



**NEONATAL DÖNEMDE DİŞİ RATLARA UYGULANAN BİSFENOL A’NIN UTERUSTA
OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİKLERE KARŞI MELATONİNİN OLASI ETKİSİNİN
HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

Damla DERNEK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2015

Damla DERNEK tarafından hazırlanan “Neonatal Dönemde Dişi Ratlara Uygulanan Bisfenol A’nın Uterusta Oluşturduğu Değişikliklere Karşı Melatoninin Olası Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Başkan: Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Rabet GÖZİL

Anatomi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 02/02/2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Damla DERNEK

02/02/2015

NEONATAL DÖNEMDE DİŞİ RATLARA UYGULANAN BİSFENOL A’NIN UTERUSTA
OLUŞTURDUĞU DEĞİŞİKLİKLERE KARŞI MELATONİNİN OLASI ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK
OLARAK İNCELENMESİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Damla DERNEK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ŞUBAT 2015

ÖZET

Bisfenol A (BPA), dünyada yaygın olarak kullanılan endokrin bozucu kimyasallardan biridir. Dişi sıçanlarla yapılan çalışmalarda, ergenlik döneminin süresini, over ve uterus ağırlıklarını, anogenital mesafeyi, vajinal açılış süresini, östrus döngüsünü etkilediği bilinmektedir. Melatonin ise, memelilerin epifiz bezi, over, lens, kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenmesi sonucu salgılanan bir hormondur. Literatür çalışmalarında melatoninin, bazı ilaçların toksisitesini azalttığı, follikül gelişimini indüklediği, antioksidan özelliği sayesinde de oosit kalitesini arttırdığı gösterilmektedir. Bu çalışmada, literatürle uyumlu olarak, neonatal dönemde BPA’ya etkin bırakılan dişi sıçanların uterus dokusunda oluşan değişiklikler yapısal düzeyde saptandı. Saptanan değişikliklere karşı prepubertal dönemde uygulanan melatoninin olası etkileri incelendi. Bunun için 24 adet Wistar-albino cinsi dişi sıçan dört eşit gruba ayrıldı ve doğdukları gün sıfır kabul edilerek neonatal dönemde deneye başlandı. Grup 1’e ait sıçanlar Kontrol (susam yağı+etanol) grubu olarak kullanıldı. Grup 2’ye ait sıçanlara 10 gün süresince 100 mg/kg oranında BPA (PND0-PND20) subkutan enjeksiyon yapıldı. Grup 3’e ait sıçanlara 10 gün süresince 10 mg/kg oranında Melatonin (PND20-PND30) subkutan enjeksiyon yapıldı. Grup 4’e ait sıçanlara 10 gün süresince 100 mg/kg BPA (PND0-PND10) ve 10 mg/kg oranında Melatonin (PND20-PND30) subkutan enjeksiyon yapıldı. Sıçanlar, PND70 evresinde sakrifiye edildi ve uterus dokuları alındı. Deney sonrası yapılan çalışmalar sonucunda BPA’nın, sıçanlarda vajinal açıklığın görülme süresini kısalttığı, erken puberteye ve uterus dokusunda dejeneratif değişikliklere neden olduğu, uterusun luminal ve glandüler epitelinde apoptotik reaksiyonları arttırdığı gözlemlendi. Ayrıca sıçanların vücut ve uterus ağırlıklarını arttırdığı, fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Bu durumun, uterus luminal epitel yüksekliği, miyometrium kalınlığı ve uterus bezleri açısından yapılan değerlendirmelerde bulunan sonuçlar ile uyumlu olduğu tespit edildi. Buna karşılık BPA’nın, uterus lümen çapını arttırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. BPA+Melatonin grubunda ise, oluşan bu dejeneratif değişikliklerin olumlu yönde etkilendiği belirlendi. Ayrıca melatonin grubunun bulguları ile Kontrol grubu bulgularının eş değer oldukları tespit edildi.

Bilim Kodu : 1061.4.101
Anahtar Kelimeler : Bisfenol A, melatonin, uterus, neonatal
Sayfa Adedi : 87
Danışman : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

HISTOPATHOLOGIC EXAMINATION OF POSSIBLE EFFECTS OF MELATONIN AGAINST THE ALTERNATION ON UTERUS OF NEONATAL EXPOSURE TO BISPENOL A IN FEMALE RATS

(M. Sc. Thesis)

Damla DERNEK

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

FEBRUARY 2015

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is one of the widely used endocrine disrupting chemicals in the world. Studies on female rats show that BPA effects on the period of puberty, ovarian and uterine weights, anogenital distance, the vaginal opening time and estrous cycle. Melatonin is a hormone which is synthesized and secreted from mammalian pineal gland, ovary, lens, bone marrow cells, the gastrointestinal tract and bile. Some studies which are situated in literature that melatonin reduces the toxicity of some drugs, induces follicular development, and increases the quality of oocyte, due to its antioxidant property. In this study, compatible with the literature, Female rats exposed with BPA in neonatal period. After this exposure, there was detected degenerations in uterus tissue of these rats. Possible effects of melatonin investigated against these degenerations implement in prepubertal period. For these purpose, twenty-four female Wistar-albino rats were divided equally into four groups. Rats in Group I were used as control (sesame oil + ethanol). Rats in Group II were injected daily with BPA (100 mg/kg) subcutaneously for 10 days (PND0-PND10). Rats in Group III were injected daily with melatonin (10 mg/kg) subcutaneously for 10 days (PND20-PND30). Lastly, rats in Group IV were injected daily with BPA (100 mg/kg) (PND0-PND10) and melatonin (10 mg/kg) (PND20-PND30) subcutaneously for 10 days. At the end of the experimental period, all rats were sacrificed on the PND70 stage and the uterine tissue of rats were removed. As a result of studies, it was observed that BPA decreases the time of the vaginal opening, increases apoptotic reaction rates of the uterus luminal and glandular epithelium, causes early onset puberty period and degenerative changes of the uterine tissue in rats. BPA was also increased the rats body/uterus weight but the results were not statistically significant (These results coherent with results of BPA uterine luminal epithelium height, myometrium thickness and uterine glands.). On the contrary, BPA increased uterine lumen diameter and the results were statistically significant. In rat groups which exposed with BPA+Melatonin, the degenerative changes also changed positively. Furthermore, rat groups which exposed with melatonin findings were same with Control Groups.

Science Code : 1061.4.101

Key Words : Bisphenol A, melatonin, uterus, neonatal

Page Number : 87

Supervisor : Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN başta olmak üzere yüksek lisans öğrenimim süresince hoşgörüsü, sabrı ve desteği ile her zaman yanımda olan çok değerli Danışmanım Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na, hem eğitimimde hem de gelişmemde katkıları olan değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Tahir HATİPOĞLU'na, Prof. Dr. Celal ILGAZ'a, Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a, Prof. Dr. Gülnur TAKE'ye, Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı (GÜBAP) tarafından 01/2013-11 nolu "Neonatal Dönemde Dişi Ratlara Uygulanan Bisphenol A'nın Uterus Ve Ovaryumda Oluşturduğu Değişikliklere Karşı Melatoninin Olası Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi" isimli yüksek lisans tezi araştırma projesi kapsamında sağlanan maddi destekler için kuruma teşekkür ederim.

Çalışmalarım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Tuncay PEKER'e ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan sevgili hocam Prof. Dr. Rabet GÖZİL'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek ve yardımcı olan Anabilim Dalımızda görev alan tüm araştırma görevlilerine, tez çalışmalarım boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan, yol gösteren sevgili Neslihan COŞKUN'a, dönem arkadaşlarıma ve Anabilim Dalı personeli Recep ORHAN'a teşekkür ediyorum.

Sevgi, destek ve sonsuz güvenleri ile bugünlere gelmemi sağlayan koşulsuz anlayışlarıyla yanımda olan sevgili aileme ve yardımları için Özgür ÇETİNER'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Uterus.....	5
2.1.1. Uterusun gelişimi	5
2.1.2. Uterusun anatomisi.....	7
2.1.3. Uterusun histolojisi	13
2.1.4. Uterusun fizyolojisi	18
2.2. Ratlarda Östrus Siklusu	20
2.3. Bisfenol A	22
2.3.1. Genel bilgiler	22
2.3.2. Yapısı ve tarihçesi.....	23
2.3.3. Kullanım alanları	24
2.3.4. Migrasyon ve metabolizması	25
2.3.5. Toksisitesi	26
2.4. Antioksidanlar	27

	Sayfa
2.4.1. Melatonin.....	27
2.5. Apoptozis.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	35
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	35
3.2. Vajinal Açıklık ve Puberte Tayini	36
3.3. Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi	37
3.4. TUNEL Yöntemi	37
3.5. İstatistiksel Yöntem	38
4.BULGULAR	41
4.1. Vajinal Açıklık ve Puberte Tayini Bulguları	41
4.2. H&E Bulguları	43
4.3. TUNEL Bulguları.....	52
4.4. İstatistiksel Bulgular	55
4.4.1. Vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	55
4.4.2. Organ ağırlıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	56
4.4.3. H&E bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	57
4.4.4. TUNEL bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	62
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ	75
KAYNAKLAR	77
EKLER.....	85
EK-1. Etik kurul onayı	86
ÖZGEÇMİŞ	87

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Gruplara ait vajinal açıklık dönemlerindeki ortalama kiloları.....	43
Çizelge 4.2. Gruplara ait vücut ağırlıklarının artış ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri.....	55
Çizelge 4.3. Gruplara ait uterus ağırlık ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri	56
Çizelge 4.4. Gruplara ait epitel yüksekliğinin ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri.....	58
Çizelge 4.5. Gruplara ait miyometrium kalınlığının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri	59
Çizelge 4.6. Gruplara ait uterus bez yoğunluğunun ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri	59
Çizelge 4.7. Gruplara ait uterus lümen çapının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri.....	60
Çizelge 4.8. Gruplara ait epitel yüksekliği, miyometrium kalınlığı, bez yoğunluğu ve lümen çapının Kruskal Wallis testine göre kıyaslanması	62
Çizelge 4.9. Gruplara ait luminal epitel ve glandüler epitelde apoptozise giden hücre sayısının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri	63
Çizelge 4.10. Gruplar arası luminal epitel ve glandüler epitelde apoptozise giden hücre sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	65

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.2. Melatoninin antioksidan özellikleri	31
Şekil 2.3. Apoptozise uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler	33
Şekil 4.1. Gruplara ait vücut ağırlıkları artışı	55
Şekil 4.2. Gruplara ait uterus ağırlık artışı.....	57
Şekil 4.3. Kontrol, BPA, Melatonin ve BPA+Melatonin gruplarının epitel yüksekliği, miyometrium kalınlığı, bez yoğunluğu ve lümen çapı ortalamaları	61
Şekil 4.4. Gruplara ait luminal epitel ve glandüler epitelde apoptozise giden hücre sayısı	63

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. BPA grubuna ait vajinal açıklık (siyah ok) (a) ve vajinal smear (kırmızı ok) (b)	41
Resim 4.2. BPA+Melatonin grubuna ait vajinal açıklık (siyah ok) (a) ve vajinal smear (kırmızı ok) (b).....	41
Resim 4.3. Melatonin grubuna ait vajinal açıklık (siyah ok) (a) ve vajinal smear (kırmızı ok) (b)	42
Resim 4.4. Kontrol grubuna ait vajinal açıklık (siyah ok) (a) ve vajinal smear (kırmızı ok) (b)	42
Resim 4.5. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, tek katlı prizmatik epitel (kırmızı ok), lamina propriadan (lp) oluşan endometrium katı (em), düz kas tabakasından oluşan miyometrium katı (mm), seroza (mavi ok) ayırt edilmekte (H&E, x40)	44
Resim 4.6. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, tek katlı prizmatik epitel (kırmızı ok) ile lamina proprianın (lp) yüzeyel katında bulunan tübüler yapıdaki uterus bezleri (★), interglandular stromadaki kandamarı (kd) izlenmekte (H&E, x100)	44
Resim 4.7. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, tek katlı prizmatik epitel oluşturan silyalı hücreler (siyah ok) ile silyasız salgı yapan prizmatik hücreler (yeşil ok), lamina propriadan tübüler yapıdaki uterus bezleri (★), interglandular stromada fibroblastlar (fb) ile kollagen lifleri (co) dikkati çekmekte (H&E, x40)	45
Resim 4.8. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, lamina propriadan tübüler yapıdaki uterus bezlerinin görüldüğü endometrium katı (em), longitudinal seyirli düz kaslardan oluşan miyometrium katı (mm) ile miyometriumu çevreleyen seroza (se) katı görülmekte (H&E, x100)	45
Resim 4.9. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, küçük büyültmede kontrol grubuna göre artmış uterus lümen çapı (↔), sınırları net olarak ayırt edilemeyen endometrium, miyometrium ve seroza katları (H&E, x100)	46

Resim	Sayfa
Resim 4.10. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, luminal epiteli oluşturan net olarak ayırt edilemeyen silyalı ve silyasız salgı hücreleri arasında heterokromatik görünümlü çekirdek benzeri oluşumlar içeren köpüksü görünümlü boşluklar (siyah oklar) görülmekte (H&E, x40).....	47
Resim 4.11. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, lamina propriada yer yer ödematöz alanlar (✚) görülmekte (H&E, x40)	47
Resim 4.12. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, miyometrium katını (mm) oluşturan longitudinal düzenlenimli düz kas tabakasında kontrol grubuna göre artış olduğu ve kas tabakasını saran serozanın (se) gevşek bağ dokusunun mezotelden oluşmuş olduğu görülmekte (H&E, x40)	48
Resim 4.13. Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, lümen çapında (↔) meydana gelen değişiklikler ve uterusu ait endometrium (em), miyometrium (mm) ve seroza (se) katları ayırt edilmekte (H&E, x10)	49
Resim 4.14. Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, luminal epiteli oluşturan prizmatik silyalı hücreler ve silyasız salgı hücreleri (siyah ok) görülmekte (H&E, x40)	49
Resim 4.15. Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, normal yapıdaki interglandular stroma (➤) ve kalınlığı diğer gruplara göre azalmış olan miyometrium katı (mm) görülmekte (H&E, x40)	50
Resim 4.16. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, luminal epitel, uterus bezlerini içeren lamina propria, miyometrium ve seroza katları ayırt edilmekte ve lümen çapının BPA ve Kontrol grubuna göre azalmış olduğu görülmekte (H&E, x100)	51
Resim 4.17. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, luminal epitel hücrelerinin BPA grubuna göre daha düzeli olduğu ve aralarında BPA grubuna oldukça az olan heterokromatik çekirdekleri olan köpüksü görünümlü kavitasyonlar görülmekte (H&E, x40)	51
Resim 4.18. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, interglandular stromayı oluşturan yapıların BPA grubuna göre düzelmiş olduğu, ödematöz alanların (★) kaybolduğu, miyometriumu (mm) oluşturan longitudinal kas lifleri ve seroza (se) belirgin olarak ayırt edilmekte (H&E, x40).....	52

Resim	Sayfa
Resim 4.19. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde a)x100, b)x400, c)x400, d)x400 büyültmelerinde TUNEL yöntemi ile fizyolojik apoptozis luminal epitelde (siyah ok) ve glandüler epitelde (kırmızı ok) gözlendi (DAB&Metilen Green)	53
Resim 4.20. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, a)x100, b)x400, c)x400 büyültmelerinde TUNEL yöntemi ile Kontrol grubuna göre luminal epitelde (siyah ok) ve glandüler epitelde (kırmızı ok) apoptotik reaksiyonda artış gözlendi (DAB&Metilen Green)	53
Resim 4.21. Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, a)x100, b)x400 büyültmelerinde TUNEL yöntemi ile luminal epitelde (siyah ok) ve glandüler epitelde (kırmızı ok) Kontrol grubuna eşdeğer apoptotik reaksiyon gözlendi (DAB&Metilen Green).....	54
Resim 4.22. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, a)x100, b)x400 büyültmelerinde TUNEL yöntemi ile luminal epitelde (siyah ok) ve glandüler epitelde Kontrol grubuna eşdeğer apoptotik reaksiyon gözlendi (DAB&Metilen Green).....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
L	Litre
g	Gram
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
kg	Kilogram
mg	Miligram
mm	Milimetre
H_2O_2	Hidrojen peroksit
OH	Hidroksil radikali
ONOO^-	Peroksinitrit

Kısaltmalar

Açıklamalar

a.	Arteria
BPA	Bisfenol A
CAT	Katalaz
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDC	Endokrin Bozucu Kimyasal
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
gl.	Glandula
GnRH	Gonadotropik Serbestleştirici Hormon
GR	Glutasyon redüktaz
GSH-Px	Glutasyon
H&E	Hematoksilen-Eozin

Kısaltmalar**Açıklamalar**

hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu
IVF	In Vitro Fertilizasyon
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LH	Lüteinize Edici Hormon
Lig.	Ligamentum
m.	Musculus
NAT	N-asetil transferaz
PVC	Polivinil Klorür
ROM	Reaktif Oksijen Metabolitleri
ROS	Reaktif Oksijen Bileşikleri
SCG	Servikal gangliyon
SCN	Suprakiazmatik çekirdek
SOD	Süperoksit dismutaz
TBF	Testis Belirleyici Faktör
TDI	Tölere edilebilir alım miktarı
TGF-β	Transforming Growth Factor
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TNF	Tümör Nekroz Faktör
v.	Venae

1.GİRİŞ

Endokrin bozucular, doğada doğal olarak bulunabildiği gibi değişik sentetik ve endüstriyel ürünlerin içeriğinde de bulunabilen endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değiştiren, ekzojen madde veya madde karışımlarıdır [1]. Bisfenol A (BPA), ilk olarak Rus kimyager Dianin tarafından 1891’de sentezlenmiş, 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan yapısında bir madde olup, dünyada yaygın olarak kullanılan endokrin bozucu kimyasallardan biridir [2].

BPA’nın primer endokrin bozucu etkisinin yanında, endojen östrojenlerin aktivitesinde değişiklikler, tiroid hormon fonksiyonunda bozukluklar, merkezi sinir sisteminin baskılanması ve androjenik hormonlar üzerine etkileri olduğu da gösterilmiştir. BPA, özellikle plastik sanayisinde biberon, su şişeleri gibi değişik plastik ürünlerin yapımında; sebzeler, içecekler, süt tozu gibi gıda ve içeceklerin ambalajlanmasında; metal kutuların iç yüzeylerinin kaplanmasında; diş yapımı ve tedavi malzemelerinde; sanayide köpük ve paketlenme sistemlerinde; boya, peptisid, herbisid maddeler gibi pek çok üründe kullanılmaktadır [1, 3, 4].

BPA’ya etkin kalma oral, dermal veya inhalasyon yolu ile olabilmektedir. BPA’nın ambalaj materyallerinden gıda maddelerine geçebildiği bu yüzden de oral yolla BPA’ya etkin kalmanın çok yüksek oranlarda olduğu belirtilmiştir. BPA’nın tamamına yakınının idrarla atıldığı belirlenmişse de vücutta idrardan (0,4-149 µg/L) başka kan (0,1-10 µg/L), yağ dokusu, semen, anne sütü, amniyotik sıvı (0,1-10 µg/L), plasenta, fetus, kordon kanı ve tükürükte de bulunduğu bildirilmiştir [5]. Bu maddeye etkin kalındıktan sonra, yağda çözünen maddeler oldukları için dokularda birikim eğiliminde oldukları gösterilmiştir [6].

BPA’ya oral veya intraperitoneal olarak maruz kalmış erkek sıçanlarda anogenital açıklığın azaldığı, prostat büyümesi, epididimal ağırlıkta azalma, testis ağırlığında artış, günlük sperm üretimlerinde ve total sperm sayılarında azalma, fertilitede azalma, spermde oksidatif stresin indüksiyonu gibi etkilere neden olduğu gözlenmiştir. Dişi sıçanlarla yapılan çalışmalarda ise ergenlik döneminin süresini, over ve uterus ağırlıklarını, anogenital açıklığı, vajinal açıklık görülme süresini, sağ kalım oranlarını, gebelik süresini,

östrus döngüsünü etkileyerek üreme fonksiyonlarının insidansını etkilediği gösterilmiştir [7].

BPA'ya etkin kalan sıçanlarda süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri azalırken, reaktif oksijen bileşiklerinin (ROS) ve lipid peroksidasyonun anlamlı ölçüde arttığı belirtilmiştir [8]. BPA'nın biriktiği dokularda ROS aracılığı ile hücresel protein ve lipidlerin oksidatif hasarına bağlı olarak hücre düzeyinde de hasara neden olduğu gözlenmiştir [9].

Melatonin [N-asetil-5-metoksitriptamin] memelilerin epifiz bezinden, over, lens, kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur. Melatonin hormonu, aydınlık-karanlık siklusu ile ilişkili bilgiyi vücudun fizyolojisine aktararak sirkadiyen ritmin ve organizmanın fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar [10].

Melatonin hormonunun organlar ve sistemler üzerine birçok etkisi vardır. Melatonin sekresyonunun baskılanması, serum kalsiyum konsantrasyonunu düşürürken, melatonin uygulaması serum kalsiyum düzeyini arttırmaktadır. Kardiyovasküler sisteme, kemiklere, Merkezi sinir sistemine ve Reprodüktif sistem üzerine olan etkilerine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Bazı vücut hücrelerinde anti-apoptotik etkili, kanser hücrelerinde de pro-apoptotik etkili olduğu görülmüştür. Melatoninin bazı ilaçların toksisitesini azalttığı ve/veya etkinliğini arttırıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [11, 12].

Melatonin hormonunun follikül gelişimini indüklediği, antioksidan özelliği sayesinde de oosit kalitesini arttırdığı, embriyo gelişimini hızlandırdığı, granüloza hücre luteinizasyonunu arttırdığı ve progesteron üretiminde artışa yol açtığı için in vitro fertilizasyon (IVF) programlarında infertil kadınların tedavisinde pozitif sonuçlar alındığı gösterilmiştir. Pineal bezi alınan hayvanlarla yapılan bir çalışmada ise atretik follikül sayısının arttığı görülmüştür [13]. Melatonin hormonunun güçlü bir serbest radikal temizleyicisi ve geniş spektrumlu bir antioksidan olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca lipid peroksidasyonunu, proteinlerin oksidasyonunu ve DNA hasarını önlediği, mitokondriyal oksidatif stresi azaltarak mitokondrinin en uygun düzeyde işlev

görmesini sağlayarak apoptozis ve hücre ölüm sürecini de yavaşlatabildiği belirtilmiştir. Melatoninin hidroksi radikallere olan antioksidan etkisinin, diğer antioksidanlardan daha fazla olduğu ve antioksidan enzimleri aktive ettiği bilinmektedir [14, 15].

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada literatürle uyumlu olarak neonatal dönemde BPA'ya etkin bırakılan dişi sıçanların uterus dokusunda oluşabilecek değişiklikleri yapısal düzeyde saptamak ve oluşabilir değişikliklere karşı prepubertal dönemde uygulanan melatoninin olası etkilerini saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterus

2.1.1. Uterusun gelişimi

Genetik olarak cinsiyet, döllenme sırasında belirlense de gelişimin 7. haftasına kadar dişi ve erkekte benzer özellikler görülmektedir. Bu nedenle embriyonik gelişimin bu evresine farklanmamış evre denir [16, 17].

Cinsiyetin belirlenmesi ve farklanması, çok sayıda otozomal ve resesif genin rol oynadığı karmaşık bir süreçten oluşmaktadır. Seksüel dimorfizmin anahtarı, Y kromozomunun kısa kolu (Yp11) üzerindeki SRY genidir (Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge). Bu genin protein ürünü testis belirleyici faktördür (TBF). TBF, cinsiyet organlarının farklanmasını düzenleyen genlerin harekete geçirilmesini sağlar. Fetusun cinsiyeti bu faktörün varlığında erkek tipinde; yokluğunda ise kız tipinde gelişir [17].

Gonadlar; mezodermal epitel, embriyonik bağ dokusu ve ilkel germ hücrelerinden köken alırlar. Kölom epitelinin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla gonadlar ortaya bir çift uzunlamasına genital veya gonadal sırt halinde çıkarlar. Gelişimin 6. haftasına kadar genital sırtlar içinde germ hücreleri gözlenmez [17, 18].

Primordiyal germ hücreleri, epiblasttan köken alır. Primitif çizgi boyunca göç eder ve 3. haftada vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. 4. haftada ameboid hareketlerle sonbarsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşırlar. 6. haftada da genital sırtları işgal ederler [16, 17].

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaştıkları sırada genital sırttaki epitel hücreler proliferasyon olarak alttaki mezenşimin içine gömülür ve burada ilkel cinsiyet kordonlarını oluştururlar. İlkel cinsiyet kordonları, kısa sürede alttaki mezenşimin içine doğru büyüyerek, dışta korteks, içte medulla bölgelerini oluşturur. Bu evrede erkek ve dişi

gonadlar birbirinden ayırt edilemediğinden 'farklanmamış gonad' olarak isimlendirilirler. Embriyo XX cinsiyet kromozomunu içeriyorsa, farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma farklanırken, medullası geriler. XY cinsiyet kromozomuna sahipse medulla testise farklanırken, korteks gerileyip dejenere olur [16, 17, 18].

Erkek ve dişi embriyolarda iki çift genital kanal bulunur. Paramezonefrik kanal (Müllerian kanalı) dişi üreme sistemi, mezonefrik kanal (Wolffian kanalı) ise erkek üreme sisteminin gelişiminde yer alır. 4. haftanın sonunda, ürogenital sırtın ön-yan yüzeyindeki epitelin uzunlamasına içe çökmesi ile paramezonefrik kanal oluşur. Kanal, üst ucundan karın boşluğunun içine huni biçiminde açılırken, alt kısmı da önce mezonefrik kanalın yanında uzanır ve onu önden çaprazlayıp, kaudomedial yönde gelişmeyi sürdürür [17].

