



**POLİKİSTİK OVER SENDROMLU (PCOS) ERGEN KIZLARDA
CYP19 GEN POLİMORFİZMİ VE BİSFENOL A MARUZİYETİNİN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Çağrı İPEK

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2023

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.

Çağrı İPEK

27/01/2023

POLİKİSTİK OVER SENDROMLU (PCOS) ERGEN KIZLARDA
CYP19 GEN POLİMORFİZMİ VE BİSFENOL A MARUZİYETİNİN
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Çağrı İPEK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2023

ÖZET

Sunulan bu çalışmanın hedefinde, kadınlarda görülme sıklığı yüksek olan Polikistik over sendromu (PKOS) gelişiminde, gen-çevre etkileşiminin araştırılması yatmaktadır. PKOS, tipik olarak ergenlik döneminde gözlenen ve ileri yaşlarda tip 2 diyabet gibi ikincil hastalıkların gelişme riskini arttıran metabolik bozukluklar ile ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla çalışma, PKOS gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülen ve androjen metabolizmasındaki bozuklukların genetik nedenlerinden biri olabileceği CYP19 ve PKOS ile en çok ilişkilendirilen genlerden biri olan DENND1A genlerindeki polimorfizmlerle PKOS gelişimi arasındaki olası ilişkisinin belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, günlük yaşamımızda pek çok kaynaktan maruz kaldığımız, endokrin bozucu etkiye sahip kimyasal bir grup olan alkilfenollerin önemli üyelerine maruziyetinin PKOS ile ilişkisi de değerlendirilmiştir. Böylelikle, PKOS gelişiminde gen-çevre ilişkisinin anahtar rol oynayıp oynamayacağı hakkında bilgi sahibi olunmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar çerçevesinde PKOS gelişimindeki sorumlulukta genetik faktörlerin mi yoksa çevresel maruziyetlerin mi veya her iki durumun da bir arada rolünün olup olmadığı konusunda eksikliği duyulan bilgilere ulaşılması hedeflenmektedir. Çalışmamızda PKOS gelişiminde bazı genetik ve çevresel faktörlerin rolünün incelenmesi amacıyla 120 kontrol 102 PKOS hastasında DENND1A *rs10818854* ve CYP19 *rs2414096* genotiplerinin sıklığını, aynı bireylerin idrar örneklerinde Bisfenol A (BPA), Oktifenol (OP) ve Nonilfenol (NP) düzeylerini araştırdık. Tek Nokta Mutasyon (TNP) analizleri bireylerin DNA örneklerinde RT-PCR yöntemi uygulanarak, alkilfenollerin ölçümleri ise Sıvı Kromatografisi-tandem Kütle Spektrometresi (LC/MS-MS) yöntemiyle gerçekleştirildi. Çalışmamızda Türk popülasyonunda ilk kez DENND1A *rs10818854* polimorfizm sıklığı incelenmiş ve varyant alel sıklığı kontrol grubunda 0,1 bulunmuş PKOS gelişimi açısından ise bir risk faktörü olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). CYP19 *rs2414096* genetik polimorfizminin ise aromataz aktivitesinden bağımsız olarak PKOS gelişimine yatkınlıkta rol oynadığı belirlenmiştir ($p=0,022$). Çalışmamızda sadece OP maruziyetinin zayıf da olsa PKOS gelişiminde rol oynadığını ve bu riskin CYP19 A aleli taşıyanlarda daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz ($p=0,018$). Çalışmamız hem alkilfenollerin PKOS gelişimindeki rolünün incelenmesi hem de DENND1A *rs10818854* ve CYP19 *rs2414096* polimorfizmlerinin sıklığının belirlenmesi açısından Türk popülasyonunda yapmış ilk çalışmadır. Elde edilen sonuçların PKOS gelişiminde genetik faktörlerin ve çevrenin etkisinin bir arada değerlendirilme olanağı sunması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Bilim Kodu : 1021
Anahtar Kelimeler : Polikistik over sendromu, Endokrin bozucular, Gen polimorfizmi, Bisfenol A CYP19, DENND1A
Sayfa Adedi : 111
Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmet ÇOK

INVESTIGATION OF CYP19 GENETIC POLYMORPHISM AND EXPOSURE TO
BISPHENOL A IN ADOLESCENT GIRLS WITH POLYCYSTIC OVARIAN
SYNDROME (PCOS)

(Ph. D. Thesis)

Çağrı İPEK

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2023

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the gene-environment interaction in the development of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), which has a high incidence in women. PCOS is associated with metabolic disorders that are typically observed in adolescence and increase the risk of developing secondary diseases such as type 2 diabetes in later life. For this reason, the study was conducted to determine the possible relationship between the development of PCOS and polymorphisms in the CYP19 and DENND1A genes, which are thought to play an important role in the development of PCOS and may be one of the genetic causes of androgen disorders. On the other hand, the relationship between PCOS and exposure to important members of alkylphenol compounds, a chemical group with endocrine disrupting effects, which we are inevitably exposed to from many sources in our daily life, was also evaluated. Thus, it has been tried to have information about whether the gene-environment relationship will play a key role in the development of PCOS. Within the framework of the results obtained, it is aimed to reach the missing information about whether genetic factors or environmental exposures or both conditions play a role in the responsibility for the development of PCOS. In our study, we aimed to investigate the role of some genetic and environment factors in PCOS risk and conducted a study comprised of 120 control and 102 PCOS patients. We evaluated the frequency of DENND1A rs10818854 and CYP19 rs2414096 genotypes and measured the levels of Bisphenol A (BPA), Octylphenol (OP) and Nonylphenol (NP) levels in urine samples. Single Nucleotide Polymorphisms were analysed with RT-PCR in DNA samples and alkylphenols were measured in Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (LC/MS-MS). DENND1A rs10818854 polymorphism frequency was determined for the first time in Turkish population and was found as 0,1 which was not a risk factor for PCOS in the present study ($p>0,05$). According to our results CYP19 rs2414096 polymorphism plays a role in individual susceptibility to PCOS with another mechanism other than regulating the aromatase activity ($p=0,022$). In our study, OP levels were higher in PCOS group which was even higher in CYP19 A allele carriers ($p=0,018$). Our study is the first study conducted in the Turkish population in terms of both examining the role of alkylphenols in the development of PCOS and determining the frequency of DENND1A rs10818854 and CYP19 rs2414096 polymorphisms. We think that the results obtained are important in terms of providing the opportunity to evaluate the effects of genetic factors and the environment in the development of PCOS.

Science Code : 1021

Key words : Polycystic ovary syndrome, Endocrine disruptors, polymorphism,
Bisphenol A, CYP19, DENND1A

Page Number : 111

Supervisor : Prof. Dr. İsmet ÇOK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana bilimsel konularda yol göstermekten öte hayatın her alanında her zaman yanımda olduğunu hissettiğim, beni oğlundan ayrı görmeyen, öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. İsmet ÇOK’a,

Desteği ve güleryüzüyle tezin özellikle deneysel aşamalarında olmak üzere bana her adımda yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ela KADIOĞLU’na;

315S180 numaralı proje ile tez çalışmalarımı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Başkanlığı’na,

Samimiyetleri ve güleryüzleri ile lisans hayatımdan itibaren beni Farmasötik Toksikoloji alanında doktora yapmak konusunda cesaretlendiren kıymetli bilgilerini benden esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ali Esat KARAKAYA, Prof. Dr. Sema BURGAZ, Prof. Dr. Bensu KARAHALİL ve Prof. Dr. Gonca ÇAKMAK’a,

Gönüllülerden numunelerin toplanması sürecinde yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Aysun BİDECİ ve Uzm. Dr. Esra DÖĞER’e,

Çalışmamızın Mersin ayağındaki analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Dilek BATTAL’a; beni destekleyen, yol gösteren arkadaşlarım Dr. Ayça AKTAŞ ŞÜKÜROĞLU ve Dr. Aylin ELKAMA’ya, istatistiksel analizlerde yardımcı olan ve beni motive eden arkadaşım Dr. Feyza GÜRER ve bu vesileyle vakitlerini çaldığım arkadaşım, kardeşim Uzm. Ecz. Çağrı GÜRER ile minik prensens Göksu GÜRER’e,

Tecrübelerinden her daim faydalandığım, yardımlarını esirgemeyen ağabeyim Prof. Dr. Engin DELİGÖZ’e

Beni okutan, büyüten ve bugünlere getiren, her zaman yanımda olan ilk öğretmenim babam Mürsel İPEK ile canım annem Salime İPEK ve minik kardeşim Ceren İPEK’e,

Ve vazgeçmeye en yakın olduğum anda tezi bitirmem için beni motive eden, hep yanımda olan, en büyük destekçim sevgili eşim Ayla’ma tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. PKOS Epidemiyolojisi	6
2.1.1. Prevalans	6
2.1.2. Klinik belirtileri.....	6
2.2.3. Patogenezi	10
2.2. Genetik faktörler	12
2.2.1. CYP19 geni	14
2.2.2. DENND1A geni	15
2.2.3. Tek nükleotit polimorfizmleri	15
2.3. Çevresel Faktörler	15
2.3.1. Endokrin bozucular	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Çalışma grubu seçimi ve biyolojik örnek toplama.....	29
3.1.2. İdrar örneklerinde bisfenol A, oktilfenol ve nonilfenol tayini	32

Sayfa

3.1.3. Kan numunelerinden genomik DNA izolasyonu ile CYP19 (rs2414096) ve DENND1A (rs10818854) genlerindeki tek nokta polimorfizmlerin Real-Time PCR ile belirlenmesi.....	36
3.1.4. Biyokimyasal parametrelerin ölçüm yöntemi	41
3.2. İstatiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR	45
4.1. LC/MS-MS Cihazı ile BPA, OP ve NP Analizi Yöntem Validasyonu.....	45
4.1.1. LC-MS/MS cihazının kalibrasyonu	45
4.1.2. LC/MS-MS cihazı ile BPA, OP ve NP analizlerine ilişkin kromatogram	46
4.1.3. Doğruluk ve geri kazanım	47
4.1.4. Teşhis ve miktar tayini alt sınırı.....	47
4.1.5. Validasyon parametreleri	48
4.1.6. İyon kaynağının optimizasyonu-MS parametreleri.....	50
4.1.7. Çalışmaya katılan bireylerin temel özellikleri ve biyokimyasal ölçüm sonuçları.....	52
4.1.8. Hasta ve kontrol grubunda DENND1A (rs10818854) ve CYP19 (rs2414096) genotip sıklıkları.....	55
4.1.9. PKOS ve kontrol gruplarında Alkilfenollerin (BPA, OP ve NP) miktar tayini	63
4.1.10. Alkilfenollere maruziyet ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.....	63
4.1.11. PKOS gelişimi üzerinde alkilfenollere maruziyet ve genotiplerin etkisinin beraber incelenmesi.....	65
4.1.12. PKOS ve kontrol gruplarında yapılan anket çalışmasının analiz sonuçlarına ile birlikte değerlendirilmesi.....	67
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR	87
EKLER.....	101

	Sayfa
EK-1. Etik Kurul Onayı	102
EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	104
EK-3. Gönüllülere Yönelik Anket Formu	106
ÖZGEÇMİŞ	111

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. PKOS tanı kriterleri.....	6
Çizelge 2.2. Bazı endokrin bozucu kimyasallar ve kullanım alanları	18
Çizelge 3.1. Çalışmaya katılan gönüllülere ait yaş, VKİ bilgileri.....	30
Çizelge 3.2. LC-MS/MS çalışma parametreleri	35
Çizelge 3.3. CYP19 (rs2414096) ve DENND1A (rs10818854) analiz protokolü	39
Çizelge 3.4. RT-PCR analizi için hazırlanan final karışım içeriği.....	40
Çizelge 3.5. Biyokimyasal parametrelerin ölçüm yöntemleri	42
Çizelge 4.1. BPA, OP ve NP'e ait LOD ve LOQ değerleri	47
Çizelge 4.2. LC-MS/MS validasyon parametreleri	49
Çizelge 4.3. Miktar tayini için MS/MS geçişleri ve enstrüman parametreleri.....	50
Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri	53
Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grubunda ölçülen biyokimyasal parametre ölçüm sonuçları	53
Çizelge 4.6. VKİ<25 kg/m ² olan olgular içerisinde gruplara göre olgularda ölçülen biyokimyasal parametre ölçüm sonuçları.....	54
Çizelge 4.7. VKİ≥25 kg/m ² olan olgular içerisinde gruplara göre olgularda ölçülen biyokimyasal parametre sonuçları.....	55
Çizelge 4.8. Kontrol grubu içerisinde hem genel hem de VKİ sabit tutulduğunda genotip dağılıma ilişkin Hardy-Weinberg dengesi	56
Çizelge 4.9. PKOS ve kontrol grupları arasında genotiplerin dağılımı ve alel frekansları.....	57
Çizelge 4.10. Tüm olgular içerisinde DENND1A genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri.....	57
Çizelge 4.11. Hasta grubu içinde DENND1A genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri	58
Çizelge 4.12. Tüm olgular içerisinde CYP19 genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri I.....	59
Çizelge 4.13. Tüm olgular içerisinde CYP19 genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri II	59

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.14. Hasta grubu içinde CYP19 genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri I	60
Çizelge 4.15. Hasta grubu içinde CYP19 genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri II	61
Çizelge 4.16. Normal ve fazla kilolu bireylerde genotiplerin dağılımı ve alel frekansları.....	62
Çizelge 4.17. Hasta ve kontrol grubunda alkilfenol düzeyleri	63
Çizelge 4.18. Normal ve kilolu bireylerde alkilfenol düzeyleri	63
Çizelge 4.19. Tüm olgularda BPA, OP ve NP maruziyeti ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki	64
Çizelge 4.20. Hasta grubu içinde BPA, OP ve NP maruziyeti ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki	64
Çizelge 4.21. PKOS gelişiminde alkilfenollere maruziyet ile DENND1A ve CYP19 genotiplerinin etkisinin incelenmesi.....	66
Çizelge 4.22. PKOS ve kontrol gruplarında ilk adet görme yaşlarının dağılımı.....	67
Çizelge 4.23. PKOS ve kontrol gruplarında yaşlara göre alkilfenol düzeylerinin medyan ortalamaları	67
Çizelge 4.24. PKOS ve kontrol gruplarında alkilfenol düzeyleri ile ilk adet görme yaşları arasındaki korelasyon	68
Çizelge 4.25. PKOS ve kontrol gruplarında alkilfenol düzeyleri ile erken göğüs büyümesi veya erken tüylenme arasındaki ilişkinin karşılaştırılması.....	68
Çizelge 4.26. PKOS ve kontrol gruplarında erken ergenlik teşhisi ile alkilfenollere maruziyet düzeylerinin karşılaştırılması	69
Çizelge 4.27. PKOS ve kontrol gruplarında içme suyu kaynağı ile alkilfenollere maruziyet düzeylerinin karşılaştırılması	69
Çizelge 4.28. Hazır su tüketim süresi ile alkilfenol maruziyeti arasında ilişkinin PKOS ve Kontrol gruplarında değerlendirilmesi	70
Çizelge 4.29. Fast food tüketim sıklığına göre PKOS ve kontrol gruplarında alkilfenol düzeyleri	70
Çizelge 4.30. Teneke kutuda satılan kola, soğuk çay gibi içecekleri tüketme açısından PKOS ve kontrol gruplarında alkilfenol maruziyet düzeyleri.....	71
Çizelge 4.31. Plastik malzeme ile kaplanmış gıda maddelerini alma alışkanlığının PKOS ve kontrol gruplarındaki alkilfenol düzeylerine etkisi	71

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.32. Plastik kap içinde mikrodalga fırında ısıtılmış yemek tüketimi açısından BPA, OP ve NP'e maruziyet düzeylerinin karşılaştırılması	72
Çizelge 4.33. PKOS ve kontrol grupları içinde plastik biberon, emzik ve/veya suluk kullanımının alkilfenollere maruziyet ilişkisinin değerlendirilmesi	72
Çizelge 4.34. Amalgam olmayan kompozit dolgu diş kullanımının BPA düzeyine etkisi	73
Çizelge 4.35. Bireylerin kullandıkları oyuncak materyalinin PKOS ve kontrol grupları arasında dağılımı.....	73
Çizelge 4.36. İlk adet görülen yaşlara göre medyan OP düzeyleri ortalaması.....	73
Çizelge 4.37. Erken göğüs büyümesi veya erken tüylenme şikayetleri varlığı ile OP maruziyet düzeyi ilişkisi.....	74
Çizelge 4.38. Erken ergenlik teşhisi varlığının OP düzeyine etkisi	74
Çizelge 5.1. PKOS ve BPA maruziyeti arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bazı çalışmalar	84

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Androjen fazlalığının hücresel aktivite üzerindeki etkileri	9
Şekil 2.2. Polikistik over sendromu patofizyolojisi	12
Şekil 2.3. PKOS'un olası genetik faktörlerine genel bir bakış.....	14
Şekil 2.4. Endokrin bozucuların etki mekanizmaları	19
Şekil 2.5. Bisfenol A (BPA) kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.6. BPA maruziyet yolları ve maruziyet kaynakları.....	22
Şekil 2.7. Nonilfenol epoksilat (NPE), Oktilfenol epoksilat (OPE), Nonilfenol (NP) ve Oktilfenol (OP)'un kimyasal yapıları.....	24
Şekil 2.8. Nonilfenolün (NP) kimyasal yapısı ve bazı fizikokimyasal özellikleri	26
Şekil 2.9. Oktilfenolün molekül yapısı ve bazı fizikokimyasal özellikleri	27
Şekil 3.1. Biyolojik örneklerin hazırlanması.....	34
Şekil 3.2. DENND1A rs10818854 yabancı/mutant genotipe ve negatif kontrole ait erime eğrileri ve erime pikleri.....	41
Şekil 3.3. CYP19 rs2414096 yabancı/heterozigot/mutant genotiplere ait erime eğrileri ve erime pikleri	41
Şekil 4.1. BPA kalibrasyon grafiği.....	45
Şekil 4.2. OP kalibrasyon grafiği	45
Şekil 4.3. NP kalibrasyon grafiği	46
Şekil 4.4. Kreatinin kalibrasyon grafiği	46
Şekil 4.5. BPA, OP ve NP'in alıkonma zamanlarını gösterir temsili kromatogram	47
Şekil 4.6. BPA, BPA-IS, OP, OP-IS, NP, NP-IS'nin temsili kromatogramları.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
'	Dakika
"	Saniye
%	Yüzde
°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
g	Gram
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı

Kısaltmalar	Açıklama
3β-HSD	3 β hidroksi steroid dehidrogenaz
A₄	Androstenedion
ACTH	Adreno Cortico Troid Hormon
AES	Androgen Excess Society
APE	Alkilfenol Etoksilat
VKİ	Vücut Kütle İndeksi
BPA	Bisfenol A
CYP19	Sitokrom p450 19
DENND1A	Differentially expressed in normal and neoplastic cells domain

Kısaltmalar	Açıklama
DHEA	Dihidroepiandrostenedion
DHEASO₄	Dihidroepiandrostenedionsülfat
EBK	Endokrin Bozucu Kimyasal
ECLIA	Electro-chemiluminescence immunoassay
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Estrogen Receptor
E2	Estradiol
ESHRE/ASRM	European Society for Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GPOR	G-protein-coupled estrogen receptor
GWAS	Genom Wild Assosiation Study
HPG	Hipofiz Gonadal Eksen
HPO	Hipofiz Overyan Eksen
İD	İnsülin Direnci
LH	Luteinleştirici Hormon
NIH/NICH	National Institutes of Health/National Institute of Child Health and Human Disease
NP	Nonilfenol
NPE	Nonilfenol etoksilat
OP	Oktilfenol
OPE	Oktilfenol Etoksilat
PKOS	Polikistik Over Sendromu
RIA	Radioimmuniassay
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SHGB	Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
SNP	Single Nukleotide Polymorphism
StAR	Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein
TNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi

1. GİRİŞ

Ergenlik, hem biyolojisi hem de yetkin insan yetişkin işleyişine benzersiz katkıları açısından etkileyici bir dönem olmasına rağmen, bazı hastalık türleri bu dönemde en yüksek görülme sıklığına sahiptir. Örneğin yüksek hepatit insidansı [1], gastrointestinal sistem enfeksiyonları [2] ve en yüksek ölüme yakın astım atakları [3] ergen yaş aralığında kaydedilmiştir. Orta ergenlik yeme bozukluklarının ortaya çıktığı dönem iken [4], uyku apnesi, gecikmiş uyku fazı sendromu gibi patolojik uyku durumları bu dönemde baş gösterir [5]. Ayrıca ergenlik, tiroid bozuklukları, diyabet, koroner arter hastalığı, şizofreni ve otoimmün hastalıkları gibi büyük ölçüde çocuklukta uykuda olan hastalıkların semptomatik olarak ortaya çıktığı bir dönemdir. Genellikle halk sağlığı yetkilileri, öğretmenler ve ebeveynler yaralanma riski taşıyan davranışların azaltılmasına, üreme sağlığı, madde bağımlılığını ve okul terkinin önleme gibi konulara odaklanırlar [6]. Çevresel maruz kalmalar ve toksik kimyasallar, ergenler için bir endişe veya müdahale konusu olarak nadiren dile getirilir.

Ergenliğe girmek, üreme yaşamında önemli bir dönüm noktasıdır, ancak son zamanlarda, özellikle kızlarda erken gelişmiş veya gecikmiş ergenlik gibi bazı ergenlik bozuklukları bildirilirken, Polikistik Over Sendromu (PKOS) gibi hastalıkların da ergenlik çağındaki kızlarda da görülme sıklığının arttığı pek çok ülkede bildirilmektedir [7]. PKOS, görülme sıklığı %5-10 civarı olan özellikle üreme çağındaki kadınların etkilendiği yaygın bir endokrin bozukluk olup, prevalansı başta gelişmiş ülkeler olmak üzere tüm dünyada artmaya devam eden bulaşıcı olmayan hastalıklardan biridir. PKOS, üreme çağındaki kadınlarda hiperandrojenizm ve polikistik over morfolojisi ile seyreden heterojen bir over disfonksiyonu bozukluğudur. PKOS semptomları genellikle ergenlikte fark edilip, sıklığı ergenlik ile beraber artmakta, 15 yaşına gelindiğinde %26 oranına kadar ulaşmaktadır [8]. PKOS, obezite, insülin direnci ve PKOS patolojisini şiddetlendirebilen ve daha sonraki yaşamda tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklara yol açabilen telafi edici hiperinsülinemi gibi geniş bir metabolik bozukluklar yelpazesi ile karakterize edilir. Ergenlerde PKOS'a eşlik eden obezite ve dislipidemi insidansı yetişkinlere göre daha yüksek olabilmektedir [9]. Yapılan çalışmalar, bu kişilerde yetişkinlik döneminde tip 2 diyabetin gözlenme riskinin 10 kat, metabolik sendrom gözlenme riskinin ise 2 kat daha fazla olduğunu göstermektedir [10,11]. Ayrıca endometrium kanser ve infertilite riskinin de yüksek olması nedeniyle, hastalığın erken teşhisi ve tedavisi PKOS'a eşlik eden sekonder

hastalıkların önlenmesi açısından önemlidir [12]. Bu nedenle, PKOS gözlenen ergenlerin tanımlanması ve tedavi edilmesi oldukça önemlidir.

PKOS'un patogenezi hala belirsiz olsa da hem genetik hem de çevresel faktörlerin PKOS etiolojisinde rol oynayabileceğine dair kanıtlar daha dikkat çekici olarak ortaya çıkmaya başlamıştır. Özellikle endokrin sistem üzerine etkili çevresel kirleticilerin hayvan ve insan üreme sistemi üzerinde yaratmış oldukları olumsuz etkilere yönelik bilimsel kanıtların artmasına paralel olarak, PKOS gelişiminde rol oynayan pek çok faktör arasında Endokrin Bozucu Kimyasalların rol alabileceği (EBK) düşünülmektedir. EBK'ler, PKOS'dan etkilenen kadınlarda semptomlarını kötüleştirmek veya genetik olarak yatkın deneklerde sendromun nihai fenotipine katkıda bulunmak için çevresel bir değiştirici görevi görebileceğine dair kanıtların sayısı artmaya başlamıştır. Farklı duyarlılık pencereleri nedeniyle, farklı gelişim dönemlerinde aynı kimyasalın aynı dozunun çok farklı biyolojik sonuçları olabilir. Özellikle fetal gelişim, bebeklik, çocukluk ve ergenlik gibi gelişimin kritik dönemlerinde düşük dozlarda bile EBK'lere maruz kalmak, merkezi sinir sistemi, üreme ve gelişimsel bozuklukların yükselişinde rol oynayabilmekte ve bu sistemlerin işlevinde kalıcı sorunlara neden olabilmektedirler. EBK'lere özellikle intrauterin ve bebeklik periyodunda maruziyette ortaya çıkan sağlık sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, ergenlik döneminin kritik penceresi hakkında sınırlı veri mevcuttur. Dolayısıyla ergenlik döneminde başta EBK'lere maruz kalmaya bağlı olarak gelişen sağlık problemlerinin belirlenmesi kritik öneme sahiptir.

Alkilfenoller, endokrin bozucu olarak tanımlanan kimyasalların önemli çevresel kirletici gruplarından birini oluşturmaktadırlar. Bu grubun üyelerinden olan Bisfenol A (BPA), oktilfenol (OP) ve nonilfenol (NP) günlük hayatımızda yaygın olarak kullandığımız alkilfenol bileşikleridir. BPA, plastiklerin ve epoksi reçinelerin yapımı amacıyla dünyada en fazla üretilen kimyasallardan biridir [13]. OP ve NP bileşikleri de BPA gibi fenolik reçine ve alkilfenoletoksilat üretiminde (non-iyonik deterjanlar) yararlanılan kimyasallardır. Alkilfenoletoksilatlar endüstride kâğıt, deri, tekstil, yağ, boya, deterjan, pestisit ve kişisel bakım ürünleri gibi pek çok endüstriyel formülasyonlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Plastik şişeler, kaplamalar, borular, gıda ambalajları, diş dolguları ve yanmaya dayanıklı materyaller gibi günlük yaşantımızda sıklıkla kullandığımız materyallerin bileşiminde yer aldıklarından bu bileşiklere olan maruziyetimiz kaçınılmazdır. Ayrıca, OP ve NP bileşiklerinin çevrede yayılmasının başlıca nedeni, alkilfenoletoksilat bileşiklerinin çevrede biyodegradasyonudur.

Yapılan in-vitro ve in-vivo çalışmalar, alkilfenollerin östrojen aktivitesi olduğunu ve α - ve β -östrojen reseptörlerine bağlandığını göstermektedir. Ayrıca BPA'nın endojen östrojenlerin etkisini inhibe ettiğine dair de kanıtlar bulunmaktadır [14]. Bu etkileri nedeniyle alkilfenoller, endokrin bozucu kimyasallar sınıfında yer almaktadır [15]. Ergenlerin özellikle ailesel diyet alışkanlıkları veya diyet alışkanlıklarının aileden farklılık göstermesi başta alkilfenoller gibi endokrin bozucu bileşiklere fazladan maruziyet riskini de beraber getirmektedir. Bu durum da fazladan sağlık risklerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. PKOS'un da temelinde steroid metabolizmasındaki bozukluklar yattığı için alkilfenol maruziyetinin hastalığa yakalanma riskini artırabileceği düşünülmektedir. Nitekim ülkemizde ergen kızlarda (13-19 yaş) yapılan bir çalışmada, PKOS'lu adolesanların serum BPA düzeyleri, obeziteden bağımsız olarak sağlıklı kızların BPA düzeylerinden oldukça yüksek bulunmuştur [16].

PKOS gelişiminde çevresel faktörler beraber pek çok genin rol aldığı kompleks bir bozukluktur [17]. Üreme sisteminde, insülinin etki ve salgılanmasında, obezite ve enerji regülasyonunda rol oynayan genler, aday genler olarak kabul edilmiş ve bu genlerdeki bozukluklar veya mutasyonlar ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu genlerden özellikle androjen biyosentez yolağındaki steroidojenik enzimleri kodlayan genler hakkındaki çalışmalar son zamanlarda yoğunlaşmıştır [18]. Androjenin aşırı üretimi, PKOS'unun en önemli fizyopatolojik özelliğidir. Bu nedenle, androjen metabolik yolağındaki pek çok gen (HSD17B6, CYP19, CYP11A1, CYP17, ve INSR gibi) araştırılmış ve PKOS ile ilişkilendirilmiştir [19]. Bu konuda günümüzde üzerinde araştırmaların yoğunlaştığı genlerden biri olan CYP19 genidir. CYP19 geni östrojen biyosentezindeki son basamakta rol alan ve C19 steroidlerinin (androjenler), C18 (östrojenler)'e dönüşümünü katalize eden aromataz enzimini kodlamakta olup, 15. kromozomun uzun kolunda 15q21.2 pozisyonunda bulunmaktadır [20]. CYP19 genindeki olası varyasyonlar, reseptöre bağlanacak östrojen miktarını veya direkt olarak androjen reseptörüne bağlanacak testosteron miktarını etkileyebilmektedir. Nitekim Çin popülasyonunda PKOS ile ilgili çeşitli duyarlılık bölgeleri tespit edilerek, bu bölgelerdeki tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) incelenmiş ve YAP1, INSR, C9orf3, DENND1A, FSHR, HMGA2, RAB5B, TOX3, LHCGR, THADA ve SUMO1P1-ZNF217 aday genlerinin PKOS gelişiminde rolü olabileceği ileri sürülmüştür [21]. Daha sonra Avrupa ırkında yapılan çalışmalar bu 11 aday gen bölgesinin PKOS ile ilişkisini doğrulayacak yönde sonuçlar ortaya koymuşlardır [22,23]. Bunlara arasında yer alan DENND1A *rs10818854* polimorfizminin konuyla olan ilgisi ve önemi Avrupa ırkında

son zamanlarda yapılan tüm genom ilişkilendirme çalışmasında ortaya konulmaya çalışılmaktadır. Türkiye'de farklı üç çalışmada CYP19 polimorfizminin jinekomasti, postmenopoz ve meme kanseri ile ilişkisi araştırılmış olmasına rağmen günümüze kadar PKOS-CYP 19 polimorfizmi ilişkisini araştıran herhangi bir çalışma yapılmamıştır [24–26]. CYP19 ve DENND1A genlerindeki polimorfizm sıklığının Türk popülasyonunda ortaya konulup PKOS ile ilişkisinin değerlendirilmemiş olması bu konuda tamamlanması gereken bir eksikliğin olduğunu ortaya koymaktadır.

Sunulan bu çalışmanın hedefinde, Türk popülasyonunda görülme sıklığı yüksek olan PKOS'un gelişiminde, gen-çevre etkileşiminin araştırılması yatmaktadır. Dolayısıyla çalışma, PKOS gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülen ve androjen metabolizmasındaki bozuklukların genetik nedenlerinden biri olabilecek CYP19 ve PKOS ile en çok ilişkilendirilen genlerden biri olan DENND1A genlerindeki polimorfizmler ile PKOS gelişimi arasındaki olası ilişkisinin belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, günlük yaşantımızda kaçınılmaz olarak pek çok kaynaktan maruz kaldığımız, endokrin bozucu etkiye sahip kimyasal bir grup olan alkilfenollerden BPA, OP ve NP bileşiklerine maruziyet araştırılarak, PKOS gelişiminde gen-çevre ilişkisinin anahtar rol oynayıp oynamayacağı belirlenmeye çalışılmıştır. Böylelikle bu hastalığa yönelik olarak yüklenilmeye çalışılan sorumlulukta genetik faktörlerin mi yoksa çevresel maruziyetlerin mi veya her iki durumun da bir arada rolünün olup olmadığı konusunda eksikliği duyulan bilgilere ulaşılması hedeflenmektedir.

Ayrıca çalışmamızda, yetişkinlerin değil de ergen hastaların incelenmesi PKOS konusunda alınacak çıktılar açısından son derece önemlidir. Çünkü PKOS sıklığı ergenlerde oldukça yüksektir ve çalışmanın kapsamı ve sonuçları, hastaların erken yaşlarda çevresel maruziyetleri konusunda bilinçlenmelerine ve maruziyetlerini azaltmaları konusunda farkındalık kazanmalarına olanak sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Polikistik Over Sendromu (PKOS), dünya çapında üreme çağındaki kadınların en sık karşılaştığı endokrin sistem bozukluklarından biridir. Tanı kriterlerine ve çalışılan popülasyonlara göre değişkenlik gösteren PKOS prevalansı, genel popülasyonda %8 ile %13; adölesanlarda ise %6 civarındadır [27].

PKOS ilk olarak 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından tanımlanmıştır. “*Biletaral polikistik overlerle ilişkili amenore*” ismiyle yayınladıkları makalelerinde 7 hastada polikistik overler ile amenorenin bir arada görüldüğünü belirterek polikistik overlerin klasik tanımını yapmışlardır [28]. 1958 yılında McArthur ve arkadaşları Stein ve Leventhal tarafından amenore, hirsütizm, obezite ve yumurtalıkların karakteristik polikistik görünümüne sahip olan kadınların idrarlarında luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyelerinin yüksek olduğunu göstermişlerdir [29,30].

Yıllar içinde tanım aralığı daha da genişleyen ve katılan PKOS’un bugüne kadar birden fazla tanımı yapılmıştır. Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH, National Institutes of Health) 1990 yılındaki konferansta PKOS’u diğer endokrinopatilerin görülmediği durumlarda klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm ve menstrüel bozukluğun beraber görülmesi olarak tanımlamıştır. 2003 yılında Rotterdam Konsensusunda ise tanı kriterleri tekrar düzenlenmiş ve diğer endokrinopatilerin yokluğunda kronik anovülasyon/oligomenore, klinik/biyokimyasal hiperandrojenizm ve polikistik görünümlü overler gibi kriterlerin en az 2’sinin bulunmasını PKOS olarak tanımlamışlardır. 2006 yılında The Androgen Excess and PCOS (AE-PKOS) Topluluğu PKOS’u klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm ile menstrual disfonksiyon ve/veya polikistik over morfolojisi gibi kriterlerin her ikisinin de mevcut olması olarak tanımlamıştır [31] . Çizelge 2.1’de bahsedilen 3 farklı PKOS yaklaşımı ile ilgili kriterler sunulmuştur.

Çizelge 2.1. PKOS tanı kriterleri

NIH (1990)	ESHRE/ASRM (2004) Rotterdam Kriterleri	AES (2006)
Aşağıdaki kriterlerden her ikisi de olmalı	Aşağıdaki kriterlerden en az ikisi olmalı	Aşağıdaki kriterlerden her ikisi de olmalı
Klinik ve/veya Biyokimsayal Hiperandrojenizm	Klinik ve/veya Biyokimsayal Hiperandrojenizm	Klinik ve/veya Biyokimsayal Hiperandrojenizm
Menstrual Bozukluk	- Oligoanovülasyon veya anovülasyon - Polikistik overler	Overyan disfonksiyon ve/veya polikistik overler

2.1. PKOS Epidemiyolojisi

2.1.1. Prevalans

PKOS tanım aralığının yıllar içinde artması, prevalansının da tanı kriterine bağlı olarak değişkenlik göstermesine neden olmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'nde NIH kriterleri baz alınarak yapılan bölgesel bir çalışmada üreme çağındaki kadınlarda PKOS prevalansı %6,6 olarak bulunmuştur [32]. Coğrafi konuma göre değişkenlik göstermekle birlikte Dünya genelindeki PKOS prevalansları NIH 1990 kriterlerine göre %5 ile %10; ESHRE/ASMRE (Rotterdam) 2013 kriterlerine göre %6 ile %21; AE-PKOS 2006 kriterlerine göre %10 ile %15 arasında değişkenlik göstermektedir [33]. Türkiye'de PKOS prevalansı ile ilgili yapılan bir çalışmada ise 3 farklı PKOS tanı kriteri kullanılmış ve NIH 1990, ESHRE/ASMRE (Rotterdam) 2013 ve AE-PKOS 2006 kriterlerine göre PKOS prevalansı sırasıyla %6,1, %19,9 ve %15,3 olarak bulunmuştur [34].

