuçlarına bakıldığında ise pozitif kontrol grubunda (BPA), negatif kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir. Buna karşın floretin grupları ile pozitif kontrol grubu BPA arasında anlamlı bir değişim görülmemiştir. Histopatolojik olarak karaciğer görüntüleri değerlendirildiğinde dokudaki BPA uygulamasından kaynaklı bozulmaların trigliserid değerlerini yükseltmiş olabileceğini söyleyebiliriz.

Memelilerde, en yüksek kreatinin konsantrasyonları iskelet kasında bulunmaktadır. Kreatinin bu dokunun enerji metabolizmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Çok sayıda deneysel bulgu, kreatinin metabolizmasındaki bozukluklar ile çeşitli kas hastalıkları arasında yakın bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Öte yandan böbrek metabolizmasında da çok önemli rol oynamaktadır [98]. Histopatolojik olarak böbrek dokularında tespit edilen değişiklikler olmasına rağmen serum kreatinin seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

İnsan serum albümini, memeli plazmasında en bol bulunan proteindir ve genellikle çok işlevli bir taşıma proteini olarak kabul edilir. Bu nedenle, albüminin aynı zamanda önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve proteinin, aslında sürekli oksidatif strese maruz kaldığı bilinen plazmada ana ve baskın dolaşımdaki antioksidanı temsil edebileceğini gösteren kanıtlar vardır [99]. Albümin, karaciğerde üretildiği için de karaciğerdeki değişiklikler albümin sonuçlarını etkilemektedir. Albümin seviyesi düştüğünde kan plazmasında yer alan büyük proteinler dar damar yapılarından geçemez ve bu da ödeme neden olabilmektedir [100]. Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında ise albümin açısından gruplar arasında anlamlı farklılıkların olduğu görülmektedir. Serum albümin değerleri en düşük 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin grubunda grlmştir. Bu sonuç histopatolojik olarak 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin grubuyla uyumlu sonuçlar vermektedir. Bu grupta demin görünmesi de bunu desteklemektedir.

Karaciğer hücrelerinde özellikle hücre membranının yapısal bütünlüğünde meydana gelen hasarlar sonucu ALT ve AST kana fazla miktarda salınmaları nedeniyle

serumdaki değerleri yükselmektedirler [101]. Uygulama gruplarında ALT ve AST değerlerinin her ikisi de yağ kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yükselmiş ancak gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Histopatolojik incelemelerde tüm gruplarda en çok görülen hasar konjesyon ve sinüzoidal genişleme olmuştur. Biyokimyasal inceleme sonuçları histopatolojik görüntüleri desteklemekte ve meydana gelen bu hasarın BPA kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Uterus dokusu incelendiğinde fitoöstrojen uygulamasına bağlı olarak, 50 mg/kg/gün BPA + 5 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün BPA + 50 mg/kg/gün floretin grubunda salgı bezi sayısının arttığı görülmektedir. Bu durum uygulanan floretine karşı bir hücresel yanıtın gelişebileceğini ve endometriyumda salgı bezi sayısını artırabileceğini düşündürmektedir. Floretin, östrojen reseptörü ile endojen östrojenden farklı yanıt oluşturarak, metabolik yolları harekete geçiriyor olabilir ya da östrojenin alt varyasyonları ile etkileşerek salgı bezi sayısını arttırmış olabilir [102].