Dişi embriyolarda, Leydig hücrelerince sentezlenen testosteron hormonu olmadığından, Mezonefrik kanallar geriler; Sertoli hücrelerince salgılanan 'Müllerian Baskılayıcı Madde' (MIS) yokluğu nedeniyle paramezonefrik kanallar gelişir. Erkek cinsiyet gelişiminin uyarılması için testosteron hormonunun gerekli olmasına karşın, dişi cinsiyet gelişiminde ovaryumlar ve hormonların varlığı gereksizdir. Dişilerde esas genital kanallar paramezonefrik kanallarca oluşturulur. Başlangıçta her kanalda tanımlanabilir 3 kısım vardır [17]:

- a) Karın boşluğuna açılan vertikal parça
- b) Mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal parça
- c) Karşı taraftan gelen eşiyile birleşen kaudal vertikal parça

Ovaryumların aşağı inmeleri ile birlikte ilk iki parçadan tuba uterinalar gelişir. Bunların kaudal kısımları da uterus kanalını oluşturmak için kaynaşırlar [17, 18].

Paramezonefrik kanalların kranial vertikal parçalarının açık üst uçları tuba uterina'ların fimbriyalarını meydana getirir. Aynı zamanda kranial vertikal parçadan, tuba uterina'ların infundibulum ve ampulla kısımları da oluşur. Horizontal parça ise isthmusu biçimlendirir. Başlangıçta vertikal olarak yerleşim gösteren tuba uterinalar, uterusun gelişmesi sırasında karın boşluğunun iç kısmına doğru hareket eder ve horizontal hale gelirler [19].

Paramezonefrik kanalların birleşmesi ile iki peritoneal katlantı da birleşerek, sağ ve sol kalın (broad) ligamentler ile uterorektal ve uterovesikal çukurlar oluşur. Kaynaşan paramezonefrik kanallardan uterusun gövde ve serviks kısımları gelişir. Bu yapıların çevresi uterusun kas katmanı miyometriyum'u ve periton örtüsü olan perimetriumu oluşturan mezenşim tabakasıyla sarılır. Serviks, paramezonefrik kökenli olmasına karşın, müköz membranları ürogenital sinüsten köken alır [16, 19].

İnsan uterusları başlangıçta çift boynuzlu şekildedir. İnsanda uterusun gelişimi bazen çift boynuzlu evresinde kalabilir. Normalde bu iki boynuz arasında mezenşim çoğalması gerçekleşir ve uterus erişkinlerdeki armut biçimini alır [20, 21].

Paramezonefrik kanalların uzunlukları boyunca veya herhangi bir bölgesinde kaynaşmamaları sonucunda uterus duplikasyonları oluşur. En şiddetli şekli olan *uterus didelphis*de iki uterus ve iki serviks vardır. En hafif şekli olan *uterus arcuatus*ta uterus korpusunun ortasından lümen içine doğru hafif bir çıkıntının olduğu gözlemlenir. Sık görülen uterus anomalilerinden biri de, uterusun ortak bir vajinaya iki boynuz şeklinde açıldığı *uterus bicornis*dir. Uterus bicornisin, çift serviksin bulunduğu *uterus bicornis bicollis* ve tek serviks, tek tuba uterinanın bulunduğu *uterus bicornis unicollis* olmak üzere iki türü vardır [16, 17, 22].

Gelişim sırasında, bazen mezovaryumda bulunan, üst ve alt mezonefrik kanal kalıntıları görülebilir. Bunların bazıları, ovaryum ve tuba uterina arasında, mezovaryumda bulunan *epoophoron* artıklarıdır. Uterusa yakın yerleşimli bazı rudimenter tübüller de *paroophoron* olarak kalırlar. Mezonefrik kanalın, duktus deferens ve ejakülatör kanala denk gelen bazı bölümleri; vajina duvarı içerisinde veya uterusun yan duvarları boyunca kalın ligament katmanları arasında "*Gartner kanalı*" olarak görülebilir. Bu kanal kalıntılarından da *Gartner kistleri* oluşabilir [16, 19, 22].

2.1.2. Uterusun anatomisi

Uterus (rahim, dölyatağı), vücut orta düzleminde, pelvis boşluğu içerisinde, içi boş, armut biçimli ve kalın kaslı duvarları olan bir organdır. Rektumun önünde, vesica urinarianın

(mesane) arkasında ve vaginanın üstünde yer alır. Üstten ise ince bağırsak kıvrımları ile komşuluktadır. Uterusun abdominal bölümü tuba uterina, pelvis içindeki bölümü ise vagina ile devam eder [23].

Uterus; tabanı yukarıda, tepesi aşağıda ters konumlu bir armuta benzer. Önden ve arkadan hafif basıktır. Organın uzun eksenini orta planda yerleşim gösterir ve uterusun pelvis eksenine uyan ve öne-aşağıya bakan bir konkavitesi vardır. Ağırlığı 50-80 gr. arasında olup, doğum yapmış kadınlarda yapmamışlara göre farklılıklar göstermektedir. Uzunluğu yaklaşık olarak 7-9 cm, genişliği 5 cm, duvar kalınlığı ise 2,5 cm kadardır. Gebelikte uterus büyür, ayrıca şekil ve duruş yönünden de değişiklikler gösterir. Doğumdan sonra neredeyse eski haliyle aynı duruma döner [24].

Uterus yapı, işlev ve anatomik olarak corpus uteri, fundus uteri ve cervix uteri bölümlerinden oluşur. Tuba uterinaların uterusu açılış yerlerinin altındaki bölüm corpus uteridir. Corpus ve cervix uteri arasında, yaklaşık 1 cm uzunluğunda isthmus uteri denilen, corpus uterinin en dar yeri olan bir bölümdür [23, 24].

Corpus uteri (gövde): Tuba uterinaların giriş yaptığı yerlerin altında kalan ve uterusun geniş 2/3 üst bölümüdür. Tabanı yukarıda, tepesi aşağıda bir üçgene benzer. Önden arkaya basık olan corpus uterinin iki yüzü ve üç kenarı vardır. Buranın ön yüzü düz, arka yüzü konvekstir. Aşağı doğru daralır ve cervix uteri ile devam eder. Corpus ve cervix uteri birbirinden, isthmus uteri ile ayrılır. Bu bölüm yaklaşık 1 cm uzunluğundadır ve corpus uterinin en dar yeri olan ara bir bölümdür [24].

Corpus uterinin *facies anterior* ve *facies posterior* olmak üzere iki yüzü vardır:

Facies anterior, uterusun ön yüzü olup mesanenin (vesica urinaria) üst yüzü ile komşuluk yapmaktadır. Corpus uteriye örten periton, mesanenin üst yüzünden atlayarak *excavatio vesicouterina* adı verilen çıkmazı oluşturur.

Facies posterior, rektuma bakar. Rectum ile arasında, ince bağırsaklar ve colon sigmoideum bulunur. Facies posteriory örten peritonun, arka-aşağı bölgede vaginanın

arka yüzünün üstünü de örttükten sonra rektuma geçmesi sonucu, bu iki organ arasında oluşan çıkmaza ise excavatio rectouterina (Douglas çıkmazı) adı verilir. Bu çıkmazı oluşturan plika da plica rectouterina (Douglas plikası) olarak adlandırılır [24, 25].

Corpus uteri içinde, *cavitas uteri* denilen yaklaşık 6 cm uzunluğunda bir boşluk vardır. Uterus duvarının kalın olması nedeniyle organın büyüklüğüne oranla daha küçük bir boşluktur. Cavitas uterinin ön ve arka duvarları sürekli birbirlerine değdikleri için sagittal kesitlerde bir yarık, koronal kesitlerde ise üçgen şeklinde görülür [24, 25].

Fundus uteri: Fundus uteri, uterusun en geniş kısmıdır. Tuba uterinaların corpus uteriye bağlandığı yerin üstünde kalan kubbe şeklinde olan peritonla örtülü kısmıdır. İnce bağırsak kıvrımları ve colon sigmoideum ile komşuluk yapar. Corpus uteri, fundustan isthmusa doğru daralır ve serviks uteri ile birleşir [24].

Cervix uteri (Serviks): Uterusun daha dar olan 1/3 alt parçasıdır ve isthmus uteri ile vagina arasında kalan kısımdır. Yaklaşık 2,5 cm uzunluğundadır. Uterusun en sabit bölümüdür. İçinde, yukarıda cavitas uteri, aşağıda vagina ile devam eden *canalis cervicis uteri* denilen bir kanal bulunur. Bu kanal, isthmus uteri ile ostium uteri arasındadır. Ostium internum, canalis cervicis uteri ile uterus boşluğuna açılırken ostium externum, canalis cervicis uteri aracılığıyla vaginaya açılır. Dış deliğe ostium uteri adı da verilir. Canalis cervicis, önden arkaya basık, orta bölümü daha geniş bir boşluktur. Bu kanalın iki ucu, orta bölümüne oranla daha dardır. Bu kanalın ön ve arka duvarında uzunlamasına seyreden birer çıkıntı bulunur. Bu çıkıntılardan yan tarafa doğru uzanan plikalara, *plicae palmatae* denir. Öndeki plikalar, arkadaki plikalar arasındaki oluklara girer. Bu nedenle kanalı iyice kapatırlar. Ostium internum, canalis cervicis uteri ile uterus boşluğuna açılırken ostium externum, canalis cervicis uteri aracılığıyla vaginaya açılır [24, 25, 26].

Cervix uterinin alt kısmı vaginanın içine doğru uzanmıştır. Cervix uterinin vagina içerisine giren bu bölümüne portio vaginalis cervicis, yukarısında kalan bölümüne ise portio supravaginalis cervicis ismi verilir.

Portio supravaginalis cervicis, cervix uteri'nin vaginanın üstünde kalan 2/3'lük üst bölümünü oluşturur. *Portio vaginalis cervicis*, cervix uterinin vagina içinde kalan 1/3'lük kısmıdır. Vaginanın ön duvarı üzerine sarkar. Bunun sonucunda vagina ile aralarında fornix vaginae denilen bir oluk oluşur (fornix posterior). Portio vaginalisin tam ortasında ostium uteri bulunur. Vaginanın arka duvarına doğru bakan bu delik hiç doğum yapmayan kadınlarda ufak ve yuvarlak, doğum yapanlarda ise enine bir yarık şeklindedir [24].

Uterusun konumları

Birçok kadında uterusun uzun eksenini ile vaginanın uzun eksenini arasında, açıklığı öne bakan 90°'lik bir açı oluşur. Bu pozisyona anteversio uteri denir. Bunun yanında corpus uterinin uzun eksenini, eksternal os seviyesinde, açıklığı öne bakan, cervixin uzun eksenini ile 170°'lik bir açı yapar. Bu pozisyona da anteflexio uteri denir.

Bazı durumlarda fundus ve corpus uteri vaginanın arkasına doğru eğilerek excavatio rectouterina içinde bulunabilirler. Bu durumdaki uterusu retroversio uteri denir. Eğer corpus uteri de cervix uteriye göre arkaya doğru bükülmüş ise retroflexio uteri pozisyonu oluşur.

Mesanesi boş olan ve ayakta duran kadınlarda uterus neredeyse yatay konumdadır [27].

Uterusun ligamentleri

M. levator ani; pelvis çıkımının büyük bölümünü örttüğünden uterusun konumunu koruyan en önemli yapıdır. M. levator ani kasıldığında, artmış karın içi basınca karşı koyar. M. levator aninin ön parçasını oluşturan kas lifleri, bu kası örten fascia aracılığı ile cervix uteriye tutunur. Böylece uterusun aşağıya doğru yer değiştirmesi önlenmiş olur [27].

Lig. transversum cervicis (lig. cardinale); vaginanın üst ve cervix uterin alt bölümlerinden bu yapıları önden ve arkadan sararak, vagina ve cervix uterin yan kısımlarında bir araya gelerek pelvis yan duvarlarına doğru uzanırlar. Böylece pelvis döşemesi içinde uzanan bağ dokusu lifleri pelvis yan duvarlarına tutunur. Lig. transversum

cervicis içindeki uterusa ait damarlar ile birlikte cervix desteklenir. Özellikle retroversio uteri konumunda, lig. transversum cervicis'lerin tutucu etkileri daha belirginleşir. Lig. transversum cervicisin ön tarafa uzanan lifleri lig. pubovesicale, arka tarafa uzanan lifleri ise lig. sacrocervicale ile devam eder. Lig. transversum cervicis içinde a. vaginalis bulunur [27].

Lig. pubocervicale; pubisin arka yüzünü cervix uteriye bağlayan şerit biçimindeki bağlardır. Bu bağ mesanenin yanından geçerken mesaneye de tutunur [27].

Lig. sacrocervicale; lig. transversum cervicisin arka kısmından oluşur. İçinde m. rectouterinus denilen düz kas lifleri bulunur. Bu bağın excavatio rectouterinaların yanlarındaki sınırları plicae rectouterinaları oluşturur [27].

Lig. latum uteri (geniş bağ); uterusun yan kenarlarında birleşir. Pelvisin yan duvarına uzanarak buradaki periton ile devam eder. Ovarium, tuba uterina, uterus ile mesane ve rectum arasında enine olarak bulunur. Lig latum uteri'nin cervix uteri'de tabandan başlayıp ışınsal şekilde dağılarak pelvis duvarına tutunan liflere lig. cardinale uteri (Mackenrodt bağları) adı verilir. Parametrium'u oluşturan liflerin ön, yan ve arkaya uzanması sonucu uterus'u taşıyan önemli bağlardan lig. transversum cervicis, lig. pubocervicale ve lig. sacrocervicale şekillenir. Bu oluşumlar uterus'un tutucu bağlarından. Lig. latum uteri'nin, uterus'un yan taraflarına tutunan kısmı uterus'u her iki taraftan destekleyip korur [28].

Lig. teres uteri (yuvarlak bağ); Gubernaculum artığıdır. Uterusun gövdesinden pelvis girimine kadar uzanır. Burada canalis inguinalisten geçerek labium majus pudendiye girer [27].

Lig. uterosacralis; rectumun yan taraflarından geçerek cervix uteriye m. piriformisin fasiasına bağlar. Bunlar lig. teres uterinin ön tarafa çekmek istediği cervix uteriye arka tarafa doğru çekerek stabilize eder [28].

Lig. ovarii proprium; Uterusu ovaryuma bağlayan ve yanlarda bulunan bağıdır. Lig. latum uteri'nin arka katlantısını yapar [28].

Uterusun damarlanması ve sinirleri

Uterus'a, a. iliaca communis'ten ayrılan a. iliaca interna'nın dalı olan a. uterina gelir ve organı besler. A. uterina üstte a. ovarica (pars abdominalis aorta'nın dalı), altta a. vaginalis ile anastomoz yapar. A. uterina'nın dalları lig. latum uteri içinde kıvrımlar yaparak yükselir ve uterus duvarına giren dalları aa. arcuatae anteriores ve aa. arcuatae posteriores olarak gruplara ayrılır. Bu dallar dairesel olarak miyometrium'a ilerler ve karşı taraftan gelen dallar ile anastomoz yapar [27, 28].

Uterusun venleri uterus arterlerini izler ve v. iliaca internaya boşalırlar. Uterus venleri, cervix uterinin yan taraflarında plexus venosus uterinus adı verilen ven ağını oluştururlar. Ağdan çıkan venler ise (venae uterinae) v. iliaca internaya açılırlar. V. iliaca interna; cavitas pelvisi terk eder ve pelvis girişinin hemen üst yanında bulunan v. iliaca communis ile birleşir [27, 28].

Uterusun lenf drenajı üç yol ile olur. Fundus uteriden gelen lenf damarlarının çoğu ovaryumun lenf damarları ile birlikte birinci lumbal vertebra seviyesinde olan nodi lymphatici aorticiye açılırlar. Corpus uterinin lenf damarları, lig. teres uteri'ni takip ederek nodi lymphatici inguinales superficiales'e bağlanırlar. Cervix uterinin lenf damarları ise nodi lymphatici iliaci interni ve nodi lymphatici sacrales'e açılırlar [27].

Uterus'a sinirler plexus hypogastricus inferior (plexus pelvici)'dan ve büyük miktarda da, plexus uterovaginalis'in ön ve orta bölümlerinden gelir. Plexus hypogastricus inferior'dan çıkan nn. uterini lig. latum uteri'nin tabanında plexus uterovaginalis ismini alır. Plexus uterovaginalis'teki liflerin çoğu vasomotor etki gösterir. Uterus'a gelen preganglionik sempatik lifler medulla spinalis'in T 11-12 ve L 1 segmentlerinden, parasempatik lifler ise plexus pelvici aracılığıyla S 2-4 spinal segmentlerinden gelir [23, 27, 29].

2.1.3. Uterusun histolojisi

Uterus histolojik olarak dıştan içe doğru;

1. Perimetrium (tunica serosa),
2. Miyometrium (tunica muscularis),
3. Endometrium (tunica mucosa) olarak üç katmandan oluşur [30, 31, 32].

Perimetrium

Uterusu en dıştan saran katmandır. Peritonun visseral yaprağıdır. Perimetriyum, tek katlı yassı epitel, mezotel ve onun altında yer alan ince gevşek bağ dokudan oluşur. Pelvik ve abdominal periton ile devam eder. Bu tabaka uterusun tüm arka yüzünü örter. Ön yüz ise "tunica adventisya" adını alan bir bağ dokusu ile örtülüdür [30, 31].

Miyometrium

Uterusun en kalın katmanıdır. Bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinden oluşur. Bu düz kas demetleri de kendi içinde sınırları belirgin olmayan üç katman oluşturur. İç kas katmanında(st. submucosum) uzunlamasına düzenlenmiş kas lifleri bulunurken, orta kas katmanı(st. vasculosum - st. subvasculosum) kalın olup enlemesine uzanan kas lifleri ile bunların arasındaki bağ dokusunda bulunan çok miktarda büyük kan damarlarından oluşur. Özellikle venleri içeren orta kas katmanına, vasküler (damarlı) tabaka denir. Dış kas katmanı (st. subserosum) ise uzunlamasına düzenlenmiş kas liflerinden oluşur [31, 33].

Serviks ve isthmusta iç ve dış uzunlamasına düz kas lifleri gittikçe zayıflar. Enlemesine uzanan düz kas lifleri ise çok iyi gelişmiştir. Miyometriyumun özellikle dış kas demetleri arasındaki gevşek bağ dokusunda, bol kollajen ve elastik lifler bulunur. Bunlar arasında fibroblast, histiyosit, makrofaj ve mast hücreleri gözlenir [33].

Gebelikte, miyometrium büyüme evresine girer. Bu düz kas dokusu hücrelerinin hem hiperplazi (düz kas hücrelerinin sayısında artış), hem de hipertrofi (hücrenin boyutlarının

artması) göstermesi sonucu gerçekleşmektedir. Bu sırada bağ doku miktarı da artar. Pek çok düz kas hücresi, protein salgısı yapan hücelere özgü ince yapı özelliklerini gösterir. Bu hücreler, gebelik sırasında aktif olarak kollagen sentezlerler ve uterusun kollagen miktarını artırırlar [31, 32, 34].

Gebelik sırasında uterus kaslarının hareketleri ovaryum ve plasentadan salgılanan peptid bir hormon olan, relaksin hormonunun denetimindedir. Relaksin miyometrial kasılmaların baskılanmasını sağlar. Doğum sırasında ise yine peptid bir hormon olan ve nörohipofizden salgılanan oksitosin hormonu uterus kaslarının hareketini uyarır ve kasılmalarını denetler [32, 33, 34].

Doğumdan sonra, uterusun boyutları gebelik öncesi durumuna yakın değerlere iner. Bazı düz kas hücrelerinde yıpranma, boyutlarında azalma ve kollajen yapımında enzimatik eksilme görülür [32, 34].

Endometrium (tunica mucosa)

Uterusun en iç katmanı olan ve fötusun yerleşip geliştiği endometrium, epitel ve bunun altında yer alan lamina propriadan oluşur. Epitel tek katlı prizmatiktir ve iki tip hücre görülür. Bu hücrelerin bir kısmı silyalı, bir kısmı ise salgı yapan mikrovilluslu hücrelerdir. Yüzey epitel hücreleri, altındaki endometriyal stroma denilen lamina proprianın derinliğine uzanarak dallı basit tübüler tipte uterus bezlerini (gl. uterina) oluştururlar. Bu bezler, menstrüal döngünün evrelerine göre, şekillerini ve büyüklüklerini değiştirir. Birbirine çok yakın ya da biraz aralıklı dururlar. Uterus bezlerini oluşturan epitel, yüzey epiteline benzerdir ama silyalı hücreler çok daha azdır [33, 34].

Lamina propria, bol hücreli, fibroblastlardan zengin, bol miktarda temel madde içeren sıkı düzensiz bağ dokusudur. Bağ doku genellikle tip III kollajen lifler ve bunun yanında retiküler lif ağları içerir. Elastik liflere ise ancak arteriollerin çevresinde rastlanır. Bu liflerin arasında çok sayıda iğ şeklinde bağ doku hücreleri de bulunur. Bunlar; lenfositler, granüler lökositler ve makrofajlardır. Gebelik sırasında daha da irileşen hücelere, *desidual hücreler*

denir. Bu hücreler bir ya da iki çekirdek içerir ve sitoplazmalarında, lipid tanecikleri, glikojen ve vakuoller bulunur [31, 34].

Endometrium işlevsel olarak iki tabakadan oluşur. Miyometrium'a komşu olan, endometrium'un 1/3 bazal kısmını oluşturan ve uterus bezlerinin son kısımlarını içeren bölgeye endometrium bazalis (stratum basale endometriale) denir ve bu tabaka menstruasyon sırasında dökülmez ve menstruasyondan sonra yenilenecek olan fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturur.

Endometrium'un 2/3 yüzeyel bölgesinde ise bezlerin boyun ve gövde bölümleri bulunur. Menstruasyon esas olarak burada olaylanır. Bu katmana endometrium fonksiyonalis (stratum functionale endometriale) denir. Gebelik ve döngünün sekresyon evresinde iki katmandan oluşur. Bezlerin daralıp kapanmış boyun bölgelerini içeren 2/3 yüzeyel bölümü yoğun yapıdadır ve kompakt tabaka (stratum compactum endometriale) ismini alır. Alt bölüm ise genişlemiş, salgıyla dolu bezler nedeniyle süngerimsi yapıdadır ve spongiöz tabaka (stratum spongiosum endometriale) olarak bilinir [34].

Endometriyum yeni doğanda genellikle proliferasyon evresi görünümündedir. Pubertede önce endometriyum epitel tek katlı, alçak kübiktir ve ince bir stromaya sahiptir. Epitel de stromaya doğru çökmüş az sayıda tubuler bezler bulunur. Doğurganlık döneminde stromal hücreler, epitel hücreleri ve damarlar hızla çoğalır. Kanama ve menopoza arasında, endometrium tek katlı prizmatik epitel ve altındaki lamina propria'dan oluşur [34, 35].

Kadınlarda yaklaşık 12-15 yaşlarında başlayan ve 45-50 yaşlarına değin süren menstrüal ya da uterinal döngü, hipofiz bezi ön lobunun uyarısı altında salgılanan ovaryum hormonları olan östrojen ve progesteron etkisiyle olaylanır. Endometriyumdaki bu döngüsel değişiklikler, döllenmiş ovumun implantasyonuna en uygun yapının oluşmasını sağlar. Gebeliğin olmaması durumunda menstrual döngüye bağlı olarak yaklaşık 28 günde bir uterus tunika mukozasında değişiklikler olur ve döngü sonunda eski biçimine döner [30, 31, 33].

Menstrüel döngü ardışık üç evreden oluşur:

1) Proliferasyon (foliküler) evresi: Menstruasyon ile ovulasyon olayları arasındaki, bir önceki menstrüasyonda dökülen epitelin yenilenmesini sağlayan evredir. Bu evre yaklaşık 9 gün sürer ve menstrüasyondan sonraki 5. ile 14. günler arasında olaylanır. Ovaryumlarda bu dönemde folliküller olgunlaşır ve folliküllerden östrojen salgılanır. Östrojenin endometriyuma etkisiyle, hücreler hızla çoğalır ve menstrüasyon ile yitirilen endometrium bezleri ve epiteli yeniden oluşur. endometrium'un tüm kan damarları özellikle kapillerleri genişler, bol kanla dolar ve spiral arterler yeniden oluşur. Yenilenen spiral arterler fazla kıvrımlı değildirler ve fonksiyonalis katmanının yüzeye doğru 2/3'üne erişirler. Bez lümenleri biraz genişler ve lümeni çeviren epitel hücrelerinde glikojen birikmeye başlar. Glikojen birikimi, hücrelerin bazal sitoplazmalarında belirgindir. Bu alışılmış histolojik kesitlerde hücrelerin bazal kısımlarında boşluklar şeklinde belirgindir. Hücreler iri, yoğun kromatinli çekirdek kapsar. Bu evrede fonksiyonel kat 2-3 milimetreye kadar kalınlaşır. Yaklaşık 14. gün olan ovulasyonda endometrium tümüyle yenilenmiştir. Proliferatif evre ovulasyondan sonra bir iki gün daha sürebilir [30, 31, 34].

2) Sekresyon (luteal, progestasyonel) evresi: Progesteronun etkisiyle başlar. Bu hormon ovulasyondan sonra, korpus luteumdan salgılanır. Döngünün 28. gününe kadar sürer. Östrojen etkisi ile gelişmiş olan bezler üzerine etki eden progesteron ile bezler genişleyerek, bez gövdeleri çok kıvrımlı bir yapı kazanır. Spiral arterler, yüzeye doğru uzayarak iyice kıvrımlı hale gelirler. Epitel hücreleri çekirdeğin altında glikojen depolamaya başlar. Daha sonra glikojen miktarı azalır ve glikoprotein salgı ürünleri bezlerin lümenini genişletir. Biriken glikoprotein salgısı, döllenme sonrasında embriyonun beslenmesi için önemli bir kaynaktır. Bu dönemde endometrium, glikojen salgıların birikmesi ve stromada oluşan ödeme bağlı olarak en kalın halini alır (5 mm). Mitozun nadir görüldüğü bu evrede uterus zigotun tutunması için hazırlık yapar.

Gebelik olmazsa sekresyon evresinin sonunda menstrüasyon evresi başlar. Döllenme olmuşsa, endometriumun lamina propriasındaki stromal hücreler büyür ve artan progesteron miktarına yanıt olarak glikojen ve lipid depolarlar. Bu endometriyal değişikliklere desidual reaksiyon adı verilir [33, 34].