2.1.2. Klinik belirtileri

Adet düzensizlikleri

PKOS'ta adet düzensizlikleri (menstrual düzensizlikler) yaygın olarak gözlemlenir. Adet düzensizlikleri oligomenore, anemore ve uzamış düzensiz âdet kanaması olarak görülebilir [35]. Oligomenore, adet olma periyodunun 35 günden fazla ya da yılda 10'dan daha az adet olmak olarak tanımlanabilir. PKOS'lu kadınların yaklaşık yalnızca %30'u normal adet periyoduna sahiptir, diğer yandan oligomenoreli kadınların %85-90'ında ve amenoreli kadınların %30-40'ında PKOS teşhisi konmaktadır. Normal adet periyoduna sahip PKOS'lu hastaların zaman içerisinde kilo alımına bağlı olarak adet düzensizlikleri geliştiği

görülmüştür. Bu hastalar kilo verdiğinde ise adet düzensizliklerinin daha iyiye gittiği anlaşılmıştır [36].

Normalden daha az adet görmek PKOS'lu hastaların gebe kalma şansını da azaltmaktadır. PKOS'lu kadınların %40-60'ında kronik anovülasyona bağlı kısırlık görülmektedir [37]. Kadınlarda görülen kısırlığın ise %40'ından sorumlu olduğu, ayrıca endometriyal karsinomanın sebep olabileceği düşünülmektedir [38].

Polikistik over morfolojisi

PKOS tanısının konması için değerlendirilen kriterlerden birisi de polikistik over morfolojisidir. 2003 yılında Rotterdam Konsensusu polikistik overi ultrasonografi altında boyutları 2 ila 9 mm arasında ölçülen en az 12 folikülün varlığı ve/veya 10 cm³ ün üzerine çıkan artmış over hacmi olarak tanımlamıştır. Rotterdam Konsensusu tarafından belirlenen ultrasonografi temelli kriterlerin üreme çağındaki sağlıklı kadınlarda da polikistik over oranlarının rapor edilmesi polikistik over morfolojisiyle ilgili kriterlerin de yıllar içinde tartışılmasına yol açmıştır [39]. PKOS'lu hastalarda bozulan FSH sekresyonu foliküllerin olgunlaşmasını engellemektedir. Bu durum foliküllerin yumurtlama öncesinde kalmasına ve polikistik over morfolojisine sebep olmaktadır [40].

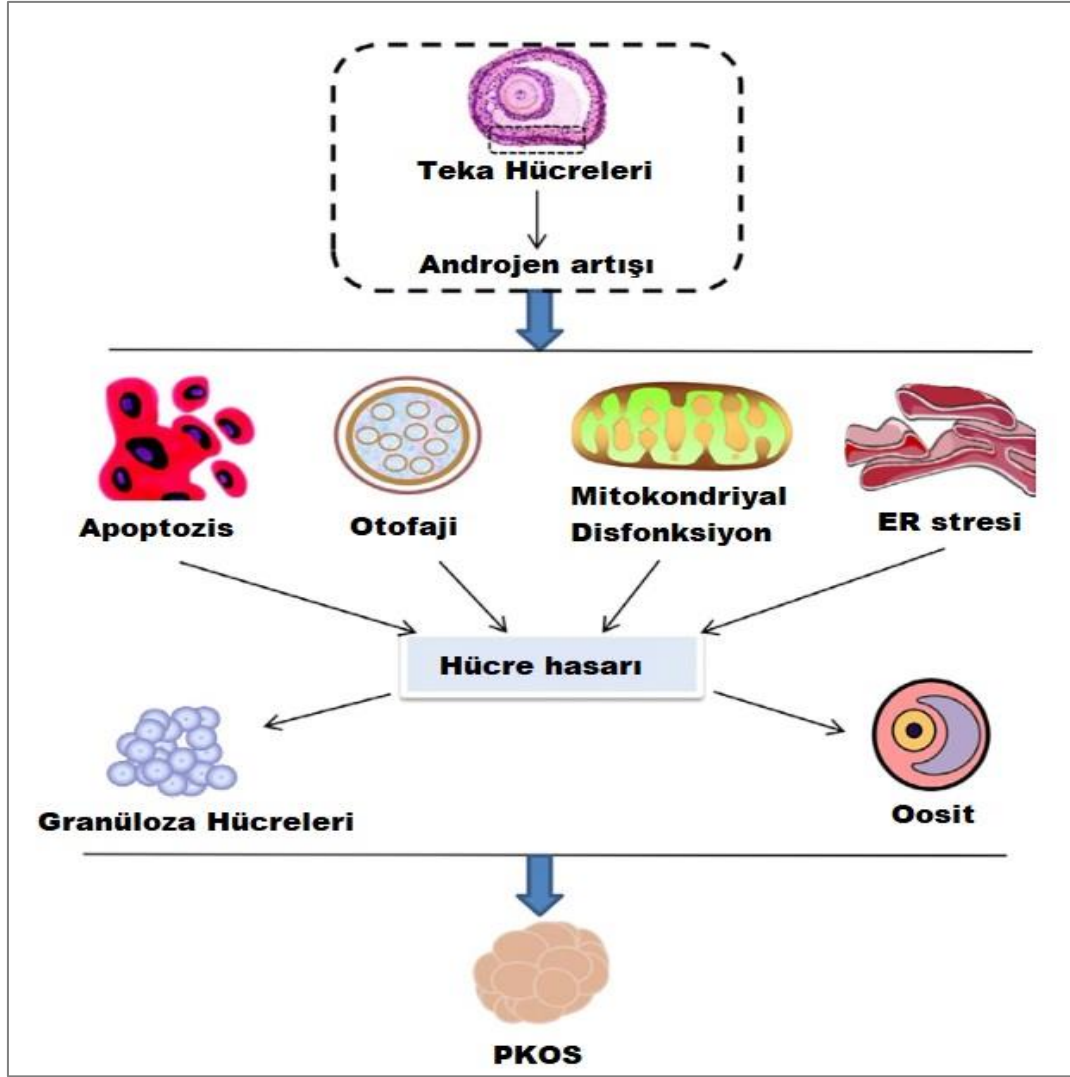
Sağlıklı ve PKOS tanılı kadınların polikistik over sayısı ve yumurtalık hacimlerinin yıllar içinde azalması 40 yaş üzeri kadınlarda polikistik overleri tanımlamak için özellikle yaşa dayalı yeni yaklaşımları da beraberinde getirmektedir [41].

Hiperandrojenizm

PKOS'lu hastalar içinde hiperandrojenizm görülme oranı %60-80 civarındadır [42]. Bu nedenle yüksek androjen seviyeleri PKOS'un önemli bir göstergesi olmuştur. Hiperandrojenizmde androjen seviyesi normalin üzerindedir. Bu durum kendini klinik ve/veya biyokimyasal belirteçlerle göstermektedir. Hiperandrojenik PKOS'lu hastalarda testosteron gibi androjenler ile androstenedion (A4), dehidroepiandrosteron (DHEA) gibi androjen öncüllerinin serum seviyelerinin yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca androjen öncüllerinden androjen dönüşümünü sağlayan enzimlerden olan 3 β hidroksi steroid dehidrogenaz (3β-HSD)'ın seviyesi de yine hiperandrojenik PKOS'lularda yüksektir [43].

Yumurtalıklar ve adrenal bezler kadınlardaki androjen üretimin iki ana kaynağıdır [44]. Androjenler çoğunlukla overlerdeki teka hücrelerinden LH'ın; adrenal bezlerde ise ACTH'ın etkisiyle kolesterol öncülünden sentezlenirler. Adrenal bez kaynaklı hiperandrojenizm PKOS'luların %20-30 civarını etkilese de PKOS'luların metabolik bozukluklarla ilgili durumlarına etki göstermemektedir. Over kaynaklı hiperandrojenizm ise PKOS'un önemli bir indükleyicisi olarak kabul edilmektedir. Aşırı androjen granüloza hücreleri ve oositlerde apoptozis, mitokondriyal disfonksiyon, endoplazmik retikulum stresi ve otofaji gibi hücrel aktiviteyi indükler (Şekil 2.1) ve PKOS'un oluşmasına ve gelişmesine katkıda bulunur [42].

Androjen seviyesinin yükselmesi granüloza hücre fonksiyonlarına ve foliküler gelişime etki ederek ayrıca insülin direncine ve obeziteye yol açmaktadır. Birçok hiperandrojenizimli PKOS hastasında steroidogenez yolaktaki defektler anormal folikülogeneze ve başarısız baskın folikül gelişimine sebep olmaktadır. Nihayetinde hiperandrojenizm obezite, anormal tüylenme, akne ve androjenik alopesi gibi durumlara sebebiyet vermektedir. Bu belirtiler PKOS'lu kadınlarda fizyolojik stresi de beraberinde getirebilmektedir [45]. Hiperandrojenizmde virilizasyon da görülebilir ve androjen seviyesine bağlı olarak virilizasyon belirtileri de daha şiddetli veya daha az olabilir [46].



Şekil 2.1. Androjen fazlalığının hücresel aktivite üzerindeki etkileri [42]

Hiperandrojenizm, kadınlarda androjen bağımlı bölgelerde terminal tüy büyümesine sebep olarak hirsütizm tablosunu ortaya çıkarabilir. Hirsütizme adrenal hiperplazi, tiroit disfonksiyon, cushing sendromu gibi tablolara neden olabilir ancak en yaygın sebebi toplam olguların %70'ten fazlasını oluşturan PKOS'tur [47].

İnsülin direnci

PKOS'luların büyük bir kısmında görülen bir diğer önemli semptom insülin direncidir (İD). PKOS'luların tahmini %50 ila %70'inde bireyin vücut kütle indeksinden (VKİ) bağımsız olarak İD gelişmektedir. PKOS'ta karakteristik olarak İD'e eşlik eden obezite, abdominal bölgedeki yağlanma olarak tanımlanan abdominal obezitedir [48]. Hiperandrojenizm ve hiperinsülinemi insülin direnci ile yakından ilişkilidir. İnsülin direnci, overlerde androjen

üretimini stimüle etmekte diğer yandan karaciğerde Seks Hormon Bağlayıcı Globulin (SHGB) üretimini azaltmaktadır. Bunun sonucu olarak SHGB'e bağlı olan testosteron seviyesi azalırken serumdaki serbest testosteron seviyesi artış göstererek hiperandrojenemiye katkıda bulunmaktadır [49]. Tip 2 diyabet, metabolik sendrom ve kardiyovasküler rahatsızlıklar ortaya çıkma olasılığı hiperinsülineminin eşlik ettiği insülin direnci tablosunda artmaktadır[50].

Overlerdeki teka hücreleri normal koşullarda foliküllerin büyümesine destek olurken olgun oositlerin oluşumuna da yardımcı olmaktadır. Ancak bu hücreler PKOS'lu hastalarda insülinin uyarıcı etkisine karşı aşırı duyarlı olurlar ve normalden fazla çoğalarak yumurtalık hipertekozuna neden olurlar. İnsülin direncinin teka hücreleri üzerindeki bu etkisi androjenik potansiyeli artırır ve PKOS tablosunu şiddetlendirir [51].

PCOS teşhisi konmuş kadınların yaş grupları değiştikçe klinik belirtilerden bazıları daha az veya daha çok görünebilmektedir. Buna göre overyan disfonksiyon ve hiperandrojenizm gibi klinik belirtiler genç hasta gruplarında daha çok görünürken; metabolik bozuklukların (diyabet, hipertansiyon, dislipidemi vb.) yaşlı hasta gruplarında daha çok görüldüğü gözlemlenmiştir. Yine 20 yaşın üzerindeki hastalarda 20 yaş altındaki hastalara göre dolaşımdaki androjen hormonlarının belirgin derecede azaldığı görülmüştür [52]. Başka bir çalışmada ise 20'li yaşlarının başında PCOS teşhisi konmuş hastalar 20 yıl boyunca majör klinik belirtiler yönünden takip edilmiş ve yıllar içinde androjen seviyeleri ve over büyüklükleri azalırken bel çevre genişliklerinin arttığı görülmüştür [53].

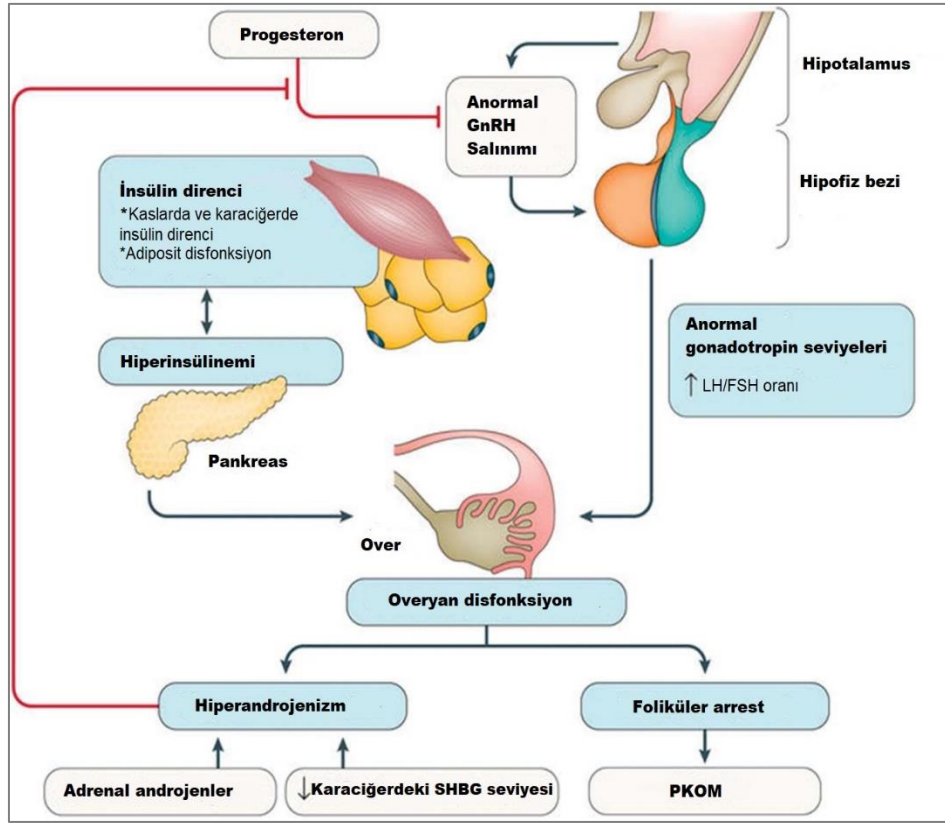
2.2.3. Patogenezi

Kadınlar ve erkeklerde üreme, hipotalamik hipofizer gonadal eksen (HPG) olarak adlandırılan nöroendokrin eksen tarafından yönlendirilir. Esas olarak hipotalamus ve hipofiz arasındaki etkileşimlerden oluşan HPG eksenini, üreme hücrelerinin büyümesini ve olgunlaşmasını erkek ve kadınlardaki gonadal steroidleri sentezleyerek düzenler. Hipotalamus tarafından salgılanan GnRH hipofize giderek buradan luteinize edici hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) salgılanmasını tetikler. Bu hormonlar da gonadal steroidlerin üretimini kontrol etmektedir [54].

HPO ise hipotalamik hipofizer overyan eksenidir ve dişilerdeki hipotalamik hipofizer gonadal (HPG) eksenini ifade eder. Androjen fazlalığı ve ovulasyon işlevinin bozukluğu gibi semptomlarla karakterize olan PKOS'un HPO aks işlevini bozduğu görülmüştür [55]. PKOS'lu hastalarda HPO aksı, hastaların LH ve FSH seviyelerinin yükselmesi bunun yanında LH:FSH oranının artmasıyla bozulmaktadır [56]. PKOS'lu olguların %75'inde LH'nin; %94'üneyse LH:FSH oranının yükseldiğı görülmüştür [57]. Normal şartlarda GnRH, LH ve FSH salınımı indükler. Teka hücrelerine etki eden LH buradan androstenedion salınımına neden olurken; FSH granüloza hücrelerini stimüle eder ve androstenediondan östron oluşumunu sağlar. Bu noktada LH:FSH oranının artması androstenedion ve östron üretiminin androstenedion lehine bozularak androjenik etkinin artmasına neden olmaktadır [58].

PKOS'lu hastalarda GnRH'nin pulsatil salınımının bozulmasıyla artan LH sekresyonu overyan disfonksiyona ve hiperandrojenizme sebep olmaktadır. LH'nin normal olmayan bu sekresyonunun ergenlik döneminde ortaya çıktığı ve progesteronun GnRH sekresyonunu engellemesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.2) [59].

Androjenler sağlıklı kadınlarda adrenal bezler ve overlerden eşit miktarda salgılanırken PKOS'lu kadınlarda androjen üretiminin primer kaynağının overler olduğu görülmüştür. Bu overlerde androstenedion yoluyla gerçekleşmektedir. Burada üretilen androstenedion daha sonra dolaşımda testosterona dönüşmektedir. Tıpkı insülin direncinin karaciğerde SHBG üretimini azalttığı gibi yüksek miktardaki androjenler de SHBG üretiminin azalmasına sebep olur, sonuç olarak serbest testosteron miktarı kanda artış gözlenir [49,58].



Şekil 2.2. Polikistik over sendromu patofizyolojisi [59]

PKOS'ta görülen semptomların tek bir nedene bağlı olmaması PKOS'un etiyolojisini de karmaşık hale getirmektedir [60]. Çoğu heterojen hastalıklarda olduğu gibi etiyolojisinde çevresel ve genetik faktörlerin bir arada olduğu düşünülmektedir [48,51,61–63]. Öyle ki PKOS'un gelişimde birden fazla gen ve çevresel faktörün olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. [17]. Bu durum bize PKOS gelişimde gen-çevre etkileşiminin önemini ve bireyin genotipinin çevresel koşullarla birleştiğinde sendromu ortaya çıkartabildiği düşündürmektedir.

2.2. Genetik faktörler

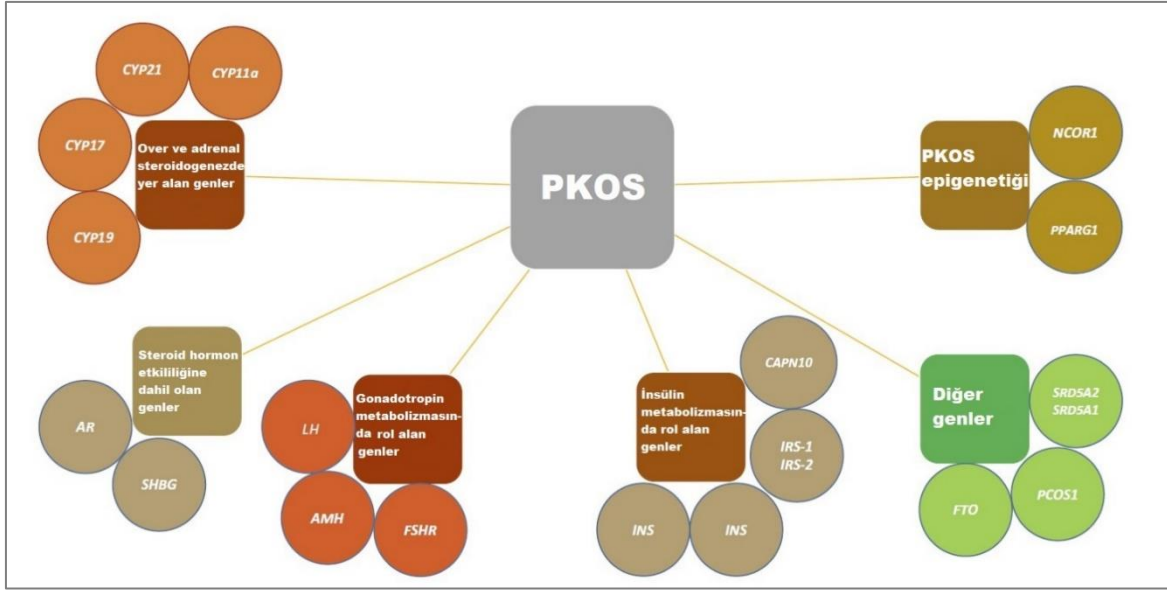
PKOS'un yaygın semptomlarından bazılarının ailesel kümelenme göstermesi PKOS'un genetik geçişli bir hastalık olduğu ihtimalini de beraberinde getirmiştir. Bununla ilgili literatürdeki ilk çalışmada oligomeneore, hirsütizm ve büyümüş overlere sahip kadınların kız kardeşlerinde de aynı semptomların kontrol grubundakilerinin kardeşlerine göre daha yaygın olduğunu görmüşlerdir [64]. Hague ve arkadaşları polikistik over morfolojisi olan PKOS'lu hastaların yakınlarını incelemiş ve %67'sinin annesinde, %87'sinin ise kız kardeşlerinde yine PKOS tespit etmiştir [65]. PKOS'ta kalıtım derecesini belirlemek

amacıyla büyük bir soyağacı veri tabanında analizler yapılmış ve PKOS popülasyonu arasındaki akrabalık derecesinin rastgele örneklem arasındaki ortalama akrabalık derecesinden 4 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir. Daha önce yapılan birçok çalışma ile beraber bu çalışma da PKOS'un ailesel bir hastalık olabileceğini göstermektedir [17].

PKOS gelişiminde aday genleri belirlemek amacıyla GWAS çalışmaları da yapılmıştır. Bugüne kadar çeşitli popülasyonlar üzerinde 6 GWAS çalışması yapılmış bu çalışmaların ikisi Han Çinlisi, ikisi Kore ve diğer ikisi de Avrupalı kadınlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda toplam 19 loci PKOS ile ilişkilendirilmiştir. 19 locinin 11'i Avrupa, Kore ve Han Çinlileri ırklarında ortaktır. Buna göre 11 aday gen belirmiştir. Bu 11 gen: DENND1A, ERBB4, KRR1, YAP1, C9orf3, RAB5B, THADA, FSHB, ARL14EP, NEIL2, GATA4'dür [66].

GWAS çalışmaları dışında PKOS patogenezi ile PKOS'un klinik ve biyoklinik tablosu da aday gen seçiminde belirleyici bir diğer yaklaşım olmuştur. Bu nedenle üreme sistemi, insülin metabolizması, enerji düzenlemesi, overleri doğrudan ya da dolaylı yoldan etkileyen tüm genler aday olarak değerlendirilerek bu genler üzerinde çalışmalara öncelik verilmiştir. [19] Overyan ve adrenal stereogenezisde rol oynayan genler (CYP21, CYP19, CYP17); steroid hormon etkililiğinde rol oynayan genler (Androjen Reseptör Geni-AR-, Seks Hormon Bağlayıcı Globulin Geni -SHBG-) ; gonadotropinin metabolizmasında rol oynayan genler (AMH, FSHR, LH), insülin metabolizmasında rol oynayan (INSR , IGF2 vd.) genlerin de PKOS'un gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmüş ve polimorfizm çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PKOS'un genetik tablosuna genel bir bakış şekil 2.3'te özetlenmiştir [38].

Özetle PKOS'un genetik temellerine ilişkin kanıtların çok geniş olduğu görülmektedir. Ancak bu kanıtlardan hiçbirisi PKOS patogenezi tek başına yorumlamak için yeterli değildir [17].



Şekil 2.3. PKOS'un olası genetik faktörlerine genel bir bakış [38].

2.2.1. CYP19 geni

CYP19 (sitokrom p450 19) geni 15.kromozomun uzun kolunda 15q21.2 lokasyonunda yer almaktadır [67]. Testosteron ve androstenedionun ayrı ayrı östradiol ve östrona dönüşümünü sağlayarak östrojen biyosentezinin son adımı katalizleyen p450 aromataz enzimini kodlar. Androjenlerin (C19 steroidleri) östrojenlere (C18 steroidleri) olan bu dönüşümü geri dönüşsüzdür [20]. CYP19 gen varyasyonlarının aromataz ekspresyonunu veya aktivitesini etkileyerek steroid hormon bozukluklarına yol açarak meme kanseri veya osteoporoz gibi bazı steroid hormonuna bağlı hastalıklara neden olabileceği düşünülmektedir [68]. Serum androjen seviyelerindeki farklılıkların CYP19 gen mutasyonlarından kaynaklandığına ilişkin yayınlar mevcuttur [69].

Hiperandrojenizm görülen bazı vakalarda hastaların aromataz enzim eksikliği tespit edilmesi ve CYP19 gen tek nokta mutasyonları (SNP) ile hiperandrojenizmin ilişkilendirildiği çalışmaların olması PKOS'un klinik/biyoklinik tablolarından biri olan hiperandrojenizme etkisi olabileceği düşünüldüğü için CYP19 geni üzerindeki mutasyonlar PKOS'la ilişkilendirilmiştir [18,20].

CYP19'un kodladığı aromataz enzimi plasenta ve over gibi östrojen sentezleyen hücrelerin endoplazmik retikulumunda temel olarak yerleşmiştir. Bunun yanında adipoz doku, karaciğer, kas ve saç folikülü gibi birçok dokuda da bulunmaktadır [70].

2.2.2. DENND1A geni

DENND1A (differentially expressed in normal and neoplastic cells domain) geni DENN domain proteinini kodlayan 18 genden biridir. 9. kromozomun 9q33.3 lokasyonunda bulunur. DENN domain proteini klatrin aracılı endositoz mekanizmasının bir bileşenidir ve endozomal membran trafiğinin düzenlenmesinde Rab35 için guanin nükleotit değişim faktörü olarak işlev görmektedir [71]. Bu protein over teka hücreleri ve sitoplazma içinde bulunur [72].

DENND1A'nın androjen üreten dokulardan olan over teka hücreleri ve adrenal zona retikularis'te yüksek oranda eksprese olduğu görülmüştür [73]. Yapılan başka bir çalışmada PKOS'lu ve normal adet döngüsüne sahip kadınlardan izole edilen teka hücrelerinden PKOS'lu kadınlarda artmış DENND1A ekspresyonu ve artmış androjen biyosentezi görülmüştür [74]. DENND1A rs10818854 gen polimorfizmi ile PKOS arasında anlamlı ilişkilerin bulunduğu çalışmalar Singapur, Çin gibi Asya ve Bahreyn Tunus gibi Arap ülkelerinde mevcuttur [71,75,76]. Ülkemizde bugüne kadar DENND1A genine ait polimorfizmlerin incelendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

2.2.3. Tek nükleotit polimorfizmleri

Tek nükleotit polimorfizmi (SNP) bireyler arasında bir DNA dizisindeki tek bir konumda meydana gelen varyasyondur. Bir popülasyonun %1'inden fazlası aynı nükleotidi DNA dizisindeki belirli bir konumda taşııyorsa, o zaman bu varyasyon SNP olarak sınıflandırılabilir. Bir gen içinde bir SNP meydana gelirse, o zaman gen birden fazla alele sahip olarak tanımlanır. Bu durumlarda, SNP'ler amino asit sekansında varyasyonlara yol açabilir. Ancak SNP'ler sadece genlerle ilişkili değildir; DNA'nın kodlamayan bölgelerinde de oluşabilirler. İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla birçok polimorfizm bulunmuştur. Bu polimorfizmler içinde en sık görüleni SNP'lerdir ki halka açık veri tabanında 9 milyondan fazla tek nükleotit polimorfizmi tanımlanmıştır [77].

2.3. Çevresel Faktörler

PKOS tablosunun oluşmasında genetik varyasyonların önemli bir katkısı olduğu yapılan çalışmalarla her ne kadar gösterilse de çevresel faktörler de PKOS oluşumuna büyük oranda

etki etmektedir. Bu çevresel faktörler, diyet ve beslenme, coğrafya, sosyoekonomik düzey ve çevresel toksinlere maruziyet olarak sınıflandırılabilir [78].

Çevresel toksinler, çevrede bulunan ve biyolojik organizmalar üzerinde olumsuz etkileri olan kimyasal kirleticiler olarak tanımlanmaktadır. İnsan sağlığı ve üreme üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu bilinen çevresel toksinler solunabilir, cilt ve mukoza zarlarından emilebilir veya yutulabilir. PKOS'ta çevresel maruziyetlerin ne zaman ortaya çıkacağı ve çeşitli aşamalarda maruz kalmanın bu hastalığın doğasını nasıl etkileyebileceği PKOS ile ilgili olası çevresel risk faktörlerini dikkate almak için önemlidir. Endokrin bozucular da PKOS tablosuna katkıda bulunan önde gelen çevresel toksinlerdendir [79].

2.3.1. Endokrin bozucular

İnsanlar da dahil olmak üzere çok hücreli organizmalar, hayatta kalmak, üremek ve büyümek amacıyla organizmalarının fizyolojik taleplerini karşılamak ve çevresel zorluklara karşı bir yanıt oluşturabilmek zorundadırlar. Bunun için ise dokular, organlar ve organ sistemleri arasında etkili bir koordinasyona sahip olmak gerekir. Endokrin sistem hormonlar aracılığıyla bu koordinasyonu sağlar[80]. Hormonlar, glikoprotein, peptit, steroid veya modifiye edilmiş aminoasitler şeklinde olabilirler ve biyolojik haberciler olarak vücudun diğer bölgelerindeki organları ve dokuları hedeflemek için kan ve lenfatik dolaşım sistemlerinde dolaşırlar. Hedef hücrelerdeki değişiklikleri reseptörler vasıtasıyla gerçekleştirirler [81]. Hormonlar bu işlevleri çok küçük dozlarda gerçekleştirdikleri için başta kimyasal maddeler olmak üzere dış kaynaklı maddeler hassas bir şekilde dengede olan bu sistem üzerine kantitatif olarak küçük ancak kalitatif olarak büyük biyolojik sonuçlar doğurabilirler. Endokrin sistemde bozukluklar hormonların aşırı üretiminden veya etkilerindeki azalmadan kaynaklanabilmektedir.

Endokrin Bozucu Kimyasallar (EBK), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “*Endokrin sistemin işlevini değiştirerek sağlıklı bir organizma veya onun gelecekteki nesil veya (alt) popülasyonunda olumsuz sağlık etkilerine neden olan eksojen madde veya madde karışımları*” olarak tanımlanmaktadır [82]. Daha önce insan vücudunda tespit edilmemiş eksojen kimyasallar insan vücudunda tespit edilip miktarları ölçüldükçe bu kimyasalların endokrin sistem, üreme sistemi, sinir sistemi ve nihayetinde karsinogenezis üzerindeki etkileriyle ilgili bilimsel yayınlarda da artış meydana gelmiştir. Bu durum hükümetlerin ve

bazı uluslararası organizasyonların dikkatini çekmiş ve 1996 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD), Avrupa Komisyonu'nun başı çektiği “*Endokrin Bozucuların insan sağlığı ve yaban hayata etkisi*” isimli bilimsel toplantıda EBK'lerin önemine uluslararası boyutta ilk kez değinilmiştir. Bu toplantıda insan vücudunda ölçülebilen 500'den fazla eksojen kimyasal olduğu, 1920'li yıllardan önce bu maddelerin insan vücudunda yer almadığı ve son 20 yıldır doğan bebeklerin fetüstayken bu kimyasal maruz kalabildikleri bildirilmiştir [83].

2018 yılında Lancet Kirlilik ve Sağlık Komisyonu hava, su ve toprağı kontamine eden kimyasallardan her yıl 9 milyon erken ölüm görüldüğünü, bu sayının düşük ve orta gelirli ülkelerde görülen tüberküloz, malarya gibi ölümlerin 3 katından fazla olduğunu hesaplamıştır [84].

EBK olarak sınıflandırılan bileşikler, kimyasal yapıları birbirinden farklı olan çokça geniş heterojen bir gruptur. Doğal ve antropojenik veya sentetik endokrin bozucu bileşikler olarak 2 ayrı gruba ayrılırlar: [85–90]

Doğal endokrin bozucular

- Fitoöstrojenler (kumestrol, genistein vd.)
- Mikoöstrojenler (Zeralenon vd.)

Sentetik endokrin bozucular

- Plastikleştiriciler (Bisfenol A, ftalatlar),
- Pestisitler (Klorpirifos, metoksiklor),
- Fungusitler (Vinklozolin),
- Farmasötik maddeler (Simetidin, Dietilstilbestrol)
- Endüstriyel yan ürünler (Perklorat, dioksin)

EBK'lere gündelik yaşantımızda tüketici ürünleri vasıtasıyla çokça maruz kalınabilmektedir. Bu maruziyet bilinçli ya da istemsiz bir şekilde olabilir. Tarım ilaçları, kişisel bakım ürünleri, tıbbi malzemeler, elektronik ve inşaat malzemeleri, gıda ambalaj

materyalleri, çocuk ürünleri, giyim ve kumaş işleme gibi çok geniş bir yelpazede EBK'ler karşımıza çıkar. (Çizelge 2.2)

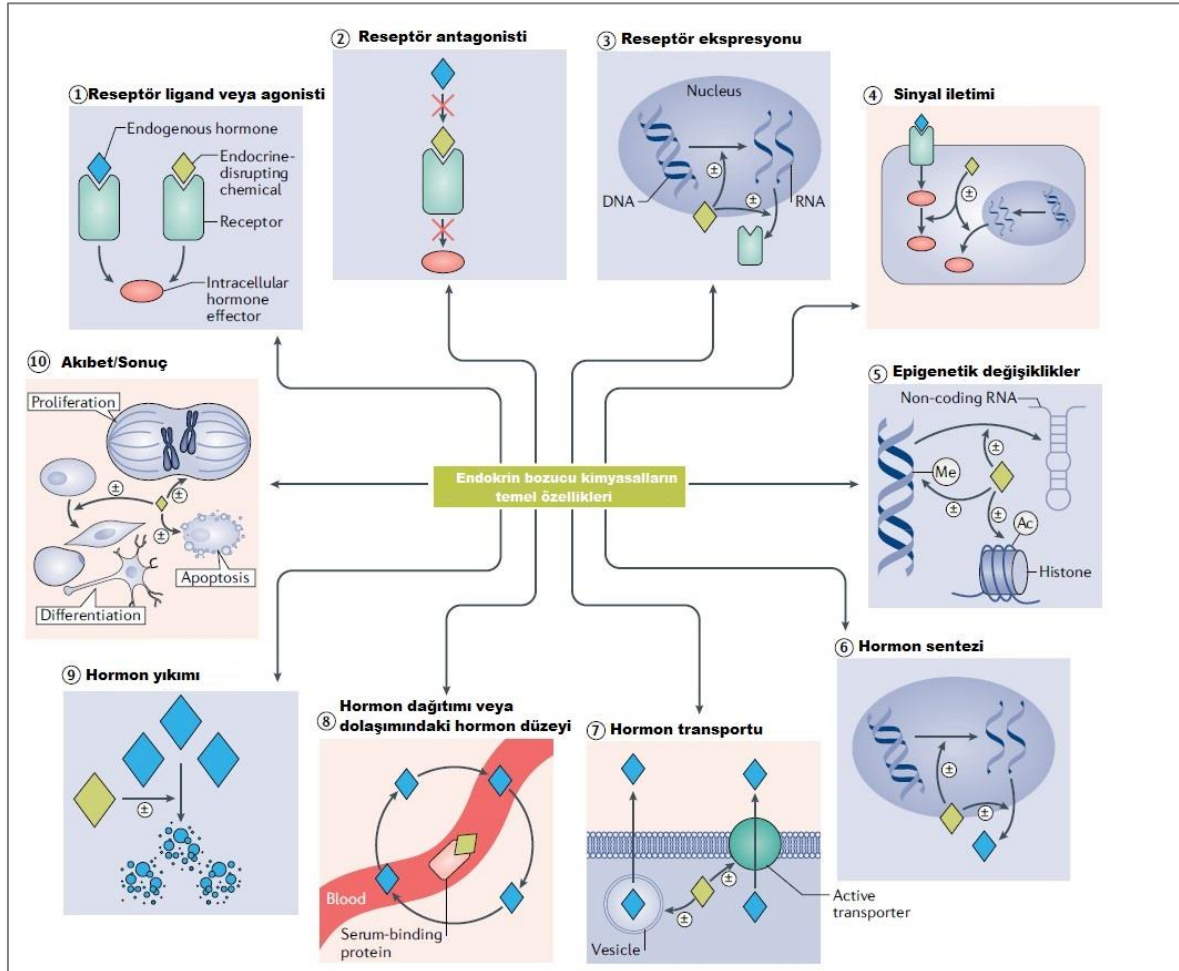
Çizelge 2.2. Bazı endokrin bozucu kimyasallar ve kullanım alanları [87]

Endokrin Bozucu Kimyasal	Kullanım Alanları
DDT, klorpirifos, atrazin	Pestisitler
Kurşun, ftalatlar, kadmiyum	Çocuk ürünleri - oyuncaklar
Bisfenoller, ftalatlar, perflorooktanoik asit türevleri	Gıda ambalajları
Triklosan	Antibakteriyel ürünler
Perflorooktanoik asit (PFOA) türevleri	Halı sanayi, yer kaplama ürünleri, teflon yanmaz tavalar/tencereler, tekstil
Alkilfenoller	Petrol ve metabolitlerini uzaklaştırmak için kullanılan deterjanların bazıları
Etinil estradiol	Kontraseptifler
Parabenler, ftalatlar, glikol eterler, kokular, siklosiloksanlar	Kozmetik, kişisel bakım ürünleri, ilaçlar, temizlik ürünleri

EBK'lerin mevcut zararlı etkisinin boyutu, EBK'e maruziyetin hayatın hangi döneminde olduğu ve/veya maruz kalınan süre ile de yakından ilişkilidir. Örneğin dioksin türevlerine anne karnında maruz kalmak veya doğum sonrasında maruz kalmak, ortaya çıkan sağlık etkileri yönünden farklılık yaratabilmektedir. Anne karnında maruziyet dış ve iç genital organ gelişimine olumsuz etkiler yaratırken, doğum sonrasındaki maruziyette bu tablolar ortaya çıkmayabilir. Diğer yandan EBK'e maruz kalınan süre ve maruziyet dozu da arttıkça organizmaya zararı şiddetlenmektedir. Maruziyet dozu aynı zamanda EBK'nin etki mekanizmasına da değiştirebilmektedir. Düşük dozda östrojen reseptörlerine bağlanarak antiöstrojenik etki gösteren bir EBK yüksek dozda androjen reseptörlerine bağlanarak antiandrojenik etki göstermektedir [89].