Vajinal smear sitolojisi, vajinal epiteldeki morfolojik değişiklikler ve vajinal smeardaki farklı hücre tiplerinin oranı göz önüne alındığında, vajinal epitel üzerindeki östrojenin etkisini tahmin etmeyi mümkün kılmaktadır. Dolaşımdaki östrojen, sıçanın vajinal epitelyumuna etki ederek hücre proliferasyonunu ve keratinizasyonunu uyarmaktadır. Epitel morfolojisi ve hücre tipleri, östrus siklus fazını ve sıçanların üreme hormonu ile ilişkili olarak seviyesini karakterize etmektedir [23]. Proöstrus ve östrus fazında östrojen hormonu etkisini gösterirken, metöstrus ve diöstrus fazlarında ise progesteron etkisini göstermektedir [74]. Çalışmamızda BPA ve testosteron propiyonat uygulaması yapılmış gruplarda düzensiz östrus döngüsü tespit edilmiştir. Düzensiz seyreden döngüde diöstrus fazının sabit olması dikkat çekmiştir. 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin grubunda ise pozitif kontrol gruplarına göre daha düzenli bir östrus döngüsü elde edilmiştir. Elde edilen östrojen hormon değerleri ile karşılaştırıldığında 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin grubunun östrojen değerinin pozitif kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği görülmektedir. Hormon ve östrus döngüsü sonuçları birbirini desteklemektedir. Kakadia ve ark. yaptıkları çalışmada da letrozol ile indüklenen PKOS modellemesinde benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür [25].

Karaciğer, endokrin bozucu kimyasallar için hedef organ konumundadır. Hepatik enzimler BPA kaynaklı yükselebilmekte ve histopatolojik görüntüler açığa çıkmaktadır. BPA tarafından indüklenen karaciğer hasarı, BPA toksik metabolitlerinin birikmesi ve

karaciğerde reaktif oksijen türlerinin üretilmesinden de kaynaklanabilir. Kontrol gruplarında hepatositler, yuvarlak veziküler çekirdekler içeren asidofilik sitoplazmaya sahip olan büyük poligonal hücrelerden oluşmaktadır. BPA uygulanan pozitif kontrol grubunda ve 50 mg/kg/gün BPA+ 0,5 mg/kg/gün floretin grubunda yağ kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar meydana gelmiştir. Bu gruplarda ortak olarak en çok sinüzoidal genişleme görülmüş, BPA grubunda ayrıca yoğun olarak konjesyon ve hepatositlerde genişleme kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar Ahmed ve ark. yaptığı çalışma ile uyumlu sonuçlar göstermiştir [101].

Böbrek dokusunda, kontrol grubunda renal tübüller, apikal fırça sınırlarına sahip proksimal kıvrımlı tübüllerden oluşurken, distal kıvrımlı tübüller basit küboidal hücrelerle kaplıdır. BPA ve tüm uygulama gruplarında (testosteron propiyonat grubunda daha az olmakla birlikte) böbrek dokusunda dejeneratif değişiklikler görülmüştür. BPA hasarı en çok böbrekte gözlenmiştir. En çok görülen histopatolojik durumlar tüm gruplarda glomerular atrofi olmuştur. Bunun yanı sıra Bowman kapsülünde genişleme, tübüller dejenerasyon ve konjesyona da sıkça rastlanmıştır. Endokrin bozucu kimyasallar sadece hormonları taklit etmekle kalmaz aynı zamanda hormon sentezini ve dağılımını da engelleyebilmektedir. Bu da doku metabolizmasında dikkat edilmesi gereken bir diğer konudur. BPA, toksik metabolitlerin birikmesi ve böbreğin onları yok edememesi nedeniyle nefrotoksik bir etki ortaya çıkabilmektedir [101].

Ovaryum dokuları immünohistokimyasal olarak incelendiğinde CYP17A1'nin boyanması BPA pozitif kontrol grubunda daha yoğun görülmüştür. Bu durum muhtemelen teka ve interstisyel hücrelerde bulunan CYP17A1 enziminin yoğun ekspresyonundan kaynaklanmaktadır. Androjenlerin sürekli uyarılması, androjen reseptörlerinde değişikliklere veya PKOS'ta yumurtalık disfonksiyonuna neden olan epigenetik değişikliklere yol açmaktadır [72]. Bu enzim hücrede düz endoplazmik retikulumda lokalize olmaktadır ve androjen üretimiyle ilişkilidir. Serum testosteron seviyesinin artması, BPA uygulanan gruplardaki ovaryum dokularında görülen kist sayısındaki artış ile arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