3) Menstruasyon (kanama) evresi: Oositin döllemesi veya implantasyon gerçekleşmediği durumlarda, korpus luteumun işlevi 14 gün sonunda kendiliğinden sona erer. Buna bağlı olarak kandaki östrojen ve progesteron miktarları hızla düşer ve bu hormonların etkisiyle gelişmiş olan endometriyumda gerileme (involusyon) başlar ve endometriyum kısmi olarak dökülür. Böylece menstruasyon evresi başlar. Bu evre döngünün 1.-4. günleri arasında gerçekleşir. Bu dönemde spiral arterler kasılıp gevşemeye başlar, bezlerin salgıları azalır, stroma daha yoğun bir hale gelerek lökositler artar, spiral arterlerin kasılması devamlı hale gelerek fonksiyonel tabakanın oksijenlenmesini keser. Böylece fonksiyonel tabakada nekroz bölgeleri belirir ve birbirleriyle birleşir. Spiral arterlerin duvarında önce spazm, daha sonra nekroz gelişmesi, leke biçimindeki kanamaların bir araya gelerek kanamayı başlatmasına sebep olur.

Menstruasyon evresinin sonunda endometriyumdan geriye, endometriyum bezlerinin bazal bölümlerini içeren bazal tabaka kalır. İnce bir tabakaya dönüşen endometriyumda bazal hücreler, mukozayı yeniden oluşturmak için bölünmeye başlar. Bezlerin dip kısımları kısa sürede çoğalarak bezleri yapar. Bağ dokusu da çoğalarak bezlerin arasını doldurur. Rejenerasyon evresi adı verilen bu evrede, endometriyumun fonksiyonel tabakası yenilenir ve endometriyum yeni bir döngüye hazırlanır.

Endometrium özel bir kan damar sistemi içerir. Miyometrium'un orta bölümlerinde dairesel olarak yerleşmiş arkuat arterlerden iki dal endometrium'a doğru dik açılarla ışınsal ilerler. Bu ışınsal (radial) arterler endometrium bazalis'teki kısa düz arterleri oluştururlar. Üst kısımlara doğru ilerleyen bu arterler spiral arterleri yaparlar. Spiral arterler, fonksiyonals katmanının daha üst kısımlarında incelerek arteriol ve kapillere dönüşürler. Kapiller ağı yüzey epitelinin hemen altındadır. Spiral arterler zengin bir kapiller ağı oluşturarak fonksiyonals katmanının bezlerini ve bağ dokusunu beslerler. Bu arterler hormonlara duyarlıdır. Düz arterler sadece bazalis katmanını besler ve hormonlara duyarsızdır. Kapiller yatak, laküna denilen ince duvarlı genişlemiş bölgeler içerir. Lakünalar, endometrium'un venöz sisteminde de bulunabilir [31, 33, 36].

Menstruasyon sırasında yaklaşık 30-50 ml kan kaybı olur. Ancak dökülen endometriyum miktarı ile kaybedilen kan miktarı kişiye göre ve zamana göre farklılık gösterir [33, 34].

2.1.4. Uterusun fizyolojisi

Kadının üretkenlik yıllarında, hormonların salgı hızındaki aylık ritmik değişimlere uygun olarak, ovaryumda ve uterusta değişimler görülür. Buna *menstrual döngü* denir. Döngü süresi yaklaşık 28 gündür. Bazı kadınlarda bu süre bazen 20 gün gibi kısa ya da 45 gün gibi uzun dönemler içinde değişebilir [37].

Dişi hormonal sistemi üç hormon grubunun etkisindedir:

1. Hipotalamustan salınan hipotalamik serbestleyicisi hormon ya da gonadotropik serbestleştirici hormon (GnRH).
2. Hipofiz ön lobundan salgılanan follikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH).
3. Ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteron [37, 38].

Hipotalamustan GnRH salgılanması ortalama 2 saatte bir gerçekleşir ve birkaç dakika sürer. GnRH'nin pulsatil salınımı LH'nin salınımına neden olurken, FSH salgısı sürekli. GnRH'in yükselmesi döngüyü başlatır. GnRH hipofiz ön lobundan LH ve FSH salınımını artırır. Ayrıca bu iki hormonun salgılanması, ovaryumlardan salgılanan östrojen ve progesteron adlı gonadal steroidlerin geri bildirim etkisi ile de düzenlenir [37].

Her aylık döngüde, ovaryumlarda gelişmeye başlayan primer folikül grubu FSH ve LH hormonlarının etkisiyle yüksek miktarda östrojen salgılar. Bu durum hipofiz hormonlarının salınımını baskılar. Döngünün 12-13. günü çok yüksek olan östrojen seviyesi pozitif geri bildirim yaparak LH salınımını artırır. Ovulasyondan yaklaşık 18 saat önce ani LH ve FSH artışı önce ovulasyona, daha sonra korpus luteumun oluşmasına neden olur. Ovulasyondan sonra korpus luteumdan progesteron salınımı başlar [39].

Östrojen ve progesteronun FSH ve LH üzerinde baskılayıcı etkisine ek korpus luteumdan salgılanan inhibin hormonu da FSH ve LH salgılanmasını baskılar. Bu hormonların etkisiyle

menstrüasyondan birkaç gün önce LH düzeyi en alt değere indiğinde, korpus luteum dejenere olur. Bunun sonucunda plazmada östrojen ve progesteron düzeyleri düşer ve FSH, LH, GnRH baskılanmaktan kurtulurlar ve bir grup büyüyen follikülün ortaya çıkmasıyla yeni döngü başlar [37, 39].

Ovaryum folliküllerinin teka interna ve granüloza hücrelerinden, korpus luteumdan ve plasentadan salgılanan östrojen, uterusunda endometriyal proliferasyonu uyarır, uterusun kan akımını artırır, uterus kasının miktarını ve kasılma proteinlerinin miktarını artırarak kası daha kolay uyarılabilir hale getirir. Ayrıca uterusu oksitosin hormonuna karşı daha duyarlı kılar [39, 40].

Korpus luteum, plasenta ve ovaryum foliküllerinden salgılanan progesteron, endometriyumdaki gebelik öncesi değişiklikler ile serviks ve vajinadaki döngüsel değişikliklerden sorumludur. Miyometriyum hücreleri üzerinde östrojene antagonist çalışarak, bu hücrelerin uyarılabilirliğini, oksitosine duyarlılığını ve kendiliğinden oluşan elektriksel zar potansiyelini azaltır ya da artırır. Aynı zamanda endometriyumdaki östrojen reseptörlerinin sayısını azaltarak uterus üzerine etki eder [40].

Relaksin, kadınlarda korpus luteum, uterus, plasenta ve meme bezlerinde yapılan bir polipeptid hormondur. Gebelikte simfizis pubisi ve pelvisin diğer eklemlerini gevşetir, uterus kasılmalarını baskılar, uterus serviksini genişleterek doğumu kolaylaştırır. Gebe olmayan kadınlarda, menstrüel döngünün salgı evresinde korpus luteum ve endometriumda relaksin bulunur. Gebe olmayan kadınlardaki görevi belirlenmemiştir [39, 40].

Uterus gövdesinin devamı olan serviks, bazı özellikleri açısından farklılık gösterir. Servikal kanalda mukus üreten hücreler, döngüsel değişiklikler ile uyumlu olarak mukus üretirler. Serviksin mukus salgıları düzenli olarak değişir. Östrojen, mukusa daha ince ve daha alkali bir yapı kazandırarak spermiyumun taşınması ve yaşaması için uygun ortamı oluşturur. Progesteron ise servikal mukusu kalın, yapışkan ve hücre içeren bir hale getirir. Ovulasyon anında mukus, en ince yapısında iken ovulasyondan sonra ve gebelik sırasında kalınlaşır [38, 40].

Plasental insan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) döllenmiş oosit'in trofoblast hücrelerinden salgılanarak anne kanına geçer. Gebelik olduğu durumlarda, LH'nin görevini alarak, korpus luteumu progesteron salgılamak üzere sürekli olarak uyarır. Böylece korpus luteum, sekretuar endometriyumunu destekleyerek gebeliğin devamlılığını sağlar. Bu durum gebeliğin 4. ayının sonuna kadar devam eder. Daha sonraki dönemlerde progesteron hormonu, gelişen plasenta tarafından salgılanır [40, 41].

Gebeliğin oluşmadığı durumlarda ise korpus luteumun hormon desteği ortadan kalkar ve endometriyum inceler. Bu durumda spiral arterlerin kıvrımları artar. Endometriyumda nekroz odakları belirerek birleşirler. Spiral arterlerin duvarlarında önce spazm, sonra nekroz gelişerek menstrüel kanama başlar. Döngülerin sona erdiği, kadın cinsiyet hormonlarının azaldığı ve yok olduğu evreye ise *menopoz* adı verilir. Menopozun nedeni ovaryumlardaki foliküllerin tükenmesidir [38, 40, 42].

2.2. Sıçanlarda Östrus Siklusu

Uterusun işlevi hormonal uyarımlarla düzenlenir ve işlevine koşut yapısı menstrüel döngü içerisinde 4 evrede incelenir. Sıçan östrus siklusu, ortalama 4-5 gün sürmektedir. Sıçanlar puberta başlangıcından yaşlılığa kadar siklik aktivite gösteren ve mevsimden bağımsız olarak östrus siklusu geçiren poliöstrik hayvanlardır. Östrus siklus dört evreden oluşur: Proöstrus, Östrus, Metaöstrus, Diöstrus [43, 44].

Düzenli östrus siklusu vajinanın açılmasından bir hafta sonra başlar. Bu siklus 14 günde bir 4-5 gün sürmektedir. Dişide pubertayla beraber vajina açılır ve proöstrus gözlenir. Vajinal açıklık ilk defa 33-42. günlerde, vücut ağırlığı yaklaşık 100 g iken meydana gelir [44].

Proöstrus evresi 12 saat sürer. Bu evreden sonra diş erkeği kabul etmeye başlar. Vajinal sitolojide çekirdekli epitel hücreleri görülür. Vajina kanalı doğumdan 33-42. gün sonra açılır. LH ve östradiol en üst düzeye ulaşır. FSH'da yavaş bir artış görülür.

Östrus evresi, 12 (9-15) saat sürer. Diş erkeği kabul etmeye devam eder ve lordozis (sırtın iç bükey yapılp genital bölgenin açığa çıkarılması) gözlenir. Sitolojide %75 oranında

çekirdekli hücreler görülmektedir, geri kalan kalan %25 ise kornifiye hücrelerden oluşmaktadır. LH en düşük düzeydedir ve östradiol evrenin sonlarına doğru en alt seviyeye gelir. FSH da en yüksek düzeyine ulaşır. Östrusun sonuna doğru ovulasyon gerçekleşir.

Metaöstrus evresi, 21 saat sürer ve artık dişi erkeği kabul etmez. Çekirdekli ve kornifiye hücrelerle beraber çok sayıda akyuvar görülür.

Diöstrus evresi, en uzun dönem olup 57 saat sürer ve vajinal sitolojide akyuvarlar görülür. LH ve FSH düzeyleri düşüktür. Östradiol düzeylerinde de düşüklük olur [44].

Östrus siklusunun saptanabilmesi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Önemli yöntemler arasında davranışsal değişimlerin gözlenmesi, vajinal sitolojik inceleme, vajinanın elektrik iletkenliğinin ölçülmesi gösterilebilir [45].

Yapılan bir çalışmada östrus siklusu boyunca uterusda meydana gelen değişiklikler yarı ince kesit alınarak gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre;

Proöstrus evresinde, uterus lümen epiteli tek sıralı prizmatik, çekirdekler oval şekilli, bazalde yerleşik ve ökromatiktir. Heterokromatin çekirdek zarı altında ince bir şerit halindedir. Epitel çöküntülerinin lamina propria'ya doğru uzanarak yalancı bezleri oluşturduğu ve bu bezlerdeki epitel boyunun yüzey epiteline karşın daha alçak boylu olduğu dikkati çekmiştir. Yüzey ve bez epitel hücrelerinde apikal sitoplazma yerleşimli irili ufaklı vezikül ve vakuollerin olduğu görülmüştür. Lamina propria'da çeşitli bağ dokusu hücreleri ve kapillerler izlenmiştir.

Östrus evresindeki, yüzey epitelinin yüksek boylu prizmatik bir hal aldığı ve epitelde bazı hücrelerin apoptozise gittiği görülmüştür. Lümeninde belirgin katlantılar oluşmuştur. Yalancı ve gerçek uterus bezleri gelişkin ve hücre boyları yüzey epiteline kıyasla daha kısa olduğu görülmüştür. Lamina propria'da bağ dokusu hücrelerinin proöstrusa karşın daha gelişkin olduğu dikkati çekmiştir. Damarlar yaygın olarak görülmüştür.

Metaöstrus evresinde, yüzey epitelinin boyu diğer iki gruba karşın daha kısa olduğu gözlemlenmiştir. Yalancı bezler ve uterus bezleri oldukça gelişkindir. Uterus bezlerinin lümenlerinin oldukça genişlemiş olduğu, içlerinin de az yoğun salgı maddesi ile dolu olduğu dikkati çekmiştir. Lamina propria'da yaygın stromal hücre varlığı belirgindir.

Diöstrus evresinde, yüzey epiteli diğer tüm gruplara karşın son derece incelmıştır. Yüksek boylu kübikten, alçak kübiğe değişkenlik göstermiştir. Yalancı bezler oldukça az sayıda buna karşın uterus bezleri belirgindir. Uterus bez lümeni oldukça girintili çıkıntılı ve geniştir. Hem uterus bezlerinin hem de yalancı bez epitel hücrelerinin boyları yüzey epiteline oranla daha yüksek boylu prizmatiktir. Stromada iri stromal hücreler ayırt edilmiştir. Bu evrede mukoza katlantılarının oldukça sığ olduğu yer yer de hiç gözlenmediği ayırt edilmiştir [46].

Menstrüel döngü sürecinde ovaryum hormonlarının değişen düzeyleri uterus yüzey ve bez epitel hücreleri, stroma yapısı ile miyometriyum düz kas hücrelerinde önemli değişikliklere neden olur. Uterus yüzey epitelinde metaöstrus, diöstrus ve proöstrus'da yüksek düzeyde hücre çoğalması olduğu bildirilmiştir [47]. Bu çoğalmanın metaöstrus ve diöstrus evrelerinde bez hücre artışı ile birlikte olaylandığı gösterilmiştir. Östrus evresinde ise hücre ölümünün yüzey ve bez epitel hücrelerinde apoptotik yolak ile gerçekleştiği saptanmıştır [48].

2.3. Bisfenol A

2.3.1. Genel bilgiler

Ksenobiyotik kimyasalların, insanlar ve doğal yaşamdaki birçok canlı üzerinde hormon benzeri etkileri vardır. Bu kimyasalların endokrin ve reproduktif etkilerinin, endojen östrojenleri taklit etme ya da bozma yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu kimyasallar bugün endokrin bozucu kimyasallar (EDCs), endokrin bozucular ya da çevresel östrojenler olarak anılmaktadırlar [49]. Plastik monomeri veya plastikleştirici olarak kullanılan bisfenol A (BPA) Dünya çapında en yüksek üretim hacmine sahip olan endokrin bozuculardan biridir [50].

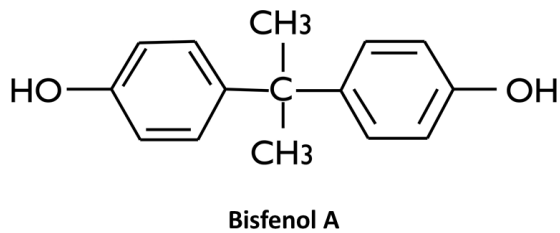
Genellikle polikarbonatlar, epoksi reçineler ve termal kâğıtların sentezinde kullanılır. Böylelikle günlük hayatımızda kullandığımız su boruları, elektronik aletler, kâğıt veya oyuncakları da içeren çok çeşitli kullanım alanlarına girmiştir. Ayrıca BPA, yiyecek, içecek ve içme suyu ambalajlarında bulunur. Bu ambalajların içindeki ürünlerle temas ederek bu ürünleri kullanan kişilerin vücuduna nüfuz eder.

BPA'nın endokrin bozucu aktivitesi hayvanlarda ve muhtemelen insanlarda oksidatif ve mutajenik potansiyelleri ile kendini göstermektedir. BPA, içinde cinsiyet hormonları, leptin, insülin ve tiroksin gibi çeşitli hormonların fonksiyonlarını bozduğu ve hepatotoksik, immünotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkilere neden olduğu kanıtlanmıştır. Son çalışmalarda BPA'ya etkin kalmanın obezite, diyabet ve kalp hastalığı açısından risk oluşturduğunu göstermektedir [50].

Araştırmalar BPA'nın bitkiler, bakteri, fungi ve algleri içeren mikroorganizmalar tarafından BPA'dan daha az toksik ve östrojenik metabolitlerine dönüştürülebildiğini göstermiştir. Ayrıca bazı bakteri ve fungi türleri BPA'yı karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmak için mineralize edebilmektedir [51].

2.3.2. Yapısı ve tarihçesi

Bisfenol A [2,2-bis (4-hidroksifenil) propan], iki fenol ve polikarbonat moleküllerinin birleşmesiyle elde edilen bir tür organik bileşiktir (Şekil2.1). BPA, fenolik kokulu, beyaz, kristalize yapıda olan katı bir maddedir. Molekül ağırlığı $228,29 \text{ g/cm}^3$, erime noktası 156°C ve kaynama noktası 220°C olan bir bileşiktir. Etanol, aseton ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünmektedir [50].



Şekil 2.1. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı [52]

İlk defa 1891 yılında Rus kimyager Alexander P. Dianin tarafından sentezlenmiştir [6]. 1930'lu yıllarda Dodds ve Lawson tarafından sentetik östrojen olarak sentezlenmiş, ancak östrojenik etkinliğinin az olması nedeniyle kullanıma girmemiştir. 1953 yılında polivinil klorür (PVC) gelişimi ile plastik ürünlerin yapısında önemli bir rol almaya başlamıştır [53].

1980'li yıllarda yıllık üretim kapasitesi 1 milyon ton iken, bu miktar artarak 2009 yılında 2,2 milyon tonu aşkın bir üretime ulaşmıştır [50].

Kanada, Eylül 2010'da BPA'nın toksik bir madde olduğunu açıklayan ilk ülke olmuştur. İlerleyen dönemlerde dünyada birçok ülke özellikle biberonlarda BPA kullanımını yasaklamıştır. 10 Haziran 2011'de ülkemizde Tarım ve Köyşleri Bakanlığı'nın 'Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler' Tebliği'nde yaptığı değişiklik yürürlüğe girmiştir. Tebliğ uyarınca, referans numarası "13480" olan "2,2-Bis(4-hidroksifenil) propan", Türk Gıda Kodeksi (TGK)-Bebek Formülleri ve TGK-devam Formülleri Tebliği'nde bebek olarak tanımlanan tüketici grubu için kullanılan, polikarbonat madde ve malzemelerin üretiminde kullanılmaması belirtilmiştir [53, 54].

2.3.3. Kullanım alanları

Dünyada üretilen BPA'nın %70'i polikarbonat plastiklerin, %25'i epoksi reçinelerin üretiminde kullanılmaktadır. Polikarbonatlar biberonlar, su şişeleri gibi değişik plastik ürünlerin yapımında yer almaktadır. Epoksi reçineler ise gıda ve içeceklerin ambalajlanmasında kullanılan metal kutuların iç yüzeylerinin kaplanmasında; şarap ve su gibi sıvıların bulunduğu depolama kapları ile değişik tiplerdeki gıda taşıma kaplarının yapılmasında kullanılmaktadır [3].

Günümüzde özellikle plastik, naylon, polyester ve PVC gibi maddelerin üretilmesinde etkin rol oynar. Bu maddeler, çoğunlukla şeffaf ve dayanıklı, tekrar kullanılabilen kalın plastik ürünlerin yapısında (PVC pencereler, biberonlar, su damacanaları, yemek saklama kapları, buzdolabı çekmeceleri) bulunmaktadır.

Metal kutuların iç yüzeyinde, metal yüzey ile besin ürünlerinin etkileşiminin engellenmesi amacıyla ince bir tabaka halinde yer alır. Su, kola ve meyve suyu şişeleri, kola ve bira kutularının iç yüzeyinin kaplandığı plastik film yapımında da kullanılmaktadır.

Diş hekimlerinin diş yapımında kullandığı malzemelerde, sanayide köpük ve paketlenme sistemlerinde, fiberglas üretiminde, beton yenilemesi ve korumasını içine alan inşaat uygulamalarında, fungusit ve pestisitlerin üretiminde kullanıldığı ve bu sayede günlük hayatın birçok alanında insanların temas ettiği bir madde olduğu gösterilmiştir [53].

Ayrıca BPA, vinil klorid üretiminde stabilizatör olarak kullanılır [55].

2.3.4. Migrasyon ve metabolizması

Doğal çevrede (sulak alan, hava ve toprak) BPA varlığı sadece insan kaynaklı aktiviteye bağlıdır. Bunun dışında BPA'ya etkin kalındığı düşünülen en önemli kaynağın gıda olduğuna inanılmaktadır [51, 56].

Migrasyon, gıda maddesi ile ambalaj içeriği arasındaki etkileşim ile meydana gelen kütle transferine verilen isimdir. Ambalaj içeriğinden gıda maddesine monomerler, plastik katkı maddeleri ve oligomerler gibi çok çeşitli maddeler migrasyonla taşınabilmektedir [3].

BPA migrasyonu, polimerizasyonun tamamlanmaması veya polimerlerin kısmi hidrolizi sonucu ambalajdan gıdaya gerçekleşmektedir. Sıcaklık, BPA migrasyonunu etkileyen faktörlerden biridir. Örneğin, konservasyon işlemi sırasında kullanılan ısıtma süresi ve sıcaklığı, mikrodalga kaplarda ısıdan dolayı reçinelerde dekompozisyon gerçekleşmesi BPA migrasyonunun oldukça arttığını göstermektedir. Ayrıca BPA'nın migrasyonunu etkileyen diğer bir faktör ise gıdaları saklama süresidir. Yapılan bazı çalışmalar gıdaların saklanma süresinin artmasının BPA migrasyonunu arttırdığını göstermiştir [3].

Başka bir çalışmada BPA'nın polikarbonatlardan polimerlerin difüzyonu ve hidrolizi sırasında migrasyon olduğunu göstermiştir. Bir çözeltinin pH'sındaki azalma polikarbonatlardan suya BPA migrasyonunda artışa neden olabildiğini göstermiştir [51].

BPA'nın metabolik yolağı ile ilgili bilinmeyen pek çok nokta vardır. Esas temas yolunun oral yol olması nedeniyle bu konuda çalışmalara daha sık rastlanmaktadır. İnsanlarda oral yolla alınan BPA, gastrointestinal sistemden emilmektedir. Emilim oranı konusunda bilgi olmasa da karaciğerde glukuronik asit ile birleştiğı ve böbrekler aracılığı ile kandan hızlıca süzöldüğü ve idrar yoluyla atıldığı gösterilmiştir. Ortalama altı saatlik bir yarılanma ömrü vardır ve yaklaşık 42 saatte tamamına yakını idrarla atıldığı gösterilmiştir. Çok az bir miktar da dışkı ile atılır. Asıl endokrin bozucu etkinin serbest BPA ile meydana geldiğı, metabolitlerin hormonlarla etkileşmediğı gösterilmiştir [50, 52].

Deri yolu ile de etkilenim sonucu %10'a yakın bir miktarda emilim olabileceğı gösterilmiştir. Vücutta idrardan başka kanda, yağ dokusunda, semende, anne sütünde, amniyotik sıvıda, plasenta ve fetusta, kolostrumda, umbilikal kord kanında, tükürükte de BPA bulunabileceğı belirtilmektedir [50, 52].

2.3.5. Toksisitesi

Amerika'da, insanlar için (bebekler, çocuklar ve yetişkinler) BPA'nın günlük tolere edilebilen alım miktarı (TDI), 0,05 mg/kg'dan daha az olması gerektiğı düşünölmüştür. Avrupa Birliğı'nde ise geçici TDI 10 µg/kg olarak belirlenmiştir. Çünkü yiyeceklerde BPA'nın migrasyon seviyesi ölkeler arasında farklılık gösterebilmektedir. BPA'nın TDI'sı 1 µg/kg'dan daha az olmalıdır [56].

Yapılan çok sayıdaki çalışmalar BPA'nın diabet, obezite, kalp-damar hastalığı, kronik böbrek hastalığı, doğum defektleri, gelişimsel bozukluklar, üreme sistemi hastalıkları, kanser ve kronik solunum hastalığına sahip olan kişilerde yüksek miktarda çıktığını göstermiştir [56].

Son zamanlardaki deneysel çalışmalar, BPA'nın glukoz metabolizmasını, içinde insölin direnci, pankreatik beta hücreleri disfonksiyonu, adipogenez, inflamasyon ve oksidatif stresi bulunduran çeşitli mekanizlarla etkilediğı düşünölmektedir. Bununla birlikte birçok çalışma idrardaki BPA oranı ve obezite arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir [56].

Kardiovasküler hastalıklarla da BPA'nın ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bir çalışmada, koroner arter darlığı olanlarda, hiçbir kalp rahatsızlığı olmayanlara kıyasla idrardaki BPA konsantrasyonu oldukça yüksek çıkmıştır [56].

2.4. Antioksidanlar

Reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için farklı savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalara "antioksidan savunma sistemleri" ya da antioksidanlar denilmektedir. Antioksidanlar aktivitelerini dört farklı şekilde gösterirler.

1. Serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek onlara bir hidrojen aktarırlar. Bu yolla serbest oksijen radikallerinin aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürerek etkilerini gösterirler.
2. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları daha zayıf yeni moleküllere çevirebilirler.
3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir kırıcı olarak etki ederler.
4. Tamir işlevi ile de onarıcı etki gösterirler [57].