EBK'ler etki mekanizmaları incelendiğinde özellikle endojen hormonları taklit ederek etki ettikleri görülmektedir. Homeostaz, üreme, anne karnında gelişim gibi birçok hayati fonksiyonda nükleer reseptörler ile etkileşime girerler [91]. ER α , ER β ve androjen reseptörleri (AR) başta olmak üzere pregnan X reseptörü (PXR), tiroid hormon reseptörü (THR), retinoid X reseptörü (RXR) ve peroksizom proliferatör – aktive reseptör alfa ve gama (PPAR α ve PPAR γ), aril hidrokarbon reseptörü EBK'nin etkileşime girdiği nükleer reseptörlere örnektir. Membran östrojen reseptörleri, steroid olmayan nörotransmitter reseptörlerden serotonin, dopamin, norepinefrin reseptörleri de EBK'lerin etkileşime girdiği

yapılardır (de Coster ve van Larebeke, 2012; Balaguer vd., 2017). EBK'lerin etki mekanizmaları şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Endokrin bozucuların etki mekanizmaları [94]

EBK'lere olan kaygı dünya genelinde giderek artmaktadır. Bunun nedeni çok çeşitli sağlık etkileri oluşturmalarıdır ki bu sağlık etkilerinin başında üreme sağlığına yönelik etkiler gelmektedir. Maruziyetin olası sonuçları da hayvanlarda gösterilmiştir. Ayrıca bazı insan maruziyetleri sonucunda meme-prostat kanserleri (BPA), endometriyozis (Dioksin, PCBler), infertilite (fitalatlar, östrojenler, pestisitler), diyabet/metabolik sendrom (BPA), erken ergenlik (östrojenler, BPA), obezite (BPA, tributil kalay, organik klorlu pestisitler) gibi üreme ve hormon hastalıklarına neden olduklarına ait bilgiler gün geçtikçe artmaktadır. Diğer yandan beyin/sinir sistemi üzerine olan olumsuz etkileri sonucunda parkinson hastalığı (pestisitler), ADHD/öğrenme bozukluklarının gelişimine (PCBler, organik klorlu pestisitler) katkıda bulundukları artık bilimsel kanıtlarla ortaya konulmaya başlanmıştır[95]

Endokrin bozucu kimyasallardan olan BPA'nın PKOS patogenezi üzerine olan etkisi hakkındaki çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. BPA'nın insülin sinyali, yağ metabolizması, overlerdeki steroidogenez ve HPO aksı üzerindeki etkilerinin gerek hayvan modelleri gerek de in vitro insan hücre hattındaki çalışmalarla gözlenmesi PKOS için olası risk faktörlerden biri olmasına neden olmuştur. BPA'nın 17- β estradiol aktivitesini taklit etmesi, HPO aksındaki steroid feedback mekanizmalarını ve overlerdeki steroid etkisini bozması genel olarak HPO eksen fonksiyonlarını baskılamasına neden olmaktadır. Ayrıca dolaşımdaki LH seviyesini artırmakta ve LH:FSH oranını bozmaktadır. Testosteron hidroksilaz üzerindeki inhibitör etki de BPA'nın androjen seviyelerini de artırma potansiyeli olduğunu göstermektedir. Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde BPA, PKOS patogenezi için önemli bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir [96,97].

Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) ilk olarak 1981 yılında Rus Kimyager Alexandr P. Dianin tarafından sentezlenen, epoksi reçineler ve polikarbonatların üretimleri başta olmak üzere birçok farklı endüstriyel alanda kullanılan sentetik bir kimyasaldır [98]. Polikarbonat ve epoksi reçine bazlı ürünlerin üretimlerinin yıllar içinde artması BPA'nın üretimini ve insan maruziyetini de artırmıştır [99]. Öyle ki 2010-2016 yılları arasında üretimi 8 milyon metrik tona dayanmıştır. 2022 yılının sonuna doğru ise bu değerin 10,2 milyon metrik tona ulaşması tahmin edilmektedir [100].

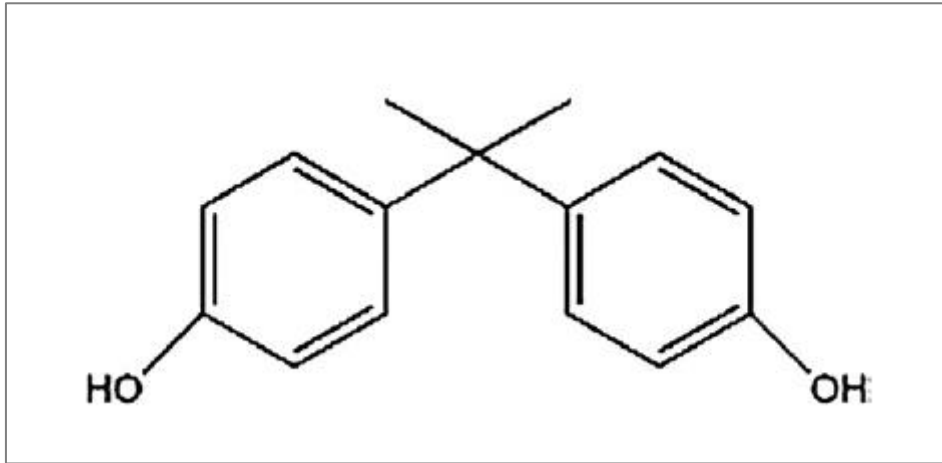
Başta ısı ve asidik-bazik koşullar BPA monomerlerini bağlayan ester bağının hidrolizini hızlandırarak günlük hayatta yoğun olarak kullanılan polikarbonat ve epoksi reçineler gibi ürünlerden BPA salınımını hızlanma böylece BPA'nın insan ve çevre maruziyetinin potansiyeli de artmaktadır. Yüksek hacimli üretimler de BPA'nın insan ve çevre sağlığı ile ilgili endişeleri de beraberinde getirmektedir [101].

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK) Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından “üremenin, gelişimin, homeostazın ve/veya davranışın korunmasından sorumlu vücuttaki hormonların sentezine, salgılanmasına, taşınmasına, bağlanmasına veya elimine edilmesine müdahale eden bir ajan” olarak nitelendirilmiştir [102]. BPA'nın dietilstilbestrol (DES) ve östradiol ile benzer yapıda olması nedeniyle östrojen reseptörlerine

bağlanabilmesi, östrojen benzeri yanıt oluşturmaları BPA'nın EBK olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur [100].

Yapısı

BPA hidrojen klorür gibi güçlü bir asidik katalizör varlığında 2 mol fenolün 1 mol aseton ile yoğunlaştırılması sonucu sentezlenmektedir. BPA'nın moleküler yapısında merkezde tetrahedral karbon atomu bulunur ve bu karbon atomuna 2 metil ve 2 fenol grup bağlıdır (Şekil 2.5) [103]. Organik çözücülerde tamamen çözülürken suda az miktarda çözünür. Oda sıcaklığında beyaz renkte, katı pul veya kristal formda bulunur. Fenolik kokuya sahiptir[98].



Şekil 2.5. Bisfenol A (BPA) kimyasal yapısı [103]

BPA'nın yarı ömrü (4-8 saat), DDT, Mireks, heptaklor, toksafen vb. gibi kalıcı organik kirleticilere (KOK) göre düşüktür [104]. Çevrede ve canlı organizmalarda yıkıma daha kolay maruz kalabildiği için insan ve yaban hayatta biyoakümülyasyon göstermezler. Esas endişe konusu durum ise BPA'ya olan maruziyetin sürekli olmasıdır. Yarı ömürleri kısa olsa dahi çevreye salınımın sürekliliği yarı ömürler bu bileşikler için esasen “kalıcı” kirleticiler yapmaktadır [105,106].

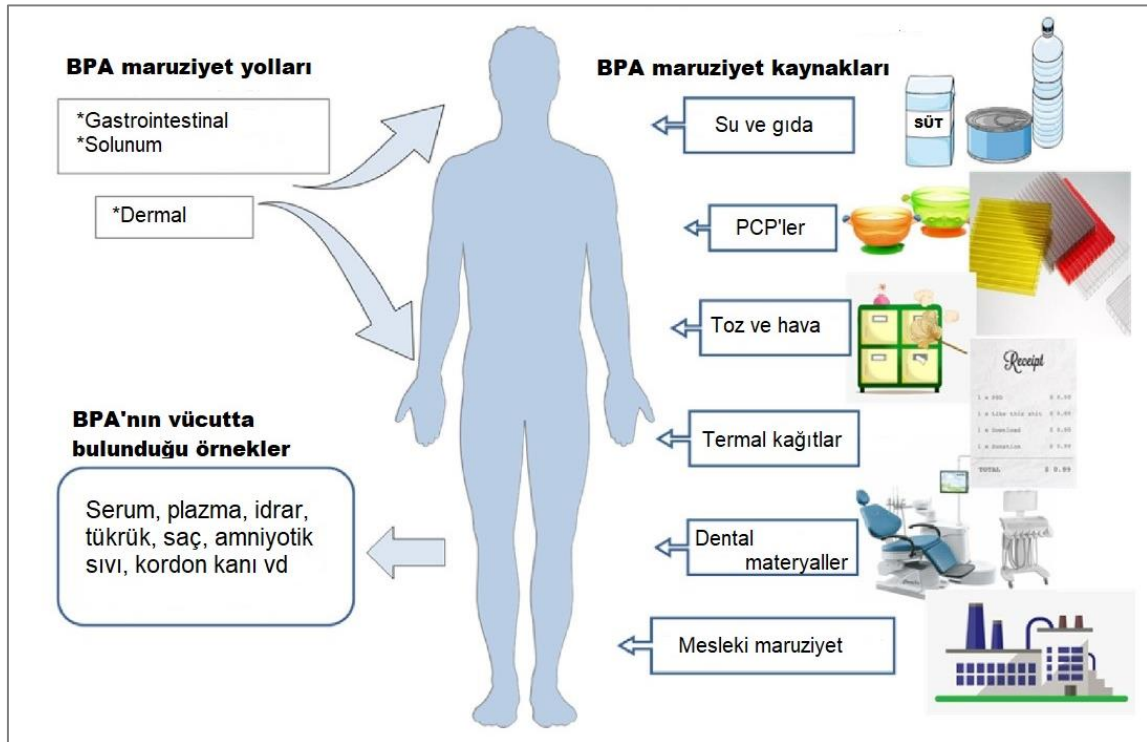
Kullanım Alanları

1953 yılında Daniel Fox ve Hermann Schnell, BPA'nın polikarbonat ve fosgen arasında polimerizasyon sağlama (çapraz bağlar oluşturma) yeteneğini keşfetmişlerdir. Bunun ardından BPA'nın endüstriyel kullanımı artış göstermiş; ABD'de 1957 onu takiben 1958

yılında Avrupa’da polikarbonatların üretiminde kullanılmaya başlanmıştır [107]. BPA fenol reçineleri, poliakrilatlar ve poliesterler gibi malzemelerin üretimi için de kullanılır ancak çoğunluk polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin üretimindedir [99]. Üretilen BPA’nın endüstriyel olarak kullanım oranlarına bakıldığında %65’i polikarbonat üretiminde, %28’i epoksi ve diğer reçinelerin üretiminde, %7 civarında ise alev geciktiricilerin üretiminde kullanılır [100].

Polikarbonatlar, termoplastik polimer yapısındadır ve günlük yaşantımızdaki birçok ürünün yapısına girerler. Bebek biberonları, su şişeleri ve medikal cihazlar bunlara örnekler. PVC’ler, kompakt disk (CD), termal kağıtlar, süt ve su şişeleri ile kola ve bira kutularının iç yüzeylerinin kaplandığı plastik filmler ve bebek biberonları da BPA’nın kullanıldığı ve günlük hayatımızda sıkça karşılaştığımız ürünlerdir [107]. BPA maruziyet kaynakları, maruziyet yollarına ait özet şekil 2.6’da gösterilmiştir.

Gıda maddelerinin saklandığı metal kaplarda ince bir film halinde metal yüzeylerde kullanılarak metalin gıda maddesiyle etkileşiminin önlenmesinde kullanılmaktadır. Bazı dental kompozitlerde ve dolgu malzemelerinde, alev geciktiricilerin ve bazı fungusit, pestisitlerin yapısında BPA bulunmaktadır [108].



Şekil 2.6. BPA maruziyet yolları ve maruziyet kaynakları [109]

Toksisitesi

BPA'nın üretimin artması ve kullanımının da bu paralelde yaygınlaşması doğa ve insanlar için olası sağlık endişelerini de beraberinde getirerek toksisite çalışmalarının yaygınlaşmasına neden olmuştur. Yapılan biyolojik izlem çalışmalarında BPA'nın insanda kan, idrar, tükürük, anne sütünde bulunabildiği görülmüştür [110]. BPA'nın çeşitli biyolojik reseptörlerle (östrojen reseptörü, androjen reseptörü ve tiroid hormon reseptörü) etkileşerek endokrin bozucu etkilerini gösterdiği düşünülmektedir. Bu etkilerin nihayetinde üreme sistemi, sinir sistemi, bağışıklık sistemi ve metabolik fonksiyonlarda; yenidoğan ve çocukların büyüme-gelişme sürecinde olumsuz sağlık sonuçları oluşabilmektedir [109].

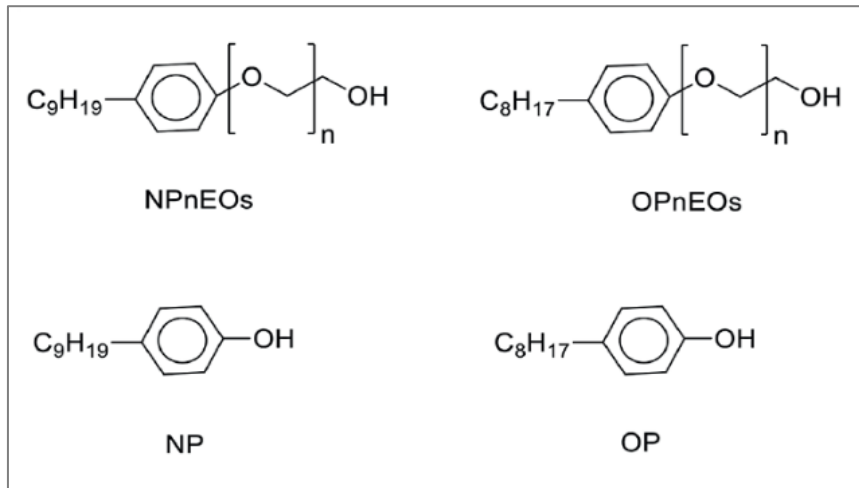
BPA'nın da içinde bulunduğu alkilfenolik bileşikler fenolik halka ihtiva etmektedir. Buradaki fenolik halka halojen içermemektedir. BPA östrojenik etkisini nükleer reseptör ailesinden östrojen reseptör α (ER α) ve östrojen reseptör β (ER β) e bağlanarak göstermektedir [111]. Ayrıca yine östrojenik reseptör ailesinden GPER (G-protein-coupled estrogen receptor) reseptörlerine bağlandığını gösteren çalışmalar vardır [112].

BPA'nın toksisitesini yalnızca 17- β estradiol'e benzeyen yapısı nedeniyle endokrin bozucu olarak göstermediği; genetik, epigenetik, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon ile hücre sinyal iletimi üzerinde de toksik etkiler oluşturabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. BPA'nın kromozomal aberasyonlar ve DNA hasarı gibi mekanizmalar ile genetik; metilasyon ve histon metiltransferaz miktarının artırması ile epigenetik; doğrudan veya dolaylı yollarla oksidatif homeostazi bozarak mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres; hücre içi kalsiyum miktarının artırılması gibi mekanizmalarla da hücre sinyal yollarına müdahil olduğu ve bir çok metabolik rahatsızlık, kanser gibi hastalıkların oluşumuna katkıda bulunabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [113].

Alkilfenol etoksilatlar (APEs)

Yüzey aktif maddeler temizleme ve çözündürme özellikleriyle bilinen bir grup kimyasal maddelerdir. Kimyasal yapıları polar bir baş kısım ve nonpolar kuyruk kısmından ibarettir. Polar baş kısım suda iyi çözünürken nonpolar kuyruk kısım suda iyi çözünmez. Bu nedenle sürfaktan olarak da isimlendirilen yüzey aktif maddeler aynı molekül bünyesinde hem polar hem de nonpolar grupları ihtiva eder [114].

Süfaktanların hidrofobik olan nonpolar kısımları da katyonik, iyonik olmayan ve/veya anyonik bileşikler olarak sınıflandırılabilirler. Bunlar arasında iyonik olmayan alkilfenol etoksilatlar (APE) da yüzey aktif maddelerin en çok kullanılan sınıflarından biridir. APE'ler içinde nonilfenol etoksilatlar (NPE) ve oktilfenol etoksilat (OPE) en çok üretilen APE'lerdir. Sırasıyla %80 ve %20 üretim oranlarıyla NPE ve OPE'lar toplam APE üretimini oluştururlar [115]. NPE ve OPE'lerin kimyasal yapıları Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Nonilfenol epoksilat (NPE), Oktilfenol epoksilat (OPE), Nonilfenol (NP) ve Oktilfenol (OP)'un kimyasal yapıları [115]

Alkilfenoller (AP) ekonomik olarak yüksek öneme sahiptirler. Kişisel bakım ürünlerinde, ev temizliğinde kullanılan deterjanlarda, boya, tekstil, polimer ve pestisit formülasyonlarında, selüloz kâğıt endüstrisinde çokça kullanılırlar [114].

APE'lerin kararlı bozunma ürünleri olan nonilfenol (NP) ve oktilfenol (OP) gibi AP'ler hakkındaki endişeler, bu kimyasalların birçok organizmada ilgili reseptörlere bağlanmada östrojenle rekabet etmesinin hormonal sistem üzerindeki etkileri nedeniyle endokrin bozucu kimyasal (EBK) olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur [76].

Nonilfenoller (NP)

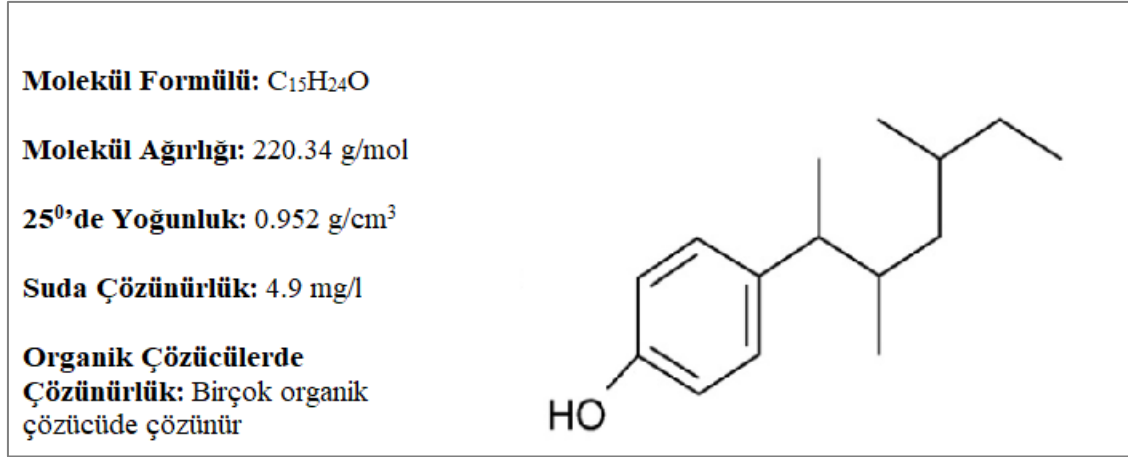
1940 yılında ilk kez sentezlenen NP, sentezlendiği günden beri kullanımı ve üretimi artan bir kimyasaldır. Ksenobiyotik bileşik olan NP, %65 oranında NPE üretiminde kullanırken; motor yağ katkı maddesi ve antioksidan üretiminde de kullanılır [116]. NP'ler ayrıca pestisitler, bulaşık ve çamaşır deterjanlarının yapısında da bulunur. Yaygın kullanımı

nedeniyle toprakta, yeraltı ve yerüstü sularında, besinlerde NP varlığı karşımıza çıkar [117]. Nonilfenol bir fenol halkası ve bunun üzerinde para pozisyonda yer alan 9 karbon uzunluğunda zincir ihtiva eden. (Şekil 2.8) NP, normal koşullar altında viskoz sıvı formundadır ve açık soluk renktedir. Suyla karışmaz. Asidik koşullarda fenolün alkillenmesiyle üretilir [116].

NP'nin sağlık üzerine birçok olumsuz etkisi vardır. Meme tümörü hücre proliferasyonunu indükleyebildiği gözlemlenmiştir [116]. Bunu, meme tümörü gelişiminde rol oynayan MCF-7 hücrelerini aktive ve hücre proliferasyonunu indükleyerek gösterdiği düşünülmektedir [118]. Düşük doz NP'nin dişi ratlarda meme hücresi proliferasyonunu kontrol grubuna göre %200 artırdığı görülmüştür [119].

NP canlı organizmada östrojen benzeri davranış sergiler [120]. NP'nin östrojen benzeri etki göstermesi in vitro ve in vivo çalışmalarla ortaya konmuştur[121] . Östrojen benzeri etkisini 17 β - östradiol'e benzeyen yapısı nedeniyle östrojen reseptörlerine bağlanmak için bu hormonları taklit etmesiyle gösterir [122–124].

2014 yılında Tayvan'da hamilelerde yapılan bir çalışmada NP maruziyeti ile serum LH seviyesi arasında ters orantı olduğu görülmüştür. Bu durumda NP'nin östrojen benzeri etkisinin hamilelik sırasında LH üzerinde negatif feedback etkisi oluşturabileceği düşünülmüştür. Gebeliğin birinci trimesterindeki östrojen seviyesi ile düşük doğum ağırlığı ve erken doğum arasında artan bir risk vardır. NP, östrojeni taklit ettiği için gebelikteki NP maruziyeti erken doğum, düşük doğum ağırlığı gibi risklerle ilişkilendirilmektedir [125]. NP'nin sıçanlarda testosteron salınımını stimüle ettiği görülmüş bunu steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) seviyeleri ve aktiviteleri üzerindeki etkileri vasıtasıyla gerçekleştirdiği düşünülmüştür [126].



Şekil 2.8. Nonylphenolün (NP) kimyasal yapısı ve bazı fizikokimyasal özellikleri [116]

1983 yılında İsviçre'den Giger ve arkadaşları NPE ve bozunma ürünlerinin sucul yaşam için öncüllerinden daha toksik olduğunu belirtmiştir [116]. NP'ler doğrudan doğaya deşarjlarından ziyade, NPE'lerin biyolojik olarak kısmi bozunmasıyla bulunur. Doğada sediment, su, çamur ve toprakta sıklıkla tespit edilmektedirler. 1999 ve 2000 yıllarında ABD'de yapılan bir araştırmada da 30 eyalette 139 nehirde %50.6'lık tespit sıklığı; sırasıyla 0.8 ve 40 µg/l'lik ortalama ve maksimum konsantrasyonlarıyla bulunmuşlardır [127].

Oktilfenoller (OP)

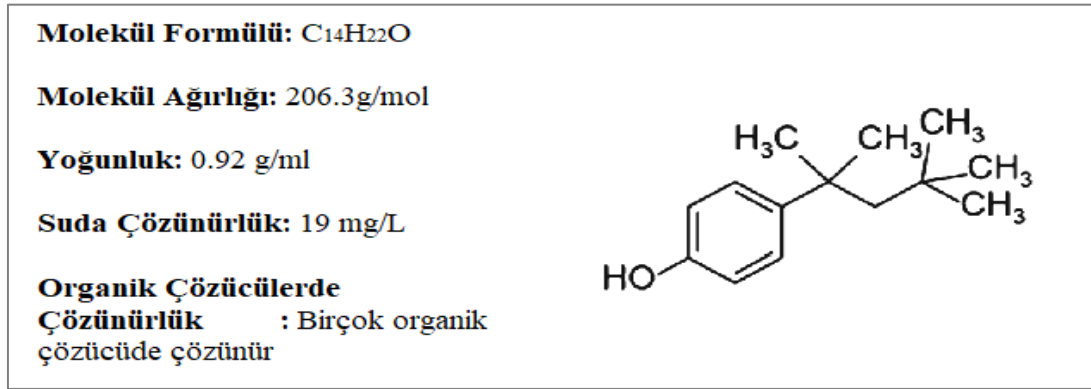
Oktilfenoller (OP), iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden alkilfenol etoksilatların (AEO) parçalanmalarından kaynaklanan bir diğer yüksek hacimli bozunma ürünüdür [128]. NP'ler, yaklaşık %80 oranıyla alkilfenoletoksilatların majör bozunma ürünüyken; OP'ler minör düzeyde bozunma ürünüdür [115]. OP'nin moleküler yapısı ve bazı fizikokimyasal özellikleri şekil 2.9'da gösterilmiştir [128].

OP'ler de tıpkı NP'ler gibi organizmada östrojen benzeri etki gösterir, öyle ki östrojen reseptörlerine bağlanarak hormonal sistem üzerinde olumsuz etki yaratırlar. [129] In-vitro çalışmalarla da OP'nin östrojenik ve antiandrojenik etkileri gösterilmiştir. [130] OP'e maruziyet erkeklerde kısırlığa sebep olabilmektedir. [129] OP'e maruz bırakılan erkek sıçanların sperm sayılarının düştüğü, sperm anormalliklerinin de arttığı görülmüştür [131].

OP'nin plasenta hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu, ayrıca düşük dozlarda maruziyetin aromataz aktivitesini artırdığı, yüksek dozlarda maruziyette ise dramatik bir

biçimde aromataz aktivitesinin azaldığı JEG-3 hücre kültürü çalışmalarında gözlemlenmiştir [132]. OP'e yüksek dozlarda maruz bırakılan anne ratların yavruları takip edilmiş, dişi ve erkek yavruların yetişkinlikte dalak ve karaciğerler dokularında olumsuz etkilerin oluştuğu görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada OP maruziyetinin dalakta artan yıkım ile kırmızı kan hücresi sayısında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [133].

Oktilfenoller, alkilfenoletoksilatlar içerisinde en yüksek östrojenik etkiye sahip olanıdır ayrıca bazı in vitro çalışmalarla östrojen reseptörlerine bağlandığı ve östrojene duyarlı genleri aktive ettiği gösterilmiştir [129,134].



Şekil 2.9. Oktilfenolün molekül yapısı ve bazı fizikokimyasal özellikleri [128]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma grubu seçimi ve biyolojik örnek toplama

Tez çalışmamız popülasyon temelli vaka-kontrol çalışması olarak planlanmıştır. Bu kapsamda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinoloji Anabilim Dalına başvurmuş ve PKOS teşhisi konmuş ergen kızlardan rutin analizlerde alınan biyolojik numunelerine ek olarak 5-10 ml venöz kan ile 150- 250 ml idrar numunesi alınmıştır. Bununla birlikte aynı bölüme başvurmuş ve PKOS saptanmayan gönüllülerden de yine rutin analizlerde alınan biyolojik numunelerine ek olarak 5-10 ml venöz kan ile 150- 250 ml idrar numunesi alınmış ve çalışmamızın kontrol grubu bu gönüllülerden oluşturulmuştur.

Araştırma kapsamındaki gönüllüler aşağıdaki kriterlere göre çalışmaya dahil edilmiş ve/veya hariç bırakılmıştır:

Vaka ve kontrol grubu dahil edilme kriterleri:

- Onam (rıza) veren bireyler
- PKOS gözlenen ergen kızlar (2005 Androjen Excess Society Teşhis Kriterleri çerçevesinde teşhis edilmiştir.)
- PKOS gözlenmeyen sağlıklı ergen kızlar

Vaka ve kontrol grubu dışlama kriterleri

- Gönüllünün çalışmaya katılmak istememesi
- Gönüllünün kronik bir hastalığının olması
- PKOS dışındaki hiperandrojenizm ilişkili hastalık teşhisi olan hastalar (hiperlaktone, Cushing sendromu, klasik olmayan konjenital adrenal hipeplazi vb.)

Yukardaki kriterlere göre çalışmamıza 102 PKOS hastası gönüllü ve 120 PKOS yönünden sağlıklı olan kontrol grubu gönüllüleri olmak üzere toplam 222 gönüllü katılmıştır. (Çizelge 3.1) Gönüllülerden alınan kan numuneleri EDTA'lı tüplere; idrar numuneleri ise BPA, OP ve NP içermeyen vida kapaklı 125 ml'lik cam kaplarda çalışma yapılana kadar saklanmıştır.

Saklama koşulları kan numuneleri için -80°C ; idrar numuneleri için -20°C olarak belirlenmiştir.

Ankara’da bulunan Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 05.11.2014 tarih ve 2014-10/119 karar nolu izin ile çalışmanın etik kurul izni alınmıştır (Ek:1). Gönüllüler grubu çocuklardan oluştuğu için ebeveynlere yönelik Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF) hazırlanmış (Ek:2) ve yüzyüze görüşülerek çalışma anlatılarak rızalar yazılı olarak alınmıştır.