Polikistik overlerde bulunan teka hücreleri, normal teka hücreleri ile karşılaştırıldığında hem androstenedion hem de progesteron üretiminde in vitro olarak önemli bir artış göstermektedir. Steroidogeneze meydana gelen olası defekt ya da progesteron biyosentezinin normal düzeyin altında olması PKOS'a neden olabilmektedir. CYP11A1 tarafından kolesterolün pregnenolona dönüştürülmesi, steroid hormon biyosentezinin

başlangıcında ilk hız sınırlayıcı adımdır. Bu enzimin artışı androjen üretiminde bir artışa neden olabilmektedir [71]. Çalışmamızdan elde ettiğimiz görüntülerde pozitif kontrol gruplarında, CYP11A1 boyanmasının arttığı saptanmıştır. 50 mg/kg/gün BPA +5 mg/kg/gün floretin ve 50 mg/kg/gün BPA+50 mg/kg/gün floretin gruplarında pozitif kontrol gruplarına kıyasla daha az CPY11A1 boyanmasının açığa çıktığı görülmüştür.

6.SONUÇ

1. Dişı üreme sisteminin gelişimi ve işlevi hormon konsantrasyonlarına ve bunların belli bir dengesinin olmasına bağlıdır. Endokrin disfonksiyon, adet düzensizlikleri, doğurganlık bozukluğu, endometriozis, polikistik over sendromu (PKOS) ve östrojen konsantrasyonunda değişiklik gibi birçok anormalliğe yol açabilir. Bu anormallikler, östrojenlerin, tekal androjenlerin ve/veya tiroid hormonlarının konsantrasyonunun modülasyonundan kaynaklanabilir. Endokrin bozucular bu hormonları modüle etme yeteneğine sahip olduklarından, dişı genital fonksiyonunu etkileyip etkilemediklerini belirlemek önemlidir [1]. Bu bulgular, BPA'nın ve çevrede bulunan diğer ksenoöstrojenlere maruz kalmanın, kabul edilebilir seviyelerinin yeniden değerlendirilmesi için zorlayıcı bir ihtiyaç olduğunu göstermektedir.
2. Sentetik ilaçların neden olduğu olumsuz etkiler nedeniyle, bitki bazlı ilaçlar PKOS tedavisinde daha çok tercih edilmektedir [59]. Floretin ile ilgili olarak çok sayıda farmakolojik aktivite bildirilmiştir ve çok yönlü olumlu etkilere sahiptir. Floretinin sahip olduğu flavonoid içeriği, bu çalışmada gözlemlenen farmakolojik aktivite için sorumlu bir faktör olabilir. Toksikite parametreleri, floretin ile uzun süreli tedaviden sonra toksik bir etkiye rastlanılmadığını belirtmektedir. Bu durum floretin ile uzun süreli tedavinin, PKOS hastaları için olumlu bir etki yaratabileceğini düşündürmektedir.
3. Bu çalışmanın sonuçları, BPA tarafından indüklenen PKOS tedavisine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Floretinin ovaryum üzerinde olumlu etkileri olduğu açıktır. Buna ek olarak, insanlar floretin içeren besinlere kolayca ve rahat bir şekilde ulaşabilirler. Ayrıca, gelecekte daha detaylı yapılacak çalışmalar ile etkili bir anti-PKOS ilacı olarak geliştirilmesi ve ticari formülasyonlarının yapılması bu hastalığın tedavisinde kullanımını sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

- [1] M. Giulivo, M. Lopez de Alda, E. Capri, and D. Barceló, 'Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review', *Environ. Res.*, vol. 151, pp. 251–264, 2016.
- [2] E. D. Palioura, E., Kandarakis, 'Polycystic ovary syndrome (PCOS) and endocrine disrupting chemicals (EDCs)', *Rev Endocr Metab Disord*, vol. 16, pp. 365–371, 2015.
- [3] C. C. Peng, C. Y. Liu, N. R. Kuo, and T. H. Tung, 'Effects of Phytoestrogen Supplement on Quality of Life of Postmenopausal Women: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials', *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2019, 2019.
- [4] G. Karabulut and N. Barlas, 'Genotoxic, histologic, immunohistochemical, morphometric and hormonal effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) on reproductive systems in pre-pubertal male rats', *Toxicol. Res. (Camb)*, vol. 7, no. 5, pp. 859–873, 2018.
- [5] M. Najafian *et al.*, 'Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats', *Mol. Biol. Rep.*, vol. 39, no. 5, pp. 5299–5306, 2012.
- [6] C. Monneret, 'What is an endocrine disruptor?', *Comptes Rendus - Biol.*, vol. 340, no. 9–10, pp. 403–405, 2017.
- [7] I. Kabir, E.R, Rahman, M.S, Rahman, 'A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health', *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 40, pp. 241–258, 2015.
- [8] E. Diamanti-Kandarakis *et al.*, 'Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement', *Endocr. Rev.*, vol. 30, no. 4, pp. 293–342, 2009.
- [9] A. Z. Rutkowska, A. Szybiak, K. Serkies, and D. Rachoń, 'Endocrine disrupting chemicals as potential risk factor for estrogen-dependent cancers', *Pol. Arch. Med. Wewn.*, vol. 126, no. 7–8, pp. 562–570, 2016.