2.4.1. Melatonin

Genel bilgiler

Melatonin 1958 yılında Aeron B. Lerner tarafından tanımlanan N-asetil-5-metoksitriptamin yapısında olan lipofilik bir hormondur. Başlıca epifiz bezinden(gl. Pineale), sirkadiyan ritimde ve karanlıkta salgılanan bir hormondur [58, 59]. Epifiz bezi, insan vücudundaki en küçük endokrin bezdir. Ortalama 100-150mg ağırlığında, 5-10 mm boyunda ve 3-5 mm genişliğindedir. Memelilerde epifiz bezi elektriksel uyarıları hormonal uyarılara dönüştüren bir nörendokrin dönüştürücü işlevi görür [60].

Epifiz bezinin parankiması, pinealositler ve glia hücrelerinden oluşur. Nöroepitelial hücreler olan pinealositler, hafif bazofilik sitoplazmalı hücrelerdir; belirgin çekirdekçikler içeren çekirdekleri büyük, düzensiz ya da birkaç lopludur. Sitoplazmik uzantıları olan

pinealositler, granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum, mikrotübüller, lipid damlacıkları, mitokondriyonlar ve çok sayıda Golgi kompleksi içerirler [33].

Melatonin, epifiz bezinden başka over, lens, kemik iliği hücreleri, safra ve gastrointestinal sistemden de sentezlenip salgılanabilen bir hormondur. Gece pikinden epifiz bezi sorumlu iken gündüz pikinden bağırsak, pankreas gibi gastrointestinal sistem organları sorumludur [10].

Metabolizması

Ortam ışıklanmasına duyarlı olan melatonin salınımı, geceleri gündüze göre 7-10 kat daha fazla olmaktadır. Günün aydınlanması ile retinadaki reseptörler uyarılır, optik sinir aracılığıyla bu uyarılar suprakiazmatik çekirdekteki (SCN) hücelere taşınır, bu hücelerden kalkan baskılayıcı (inhibitör) uyarılar ise üst servikal gangliyon (SCG) hücrelerinin uyarı üretmesini engeller. Dolayısıyla SCG'den pineal beze giden adrenerjik yollar aydınlık ortamda uyarı üretemez. Ancak gece, ortamın kararmasıyla SCG üzerindeki inhibitör baskı kalkar ve pineal bezi hem α hem de β adrenerjik yolları ile uyarır [61].

Gelen uyarılar pineal bezin asıl hücreleri olan pinealositlerde, G proteinleri aracılığıyla N-asetil transferaz (NAT) enziminin aktif hale geçmesini sağlar. Pinealositlerce gün boyu aktif transportla kandan alınıp işlenerek serotonine dönüştürülen triptofan aminoasidi, gece karanlığında aktive olan bu NAT enzimi ile tetiklenen zincirleme tepkimelerle melatonine dönüştürülür. Üretilmiş olan bu melatonin yüksek lipofilik özelliği sayesinde serbest difüzyonla hücre zarını kolayca geçer ve kanda % 60-70 oranında albümine bağlanarak taşınır. Yarılanma ömrü 20-40 dakika kadardır [61, 62].

Melatonin sentezlendikten sonra depolanmadan kana geçer ve tüm biyolojik sıvılara (kan, BOS, tükürük, idrar, sperm, lenf, amniyotik sıvı, ovaryum folliküler sıvısı, safra) ve dokulara (siyatik sinir, retina gibi) dağılır [62].

Melatoninin çevresel, hormonal, yaş vb faktörlere bağlı olarak yaygınlığı değişmekle beraber birçok dokuda reseptörlerinin bulunduğu bilinmektedir. Özellikle merkezi sinir

sisteminde melatonin reseptörleri çok yaygındır. Ayrıca melatonin, reseptör çeşitliliği yönüyle birçok molekülden farklı bir özelliğe sahiptir: Buna göre, melatoninin hücre zarı, sitoplazması ve çekirdeğinde bulunan üç farklı reseptör tipi tanımlanmıştır ve bunların da alt tipleri vardır.

Hücre zarında G protein aracılı etki gösteren yüksek afiniteli (MT1) ve düşük afiniteli (MT2) reseptörleri, sitoplazmada Ca-kalmodulin reseptörleri, çekirdeğinde ise retinoid Z ve O reseptörleri ayırt edilmiştir [61, 63].

Bu reseptör çeşitliliği sayesinde melatonin farklı dokularda farklı işlevler gösterebilen çok yönlü bir molekül olarak dikkat çeker. İşlev ve etkileri arasından şu ana kadar keşfedilmiş olanlardan ön plana çıkanları kronobiyolojik düzenleyici, uyku düzenleyici, antioksidan, immün destekleyici, anti-kanser, kan basıncı düzenleyici, üreme fonksiyonları düzenleyici şeklinde sıralanabilmektedir [61].

Melatonin, karaciğerde melatonin hidroksilaz enzimi ile son metaboliti olan 6-hidroksimelatonine dönüştürülerek idrar yolu ile atılır; 6-hidroksimelatoninin idrardaki konsantrasyonu, serum melatonin konsantrasyonları ile paraleldir. Melatonin intravenöz olarak uygulandığında hızlı bir şekilde vücut kompartmanlarına dağılmakta ve serum yarılanma ömrü olan 30 saniye ile 5,6 dakika içerisinde elimine edilmektedir [64].

Etkileri

Melatoninin canlı vücudunda birçok biyolojik fonksiyonu düzenlediği düşünülmektedir. Melatonin sentezi, immün fonksiyonu uyarır, gece boyunca uykunun düzenlenmesini sağlar, kanda kolesterol seviyesini düşürür, aterosklerozis ve hipertansiyon riskini azaltır, lokomotor aktivite üzerine inhibitör etki yapar, hipotalamusun ön bölgesindeki preoptik sahayı etkileyerek vücut ısısında düşüğe sebep olmaktadır [65, 66, 67].

Antioksidan etkisi

Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin için, bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, melatonin'in tüm intraselüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece melatonin, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir [68, 69].

Melatonin, hem yağda ve hem de suda çözünabilir özelliğe sahip olması sebebiyle, vücudun her hücresine nüfuz edebilir ve bu sebeple de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha etkilidir. Melatonin, hücresel düzeyde mitokondrilere nüfuz edebilen birkaç antioksidandan biridir. Bu sebeple, melatoninini diğer antioksidanlardan ayıran önemli özelliği mitokondrileri oksidasyon hasarından korumasıdır [66, 69].

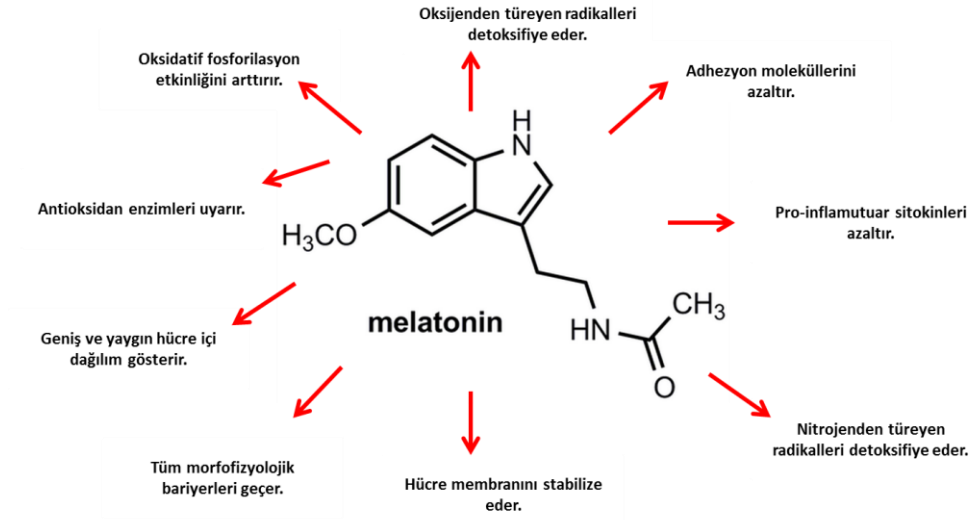
Genel olarak melatoninin antioksidan özelliğini iki ana etki altında toplayabiliriz:

Birincisi reseptörden bağımsız olarak oksidan maddeye (serbest radikal, reaktif oksijen türevi vb.) elektron sağlaması yoluyla olan doğrudan süpürücü etki, ikincisi ise endojen antioksidan mekanizmaları reseptör bağımlı olarak harekete geçirmek yoluyla gösterdiği indirekt etkisidir.

Direkt süpürücü etkisiyle süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH), peroksinitritler ($ONOO^{\cdot-}$) gibi radikal ve reaktif maddeleri zararsız hale getirdiği gösterilmiştir. İndirekt etki olarak ise süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlerin DNA seviyesinde ekspresyonlarını artırdığı ve peroksinitritlerin artışına neden olabilen uyarılabilir (indüklenabilir) nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimini inhibe ettiği ortaya konmuştur [70].

Melatonin, çeşitli yönleriyle klasik antioksidanlardan (E vitamini, C vitamini, p-karoten vs.) farklıdır. Klasik antioksidanlar etkilerini gösterdikten sonra preoksidan maddelere dönüşürler. Yani bu maddeler süpürdükleri oksidan maddelerden sadece daha az zararlıdır. Ancak melatonin oksidan maddelere etki ettikten sonra ara kademelerde ve

sonuçta oluşan ürünler yine antioksidan etkilidir. Bu özellik bir antioksidan ajan için çok değerlidir ve “suicidal veya terminal antioksidan” olarak nitelendirilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Melatoninin antioksidan özellikleri [71]

Ayrıca melatonin kanser gibi kronik oksidatif stres oluşturan hastalıklarda, birçok seviyede etki ederek ortaya çıkan kısır döngüyü engeller [61].

2.5. Apoptozis

Vücudumuzda hücre ölümü ve hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptozis, Yunanca ‘ağaçtan düşen yaprak’ veya ‘çiçekten ayrılan petal’ anlamına gelir. Apoptozis, Apo(=ayrı), Ptois(=düşme) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş bir kelimedir. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Avusturalyalı bir patalog olan J.F. Kerr tarafından tanımlanmıştır. Apoptozis ile ilgili çalışmalar genellikle Nematodlar üzerinden yürütülmektedir [72].

Apoptozis patolojik hücre ölümü olan ve ATP miktarının azalıp, hücre homeostazının hızla bozulduğu, inflamasyon yanıtının geliştiği nekrozdan tamamen farklı olarak; inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye (ATP) gereksinim duyan, organizmada homeostazi koruyan bir

olaydır. Apoptozis, mitoz gibi normal gelişim için gerekli olduğu gibi organizmanın bütünlüğüne karşı tehdit oluşturan hücreleri yıkmak için de gereklidir [73, 74].

Embriyonik dönemde, memeli üyelerinin oluşumunda el ve ayak parmak taslaklarının arasında ara dokunun ortadan kalkması, merkezi sinir sisteminin şekillenmesi, kan damarlarının sayısının azaltılması, fötusun cinsel gelişimi sırasında duktus sisteminin gerilemesi apoptozis ile gerçekleşir [73].

Postnatal dönemde, kemik iliğinde kan üretiminin dengede tutulması için bir miktar kan hücrelerinin uzaklaştırılması; menstruasyon sırasında endometriumun fonksiyonel tabakasının dökülmesi, menstrüel döngü sonunda korpus luteumun involusyonu; ince bağırsaktaki kriptaların tabanlarında oluşan yeni hücrelerin zamanla kriptaların uçlarına göç ederek bağırsak boşluğuna dökülmesi; deri hücrelerinin derinin bazal tabakasından en üst tabakasına göç ederek burada organizmayı dış etkenlere koruyabilmek için ölmesi; timusta olgunlaşan T-lenfositlerinin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli olanların ortadan kaldırılması; sütten kesilen dişilerin meme bezlerinin involusyonu apoptozisle meydana gelmektedir [73].

Bazı patolojik durumlarda (diyabet, viral enfeksiyonlar, oksidatif stres vb.) ve hasarlı DNA'ların da ortadan kaldırılmasında apoptozis rol oynamaktadır. [çoşkun, kandaş]

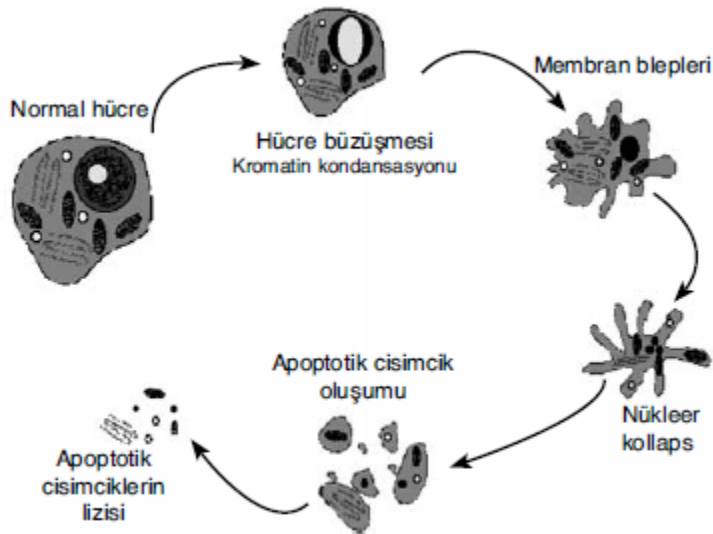
Apoptozis mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apoptozisi etkileyen hücre içi uyarılar genel olarak: büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir [74].

Apoptozisi etkileyen uyarıların bazıları şu şekilde sıralanabilir: büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artı, tümör nekroz faktör (TNF), TGF- β (Transforming Growth Factor), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyal enfeksiyonlar ve glukokortikoidler gibi [75].

Apoptoz süreci, DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim)

olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir. Bu süreçte belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar: Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteinidir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozisde gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur [76, 77].

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarım alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Hücrenin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili "apoptotik cisimcikler" oluşur. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler (Şekil 2.3). Apoptozis 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptoziste önemli bir role sahiptir ve stabilizasyonu apoptozisi engellemektedir [76, 77, 78].



Şekil 2.3. Apoptozise uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler [77]

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan çalışmamızda Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM)'nden sağlanan Wistar Albino cinsi, 24 adet, yenidoğan dişi sıçanlar kullanıldı.

Denekler laboratuvar ortamında seksüel olgunluğa (65-110 gün) gelene kadar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünde ve 20-25°C'lik sıcaklıkta tasarlanmış laboratuvar ortamında tutuldular. Tüm deneklerin su ve besine serbest erişimi sağlandı. Deney süresince tüm deneklerin ağırlıkları enjeksiyondan önce tartıldı [45].

Çalışmada her grupta 6 sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturuldu;

Grup 1: İlk 10 gün boyunca BPA ile aynı dozda susam yağı ve 20. günden 30. güne kadar Melatonin dozuna eş değer %1'lik etanol uygulanan, kontrol grubu sıçanlar (n=6).

Grup 2: İlk 10 gün boyunca 100 mg/kg vücut ağırlığı dozda susam yağında çözülmüş BPA uygulanan, BPA grubu sıçanlar (n=6).

Grup 3: 20. günden itibaren -prepuberteden puberteye- 10 gün boyunca %1'lik etanol'de çözülmüş melatonin uygulanan, Melatonin grubu sıçanlar (n=6).

Grup 4: İlk 10 gün boyunca 100 mg/kg vücut ağırlığı dozda susam yağında çözülmüş BPA ve 20. günden itibaren 10 gün boyunca 10 mg/kg vücut ağırlığı dozda %1'lik etanol'de çözülmüş melatonin uygulanan, BPA+Melatonin grubu sıçanlar (n=6).

Sıçanların doğdukları gün sıfır kabul edilerek neonatal dönemde ilk 10 gün boyunca Grup 2 ve 4'e 100 mg/kg vücut ağırlığı dozda susam yağında çözülmüş BPA subkutan enjeksiyon ile uygulandı. Grup 1'de bulunan dişi sıçanlara aynı stres koşullarının oluşturulması

amacıyla ilk 10 gün boyunca BPA ile aynı dozda susam yağı subkutan enjeksiyon ile uygulandı.

Dişi sıçanlarda vajinal açıklığın ve ilk proöstrusun gözlenmesinin puberte belirteci olduğu, vajina açıklığının görülmesinden yaklaşık bir hafta sonra da östrus siklusunun başladığı, vajinal açıklığın yaklaşık 33-42. günlerde, vücut ağırlığı 100 gram iken meydana geldiğini belirtilen çalışmalar referans alınarak [44, 79] Grup 3 ve 4'e puberte başlangıcından önce prepuberteden (20. gün) tahmini puberteye kadar (30. gün) 10 gün boyunca 10 mg/kg vücut ağırlığı dozda Melatonin, %1'lik etanolde çözüldükten sonra sirkadiyen ritim dikkate alınarak 10 gün boyunca saat 16.00'da karanlık ortamda subkutan enjeksiyon ile uygulandı. Grup 1'de bulunan dişi sıçanlara aynı stres koşullarının oluşturulması amacıyla aynı günlerde Melatonin dozuna eş değer %1'lik etanol subkutan enjeksiyon ile uygulandı.

Tüm sıçanlar ilgili uygulamalar sonrasında seksüel olgunluğa ulaştığında [45] yaklaşık 70. günde 40 mg/kg dozda ketamin hidroklorid ve 5 mg/kg dozda ksilazin hidroklorid enjeksiyonu ile uyutularak ötenazileri gerçekleştirildi. Ötenazi sonrası uterus dokuları alındı.

Alınan uterus dokuları tartıldıktan sonra, ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk nötralformalde en az 72 saat oda sıcaklığında tespit edildi. Doku örnekleri rutin histolojik takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı ve hazırlanan parafin bloklardan alınan 4-5 µm kalınlığındaki kesitlerle ışık mikroskopik düzeyde incelemeler yapıldı.

3.2. Vajinal Açıklık ve Puberte Tayini

Nah ve arkadaşlarının yaptığı [7] puberte tayini dikkate alınarak, sıçanlar yaklaşık 20. güne ulaştıklarından itibaren vajinal açıklıkları görülene kadar her gün aynı saatte kontrolleri yapıldı. Vajinal açıklığın gözlenmesinden yaklaşık bir hafta sonra östrus döngüsünün başladığı varsayılarak her hayvandan vajinal smear örnekleri alındı [44, 79]. Smear örnekleri alınırken sıçanlar, kuyruk kökünden tespit edilip kaldırılarak başı aşağıya gelecek şekilde tutuldu, vajina %0,2'lik serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra cam bagetle lama

yayacak şekilde alındı. Alınan smear örnekleri tespit edildikten %96'lık alkolde 5 dakika bekletildi. Örnekler alkolden çıkarıldıktan sonra iki kez distile su ile yıkandı. Kesitlerin 4 dakika toluidin mavisi ile boyanması sağlandı ve tekrar distile su ile iki kez yıkandı. Örnekler %96'lık alkole batırıldıktan sonra süresi dikkate alınmadan ksilende bekletildi. Ksilenden çıkarılan kesitler havada kurutulduktan sonra entellanla kapatıldı. Boyanan smear örneklerinde görülen vajinal epitel hücrelerinin görüntüleri Leica DM 4000B (Germany) ışık mikroskobunda elde edildikten sonra, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

3.3. Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi

Deparafinizasyon işlemi için, lamlara alınan kesitler 37°C'lik etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. Lamlar deparafinizasyonu tamamlamak için 3 kez 20'şer dakika ksilolde bırakıldıktan sonra rehidratasyon işlemi için sırasıyla %100, %90, %80, %70 ve %50 etil alkol serilerinde 10'ar dakika tutuldu. Kesitler havada kurutularak 10 dakika akan musluk suyu ile yıkanarak alkolden arındırıldı. Kesitler 10 dakika hematoksilen boya solüsyonunda tutuldu. Daha sonra akan musluk suyu altında 10 dakika yıkandı. Kesitler ayrışma (farklılaşma) işlemi için glasiyel asetik asit ile alkol karışımı olan solüsyona 2-3 kez batırılıp çıkarılarak akan musluk suyu altında 10 dakika yıkandı. Kesitler 10 dakika Eosin boya solüsyonunda tutuldu. Sonra 10 dakika akan musluk suyu ile yıkandıktan sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla % 50, %70, %80, %90 ve %100'lük etil alkol serilerinden hızlıca geçirilerek 45 dakika ksilolde bekletildi ve lamlar entellan ile kapatıldı. Kesitler Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda elde edilen görüntüler, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

3.4. TUNEL Yöntemi

Her gruba ait doku örneklerinde DNA fragmentasyonu ile gelişen apoptozisi saptamak için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi uygulanmıştır.

Kesitler 37°C'deki etüvde bir gece tutulmuş daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat, son olarak da 61°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15'şer dakika ksilol'e etkin bırakılmıştır. Daha sonra 5'er dakika sırasıyla 2 kez absolü alkol, 1 kez %96'lık ve %70'lik alkol serilerinden geçirilmiştir. Kesitler alkolden arındırılmak için 5 dakika PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra etrafı PAP-pen ile çevrelenen dokular, 15 dakika boyunca 20 µg/ml proteinaz K ile inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular 2 kez 2'şer dakika PBS ile yıkanmıştır. PBS ile yıkama aşamasından sonra 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılmış dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmiştir. 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler üzerine Equilibration Buffer damlatılarak oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. 60 dakika 37°C nemli ve karanlık ortamda Millipore Apoptag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection kit ile bekletilmiştir. Daha sonra dokular Stop/Wash tamponunda 10 dakika bekletilmiş ve 1 dakika PBS ile yıkanmıştır. Ardından dokular Anti-Digoxin Peroksidase solüsyonu ile nemli ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Tekrar dokular 4 kez 2'şer dakika PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapılmıştır. 3 kez 1'er dakika distile su ile yıkanmış ve 5 dakika distile suda bekletilmiştir. Zemin boyası olarak Metilen Green'de 10 dakika bekletilmiştir. Boyanan camlar 3 kez 1'er dakika distile suda yıkandıktan sonra artan alkol serilerinden geçirilmiştir. Son olarak da 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile lamelle kapatılmışlardır. Kesitler Leica D bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde değerlendirilmiştir.

3.5. İstatistiksel Yöntem

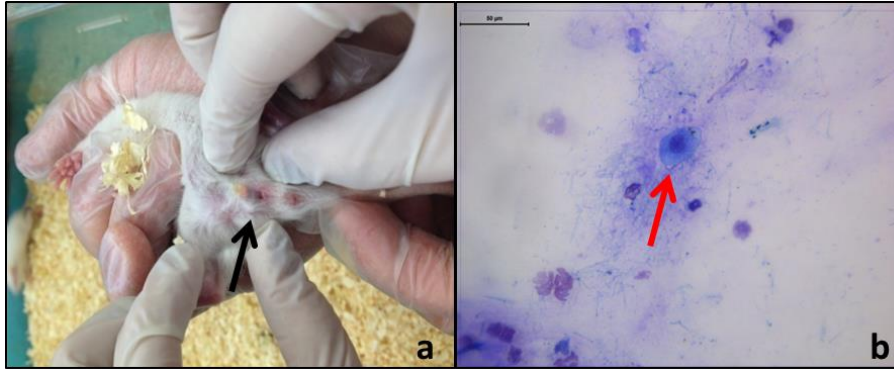
Sıçanların deney başlangıcından deneyi sonlandırıncaya kadar geçen sürede ağırlıkları tartılarak her gruba ait ağırlık artışı ortalamaları ve deney sonlandırıldıktan sonra uterus dokuları tartılarak elde edilen organ ağırlıkları ortalamalarına ait veriler IBM SPSS 20 istatistik programına yüklenerek Kruskal-Wallis testi ile gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirildi. Kruskal Wallis testiyle anlamlı bulunan grupların ikili karşılaştırılması ise Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ 'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Elde edilen H&E boyamalarında, her gruba ait deneklerden alınan seri kesitlerden 6'sar ölçüm yapılarak uterus lümen genişliği, luminal epitel yüksekliği, miyometrium kalınlığı, uterus bezleri ve apoptozise giden hücrelerin sayısı ölçüldü. Elde edilen veriler IBM SPSS 20 istatistik programına yüklenerek gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Kruskal Wallis testiyle anlamlı bulunan grupların ikili karşılaştırılması ise Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. $p<0.05$ 'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

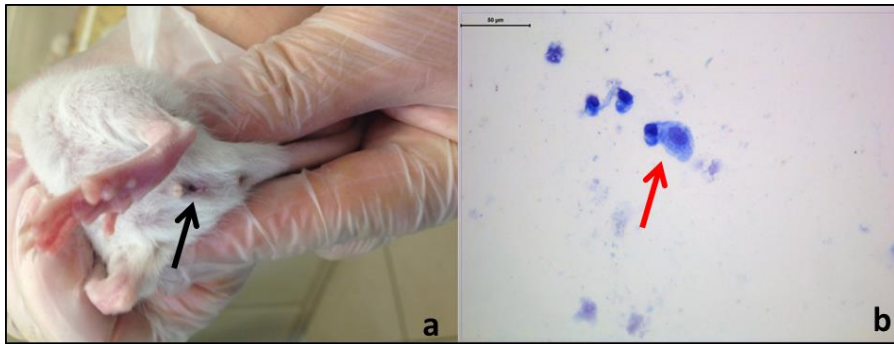
4.1. Vajinal Açıklık ve Puberte Tayini Bulguları

BPA grubuna ait sıçanlarda 24 günlük ve ortalama ağırlıkları 46,0 gram olduğunda vaginal açıklığın oluştuğu görüldü (Resim 4.1a). Bundan bir hafta sonra alınan smear örnekleri boyanarak incelendi (Resim 4.1b). Vajinal smearda epitelyum hücrelerinin gözlenmesi, BPA grubunda östrus siklusunun 31. günde başladığını göstermiştir.