Çalışmamız sırasında gönüllülere yönelik ayrıca anket hazırlanmış ve bu anketteki sorulara yanıt verilmesi istenmiştir (Ek:3). Ankette çalışmamız kapsamında incelenen çevresel maruziyet kimyasalları BPA, OP ve NP’nin gönüllülerin gündelik hayatındaki olası maruziyet etmenlerine yönelik yaşam tarzı ve bazı alışkanlıkları sorgulanmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmaya katılan gönüllülere ait yaş, VKİ bilgileri

	Kontrol (n=120)	PKOS (n=102)	p-değeri
Yaş (yıl)	15,0 (14,6-17,0)	16,0 (15,0-17,0)	0,066
VKİ (kg/m^2)	23,4 (20,7-26,7)	24,6 (21,1-28,4)	0,084
VKİ ≥ 25 (kg/m^2)	43 (%35,8)	48 (%47,1)	0,090

Kullanılan ekipmanlar ve sarf malzemeler

- Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (LC/MS-MS) Cihazı (Agilent 1200/6460)
- LC/MS-MS kolonu (Agilent SB-C18, 3x50 mm)
- LC/MS-MS kolonu (Agilent PFP, 100x30 mm)
- Nanodrop spektrofotometre (ND-1000 Spectrophotometer)
- RT-PCR cihazı (Roche® Lightcycler 480)
- Hot block (Techne Dri-block DB2A)
- 0,2-2 μL , 1-10 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL pipet uçları (Eppendorf®)
- DNAaz RNAaz free ependorflar
- EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) ’lı steril kan toplama tüpü (Vacutest)
- Teflon kapaklı cam idrar kabı (Japonya)

- Mikrosantrifüj cihazı (Hettich Zentrifugen® Micro120)
- Polipropilen repeator pipet ucu
- Balonjoje (100cc)
- -20°C Derin Dondurucu (No Frost, Beko)
- Buzdolabı (Vestel)
- Santrifüj (Hettich Universal 320)
- pH metre (Thermo, Orion 3 star)
- Vorteks (Heidolph)
- Mini santrifüj cihazı (Thermo Scientific® mySPIN12)
- Manyetik karıştırıcı (Wisd Wisestir MSH 320)
- Distile Su Cihazı
- Teflon Kapaklı Cam İdrar Kabı
- Vial (0,5-1,0-1,5 ml hazneli)
- Repeater pipet (10-100-1000µl'lik)
- Kapaklı cam deney tüpü
- Elektronik Hassas Terazi (Mettler Toledo)
- Vial kapağı
- Kurutma kağıdı

Kullanılan kimyasallar

- DNA izolasyon kiti (Roche)
- SNP primerleri (Roche)
- Roche® Lightcycler Faststart DNA master (Roche)
- Moleküler biyolojik steril su (Nzytech)
- Sodyum perklorat monohidrat (Merck)
- Tris (Bioshop Kanada)
- Sukroz (Merck)
- Magnezyum klorür (Merck)
- Sodyum Klorür (Merck)
- Triton X-100 (Merck)
- Sodyum dodesil sülfat (Merck)
- Sodyum perklorat (Sigma)

- Kloroform (Merck)
- Sodyum hipoklorit (Tekkim)
- EDTA (Bioshop Kanada)
- Hidroklorik asit (Merck)
- Metanol (Merck)
- Çinkosülfat Heptahidrat (Merck)
- Amonyum Asetat (J.T.Baker)
- β -Glukuronidaz/Sulfataz (Sigma-Aldrich)
- Bisfenol A (Sigma-Aldrich)
- 4-tert-Octylphenol (Sigma-Aldrich)
- 4-n-Nonylphenol (Sigma-Aldrich)
- $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA (Cruz Biotechnology)
- 4-tert-Octylphenol- $^{13}\text{C}_6$ (Cruz Biotechnology)
- 4-n-Nonylphenol- $^{13}\text{C}_6$ (Cruz Biotechnology)
- Kreatinin (Sigma-Aldrich)
- Kreatinin-d3 (Sigma-Aldrich)

3.1.2. İdrar örneklerinde bisfenol A, oktilfenol ve nonilfenol tayini

Yöntem

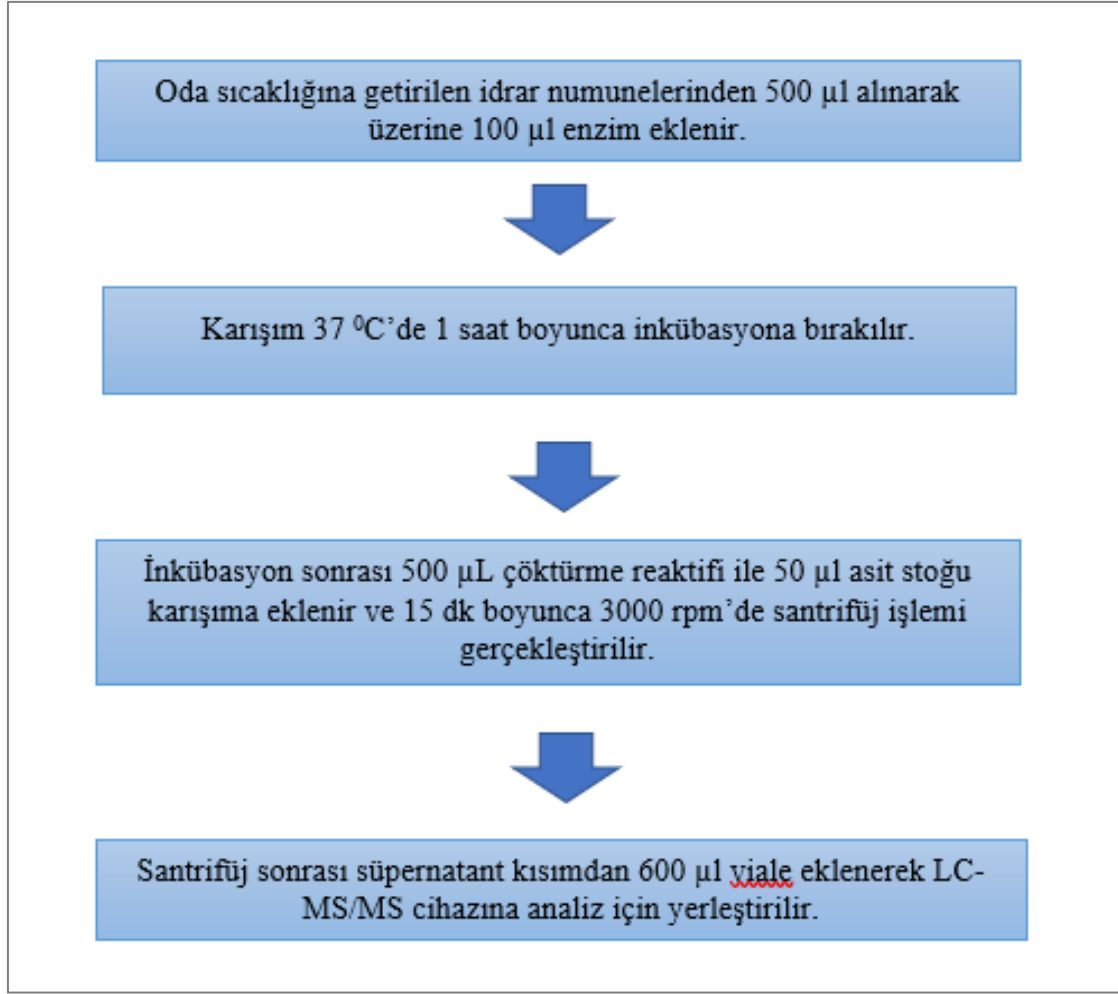
BPA, OP ve NP kimyasalları organizmada değişen oranlarda metabolize edilirler ve bu şekilde organizmadan uzaklaştırılırlar. İnceleyeceğimiz idrar numunelerinde de söz konusu bileşikler hem serbest hem de konjugatları şeklinde bulunmaktadır. Çalışmamız, BPA, OP ve NP'in serbest formlarının ölçüm esasına dayanmaktadır. Bu nedenle idrar numuneleri analiz için hazırlanırken enzim kullanılarak (β -glukuronidaz-sülfataz) konjuge formlar serbest forma dönüştürülmüştür. Diğer yandan idrar numuneleri spot idrar olarak toplanmıştır. 24 saatlik BPA, OP ve NP atılımını hesaplayabilmek ve atılımdan kaynaklanabilecek değişiklikleri/hataları düzeltmek için böbrek atılımını hesaplamak gerekmektedir. Bu nedenle idrar numunelerinde kreatinin ölçümü de gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için ölçümü yapılan BPA, OP ve NP değerleri kreatinin miktarları ile aynı birime çevrilerek bölünmüş ve “ $\mu\text{g/g}$ kreatinin” olarak sonuçlarımız gösterilmiştir. Çalışmamızda

idrar örneklerinden izolasyon ve miktar tayininde Battal ve ark. (2021) geliştirdiği yöntemden faydalanılmıştır [135].

BPA, OP ve NP tayini için biyolojik örneklerin hazırlanması

Analiz için öncelikle -20°C 'de bekletilen idrar numuneleri oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı. Oda sıcaklığına getirilen numunelere β -glukuronidaz-sülfataz enzimi eklendi ve 37°C 'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında içinde standartlar da bulunan çöktürme reaktifi ve asit stoğu numunelere eklenerek 15 dk boyunca 3000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım viallere alınarak analiz için sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi cihazına (LC-MS/MS) yerleştirildi. (Şekil 3.1)

İdrar numuneleri LC-MS/MS için hazır hale getirilmeden önce çöktürme reaktifi ve asit stoğu hazırlandı. Çöktürme reaktifi, 3 g çinkosülfatheptahidrata 70 ml metanol, 30 ml distile su ve iç standartlar (100 ppm'lik $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA'dan 100 μl , 10 ppm'lik 4-n-Nonylphenol- $^{13}\text{C}_6$ den 1000 μl , 100 ppm'lik 4-tert-Octylphenol- $^{13}\text{C}_6$ den 100 μl) eklenerek; asit stoğu ise 10 ml distile suya 600 μl formik asit eklenerek hazırlandı.



Şekil 3.1. Biyolojik örneklerin hazırlanması

BPA, OP ve NP tayini için LC/MS-MS çalışma koşulları

İdrar örneklerinde BPA, OP ve NP tayinleri biyolojik örneklerde madde miktarı tayininde hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olan sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi cihazı (LC-MS/MS) ile yapılmıştır. LC-MS/MS analizleri için Mersin Üniversitesi merkez laboratuvarında bulunan LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır. Toplanan idrar numuneleri soğuk zincir ile Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesine iletilmiştir.

Analizde Pursit 3 PFP (100X3.0 mm) Agilent marka kolon kullanılmıştır. Mobil faz A 2 mM amonyum asetat içeren su; mobil faz B metanol şeklinde kullanılmıştır. Çalışmada MS/MS, elektrosprey (ESI) negatif iyon çoğaltıcı reaksiyon görüntüleme modunda (multiple reaction monitoring, MRM) çalıştırılmıştır. (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. LC-MS/MS çalışma parametreleri

Kolon	Pursit 3 PFP (100X3.0 MM) Agilent
Mobil Faz A	2 mM Amonyum Asetat içeren su
Mobil Faz B	Metanol
Akış Hızı	700µL/dk
Sheat gas (N2, %99.995) sıcaklığı	350 °C
Auxiliary gas (N2, %99.995) sıcaklığı	300 °C
Kapiller voltaj	2250 V, negatif
Nozzle voltaj	300 V, negatif
Kolon sıcaklığı	20 °C
İnternal standart 1	¹³ C ₁₂ -BPA
İnternal standart 2	4-n-Nonylphenol- ¹³ C ₆
İnternal standart 3	4-tert-Octylphenol- ¹³ C ₆

Kreatinin analizi için biyolojik örnek hazırlama

Spot idrar numunelerinde kreatinin miktarını ölçmek amacıyla biyolojik örnekler hazırlanmıştır. Bunun için oda sıcaklığında getirilen idrar numunelerinden 100 µl alınarak cam tüpe konulmuş ve distile su ile 1000 µl'e tamamlanmıştır. 1:10 oranına seyreltilen bu karışımdan 50 µl alınarak aynı işlemle 5 ml'e distile suyla tamamlanmıştır. Böylece toplamda idrar numunesi 1:1000 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilen numuneden 1000 µl alınarak viallere konulmuştur. Viallerin üzerine 5 ppm Kreatinin İS'den 100 µl eklenmiş ve final karışım ölçüm cihazına yerleştirilmiştir. Homojenizasyon için yukardaki işlemler boyunca solüsyonlar vortekslenmiştir.

Kreatinin analizi için LC-MS/MS çalışma koşulları

Analiz için cihaz çizelge 3.2'te belirtilen optimize koşullarda çalıştırılmıştır. LC-MS/MS cihazı pozitif iyon çoğaltıcı tepkime görüntüleme modunda (multipl reaction monitoring: MRM) çalıştırılmıştır.

LC-MS/MS için yöntem validasyonu

İdrar örneklerinde BPA, OP ve NP analizleri gerçekleştirilirken LC-MS/MS cihazında analiz yöntemine ilişkin validasyon parametreleri de belirlenmiştir. Bu doğrultuda analiz

yöntemiyle ölçülebilen en düşük miktar (LOQ) ve ölçülebilen en küçük değer (LOD) hesaplanmıştır.

Validasyon için BPA, OP ve NP'nın her birinden 20, 50, 200 ve 400 ng/ml'lik çözeltilerin her biri beş gün üst üste ve günde beş kez ölçülerek gün içi (Intraday) ve günler arası (Interday) ortalama (Ort), duyarlılık (Relative Standard Deviation, % RSD) ve doğruluk (% recovery, Rec) değerleri de validasyon parametreleri olarak belirlenmiştir.

3.1.3. Kan numunelerinden genomik DNA izolasyonu ile CYP19 (rs2414096) ve DENND1A (rs10818854) genlerindeki tek nokta polimorfizmlerin Real-Time PCR ile belirlenmesi

Yöntem

EDTA'lı tüplere toplanan hasta ve kontrol gruplarına ait kan numunelerinde Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile DENND1A (rs1088854) ve CYP19 (rs2414096) genlerinde tek nokta mutasyon polimorfizmlerine (SNP) bakıldı. Bunun için ilk adım olan kan numunelerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu

Bireylerden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu için öncelikle Roche, High Pure PCR Template Prapation Kit (Cat No: 11796828001) kullanıldı. Kit ile izolasyon yapılamadığı durumlarda ise kan numuneleri önce lizis işlemine tabi tutuldu ardından proteinlerin denatürasyonu ve nükleik asitlerin etanol ile çöktürülmesinden sonra sodyum perklorat/etanol ekstraksiyon gerçekleştirilecek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

High Pure PCR Template Prapation Kit içinde genomik DNA izolasyonu için 5 farklı kimyasal karışım bulunmaktadır. Bu maddeler ve içerikleri ise şöyledir:

- Proteinaz K: “Liyofilize proteinaz K”
- İnhibitör uzaklaştırıcı tampon: “5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6”
- Yıkama çözeltisi: “20 mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH: 7,5”

- Bağlama tamponu: “6 M guanidine-HCl, 10mM üre, 10mM Tris-HCl, %20 (v/v) Triton X-100 pH:4,4”
- Elüsyon tamponu: “10mM Tris-HCl, pH:8,5”

Kit ile izolasyon için ön hazırlık aşamasında kit içinden çıkan bazı kimyasallara bir takım işlemler uygulandı. Buna göre 5 ml distile su liyofilize haldeki Proteinaz K’a eklendi. 20 ml etanol de inhibitör uzaklaştırıcı tampona ilave edilerek hazır duruma getirildi. Son olarak da 80 ml etanol de yıkama çözeltisine eklenerek ön hazırlık aşaması tamamlandı ve aşağıda izlenen adımlarla DNA izole edildi:

1. 200 µl kan örneği 1,5 ml’lik santrifüj tüpüne konuldu.
2. Üzerine 200 µl bağlama tamponu ve 20 µl proteinaz K eklendi.
3. Hemen karıştırılmaya başlanan karışım iyice karıştırıldıktan sonra 10 dk 70 °C’de inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrasında DNA’ların iyice çökmesini sağlamak için 100 µl izopropil alkol eklendi ve pipetle karıştırıldı
5. Toplama tüpü çıkartıldı ve içine filtreli tüp yerleştirildi. Hazırlanan bu karışım toplama tüpüne aktarıldı.
6. Tüpteki karışım 8000g devirde 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj bitiminde alttaki toplama tüpü atıldı, içindeki filtreli tüp yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
8. Toplama tüpüne 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklendi ve 8000g devirde 1 dk santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonunda alttaki toplama tüpü atıldı. Filtreli tüp yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
10. Toplama tüpüne 500 µl yıkama çözeltisi ilave edilerek 8000g devirde 1 dk santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonunda alttaki toplama tüpü atıldı. Filtreli tüp yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
12. Toplama tüpüne 500 µl yıkama çözeltisi ilave edilerek 8000g devirde 1 dk santrifüj edildi.
13. Santrifüj sonunda alttaki toplama tüpü atıldı. Filtreli tüp yeni toplama tüpüne yerleştirildi.

14. Filtreli tüp 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirilir ve üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklenerek 8000g devirde 1 dk santrifüj edilir.
15. Santrifüj sonunda karışıma tekrar 50 µl elüsyon tamponu ilave edilir ve 8000g devirde 1 dk daha santrifüj edilir.
16. Altta toplanan kısım üst kısma tekrar aktarılır ve 8000g devirde 1 dk santrifüj edilir.
17. Alttaki 100 µl DNA çözeltisi analiz için saklandı.

Kit ile izolasyon yapılamadığı durumlarda lizis işleminden sonra proteinlerin denatürasyonu ve nükleik asitlerin etanol ile çöktürülmesine dayanan, sodyum perklorat/etanol ekstraksiyon yöntemiyle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için önce aşağıdaki çözeltiler hazırlanmıştır:

- Reajan A çözeltisi: Lizis tamponudur. 109,5 gr süktroz ve 1 gr $MgCl_2$ 800 ml distile su içinde çözdürülür. Diğer yandan 1 M Tris HCl (pH:8) çözeltisinden 10 ml üzerine eklendikten sonra karışım 1000 ml'e distile su ile tamamlanır. Otoklavda sterilizasyon sonrası karışım sıcak haldeyken 10 ml Triton X-100 eklenir ve oda sıcaklığında berraklaşıp soğuyana kadar beklenir. Daha sonra +4 °C'de saklanır.
- Reajan B çözeltisi: 48,5 g Trizma Baz, 22,3 g EDTA ve 8,8 g NaCl tartıldıktan sonra distile su ile çözdürülerek 800 ml'ye karışım tamamlanır. pH'ı 8 e derişik HCl çözeltisi ile ayarlandıktan sonra sterilize edilmek üzere otoklava konur. Otoklav sonrası sıcakken 10 g sodyum dodesil sülfat eklenir ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.
- 5 M Sodyum Perklorat Çözeltisi: 70,2 sodyum perklorat tartılarak distile su içinde çözdürölüp 100 ml'e hacme tamamlanır.

Çözeltiler hazırlandıktan sonra aşağıdaki basamaklarla DNA izolasyonu gerçekleştirilir.

1. 4 ml kan örneği alınarak üzerine soğuk Reajan A çözeltisinden 15 ml ilave edildi.
2. Çözelti 3000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant kısmı yavaşça atıldı ve dipteki pellet kısmı üzerine 2 ml Reajan B çözeltisinden ilave edildi.
3. 0,5 ml sodyum perklorat çözeltisine bu karışım ilave edilerek 15 dk alt üst edildi ve 60 °C'de 30 dk inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası 2 ml soğuk kloroform ilave edilerek 10 dk boyunca alt üst edildi.
5. Karışım 1400 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst fazın tamamı temiz tüpe alındı.

6. Bu karışımın üzerine 5 ml soğuk etanol eklendi ve DNA sarmalının oluştuğu görüldü.
7. Oluşan sarmal alındıktan ve 10 dk kurutulduktan sonra ependorf tüplerine alınarak üzerlerine yaklaşık 250 µl moleküler biyolojik steril su ilave edilerek çözdürüldü.
8. 60 °C'de 1 gece inkübasyon banyosunda inkübe edilen DNA çözeltisi +4 °C'de analiz için saklandı.

Yukarıda açıklanan iki yöntemden birine göre izole edilen DNA çözeltileri izolasyon sonrasında içerdikleri DNA'lar saflık ve miktar değerlendirilmelerine tabi tutuldu. Bunun için nanodrop 100 spektrofotometre cihazında her bir örneğin 260/280 nm ve 260/230 nm dalga boylarının DNA saflıkları ve miktarları ölçüldü. Yeterli saflıkta ve miktarda bulunan örneklerle çalışmaya devam edildi.

Reaksiyon karışımının hazırlanması ve örneklerin RT-PCR cihazına yüklenmesi

Genomik DNA'lar izole edildikten sonra RT-PCR analizlerinin yapılacağı Roche Lightcycler 480 cihazına yüklenmeden önce cihaz açılarak self test yapıldı. Ardından polimorfizm analizlerinin gerçekleştirileceği analiz protokolü cihaz üzerinde ayarlandı. Analiz protokolü her iki polimorfizm için aynı olup Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. CYP19 (rs2414096) ve DENND1A (rs10818854) analiz protokolü

Denaturasyon	Çoğalma	Erime	Soğuma
1 döngü	45 döngü	1 döngü	1 döngü
95°C;10 dk	1.segment: 95°C, 10 sn	1. segment: 95°C, 30 sn	40°C, 30 sn
	2. segment: 60°C, 10 sn	2. segment: 40°C, 2 dk	
	3. segment: 72°C, 15 sn	3. segment: 75°C	

Cihaz analiz için hazır hale getirildikten sonra cihaza yüklenmek üzere analiz karışımı hazırlandı. Bunun için DNA primer ve problemleri içeren viallere izole edilen DNA örnekleri ve FastStart DNA Master, MgCl₂ eklenerek analize hazır hale getirildi. Cihaza yüklenen final karışımın içeriği ve miktarı Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

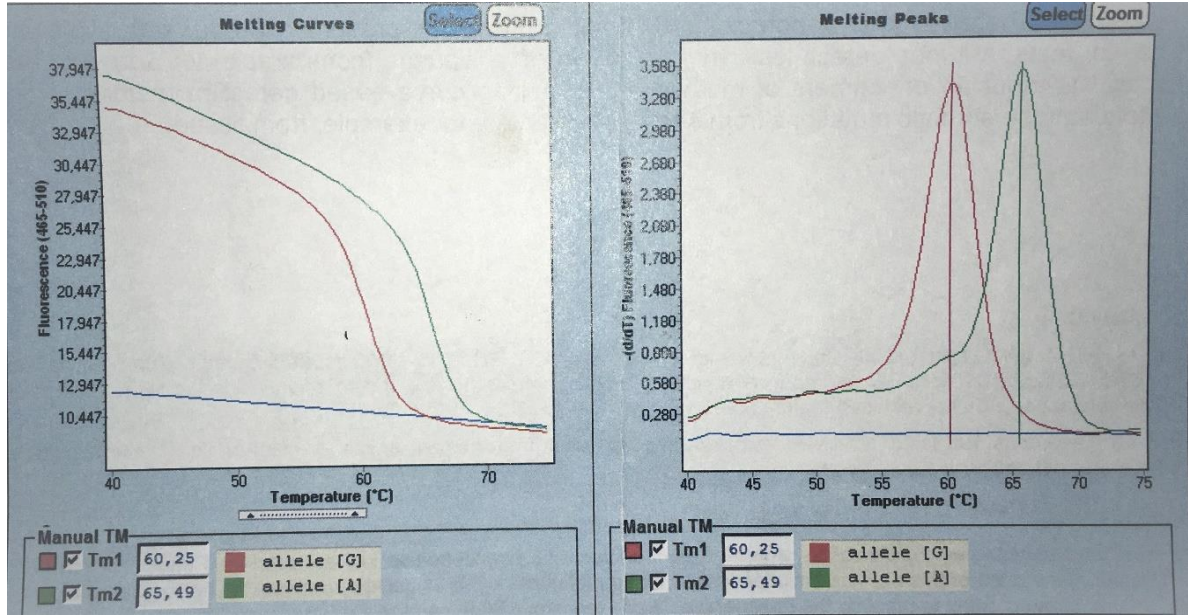
Çizelge 3.4. RT-PCR analizi için hazırlanan final karışım içeriği

H ₂ O	7,7 µl
Fast Start DNA Master	1 µl
DNA örneği	2 µl
Reagent Mix	0,5 µl
25mM MgCl ₂	0,8 µl
Toplam	12 µl

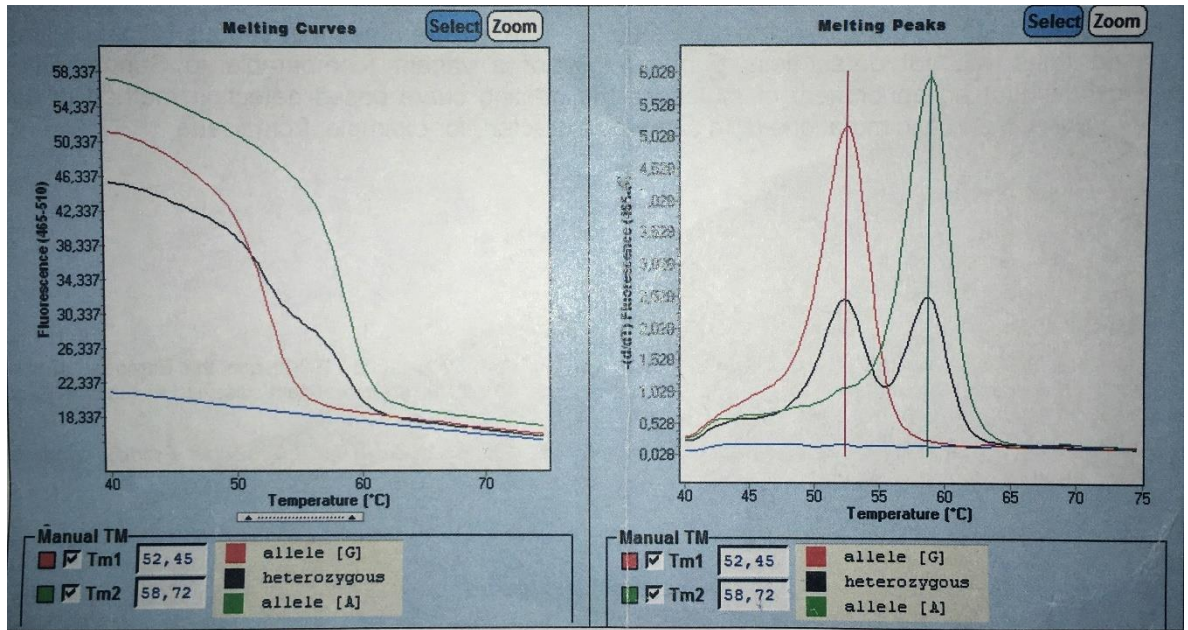
Toplam hacmi 12 µl olan karışım cihaza yüklendikten sonra LightCycler480 SW1.5 (Roche Molecular Systems, Inc.) yazılımı üzerinden cihaza yüklenen protokol çalıştırıldı ve analize başlandı.

Genotipler PCR fragmentleri üzerinde hibritleşen ve floresan sinyali (FRET: Floresan Rezonans Enerji Transferi) yayan hibridizasyon problemleri kullanılarak belirlendi. 95⁰C’de 10 saniye süren 1 döngü ile denatürasyon işlemi gerçekleşti. Ardından 95 °C’de 10 saniye, 60 °C’de 10 saniye ve 72 °C’de 15 saniye süren 45 döngü ile amplifikasyon (çoğalma) adımı gerçekleşti. Erime aşamasında 95⁰C’de 30 sn süren denatürasyon ve 40⁰C’de 2dk süren renatürasyonun ardından sıcaklığın bir fonksiyonu olarak floresan sinyalin düşüşünü izlemek için sıcaklık yavaşta 75⁰C’e yükseltildi. Tüm bu adımlardan sonra 40⁰C’de 30 sn boyunca soğutma adımı gerçekleştirildi.

Polimorfizmlerin genotiplenmesi erime eğrisi analizine dayanmaktadır. Buradaki genotipler alellere özgü erime noktası sıcaklığı (T_m) kullanılarak tespit edilmiştir. DENND1A geni için yabanıl rs10818854 aleli (G)’nin T_m’si 60.25 °C; mutant aleli (A)’nin T_m’si 65.49 °C’dir. CYP19 geni için yabanıl rs2414096 aleli (G)’nin T_m’si 52.45°C; mutant aleli (A)’nın T_m’si 58.72 °C’dir. DENND1A rs10818854 ve CYP19 rs2414096’e ait yabanıl/heterozigot/mutant genotiplere ait erime pikleri ve erime eğrileri şekil 3.2-3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. DENND1A rs10818854 yabancıl/mutant genotipe ve negatif kontrole ait erime eğrileri ve erime pikleri



Şekil 3.3. CYP19 rs2414096 yabancıl/heterozigot/mutant genotiplere ait erime eğrileri ve erime pikleri

3.1.4. Biyokimyasal parametrelerin ölçüm yöntemi

PKOS tanısında yararlanılan biyokimyasal ölçümler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Laboratuvarında ECLIA (Electro-chemiluminescence immunoassay) veya RIA (Radioimmunoassay) yöntemiyle yapılmıştır.

Çizelge 3.5. Biyokimyasal parametrelerin ölçüm yöntemleri

Ölçülen Parametre	Analiz Yöntemi
FSH, LH	ECLIA
Serbest Testosteron	RIA
Total Testosteron	ECLIA
17 Hidroksi Progesteron	RIA
DHEA-SO ₄	ECLIA
SHBG	ECLIA
Androstenedion	RIA
Prolaktin	ECLIA
Progesteron	ECLIA

3.2. İstatiksel Analiz

Elde edilen veriler IBM SPSS 17.0 programıyla analiz edildi. Sürekli sayısal değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Kolmogorov Smirnov testiyle varyansların homojenliği ise Levene testiyle araştırıldı.

Tanımlayıcı istatistikler sürekli sayısal değişkenler için medyan (25. – 75.) yüzdeler biçiminde gösterilirken kategorik değişkenlerin gösteriminde olgu sayısı ve (%) şeklinde kullanıldı. Kontrol grubu içerisinde hem genel hem de beden kitle indeksi sabit tutulduğunda DENND1A ve CYP19 genlerinin genotip dağılımları açısından Hardy-Weinberg dengesinin sağlanıp sağlanmadığı bakıldı bunun için jenerik Ki-Kare testi kullanıldı.

Gözlenen frekanslar ile beklenen frekanslar arasındaki farklara bakıldı. Gruplar arasında sürekli sayısal değişkenler yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U testiyle ikiden fazla grup arasındaki farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testi ile araştırıldı. Kruskal Wallis test istatistiği sonuçlarının önemli bulunduğu durumlarda Conover'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durum(lar) tespit edildi. Sürekli sayısal değişkenlerin birbiri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin olup olmadığı ise Spearman'ın Korelasyon testi kullanılarak araştırıldı.

Tek değişkenli istatistiksel analizler sonucunda biyokimyasal ölçümler üzerinde etkili olan veya etkili olabileceği düşünülen olası tüm risk faktörlerinin birlikte etkileri Çoklu Değişkenli (Multiple) Doğrusal Regresyon analizleri ile araştırıldı. Yaş ve beden kitle indeksi gibi biyolojik etkenlerin yanı sıra tek değişkenli istatistiksel analizler sonucunda

$p < 0.10$ olarak saptanan değişkenler aday risk faktörleri olarak çoklu değişkenli doğrusal regresyon modellerine dahil edildi. Ayrıca, her bir değişkene ait regresyon katsayısı, %95 güven aralığı ve t istatistikleri hesaplandı. Biyokimyasal ölçümlere ait veriler normalden uzak dağılıma sahip olduklarından doğrusal regresyon analizlerinde her bir biyokimyasal ölçüm için logaritmik dönüşüm yapıldı.

Tüm olgular içerisinde DENND1A ve CYP19 bölgelerine göre genotip ve alel tiplerinin PKOS yatkınlığı üzerine anlamlı etkisinin olup olmadığı ve kontrol grubu içerisinde söz konusu genotip ve alel tipleri ile fazla kilolu olma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik olup olmadığı Tek Değişkenli Lojistik Regresyon analizi ile değerlendirildi. Ayrıca, her bir genotip ve alel için odds oranı ve %95 güven aralıkları hesaplandı.

2x2'lik çapraz tablolarda beklenen frekansın 5'in altında olduğu durumda Fisher'in Kesin Sonuçlu Olasılık testi, 5-25 arasında olması halinde Süreklilik Düzeltmeli Ki-Kare testi, 25'ten büyük olması durumunda ise Pearson'un Ki-Kare testi kullanılarak kategorik veriler değerlendirildi. RxC çapraz tablolarda ise gözelerin en az ikisinde beklenen frekansın 5'in altında olduğu durumda Olabilirlik Oran testi kullanılırken aksi durumlarda söz konusu veriler Pearson'un Ki-Kare testi değerlendirildi.

PKOS grubu içerisinde tek değişkenli istatistiksel analizler sonucunda PKOS semptomları üzerinde etkili olan veya etkili olabileceği düşünülen olası tüm risk faktörlerinin birlikte etkileri ise Çoklu Değişkenli (Multiple) Lojistik Regresyon analizi ile araştırıldı. Yaş ve beden kitle indeksi gibi biyolojik etkenlerin yanı sıra tek değişkenli istatistiksel analizler sonucunda $p < 0.25$ olarak saptanan değişkenler aday risk faktörleri olarak çoklu değişkenli lojistik regresyon modellerine dahil edildi. Ayrıca, her bir değişkene ait odds oranı, %95 güven aralığı ve Wald istatistikleri hesaplandı.

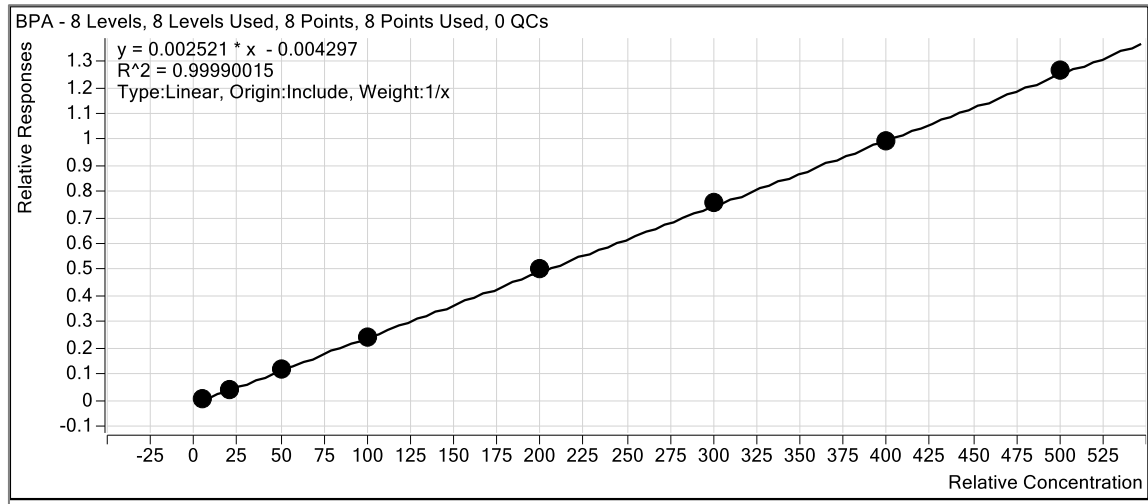
Aksi belirtilmedikçe $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ancak, olası tüm çoklu karşılaştırmalarda Tip I hatayı kontrol edebilmek için mevcut çalışmada Bonferroni Düzeltmesi yapıldı.

4. BULGULAR

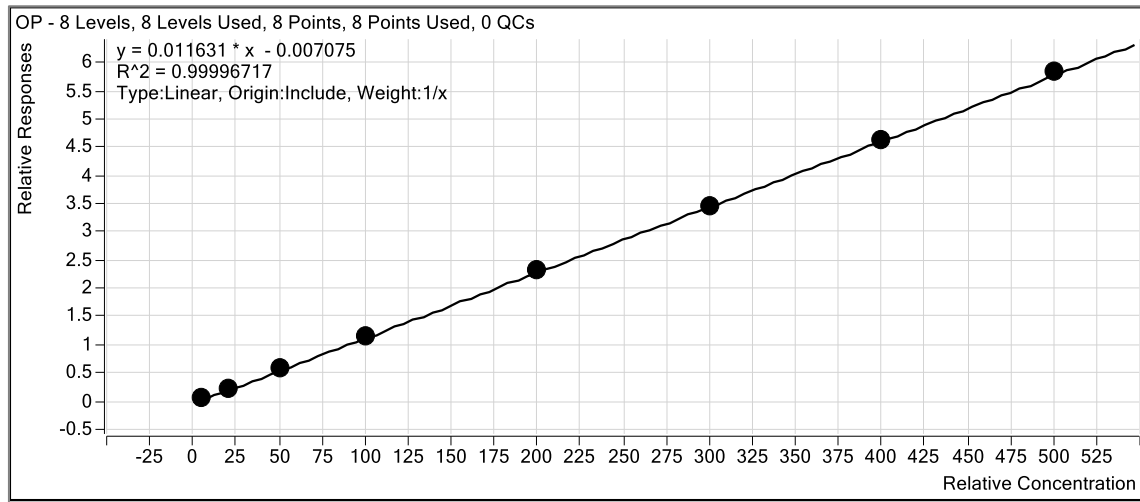
4.1. LC/MS-MS Cihazı ile BPA, OP ve NP Analizi Yöntem Validasyonu

4.1.1. LC-MS/MS cihazının kalibrasyonu

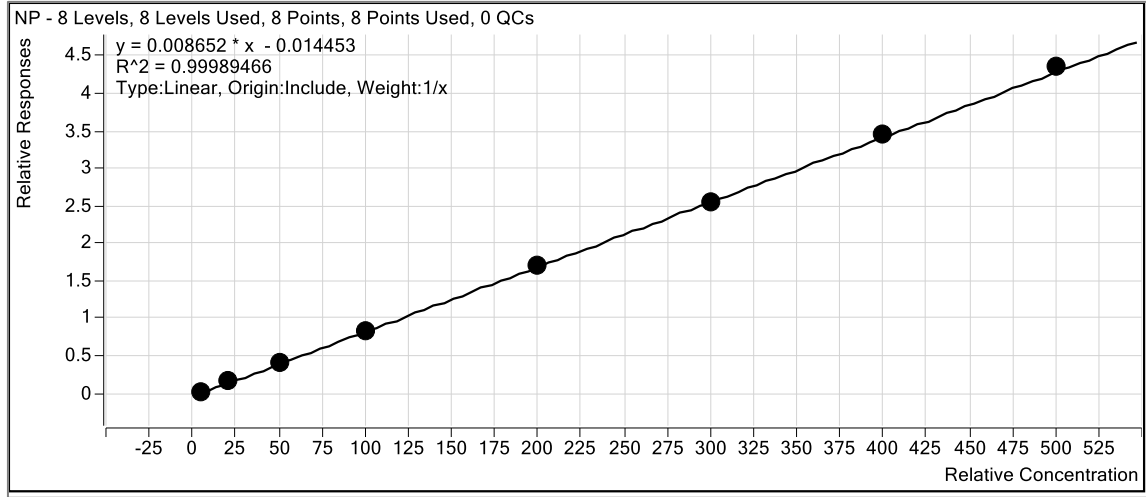
İdrar örneklerinde BPA, OP, NP ve kreatinin analizleri için geliştirilen yöntemle cihaz kalibrasyonuna ilişkin grafikler oluşturulmuştur. Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4. Kalibrasyon grafiklerine ilişkin r^2 değerleri tüm analitler için 0,99 olarak bulunmuştur.