- [10] A. Rutkowska and D. Rachoń, ‘Bisphenol A (BPA) and its potential role in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome (PCOS)’, *Gynecol. Endocrinol.*, vol. 30, no. 4, pp. 260–265, 2014.
- [11] S. Ma, W. Shi, X. Wang, P. Song, and X. Zhong, ‘Bisphenol A Exposure during Pregnancy Alters the Mortality and Levels of Reproductive Hormones and Genes in Offspring Mice’, *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [12] International Food Safety Authorities Network (INFOSAN), ‘BISPHENOL A (BPA) - Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO’, no. November, pp. 1–6, 2009.
- [13] S. K. Blank, C. R. McCartney, and J. C. Marshall, ‘The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome’, *Hum. Reprod. Update*, vol. 12, no. 4, pp. 351–361, 2006.
- [14] J. M. Gámez *et al.*, ‘Exposure to a low dose of bisphenol A impairs pituitary-ovarian axis in prepubertal rats. Effects on early folliculogenesis.’, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 39, no. 1, pp. 9–15, 2015.
- [15] M. H. and A. R. Anna Ptak, ‘The Ovary as a Target Organ for Bisphenol A Toxicity’, 2017.
- [16] T. Jambor, H. Greifova, J. Bistakova, and N. Lukac, ‘Endocrine Disruptors and Reproductive Health in Males’, *Endocr. Disruptors*, 2018.
- [17] ‘BPA’. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623#section=Crystal-Structures>. [Accessed: 17-Aug-2020].
- [18] E. Üniversitesi, A. Sağlık Yüksekokulu, and B. ve Diyetetik Bölümü, ‘Fitoöstrojenler ve Sağlıkta Etkileri’, *N. İNANÇ, Ş. TUNA Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, vol. 2, no. 2, pp. 91–95, 2005.
- [19] E. Bin Yang, Y. J. Guo, K. Zhang, Y. Z. Chen, and P. Mack, ‘Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives’, in *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1550, no. 2, 2001, pp. 144–152.
- [20] J. Barrett, ‘Phytoestrogens. Friends or foes?’, *Environ. Health Perspect.*, vol. 104, no. 5, pp. 478–482, 1996.