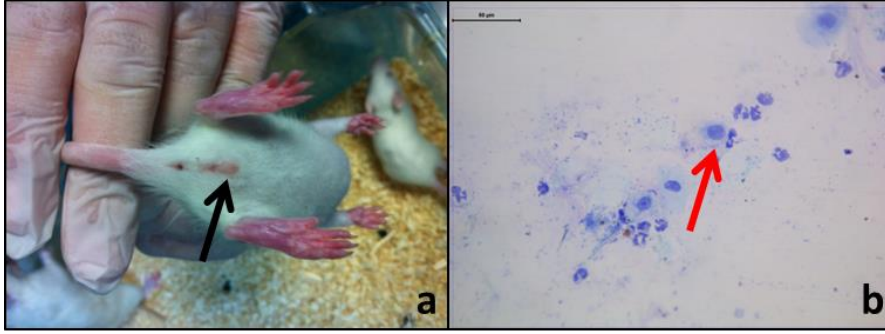
Resim 4.1. BPA grubuna ait vajinal açıklık (siyah ok) (a) ve vajinal smear (kırmızı ok) (b)

BPA+Melatonin grubuna ait sıçanlarda 31 günlük ve ortalama ağırlıkları 67,75 gram olduğunda vaginal açıklığın oluştuğu görüldü (Resim 4.2a). Bundan bir hafta sonra alınan smear örnekleri boyanarak incelendi (Resim 4.2b). Vajinal smearda epitelyum hücrelerinin gözlenmesi, BPA+Melatonin grubunda östrus siklusunun 38. günde başladığını göstermiştir.



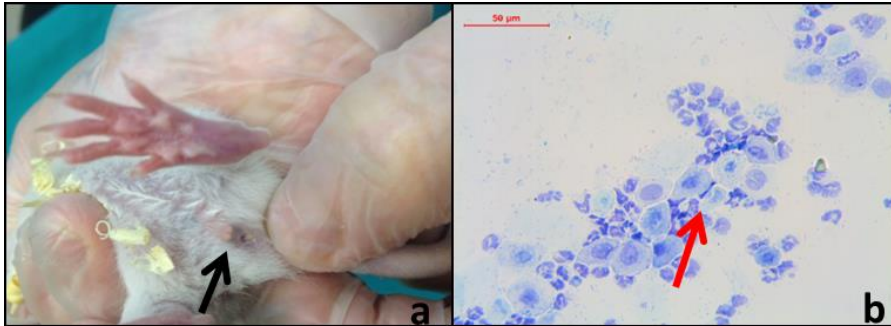
Resim 4.2. BPA+Melatonin grubuna ait vajinal açıklık (siyah ok) (a) ve vajinal smear (kırmızı ok) (b)

Melatonin grubuna ait sıçanlarda 40 günlük ve ortalama ağırlıkları 75,0 gram olduğunda vajinal açıklığın oluştuğu görüldü (Resim 4.3a). Bundan bir hafta sonra alınan smear örnekleri boyanarak incelendi (Resim 4.3b). Vajinal smearda epitelyum hücrelerinin gözlenmesi, Melatonin grubunda östrus siklusunun 47. günde başladığını göstermiştir.



Resim 4.3. Melatonin grubuna ait vajinal açıklık (siyah ok) (a) ve vajinal smear (kırmızı ok) (b)

Kontrol grubuna ait sıçanlarda 54 günlük ve ortalama ağırlıkları 100,0 gram olduğunda vajinal açıklığın oluştuğu görüldü (Resim 4.4a). Bundan bir hafta sonra alınan smear örnekleri boyanarak incelendi (Resim 4.4b). Vajinal smearda epitelyum hücrelerinin gözlenmesi, Kontrol grubunda östrus siklusunun 61. günde başladığını göstermiştir.



Resim 4.4. Kontrol grubuna ait vajinal açıklık (siyah ok) (a) ve vajinal smear (kırmızı ok) (b)

Elde edilen verilere göre kontrol grubunda vajinal açıklığın yapılan çalışmalara benzer şekilde yaklaşık 100,0 gram ağırlığa ulaştığında [79] görüldüğü gözlenmişken, BPA uygulanan sıçanlarda diğer gruplara kıyasla henüz ortalama 46,0 gram ağırlığındayken vajinal açıklığın ilk kez görülmesinin, BPA'nın erken puberteye neden olabileceğini göstermektedir. Bunu takiben BPA+Melatonin grubundaki sıçanlar değerlendirildiğinde

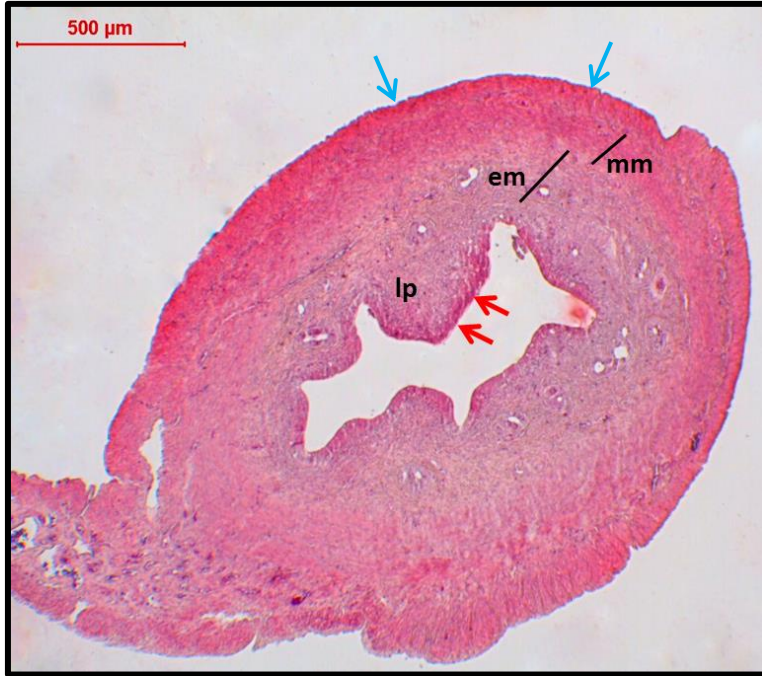
BPA uygulanan gruba kıyasla, puberteye bir hafta daha geç girmesi, Melatonin uygulamasının erken puberte bulgularını geciktirdiğini göstermiştir. Melatonin grubunda, melatonin uygulanan sıçanlar Kontrol grubuna göre daha erken puberteye girmiştir. Melatonin uygulamasının da minimal düzeyde kilo alımına neden olduğu, kilo alımının ise daha erken puberteye girmeye neden olabileceği düşünülmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Gruplara ait vajinal açıklık dönemlerindeki ortalama ağırlıkları

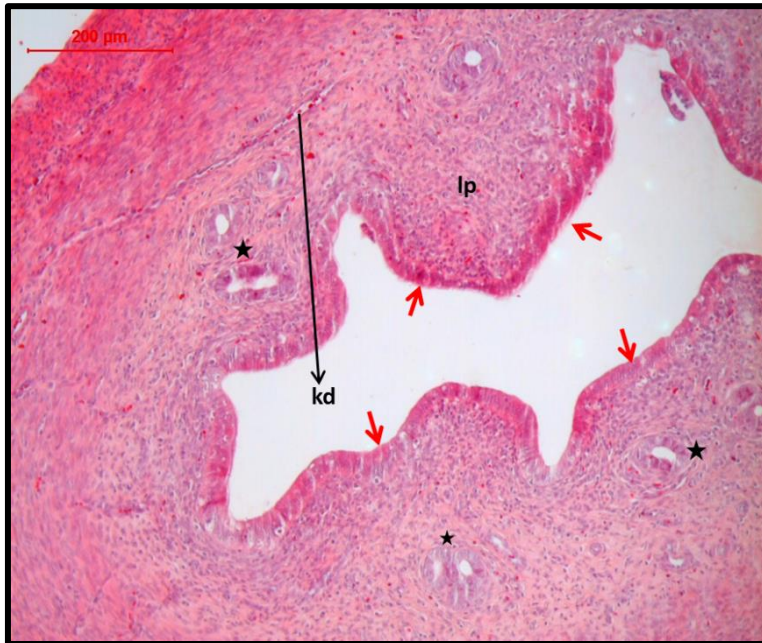
	24. gün	31. gün	40. gün	54. gün
Kontrol	35.0 gr	53.0 gr	67.0 gr	99,7 gr
BPA	46.0 gr	69.0 gr	81 gr	106.0 gr
Melatonin	46.0 gr	65.0 gr	75 gr	104.0 gr
BPA+Melatonin	44.0 gr	67.75 gr	82 gr	118.0 gr

4.2. H&E Bulguları

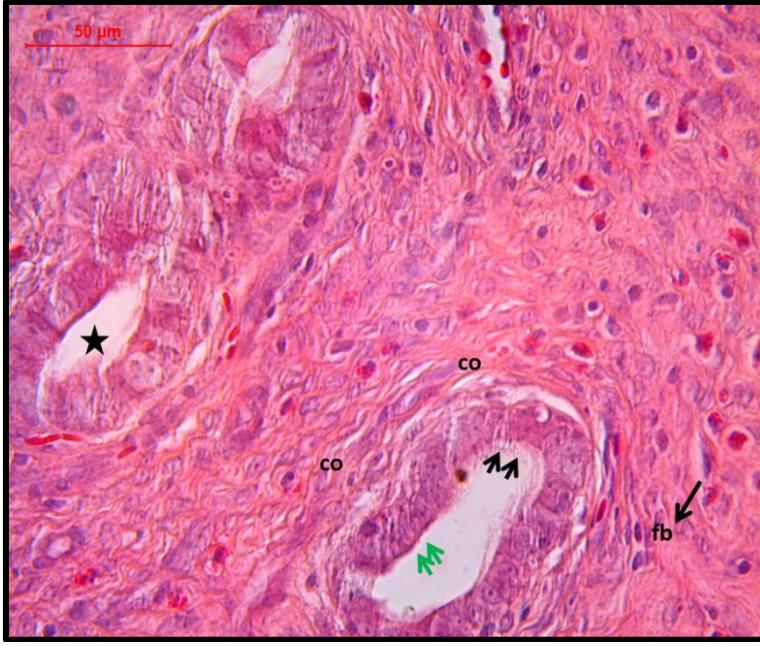
Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun H&E ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede uterusun üç tabakası normal yapıda ve net olarak ayırt edilebilmekteydi. Tek katlı prizmatik epitel ile altındaki lamina propriadan oluşmakta olan endometrium, uterusun düz kaslardan oluşmakta olan miyometrium ve miyometriumu saran seroza tabakaları belirgin olarak ayırt edildi (Resim 4.5). Aynı grubun büyük büyültmesinde tek katlı prizmatik epiteliden oluşan luminal epitel ile altında düz, tübüler yapıdaki uterus bezlerinin (glandula uterina) bulunduğu lamina propria katı ayırt edilmekteydi. Uterus bezlerinin genellikle endometriumun yüzeyel katında bulunduğu dikkati çekti. Lamina propriada kan damarlarının varlığı saptandı (Resim 4.6). Aynı grubun en büyük büyültmesinde tek katlı prizmatik luminal epiteli oluşturan silyalı hücreler ile silyasız salgı yapan prizmatik hücrelerin normal düzende ve yapıda oldukları dikkati çekti (Resim 4.7). Epitelin altındaki lamina propriada düz, tübüler yapıdaki uterus bezleri ile hücreden zengin interglandular stroma izlendi. İnterglandular stromada kollagen liflerin, fibroblastların ve diğer bağ dokusu hücrelerinin varlığı ayırt edildi. Kontrol grubuna ait diğer bir kesitte longitudinal seyir gösteren, düz kaslardan oluşan miyometrium tabakası ile onu çevreleyen gevşek bağ dokusu yapısındaki seroza tabakası ayırt edildi (Resim 4.8).



Resim 4.5. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, tek katlı prizmatik epitel (kırmızı ok), lamina propriadan (lp) oluşan endometrium katı (em), düz kas tabakasından oluşan miyometrium katı (mm), seroza (mavi ok) ayırt edilmekte (H&E, x40)



Resim 4.6. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, tek katlı prizmatik epitel (kırmızı ok) ile lamina proprianın (lp) yüzeyel katında bulunan tübüler yapıdaki uterus bezleri (★), interglandular stromadaki kan damarı (kd) izlenmekte (H&E, x100)

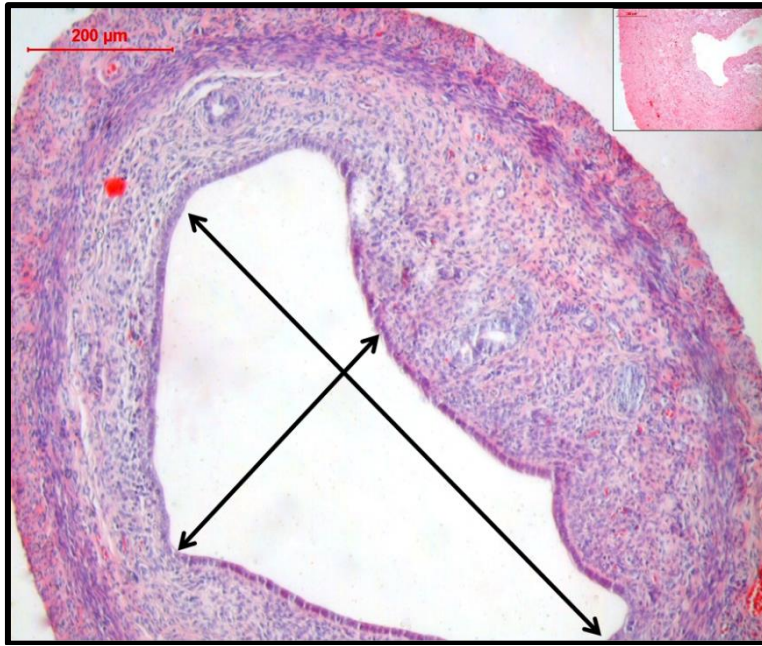


Resim 4.7. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, tek katlı prizmatik epiteli oluşturan silyalı hücreler (siyah ok) ile silyasız salgı yapan prizmatik hücreler (yeşil ok), lamina propriadan tübüler yapıdaki uterus bezleri (★), interglandular stromada fibroblastlar (fb) ile kollagen lifleri (co) dikkati çekmekte (H&E, x400)

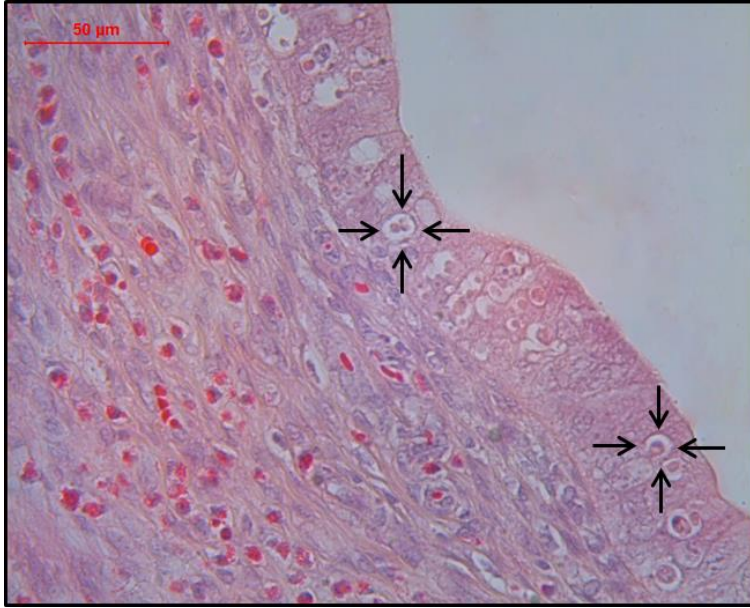


Resim 4.8. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, lamina propriadan tübüler yapıdaki uterus bezlerinin görüldüğü endometrium katı (em), longitudinal seyirli düz kaslardan oluşan miyometrium katı (mm) ile miyometriumu çevreleyen seroza (se) katı görülmekte (H&E, x100)

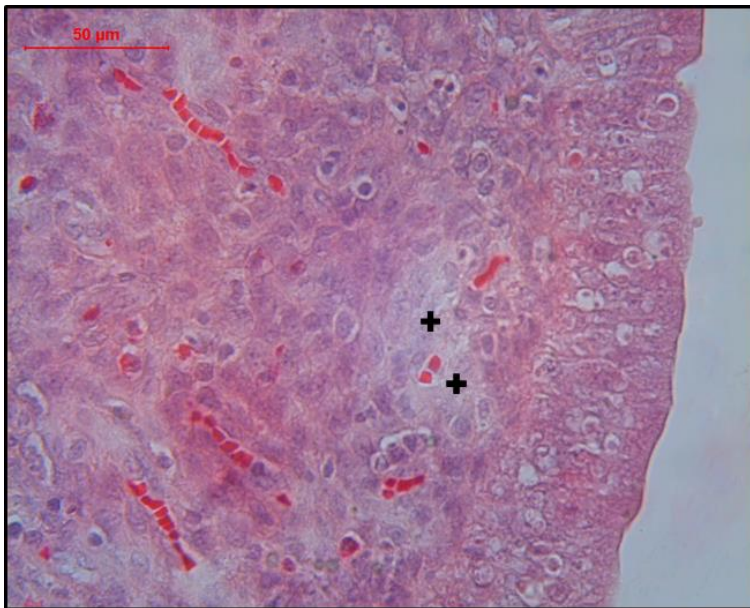
BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun H&E ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede uterus lümeninin kontrol grubuna göre genişlemiş olduğu, uterusu ait endometrium, miyometrium ve seroza tabakalarının net olarak ayırt edilemediği görülmüştür (Resim 4.9). Aynı grubun büyük büyültmesinde luminal epitelini oluşturan silialı hücreler ile siliasız salgı yapan hücrelerin net olarak ayırt edilemediği, epitel hücreleri arasında heterokromatik çekirdek benzeri oluşumlar içeren köpüksü görünümdeki boşlukların (kaviteli yapıların) meydana geldiği saptandı. Epitel altındaki lamina propriada, kontrol grubuna göre uterus bezlerinin azaldığı ya da hiç görülmediği alanlar tespit edildi (Resim 4.10). Ayrıca lamina propriada, stromayı oluşturan bağ dokusu hücrelerinde, fibroblastlarda, kollagen liflerde dejeneratif değişiklikler, yer yer ödematöz alanlar ve ekstrasvaze (damar dışına çıkmış) eritrositler belirlendi (Resim 4.11). Aynı grubun büyük büyültmesinde miyometrium katını oluşturan longitudinal düzende düz kas tabakasında kontrol grubuna göre artış olduğu ve kas tabakasını saran serozanın gevşek bağ dokusunun ve mezotelden oluşmuş olduğu görüldü (Resim 4.12).



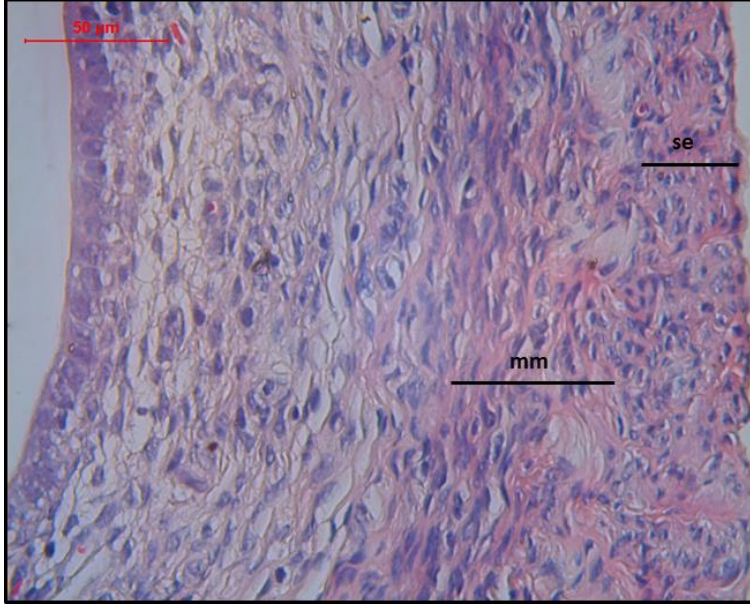
Resim 4.9. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, küçük büyültmede kontrol grubuna göre artmış uterus lümen çapı ($\leftrightarrow$), sınırları net olarak ayırt edilemeyen endometrium, miyometrium ve seroza katları (H&E, x100)



Resim 4.10. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, luminal epiteli oluşturan net olarak ayırt edilemeyen silyalı ve silyasız salgı hücreleri arasında heterokromatik görünümlü çekirdek benzeri oluşumlar içeren köpüksü görünümlü boşluklar(siyah oklar) görülmekte (H&E, x400)

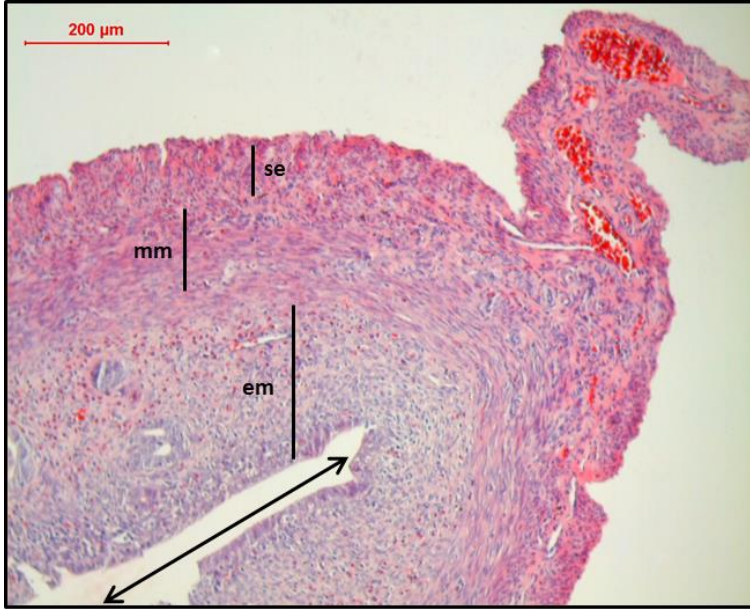


Resim 4.11. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, lamina propriada yer yer ödematöz alanlar(+) görülmekte (H&E, x400)

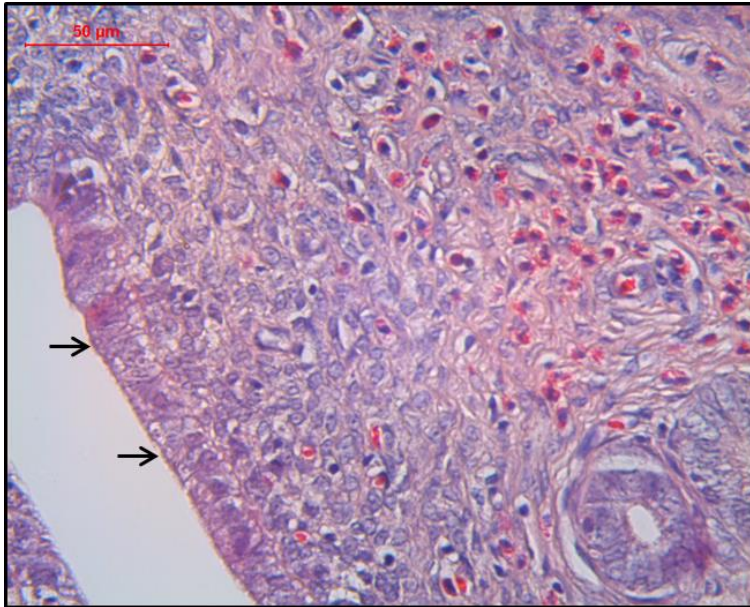


Resim 4.12. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, miyometrium katını (mm) oluşturan longitudinal düzenlenimli düz kas tabakasında kontrol grubuna göre artış olduğu ve kas tabakasını saran serozanın (se) gevşek bağ dokusun mezotelden oluşmuş olduğu görülmekte (H&E, x400)

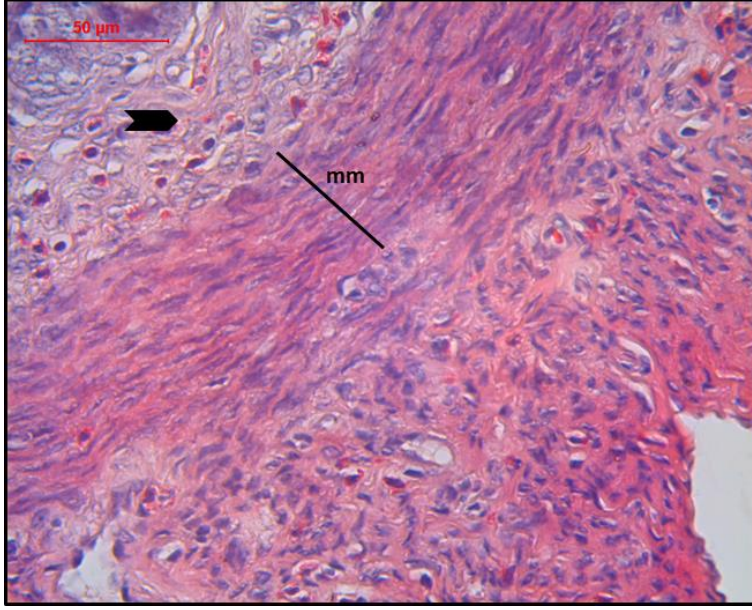
Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun H&E ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede lümen çapının diğer gruplara göre azalmış olduğu belirlendi (Şekil 4.6). Uterusa ait endometrium, miyometrium ve seroza katları ayırt edilebildi (Resim 4.13). Epiteli oluşturan silyalı ve silyasız salgı yapan prizmatik hücreler belirgindi. Lamina propriada uterus bezlerinin sayısında Kontrol grubuna eşdeğer olduğu belirlendi (Şekil 4.6, Resim 4.14). İnterglandular stromanın normal yapıda olduğu görüldü. Miyometrium tabakasının kalınlığının da Kontrol grubuna eşdeğer olduğu belirlendi (Resim 4.15).