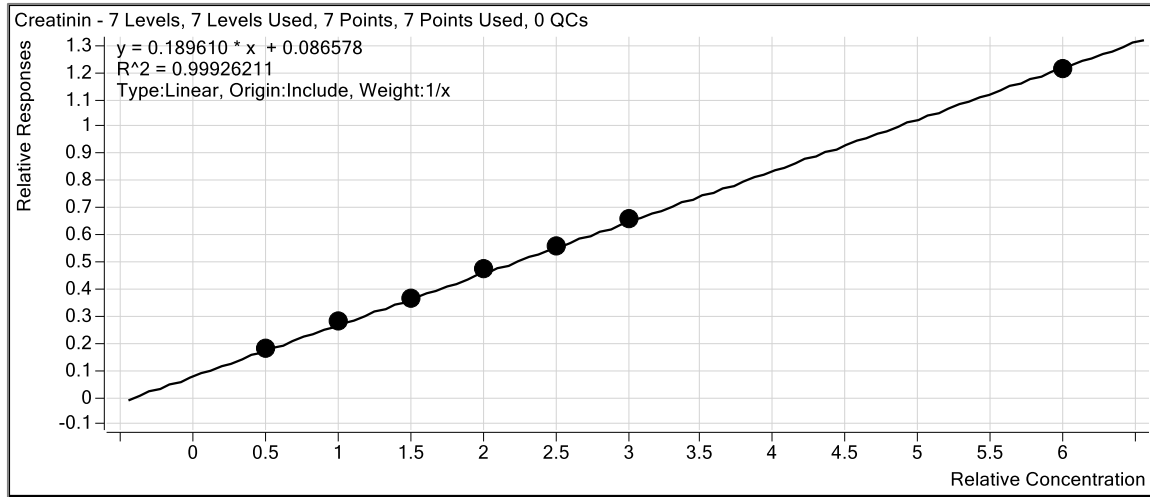
Şekil 4.1. BPA kalibrasyon grafiği



Şekil 4.2. OP kalibrasyon grafiği



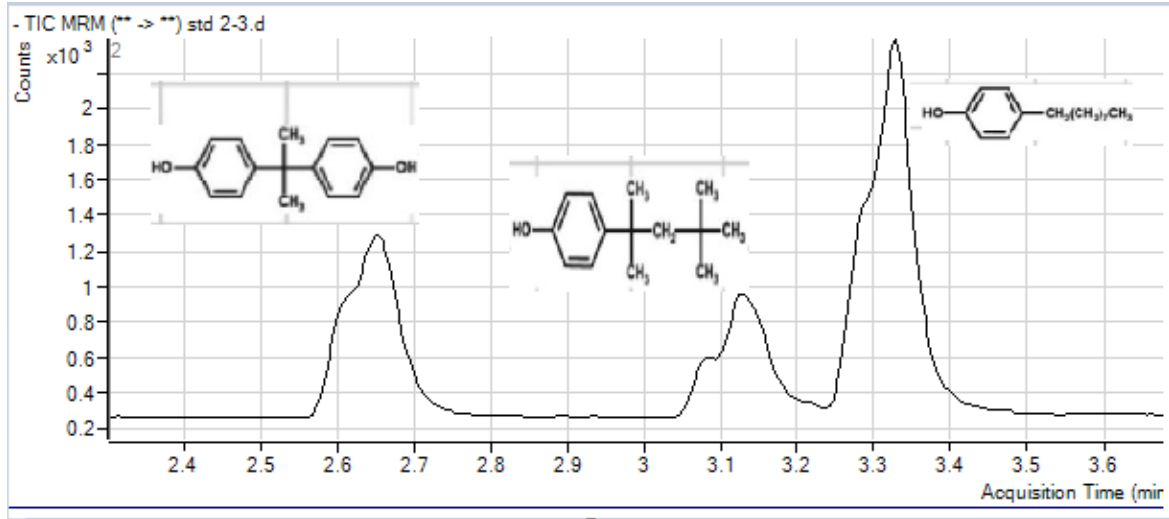
Şekil 4.3. NP kalibrasyon grafiği



Şekil 4.4. Kreatinin kalibrasyon grafiği

4.1.2. LC/MS-MS cihazı ile BPA, OP ve NP analizlerine ilişkin kromatogram

LC/MS-MS cihazının oto samplerında yer alan aynı vialden tek enjeksiyon ile BPA, OP ve NP miktar tayinin yapılması amaçlanmıştır. Bu analize ilişkin her bir analite ait alıkonma zamanını temsili olarak gösteren kromatogram Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. BPA, OP ve NP'in alıkonma zamanlarını gösterir temsili kromatogram

4.1.3. Doğruluk ve geri kazanım

Deneysel ve teorik miktarlar kullanılarak geri kazanılan miktarlar aşağıdaki eşitliğe göre BPA, OP ve NP için hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Deneysel (ölçülen miktar)}}{\text{Teorik (ilave edilen miktar)}} \times 100 \quad (4.1)$$

4.1.4. Teşhis ve miktar tayini alt sınırı

Doğrusallık çalışmaları sırasında elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğimleri ve kullanılan en düşük konsantrasyonun standart sapmalarıyla teşhis sınırı ve miktar tayini alt sınırı (LOD ve LOQ) değerleri hesaplanmış ve aşağıdaki çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. BPA, OP ve NP'e ait LOD ve LOQ değerleri

Analit	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
BPA	0,001	0,005
OP	0,005	0,180
NP	0,007	0,023

4.1.5. Validasyon parametreleri

Validasyon için BPA, OP ve NP'nın her birinden 20, 50, 200 ve 400 ng/ml'lik çözeltilerin her biri beş gün üst üste ve günde beş kez ölçülerek gün içi (Intraday) ve günler arası (Interday) ortalama (Ort), duyarlılık (Relative Standard Deviation, % RSD) ve doğruluk (% recovery, Rec) değerleri de validasyon parametreleri olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. LC-MS/MS validasyon parametreleri

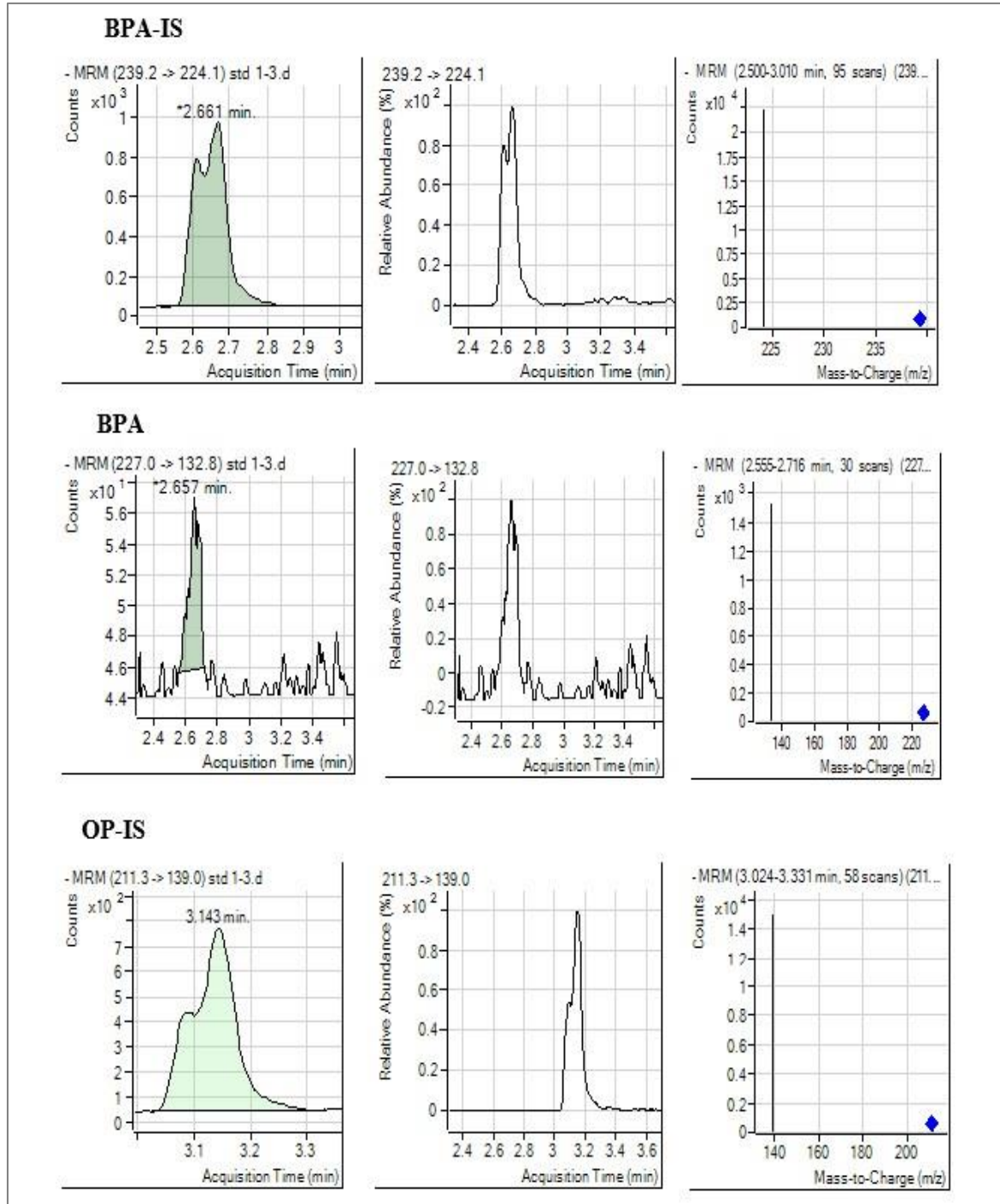
	BPA											
	Doğruluk						Kesinlik					
	Gün içi			Günler arası			Gün içi			Günler arası		
	Ortalama (n=5)	Rec. (%)	CV (%)	Mean (n = 5)	Rec. (%)	CV (%)	Ortalama (n = 5)	Rec. (%)	CV (%)	Ortalama (n = 5)	Rec. (%)	CV (%)
Bisfenol A	19.76	98.80	1.22	19.04	95.20	4.77	20.40	102.00	3.00	17.32	86.60	2.76
20 ng/ml	19.76	98.80	1.22	19.04	95.20	4.77	20.40	102.00	3.00	17.32	86.60	2.76
50 ng/ml	43.41	86.82	13.17	42.56	85.12	14.87	42.16	84.32	4.52	38.15	95.30	3.50
200 ng/ml	188.78	94.39	5.61	182.24	91.12	8,87	200.95	100.40	1.71	197.97	98.98	1.07
400 ng/ml	365.52	91.38	8.62	344.02	86.005	13.99	331.62	82.90	1.61	364.18	91.10	11.29
	Nonilfenol											
	Doğruluk						Kesinlik					
	Gün içi			Günler arası			Gün içi			Günler arası		
	Ortalama (n = 5)	Rec. (%)	CV (%)	Ortalama (n = 5)	Rec. (%)	CV (%)	Ortalama (n = 5)	Rec. (%)	CV (%)	Ortalama (n = 5)	Rec. (%)	CV (%)
Nonilfenol	20.12	100.60	0.62	19.69	98.45	1,53	19.67	98.35	2.77	19.85	99.25	2.18
20 ng/ml	20.12	100.60	0.62	19.69	98.45	1,53	19.67	98.35	2.77	19.85	99.25	2.18
50 ng/ml	49.10	98.20	1.80	49.39	98.78	1,22	49.09	98.18	0.69	47.82	95.64	1.42
200 ng/ml	196.12	98.06	1.94	195.78	97.89	2,11	199.17	99.58	0.55	199.17	99.58	0.55
400 ng/ml	393.00	98.25	1.74	394.33	198.58	1,41	395.30	98.82	0.37	395.30	98.82	0.37
	Oktilfenol											
	Doğruluk						Kesinlik					
	Gün içi			Günler arası			Gün içi			Günler arası		
	Ortalama (n=5)	Rec. (%)	CV (%)	Ortalama (n=5)	Rec. (%)	CV (%)	Ortalama (n = 5)	Rec. (%)	CV (%)	Ortalama (n = 5)	Rec. (%)	CV (%)
Oktilfenol	19.43	97.15	2.86	19.35	96.75	3,25	19.54	97.70	3.36	18.66	93.30	3.51
20 ng/ml	19.43	97.15	2.86	19.35	96.75	3,25	19.54	97.70	3.36	18.66	93.30	3.51
50 ng/ml	49.23	98.5	1.54	48.00	96.00	3,99	49.44	98.88	1.39	48.58	97.16	2.04
200 ng/ml	197.65	98.80	1.17	197.18	98.59	1,4	197.28	98.64	0.99	197.90	98.95	0.77
400 ng/ml	380.42	95.10	4.89	397.39	97.84	0,65	396.65	99.16	1.03	391.23	98.80	0.71

4.1.6. İyon kaynağının optimizasyonu-MS parametreleri

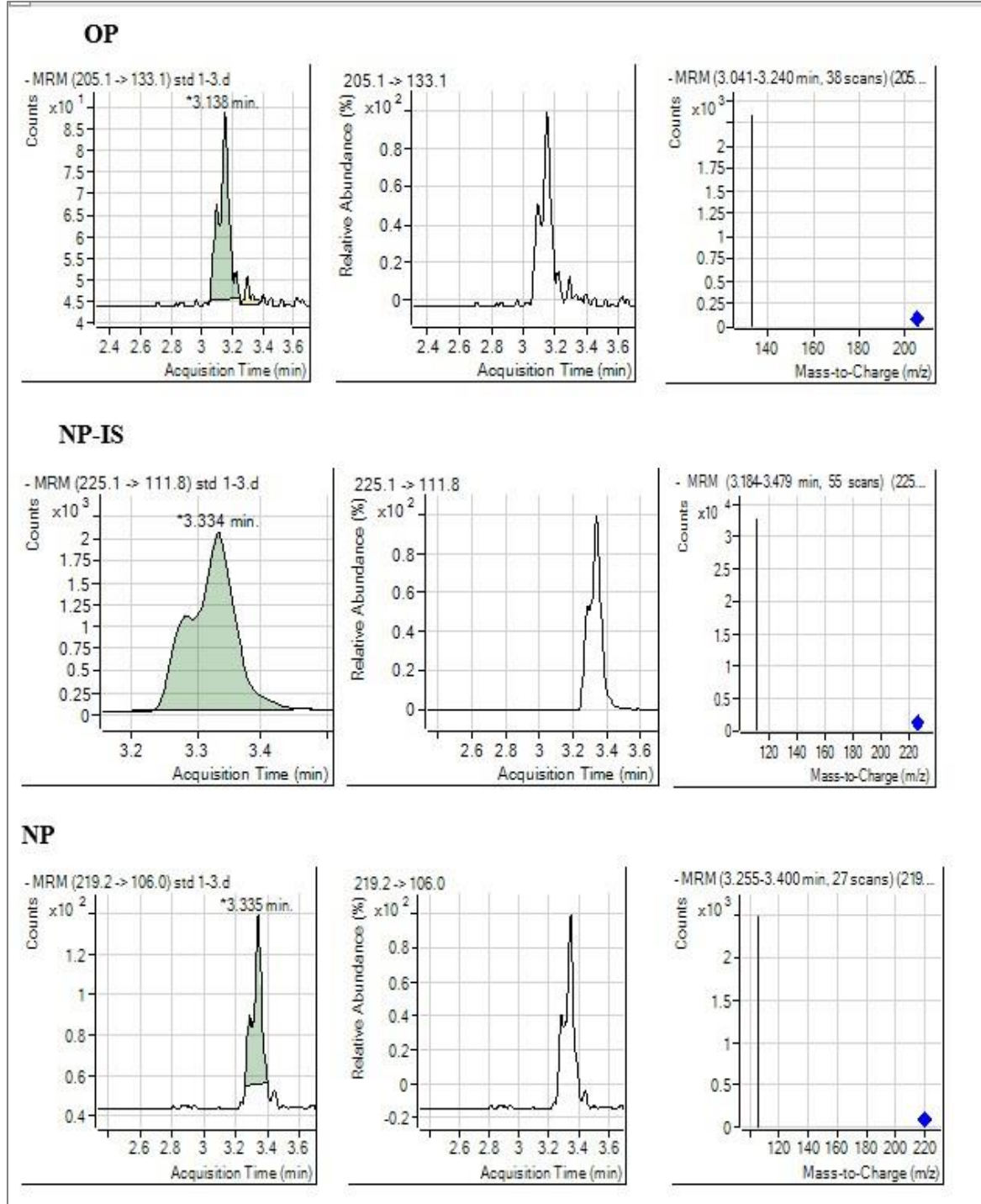
Kütle spektroskopisi parametreleri optimize edilirken negatif iyonizasyon modunun en etkili iyonizasyon modu olduğu bulundu. Çizelge 4.3’de çoklu reaksiyon izleme modu (MRM) ile izlenen her bir bileşik için çarpışma enerjisi ve parçalayıcı voltajı gibi optimize edilmiş parametreler özet olarak sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Miktar tayini için MS/MS geçişleri ve enstrüman parametreleri

Analit	Geçiş (m/z)	Parçalayıcı voltajı (V)	Çarpışma enerjisi (eV)
¹³ C ₆ -BPA	239.2-224.1	120	12
BPA	227.0-132.8	110	21
¹³ C ₆ -NP	225.1-111.8	130	20
NP	219.2-106.0	130	20
¹³ C ₆ -OP	211.3-139.0	130	25
OP	205.1-133.1	130	25



Şekil 4.6. BPA, BPA-IS, OP, OP-IS, NP, NP-IS'nin temsili kromatogramları



Şekil 4.6. (devam) BPA, BPA-IS, OP, OP-IS, NP, NP-IS'nin temsili kromotogramları

4.1.7. Çalışmaya katılan bireylerin temel özellikleri ve biyokimyasal ölçüm sonuçları

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.4'de; incelediğimiz biyokimyasal parametreler açısından elde ettiğimiz bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler ise Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	Kontrol (n=120)	PKOS (n=102)	p-değeri
Yaş (yıl)	15,0 (14,6-17,0)	16,0 (15,0-17,0)	0,066
VKİ (kg/m ²)	23,4 (20,7-26,7)	24,6 (21,1-28,4)	0,084
VKİ ≥25 kg/m ²	43 (%35,8)	48 (%47,1)	0,090
Menstrual bozukluk n (%)	18 (%15,0)	83 (%81,4)	<0,001
Hirsutizm n (%)	31 (%25,8)	70 (%68,6)	<0,001
İnsülin direnci n (%)	30 (%27,0)	40 (%41,7)	0,026
Obezite n (%)	31 (%26,5)	39 (%39,4)	0,044
Hepatosteatoz n (%)	4 (%3,6)	5 (%5,8)	0,509

PKOS ve kontrol grubu klinik ve demografik özellikler açısından irdelendiğinde menstrual bozukluk, hirsutizm, insülin direnci ve obezite prevalanslarının PKOS grubunda daha yüksek olduğu bulunmuştur. (p<0,05).

Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grubunda ölçülen biyokimyasal parametre ölçüm sonuçları

	Kontrol (n=120)	PKOS (n=102)	p-değeri
LH (IU/L)	5,6 (4,0-8,1)	7,6 (4,6-13,5)	<0,001
FSH (IU/L)	5,3 (4,1-6,2)	5,7 (4,4-6,5)	0,325
LH/FSH	1,1 (0,7-1,7)	1,5 (0,9-2,8)	<0,001
E2 (pg/ml)	47,0 (29,0-84,5)	37,5 (25,7-51,5)	0,031
T.Testosteron (ng/ml)	0,28 (0,19-0,40)	0,38 (0,29-0,57)	<0,001
E2/T	173,4 (93,1-379,9)	86,3 (55,6-176,0)	<0,001
17OH Progesteron (ng/ml)	1,4 (0,9-2,1)	1,6 (1,0-2,3)	0,166
DHEASO4 (ng/ml)	221,0 (163,7-312,2)	265,4 (194,0-371,6)	0,022
SHBG (µg/ml)	3,8 (2,7-5,8)	3,6 (2,4-5,5)	0,403
FAİ	6,6 (4,1-11,5)	9,9 (6,0-19,9)	0,004
Androstenedion (ng/ml)	1,1 (0,8-1,5)	1,3 (0,9-1,7)	0,057
Prolaktin (ng/ml)	13,4 (10,3-18,7)	16,3 (12,4-21,2)	0,025
Progesteron (ng/ml)	0,6 (0,4-1,0)	0,7 (0,4-1,0)	0,999

Serum örneklerinin incelenmesi neticesinde ise LH, LH/FSH, total testosteron, DHEASO4, FAİ ve prolaktin düzeyleri medyan değerlerinin PKOS grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Medyan E2 ve E2/T düzeyleri ise istatistiksel anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (p<0,05). PKOS ve kontrol grupları arasında incelenen diğer klinik ve biyokimyasal parametreler ile demografik özellikler yönünden anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05).

İncelenen biyokimyasal parametreler VKİ açısından normal ve kilolu bireyler olarak iki ayrı gruba ayrılmış ve normal kilolu bireylerde LH, LH/FSH, total testosteron, E2/T ve prolaktin düzeylerinin hasta grubunda kontrole göre daha yüksek olduğu görülmüştür. VKİ'e göre gruplar oluşturulmadan yapılan değerlendirmede PKOS ve kontrol grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık çıkan E2, DHEASO4 ve FAI gibi değerlerde anlamlı farkın ise devam etmediği görülmüştür. Fazla kilolu bireylerde sadece total testosteron ve E2/T düzeylerinde PKOS ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir. Bu verilere ilişkin sonuçlar Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. VKİ<25 kg/m² olan olgular içerisinde gruplara göre olgularda ölçülen biyokimyasal parametre ölçüm sonuçları

	Kontrol (n=77)	PKOS (n=54)	p-değeri*
LH (IU/L)	5,4 (4,1-7,7)	7,6 (5,7-17,6)	<0,001
FSH (IU/L)	5,3 (4,1-6,7)	6,0 (4,8-6,7)	0,103
LH/FSH	1,0 (0,7-1,7)	1,4 (1,0-3,1)	0,003
E2 (pg/ml)	53,2 (30,4-92,7)	42,5 (24,9-55,1)	0,035
T.Testosteron (ng/ml)	0,28 (0,18-0,40)	0,37 (0,29-0,60)	<0,001
E2/T	189,6 (101,3-408,7)	83,9 (55,8-172,3)	<0,001
17OH Progesteron (ng/ml)	1,4 (0,9-2,2)	1,7 (1,1-2,5)	0,250
DHEASO4 (ng/ml)	214,3 (154,7-309,4)	264,2 (180,8-369,5)	0,081
SHBG (µg/ml)	4,8 (3,5-7,1)	4,4 (3,6-6,7)	0,838
FAİ	5,2 (2,6-10,0)	8,3 (5,3-17,7)	0,039
Androstenedion (ng/ml)	1,0 (0,8-1,5)	1,3 (0,9-1,7)	0,063
Prolaktin (ng/ml)	12,8 (10,2-17,0)	18,4 (12,9-22,7)	<0,001
Progesteron (ng/ml)	0,6 (0,4-1,0)	0,8 (0,5-1,1)	0,681

Çizelge 4.7. VKİ $\geq$ 25 kg/m² olan olgular içerisinde gruplara göre olgularda ölçülen biyokimyasal parametre sonuçları

	Kontrol (n=43)	PKOS (n=48)	p-değeri*
LH (IU/L)	5,8 (4,0-8,3)	6,6 (4,0-11,5)	0,198
FSH (IU/L)	5,1 (3,8-6,0)	5,1 (3,9-6,2)	0,945
LH/FSH	1,2 (0,8-1,8)	1,6 (0,8-2,3)	0,179
E2 (pg/ml)	34,8 (27,3-68,6)	37,0 (27,0-50,0)	0,768
T.Testosteron (ng/ml)	0,29 (0,20-0,44)	0,40 (0,28-0,54)	0,025
E2/T	140,2 (87,6-256,0)	89,0 (54,5-184,1)	0,023
17OH Progesteron(ng/ml)	1,2 (0,9-2,0)	1,5 (1,0-2,2)	0,263
DHEASO4 (ng/ml)	240,0 (183,7-314,8)	266,6 (205,0-379,9)	0,177
SHBG (µg/ml)	2,7 (1,9-3,6)	2,4 (1,5-3,5)	0,286
FAİ	9,1 (5,3-18,0)	15,7 (9,2-23,7)	0,055
Androstenedion(ng/ml)	1,2 (0,9-1,5)	1,3 (1,0-1,5)	0,593
Prolaktin(ng/ml)	15,2 (11,6-21,4)	14,4 (12,0-21,0)	0,463
Progesteron(ng/ml)	0,6 (0,4-1,0)	0,6 (0,3-1,0)	0,881

4.1.8. Hasta ve kontrol grubunda DENND1A (rs10818854) ve CYP19 (rs2414096) genotip sıklıkları

Genotip dağılımına ilişkin kontrol grubu içerisinde hem genel hem de VKİ sabit tutulduğunda genotip dağılıma ilişkin Hardy-Weinberg dengesi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmiştir. Olgular hem genel hem de VKİ açısından normal kilolu ve fazla kilolu gruplara ayrılarak değerlendirildiğinde hem DENND1A hem de CYP19 genotip dağılımı yönünden gözlenen frekanslar ile beklenen frekanslar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$). Böylece seçilen kontrol grubunun Hardy-Weinberg dengesi açısından çalışma için uygun bir grup olduğu görülmüştür (Çizelge 4.8)

Çizelge 4.8. Kontrol grubu içerisinde hem genel hem de VKİ sabit tutulduğunda genotip dağılıma ilişkin Hardy-Weinberg dengesi

	DENND1A				CYP19			
	Gözlenen	Beklenen	χ^2	P	Gözlenen	Beklenen	χ^2	P
Genel			1,358	0,244			0,215	0,643
GG	88	89,1			39	37,8		
AG	22	19,8			51	53,4		
AA	0	1,1			20	18,8		
VKİ <25 kg/m ²			0,760	0,383			0,352	0,553
GG	55	55,6			23	21,8		
AG	13	11,8			31	33,4		
AA	0	0,6			14	12,8		
VKİ ≥25			0,605	0,438			0,004	0,950
GG	33	33,5			16	16,1		
AG	9	8,0			20	19,8		
AA	0	0,5			6	6,1		

PKOS ve kontrol grupları arasında genotip ve alel frekansları tek değişkenli lojistik regresyon analizi ile incelenmiş ve sonuçları Çizelge 4.9’da sunulmuştur. Ayrıca, her bir referans genotip ve alele karşı riskli olduğu düşünülen genotip ve alellerin hastalık yatkınlığı üzerine etkileri odds oranı (OO) ve %95 güven aralıkları hesaplanarak incelenmiştir.

DENND1A açısından PKOS üzerinde sırasıyla; AG genotipi ya da A alelini taşıyor olmanın istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (p=0,473 ve p=0,496). CYP19 açısından GG genotipine karşı AA genotipini taşıyor olmanın PKOS yatkınlığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı ve ters etkisinin olduğu görülmüştür (OO = 0,373; %95 GA: 0,153- 0,913 ve p=0,031). Benzer şekilde CYP19 açısından G aleline karşı A alelini taşıyor olmanın da PKOS yatkınlığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı ve ters etkisinin olduğu görülmüştür (OO= 0,631; %95 GA: 0,422-0,945 ve p=0,025).

Çizelge 4.9. PKOS ve kontrol grupları arasında genotiplerin dağılımı ve alel frekansları

	Kontrol	PKOS	p-değeri	OO (%95 GA)
DENND1A				
GG	88 (%80,0)	83 (%83,8)	-	1,000
AG	22 (%20,0)	16 (%16,2)	0,473	0,771 (0,379-1,569)
DENND1A				
G	198 (%90,0)	182 (%91,9)	-	1,000
A	22 (%10,0)	16 (%8,1)	0,496	0,791 (0,403-1,553)
CYP19				
GG	39 (%35,5)	47 (%47,5)	-	1,000
AG	51 (%46,4)	43 (%43,4)	0,233	0,700 (0,389-1,259)
AA	20 (%18,2)	9 (%9,1)	0,031	0,373 (0,153-0,913)
AG+AA	71 (%64,5)	52 (%52,5)	0,079	0,608 (0,349-1,059)
CYP19				
G	129 (%58,6)	137 (%69,2)	-	1,000
A	91 (%41,4)	61 (%30,8)	0,025	0,631 (0,422-0,945)

Hem tüm gruplar hem de PKOS grubu içinde DENND1A rs10818854 genotiplerinin ölçülen biyokimyasal parametreler üzerine etkisi de incelenmiştir. Tüm olgular içinde GG genotipini taşıyan grup ile AG genotipini taşıyan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir (Çizelge 4.10) ($p>0,05$). PKOS grubu içinde benzer şekilde DENND1A GG genotipini taşıyan grup ile AG genotipini taşıyan grup arasında biyokimyasal ölçüm düzeyleri yönünden Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir (Çizelge 4.10) ($p>0,025$).

Çizelge 4.10. Tüm olgular içerisinde DENND1A genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri

	DENND1A GG	DENND1A AG	p-değeri
LH (IU/L)	5,9 (4,3-10,8)	6,3 (4,3-8,8)	0,852
FSH (IU/L)	5,5 (4,0-6,5)	5,2 (4,8-6,1)	0,694
LH/FSH	1,2 (0,8-2,0)	1,3 (0,8-2,3)	0,779
E2 (pg/ml)	40,0 (27,0-60,6)	47,4 (27,5-83,1)	0,306
T.Testosteron (ng/ml)	0,31 (0,20-0,46)	0,34 (0,27-0,43)	0,480
E2/T	130,9 (70,3-268,6)	140,2 (84,7-226,2)	0,637
17OH Progesteron (ng/ml)	1,4 (1,0-2,1)	1,5 (1,1-2,4)	0,305
DHEASO4 (ng/ml)	229,0 (165,0-328,4)	253,0 (172,4-369,9)	0,530
SHBG (µg/ml)	3,8 (2,5-5,9)	3,3 (2,6-5,0)	0,450
FAİ	8,2 (4,2-15,6)	7,5 (5,2-12,7)	0,741
Androstenedion (ng/ml)	1,2 (0,9-1,5)	1,2 (0,8-1,6)	0,656
Prolaktin(ng/ml)	14,9 (11,8-21,0)	13,4 (11,0-20,4)	0,570
Progesteron(ng/ml)	0,6 (0,4-1,1)	0,6 (0,4-0,9)	0,585

Çizelge 4.11. Hasta grubu içinde DENND1A genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri

	DENND1A GG	DENND1A AG	p-değeri
LH (IU/L)	7,0 (4,5-13,3)	8,7 (5,6-18,9)	0,268
FSH (IU/L)	5,5 (4,1-6,5)	6,1 (5,3-6,4)	0,240
LH/FSH	1,4 (0,9-2,7)	1,7 (0,9-3,8)	0,514
E2 (pg/ml)	36,8 (25,3-50,6)	46,5 (26,7-76,0)	0,195
T.Testosteron (ng/ml)	0,37 (0,27-0,59)	0,38 (0,28-0,46)	0,728
E2/T	85,8 (54,6-170,9)	116,3 (69,8-193,4)	0,319
17OH Progesteron (ng/ml)	1,5 (1,0-2,1)	2,2 (1,3-2,7)	0,060
DHEASO4 (ng/ml)	247,3 (180,8-370,6)	321,4 (220,5-377,9)	0,394
SHBG (µg/ml)	3,5 (2,3-5,5)	4,1 (3,2-11,4)	0,286
FAİ	12,0 (7,0-22,1)	8,0 (4,5-13,9)	0,326
Androstenedion (ng/ml)	1,3 (0,9-1,6)	1,5 (1,0-2,8)	0,196
Prolaktin (ng/ml)	17,0 (12,5-21,3)	14,6 (10,7-20,7)	0,374
Progesteron (ng/ml)	0,6 (0,4-1,0)	0,8 (0,4-0,9)	0,799

Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13'de tüm olgular içerisinde CYP19 açısından genotiplere göre olguların biyokimyasal ölçümlerinin istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterip göstermediği incelenmiştir. Bu analize göre CYP19 genotipleri ayrı ayrı incelendiğinde (Çizelge 4.12) genotipler arasında biyokimyasal ölçümler açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Ancak AG (heterozigot) ve AA (mutant) genotipler beraber değerlendirildiğinde (Çizelge 4.13) GG genotipini taşıyan grup ile AG+ AA genotipini taşıyan grup arasında LH, LH/FSH ve DHEASO4 hariç geriye kalan diğer değişkenler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). CYP19 GG genotipini taşıyan gruba göre AG+AA genotiplerini taşıyan grubun medyan LH ve LH/FSH düzeyleri istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p=0,038$ ve $p=0,038$). Buna karşın GG genotipini taşıyan gruba göre AG+AA genotiplerini taşıyan grubun medyan DHEASO4 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,030$).

Tüm olgular içerisinde biyokimyasal parametrelerdeki değişimi tahmin etmede belirleyici olabileceği düşünülen olası tüm risk faktörlerinin çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizi ile birlikte etkileri incelendiğinde daha önce LH seviyesi üzerinde CYP19 açısından AG+AA genotiplerini taşıyor olmanın anlamlı etkisi diğer faktörlere göre düzeltme yapıldığında ortadan kaybolmuştur ($p=0,158$). Ancak, CYP19 AG+AA genotipini taşıyan bireylerde LH/FSH oranı GG genotipini taşıyanlara göre diğer faktörlerden bağımsız olarak

istatistiksel anlamlı olarak azalmaktadır. (B=-0,194; %95 Güven Aralığı: -0,379 – - 0,008 ve p=0,041).

Çizelge 4.12. Tüm olgular içerisinde CYP19 genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri I

	GG	AG	AA	p-değeri
LH (IU/L)	6,9 (4,6-11,9)	5,7 (4,1-9,3)	5,3 (3,7-8,4)	0,091
FSH (IU/L)	5,3 (3,9-6,2)	5,5 (4,4-6,6)	5,4 (4,4-6,5)	0,507
LH/FSH	1,3 (0,9-2,7)	1,2 (0,8-1,8)	1,1 (0,7-1,8)	0,089
E2 (pg/ml)	39,3 (27,8-58,2)	41,7 (27,0-69,3)	47,7 (23,9-88,0)	0,921
T.Testosteron (ng/ml)	0,35 (0,21-0,46)	0,32 (0,20-0,43)	0,30 (0,19-0,42)	0,624
E2/T	134,9 (71,4-227,0)	138,1 (75,4-388,2)	129,0 (67,0-358,2)	0,735
17OH Progesteron (ng/ml)	1,5 (0,9-2,1)	1,3 (1,0-2,1)	1,6 (1,3-2,5)	0,258
DHEASO4 (ng/ml)	213,0 (163,7-283,3)	257,6 (171,2-368,2)	234,0 (161,5-370,1)	0,090
SHBG (µg/ml)	4,0 (2,6-6,8)	3,5 (2,5-5,0)	3,9 (2,6-5,6)	0,182
FAİ	7,4 (3,7-15,7)	8,9 (4,4-15,2)	8,2 (4,7-12,6)	0,831
Androstenedion (ng/ml)	1,2 (0,8-1,5)	1,3 (0,9-1,7)	1,2 (1,0-1,5)	0,543
Prolaktin (ng/ml)	13,7 (11,7-21,0)	16,0 (12,8-21,0)	12,1 (10,1-21,2)	0,114

Çizelge 4.13. Tüm olgular içerisinde CYP19 genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri II

	GG	AG+AA	p-değeri
LH (IU/L)	6,9 (4,6-11,9)	5,6 (4,0-8,9)	0,038
FSH (IU/L)	5,3 (3,9-6,2)	5,5 (4,4-6,6)	0,246
LH/FSH	1,3 (0,9-2,7)	1,2 (0,8-1,8)	0,038
E2 (pg/ml)	39,3 (27,8-58,2)	41,9 (27,0-78,8)	0,736
T.Testosteron (ng/ml)	0,35 (0,21-0,46)	0,30 (0,20-0,43)	0,340
E2/T	134,9 (71,4-227,0)	136,2 (73,4-385,6)	0,439
17OH Progesteron (ng/ml)	1,5 (0,9-2,1)	1,4 (1,0-2,2)	0,949
DHEASO4 (ng/ml)	213,0 (163,7-283,3)	251,1 (170,8-368,5)	0,030
SHBG (µg/ml)	4,0 (2,6-6,8)	3,7 (2,5-5,1)	0,087
FAİ	7,4 (3,7-15,7)	8,8 (4,5-14,8)	0,581
Androstenedion (ng/ml)	1,2 (0,8-1,5)	1,2 (0,9-1,6)	0,321
Prolaktin (ng/ml)	13,7 (11,7-21,0)	15,2 (11,5-21,0)	0,597
Progesteron (ng/ml)	0,6 (0,4-0,9)	0,7 (0,4-1,1)	0,097

Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15'de gösterilen bulgulara göre, CYP19 açısından GG, AG ve AA genotiplerini taşıyan gruplar arasında biyokimyasal ölçüm düzeyleri yönünden Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir (p>0,025). Diğer taraftan, GG genotipini taşıyan gruba göre AG+AA genotipini taşıyan grubun medyan

LH/FSH düzeyinin istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p=0,010$). Buna karşın GG genotipini taşıyan gruba göre AG+AA genotipini taşıyan grubun medyan DHEASO4 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,019$).