- [21] cristian j Gruber, W. Tschugguel, C. Schneeberger, and johannes c Huber, 'Produktion and Actions of Esterogen', *J. Med.*, vol. 346, no. 5, pp. 340–352, 2002.
- [22] K. Setchell, 'Phytoestrogens : the biochemistry , physiology , and implications for', *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 68, pp. 1333S-1346S, 1998.
- [23] G. MC Rodrigues, B. DB Borges, L. Gabriela Q Moreira, É. Aparecida G Rossete, and S. de Castro Franca, 'Effects of estrogen-like plant compounds on the vaginal epithelium pituitary, adrenal glands, and uterus of rats', *Exp. Biol. Med.*, vol. 243, no. 15–16, pp. 1173–1184, 2018.
- [24] F. Ferrante, E. Fusco, P. Calabresi, and L. M. Cupini, 'Phyto-oestrogens in the prophylaxis of menstrual migraine', *Clin. Neuropharmacol.*, vol. 27, no. 3, pp. 137–140, 2004.
- [25] N. Kakadia, P. Patel, S. Deshpande, and G. Shah, 'Effect of Vitex negundo L. seeds in letrozole induced polycystic ovarian syndrome', *J. Tradit. Complement. Med.*, vol. 9, no. 4, pp. 336–345, 2019.
- [26] A. Bacaloni, C. Cavaliere, A. Faberi, P. Foglia, R. Samperi, and A. Laganà, 'Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants', *Anal. Chim. Acta*, vol. 531, no. 2, pp. 229–237, 2005.
- [27] L. Křížová, K. Dadáková, J. Kašparovská, and T. Kašparovský, 'Isoflavones', *Molecules*, vol. 24, no. 6, p. 1076, 2019.
- [28] J. Paluszczak and W. Baer-Dubowska, 'DNA Methylation as a Target of Cancer Chemoprevention by Dietary Polyphenols', *Polyphenols Hum. Heal. Dis.*, vol. 2, pp. 1385–1392, 2013.
- [29] J. C. Le Bail, Y. Champavier, A. J. Chulia, and G. Habrioux, 'Effects of phytoestrogens on aromatase, 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells', *Life Sci.*, vol. 66, no. 14, pp. 1281–1291, 2000.
- [30] S. Tamir *et al.*, 'Estrogenic and antiproliferative properties of glabridin from licorice in human breast cancer cells', *Cancer Res.*, vol. 60, no. 20, pp. 5704–5709, 2000.

- [31] L. P. Christensen and K. B. Christensen, 'The Role of Direct and Indirect Polyphenolic Antioxidants in Protection Against Oxidative Stress', *Polyphenols Hum. Heal. Dis.*, vol. 1, pp. 289–309, 2013.
- [32] S. Hüser *et al.*, *Effects of isoflavones on breast tissue and the thyroid hormone system in humans: a comprehensive safety evaluation*, vol. 92, no. 9. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [33] B. M. Rezk, G. R. M. M. Haenen, W. J. F. Van der Vijgh, and A. Bast, 'The antioxidant activity of phloretin: The disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 295, no. 1, pp. 9–13, 2002.
- [34] C. C. Hoerger, F. E. Wettstein, K. Hungerbühler, and T. D. Bucheli, 'Occurrence and origin of estrogenic isoflavones in Swiss river waters', *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, no. 16, pp. 6151–6157, 2009.
- [35] a L. Murkies, G. Wilcox, and S. R. Davis, 'Clinical review 92: Phytoestrogens.', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 83, no. 2, pp. 297–303, 1998.
- [36] A. I. Smeds, S. M. Willför, S. P. Pietarinen, P. Peltonen-Sainio, and M. H. T. Reunanen, 'Occurrence of "mammalian" lignans in plant and water sources', *Planta*, vol. 226, no. 3, pp. 639–646, 2007.
- [37] P. B. Andrade *et al.*, 'Valuable compounds in macroalgae extracts', *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1819–1828, 2013.
- [38] I. L. F. Nielsen and G. Williamson, 'Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans', *Nutr. Cancer*, vol. 57, no. 1, pp. 1–10, 2007.
- [39] T. Cornwell, 'Dietary phytoestrogens and health', *Phytochemistry*, vol. 65, no. 8, pp. 995–1016, 2004.
- [40] W. M. Mazur, M. Uehara, K. Wähälä, and H. Adlercreutz, 'Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects.', *Br. J. Nutr.*, vol. 83, no. 4, pp. 381–7, 2000.
- [41] J. Zhang *et al.*, 'Inhibitory Effects of Soy and Rye Diets on the Development of Dunning R3327 Prostate Adenocarcinoma in Rats', vol. 161, no. September

1997, pp. 151–161, 1998.