Resim 4.13. Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, lümen çapında ($\leftrightarrow$) meydana gelen değişiklikler ve uterusu ait endometrium (em), miyometrium (mm) ve seroza (se) katları ayırt edilmekte (H&E, x100)



Resim 4.14. Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, luminal epiteli oluşturan prizmatik silyalı hücreler ve silyasız salgı hücreleri (siyah ok) görülmekte (H&E, x400)

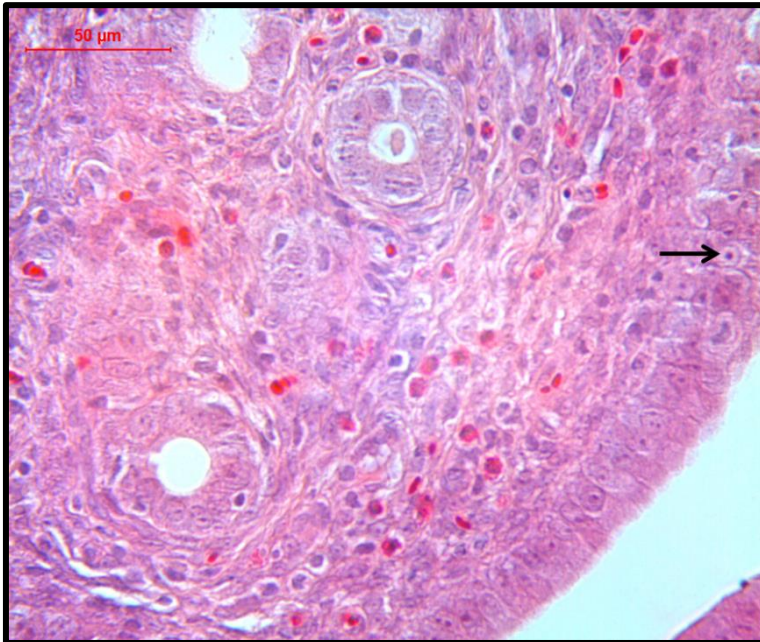


Resim 4.15. Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, normal yapıdaki interglandular stroma (➡) ve kalınlığı Kontrol grubuna eşdeğer olan miyometrium katı (mm) görülmekte (H&E, x400)

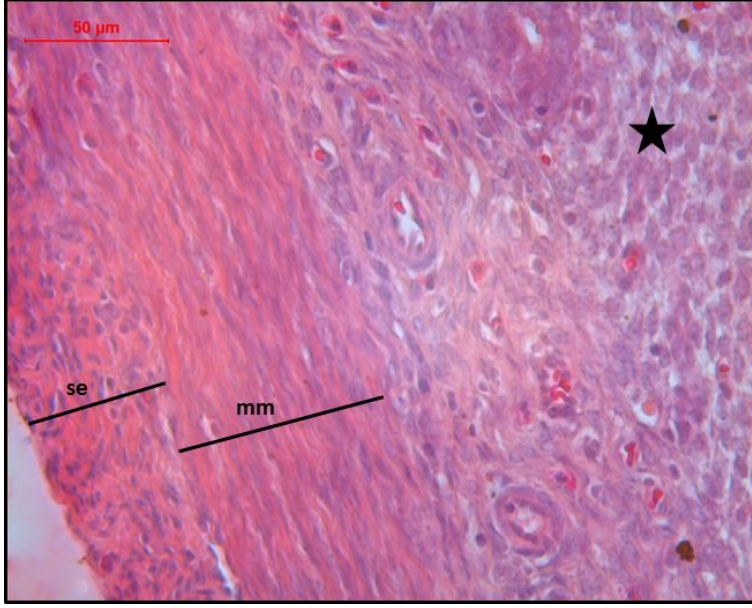
BPA+Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun H&E ile boyanmış enine kesitlerinde, küçük büyültmede luminal epitel, uterus bezlerini içeren lamina propria, miyometrium ve seroza tabakası ayırt edildi. Uterus lümen çapının BPA ve Kontrol grubuna göre azalmış olduğunu gördük (Resim 4.16). Aynı grubun büyük büyültmesinde luminal epiteli oluşturan hücrelerin düzeninde BPA grubuna göre sayıca oldukça az olan heterokromatik çekirdekli, köpüksü görünümlü kavitasyonlara rastlandı. Lamina propriadaki tübüler bezlerin sayıca diğer gruplara kıyasla azalmış olduğu saptandı (Resim 4.17). İnterglandular stromayı oluşturan bağ dokusu hücrelerinin, fibroblastların ve kollagen liflerin düzeninin BPA grubuna göre daha düzgün olduğu ancak bazı alanlarda disorganize alanlar olduğu için hücrelerin net olarak ayırt edilemediği belirlendi. Bununla birlikte ödematöz alanların kaybolmuş olduğu, miyometriumu oluşturan longitudinal kas liflerinin ve seroza katının belirgin olarak ayırt edildiği dikkati çekti (Resim 4.18).



Resim 4.16. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, luminal epitel, uterus bezlerini içeren lamina propria (lp), miyometrium (mm) ve seroza (se) katları ayırt edilmekte ve lümen çapının BPA ve Kontrol grubuna göre azalmış olduğu görülmekte (H&E, x100)



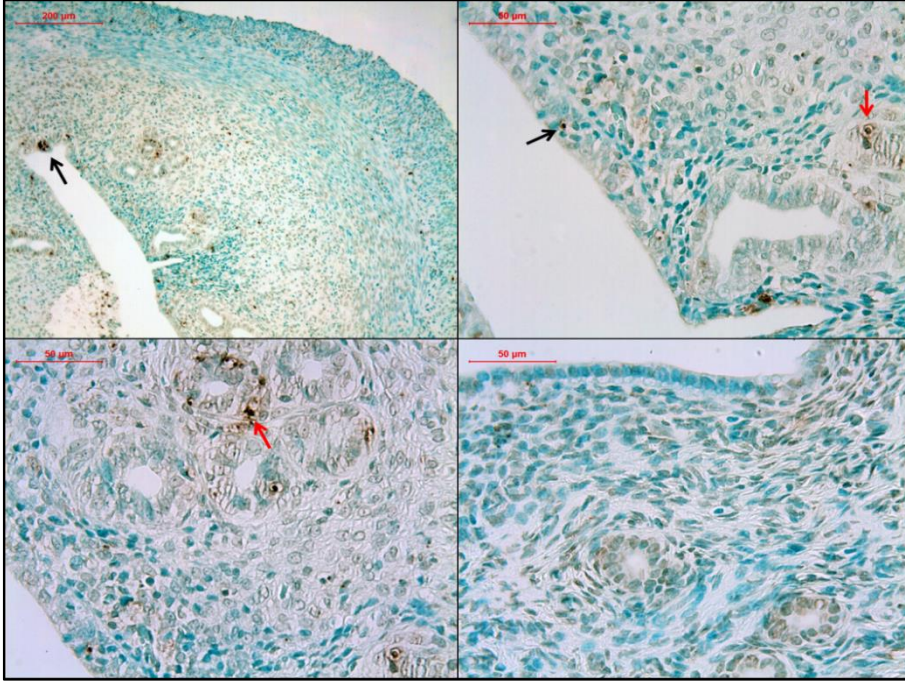
Resim 4.17. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, luminal epitel hücrelerinin BPA grubuna göre daha düzeli olduğu ve aralarında BPA grubuna oldukça az olan heterokromatik çekirdekleri olan köpüksü görünümlü kavitasyonlara (siyah ok) görülmekte (H&E, x400)



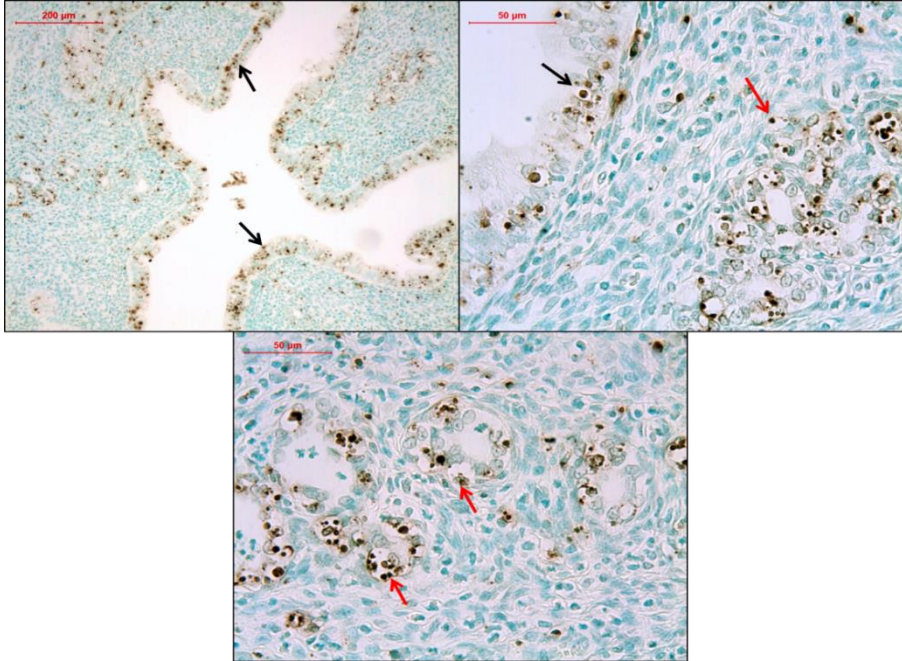
Resim 4.18. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, interglandular stromayı oluşturan yapıların BPA grubuna göre düzelmiş olduğu, ödematöz alanların(★) kaybolduğu, miyometriumu (mm) oluşturan longitudinal kas lifleri ve seroza (se) belirgin olarak ayırt edilmekte (H&E, x400)

4.3. TUNEL Bulguları

Gruplar arasında DNA fragmentasyonunu belirlemek amacı ile yapılan TUNEL boyaması sonucu, uterus dokusundan alınan enine kesitlerde, BPA grubundaki apoptotik aktivitenin luminal epitel ve glandüler epiteli oluşturan epitel hücrelerinde, Kontrol grubuna göre artmış olduğu dikkati çekti (Resim 4.19, Resim 4.20).

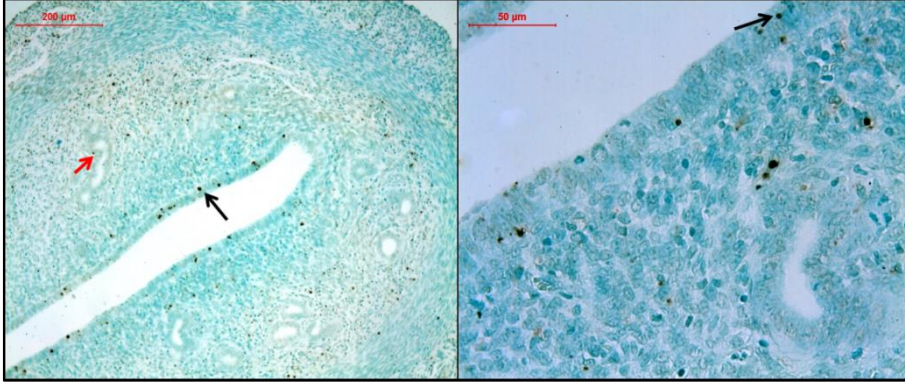


Resim 4.19. Kontrol grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde **a)**x100, **b)**x400, **c)**x400, **d)**x400 büyültmelerinde TUNEL yöntemi ile fizyolojik apoptozis luminal epitelde (siyah ok) ve glandüler epitelde (kırmızı ok) gözlemlendi (DAB&Metilen Green)

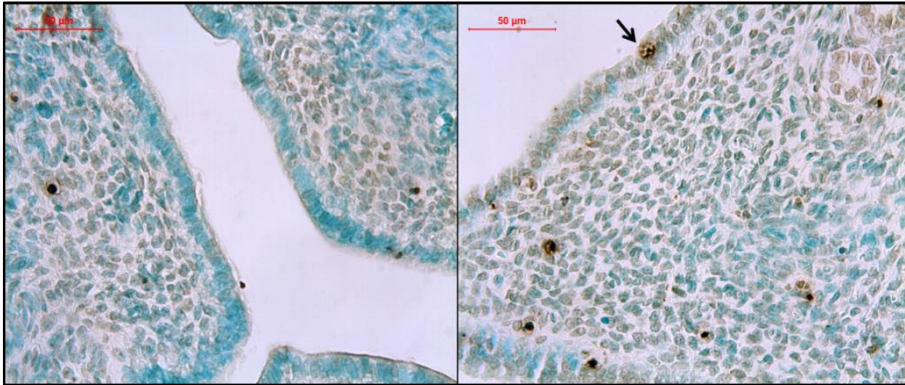


Resim 4.20. BPA grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, **a)**x100, **b)**x400, **c)**x400 büyültmelerinde TUNEL yöntemi ile Kontrol grubuna göre luminal epitelde (siyah ok) ve glandüler epitelde (kırmızı ok) apoptotik reaksiyonda artış gözlemlendi (DAB&Metilen Green)

Melatonin grubundaki apoptotik aktivitenin ise luminal epitel ve glandüler epiteli oluşturan epitel hücrelerinde, Kontrol ve BPA+Melatonin grubuna yakın olduğu gözlemlendi (Resim 4.21, Resim 4.22).



Resim 4.21. Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, **a)**x100, **b)**x400 büyültmelerinde TUNEL yöntemi ile luminal epitelde (siyah ok) ve glandüler epitelde (kırmızı ok) Kontrol grubuna eşdeğer apoptotik reaksiyon gözlemlendi (DAB&Metilen Green)



Resim 4.22. BPA+Melatonin grubuna ait sıçan uterus dokusunun enine kesitinde, **a)**x100, **b)**x400 büyültmelerinde TUNEL yöntemi ile luminal epitelde (siyah ok) ve glandüler epitelde Kontrol grubuna eşdeğer apoptotik reaksiyon gözlemlendi (DAB&Metilen Green)

Sonuç olarak, BPA grubunda, diğer gruplarda mevcut olan fizyolojik apoptozis bulgularının değişikliğe uğradığı; BPA'nın lümen epitelini ve glandüler epiteli oluşturan epitel hücrelerinde apoptozisi indüklediği düşünülmüştür.

4.4. İstatistiksel Bulgular

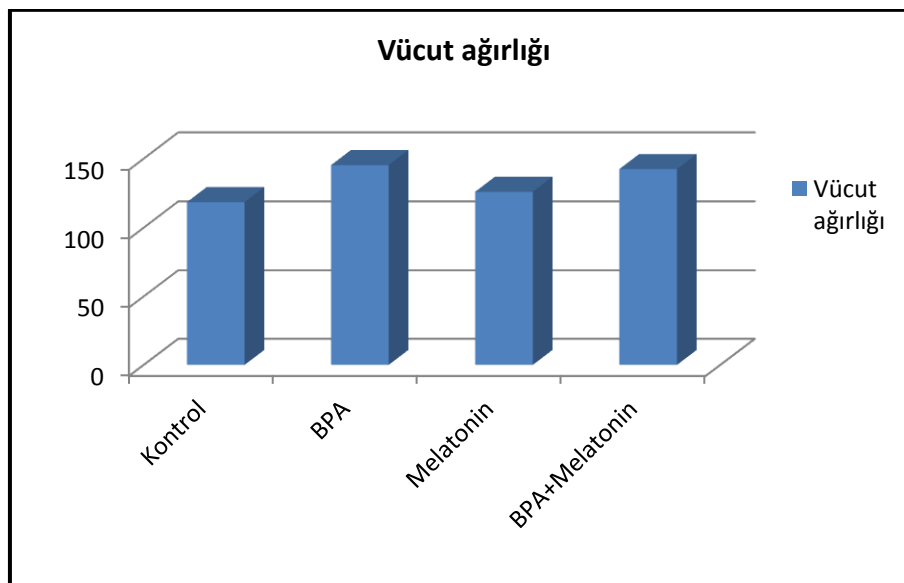
4.4.1. Vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Sıçanların deney başlangıcı ve deneyi sonlandırmadan önceki ağırlıkları saptandı ve her gruba ait ağırlık artışı ortalamaları, standart sapmaları, ortanca değerleri hesaplandı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Gruplara ait vücut ağırlıklarının artış ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri

	ORT±SS	ORTANCA (Min/Max)
Kontrol	121,86±8,66gr	118,5 (111,60/133,60)
BPA	146,62±24.40gr	145,3 (111,20/176,50)
Melatonin	129,90±15,54gr	126(111,20/146,20)
BPA+Matonin	146,56±21,70gr	142,4 (118/175,10)

Gruplara ait ağırlık artışına ait ortalamalar; Kontrol grubu 121,86±8,66gr, BPA grubu 146,62±24.40gr, Melatonin grubu 129,90±15,54gr, BPA+Melatonin grubu 146,56±21,70gr olarak saptandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Gruplara ait vücut ağırlıkları artışı (Ortanca değere göre oluşturulmuştur.)

Dört gruba ait elde edilen vücut ağırlık artışları birbirleriyle kıyaslandığında Kruskal Wallis testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ağırlık artışı saptanmazken ($p=0,257$), Kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda ağırlık artışının olduğu ancak bu artışın en fazla BPA grubunda olduğu ve bunu BPA+Melatonin ve Melatonin grubunun takip ettiği gözlemlenmiştir.

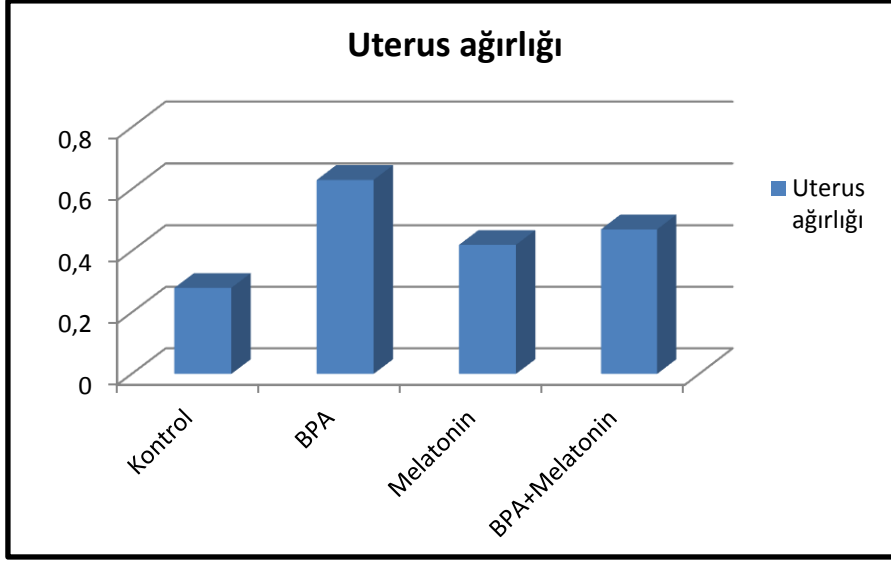
4.4.2. Organ ağırlıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Her gruba ait sıçanların deney sonlandırıldıktan sonra uterusları tartıldı. Organ ağırlıklarının ortalamaları, standart sapmaları, ortanca değerleri hesaplandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Gruplara ait uterus ağırlık ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri

	ORT $\pm$ SS	ORTANCA	(Min/Max)
Kontrol	0,28 $\pm$ 0,08 gr	0,28	(0,18/0,40)
BPA	0,55 $\pm$ 0,25 gr	0,63	(0,17/0,76)
Melatonin	0,41 $\pm$ 0,07 gr	0,42	(0,31/0,48)
BPA+Melatonin	0,43 $\pm$ 0,20 gr	0,47	(0,18/0,86)

Gruplara ait uterus ağırlık ortalamaları; Kontrol grubu 0,28 $\pm$ 0,08gr, BPA grubu 0,55 $\pm$ 0,25gr, Melatonin grubu 0,41 $\pm$ 0,07gr, BPA+Melatonin grubu 0,43 $\pm$ 0,20gr olarak saptandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Gruplara ait uterus ağırlık artışı (Ortanca değere göre oluşturulmuştur.)

Dört gruba ait elde edilen organ ağırlıkları birbirleriyle kıyaslandığında Kruskal Wallis testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmazken ($p=0,149$), her gruba ait organ ağırlıklarının ortalama değerleri kıyaslandığında, BPA grubunda artışın kontrole ve diğer gruplara kıyasla daha fazla olduğu saptandı. Buna karşılık Melatonin ve BPA+Melatonin gruplarının kontrole eşdeğer olduğu gözlemlendi.

4.4.3. H&E bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Luminal epitel yüksekliğinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Her gruba ait alınan seri kesitlerin, H&E boyamalarının ardından yapılan değerlendirmelerde, her bir seri kesitten 6'şar ölçüm yapılarak luminal epitel yüksekliği ortalamaları, standart sapmaları, ortanca değerleri hesaplandı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Gruplara ait luminal epitel yüksekliğinin ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri

	ORT±SS	ORTANCA (Min/Max)
Kontrol	165,01±47,21	168,32 (76,00/263,09)
BPA	157,63±80,27	125,60 (56,58/312,31)
Melatonin	151,84±41,99	155,59 (66,76/250,00)
BPA+Melatonin	198,26±136,47	149,94 (48,66/526,17)

Gruplara ait luminal epitel yüksekliği ortalamaları; Kontrol grubunda 165,01±47,21; BPA grubunda 157,63±80,27; Melatonin grubunda 151,84±41,99; BPA+Melatonin grubunda 198,26±136,47 olarak saptandı (Şekil 4.3).

Dört gruba ait elde edilen epitel yükseklikleri birbirleriyle kıyaslandığında Kruskal Wallis testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmazken ($p=0,67$), her gruba ait luminal epitel yüksekliğinin ortalama değerleri kıyaslandığında, Kontrol grubuna göre BPA ve Melatonin grubunda epitel yüksekliğinde azalma olduğu, BPA+Melatonin grubunun ise Kontrole yakın olduğu gözlemlendi.

Miyometrium kalınlığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Her gruba ait alınan seri kesitlerin, H&E boyamalarının ardından yapılan değerlendirmelerde, her bir seri kesitten 6'şar ölçüm yapılarak miyometrium kalınlığının ortalamaları, standart sapmaları, ortanca değerleri hesaplandı (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Gruplara ait miyometrium kalınlığının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri

	ORT±SS	ORTANCA (Min/Max)
Kontrol	20,20±9,62	14,71 (9,90/40,74)
BPA	23,31±16,56	14,72 (8,77/61,10)
Melatonin	22,59±7,71	21,93 (12,16/40,74)
BPA+Melatonin	21,16±7,21	18,81 (10,47/37,34)

Yapılan ölçümler sonucunda miyometrium kalınlığının ortalamaları; Kontrol grubunda 20,20±9,62; BPA grubunda 23,31±16,56; Melatonin grubunda 22,59±7,71; BPA+Melatonin grubunda 21,16±7,21 olarak saptandı (Şekil 4.3).

Dört gruba ait elde edilen miyometrium kalınlıkları birbirleriyle kıyaslandığında Kruskal Wallis testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmazken ($p=0,23$), her gruba ait miyometrium kalınlığının ortalama değerleri kıyaslandığında, BPA grubunda artış olduğu belirlenmiştir. Diğer grupların da kontrole eşdeğer olduğu gözlenmiştir.

Uterus bez yoğunluğunun istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Her gruba ait alınan seri kesitlerin, H&E boyamalarının ardından yapılan değerlendirmelerde, her bir seri kesitten sayılan uterus bez yoğunluğunun ortalamaları, standart sapmaları, ortanca değerleri hesaplandı (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Gruplara ait uterus bez yoğunluğunun ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri

	ORT±SS	ORTANCA (Min/Max)
Kontrol	15,80±4,77	17,00 (8,00/20,00)
BPA	9,40±6,80	7,00 (3,00/20,00)
Melatonin	16,00±5,70	13,00 (11,00/24,00)
BPA+Melatonin	9,20±6,85	4,00 (3,00/24,00)

Yapılan ölçümler sonucunda uterus bez yoğunluğunun ortalamaları; Kontrol grubunda $15,80 \pm 4,77$; BPA grubunda $9,40 \pm 6,80$; Melatonin grubunda $16,00 \pm 5,70$; BPA+Melatonin grubunda $9,20 \pm 6,85$ olarak saptandı (Şekil 4.3).

Dört gruba ait elde edilen uterus bez yoğunlukları birbirleriyle kıyaslandığında Kruskal Wallis testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmazken ($p=0,25$), her gruba ait uterus bez yoğunluğunun ortalama değerleri kıyaslandığında, BPA ve BPA+Melatonin grubunda kontrole göre azalma olurken melatonin grubunun kontrole eşdeğer olduğu gözlemlenmiştir.

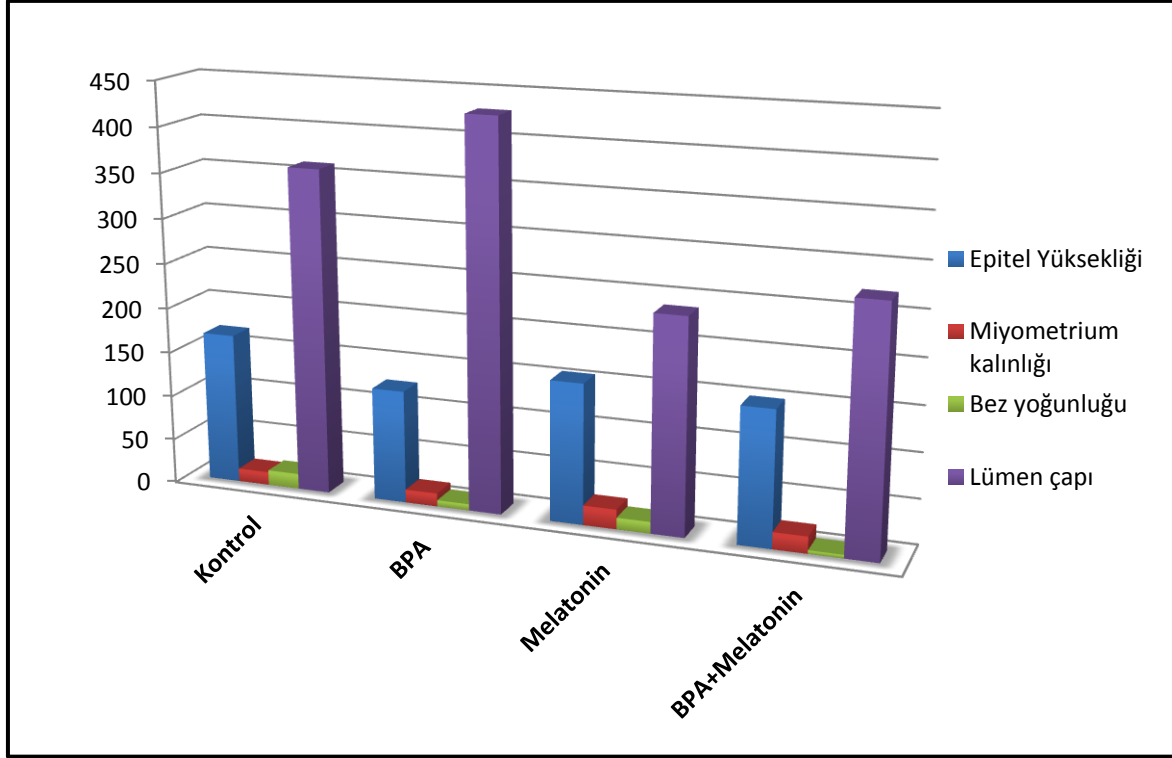
Uterus lümen çapının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Her gruba ait alınan seri kesitlerin, H&E boyamalarının ardından yapılan değerlendirmelerde, her bir seri kesitten 6'şar ölçüm yapılarak uterus lümen çapının ortalamaları, standart sapmaları, ortanca değerleri hesaplandı (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Gruplara ait uterus lümen çapının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri

	ORT $\pm$ SS	ORTANCA (Min/Max)
Kontrol	432,82 $\pm$ 238,14	360,69 (175,39/885,44)
BPA	668,92 $\pm$ 507,79	428,86 (183,88/1886,87)
Melatonin	273,92 $\pm$ 192,49	237,63 (37,34/695,91)
BPA+Melatonin	482,61 $\pm$ 668,26	271,29 (61,10/3115,70)

Yapılan ölçümler sonucunda uterus lümen çapının ortalamaları; Kontrol grubunda $432,82 \pm 238,14$; BPA grubunda $668,92 \pm 507,79$; Melatonin grubunda $273,92 \pm 192,49$; BPA+Melatonin grubunda $482,61 \pm 668,26$ olarak saptandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kontrol, BPA, Melatonin ve BPA+Melatonin gruplarının epitel yüksekliği, miyometrium kalınlığı, bez yoğunluğu ve lümen çapı ortalamaları (Ortanca değere göre oluşturulmuştur.)