Yaş ve beden kitle indeksine göre düzeltme yapıldığında CYP19 için GG genotipine sahip olanlara göre AG+AA genotipini taşıyor olmanın LH/FSH düzeyini istatistiksel anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır ($B=-0,336$; %95 Güven Aralığı: $-0,599 - -0,073$ ve $p=0,013$). Buna karşın yukarıda verilen sonuçlarda, DHEASO4 düzeyi üzerinde GG genotipine göre AG+AA genotipini taşıyor olmanın anlamlı etkisi diğer faktörlere göre düzeltme yapıldığında ortadan kaybolmuştur ($B=0,350$; %95 Güven Aralığı: $-0,002-0,701$ ve $p=0,051$). Yaş ve beden kitle indeksine göre düzeltme yapıldığında düzeltilmiş OP'nin FAI üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değiştirici etkisi görülmemiştir ($p=0,405$).

Hasta grubunda CYP19 genotiplerine göre ölçülen biyokimyasal parametreler arasındaki değişimler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve bulgular Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15'de sunulmuştur.

Çizelge 4.14. Hasta grubu içinde CYP19 genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri I

	GG	AG	AA	p-değeri
LH (IU/L)	10,6 (5,6-17,0)	5,8 (4,3-11,1)	8,0 (3,5-11,2)	0,122
FSH (IU/L)	5,5 (4,1-6,3)	5,5 (4,1-6,6)	6,1 (5,6-6,8)	0,316
LH/FSH	2,1 (1,1-3,2)	1,3 (0,8-1,9)	1,1 (0,6-2,0)	0,028
E2 (pg/ml)	37,2 (25,8-54,2)	34,0 (25,0-48,1)	50,0 (29,0-53,8)	0,764
T.Testosteron (ng/ml)	0,41 (0,28-0,56)	0,36 (0,29-0,54)	0,30 (0,21-0,79)	0,981
E2/T	94,3 (58,0-164,0)	82,4 (51,6-175,0)	86,9 (60,9-191,4)	0,958
17OH Progesteron (ng/ml)	1,6 (1,2-2,3)	1,6 (0,9-2,2)	1,3 (1,0-2,1)	0,605
DHEASO4 (ng/ml)	216,0 (165,1-329,2)	322,9 (224,0-392,0)	264,2 (213,5-399,4)	0,061
SHBG (μ g/ml)	3,6 (2,4-6,4)	3,7 (2,5-5,1)	3,1 (1,7-4,9)	0,610
FAİ	10,2 (5,6-25,0)	11,6 (8,3-18,6)	10,6 (4,0-28,9)	0,958
Androstenedion (ng/ml)	1,3 (0,9-1,7)	1,4 (1,0-1,7)	1,1 (0,7-1,4)	0,380
Prolaktin (ng/ml)	15,3 (12,0-21,2)	18,2 (13,6-21,6)	13,4 (9,3-21,3)	0,385
Progesteron (ng/ml)	0,5 (0,3-1,0)	0,8 (0,5-1,1)	0,6 (0,5-0,9)	0,334

Çizelge 4.15. Hasta grubu içinde CYP19 genotiplerine göre olguların biyokimyasal ölçümleri II

	GG	AG+AA	p-değeri
LH (IU/L)	10,6 (5,6-17,0)	5,9 (4,1-10,9)	0,041
FSH (IU/L)	5,5 (4,1-6,3)	5,9 (4,5-6,6)	0,369
LH/FSH	2,1 (1,1-3,2)	1,3 (0,8-1,8)	0,010
E2 (pg/ml)	37,2 (25,8-54,2)	36,7 (25,1-50,7)	0,675
T.Testosteron (ng/ml)	0,41 (0,28-0,56)	0,35 (0,28-0,58)	0,863
E2/T	94,3 (58,0-164,0)	84,6 (54,2-180,7)	0,804
17OH Progesteron (ng/ml)	1,6 (1,2-2,3)	1,5 (0,9-2,2)	0,345
DHEASO4 (ng/ml)	216,0 (165,1-329,2)	318,9 (223,8-388,0)	0,019
SHBG (µg/ml)	3,6 (2,4-6,4)	3,7 (2,1-4,8)	0,421
FAİ	10,2 (5,6-25,0)	11,6 (6,8-18,4)	0,930
Androstenedion (ng/ml)	1,3 (0,9-1,7)	1,2 (1,0-1,6)	0,970
Prolaktin (ng/ml)	15,3 (12,0-21,2)	16,8 (13,1-21,5)	0,569
Progesteron (ng/ml)	0,5 (0,3-1,0)	0,8 (0,5-1,1)	0,205

Çizelge 4.16’de olgular VKİ açısından normal kilolu ($VKİ < 25.0 \text{ kg/m}^2$) ve fazla kilolu ($VKİ \geq 25.0 \text{ kg/m}^2$) olarak ikiye ayrılarak kontrol ve PKOS gruplarına göre genotiplerin dağılımı ve alel frekansları yönünden tek değişkenli lojistik regresyon analizi sonuçları yer almaktadır. Hem normal kilolu hem de fazla kilolu olgular içerisinde DENND1A açısından PKOS üzerinde sırasıyla; AG genotipi ya da A alelini taşıyor olmanın istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Normal kilolu olgular içerisinde CYP19 açısından GG genotipine karşı AA genotipini taşıyor olmanın PKOS yatkınlığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı ve ters etkisinin olduğu görülmüştür (OO = 0,235; %95 GA: 0,068-0,811 ve $p = 0,022$). Normal kilolu olgular içerisinde CYP19 açısından GG genotipine karşı AG+AA genotipini taşıyor olmanın da PKOS yatkınlığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı ve ters etkisinin olduğu görülmüştür (OO= 0,420; %95 GA: 0,199-0,885 ve $p = 0,023$). Benzer şekilde normal kilolu olgular içerisinde CYP19 açısından G aleline karşı A alelini taşıyor olmanın da PKOS yatkınlığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı ve ters etkisinin olduğu görülmüştür (OO = 0,470; %95 GA: 0,270-0,819 ve $p = 0,008$). Fazla kilolu olgular içerisinde ise CYP19 açısından PKOS üzerinde sırasıyla; AG genotipi ya da A alelini taşıyor olmanın istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi gözlenmemişir ($p > 0,05$).

Çizelge 4.16. Normal ve fazla kilolu bireylerde genotiplerin dağılımı ve alel frekansları

Normal kilolu (VKİ <25,0 kg/m ²)					Fazla Kilolu (VKİ ≥ 25,0 kg/m ²)			
	<i>Kontrol</i>	<i>PKOS</i>	<i>p-değeri</i>	<i>OO (%95 GA)</i>	<i>Kontrol</i>	<i>PKOS</i>	<i>p-değeri</i>	<i>OO (%95 GA)</i>
DENND1A								
<i>GG</i>	55 (%80,9)	42 (%82,4)	-	1,000	33 (%78,6)	41 (%85,4)	-	1,000
<i>AG</i>	13 (%19,1)	9 (%17,6)	0,838	0,907 (0,354-2,321)	9 (%21,4)	7 (%14,6)	0,399	0,626 (0,211-1,860)
DENND1A								
<i>G</i>	123 (%90,4)	93 (%91,2)	-	1,000	75 (%89,3)	89 (%92,7)	-	1,000
<i>A</i>	13 (%9,6)	9 (%8,8)	0,846	0,916 (0,375-2,233)	9 (%10,7)	7 (%7,3)	0,423	0,655 (0,233-1,844)
CYP19								
<i>GG</i>	23 (%33,8)	28 (%54,9)	-	1,000	16 (%38,1)	19 (%39,6)	-	1,000
<i>AG</i>	31 (%45,6)	19 (%37,3)	0,090	0,503 (0,228-1,114)	20 (%47,6)	24 (%50,0)	0,982	1,011 (0,414-2,464)
<i>AA</i>	14 (%20,6)	4 (%7,8)	0,022	0,235 (0,068-0,811)	6 (%14,3)	5 (%10,4)	0,610	0,702 (0,180-2,735)
<i>AG+AA</i>	45 (%66,2)	23 (%45,1)	0,023	0,420 (0,199-0,885)	26 (%61,9)	29 (%60,4)	0,885	0,939 (0,401-2,198)
CYP19								
<i>G</i>	77 (%56,6)	75 (%73,5)	-	1,000	52 (%61,9)	62 (%64,6)	-	1,000
<i>A</i>	59 (%43,4)	27 (%26,5)	0,008	0,470 (0,270-0,819)	32 (%38,1)	34 (%35,4)	0,710	0,891 (0,485-1,636)

4.1.9. PKOS ve kontrol gruplarında Alkilfenollerin (BPA, OP ve NP) miktar tayini

Çizelge 4.17. Hasta ve kontrol grubunda alkilfenol düzeyleri

	Kontrol (n=120)	PKOS (n=102)	p-değeri
BPA (µg/g)	0,16 (0,09-0,45)	0,18 (0,10-0,72)	0,435
OP (µg/g)	0,07 (0,04-0,11)	0,08 (0,05-0,17)	0,020
NP (µg/g)	0,08 (0,05-0,13)	0,09 (0,05-0,21)	0,308

Kontrol grubuna göre PKOS grubunda medyan OP düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p=0,020). BPA ve NP düzeyleri arasında ise herhangi istatistiksel bir anlamlılık gözlenmemiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.18. Normal ve kilolu bireylerde alkilfenol düzeyleri

Normal kilolu (VKİ<25,0 kg/m ²)	Kontrol (n=77)	PKOS (n=54)	p-değeri*
BPA (µg/g)	0,19 (0,09-0,44)	0,18 (0,09-0,79)	0,728
OP (µg/g)	0,07 (0,04-0,13)	0,08 (0,05-0,13)	0,400
NP (µg/g)	0,09 (0,06-0,15)	0,10 (0,06-0,23)	0,524
Fazla kilolu (VKİ≥25,0 kg/m ²)	Kontrol (n=43)	PKOS (n=48)	p-değeri*
BPA (µg/g)	0,14 (0,08-0,47)	0,18 (0,12-0,67)	0,417
OP (µg/g)	0,06 (0,04-0,11)	0,11 (0,06-0,21)	0,009
NP (µg/g)	0,08 (0,04-0,13)	0,09 (0,05-0,20)	0,325

Çizelge 4.18’de bireyler VKİ’lerine göre normal ve fazla kilolu olarak ayrıldığında PKOS ve kontrol grubunda alkilfenol düzeyleri gösterilmektedir. Buna göre fazla kilolu bireylerde OP düzeyi hasta grubunda kontrole göre daha yüksek (p=0,009) iken normal kilolu bireylerde bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.1.10. Alkilfenollere maruziyet ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Çizelge 4.19’da tüm olgular içerisinde alkilfenollere maruziyet ile biyokimyasal ölçümler arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri verilmiştir. Buna göre incelediğimiz biyokimyasal parametreler içinde sadece OP ile SHBG arasında istatistiksel olarak anlamlı ve aynı yönlü korelasyon saptanmıştır. (r=0,166 ve p=0,037). Diğer değişken çiftlerinin birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon görülmemiştir (p>0,05).

Çizelge 4.19. Tüm olgularda BPA, OP ve NP maruziyeti ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki

	BPA (µg/g)		OP (µg/g)		NP (µg/g)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
LH (IU/L)	0,052	0,488	-0,006	0,936	-0,011	0,912
FSH (IU/L)	0,018	0,812	-0,054	0,446	-0,016	0,869
LH/FSH	0,036	0,628	-0,017	0,813	-0,052	0,596
E2 (pg/ml)	-0,049	0,513	-0,061	0,393	0,010	0,923
T.Testosteron (ng/ml)	-0,142	0,060	-0,050	0,483	-0,079	0,426
E2/T	0,069	0,365	-0,026	0,715	0,109	0,279
17OH Progesteron(ng/ml)	-0,057	0,453	0,012	0,867	0,129	0,191
DHEASO4 (ng/ml)	-0,037	0,625	0,017	0,814	-0,121	0,220
SHBG (µg/ml)	0,130	0,121	0,166	0,037	0,092	0,398
FAİ	-0,086	0,312	-0,104	0,202	-0,061	0,579
Androstenedion(ng/ml)	-0,026	0,737	-0,015	0,840	-0,113	0,252
Prolaktin(ng/ml)	0,103	0,172	0,093	0,192	0,113	0,255
Progesteron(ng/ml)	-0,076	0,330	0,020	0,783	-0,046	0,650

Çizelge 4.20. Hasta grubu içinde BPA, OP ve NP maruziyeti ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki

	BPA (µg/g)		OP (µg/g)		NP (µg/g)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
LH (IU/L)	0,147	0,205	-0,043	0,695	0,123	0,439
FSH (IU/L)	-0,037	0,751	-0,101	0,354	0,094	0,554
LH/FSH	0,102	0,380	-0,058	0,594	0,092	0,560
E2 (pg/ml)	0,072	0,538	-0,010	0,924	0,152	0,335
T.Testosteron (ng/ml)	-0,124	0,303	-0,194	0,080	-0,312	0,054
E2/T	0,207	0,083	0,167	0,133	0,453	0,004
17OH Progesteron (ng/ml)	0,089	0,457	-0,002	0,987	0,094	0,553
DHEASO4 (ng/ml)	-0,091	0,438	-0,082	0,454	-0,267	0,095
SHBG (µg/ml)	0,036	0,807	0,247	0,072	0,207	0,289
FAİ	-0,022	0,886	-0,270	0,056	-0,320	0,111
Androstenedion (ng/ml)	0,101	0,400	-0,108	0,333	-0,093	0,558
Prolaktin (ng/ml)	0,060	0,611	0,009	0,934	0,219	0,170
Progesteron (ng/ml)	-0,138	0,279	-0,154	0,192	-0,201	0,239

PKOS grubu içinde BPA, OP ve NP maruziyeti ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki Çizelge 4.20’de verilmiştir. Korelasyon analizi sonucunda, PKOS grubu içinde NP ile E2/T arasında da istatistiksel olarak anlamlı ve aynı yönlü korelasyon saptanmıştır ($r=0,453$ ve $p=0,004$).

4.1.11. PKOS gelişimi üzerinde alkilfenollere maruziyet ve genotiplerin etkisinin beraber incelenmesi

PKOS gelişiminde hem genotiplerin hem de alkilfenollere maruziyetin etkisi beraber incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.21'de verilmiştir. Tüm olgular içerisinde genotipler sabit tutulduğunda sadece CYP19 bölgesinde AG+AA genotipini taşıyan olgular içerisinde kontrol ve PKOS grupları arasında düzeltilmiş düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre PKOS grubunun medyan OP düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,018$). Kontrol ve PKOS grupları içerisinde ise genotipler arasında sırasıyla; medyan BPA, OP ve NP düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.21. PKOS gelişiminde alkilfenollere maruziyet ile DENND1A ve CYP19 genotiplerinin etkisinin incelenmesi

	BPA (µg/g)			OP (µg/g)			NP (µg/g)		
	<i>Kontrol</i>	<i>PKOS</i>	<i>p</i>	<i>Kontrol</i>	<i>PKOS</i>	<i>p</i>	<i>Kontrol</i>	<i>PKOS</i>	<i>p</i>
DENND1A									
<i>GG</i>	0,17 (0,10-0,51)	0,18 (0,11-0,82)	0,631	0,06 (0,04-0,11)	0,08 (0,05-0,17)	0,070	0,08 (0,05-0,13)	0,09 (0,05-0,21)	0,432
<i>AG</i>	0,14 (0,07-0,45)	0,18 (0,09-0,62)	0,722	0,06 (0,03-0,13)	0,09 (0,06-0,19)	0,229	0,07 (0,04-0,15)	0,09 (0,05-0,25)	0,547
<i>p</i>	0,389	0,565		0,776	0,569		0,852	0,915	
CYP19									
<i>GG</i>	0,26 (0,12-0,60)	0,24 (0,09-0,87)	0,886	0,08 (0,05-0,13)	0,09 (0,04-0,17)	0,641	0,09 (0,07-0,15)	0,09 (0,07-0,24)	0,980
<i>AG</i>	0,15 (0,08-0,38)	0,18 (0,12-0,63)	0,437	0,07 (0,04-0,13)	0,08 (0,06-0,20)	0,082	0,08 (0,04-0,13)	0,09 (0,05-0,24)	0,192
<i>AA</i>	0,11 (0,08-0,82)	0,10 (0,05-0,14)	0,376	0,05 (0,04-0,09)	0,07 (0,05-0,12)	0,165	0,07 (0,05-0,12)	0,09 (0,05-0,11)	0,958
<i>p</i>	0,171	0,078		0,160	0,594		0,265	0,778	
CYP19									
<i>GG</i>	0,26 (0,12-0,60)	0,24 (0,09-0,87)	0,886	0,08 (0,05-0,13)	0,09 (0,04-0,17)	0,641	0,09 (0,07-0,15)	0,09 (0,07-0,24)	0,980
<i>AG+AA</i>	0,14 (0,08-0,38)	0,17 (0,11-0,52)	0,636	0,06 (0,04-0,11)	0,08 (0,06-0,17)	0,018	0,08 (0,05-0,13)	0,09 (0,05-0,22)	0,254
<i>p</i>	0,078	0,318		0,137	0,744		0,103	0,865	

4.1.12. PKOS ve kontrol gruplarında yapılan anket çalışmasının analiz sonuçlarına ile birlikte değerlendirilmesi

Çalışmamıza katılan PKOS ve kontrol gruplarına sorulan anket sorularından elde edilen yanıtlar alkilfenol ölçüm sonuçları ve DENND1A, CYP19 genotip sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.22. PKOS ve kontrol gruplarında ilk adet görme yaşlarının dağılımı

		n	Ort	Standart Sapma	p
İlk adet görülen yaş	PKOS	99	12,48 (15-9)	1,296	0,027
	Kontrol	112	12,09 (15-9)	1,284	

İlk kez adet görülen yaşların PKOS ve kontrol grupları arasındaki dağılımı bağımsız değişken t testine göre değerlendirilmiş ve ortalama değerler PKOS ve kontrol gruplarında sırasıyla 12,48 ve 12,09 olarak bulunmuştur Çizelge 4.22 (p=0,027). PKOS grubunun ortalama ilk adet görme yaşı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.23. PKOS ve kontrol gruplarında yaşlara göre alkilfenol düzeylerinin medyan ortalamaları

		PKOS			Kontrol		
		BPA (µg/g) ort	OP (µg/g) ort	NP (µg/g) Ort	BPA (µg/g) ort	OP (µg/g) Ort	NP (µg/g) ort
İlk adet görülen yaş	9	0,05	0,03	.	0,17	0,06	0,10
	10	0,53	0,10	0,09	1,17	0,14	0,13
	11	0,83	0,23	0,12	0,82	0,07	0,09
	12	1,20	0,12	0,12	0,67	0,09	0,09
	13	3,33	0,10	0,15	3,01	0,11	0,11
	14	1,41	0,16	0,15	0,33	0,14	0,13
	15	1,18	0,14	0,34	1,67	0,18	0,10

Çizelge 4.24. PKOS ve kontrol gruplarında alkilfenol düzeyleri ile ilk adet görme yaşları arasındaki korelasyon

			PKOS			Kontrol		
			BPA (µg/g)	OP (µg/g)	NP (µg/g)	BPA (µg/g)	OP (µg/g)	NP (µg/g)
Spearman's rho	İlk adet görülen yaş	Korelasyon katsayısı	0,138	0,083	0,278	-0,073	0,011	-0,067
		p	0,207	0,416	0,065	0,461	0,905	0,600
		n	85	99	45	103	112	63

İlk kez adet görülen yaşların hem PKOS hem de kontrol gruplarındaki yaşlara göre ortalamaları çizelge 4.23’de verilmiştir. Çizelge 4.24’de ise ilk adet görülen yaşların hem PKOS hem de Kontrol gruplarında ölçülen BPA, OP ve NP değerleri ile ilişkin spearman’s rho korelasyon yaklaşımına göre değerlendirilmiş ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Buna göre ilk adet görülen yaşın hem PKOS hem de kontrol gruplarında ölçülen BPA, OP ve NP değerleriyle ilişkili olmadığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.25. PKOS ve kontrol gruplarında alkilfenol düzeyleri ile erken göğüs büyümesi veya erken tüylenme arasındaki ilişkinin karşılaştırılması

			PKOS			Kontrol		
Erken (çocukluk döneminde) göğüs büyümesi veya erken tüylenme gibi şikayetler oldu mu?			BPA	OP	NP	BPA	OP	NP
Evet	Medyan (µg/g)		0,15	0,07	0,08	0,17	0,09	0,0834
	N		38	42	20	37	41	26
	Std. Sapma		6,62	0,07	0,08	1,29	0,067	0,059
Hayır	Medyan (µg/g)		0,28	0,01	0,01	0,14	0,06	0,082
	N		48	58	24	71	76	40
	Std. Sapma		3,76	0,254	0,13	6,01	0,13	0,097
	p		0,209	0,131	0,109	0,749	0,183	0,990

PKOS’lu hastaların ve kontrol gruplarındaki gönüllülerin BPA, OP ve NP maruziyetleri ile erken (çocukluk döneminde) göğüs büyümesi veya erken tüylenme gibi şikayetleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.25). Söz konusu şikayetlerin varlığı ve yokluğu ile BPA, OP ve NP kimyasallarına maruziyet arasında $p < 0,05$ için hem PKOS hem de kontrol grupları içinde anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Çizelge 4.26. PKOS ve kontrol gruplarında erken ergenlik teşhisi ile alkilfenollere maruziyet düzeylerinin karşılaştırılması

		PKOS			Kontrol		
Kızınıza erken ergenlik teşhisi kondu mu?		BPA	OP	NP	BPA	OP	NP
Evet	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,15	0,08	0,06	0,16	0,07	0,09
	N	6	7	2	11	11	8
	Std. Sapma	0,20	0,04	0,04	1,87	0,05	0,04
Hayır	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,19	0,08	0,09	,17	0,07	0,08
	N	81	94	43	99	108	59
	Std. Sapma	5,34	0,21	0,12	5,14	0,12	0,09
p		0,615	0,297	0,295	0,838	0,854	0,588

PKOS ve kontrol grupları içinde erken ergenlik teşhisi konan ve konmayan bireylerdeki BPA, OP ve NP kimyasallarına maruziyet düzeyleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.26). Erken ergenliğin varlığı ve yokluğu açındaki maruziyetleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p<0,05$).

Çizelge 4.27. PKOS ve kontrol gruplarında içme suyu kaynağı ile alkilfenollere maruziyet düzeylerinin karşılaştırılması

		PKOS			Kontrol		
Kızınızın tükettiği içme suyu kaynağı hangisidir?		BPA	OP	NP	BPA	OP	NP
Şehir şebekesi	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,13	0,07	0,06	0,16	0,07	0,09
	N	22	26	14	38	42	24
	Std. Sapma	0,14	0,07	0,07	8,00	0,07	0,12
Hazır su	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,28	0,10	0,10	0,17	0,06	0,08
	N	64	74	31	69	74	42
	Std. Sapma	5,94	0,23	0,13	1,79	,13637	0,05
Kuyu suyu	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,06	0,03	0,08	0,13	0,04	0,08
	N	2	2	1	3	3	1
	Std. Sapma	0,04	0,01	.	0,60	0,04	.
p		0,001	0,029	0,280	0,998	0,654	0,824

PKOS’lu ve kontrol grupları içinde içme suyu kaynağı ile BPA, OP ve NP kimyasallarına maruziyet arasında ilişki olup olmadığı değerlendirilmiştir (Çizelge 4.27). Buna göre PKOS’lu grup içinde BPA ve OP kimyasallarına maruziyetin içme suyu kaynağına bağlı olarak istatistiksel anlamlı düzeyde değiştiği görülmüştür. BPA ve OP için en yüksek maruziyet kaynağının “hazır su”; en düşük maruziyet kaynağının ise “kuyu suyu” olduğu görülmüştür. NP’e maruziyet açısından içme suyu kaynakları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Kontrol grubu içinde içme suyu kaynağı ile BPA, OP ve NP kimyasallarına maruziyet arasında ilişki olup olmadığı değerlendirilmiştir. Buna göre BPA, OP ve NP kimyasallarına

maruziyet düzeyi ile içme suyu kaynağı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Çizelge 4.28. Hazır su tüketim süresi ile alkilfenol maruziyeti arasında ilişkinin PKOS ve Kontrol gruplarında değerlendirilmesi

			PKOS			Kontrol		
			BPA	OP	NP	BPA	OP	NP
Spearman's rho	Hazır su tüketim süresi	Korelasyon katsayısı	0,012	-0,159	-0,255	0,039	0,088	0,057
		p	0,927	0,172	0,159	0,749	0,458	0,721
		N	65	75	32	69	74	42

PKOS ve kontrol gruplarında ayrı ayrı hazır su tüketim süresi ile BPA, OP ve NP kimyasallarına maruziyet arasında korelasyon olup olmadığına bakılmış spearmans's rho analizine göre her iki grup için de BPA, OP ve NP kimyasallarına maruziyet ile hazır su tüketimi arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

Çizelge 4.29. Fast food tüketim sıklığına göre PKOS ve kontrol gruplarında alkilfenol düzeyleri

		PKOS			Kontrol		
Kızınızın hamburger gibi fast food ürünlerini tüketim sıklığı nedir?		BPA	OP	NP	BPA	OP	NP
Ayda 1 kez	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,16	0,08	0,10	0,17	0,06	0,08
	N	30	33	17	32	34	17
	Std. Sapma	2,87	0,07	0,08	0,42	0,18	0,07
Ayda 1-3 kez	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,22	0,08	0,08	0,15	0,08	0,09
	N	20	22	10	34	39	24
	Std. Sapma	9,13	0,16	0,17	2,26	0,09	0,09
Ayda 3-5 kez	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,19	0,07	0,09	0,12	0,05	0,06
	N	13	17	9	16	16	15
	Std. Sapma	4,93	0,09	0,11	1,57	0,05	0,04
Ayda 5 den fazla	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,22	0,09	0,07	0,09	0,05	0,05
	N	8	10	3	8	9	3
	Std. Sapma	0,34	0,07	0,17	1,60	0,05	0,01
p		0,890	0,897	0,868	0,303	0,257	0,076

PKOS ve kontrol gruplarında ayrı ayrı hamburger gibi fast food tüketim sıklığının BPA, OP ve NP kimyasallarına maruziyette anlamlı bir ilişkisinin olup olmadığı değerlendirilmiştir (Çizelge 4.29). Buna göre gerek PKOS'lu grupta gerekse kontrol grubu içinde her 3 kimyasal maruziyeti ile fast food ürünlerinin tüketim sıklığı arasında ilişki bulunamamıştır.

Çizelge 4.30. Teneke kutuda satılan kola, soğuk çay gibi içecekleri tüketme açısından PKOS ve kontrol gruplarında alkilfenol maruziyet düzeyleri

		PKOS			Kontrol		
Kızınız teneke kutuda satılan kola, soğuk çay gibi ürünleri ne sıklıkla tüketiyor?		BPA	OP	NP	BPA	OP	NP
Haftada 1 kez	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,17	0,08	0,06	0,18	0,07	0,08
	N	28	33	14	30	32	22
	Std. Sapma	8,13	0,09	0,12	2,39	,07	0,11
Haftada 1-3 kez	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,17	0,08	0,09	0,12	0,06	0,07
	N	22	24	12	33	34	20
	Std. Sapma	3,68	0,15	0,14818	1,13	0,14	0,07
Haftada 3-5 kez	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,19	0,11	0,16	0,14	0,07	0,12
	N	8	13	7	15	19	10
	Std. Sapma	2,32	0,07	0,12	0,32	0,09	0,04
Haftada 5 den fazla	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,41	0,11	0,13	0,16	0,05	0,05
	N	5	6	2	8	8	5
	Std. Sapma	0,34	0,17	0,08	1,60	0,04	0,02
p		0,656	0,753	0,614	0,424	0,963	0,590

PKOS ve kontrol gruplarındaki bireylerin teneke kutuda satılan kola, soğuk çay gibi ürünleri tüketim sıklıkları ile alkilfenollere maruziyet düzeyleri karşılaştırılmış (Çizelge 4.30) ve bu tarz ürünlerin tüketim sıklığı ile alkilfenollere maruziyet arasında hem PKOS hem de kontrol grubu içinde istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Çizelge 4.31. Plastik malzeme ile kaplanmış gıda maddelerini alma alışkanlığının PKOS ve kontrol gruplarındaki alkilfenol düzeylerine etkisi

		PKOS			Kontrol		
Çocuğunuz için plastik malzeme ile kaplanmış gıda maddelerini (streç film ile kaplanmış sandviç, plastik vakumla kaplanmış ısıtmaya hazır gıda gibi) alma alışkanlığınızın sıklığı nedir?		BPA	OP	NP	BPA	OP	NP
Her zaman	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,17	0,07	0,07	0,83	0,12	0,15
	N	4	5	3	3	4	4
	Std. Sapma	0,14	0,06	0,04	0,50	0,12	0,17
Bazen	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,15	0,07	0,07	0,14	0,07	0,08
	N	40	43	21	61	63	34
	Std. Sapma	2,04	0,09	0,14	1,07	0,13	0,06
Hiçbir zaman	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,30	0,11	0,13	0,24	0,07	0,08
	N	44	54	22	46	52	29
	Std. Sapma	6,93	,25	0,10	7,43	0,08	0,08
p		0,050	0,004	0,044	0,148	0,553	0,304

Plastik malzeme ile kaplanmış gıdaların tüketim sıklıkları ve alkilfenollere maruziyet düzeyleri PKOS ve kontrol grupları içinde ayrı ayrı karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.31) Bu

şekilde kaplanmış gıda maddelerinin tüketim sıklığı ile BPA, OP ve NP kimyasallarına maruziyet arasında PKOS grubu içinde istatistiksel olarak anlamlı (p değerleri sırasıyla 0,05; 0,004; 0,044) ilişki bulunurken; kontrol grubu içinde istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Çizelge 4.32. Plastik kap içinde mikrodalga fırında ısıtılmış yemek tüketimi açısından BPA, OP ve NP'e maruziyet düzeylerinin karşılaştırılması

		PKOS			Kontrol		
Çocuğunuz için mikrodalga fırında plastik kap içinde yemek ısıtır mısınız?		BPA	OP	NP	BPA	OP	NP
Evet	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,10	0,06	0,07	0,33	0,11	0,13
	N	6	6	5	8	9	7
	Std. Sapma	0,04	0,03	0,02	1,71	0,05	0,13
Hayır	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,18	0,08	0,09	,16	0,06	0,08
	N	79	92	39	100	108	60
	Std. Sapma	5,40	0,21	0,12	5,11	0,12	0,07
Eskiden ısıtırdım	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,82	0,17	0,33	2,38	0,05	-
	N	3	4	2	2	2	-
	Std. Sapma	0,32	0,09	0,02	3,25	0,01	-
p		0,069	0,123	0,063	0,186	0,305	0,163

Mikrodalga fırın içinde plastik kap içinde yemek ısıtılmasının alkilfenol maruziyetine etkisi PKOS kontrol grupları içinde karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.32). Söz konusu şekilde ısıtılmış yemeklerin halihazırda, geçmişte tüketilmesi veya hiç tüketilmemesi arasında alkilfenollere maruziyet yönünden istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Çizelge 4.33. PKOS ve kontrol grupları içinde plastik biberon, emzik ve/veya suluk kullanımının alkilfenollere maruziyet ilişkisinin değerlendirilmesi

		PKOS			Kontrol		
Çocuğunuz bebeklik döneminde plastik yapıda biberon, emzik ve/veya suluk kullandı mı?		BPA	OP	NP	BPA	OP	NP
Evet	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,18	0,08	0,08	0,17	0,07	0,09
	N	73	81	33	85	94	54
	Std. Sapma	5,61	0,22	0,12	5,40	0,13	0,09
Hayır	Medyan ($\mu\text{g/g}$)	0,17	0,12	0,14	0,12	0,05	0,07
	N	15	21	13	25	25	13
	Std. Sapma	0,58	0,08	0,11	2,59	0,05	0,04
p		0,803	0,707	0,218	0,229	0,238	0,254

Bebeklik döneminde plastik yapıdaki biberon, emzik ve/veya suluk kullanımının alkilfenol maruziyetine olan etkisi PKOS ve kontrol grupları içindeki ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Çizelge 4.33) Bu yapıdaki ürünlerin kullanımı ile alkilfenollere maruziyet düzeylerine arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Çizelge 4.34. Amalgam olmayan kompozit dolgu diş kullanımının BPA düzeyine etkisi

Çocuğunuzun ağızında kompozit (amalgam olmayan renksiz) dolgu diş var mı?	BPA Medyan ($\mu\text{g/g}$)	Std. Sapma
Evet (n=42)	0,17	6,52
Hayır (n=46)	0,18	3,48
p	0,973	

PKOS'lu grup içinde ağızında dolgu (amalgam olmayan kompozit yapıda) kullananların BPA düzeyleri ile dolgu kullanmayanların BPA düzeyleri Çizelge 4.34'te gösterilmiştir. Buna göre bu yapıdaki dolgunun varlığı ve yokluğu arasında BPA maruziyet düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çizelge 4.35. Bireylerin kullandıkları oyuncak materyalinin PKOS ve kontrol grupları arasında dağılımı

	Çocuğunuzun oynadığı oyuncaklar daha çok hangi tip materyalden yapılmıştır?		
	Çoğu Plastik	Çoğu Metal	Çoğu Ahşap
PKOS (n)	94	0	3
Kontrol (n)	100	2	4

Bireylerin oynadıkları oyuncakların yapısı ile PKOS olma durumu arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığına spearman's who analizi ile bakıldı. Oyuncakın materyali ile PKOS olup olmamak arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı. ($p=0,338$)

Çizelge 4.36, çizelge 4.37 ve çizelge 4.38'te CYP19 genotipi AA+AG olan PKOS'lu hastaların ilk adet görme yaşı ve OP maruziyet düzeyi arasındaki ilişki; erken göğüs büyümesi veya erken erlen tüylenme varlığının ile OP maruziyet düzeyi arasındaki ilişki ve son olarak erken ergenlik teşhisinin ile OP maruziyet düzeyi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.36. İlk adet görülen yaşlara göre medyan OP düzeyleri ortalaması

İlk Adet Görülen Yaş	OP Medyan ($\mu\text{g/g}$)	N	Std. Sapma
9	0,03	1	.
10	0,09	1	.
11	0,07	10	0,546
12	0,07	20	0,071
13	0,09	11	0,081
14	0,24	4	0,174
15	0,11	4	0,076
Tüm yaşlar	0,08	51	0,25524

AA+AG genotipine sahip PKOS'lu bireylerin ilk adet görülen yaşları ve bu yaşlara ait medyan ortalama OP düzeyleri Çizelge 4.36'te gösterilmiştir. İlk adet görme yaşı ve OP maruziyetine ilişkin korelasyon spearman's rho analizine göre değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ($p=0,136$) bulunamamıştır.