- [42] J. L. Limer and V. Speirs, ‘Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention’, *Breast Cancer Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 119–127, 2004.
- [43] X. Shen, L. Wang, N. Zhou, S. Gai, X. Liu, and S. Zhang, ‘Beneficial effects of combination therapy of phloretin and metformin in streptozotocin-induced diabetic rats and improved insulin sensitivity: In vitro’, *Food Funct.*, vol. 11, no. 1, pp. 392–403, 2020.
- [44] W. T. Chang, W. C. Huang, and C. J. Liou, ‘Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages’, *Food Chem.*, vol. 134, no. 2, pp. 972–979, 2012.
- [45] B. C. Geohagen, B. Korsharsky, A. Vydyanatha, L. Nordstroem, and R. M. LoPachin, ‘Phloretin cytoprotection and toxicity’, *Chem. Biol. Interact.*, vol. 296, no. July, pp. 117–123, 2018.
- [46] A. Takeno, I. Kanazawa, M. Notsu, K. I. Tanaka, and T. Sugimoto, ‘Phloretin promotes adipogenesis via mitogen-activated protein kinase pathways in mouse marrow stromal ST2 cells’, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 6, 2018.
- [47] I. C. W. Arts and P. C. H. Hollman, ‘Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies.’, *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, no. 1 Suppl, 2005.
- [48] M. Hassan, C. El Yazidi, C. Malezet-Desmoulins, M. J. Amiot, and A. Margotat, ‘Gene expression profiling of 3T3-L1 adipocytes exposed to phloretin’, *J. Nutr. Biochem.*, vol. 21, no. 7, pp. 645–652, 2010.
- [49] G. Shu *et al.*, ‘Phloretin promotes adipocyte differentiation in vitro and improves glucose homeostasis in vivo’, *J. Nutr. Biochem.*, vol. 25, no. 12, pp. 1296–1308, 2014.
- [50] S. Alsanea, M. Gao, and D. Liu, ‘Phloretin Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity and Improves Metabolic Homeostasis’, *AAPS J.*, vol. 19, no. 3, pp. 797–805, 2017.
- [51] H. F. Escobar-Morreale, ‘Polycystic ovary syndrome: Definition, aetiology, diagnosis and treatment’, *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 14, no. 5, pp. 270–284, 2018.

- [52] M. Hewlett, E. Chow, A. Aschengrau, and S. Mahalingaiah, ‘Prenatal Exposure to Endocrine Disruptors: A Developmental Etiology for Polycystic Ovary Syndrome’, *Reprod. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 19–27, 2017.
- [53] R. Article, ‘POLYCYSTIC OVARY SYNDROME: PATHOGENESIS , TREATMENT’, vol. 8, no. 5, pp. 107–112, 2018.
- [54] T. Tsilchorozidou, C. Overton, and G. S. Conway, ‘The pathophysiology of polycystic ovary syndrome’, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*., vol. 60, no. 1, pp. 1–17, 2004.
- [55] Z. M. van der Spuy and S. J. Dyer, ‘The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome’, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 18, no. 5 SPEC. ISS., pp. 755–771, 2004.
- [56] E. L. A. F. Van Houten and J. A. Visser, ‘Mouse models to study polycystic ovary syndrome: A possible link between metabolism and ovarian function?’, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 14, no. 1, pp. 32–43, 2014.
- [57] K. A. Walters, C. M. Allan, and D. J. Handelsman, ‘Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome1’, *Biol. Reprod.*, vol. 86, no. 5, pp. 1–12, 2012.
- [58] N. Amr and H. E. Abdel-Rahim, ‘The Effect of Chromium Supplementation on Polycystic Ovary Syndrome in Adolescents’, *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, vol. 28, no. 2, pp. 114–118, 2015.
- [59] M. A. Demirel, M. Ilhan, I. Suntar, H. Keles, and E. Kupeli Akkol, ‘Activity of Corylus avellana seed oil in letrozole-induced polycystic ovary syndrome model in rats’, *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 26, no. 1, pp. 83–88, 2016.
- [60] L. Sara *et al.*, ‘Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome’, *Fertil. Steril.*, vol. 97, no. 2, pp. 462–468, 2012.
- [61] T. M. Barber, G. K. Dimitriadis, A. Andreou, and S. Franks, ‘Polycystic ovary syndrome: Insight into pathogenesis and a common association with insulin resistance’, *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians London*, vol. 16, no. 3, pp. 262–266, 2016.
- [62] E. Diamanti-Kandarakis, ‘Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications’, *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 10, p. e3, Aug. 2008.