Dört gruba ait elde edilen uterus lümen çapları birbirleriyle kıyaslandığında Kruskal Wallis testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p=0,01$).

Grupların lümen çaplarının ikili karşılaştırması, Bonferroni düzeltmeli Mann WhitneyU testi ile ileri analizleri yapılmıştır. Buna göre;

Kontrol grubunun lümen çapı, BPA grubuna göre daha küçük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,11$).

Kontrol grubunun lümen çapının, Melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu gözlemlendi ($p=0,03$).

Kontrol grubunun lümen çapı, BPA+Melatonin grubuna göre daha fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,27$).

BPA grubunun lümen çapı, Melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu gözlemlendi (**p=0,001**).

BPA grubunun lümen çapı, BPA+Melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu gözlemlendi (**p=0,03**).

Melatonin grubunun lümen çapı, BPA+Melatonin grubuna göre daha az olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (p=0,30).

Gruplara ait epitel yüksekliği, miyometrium kalınlığı, bez yoğunluğu ve lümen çapı Kruskal Wallis testine göre kıyaslanması sonucunda sadece lümen çapında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Gruplara ait epitel yüksekliği, miyometrium kalınlığı, bez yoğunluğu ve lümen çapının Kruskal Wallis testine göre kıyaslanması (p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakter ile vurgulanmıştır.)

	Epitel yüksekliği	Miyometrium kalınlığı	Bez yoğunluğu	Lümen çapı
P	0,67	0,23	0,25	0,01

4.4.4. TUNEL bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

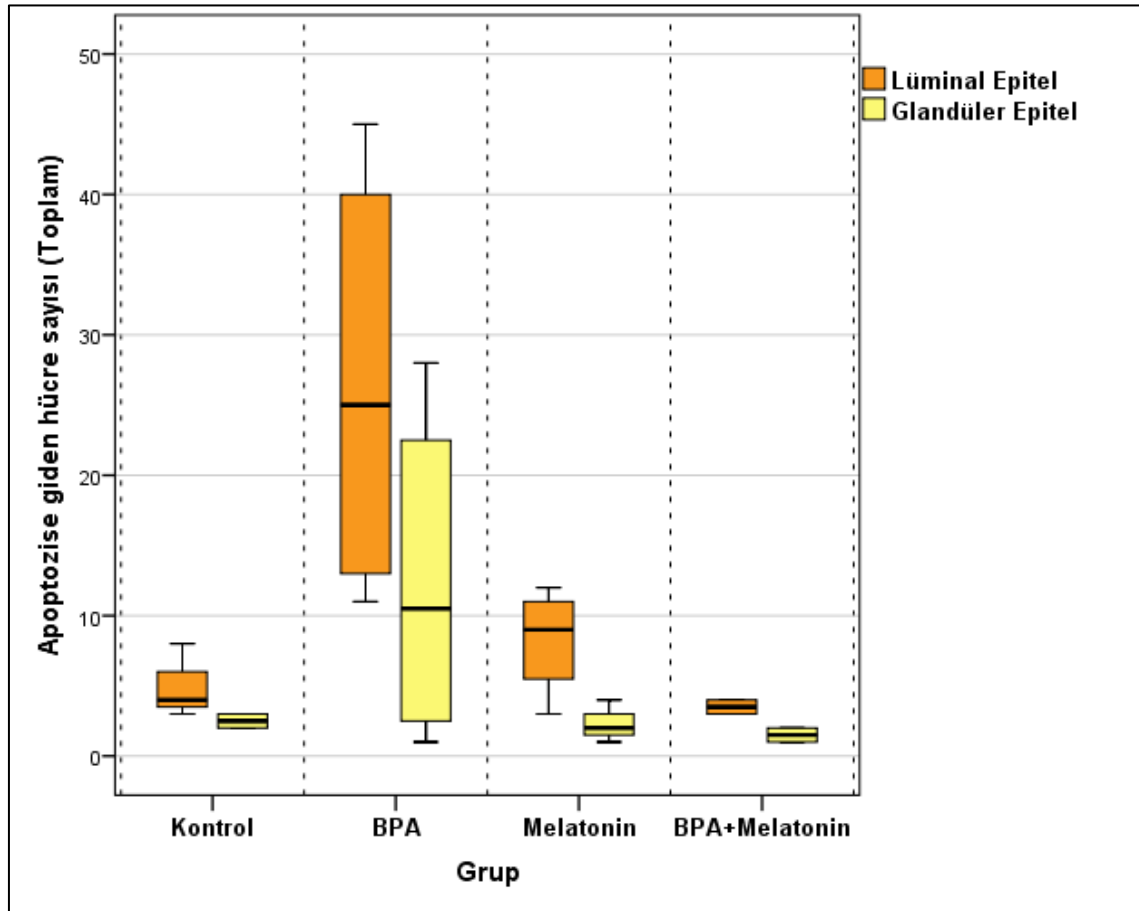
Yapılan deneylerden sonra her gruptaki deneklerden 5'er kesit üzerinden luminal epitel ve glandüler epitelde apoptozise giden hücrelerin ortalamaları, standart sapmaları, ortanca, minimum ve maksimum değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.9).

Deney sonrası luminal epitelde gruplara ait apoptozise giden hücre sayısının ortalamaları; Kontrol grubu 4,75±2,22; BPA grubu 26,50±16,20; Melatonin grubu 8,25±3,86; BPA+Melatonin grubu 3,50±0,58 olarak saptandı.

Deney sonrası glandüler epitelde gruplara ait apoptozise giden hücre sayısının ortalamaları; Kontrol grubu 2,50±0,58; BPA grubu 12,50±12,45; Melatonin grubu 2,25±1,26; BPA+Melatonin grubu 1,50±0,58 olarak saptandı (Şekil 4.4).

Çizelge 4.9. Gruplara ait luminal epitel ve glandüler epitelde apoptozise giden hücre sayısının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri

	Luminal Epitel		Glandüler Epitel	
	ORT±SS	ORTANCA (MIN/MAX)	ORT±SS	ORTANCA (MIN/MAX)
KONTROL	4,75±2,22	4,00 (3,00/8,00)	2,50±0,58	2,50 (2,00/3,00)
BPA	26,50±16,20	25,00 (11,00/45,00)	12,50±12,45	10,50 (1,00/28,00)
MELATONİN	8,25±3,86	9,00 (3,00/12,00)	2,25±1,26	2,00 (1,00/4,00)
BPA+MELATONİN	3,50±0,58	3,50 (3,00/4,00)	1,50±0,58	1,50 (1,00/2,00)



Şekil 4.4. Gruplara ait luminal epitel ve glandüler epitelde apoptozise giden hücre sayısı

Uterus luminal epitelinde, Kruskal Wallis testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken ($p=0,02$); glandüler epitelde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,20$).

Grupların uterus luminal epitelinde apoptozise giden hücre sayılarınınikili karşılaştırması, Bonferroni düzeltmeli Mann WhitneyU testi ileri analizleri ile yapılmıştır.

Buna göre;

Kontrol grubunda luminal epitelde apoptozise giden hücre sayısı, BPA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az olduğu gözlenmiştir (**p=0,02**).

Kontrol grubunda luminal epitelde apoptozise giden hücre sayısı, Melatonin grubuna göre daha az olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p=0,24).

Kontrol grubunda luminal epitelde apoptozise giden hücre sayısının, BPA+Melatonin grubuna eşdeş olduğu görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p=0,34).

BPA grubunda luminal epitelde apoptozise giden hücre sayısı, Melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu gözlenmiştir (**p=0,04**).

BPA grubunda luminal epitelde apoptozise giden hücre sayısı, BPA+Melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu gözlenmiştir (**p=0,02**).

Melatonin grubunda luminal epitelde apoptozise giden hücre sayısı, BPA+Melatonin grubuna göre daha fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p=0,14).

Uterus luminal epitelinde apoptozis değerlendirildiğinde en fazla BPA Grubunda apoptotik reaksiyonun fazla olduğu ve benzer şekilde glandüler epitelde de, istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmamasına rağmen, yapılan sayımlar değerlendirildiğinde diğer gruplara kıyasla daha fazla tutulumun olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık Melatonin ve BPA+Melatonin grubunun uterus luminal epiteli ve glandüler epitelde apoptotik reaksiyon açısından Kontrole eşdeş olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Gruplar arası luminal epitel ve glandüler epitelde apoptozise giden hücre sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Luminal Epitel	Glandüler Epitel
Kontrol BPA	p=0,02 BPA>Kontrol	p=0,24
Kontrol Melatonin	p=0,24	p=0,54
Kontrol BPA+Melatonin	p=0,34	p=0,06
BPA Melatonin	p=0,04 BPA>Melatonin	p=0,24
BPA BPA+Melatonin	p=0,02 BPA>BPA+Melatonin	p=0,119
Melatonin BPA+Melatonin	p=0,14	p=0,34

5. TARTIŞMA

Plastik madde yapımında yaygın olarak kullanılan ancak toksik etkileri olan BPA, besin saklama kapları, bebek biberonları, su kapları, diş tedavi malzemeleri, elektronik malzemeler gibi plastik içeren ürünlerin hayatımızda geniş yer kaplamasıyla beraber insan sağlığını tehdit etmektedir. Çeşitli yollarla insan vücuduna girebilen bu toksik maddenin diyabet, obezite, kalp-damar hastalığı, gelişimsel bozukluklar, üreme sistemi hastalıkları, kanser ve kronik solunum hastalığı gibi birçok hastalığa sebep olduğu düşünülmektedir.

Bebeklik döneminde BPA'ya etkin kalındığında reproduktif değişimlerin (erken puberte) erişkin döneme göre olasılığının arttığı düşünülmektedir. Çünkü bebeklik döneminde, beynin seksüel farklılaşma periyodu sırasında, reproduktif değişime duyarlılığı daha yüksektir [80].

Biz çalışmamızda, neonatal dönemde BPA'ya etkin kalan dişi sıçanların uterus dokusunda oluşabilecek değişiklikleri yapısal düzeyde saptamayı amaçladık.

Epifiz bezinin başlıca salgısı olan, endokrin sistem ve sirkadiyen ritm üzerinde de etkili olan melatoninin, yayılım yeteneği ve lipofilik yapısı sayesinde serbest radikalleri zararsız hale getirerek antioksidan özelliğini gösterdiği bilinmektedir.

Çalışmamızda, prepubertal dönemde uyguladığımız melatoninin, antioksidan özelliğinden yola çıkarak, olası iyileştirici etkilerini saptamayı amaçladık.

Neonatal dönemde uygulanan östrojenik potansiyele sahip maddelerin gelişmekte olan üreme sistemleri üzerine olumsuz etkileri göz önüne alınarak, Atanassova ve arkadaşları, neonatal dönemde günlük yüksek doz subkutan BPA uygulaması sonrasında BPA'nın testis üzerine olası etkilerini incelemişlerdir. Deney sonunda testis ağırlığı, seminifer tübül lümen formasyonu, germ hücre apoptotik indeksi (apoptotik/canlı germ hücre nükleer hacmi) incelenmiş ve kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Deney sonunda doz bağımlı olarak testis ağırlığında azalma, apoptotik indekste artış olduğu gösterilmiştir. Erken dönemde uygulanması sonrasında Sertoli hücre gelişimini etkileyerek puberte gelişimine etkisi

olduğu, erişkin dönemde ise bu etkilerin devam ettiği, spermatosit sayısında azalma olduğu, erişkin sıçanlarda da bu etkilerin devam ettiği belirtilmiştir [81].

Biz de çalışmamızda, literatür bilgilerine bağlı kalarak yüksek dozda BPA'yı subkutan yolla dişi sıçanlara uyguladıktan sonra grupların uterus ağırlıklarını karşılaştırdık. Sonuçta, BPA Grubunun uterus ağırlıklarında artış olduğunu gözlemledik.

Batmanabane ve arkadaşları, eksojen melatoninin puberte başlangıcına etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada 5-10 gñnlük sıçanlar kullanılmıştır. Uygulamanın sonunda puberteye ulaşan sıçanların over ve timus dokuları incelenmiş ve over ve timus ağırlıkları ölçölmüş, Graaf folliköl oranı hesaplanmıştır. Melatonin uygulanan sıçanlarda vajinal açıklığın erken olduğu, Graaf folliköl oranında ve organ ağırlıklarında artış olduğu gösterilmiş [82].

Bu çalışmada da prepubertal dönemdeki dişi sıçanlara melatonin uygulaması sonucu, vajinal açıklığın Kontrol Grubu'na göre, literatürle uyumlu olarak daha erken süreçte olduğu gözlemlenmiştir.

Dair ve arkadaşları, endometrial morfoloji üzerine melatoninin etkilerini incelemişlerdir. Akřam saatlerinde her 100g vücut ağırlığı için gñnlük 200µg melatonin intramuskuler olarak uygulanmıştır. Gruplar arası vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık görölmemiştir. Pinealektomi yapılan grupta uterus ağırlığı yüksek çıkmıştır. Cerrahi müdahale sonrası gruplardaki çoğu hayvanda 3 hafta boyunca östrus siklusu düzensiz gerçekleşmiştir. Melatonine etkin bırakılan grupta tedaviden 2-4 ay sonra östrus siklusunun uzadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca stromal morfoloji çok ayırt edilememektedir. Luminal epitel basit silindirik tipte ve geniş sayıda eosinofiller içermektedir. Bununla birlikte pinealektomi yapılan ancak melatonin tedavisi uygulanmayan grupta hamilelik oranının daha düşük olduğu görölmüştür [83].

Koda ve arkadaşları, BPA'nın in vivo olarak uterustaki östrojenik aktivitesi üzerinde retinoik asitin muhtemel inhibitör etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. 10-11 haftalık dişi sıçanlara retinoik asit ve BPA subkutan yolla verilmiştir. BPA uygulanan gruplarda

diğer gruplara kıyasla uterus ve vücut ağırlığında artış olduğu, retinoik asit ilaveli grupta ise bu artışın azaldığı gösterilmiştir. BPA, uterus lümen epitel hücrelerinde apoptozisi arttırırken, retinoik asitin bu oranı azalttığı gösterilmiştir [84].

Bu çalışmada ise literatür bilgileri dikkate alınarak yapılan DNA fragmentasyonunu belirlemek için TUNEL yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem sonucu, BPA uygulanan grupta diğer gruplara kıyasla luminal epitel hücrelerinde apoptotik reaksiyonda artış olduğu belirlenmiştir.

Markey ve arkadaşları, CD-1 farelerde BPA'nın çevresel tolere edilebilir yani düşük dozlardaki uygulamalarında dişi üreme organlarındaki etkilerini incelemişlerdir. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da uterus ve diğer organ ağırlıklarında azalma görülmüştür. Düşük doz BPA'da istatistiksel olarak anlamlı bir etki görülmezken yüksek doz BPA'da lamina propriada azalma gözlenmiştir. Ancak uterusun diğer katmanlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır [85].

Bizim çalışmamızda da uyguladığımız BPA dozu, doz bağımlı çalışmalar göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Böylece 100 mg/kg doz yüksek doz kabul edilmiş ve doğdukları gün sıfır kabul edilerek 10 gün boyunca neonatal dönemdeki dişi sıçanlara uygulanmıştır.

Nah ve arkadaşları, erken puberte öncesi BPA'ya etkin bırakılmanın ergenlik başlangıcına, over ağırlığına ve östrus siklusuna etkisini araştırmışlardır. Postnatal dişi farelere, sesame oilde çözölen BPA subkutan olarak artan dozlarda enjekte edilmiştir. Vücut ağırlıklarına, vajina açıklığına, östrus sikluslarına, sakrifiye edildikten sonra da over ve uterus ağırlıklarına bakılmıştır. Erken prepubertede vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. BPA uygulanmış farelerde doz seviyesine göre kontrol grubuyla kıyaslandığında erken vajinal açıklık olduğu yani puberteye erken dönemde girdiği ve yüksek doz BPA uygulanmış farelerde de östrus siklusunun, over ve uterus ağırlıklarının azaldığı saptanmıştır [7].

Newbold ve arkadaşları, CD-1 dişi farelerle yaptıkları çalışmada neonatal dönemde BPA'ya etkin kalındığında üreme organlarındaki uzun süreli etkilerini araştırmışlardır. BPA dozunu 10-100-1000 mg/kg olarak belirlemişler ve mısır yağında çözüp subkutan yolla uygulamışlardır. 18 aylık dişi farelerin vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde kontrol grubu ile BPA'ya etkin bırakılan gruplar karşılaştırıldığında vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. BPA'ya neonatal dönemde etkin kalmanın ovaryum ve reproduktif kanalda anormallikleri indüklediği bulunmuştur [86].

Bu çalışmada ise susam yağında çözülmüş ve 100 mg/kg BPA yüksek doz olarak kabul edilerek subkutan yolla dişi sıçanlara uygulanmıştır. Bunun sonucunda da BPA'ya etkin kalan sıçanların uterus dokusunda, istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da dejeneratif değişikliklerin oluştuğu gözlenmiştir.

Sangai ve arkadaşları, fare böbrek ve karaciğerinde BPA toksisitesini azaltmada quersetinin etkisini araştırmışlardır. Quersetin meyve ve sebzelerde bulunan doğal bir antioksidandır. Oral yolla verilen BPA, dozdan bağımsız olarak hayvanların vücut ağırlıklarında düşüşe yol açmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BPA verilen gruptaki hayvanların organ ağırlıkları ve total lipid ve kolesterol seviyelerinde anlamlı bir artış görülmüştür. BPA verilen gruplarda kontrol grubuna göre antioksidan enzimlerin aktiviteleri artmıştır. BPA ve quersetin verilen gruplarda vücut ve organ ağırlıklarında anlamlı bir değişim olmamasına rağmen, quersetin, BPA'nın yol açtığı oksidatif stresi ve enzimatik-nonenzimatik antioksidanları arttırarak farelerin karaciğer ve böbrek histolojik yapılarını iyileştirerek normal yapılarına dönüştürebildiği gözlenmiştir [87].

Toyama ve arkadaşları, yenidoğan sıçanlara ve farelere subkutan olarak uyguladıkları BPA'nın testis dokusunun gelişimi üzerine potansiyel etkilerini belirlemişlerdir. Yenidoğan sıçanlar ve farelerin bir grubuna BPA, diğer gruba ise 17 β -estradiol (E2) uygulamış ve 15 haftalık olduklarında testis dokuları alınmış ve analiz edilmiştir. BPA ve 17 β -estradiol (E2)'ün testis dokusu üzerinde benzer etkiler gösterdiği, puberteye ulaşabildiği ancak spermatogenezis başladığı zaman spermatidlerde akrozomal granüllerin olduğu ve nükleus da deformasyonların olduğu gözlenmiştir. Akrozomda ve nükleusta oluşan bu anormallikler ileriki evrelerde oluşan spermatid ve spermatozoalarda da varlığını

sürdürmüştür. Tedavi uygulanan sıçan ve fareler puberteye ulaştıklarında Sertoli hücreleri ve spermatidler arasındaki ektoplazmik özelleşmeyi de etkilediğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar BPA'nın östrojenik aktivite gösterdiğini ve neonatal dönemde uygulanan BPA'nın testis dokusu gelişimine etkisini hücre düzeyinde inceleyerek puberte ve erişkinlik dönemindeki etkilerini göstermişlerdir [88].

Bu çalışmada da ışık mikroskopik incelemeler yapıldığında uterusu oluşturan tabakaların belirgin olmadığı görülmüştür. Ayrıca büyük büyültmede yapılan incelemelerle luminal epiteli oluşturan silyalı ve siyasız salgı hücrelerinin net olarak ayırt edilemediği belirlenmiştir. Bunun dışında epitel hücreleri arasında heterokromotik çekirdek benzeri oluşumlar içeren köpüksü görünümlü boşluklar; lamina propriada, stromayı oluşturan bağ dokusu hücrelerinde, fibroblastlarda, kollagen liflerde dejeneratif değişiklikler, yer yer ödematöz alanlar ve ekstravaze eritrositler saptanmıştır.

Villanúa ve arkadaşlarının, 5 günlük sıçanlara uyguladıkları 100µg melatonin sonrasında, melatonin uygulanan dişi sıçanlarda pubertenin kontrol grubuna göre erken başladığını göstermişlerdir [89].

Aghajanova ve arkadaşları, BPA'nın insan endometrial stromal fibroblastlarının (ESF) farklılaşması ve östrojen metabolizması ile ilişkili gen ekspresyonları üzerine etkilerini incelemişlerdir. Kısa zamanlı BPA'ya etkin bırakılmada insan ESF çoğalması azalmıştır. Ancak bunun apoptozisten kaynaklanmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca yüksek doz BPA, östrojen reseptör alfa düzenlenmesini azaltmıştır. Sonuç olarak da BPA'nın insan ESF fonksiyonu ve gen ekspresyonu üzerinde endokrin bozucu etkisinin olduğunu belirtmişlerdir [90].

Anjum ve arkadaşları, fare testislerinde BPA'nın indüklediği mitokondrial marker enzimlerindeki hasar ve bu hasarın melatonin tarafından düzeltilmesini incelemişlerdir. Oral olarak bir süre boyunca standart dozlarda verilen BPA'nın mitokondrial enzim aktivitelerinde azalmaya yol açtığı gözlemlemişlerdir. Ayrıca BPA, antioksidan enzimlerin aktivitelerini etkilemiştir ve lipid peroksidasyonuna neden olmuştur. Eş zamanlı olarak intraperitoneal yolla uygulanan melatonin de mitokondrial lipid peroksidasyonunu

azalttığı, mitokondrial enzim aktivitelerini etkisiz hale getirdiği, ayrıca mitokondrinin azalan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların fonksiyonlarını da düzelttiğini görmüşlerdir [91].

Literatür bilgileri tarandığında melatonin uygulamasının intraperitoneal, intramuskuler olarak gerçekleştirilebildiğini görmüş olup çalışmamızda melatonini, BPA uygulamamızda olduğu gibi subkutan yolla gerçekleştirdik.

Bosquiazzo ve arkadaşları, erişkin sıçan uterusuna BPA'nın hormonal cevabının olup olmadığını saptamak amacıyla neotanal dönemdeki dişi sıçanlara subkutan yolla BPA vermişlerdir. BPA uygulanmış sıçanlarda VEGF ekspresyonu etkilenmiş ve endokrin yolakta ESR1 ve NCOR1 ekspresyonunda da değişikliklere sebep olmuştur. Neonatal dönemde uygulanan BPA'nın VEGF fonksiyonlarını etkilemesinden dolayı dişi fertilitesi üzerine olumsuz etkilerinin olduğu ve embriyo implantasyonunu da engellediği gösterilmiştir [92].

Hiyama ve arkadaşları, üç kuşak fare üzerinde yaptığı çalışmada susam yağında çözülmüş ve subkutan yolla BPA'ya etkin bırakılmış grupların reproduktif organların üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Yüksek doz BPA'ya etkin kalan gruplarda vücut ağırlıklarında kontrol grubu ile kıyaslandığında artış olduğu görülmüştür. Buna rağmen ovaryum ve uteruslarının ağırlığı azalmıştır. Ayrıca uterus lümen genişlemesi veya daralması şeklinde anormal morfolojili yapılanmalar gözlenmiştir [93].

Bu çalışmada, BPA'ya etkin kalmanın, uterus lümen çapında artış gibi dejeneratif değişikliklere neden olduğunu gözlemenmiştir. Bununla birlikte uterus yapısındaki olumsuz değişiklikler nedeni ile infertilite üzerine de etkileri olabileceği düşünülmüştür.

Pratana Lima ve arkadaşları, pinealektomik olgun dişi sıçanlarda kronik melatonin yokluğunun sıçan ovaryumuna morfolojik etkisini belirlemek ve bu sıçanlara dışardan melatonin uygulamasının (sürekli ışık altında) etkisini saptamayı amaçlamışlardır. Melatonin sıçanlara intramuskuler olarak uygulanmıştır. Tüm gruplarda devamlı östrus durumu ve ovaryum kistleri gözlenmiştir. Pinealektomik sıçanlarda, çalışmanın sonunda, ovaryumda ve vajinada oluşan değişiklikler kaybolmuştur. Devamlı ışık altında olan

sıçanlarda sadece melatonin muamelesi görenlerde vajinal ve ovarial polikistik görünüş düzelmiştir. Sonuçta, melatoninin, pinealektomi veya sürekli ışık ile indüklenen kronik anovulasyonu düzeltmekte önemli rol oynadığını göstermişlerdir [94].