Çizelge 4.37. Erken göğüs büyümesi veya erken tüylenme şikayetleri varlığı ile OP maruziyet düzeyi ilişkisi

Kızınızda erken göğüs büyümesi veya erken tüylenme gibi şikayetler oldu mu?	OP Medyan ($\mu\text{g/g}$)	N	Std. Sapma	p
Evet	0,07	25	0,063	0,036
Hayır	0,12	26	0,345	

AA+AG genotipine sahip PKOS'lu bireylerin erken göğüs büyümesi veya erken tüylenme gibi şikayetlerin varlığı yokluğu ile OP maruziyet düzeyleri arasındaki ilişki incelenmiş ve erken göğüs büyümesi veya erken tüylenme gibi şikayetleri olan bireylerdeki OP düzeyleri bu tarz şikayetleri olmayanlara göre anlamlı olarak ($p=0,036$) düşük çıkmıştır.

Çizelge 4.38. Erken ergenlik teşhisi varlığının OP düzeyine etkisi

Kızınıza erken ergenlik teşhisi kondu mu?	OP Medyan ($\mu\text{g/g}$)	N	Std. Sapma	p
Evet	0,06	5	0,037	0,087
Hayır	0,09	46	0,266	

AA+AG genotipine sahip PKOS'lu bireylerde erken ergenlik teşhisinin varlığı ve yokluğu ile OP maruziyet düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığına bakıldı. Buna göre erken ergenlik teşhisinin varlığı ve yokluğu ile OP maruziyeti arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

5. TARTIŞMA

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bir hastalığın gelişiminde, genetik faktörlerin veya çevresel maruziyetlerin tek başına etkisinden çok beraber etkisinin daha önemli olduğunu göstermektedir. Bu tarz gen-çevre etkileşimini inceleyen çalışmaların başlıca hedefi, bir hastalığın gelişiminde genetik ve çevresel faktörlerin bir arada etkilerini ortaya koymaktır.

PKOS, üreme çağındaki kadınların %5-10'unu etkileyen ve etiyolojisi tam olarak bilinmeyen yaygın bir endokrin bozukluktur. PKOS, tipik olarak ergenlik döneminde gözlenen ve ileri yaşlarda tip 2 diyabet gibi ikincil hastalıkların gelişme riskini arttıran metabolik bozukluklar ile ilişkilendirilmektedir. PKOS'un patojenezisi tam olarak aydınlatılamamış olsa da, hem genetik hem de çevresel faktörlerin önemli etkilerinin olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Bu nedenle PKOS'un heterojenik bir bozukluk olması gen-çevre etkileşimi ile açıklanabilir[12,136]

PKOS gelişimindeki başlıca patojenik mekanizma, hiperandrojenizmdir. Bu nedenle, aday gen yaklaşımına göre, androjen üretimi ve metabolizması ile ilgili yollardaki genler, endokrin düzenleyici LH ve reseptörleri ve CYP19 gibi anahtar P450 steroidojenik enzimlerini içeren pek çok genin, PKOS gelişimindeki rolü çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Ayrıca, yakın zamanda yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmasında (GWAS), PKOS ile en çok ilişkili bulunan genlerden birinin DENND1A olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda başlıca hedeflerimizden ilki, CYP19 ve DENDD1A geni ile PKOS arasındaki ilişkinin belirlenmesi olmuştur. Ayrıca Türk popülasyonunda DENND1A rs10818854 genotip dağılımı ve alel sıklıkları ilk defa çalışmamızda incelenmiştir. DENDD1A genindeki rs10818854 varyasyonu ile ilgili literatürde fazla çalışma yoktur. Şu ana kadar yayınlanan çalışmalar Çin popülasyonunda [21] , Avrupa popülasyonunda [23,137,138] ve Arap popülasyonunda yapılmıştır [71,139]. Çin popülasyonunda varyant alel (A) sıklığı 0,079; Avrupa popülasyonunda 0,038-0,073 olarak bildirilmiştir. Arap popülasyonunda yapılan çalışmalarda varyant alel sıklığı 0,059-0,09 arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda ise varyant alel sıklığı kontrol grubunda %10 bulunmuştur. Bu durumda daha önce yukarıda sıralanan popülasyon çalışmaları içinde en fazla varyasyon Türk popülasyonunda gözlenmiştir. Ancak bu sonucun doğrulanması ve dünya popülasyonu içinde DENND1A rs10818854 sıklığı açısından Türk popülasyonunun

yerinin belirlenmesi için daha fazla örnek sayısında yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde PKOS'un görülme sıklığının artması nedeniyle, genetik faktörlerin daha geniş kapsamlı incelenerek aday gen yaklaşımının tüm genom ile ilişkilendirilmesini amaçlayan ilk çalışma 2011 yılında Chen vd. tarafından yapılmıştır. PKOS ile ilgili Çin popülasyonunda yapılan "tüm genom ilişkilendirme çalışması (GWAS)" olan bu çalışmada 2p16.3, 2p21 ve 9q33.3 kromozomlarında duyarlılık bölgeleri tespit edilmiştir. Bu bölgelerdeki tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) incelenmiş ve 11 aday gen belirlenmiştir. Bu genler, DENND1A, INSR, YAP1, C9orf3, RAB5B, HMGA2, TOX3, SUMO1P1/ZNF217, THADA, FSHR ve LHCGR'dir [21]. Çin popülasyonunda yapılan bu çalışmanın ardından Avrupa ırkında yapılan çalışmalar da bu gen bölgelerinin PKOS ile ilişkisini doğrulamaktadır [22,23,137]. Goodarzi vd. (2012) yaptıkları iki kohort çalışmada, inceledikleri DENND1A rs10818854 polimorfizminin her ki kohortta da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p=0,00014$ ve $p=0,0002$) PKOS ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Tian vd. (2020) tarafından PKOS hastaları içindeki İD ve metabolik sendromun genetik polimorfizmlerle incelendiği bir çalışmada DENND1A rs10818854 polimorfizminin PKOS'lu hastalarda İD'e istatistiksel anlamlı katkıda bulunduğu görülmüştür. DENND1A over teka hücrelerinde ve adrenol zona retikularis'de yüksek oranda eksprese olmaktadır. Her iki doku da androjen üreten dokular olarak bilinmektedir. Teka hücreleri, overde östrojen biyosentezi için gerekli olan androjeni üreten ve dolayısıyla fertilitede çok önemli rolü olan, over follikülleri ile ilgili endokrin hücrelerdir. İnfertiliteye neden olan en yaygın endokrin bozukluk, teka hücrelerinin aşırı proliferasyonu sonucunda meydana gelen hiperandrojenizmdir [140].

Çalışmamızda PKOS'a genetik yatkınlıkta DENDD1A rs10818854 polimorfizminin etkisine baktığımızda, kontrol ve hasta grubu arasında DENND1A rs10818854 polimorfizmi açısından herhangi istatistiksel bir farklılığa rastlanmamıştır. Dolayısıyla yukarıda örnekleri verilen popülasyonlarda PKOS ile sözü edilen varyasyon arasında pozitif yönde bulunan ilişki Türk popülasyonunda gözlenmemiştir.

PKOS'un, klinik ve biyokimyasal özellikleri, heterojen bir yapı göstermekle beraber, hastaların hepsinde ortak olan biyokimyasal özellikler, PKOS'un genetik temelini belirlemeye yönelik olarak, endokrin/metabolik yollar ve bu yollardaki aday genler ile ilgili çalışmalar yapılmasına olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar, PKOS'un

gelişiminde pek çok genin rol aldığını göstermektedir. Bu nedenle oligogenik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir. Üreme sisteminde, insülinin etki ve salgılanmasında, obezite ve enerji regülasyonunda rol oynayan genler, aday genler olarak kabul edilmiş ve bu genlerdeki bozukluklar veya mutasyonlar ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu genlerden özellikle androjen biyosentez yolağındaki steroidojenik enzimleri kodlayan genler hakkındaki çalışmalar son zamanlarda yoğunlaşmıştır [18]. Androjenin aşırı üretimi, PKOS'unun en önemli fizyopatolojik özelliğidir. Bu nedenle, androjen metabolik yolağındaki pek çok gen (HSD17B6, CYP19, CYP11A1, CYP17 ve INSR gibi) araştırılmış ve PKOS ile ilişkilendirilmiştir [19]. Son zamanlarda çalışılan genlerden biri de CYP19 genidir. 15. kromozomun uzun kolunda 15q21.2 pozisyonunda bulunan bu gen, östrojen biyosentezindeki son basamakta rol alan ve C19 sterodilerinin (androjenler), C18 (östrojenler)'e dönüşümünü katalize eden aromataz enzimini kodlamaktadır [20]. Dolayısıyla CYP19 genindeki varyasyonlar, reseptöre bağlanacak östrojen miktarını veya direkt olarak androjen reseptörüne bağlanacak testosteron miktarını etkileyebilmektedir. CYP19 geninde pek çok tek nükleotid polimorfizmi belirlenmiştir. Bu polimorfizmlerden bazılarının aynı veya farklı etnik gruplardaki kadınlarda serum androjen seviyelerinde farklılıklara neden olduğu saptanmıştır [69]. Ayrıca aromataz enzim eksikliği olan bazı hastalarda hiperandrojenizm durumu gözlenmiştir [141]. Hiperandrojenizm, PKOS hastalarında da karakteristik bir bulgu olduğundan, CYP19 genindeki varyasyonlar PKOS hastalarında da incelenmiştir. Çalışmaların bazılarında aromataz enziminin regülasyonundaki değişikliklerin PKOS gelişimi ile ilgili olabileceği bildirilmiştir [68,70]. Jin vd. (2009) CYP19 genindeki rs2414096 polimorfizminin PKOS ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [20]. Wang vd. (2011) yaptıkları 1078 örnekle geniş bir vaka-kontrol çalışmasında Arg214Cys varyasyonunun (rs700519) PKOS ile ilişkili olduğunu ($p=0.004$) belirtmişlerdir [142]. Jiang vd. (2010) ise 1402 örnekle bir çalışmada rs2470152 ve rs2899470 polimorfizmlerinin aromataz aktivitesini etkilediğini bildirmiştir (p değerleri sırasıyla 0.023; <0.001) [143]. Bir diğer çalışmada ise farklı etnik gruplarda 5 adet farklı tek nükleotid polimorfizmi incelenmiş ve beyaz Avrupa ırkında rs2414096 polimorfizmine sahip mutant genotipi taşıyanlarda anlamlı olarak düşük seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) seviyesi gözlenmiştir. İncelenen diğer polimorfizmlerde etnik gruplar arasında değişmekle beraber, serum androjen seviyelerinde farklılıklara neden olduğu belirtilmiştir [69].

Türkiye'de farklı üç çalışmada CYP19 polimorfizminin jinekomasti, postmenapoz ve meme kanseri ile ilişkisi araştırılmış olmasına rağmen günümüze kadar PKOS-CYP 19 polimorfizmi ilişkisini araştıran herhangi bir çalışma yapılmamıştır [24–26]. CYP19 rs2414096 genetik varyasyonu ile ilgili olarak ülkemizde yapılmış olan tek çalışmada ise rs2414096 tek nokta polimorfizminin erkeklerde olağandışı östrojen artışına bağlı olarak ortaya çıkan jinekomasti üzerindeki etkisi incelenmiş ancak polimorfizm ile jinekomasti arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [26].

Çalışmamızda CYP19 rs2414096 genetik varyasyonu ile PKOS gelişimine bireysel duyarlılık arasındaki ilişki incelenmiştir. Öncelikle çalışmamızın kontrol grubunda bulduğumuz varyant alel sıklığı (0,41) daha önce Eren vd (2014) tarafından Türk popülasyonunda yapılan çalışmada bulunan sıklık (%40) ile benzerdir [26]. Çalışmamızın sonuçları, CYP19 GG genotipi taşıyan bireylerin AA genotipi taşıyanlara göre PKOS gelişimine daha yatkın olduğunu göstermektedir. Bu sonuç G aleli için de yine aynı şekildedir. Ancak istatistiksel değerlendirme sonucunda elde ettiğimiz Odds oranlarına göre bu ilişkinin çok da kuvvetli bir ilişki olmadığı görülmektedir. Diğer taraftan CYP19 rs2414096 için wild alel 'G' aleli olduğundan aromataz aktivitesinin 'A' aleli taşıyanlarda daha düşük olmasını beklemekte idik ancak sonuçlarımız belki de aromataz aktivitesinden bağımsız olarak PKOS riskinin arttığını düşündürmektedir. CYP19 genindeki rs2414096 polimorfizmi ekzonda değil de intronda yer aldığı için farklı formları düzenleyici sekansları etkileyebilir. Bu nedenle 'A' aleli, overleri PKOS gelişiminden koruyan farklı hormonların normal fonksiyonu ile ilgili olabilir. Diğer taraftan 'G' aleli taşıyanlarda bu hormonların aktivitesindeki düşüş overlerde hiperandrojenizm sonucu PKOS gelişimine neden olabilir [20,144]. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Jin vd (2009)'de 'A' alelinin aromataz aktivitesi ile ilişkili olarak androjenin östrojene normal dönüşümü ile ilgili olduğunu göstermiştir. Ayrıca aynı çalışmada AA genotipini taşıyan PKOS hastalarında aromataz aktivitesinin göstergesi olan estradiolun testosterona oranının AG ve GG genotiplerini taşıyanlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise bizim sonuçlarımızdan farklı olarak 'A' aleli taşıyan ve PKOS gelişimine yatkın olan erken ergenliğe girmiş kızlarda testosteron seviyesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak bu çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki en büyük fark, hasta grubu olarak PKOS'un seçilmemiş olması sadece PKOS gelişme olasılığının değerlendirilmesidir.

İran popülasyonunda 2017 yılında yapılan bir çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla oldukça benzerlik göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre ‘A’aleli taşıyan birey sıklığı kontrol grubunda PKOS grubuna göre daha yüksek bulunmuştur [144]. Kuzey Hindistan'da yapılan bir çalışmada ise PKOS gelişim riski ile CYP19 rs2414096 polimorfizmi arasında bir ilişki saptanmamıştır. 2020 yılında yapılan 1414 PKOS hastası, 1276 kontrol bireyinin tarandığı bir meta analiz sonucuna göre rs2414096 polimorfizminin PKOS ile ilişkili olduğu bulunmuştur [145]. Özetle rs2414096 SNP polimorfizminin PKOS gelişim riskinin değerlendirildiği 2005 ile 2021 yılları arasındaki 11 çalışmanın biri dışında tamamında rs2414096 polimorfizminin PKOS ile anlamlı bir ilişkisi olduğu görülmüştür [146].

Çalışmamızda PKOS ve kontrol grubunu incelediğimiz biyokimyasal parametreler açısından kıyasladığımızda PKOS grubunda LH, LH/FSH, T.testosteron, DHEASO₄, FAI ve prolaktin düzeylerinin kontrole göre daha yüksek; E₂ ve E₂/T değerlerinin kontrole göre daha düşük olduğunu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, PKOS'un hiperandrojenizm kaynaklı bir bozukluk olduğu düşünüldüğünde oldukça uyumludur. PKOS'ta ovülasyonu sağlayan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) salınımlarında düzensizlikler görülmüştür. LH, FSH'a göre daha fazla salgılanmakta bu da teka hücrelerinin stimülasyonu sonucunda androjen yapımına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da androjen periferel dokularda testosterona dönüşmektedir. PKOS'ta kandaki androjen miktarının artması Seks-hormonubağlayıcı globulini (SHBG) miktarının azalmasına neden olmaktadır. Kandaki SHBG düzeyinin azalması serbest testosteron ve estradiol (E₂) düzeylerinin artmasına neden olmaktadır.

PKOS'ta bazı biyokimyasal parametrelerin “T.Testosteron>3 ng/mL (%50-150 artış), Serbest testosteron indeksi >7, LH/FSH oranı >2” gibi değişimleri de söz konusudur [58]. Free Androjen Index (FAI) olarak tanımlanan ve toplam testosteron seviyesinin SHBG'e oranı olarak ifade edilen FAI de androjen yoğunluğunu gösteren bir parametre olması nedeniyle PKOS için kullanılan parametrelerden biri olmuştur. Kontrol ile PKOS'lu ve/veya hiperandojenizmi olan hastaların FAI değerleri mukayese edildiğinde, PKOS'lu ve/veya hiperandojenizimli hastalarda FAI'nin kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek çıktığını gösteren birçok çalışma mevcuttur [147–150].

Östradiol (E2) ve Toplam Testosteron (T) oranı olan E2/T aromataz aktivitesinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir [20,151]. Aromataz aktivitesindeki düşüklüğün hiperandrojenizme sebebiyet vermesi, E2/T oranının PKOS'lu hastalarda düşük olabileceği düşüncesine neden olmuştur. Birçok çalışmada E2/T oranının PKOS'lu hastalarda kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır [76].

Çalışmamızda ayrıca biyokimyasal parametreler üzerinde genotiplerin etkisini de incelenmiştir. DENND1A polimorfizminin bu parametreler üzerine bir etkisini görülmemiştir. Ancak CYP19 AG (heterozigot) ve AA (mutant) genotipler beraber değerlendirildiğinde, GG genotipini taşıyan gruba göre AG+AA genotiplerini taşıyan grubun medyan LH ve LH/FSH düzeylerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, CYP19 G alelini taşıyanlarda hiperandrojenizm bulgusunun daha yüksek olduğunu göstermektedir ki bu da PKOS riski açısından CYP19 G alelini taşıyan bireylerin daha duyarlı olduğu sonucuyla uyumludur.

Polikistik over sendromu etiyolojisi, sadece genetik yatkınlık ile açıklanamayacak oldukça karmaşık bir hastalıktır. Bu nedenle çalışmamızda dünyada yaygın maruziyetin söz konusu olduğu alkilfenol bileşiklerine maruziyet düzeyleri de incelenmiştir. Alkilfenoller "endokrin bozucular" olarak isimlendirilen ve normal endokrin fonksiyonları bozan bileşiklerdir. Endokrin bozucular, steroid hormon reseptörleriyle etkileşerek bu hormonların sentezini bozan doğal veya sentetik yapıda heterojen moleküllerdir. İçinde bisfenol (BPA), oktilfenol, nonilfenol gibi önemli önemli üyelerini barındıran ve "alkilfenoller" olarak adlandırılan kimyasallar, maruziyeti en yaygın olan endokrin bozucular olup, günlük yaşantımızda kaçınılmaz olarak beraber yaşadığımız kimyasallardır. Bu bileşiklerin plastik, kozmetik, temizlik ve pestisit endüstrisi gibi yaygın amaçlı ve çok fazla miktarlarda üretimi, çevrede yayılmaları ve insanların maruziyeti ile sonuçlanmaktadır. Endokrin bozuculara maruziyet sonucunda pek çok metabolik bozukluk ve hatta hormona bağlı neoplazilerin geliştiği gösterilmiştir. Bazı çalışmalar, özellikle Bisfenol A (BPA)'nın PKOS patojenezindeki potansiyel rolüne de dikkat çekmiştir. BPA'nın etkin bir seks hormon bağlacıyıcı globulin (SHBG) ligandı olduğu ve konsantrasyonunun artmasıyla birlikte SHBG bağlanma bölgelerinde androjenlerin yerini alarak, dolaşımdaki serbest androjen konsantrasyonunun artmasına neden olduğu bilinmektedir. Diğer alkilfenollerden oktilfenol ve nonilfenol ile ilgili çalışmalar ise sınırlı sayıdadır. Yapılan in-vitro ve in-vivo çalışmalar, alkilfenollerin östrojen aktivitesi olduğunu östrojen reseptörlerine bağlandığını göstermektedir. Ayrıca

BPA'nın endojen östrojenlerin etkisini inhibe ettiğine dair de kanıtlar bulunmaktadır [14,152]. Bu etkileri nedeniyle alkilfenoller, endokrin bozucu kimyasallar sınıfında yer almaktadır [15]. Endokrin bozucu bileşikler, normal homeostaz, üreme ve gelişimden sorumlu endojen hormonların sentezi, salınımı, taşınması ve metabolizmasını etkileyen ekzojen bileşiklerdir [152]. Ergenlerin özellikle ailesel diyet alışkanlıkları veya diyet alışkanlıklarının aileden farklılık göstermesi başta alkilfenoller gibi endokrin bozucu bileşiklere fazladan maruziyet riskini de beraber getirmektedir. Bu durum, fazladan sağlık risklerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunun idrar örneklerinde BPA, OP ve NP düzeylerini ölçerek PKOS ile bu kimyasallara maruziyet arasında bir riskin söz konusu olup olmadığını araştırdık. Çalışmamızın sonuçları sadece OP düzeylerinin PKOS grubunda kontrole göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. BPA ve NP ile ilgili herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlemlenmemiştir. Bu anlamlılık, bireyleri VKİ'lerine göre normal ($VKİ < 25,0 \text{ kg/m}^2$) ve fazla kilolu ($VKİ \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$) olarak ayırdığımız da sadece fazla kilolu bireylerde devam etmektedir. Bu sonuç muhtemelen alkilfenol bileşiklerinin vücutta yağ dokusunda birikim göstermesi ile ilgilidir.

Endokrin bozucu bir kimyasal olarak BPA'nın, PKOS patojenezindeki rolü ile ilgili güncel çalışmalar Çizelge 5.1'te özetlenmiştir. Burada özetlenen 11 çalışmanın biri dışında tamamında organizmadaki BPA düzeyinin PKOS gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. PKOS'lu kadınlarda BPA ölçümü için sıklıkla ELISA yönteminin de kullanılmış olduğu görülmektedir. ELISA yönteminde antikor özgüllüğünün düşük olması ve matriks etkileri nedeniyle biyolojik örneklerdeki BPA olduğundan farklı miktarlarda tespit edilebilmektedir. ELISA dışında tercih edilen yöntemler LC-MS ve LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS, HPLC-MS/MS veya floresan, elektrokimyasal, UV dedektörlerden birinin kullanıldığı sıvı kromatografisi gibi yöntemleridir. Kullanılan ölçüm yöntemi, analiz edilen biyolojik numune ve örneklem büyüğü vaka kontrol çalışmalarında analitin PKOS için anlamlı bir risk faktörü olup olmadığı için önemlidir.

Tam olarak açıklık kazanmasa da PKOS ve BPA maruziyeti arasındaki ilişki ile ilgili çeşitli hipotezler mevcuttur. BPA maruziyeti sonucunda androjen seviyesinin artması farklı mekanizmalarla açıklanmaktadır. Sıçan over hücrelerinin in vitro olarak BPA'ya maruziyeti

sonucunda testosteron sentezinin arttığı gözlenmiştir [153]. Bu artışın, BPA'nın CYP enzimleri üzerindeki etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [154]. Bunun yanında, androjenlerin, uridindifosfatglukronosiltransferaz (UGT) aktivitesini azaltma yoluyla BPA atılımını etkileyerek de serum BPA düzeyinin artmasına neden oldukları gösterilmiştir [155]. Ayrıca, BPA'nın karaciğerde androjen metabolizmasını değiştirerek ve potent SHBG bağlayıcı gibi davranıp androjenlerin yerine geçerek, serumda serbest androjen konsantrasyonunun artmasına neden olabileceği belirtilmektedir [156]. Bu konudaki çalışmaların sayısı az olmasına rağmen sonuçları birbiriyle oldukça uyumludur. Ancak BPA'nın PKOS gelişiminin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu henüz açıklığa kavuşmamıştır. Bu nedenle PKOS ve BPA arasındaki ilişki çift yönlü olarak kabul edilmektedir [157].

Diğer alkilfenoller ve PKOS arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların literatürdeki sayısı son derece azdır. Oktilfenol-PKOS ilişkisinin değerlendirildiği bir çalışma bilimsel veri tabanlarınca bildirilirken, nonilfenol-PKOS arasındaki ilişkiyi bildiren bir çalışmaya günümüze kadar rastlanılmamıştır. Ting-ting vd (2011) tarafından yapılan ve 60 PKOS hastasında oktilfenol maruziyetinin incelendiği çalışmada hastalığın etiyolojisi ve maruziyet arasında herhangi bir ilişki bulunmamış ancak, oktilfenol maruziyetinin hasta grubunda insülin direncini değiştirdiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmaya göre bizim çalışmamızda örnek sayısının daha yüksek olması, istatistiksel analizi de kuvvetlendirmektedir.

Çalışmamızda alkilfenol maruziyeti ile genotipin etkisini beraber inceleyerek PKOS gelişiminde hem genetik hem de çevresel maruziyetin önemini araştırdık. Sonuçlarımız DENND1A polimorfizmi ile alkilfenol maruziyetinin PKOS gelişimi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gösterdi. CYP19 polimorfizmi açısından değerlendirdiğimizde ise heterozigot ve mutant genotipe sahip olan bireylerde PKOS grubunda kontrole göre daha yüksek düzeyde OP konsantrasyonuna rastlanmıştır. Bu durum hem OP maruziyetinin hem de CYP19 A alelinin PKOS gelişiminde riski arttırdığını göstermektedir.

Literatürde şu ana kadar yapılan çalışmalarda PKOS ile alkilfenol ve CYP19 genetik polimorfizminin beraber incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla sonuçlarımızı benzer çalışmalar ile kıyaslanamamıştır. Ancak özellikle örnek sayısının arttırıldığı ve ilişkinin istatistiksel olarak daha güçlü değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak çalışmamızın bulguları PKOS gelişiminde LH, LH/FSH, T. testosteron, DHEASO₄ ve prolaktin seviyelerinin belirleyici olduğunu, aynı zamanda aromataz aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilen E2/T oranının PKOS'da düştüğünü, hiperandrojenizm göstergesi olan FAI'nin ise arttığını göstermektedir. Değerlendirdiğimiz genotipler açısından ise DENDD1A rs10818854 genetik polimorfizminin Türk popülasyonunda ilk kez sıklığı belirlenmiş ancak aynı popülasyonda PKOS gelişimi açısından genetik duyarlılığa neden olmadığını göstermiştir. CYP19 rs2414096 genetik polimorfizminin ise aromataz aktivitesinden bağımsız olarak PKOS gelişimine yatkınlıkta rol oynadığını söylenebilir.

Çalışmamızda BPA, OP ve NP maruziyeti ile PKOS gelişimi arasındaki ilişkiye baktığımızda sadece OP maruziyetinin zayıf da olsa PKOS gelişiminde rol oynadığını ve bu riskin CYP19 A aleli taşıyanlarda daha yüksek olduğu söylenebilir. Çalışmamız hem alkilfenollerin PKOS gelişimindeki rolünün incelenmesi hem de DENDD1A rs10818854 ve CYP19 rs2414096 polimorfizmleri sıklığının belirlenmesi açısından Türk popülasyonunda yapılmış ilk çalışmadır. Ancak bulgularımızın desteklenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 5.1. PKOS ve BPA maruziyeti arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bazı çalışmalar

Analiz Yöntemi	Analiz Edilen Biyolojik Örnek	Çalışma Özeti	Referans
HPLC	İdrar	PKOS'lu bireylerin idrarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek BPA seviyesi bulunmuştur.	[63]
Kompetitif Elisa	Serum	PKOSlu bireyler, sağlıklı kadınlar ve sağlıklı erkek katılımcılarda BPA maruziyetleri ölçülmüş; PKOS'lu kadınlarda ve sağlıklı erkeklerdeki serum BPA düzeyi sağlıklı kadın bireylere göre yüksek bulunmuştur.	[158]
Kompetitif Elisa	Serum	PKOS'lu bireylerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek serum BPA seviyesi bulunmuştur.	[155]
İzotop seyreltme kütle spektroskopisi	İdrar	PKOS ve kontrol grupları arasında idrar BPA düzeyleri yönünden anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.	[159]
HPLC	Serum	PKOS'lu bireylerde kontrol grubuna göre serum BPA konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur.	[160]
ELISA	Serum	PKOS'lu kadınlarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek serum BPA seviyeleri gözlenmiştir.	[161]
ELISA	Serum	PKOS'lu kadınlarda sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek serum BPA seviyeleri gözlenmiştir.	[156]
HPLC	Serum	PKOS'lu adölesanların serum BPA seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.	[16]
HPLC	İdrar	PKOS'lu adölesanların idrar BPA seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.	[162]
ELISA	Serum	PKOS'lu kadınların serum BPA seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.	[163]
HPLC-MS/MS	Serum	PKOS'lu kadınlar ile kontrol grupları arasında serum BPA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.	[164]

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir hastalığın gelişiminde Gen-çevre etkileşimini inceleyen çalışmaların başlıca hedefi, genetik ve çevresel faktörlerin bir arada etkilerini ortaya koymaktır. Yapılan bu çalışma günümüzde kadınlarda görülme sıklığı giderek artan bir üreme hastalığı olan PKOSun gelişiminde gen-çevre etkileşiminin incelendiği ilk çalışma olması itibarıyla önemlidir. Bu çalışmanın önemi ayrıca PKOS etiyojisine katkı sağlayacak gen polimorfizmlerinin ve önemli çevresel faktörlerden endokrin bozucu kimyasalların bu hastalığa katkısının ayrı ayrı incelenip, bir arada değerlendirilmesinden gelmektedir. Bu yönü ile bugüne kadar yapılan çalışmalardan öne çıkmaktadır. Çalışma bu konuda ileride yapılacak çalışmalara da yol gösterecek yeni sonuçların ortaya çıkmasını sağlamıştır. İleride özellikle CYP19 rs2414096 genetik polimorfizmine bağlı PKOS gelişimi konusunun daha geniş katılımların sağlandığı hasta popülasyonlarında derinleştirilmesine ihtiyaç vardır. Çünkü çalışmamızda CYP19 rs2414096 genetik polimorfizminin aromataz aktivitesinden bağımsız olarak PKOS gelişimine yatkınlıkta rol oynadığını belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda değerlendirilen ve PKOS ile ilişkisi konusunda bir anlamlılık sağlayamadığımız DENND1A polimorfizminin PKOS ile ilişkilendirildiği az sayıda çalışma olduğu için bu konuda detaylı bir yorum yapılamamıştır, daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Diğer taraftan PKOS-kimyasal madde ilişkisi sayısı az da olsa BPA'ya yönelik çalışmalarla ortaya konulmaya çalışılmaktadır. Endokrin bozucuların hormon sistemlerinde farklı mekanizmalarla yapabilecekleri değişiklikler göz önüne alındığında farklı kimyasal yapıda endokrin bozucu özellik gösteren kimyasallarla yapılacak ilişkilendirme çalışmaları ileride konunun bu yönünün daha da anlaşılır olmasını sağlayacaktır. Çünkü her ne kadar bizim çalışmamızda BPA ile PKOS arasındaki ilişki anlamlı bulunmamışsa da bu ilişkinin anlamlı bulunduğu diğer çalışmalar değerlendirildiğinde ve ayrıca bizim çalışmamızda anlamlı ilişkinin tespit edildiği oktilfenol bileşiği de göz önüne alındığında bir alkilfenol-PKOS ilişkisinden söz edilebilir. Dolayısıyla PKOS-endokrin bozucu kimyasal ilişkisinin giderek artan dozda ele alınmasında yarar görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Meheus A. (1995). Risk of hepatitis B in adolescence and young adulthood. *Vaccine*, 13(1), 31-34.
2. van Kruiningen H.J., Ganley L.M., and Freda B.J. (1997). The Role of Peyer's Patches in the Age-Related Incidence of Crohn's Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 25(2), 470-475.
3. Martin A., Campbell D., Gluyas P., Latimer K., Luke C., Frith P., Yellowlees P., Psych M., McLennan G., Coate S J., Ruffin R., and Roder D. (1995). Characteristics of Near-Fatal Asthma in Childhood. *Pediatric Pulmonology*, 20(1), 1-8.
4. Stice E., Killen J.D., Hayward C., and Taylor C.B. (1998). Age of onset for binge eating and purging during late adolescence: A 4-year survival analysis. *Journal of Abnormal Psychology*, 107(4), 671-675.
5. Dahl R. E. (1998). The development and disorders of sleep. *Advances in pediatrics*, 45, 73-90.
6. Schulenberg, J., Maggs, J. L., and Hurrelmann, K. (Eds.). (1997). Health risks and developmental transitions during adolescence. *Cambridge University Press*.
7. Ojaniemi M., Tapanainen P., and Morin-Papunen L. (2010). Management of polycystic ovary syndrome in childhood and adolescence. *Hormone research in paediatrics*, 74(5), 372-375.
8. Franks S., and Berga S.L. (2012). Does PCOS have developmental origins? *Fertility and Sterility*, 97(1), 2-6.
9. Bekx M.T., Connor E.C., and Allen D.B. (2010). Characteristics of Adolescents Presenting to a Multidisciplinary Clinic for Polycystic Ovarian Syndrome. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 23(1), 7-10.
10. Essah P.A., and Nestler J.E. (2006). The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Journal of endocrinological investigation*, 29(3), 270-280.
11. Legro R.S., Kusanman A.R., Dodson W.C., and Dunaif A. (1999). Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(1), 165-169.
12. Barry J.A., Azizia M.M., and Hardiman P.J. (2014). Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, 20(5), 748-758.
13. Rubin B.S. (2011). Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 27-34.

14. Wetherill Y.B., Akingbemi B.T., Kanno J., McLachlan J.A., Nadal A., Sonnenschein C., Watson C.S., Zoeller R.T., and Belcher S.M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 178-198.
15. Li Y., Yin S., Yang Y., Chen J., Wu L., and Sun C. (2020). Sample Treatment Methods for the Determination of Phenolic Environmental Estrogens in Foods and Drinking Water. *Journal of AOAC International*, 103(2), 348-364.
16. Akin L., Kendirci M., Narin F., Kurtoglu S., Saraymen R., Kondolot M., Koçak S., and Elmali F. (2015). The endocrine disruptor bisphenol A may play a role in the aetiopathogenesis of polycystic ovary syndrome in adolescent girls. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 104(4), 171-177.
17. Diamanti-Kandarakis E., Piperi C., Argyrakopoulou G., Spina J., Papanastasiou L., Bergiele A., and Panidis D. (2006). Polycystic Ovary Syndrome: The influence of environmental and genetic factors. *Hormones*, 5(1), 17-34.
18. Xita N., Georgiou I., and Tsatsoulis A. (2002). The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 147(6), 717-725.
19. Ramos Cirilo P.D., Rosa F.E., Moreira Ferraz M.F., Rainho C.A., Pontes A., and Rogatto S.R. (2012). Genetic polymorphisms associated with steroids metabolism and insulin action in polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 28(3), 190-194.
20. Jin J.L., Sun J., Ge H.J., Cao Y.X., Wu X.K., Liang F.J., Sun H.X., Ke L., Yi L., Wu Z.W., and Wang Y. (2009). Association between CYP19 gene SNP rs2414096 polymorphism and polycystic ovary syndrome in Chinese women. *BMC medical genetics*, 10, 139.
21. Chen Z.J., Zhao H., He L., Shi Y., Qin Y., Shi Y., Li Z., You L., Zhao J., Liu J., Liang X., Zhao X., Zhao J., Sun Y., Zhang B., Jiang H., Zhao D., Bian Y., Gao X., et al. (2011). Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nature Genetics*, 43(1), 55-59.
22. Eriksen M.B., Brusgaard K., Andersen M., Tan Q., Altinok M.L., Gaster M., and Glinborg D. (2012). Association of polycystic ovary syndrome susceptibility single nucleotide polymorphism rs2479106 and PCOS in Caucasian patients with PCOS or hirsutism as referral diagnosis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 163(1), 39-42.
23. Welt C.K., Styrkarsdottir U., Ehrmann D.A., Thorleifsson G., Arason G., Gudmundsson J.A., Ober C., Rosenfield R.L., Saxena R., Thorsteinsdottir U., Crowley W.F., and Stefansson K. (2012). Variants in DENND1A are associated with polycystic ovary syndrome in women of European ancestry. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(7).
24. Tüzüner B.M., Öztürk T., Kısakesen H.I., İlvan Ş., Zerrin C., Öztürk O., and İsbir T. (2010). CYP17 (T-34C) and CYP19 (Trp39Arg) Polymorphisms and their Cooperative Effects on Breast Cancer Susceptibility. *In Vivo*, 24(1), 71-4.