- [63] T. Wilcox and A. Hirshkowitz, 'NIH Public Access', vol. 85, no. 0 1, pp. 1–27, 2015.
- [64] S. Patel, 'Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy', *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 182, no. April, pp. 27–36, 2018.
- [65] D. Rachoń and H. Teede, 'Ovarian function and obesity-Interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options', *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 316, no. 2, pp. 172–179, 2010.
- [66] E. Kandaraki *et al.*, 'Endocrine disruptors and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no. 3, pp. 480–484, 2011.
- [67] J. N. Reddy, 'Endocrine disruptors 6 : 1', 1991, pp. 307–314.
- [68] E. S. Barrett and M. Sobolewski, 'Polycystic ovary syndrome: Do endocrine-disrupting chemicals play a role?', *Semin. Reprod. Med.*, vol. 32, no. 3, pp. 166–176, 2014.
- [69] M. C. Shih, N. C. Hsu, C. C. Huang, T. S. Wu, P. Y. Lai, and B. C. Chung, 'Mutation of mouse Cyp11a1 promoter caused tissue-specific reduction of gene expression and blunted stress response without affecting reproduction', *Mol. Endocrinol.*, vol. 22, no. 4, pp. 915–923, 2008.
- [70] T. T. *et al.*, 'Effect of MDR1 gene promoter methylation in patients with ulcerative colitis', *Int. J. Mol. Med.*, vol. 23, no. 4, pp. 521–527, 2009.
- [71] N. Gharani *et al.*, 'Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism', *Hum. Mol. Genet.*, vol. 6, no. 3, pp. 397–402, 1997.
- [72] L. A. Lombardi *et al.*, 'Immunohistochemical evaluation of proliferation, apoptosis and steroidogenic enzymes in the ovary of rats with polycystic ovary', *Rev. Assoc. Med. Bras.*, vol. 60, no. 4, pp. 349–356, 2014.
- [73] M. Fernández, N. Bourguignon, V. Lux-Lantos, and C. Libertun, 'Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats', *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, no. 9, pp. 1217–1222, 2010.

- [74] M. Kanter and M. S. Met, 'Balb / C Türü Di ş i Farelerde Uniseksüel Gruplaman ın Östrus Siklusu Üzerine Etkileri', *yeni Tip Derg.*, vol. 7, pp. 235–239, 2010.
- [75] A. C. Gore *et al.*, 'EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals', *Endocr. Rev.*, vol. 36, no. 6, pp. 1–150, 2015.
- [76] E. L. Gregoraszczuk and A. Ptak, 'Endocrine-disrupting chemicals: Some actions of pops on female reproduction', *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2013, 2013.
- [77] A. Konieczna *et al.*, 'Serum bisphenol A concentrations correlate with serum testosterone levels in women with polycystic ovary syndrome', *Reprod. Toxicol.*, vol. 82, no. January 2016, pp. 32–37, 2018.
- [78] K. M. Seow, C. H. Ting, S. W. Huang, L. T. Ho, and C. C. Juan, 'The use of dehydroepiandrosterone-treated rats is not a good animal model for the study of metabolic abnormalities in polycystic ovary syndrome', *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 57, no. 5, pp. 696–704, 2018.
- [79] E. Kandaraki *et al.*, 'Endocrine disruptors and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no. 3, pp. 480–484, 2011.
- [80] B. H. Rashidi *et al.*, 'The association between bisphenol a and polycystic ovarian syndrome: A case-control study', *Acta Med. Iran.*, vol. 55, no. 12, pp. 759–764, 2017.
- [81] S. Divyashree, P. Janhavi, P. V. Ravindra, and S. P. Muthukumar, 'Experimental models of polycystic ovary syndrome: An update', *Life Sci.*, vol. 237, no. July, p. 116911, 2019.
- [82] Z. Yang *et al.*, 'A pilot study on polycystic ovarian syndrome caused by neonatal exposure to tributyltin and bisphenol A in rats', *Chemosphere*, vol. 231, pp. 151–160, 2019.
- [83] M. Fernández, N. Bourguignon, V. Lux-Lantos, and C. Libertun, 'Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats', *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, no. 9, pp. 1217–1222, 2010.
- [84] S. Bhuvaneshwari, R. Poornima, and H. I. Averal, 'Management of obesity in