Bizim çalışmamızda BPA sonrası melatonin uygulaması gerçekleştirdiğimiz grupta, BPA grubuna göre daha geç puberteye girdiği, dejeneratif değişikliklerin daha az oranda görüldüğü belirlenmiştir. Melatonin uygulamasının ardından elde edilen bulguların genellikle kontrol grubuna eşdeğer sonuçlar verdiği izlenmiştir.

Schönfelder ve arkadaşları, prenatal dönemde BPA'ya etkin bırakılan sıçan yavrularındaki gelişimsel etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada BPA sıçanlara gavage yolu ile verilmiştir. Yüksek doz uygulanan grupta epitelde azalma görülmüştür. Çekirdekler daha az düzenli ve bazalde konumlanmıştır. Ayrıca hücreler içinde anlaşılamayan boşluklar görülmüştür. Sonuç olarak, BPA uterus ve östrojen reseptörlerinin gelişimini, büyümesini ve fonksiyonlarını etkileyebilir. Bu çalışma BPA'nın hem uygulandığı dönem hem de uygulanan dozun BPA'nın etkinliği açısından önemli olduğunu vurgulamaktadır [95].

Yiğit ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, erişkin tavukları BPA ve dietilstilbestrole (DES) etkin bırakmışlardır. BPA'nın östrojenik potansiyelinin belirlenmesi adına sentetik östrojen olan DES uygulamalarının etkileri karşılaştırılmıştır. Böylece düşük-yüksek dozlarda BPA ve DES 'in uterusu etkilerinin histolojik olarak gösterilmesini amaçlamışlardır. Vücut ağırlıkları kıyaslandığında yüksek doz BPA'ya etkin bırakılan gruptaki canlılarda anlamlı derecede kilo kaybı gözlenmiştir. Yüksek doz uygulanmasından sonra yapılan histomorfometrik değerlendirmeler sonucunda lümen epitel yüksekliğinde, tunika muskularis kalınlığında azalma olduğu fakat sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Buna karşılık tunika mukoza ve uterus bez yoğunluğunda anlamlı derecede azalma olduğu gözlenmiştir. Uterus bez epiteli, ERa için pozitif immünreaksiyon göstermiştir. Tüm bu bulgular, yüksek doz BPA uygulamasının embriyonik gelişimi de negatif yönde etkileyebileceğini göstermektedir [96].

Bu çalışmada sonuç olarak neonatal dönemde yüksek doz, subkutan uygulanan BPA, yaptığımız histomorfometrik değerlendirmelere göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa

da, BPA'nın epitel yüksekliğini azalttığı, miyometrium katının kalınlığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Bez yoğunluğuna bakıldığında, BPA'nın bez sayısını azalttığını, lümen çapı ve luminal epitel ve bez epitelinde apoptozise giden hücre sayısını istatistiksel değerlendirmelere göre anlamlı derecede fazla olduğunu bulunmuştur.

Son yıllarda, reproduktif sistemin de dahil olduğu birçok sistem üzerine BPA'nın toksik etkileri ve melatoninin antioksidan özellikleri ile ilgili araştırmalar artarak devam etmektedir.

6. SONUÇ

Çalışmada, neonatal dönemde BPA'ya etkin bırakılan dişi sıçanların uterus dokusunda oluşan yapısal değişiklikleri, oluşan değişikliklere karşı prepubertal dönemde uygulanan melatoninin olası etkileri araştırıldı.

Vajinal açıklık ve puberte tayini sonuçlarına bakıldığında, BPA'nın, erken puberte bulgularına yol açtığı ve BPA sonrası melatonin uygulamasının erken puberte bulgularını geciktirdiği saptandı.

H&E yöntemi sonucunda, BPA grubunda, uterusu ait endometrium, miyometrium ve seroza tabakalarının net olarak ayırt edilemediği görüldü. Ayrıca luminal epitelı oluşturan silyalı hücreler ile silyasız salgı yapan hücrelerin net olarak ayırt edilemediği, epitel hücreleri arasında heterokromatik çekirdek benzeri oluşumlar içeren köpüksü görünümdeki boşlukların (kaviteli yapıların) meydana geldiği saptandı. Epitel altındaki lamina propriada, kontrol grubuna göre uterus bezlerinin azaldığı ya da hiç görülmediği alanlar tespit edildi. Lamina propriada, stromayı oluşturan bağ dokusu hücrelerinde, fibroblastlarda, kollagen liflerde dejeneratif değişiklikler, yer yer ödematöz alanlar ve ekstravaze (damar dışına çıkmış) eritrositler belirlendi. Miyometrium katını oluşturan longitudinal düzende ki düz kas tabakasının kontrol grubuna göre artış olduğu ve kas tabakasını saran serozanın gevşek bağ dokusu ve mezotelden oluşmuş olduğu görüldü.

BPA sonrası melatonin uygulaması sonucu ise luminal epitel, uterus bezlerini içeren lamina propria, miyometrium ve seroza tabakası ayırt edildi. Uterus lümen çapının BPA ve Kontrol grubuna göre azalmış olduğu; luminal epitelı oluşturan hücrelerin düzeninde BPA grubuna göre sayıca oldukça az olan heterokromatik çekirdekli, köpüksü görünümlü kavitasyonların ve lamina propriadaki tübüler bezlerin sayıca diğer gruplara kıyasla azalmış olduğu saptandı. İnterglandular stromayı oluşturan bağ dokusu hücrelerinin, fibroblastların ve kollagen liflerin düzeninin BPA grubuna göre daha düzgün olduğu ancak bazı alanlarda disorganize alanlar olduğu için hücrelerin net olarak ayırt edilemediği belirlendi. Bununla birlikte ödematöz alanların kaybolmuş olduğu, miyometriumu oluşturan longitudinal kas liflerinin ve seroza katının belirgin olarak ayırt edildiği dikkati

çekti. Melatonin Grubunda da, diğer gruplara göre lümen çapının azaldığı, uterus bezlerinin sayısı ve miyometrium tabakasının kalınlığının Kontrol grubuna eşdeğer olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte endometrium, miyometrium ve seroza katlarının belirgin olduğu gözlenmiştir.

DNA fragmentasyonunu belirlemek için yapılan TUNEL yöntemi sonucunda da BPA'nın, luminal ve glandüler epiteli oluşturan hücrelerde apoptozisi indüklediği yani apoptotik reaksiyonun arttığı görülmüştür. BPA+Melatonin ve Melatonin grubundaki apoptotik reaksiyonun ise Kontrol grubuna benzer olduğu belirlenmiştir.

BPA uygulaması sonucu vücut ve uterus ağırlığında artış; luminal epitel yüksekliğinde ve bez yoğunluğunda azalma; miyometrium kalınlığının Kontrole benzer bulgular görülmüş ve bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Gruplar arası lümen çaplarının değerlendirmeleri sonucunda da, BPA grubunda, lümen çapı istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. BPA sonrası melatonin verilerek tedavi edilmeye çalışılan grupta ise uterus dokusunda dejeneratif değişikliklerin azaldığı görülmüştür.

Günümüzde BPA'ya çevresel tolere edilebilir ya da yüksek dozlarda etkin kalındığında oluşabilecek toksik etkileri üzerine çalışmalar devam etmektedir.

Sonuç olarak, neonatal dönemde uygulanan BPA'nın reproduktif değişim (erken puberte) ve sıçan uterus dokusunda oluşturduğu histomorfolojik, morfometrik ve apoptotik değişikliklerin, antioksidan özellikleri bilinen ve prepubertal dönemde uygulanan melatonin ile kısmi olarak önlenilebileceği kanısına varılmıştır. Ancak BPA ve melatonin uygulamalarının etkileri konusunda kesin sonuçlara ulaşabilmek için ileri düzeyde araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Rogers, A.J., Metz, L. and Yong, W.V. (2013). Review: Endocrin Disrupting Chemicals and Immune Responses: A Focus on Bisphenol-A and Its Potential Mechanisms. ***Molecular Immunology***, 53(24), 421-430.
2. Erkekoğlu, P. ve Giray, K.B. (2012). Bisfenol A'nın Endokrin Bozucu Etkileri. ***Toksikoloji Bülteni***, 35(10), 10-12.
3. Er, B. ve Sarımeahmetoğlu, B. (2011). Gıdalarda Bisfenol A'nın Değerlendirilmesi. ***Veteriner Hekim Derneği Dergisi***, 82(1), 69-74.
4. Halden, R.U. (2010). Plastics and Health Risks. ***Public Health***, 31(1), 79–94.
5. Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S. and Soto, A.M. (2009). Bisphenol-A and The Great Divide: A Review of Controversies in The Field of Endocrine Disruption. ***Endocrin Reviews***, 30(1), 75-95.
6. Michalowicz, J., Duda, W. and Stufka-Olczyk, J. (2007). Transformation of phenol, catechol, guaiacol and syringol exposed to sodium hypochlorite. ***Chemosphere***, 66(2007), 657-663.
7. Nah, W.H., Park, M.J. and Gye, M.C. (2011). Effects of Early Prepubertal Exposure to Bisphenol A on the Onset of Puberty, Ovarian Weights, and Estrous Cycle in Female Mice. ***Clinical and Experimental Reproductive Medicine***, 38(2), 75-81.
8. Chitra, K.C., Latchoumycandane, C. and Mathur, P.P. (2003). Induction of Oxidative Stress by Bisphenol A in The Epididymal Sperm of Rats. ***Toxicology***, 185: 119-27.
9. Atkinson, A. and Roy, D. (1995). In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolites. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 210(2), 424-433.
10. Schulz, P. and Steimer, T. (2009). Neurobiology of Circadian Systems. ***CNS Drugs***, 23(2), 3-13.
11. Paulis, L. and Simko, F. (2007). Blood Pressure Modulation and Cardiovascular Protection by Melatonin: Potential Mechanisms Behind. ***Physiological Research***, 56(6), 671-684.
12. Reiter, R.J., Tan, D.X., Sainz, R.M., Mayo, J.C. and Lopez-Burillo, S. (2002). Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. ***The Journal of Pharmacy and Pharmacology***, 54(10), 1299-1321.
13. Adriaens, I., Jacquet, P., Cortvrindt, R., Janssen, K. and Smitz, J. (2006). Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. ***Toxicology***, 228(2-3), 333-343.

14. Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin V. and Reiter, R.J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. ***Journal of Pineal Research***, 36(1), 1-9.
15. Guerin, P., El Mouatassim, S., and Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. ***Human Reproduction Update***, 7(2), 175-189.
16. Moore, K.L. (1998) ***The Developing Human: Clinically Oriented Embryology***. (6th edition). Amerika: Saunders Company, 323-339.
17. Sadler, T.W. (2011). ***Langman's Medikal Embriyoloji***.(Çev. C. Başaklar). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2010'da yayımlandı.). 246-254.
18. Snell, R.S. (1983). ***Clinical Embryology for Medical Students***.(3rd edition). Boston: Little, Brown and Company, 215-219
19. Sant, S. (2008). ***Embryology for Medical Students***.(2nd edition). India: Jaypee, 258-260.
20. Şeftalioğlu, A. (1998). ***Genel ve Özel İnsan Emriyolojisi***.(3.baskı). Ankara: Tıp ve Teknik Yayıncılık, 356.
21. Sweeney, L.J. (1998). ***Basic Concepts in Embryology: A Student's Survival Guide***.(1st edition). Amerika: Better Graphics, 364.
22. Moore, K.L., Persaud, T.V.N. and Torchia, M.G. (2009).***Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects***.(Çev. S. Müftüoğlu, P. Atilla ve F. Kaymaz). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri. (Eserin orijinali 1974'te yayımlandı.). 179-185.
23. Moore, K.L. and Dalley, A.F. (2007). ***Kliniğe Yönelik Anatomi***.(Çev. K. Şahinoğlu). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. (Eserin orijinali 1999'da yayımlandı.). 374-378.
24. Sancak, B. ve Cumhur, M. (2010). ***Fonksiyonel Anatomi***. (5.baskı). Ankara: ODTÜ Yayıncılık, 302-303.
25. Cumhur, M. (2001). ***Temel Anatomi***. (1.baskı). Ankara: ODTÜ Yayıncılık, 283.
26. Yıldırım, M. (2003). ***İnsan Anatomisi***. (6.baskı). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 218
27. Snell, R.S. (2004). ***Klinik Anatomi***.(Çev. M. Yıldırım). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. (Eserin orijinali 2000'de yayımlandı.). 332.
28. Dere, F. (1994). ***Anatomi***.(3.baskı). Adana: Genel Dağıtım, 693-700.
29. Ozan, H. (2004) ***Anatomi***.(2.baskı). Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 198.

30. Ovalle, W.K. and Patrick, C.N. (2009). **Netter Temel Histoloji**.(Çev. S. Müftüoğlu, P. Atilla ve F. Kaymaz). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri. 412-417.
31. Ross, M.H., Romrell, L.J. and Kaye, G.I. (1995). **Histology A text and Atlas**. (3rd edition). Amerika: Williams and Wilkins, 722-726.
32. Erdoğan, D., Görgün, M., Hatipoğlu, T. ve Ilgaz, C. (2007). **Özel Histoloji**. (2. Baskı.) Ankara: Hatipoğlu Yayınevi, 181-186.
33. Kierszenbaum, A.L. (2006). **Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş**.(Çev. R. Demir). Ankara: Palme Yayıncılık. 577-583.
34. Junqueira, L.C. and Corneiro, J. (2006). **Temel Histoloji**.(Çev. Y. Aytekin ve S. Solakoğlu). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. (Eserin orijinali 2003'te yayımlandı.). 458-462.
35. Cormack, D.H. (1987). **Ham's Histology**. (9th edition). Amerika: Lippincott Company, 633-641.
36. Eroschenko, V.P. (2001). **di Fiore Histoloji Atlası**.(Çev. R. Demir). Ankara: Palme Yayıncılık. 312-323.
37. Guyton, A.C. ve Hall, J.E. (2003). **Tıbbi Fizyoloji**.(Çev. Z. Solakoğlu). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 621-628.
38. Bozdoğan, Ö. (2012). **Fizyoloji**. (3.baskı). Ankara: Palme Yayıncılık, 539-552, 600.
39. Noyan, A. (2011). **Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji**. (19. Baskı). Ankara: Palme Yayıncılık, 1116-1126.
40. Ganong, W.F. (1999). **Tıbbi Fizyoloji**.(Çev. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Ankara). İstanbul: Barış Kitabevi, 458-463.
41. Berne, M. B. ve Levy, M.N. (2000). **Principles of Physiology**. (3rd edition). United States: Mosby. (Eserin orijinali 1992'de yayımlandı.). 598-605.
42. McLaughlin, D., Stamford, J. and White, D. (2010). **İnsan Fizyolojisi**.(Çev. A. Aktümsek). Türkiye: Nobel Yayın Dağıtım, 387-390.
43. Oba, G., Aslan, S. ve Kaymaz, M. (2001). Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vaginal sitolojinin kullanılması. **Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 48, 51-57.
44. Mülazımoğlu, S.B., İde, T. ve Aslan, S. (2012). Ratlarda Üreme. **Journal Clinical and Analytical Medicine**, 39-44.
45. Soylu, S.M. (2012). Rat Fizyolojisi. **Journal Clinical and Analytical Medicine**, 22-25.

46. Turhan, F., Erdoğan, D., Take, G. ve Bardakçı Y. (2008). Electron microscopic changes in the rat uterus during the menstrual cycle. **Gazi Medical Journal**, 19(3) 102-111.
47. Hubscher, H.C., Brooks D.L. and Johnson J.R. (2005). A quantative method for assesing stages of the rat estrous cycle. **Biotechnic and Histochemistry**. 80, 79-87.
48. Spornitz, U.M., Dravid, A. and Winkelmann, A. (1998). Scanning electron microscopic demonstrations of surface and subsurface enzymes is rat endometrium during the estrous cycle. **Scanning**, 20, 224.
49. Tsai, W. (2006). Human Health Risk on Environmental Exposur to Bisphenol-A: A Review. **Journal and Environmental Science and Health**, 24(2), 225-255.
50. Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N. and Welshons, W.V. (2007). Human exposure to bisphenol A(BPA). **Reproductive Toxicology**, 24, 139-177.
51. Michalowicz, J. (2014). Bisphenol A-Sources, toxicity and biotransformation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 37(2014), 738-758.
52. Cao, X.L. (2-5 November 2010). Chemistry and analytical methods for determination of bisphenol A in food and biological samples. **FAO/WHO Expert Meeting on Bisphenol A (BPA)**. Ottawa, 2-4.
53. Durmaz, E. ve Giray, B. K. (2013). Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi. **Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi**, 56(4), 192-199.
54. İnternet: 27960 sayılı Resmi Gazete, Tebliğ (10.06.2011). URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.resmigazete.gov.tr%2Feskiler%2F2011%2F06%2F20110610.htm&date=2015-01-04>, Son Erişim Tarihi: 04.01.2015.
55. Nam, S.H., Seo, Y.M. and Kim, M.G. (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. **Chemosphere**, 79(9), 949-952.
56. Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N. and Mornagui, B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. **Environmental International**, 64(2014), 83-90.
57. Yang, M.H. and Schaich, K.M. (1996). Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, 20(2), 225-236.
58. Lerner, B. (1958). Isolation of Melatonin, The Pineal Gland Factor that lightnes melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, 80(2), 2587.
59. Kuş, M.A., Çolakoğlu, S., Karaca, Ö., Gülcen, B., Kuş, İ. ve Sarsılmaz, M. (2012). Pinealoktomili Sıçanlarda Prefrontal Kortekste Oluşan Oksidatif Doku Hasarı ve Melatonin Hormonunun Koruyucu Etkisi. **Düzce Tıp Dergisi**, 19(3), 37-41.

60. Vural, F. (2012). *İnsan Anatomisi*. (2.baskı). İstanbul: Akademi, 117.
61. Topal, T., Öter, Ş. ve Korkmaz, A. (2009). Melatonin ve Kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 19(3), 137-143.
62. Brezezinski, A. (1997). Melatonin in Humans. *The New England Journal of Medicine*, 336(3), 186-195.
63. Ekmekçioğlu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60, 97-108.
64. Iguchi, H., Kato, K.I. and Ibayashi, Y. (1982). Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cirrhosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 54(5), 1025-1027.
65. Weaver, D.R., Stehle, J.H., Stopa, E.G. and Reppert, S.M. (1993). Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 76(2).
66. Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, 3, 13-22.
67. Kuş, İ. Ve Sarsılmaz, M. (2002). Pineal Bezin Morfolojik Yapısı ve Fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 22, 221-226.
68. Cagnacci, A. (1996). Melatonin in relation to physiology in adult humans. *Journal of Pineal Research*, 21(4), 200-213.
69. Gülçin, İ., Büyükkuroğlu, M.E., Oktay, M. ve Kufrevioğlu, O.İ. (2002). On the in vitro antioxidative properties of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 33, 167-171.
70. Arendt, J. (1988). Melatonin. *Clinical Endocrinology*, 29(2), 205-229.
71. Ballı, E. (2003). Melatoninin Fonksiyonları. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 4(4), 380-385.
72. Kerr, J.F., Yuan, J. and Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and Functions of Cell Death. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 663-698.
73. Coşkun, G. ve Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.
74. Tomatır, A.G. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 23, 499-508.
75. Öktem, S., Özhan, M.H. ve Özol, D. (2001). Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2(1), 91-95.

76. Akşit, H. ve Bildik, A. (2008). Apoptozis. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 19(1), 55-63.
77. Gültekin, N., Karaoğlu, K. Ve Küçükateş, E. (2008). Hücre apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. **Türk Kardioloji Derneği Arşivi**, 36(2), 120-130.
78. Kandaş, N. (2004). Apoptosis, programlı hücre ölümü. **Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi**, 5(1), 7-10.
79. Maeda, K., Ohkura, S. and Tsukamura, H. (2000). Physiology of the reproduction. (ed. Krinke GJ. **The laboratory rat (handbook of experimental animals)**. London: Academic Press, 148-149.
80. Matagne, V., Rasier, G., Lebrethon, M.C., Gerard, A. and Bourguignon, J.P. (2004). Estradiol stimulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in vitro: correlation with perinatal exposure to sex steroids and induction of sexual precocity in vivo. **Endocrinology**, 145(2775), 83.
81. Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K.J., Walker, M., Fisher, J.S., Morley, M., Millar, M.R., Groome, N.P. and Sharpe, R.M. (2000). Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. **Endocrinology**, 141, 3898-3907.
82. Batmanabane, M. and Ramesh, K.G. (1996). Effects of exogenous melatonin on the onset of puberty in female albino rats. **The Anatomical Record**, 245(3), 519-524.
83. Dair, E.L., Simoes, R.S., Simoes, M.J., Romeu, L.R.G., Oliveira-Filho, R.M., Haidar, M.A., Baracat, E.C. and Soares, J.M. (2008). Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Reproductive Biology**, 89(3), 1299-1305.
84. Koda, T., Morita, M. and Imai, H. (2007). Retinoic acid inhibits uterotrophic activity of bisphenol a in adult ovariectomized rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, 53(5), 432-436.
85. Markey, C.M., Wadia, P.R., Rubin, B.S., Sonnenschein, C. and Soto, A.M. (2005). Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-a in the female Mouse genital tract. **Biology of Reproduction**, 72, 1344-1351.
86. Newbold, R.R., Jefferson, W.N. and Banks, E.P. (2007). Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol a on the murine female reproductive tract. **Reproductive Toxicology**, 24(2), 253-258.

87. Sangai, N.P., Verma, R.J. and Trivedi, M.H. (2012). Testing the efficacy of quercetin in mitigating bisphenol a toxicity in liver and kidney of mice. ***Toxicology and Industrial Health***, 30, 581-597.
88. Toyama, Y., Suziki-Toyota, F., Maekawa, M., Ito, C. And Toshimori, K. (2004). Adverse effects of bisphenol a to spermiogenesis in mice and rats. ***Archives of Histology and Cytology***, 67(4), 373-381.
89. Villanua, M.Aa., Agrasal, C. And Esquifino, A.I. (1989). Neonatal administration advances rat vaginal opening and disrupts estrous cyclicity and estrogen-dependent regulatory mechanisms of luteinizing hormone and prolactin. ***Journal of Pineal Research***, 7(2), 165-174.
90. Aghajanova, I. And Giudice, L.C. (2011). Effect of bisphenol a on human endometrial stromal fibroblasts in vitro. ***Reproductive BioMedicine Online***, 22(3), 249-256.
91. Anjum, S., Rahman, S., Kaur, M., Ahmad, F., Rashid, H., Ansari, R.A. and Raisuddin, S. (2011). Melatonin ameliorates bisphenol A-induced biochemical toxicity in testicular mitochondria of Mouse. ***Food and Chemical Toxicology***, 49(11), 2849-2854.
92. Bosquiazzo, V.L., Varayoud, J., Munoz-de-Toro, M., Luque, E.H. and Ramos J.G. (2010). Effects of neonatal exposure to bisphenol a on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus. ***Biology of Reproduction***, 82(1), 86-95.
93. Hiyama, M., Choi, E., Wakitani, S., Tachibana, T., Khan, H., Kusakabe, K.T. and Kiso, Y. (2011). Bisphenol-a (bpa) affects reproductive formation across generations in mice. ***The Journal of Veterinary Medical Science***, 73(9), 1211-1215.
94. Prata Lima, M.F., Baracat, E.C. and Simões, M.J. (2004). Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, 37(7), 987-995.
95. Schönfelder, G., Friedrich, K., Paul, M. and Chahoud, I. (2004). Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. ***Neoplasia***, 6(5), 584-594.
96. Yigit, F. ve Dağlıoğlu, S. (2010). Histological changes in the uterus of the hens after embryonic exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol. ***Protoplasma***, 247(2), 57-63.

EKLER

EK-1. Etik kurul onayı



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 66332047-604.01.02/ 68- 6164
KONU :

18.1.2013

Sayın
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

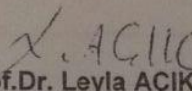
Araştırmacı grubu Suna ÖMEROĞLU, Neslihan ÇOŞKUN, Bahar KARTAL ve Damla DERNEK'ten oluşan G.Ü.ET-13.023 kod numaralı ve **"Neonatal Dönemde Dişi Ratlara Uygulanan Bisfenol A'nın Uterusta Oluşturduğu Değişikliklere Karşı Melatoninin Olası Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi"** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-13.023 and entitled **"Histopathological Examination of Possible Effects of Melatonin Against Alternations in Uterus Induced by Neonatal Bisphenol a Exposure to Neonatal Female Rats"** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

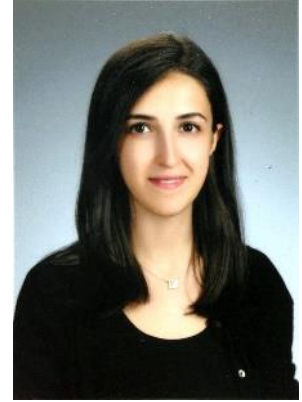

 Prof.Dr. Leyla AÇIK
 Gazi Üniversitesi
 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

T.C.Gazi Üniversitesi Rektörlüğü, 06500 Teknikokullar, Ankara
tel : 0 312 202 20 57 Faks: 0 312 202 20 63

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DERNEK, Damla
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 24.07.1989, ANKARA
Medeni hali : Bekâr
Telefon : 0 (530) 0697081
E-Posta : damladernek@gmail.com



Eğitim

Derece	Okul/Program	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Histoloji-Embriyoloji A.D.	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji	2011
Lise	Yavuz Sultan Selim Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2014-...	Türk Kızılayı Kan Hizmetleri Gn. Müd.	Kök Hücre Bağışçısı Kazanımı Yetkilisi
2013-2014	Başkent Bilgi Dünyası Etüt Merkezi	Öğretmen

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Edebiyat, Müzik, Yemek yapmak, Şehir gezileri, Doğa yürüyüşü



GAZİ GELECEKTİR..