- polycystic ovary syndrome induced albino rats with *Pergularia daemia*', vol. 1, no. 9, pp. 779–783, 2015.
- [85] M. Noroozadeh, S. Behboudi-Gandevani, A. Zadeh-Vakili, and F. Ramezani Tehrani, 'Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review', *Life Sci.*, vol. 191, pp. 259–272, 2017.
- [86] R. A. Wild, M. Rizzo, S. Clifton, and E. Carmina, 'Lipid levels in polycystic ovary syndrome: Systematic review and meta-analysis', *Fertil. Steril.*, vol. 95, no. 3, pp. 1073-1079.e11, 2011.
- [87] A. Romm, I. Burgess, D. Winston, S. M. Zick, and A. M. Q. Crawford, *Conditions of the reproductive organs*, First Edit. Elsevier Inc., 2010.
- [88] S. Jahan *et al.*, 'Therapeutic potentials of Quercetin in management of polycystic ovarian syndrome using Letrozole induced rat model: A histological and a biochemical study', *J. Ovarian Res.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–10, 2018.
- [89] R. Fraser, M. C. Ingram, N. H. Anderson, C. Morrison, E. Davies, and J. M. C. Connell, 'Cholesterol in the General Population', pp. 1364–1369, 1999.
- [90] N. Hanioka, H. Jinno, T. Nishimura, and M. Ando, 'Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver', *Arch. Toxicol.*, vol. 72, no. 7, pp. 387–394, 1998.
- [91] S. Patel, 'Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy', *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 182, no. February, pp. 27–36, 2018.
- [92] E. L. A. F. van Houten and J. A. Visser, 'Mouse models to study polycystic ovary syndrome: A possible link between metabolism and ovarian function?', *Reprod. Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 32–43, 2014.
- [93] Y. Wang, Q. Zhu, X. Dang, Y. He, X. Li, and Y. Sun, 'Local effect of bisphenol A on the estradiol synthesis of ovarian granulosa cells from PCOS', *Gynecol. Endocrinol.*, vol. 33, no. 1, pp. 21–25, 2017.
- [94] P. Galluzzo and M. Marino, 'Nutritional flavonoids impact on nuclear and extranuclear estrogen receptor activities', *Genes Nutr.*, vol. 1, no. 3–4, pp. 161–176, 2006.

- [95] E. Diamanti-Kandarakis, A. G. Papavassiliou, S. A. Kandarakis, and G. P. Chrousos, 'Pathophysiology and types of dyslipidemia in PCOS', *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 18, no. 7, pp. 280–285, 2007.
- [96] R. A. Wild *et al.*, 'Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: A consensus statement by the androgen excess and polycystic ovary syndrome (AE-PCOS) society', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 5, pp. 2038–2049, 2010.
- [97] P. A. Essah, J. E. Nestler, and E. Carmina, 'Differences in dyslipidemia between American and Italian women with polycystic ovary syndrome', *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 31, no. 1, pp. 35–41, 2008.
- [98] M. Wyss and R. Kaddurah-Daouk, 'Creatine and creatinine metabolism', *Physiol. Rev.*, vol. 80, no. 3, pp. 1107–1213, 2000.
- [99] M. Anraku, K. Yamasaki, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, and M. Otagiri, 'Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin', *Pharm. Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 632–639, 2001.
- [100] 'No Title'. [Online]. Available: <https://www.medicalpark.com.tr/albumin/>.
- [101] W. Moselhy, W. M. S. Ahmed, W. A. Moselhy, and T. M. Nabil, 'Bisphenol A Toxicity in Adult Male Rats: Hematological, Biochemical and Histopathological Approach', *Glob. Vet.*, vol. 14, no. 2, pp. 228–238, 2015.
- [102] W. N. Jefferson, E. Padilla-Banks, G. Clark, and R. R. Newbold, 'Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses', *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 777, no. 1–2, pp. 179–189, 2002.