25. Yilmaz M.B., Pazarbasi A., Guzel A.I., Kocaturk-Sel S., Kasap H., Kasap M., Urunsak I.F., Basaran S., Alptekin D., and Demirhan O. (2011). Association of serum sex steroid levels and bone mineral density with CYP17 and CYP19 gene polymorphisms in postmenopausal women in Turkey. *Genetics and molecular research : GMR*, 10(3), 1999-2008.
26. Eren E., Edgunlu T., Korkmaz H.A., Cakir E.D.P., Demir K., Cetin E.S., and Celik S.K. (2014). Genetic variants of estrogen beta and leptin receptors may cause gynecomastia in adolescent. *Gene*, 541(2), 101-106.
27. Witchel S.F., Teede H.J., and Peña A.S. (2020). Curtailing PCOS. *Pediatric Research*, 87(2), 353-361.
28. Stein I.F., and Leventhal M.L. (1935). Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 29(2), 181-191.
29. Mcarthur J.W., Ingersoll F.M., and Worcester J. (1958). The urinary excretion of interstitial-cell and follicle-stimulating hormone activity by women with diseases of the reproductive system. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 18(11), 1202-1215.
30. Wallace A.M., and Sattar N. (2007). The Changing Role of the Clinical Laboratory in the Investigation of Polycystic Ovarian Syndrome. *The Clinical Biochemist Reviews*, 28(3), 79.
31. Goodman N.F., Cobin R.H., Futterweit W., Glueck J.S., Legro R.S., and Carmina E. (2015). American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Androgen Excess and Pcos Society Disease State Clinical Review: Guide to the Best Practices in the Evaluation and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome - Part 1. American Association of Clinical Endocrinologists
32. Azziz R., Woods K.S., Reyna R., Key T.J., Knochenhauer E.S., and Yildiz B.O. (2004). The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2745-2749.
33. Lizneva D., Suturina L., Walker W., Brakta S., Gavrilova-Jordan L., and Azziz R. (2016). Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 106(1), 6-15.
34. Yildiz B.O., Bozdog G., Yapici Z., Esinler I., and Yarali H. (2012). Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Human Reproduction*, 27(10), 3067-3073.
35. Sirmans S.M., and Pate K.A. (2014). Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical Epidemiology*, 6(1), 1.
36. Harrison C.L., Lombard C.B., Moran L.J., and Teede H.J. (2011). Exercise therapy in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 17(2), 171-183.

37. Diamanti-Kandarakis E., and Dunaif A. (2012). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: An update on mechanisms and implications. *Endocrine Reviews*, 33(6), 981-1030.
38. Khan M.J., Ullah A., and Basit S. (2019). Genetic basis of polycystic ovary syndrome (PCOS): Current perspectives. *Application of Clinical Genetics*, 12, 249-260.
39. Lujan M.E., Jarrett B.Y., Brooks E.D., Reines J.K., Peppin A.K., Muhn N., Haider E., Pierson R.A., and Chizen D.R. (2013). Updated ultrasound criteria for polycystic ovary syndrome: Reliable thresholds for elevated follicle population and ovarian volume. *Human Reproduction*, 28(5), 1361-1368.
40. Coyle C., and Campbell R.E. (2019). Pathological pulses in PCOS. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 498, 110561.
41. Teede H.J., Misso M.L., Costello M.F., Dokras A., Laven J., Moran L., Piltonen T., Norman R.J., Andersen M., Azziz R., Balen A., Baye E., Boyle J., Brennan L., Broekmans F., Dabadghao P., Devoto L., Dewailly D., Downes L., et al. (2018). Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 110(3), 364-379.
42. Ye W., Xie T., Song Y., and Zhou L. (2021). The role of androgen and its related signals in PCOS. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(4), 1825-1837.
43. Walters K.A., Gilchrist R.B., Ledger W.L., Teede H.J., Handelsman D.J., and Campbell R.E. (2018). New Perspectives on the Pathogenesis of PCOS: Neuroendocrine Origins. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(12), 841-852.
44. Nanba A.T., Rege J., Ren J., Auchus R.J., Rainey W.E., and Turcu A.F. (2019). 11-Oxygenated C19 Steroids Do Not Decline With Age in Women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 104(7), 2615-2622.
45. Zeng X., Xie Y. jie., Liu Y. ting., Long S. lian., and Mo Z. cheng. (2020). Polycystic ovarian syndrome: Correlation between hyperandrogenism, insulin resistance and obesity. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 502, 214-221.
46. Yildiz B.O. (2006). Diagnosis of hyperandrogenism: clinical criteria. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 20(2), 167-176.
47. Hohl A., Ronsoni M.F., and de Oliveira M. (2014). Hirsutismo: Diagnóstico e tratamento. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 58(2), 97-107.
48. Wang J., Wu D., Guo H., and Li M. (2019). Hyperandrogenemia and insulin resistance: The chief culprit of polycystic ovary syndrome. *Life Sciences*, 236.
49. Sørensen A.E., Udesen P.B., Wissing M.L., Englund A.L.M., and Dalgaard L.T. (2016). MicroRNAs related to androgen metabolism and polycystic ovary syndrome. *Chemico-Biological Interactions*, 259, 8-16.
50. Laganà A.S., Rossetti P., Buscema M., la Vignera S., Condorelli R.A., Gullo G., Granese R., and Triolo O. (2016). Metabolism and Ovarian Function in PCOS Women: A Therapeutic Approach with Inositols. *International Journal of Endocrinology*, 2016.

51. Patel S. (2018). Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 182, 27-36.
52. Falcetta P., Benelli E., Molinaro A., di Cosmo C., Bagattini B., del Ghianda S., Salvetti G., Fiore E., Pucci E., Fruzzetti F., and Tonacchera M. (2021). Effect of aging on clinical features and metabolic complications of women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, 44(12), 2725-2733.
53. Carmina E., Campagna A.M., and Lobo R.A. (2012). A 20-year follow-up of young women with polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and Gynecology*, 119(2), 263-269.
54. Oyola M.G., and Handa R.J. (2017). Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*, 20(5), 476-494.
55. Witchel S.F., Oberfield S.E., and Peña A.S. (2019). Polycystic Ovary Syndrome: Pathophysiology, Presentation, and Treatment with Emphasis on Adolescent Girls. *Journal of the Endocrine Society*, 3(8), 1545-1573.
56. Iervolino M., Lepore E., Forte G., Laganà A.S., Buzzaccarini G., and Unfer V. (2021). Natural molecules in the management of polycystic ovary syndrome (Pcos): An analytical review. *Nutrients*, 13(5).
57. Taylor A.E., Mccourt B., Martin K.A., Anderson E.J., Adams J.M., Schoenfeld D., and Hall J.E. (1996). Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 82(7), 2248-2256.
58. Hayriye Ak Yıldırım., and Memişoğulları R. (2011). Polikistik Over Sendromu'nda Gözlenen Biyokimyasal Bozukluklar. *Konuralp Tıp Dergisi*, 3(1), 42-48.
59. Azziz R. (2018). Reproductive endocrinology and infertility: Clinical expert series polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and Gynecology*, 132(2), 321-336.
60. Evliyaoğlu O. (2011). Polycystic ovary syndrome and hirsutism. *Turk Pediatri Arsivi*, 46(1), 97-102.
61. Norman R.J., Dewailly D., Legro R.S., and Hickey T.E. (2007). Polycystic ovary syndrome. *Lancet*, 370(9588), 685-697.
62. Hoeger K.M., Dokras A., and Piltonen T. (2021). Update on PCOS: Consequences, Challenges, and Guiding Treatment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 106(3), 1071-1083.
63. Eslami B., Rashidi B.H., Amanlou M., Lak T.B., Ghazizadeh M., Haghollahi F., Bagheri M., and Eslami B. (2017). The Association Between Bisphenol A and Polycystic Ovarian Syndrome: A Case-Control Study. *Acta medica Iranica*, 55(12), 759-764.

64. Cooper H.E., Spellacy W.N., Prem K.A., and Cohen W.D. (1968). Hereditary factors in the Stein-Leventhal syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*, 100(3), 371-387.
65. Hague W.M., Adams J., Reeders S.T., Peto T.E.A., and Jakobs H.S. (1988). Familial polycystic ovaries: a genetic disease? *Clinical endocrinology*, 29(6), 593-605.
66. Hiam D., Moreno-Asso A., Teede H.J., Laven J.S.E., Stepto N.K., Moran L.J., and Gibson-Helm M. (2019). The genetics of polycystic ovary syndrome: An overview of candidate gene systematic reviews and genome-wide association studies. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10).
67. Sebastian S., and Bulun S.E. (2001). A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(10), 4600-4602.
68. Xu P., Zhang X.L., Xie G.B., Zhang C.W., Shen S.M., Zhang X.X., Cao Y.X., Wang W.J., Che Y.N., Xia Y.J., Wu X.K., Yi L., Gao Q., and Wang Y. (2013). The (TTTA)_n polymorphism in intron 4 of CYP19 and the polycystic ovary syndrome risk in a Chinese population. *Molecular Biology Reports*, 40(8), 5041-5047.
69. Sowers M.F.R., Wilson A.L., Kardia S.R., Chu J., and Ferrell R. (2006). Aromatase Gene (CYP 19) Polymorphisms and Endogenous Androgen Concentrations in a Multiracial/Multiethnic, Multisite Study of Women at Midlife. *American Journal of Medicine*, 119(9 SUPPL. 1), 23-30.
70. Lazaros L., Xita N., Hatzi E., Takenaka A., Kaponis A., Makrydimas G., Sofikitis N., Stefos T., Zikopoulos K., and Georgiou I. (2013). CYP19 gene variants affect the assisted reproduction outcome of women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 29(5), 478-482.
71. Dallel M., Sarray S., Douma Z., Hachani F., Al-Ansari A.K., Letaifa D.B., Mahjoub T., and Almawi W.Y. (2018). Differential association of DENND1A genetic variants with polycystic ovary syndrome in Tunisian but not Bahraini Arab women. *Gene*, 647, 79-84.
72. Larsen C.B., Kudela E., and Biringer K. (2022). Association of FSHR and DENND1A polymorphisms with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *JBRA assisted reproduction*,.
73. Tee M.K., Speek M., Legeza B., Modi B., Teves M.E., McAllister J.M., Strauss J.F., and Miller W.L. (2016). Alternative splicing of DENND1A, a PCOS candidate gene, generates variant 2. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 434, 25-35.
74. McAllister J.M., Legro R.S., Modi B.P., and Strauss J.F. (2015). Functional genomics of PCOS: From GWAS to molecular mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26(3), 118-124.
75. Bao S., Cai J.H., Yang S.Y., Ren Y., Feng T., Jin T., and Li Z.R. (2016). Association of DENND1A gene polymorphisms with polycystic ovary syndrome: A meta-analysis. *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 8(2), 135-143.

76. Zhang Y.Z., Tang C.Y., Song X.F., and Li F.D. (2009). Behavior and fate of alkylphenols in surface water of the Jialu River, Henan Province, China. *Chemosphere*, 77(4), 559-565.
77. Kim S., and Misra A. (2007). SNP genotyping: Technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9, 289-320.
78. Hivert M.-F., and Baillargeon J.-P. (2006). Environmental Factors in the Polycystic Ovary Syndrome. In: *Androgen Excess Disorders in Women*. Humana Press; 2006:247-257.
79. Merkin S.S., Phy J.L., Sites C.K., and Yang D. (2016). Environmental determinants of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 106(1), 16-24.
80. Ashwell E. (2022). The endocrine system and associated disorders. *British journal of nursing (Mark Allen Publishing)*, 31(6), 316-320.
81. Hinson J., Raven P., and Chew S. (2010). Introduction. *The Endocrine System*, 1-14.
82. WHO. (2012). Endocrine Disruptors and Child Health Possible Developmental Early Effects of Endocrine Disruptors on Child Health. WHO Document Production Services
83. Çetinkaya S. (2009). Endokrin çevre bozucular ve ergenlik üzerine etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*, 1(36), 59-66.
84. Varticovski L., Stavreva D.A., McGowan A., Raziuddin R., and Hager G.L. (2022). Endocrine disruptors of sex hormone activities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 539, 111415.
85. Tutanç L., Cansız D., Emekli Alturfan E., and Alturfan A. (2021). Endokrin Bozucu Kimyasallar ve Tekstil Alanında Kullanımları. *Experimed*, 11(2), 130-139.
86. Kerdivel G., Habauzit D., and Pakdel F. (2013). Assessment and molecular actions of endocrine-disrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways. *International journal of endocrinology*, 2013, 501851.
87. Fenoglu Y.B., Gümüşel K.B., and Erkekoglu P. (2019). Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelere ve Etki Mekanizmalarına Genel Bir Bakış. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 39(1), 30-43.
88. Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J.P., Giudice L.C., Hauser R., Prins G.S., Soto A.M., Zoeller R.T., and Gore A.C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293-342.
89. Yesilkaya E. (2008). Endokrin Bozucular. *Güncel Pediatri*, 6, 76-82.
90. Rolfo A., Nuzzo A.M., de Amicis R., Moretti L., Bertoli S., and Leone A. (2020). Fetal–maternal exposure to endocrine disruptors: Correlation with diet intake and pregnancy outcomes. *Nutrients*, 12(6), 1-19.

91. Swedenborg E., Rüegg J., Mäkelä S., and Pongratz I. (2009). Endocrine disruptive chemicals: Mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal of Molecular Endocrinology*, 43(1), 1-10.
92. de Coster S., and van Larebeke N. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012.
93. Balaguer P., Delfosse V., Grimaldi M., and Bourguet W. (2017). Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. *Comptes Rendus - Biologies*, 340(9-10), 414-420.
94. la Merrill M.A., Vandenberg L.N., Smith M.T., Goodson W., Browne P., Patisaul H.B., Guyton K.Z., Kortenkamp A., Cogliano V.J., Woodruff T.J., Rieswijk L., Sone H., Korach K.S., Gore A.C., Zeise L., and Zoeller R.T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(1), 45-57.
95. Lucaccioni L., Trevisani V., Passini E., Righi B., Plessi C., Predieri B., and Iughetti L. (2021). Perinatal Exposure to Phthalates: From Endocrine to Neurodevelopment Effects. *International journal of molecular sciences*, 22(8).
96. Mukhopadhyay R., Prabhu N.B., Kabekkodu S.P., and Rai P.S. (2022). Review on bisphenol A and the risk of polycystic ovarian syndrome: an insight from endocrine and gene expression. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(22), 32631-32650.
97. Jurewicz J., Majewska J., Berg A., Owczarek K., Zajdel R., Kaleta D., Wasik A., and Rachoń D. (2021). Serum bisphenol A analogues in women diagnosed with the polycystic ovary syndrome – is there an association? *Environmental Pollution*, 272, 115962.
98. Zielinska M., Wojnowska-Baryla I., and Cydzik-Kwiatkowska A. (2019). Sources and Properties of BPA. *Bisphenol A Removal from Water and Wastewater*, 3-28.
99. Kang J.H., Kondo F., and Katayama Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226(2-3), 79-89.
100. Abraham A., and Chakraborty P. (2019). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Reviews on Environmental Health*,
101. Richter C.A., Birnbaum L.S., Farabollini F., Newbold R.R., Rubin B.S., Talsness C.E., Vandenberg J.G., Walser-Kuntz D.R., and vom Saal F.S. (2007). In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies.
102. Kabir E.R., Rahman M.S., and Rahman I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 241-258.
103. Corrales J., Kristofco L.A., Baylor Steele W., Yates B.S., Breed C.S., Spencer Williams E., and Brooks B.W. (2015). Global assessment of bisphenol a in the environment: Review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose-Response*, 13(3).

104. Battal D., Cok I., Unlusayin I., Aktas A., and Tunctan B. (2014). Determination of urinary levels of Bisphenol A in a Turkish population. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(12), 8443-8452.
105. Völkel W., Colnot T., Csanády G.A., Filser J.G., and Dekant W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*, 15(10), 1281-1287.
106. Daughton C.G. (2003). Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rational for and avenues toward a green pharmacy. *Environmental Health Perspectives*, 111(5), 757-774.
107. Vilarinho F., Sendón R., van der Kellen A., Vaz M.F., and Silva A.S. (2019). Bisphenol A in food as a result of its migration from food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 91, 33-65.
108. Schechter A., Malik N., Haffner D., Smith S., Harris T.R., Paepke O., and Birnbaum L. (2010). Bisphenol A (BPA) in U.S. food. *Environmental Science and Technology*, 44(24), 9425-9430.
109. Ma Y., Liu H., Wu J., Yuan L., Wang Y., Du X., Wang R., Marwa P.W., Petlulu P., Chen X., and Zhang H. (2019). The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environmental Research*, 176.
110. Vandenberg L.N., Chahoud I., Heindel J.J., Padmanabhan V., Paumgarten F.J.R., and Schoenfelder G. (2010). Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118(8), 1055.
111. Nagel S.C., and Bromfield J.J. (2013). Bisphenol A: A model endocrine disrupting chemical with a new potential mechanism of action. *Endocrinology*, 154(6), 1962-1964.
112. Kiyama R., and Wada-Kiyama Y. (2015). Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environment International*, 83, 11-40.
113. Rezg R., El-Fazaa S., Gharbi N., and Mornagui B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*, 64, 83-90.
114. Ying G.G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32(3), 417-431.
115. Chokwe T.B., Okonkwo J.O., and Sibali L.L. (2017). Distribution, exposure pathways, sources and toxicity of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in the environment. *Water SA*, 43(4), 529-542.
116. Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., and Lester J.N. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, 34(7), 1033-1049.

117. Rattan S., Zhou C., Chiang C., Mahalingam S., Brehm E., and Flaws J.A. (2017). Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *Journal of Endocrinology*, 233(3), R109-R129.
118. Andersen H.R., Andersson A.-M., Arnold S.F., Autrup H., Barfoed M., Beresford N.A., Bjerregaard P., Christiansen L.B., Gissel B., Hummel R., Jørgensen E.B., Korsgaard B., le Guevel R., Leffers H., McLachlan J., Møller A., Nielsen J.B., Olea N., Oles-Karasko A., et al. (1999). Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals. *Environ Health Perspect.*, 89-108.
119. Colerangle J.B., and Roy D. (1996). Exposure of environmental estrogenic compound nonylphenol to noble rats alters cell-cycle kinetics in the mammary gland. *Endocrine*, 4(2), 115-122.
120. Muellerf G.C., and Kim U.-H. (1978). Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkyl phenols. *Endocrinology*, 102(5), 1429-1435.
121. Kwack S.J., Kwon O., Kim H.S., Kim S.S., Kim S.H., Sohn K.H., Lee R. da., Park C.H., Jeung E.B., An B.S., and Park K.L. (2002). Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo. *Journal of toxicology and environmental health Part A*, 65(5-6), 419-431.
122. Gible R., and Baer K.N. (2003). Effects of 4-nonylphenol on sexual maturation in *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(2), 315-321.
123. Lee P.C., and Lee W. (1996). In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 57(3), 341-348.
124. White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., and Parker M.G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135, 175-172.
125. Chang C.H., Tsai M.S., Lin C.L., Hou J.W., Wang T.H., Tsai Y.A., Liao K.W., Mao I.F., and Chen M.L. (2014). The association between nonylphenols and sexual hormones levels among pregnant women: A cohort study in taiwan. *Plos One*, 9(8), e104245.
126. Wu J.J., Wang K.L., Wang S.W., Hwang G.S., Mao I.F., Chen M.L., and Wang P.S. (2010). Differential effects of nonylphenol on testosterone secretion in rat Leydig cells. *Toxicology*, 268(1-2), 1-7.
127. Lu Z., and Gan J. (2014). Analysis, toxicity, occurrence and biodegradation of nonylphenol isomers: A review. *Environment International*, 73, 334-345.
128. Olaniyan L.W.B., Okoh O.O., Mkwetshana N.T., and Okoh A.I. (2020). Environmental Water Pollution, Endocrine Interference and Ecotoxicity of 4-tert-Octylphenol: A Review. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 248, 81-109.

129. Qin Y., Chen M., Wu W., Xu B., Tang R., Chen X., Du G., Lu C., Meeker J.D., Zhou Z., Xia Y., and Wang X. (2013). Interactions between urinary 4-tert-octylphenol levels and metabolism enzyme gene variants on idiopathic male infertility. *Plos One*, 8(3), 59398.
130. Bonefeld-Jørgensen E.C., Long M., Hofmeister M. v., and Vinggaard A.M. (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environmental Health Perspectives*, 115(Suppl 1), 69.
131. Blake C.A., Boockfor F.R., Nair-Menon J.U., Millette C.F., Raychoudhury S.S., and McCoy G.L. (2004). Effects of 4-tert-octylphenol given in drinking water for 4 months on the male reproductive system of Fischer 344 rats. *Reproductive Toxicology*, 18(1), 43-51.
132. Pérez-Albaladejo E., Fernandes D., Lacorte S., and Porte C. (2017). Comparative toxicity, oxidative stress and endocrine disruption potential of plasticizers in JEG-3 human placental cells. *Toxicology in Vitro*, 38, 41-48.
133. Barlas N., and Aydoğan M. (2009). Histopathologic effects of maternal 4-tert-octylphenol exposure on liver, kidney and spleen of rats at adulthood. *Archives of Toxicology*, 83(4), 341-349.
134. Routledge E.J., and Sumpter J.P. (1997). Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *The Journal of biological chemistry*, 272(6), 3280-3288.
135. Battal D., Sukuroglu A.A., Kocadal K., Cok I., and Unlusayin I. (2021). Establishment of rapid, sensitive, and quantitative liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method coupled with liquid-liquid extraction for measurement of urinary bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 35(12).
136. Franks S. (2002). Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 16(2), 263-272.
137. Goodarzi M.O., Jones M.R., Li X., Chua A.K., Garcia O.A., Chen Y.D.I., Krauss R.M., Rotter J.I., Ankener W., Legro R.S., Azziz R., Strauss J.F., Dunaif A., and Urbanek M. (2012). Replication of association of DENND1A and THADA variants with polycystic ovary syndrome in European cohorts. *Journal of medical genetics*, 49(2), 90-95.
138. Louwers Y. v., Stolk L., Uitterlinden A.G., and Laven J.S.E. (2013). Cross-ethnic meta-analysis of genetic variants for polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(12).
139. Gammoh E., Arekat M.R., Saldhana F.L., Madan S., Ebrahim B.H., and Almawi W.Y. (2015). DENND1A gene variants in Bahraini Arab women with polycystic ovary syndrome. *Gene*, 560(1), 30-33.

140. McAllister J.M., Modi B., Miller B.A., Biegler J., Bruggeman R., Legro R.S., and Strauss J.F. (2014). Overexpression of a DENND1A isoform produces a polycystic ovary syndrome theca phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(15).
141. Petry C.J., Ong K.K., Michelmores K.F., Artigas S., Wingate D.L., Balen A.H., de Zegher F., Ibáñez L., and Dunger D.B. (2005). Association of aromatase (CYP 19) gene variation with features of hyperandrogenism in two populations of young women. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(7), 1837-1843.
142. Wang J.Z., Deogan M.S., Lewis J.R., Chew S., Mullin B.H., McNab T.J., Wilson S.G., Ingley E., and Prince R.L. (2011). A non-synonymous coding change in the CYP19A1 gene Arg264Cys (rs700519) does not affect circulating estradiol, bone structure or fracture. *BMC Medical Genetics*, 12, 165.
143. Jiang J., Tang N.L.S., Ohlsson C., Eriksson A.L., Vandenput L., Chan F.W.K., Ching J.K.L., Kwok A., Orwoll E., Kwok T.C.Y., Woo J., and Leung P.C. (2010). Association of genetic variations in aromatase gene with serum estrogen and estrogen/testosterone ratio in Chinese elderly men. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 411(1-2), 53-58.
144. Mehdizadeh A., Kalantar S.M., Sheikhha M.H., Aali B.S., and Ghanei A. (2017). Association of SNP rs.2414096 CYP19 gene with polycystic ovarian syndrome in Iranian women. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 15(8), 491.
145. Sharma P., Kaur M., and Khetarpal P. (2021). CYP19 gene rs2414096 variant and differential genetic risk of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 37(2), 126-131.
146. Ashraf S., Rasool S.U.A., Nabi M., Ganie M.A., Masoodi S.R., and Amin S. (2021). Impact of rs2414096 polymorphism of CYP19 gene on susceptibility of polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism in Kashmiri women. *Scientific Reports*, 11(1).
147. Mierzwicka A., Kuliczowska-Plaksej J., Kolačkov K., and Bolanowski M. (2018). Preptin in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 34(6), 470-475.
148. al Kindi M.K., al Essry F.S., al Essry F.S., and Mula-Abed W.A.S. (2012). Validity of serum testosterone, free androgen index, and calculated free testosterone in women with suspected hyperandrogenism. *Oman medical journal*, 27(6), 471-474.
149. Güngör O., Tarihi G., Erden G., Bal C., Uğuz N., Sezer S., Özdemir Ş., Çelik H.T., and Metin Yıldırım kaya M. (2011). The comparison of free androgen index and serum free testosterone levels in women with hirsutism or polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2(2), 152-156.
150. Eden J.A., Place J., Carter G.D., Jones J., Alaghband-Zadeh J.A., and Pawson M. (1988). Elevated free androgen index as an indicator of polycystic ovaries in oligomenorrhoea without obesity or hirsuties. *Annals of clinical biochemistry*, 25 (Pt 4)(4), 346-349.

151. Chen J., Shen S., Tan Y., Xia D., Xia Y., Cao Y., Wang W., Wu X., Wang H., Yi L., Gao Q., and Wang Y. (2015). The correlation of aromatase activity and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome. *Journal of Ovarian Research*, 8(1).
152. Caserta D., di Segni N., Mallozzi M., Giovanale V., Mantovani A., Marci R., and Moscarini M. (2014). Bisphenol a and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 12(1), 37.
153. Zhou W., Liu J., Liao L., Han S., and Liu J. (2008). Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 283(1-2), 12-18.
154. Ehrlich S., Williams P.L., Hauser R., Missmer S.A., Peretz J., Calafat A.M., and Flaws J.A. (2013). Urinary bisphenol A concentrations and cytochrome P450 19 A1 (Cyp19) gene expression in ovarian granulosa cells: An in vivo human study. *Reproductive Toxicology*, 42, 18-23.
155. Takeuchi T., Tsutsumi O., Ikezuki Y., Takai Y., and Taketani Y. (2004). Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocrine journal*, 51(2), 165-169.
156. Kandaraki E., Chatzigeorgiou A., Livadas S., Palioura E., Economou F., Koutsilieris M., Palimeri S., Panidis D., and Diamanti-Kandarakis E. (2011). Endocrine disruptors and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(3).
157. Rochester J.R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155.
158. Takeuchi T., and Tsutsumi O. (2002). Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(1), 76-78.
159. Vagi S.J., Azziz-Baumgartner E., Sjödin A., Calafat A.M., Dumesic D., Gonzalez L., Kato K., Silva M.J., Ye X., and Azziz R. (2014). Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol a in polycystic ovary syndrome: A case-control study. *BMC Endocrine Disorders*, 14(1).
160. Vahedi M., Saeedi A., Poorbaghi S.L., Sepehrimanesh M., and Fattahi M. (2016). Metabolic and endocrine effects of bisphenol A exposure in market seller women with polycystic ovary syndrome. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(23), 23546-23550.
161. Kawa I.A., Masood A., Ganie M.A., Fatima Q., Jeelani H., Manzoor S., Rizvi S.M., Muzamil M., and Rashid F. (2019). Bisphenol A (BPA) acts as an endocrine disruptor in women with Polycystic Ovary Syndrome: Hormonal and metabolic evaluation. *Obesity Medicine*, 14, 100090.

162. Akgül S., Sur Ü., Düzçeker Y., Balcı A., Kızılkın M.P., Kanbur N., Bozdağ G., Erkekoğlu P., Gümüş E., Kocer-Gumusel B., and Derman O. (2019). Bisphenol A and phthalate levels in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 35(12), 1084-1087.
163. Wang Y., Zhu Q., Dang X., He Y., Li X., and Sun Y. (2017). Local effect of bisphenol A on the estradiol synthesis of ovarian granulosa cells from PCOS. *Gynecological Endocrinology*, 33(1), 21-25.
164. Yang Z., Shi J., Guo Z., Chen M., Wang C., He C., and Zuo Z. (2019). A pilot study on polycystic ovarian syndrome caused by neonatal exposure to tributyltin and bisphenol A in rats. *Chemosphere*, 231, 151-160.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli 2. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Dr. Abdurrahman Yurtarslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi

SAYI : 20033663-903/ 183

04.07/2014

KONU : Etik Kurul Karar Yazısı

Sayın Prof. Dr. İsmet ÇOK
Farmasötik Toksikoloji Uzmanı
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi F. Toksikoloji Anabilim Dalı

Sorumluluğunuzda yürütülmesi planlanan “Polikistik Over Sendromlu (PKOS) Ergen Kızlarda CYP19 Gen Polimorfizmi ve Bisfenol A Maruziyetinin Rolünün Araştırılması” konulu çalışma başvurunuz, 02 Temmuz 2014 tarihli Hastanemiz Etik Kurul Toplantısında değerlendirilmiş olup, bilgilendirilmiş onam formundaki minör değişiklikler çalışma röportörü tarafından değerlendirildikten sonra çalışma uygun bulunmuş olup, araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. (2014-6/100 sayılı karar)

03 Temmuz 2014 tarih ve 218 sayılı yazınız ile eksiklikler tamamlanarak kurulumuza sunulmuştur. Yapılan inceleme sonrasında kararda belirtilen eksikliklerin tamamlandığı kanaatine varılmış olup, cevabi yazının dosyaya eklenmesi uygun görülmüştür.

02 Temmuz 2014 tarih ve 2014-6/101 sayılı karar yazısı ilişikte gönderilmiştir.
Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. M. Can ATALAY
(Bilgilendirmenin Yeterli Olduğu Durumlarla
İlgili Değerlendirme Görevlisi)

Doç. Dr. Süheyla ÜNVER
Etik Kurul Başkanı

EK: 2014-6/101 Sayılı Karar Yazısı (1 sayfa)

Mehmet Akif Ersoy Mah.13.Cad.No:56
Yenimahalle 06200 ANKARA
Telefon:(312) 336 09 09
Faks : (312) 345 49 79

İrtibat İçin: Etik Kur. Sek.Songül DÜZ
Dahili No:4061
E-Posta: etikkurul@onkoloji.gov.tr

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	T.C SAĞLIK BAKANLIĞI TKHK ANKARA 2. BÖLGE KAMU HASTANELERİ BİRLİĞİ GENEL SEKRETERLİĞİ DR.ABDURRAHMAN YURTASLAN ANKARA ONKOLOJİ EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	T.C Sağlık Bakanlığı TKHK Ankara 2. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği Dr. Abdurrahman YURTASLAN Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mehmet Akif Ersoy Mahallesi 13. Cadde No:56 Yenimahalle-06200/ANKARA
	TELEFON	0 312 336 96 81
	FAKS	0 312 336 96 81
	E-POSTA	etikkurul@onkoloji.gov.tr

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Polikistik Over Sendromlu (PKOS) Ergen Kızlarda CYP19 Gen Polimorfizmi ve Bisfenol A Maruziyetinin Rolünün Araştırılması"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-----

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. İsmet ÇOK
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Farmasötik Toksikoloji Uzmanı
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi F. Toksikoloji Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ	-----
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-----
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐
		FAZ 2 ☐
		FAZ 3 ☐
		FAZ 4 ☐
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Gözlemsel ilaç çalışması ☐
		İlaç dışı klinik araştırma ☒
		Diğer ise belirtiniz ☐
	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐
	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLE N BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA	☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	İLAN	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐				
	DİĞER:	☐				

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Sümeyla ÜNER
İmza:

EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

**İLAÇ DIŞI “GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” DA YER ALACAK
OLAN “18 YAŞ ALTI SAĞLIKLI GÖNÜLLÜLER”İN EBEVEYNLERİ İÇİN
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’den Prof. Dr. İsmet Çok’un sorumlu araştırmacısı olduğu, “Polikistik over sendromlu (PKOS)- yumurtalık kistli-ergen kızlarda CYP19 gen polimorfizmi ve Bisfenol A maruziyetinin rolünün araştırılması” isimli bir araştırma yapılması planlanmaktadır.

Bu çalışmada, yumurtalık kisti gözlenen ergen kızlarda kalıtsal bir faktörün varlığının ve plastiklerde bulunan Bisfenol-A isimli bir maddeye maruziyet düzeyinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmanın bilimsel olarak yürütülebilmesi için, 100 yumurtalık kisti hastası ve 100 sağlıklı gönüllünün katılımına gereksinim vardır. Bu çalışmaya, ebeveyni olduğunuz katılımcının “gönüllü verici” olarak katılımını kabul ederseniz;

- 1) **Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında kızıma yapılacak rutin testler sırasında alınan kan örneğine ilave olarak (ayrıca damara girmeden) bir tüp daha kan numunesi almak,**

- 2) **Verilen cam idrar kaplarına bir miktar (yaklaşık 150-250 mL) idrar örneği almak ve**

- 3) **Size verilecek olan anket sorularını cevaplamak**

dışında herhangi bir işlem yapılmayacaktır. Alınan numunelerin taşıma işlemleri ve tetkikleri araştırmacı tarafından yapılacak olup, bu uygulamalar için sizden hiçbir koşulda bir ücret talep edilmeyecektir. Çalışmada, katılımcının bir (1) kez vereceği numuneler ile, Gazi Üniversitesi ve Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında çalışma yapılacak ve maruz kaldığı bisfenol A düzeyi ve CYP19 genotipi belirlenecektir. Araştırmacı katılımcıdan elde ettiği sonuçları, araştırmayı yürütmek için kullanacak olup, katılımcı kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacak; araştırma sonuçlarının yayınlanması halinde dahi kimlik bilgileri gizli kalacaktır.

Bu çalışmada, kızınızın yer alıp alması size ve katılımcıya bağlı olup gönüllülük esasına dayalıdır. İstedığınız zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin siz ve/veya katılımcı araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilir. Eğer katılmaya karar vererseniz, yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak üzere size verilecektir. Bu form yasal temsilcisi olduğunuz birey adına, sizin tarafınızdan imzalandığında, katılımcının orijinal tıbbi kayıtlarına çalışma doktorunuz/araştırmacı, Etik Kurul, Sağlık Bakanlığı ve diğer sağlık otoriteleri doğrudan erişim hakkına sahip olacaklardır.

Katılımcı Ebeveyninin Beyanı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Ebeveyni olduğum oğlum/kızımın araştırmaya gönüllü olarak katılımını, istediği zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğini ve kendi isteğine bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğini biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, ebeveyni olarak oğlum/kızımın katılımını kabul ediyor ve katılımcıya araştırma kapsamında alınacak olan idrar örneğinin,

- ☐ "Yalnızca bu araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.",
- ☐ "İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum."
- ☐ "Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum."

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı Ebeveyni:

Adı, soyadı:

Tel:

İmza:

EK-2. (devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Tarih:

Katılımcı ile görüşen araştırmacı:

Adı soyadı, unvanı: Uzm. Dr.Esra Döğ r

Adres: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,  ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bilim Dalı

Tel: 0312 202 6046

 mza:

Tarih:

EK-3. Gönüllülere Yönelik Anket Formu

ARAŞTIRMA PROJESİ ANKETİ
(ÖRNEK ALINAN ÇOCUKLARIN VELİLERİ İÇİN)

**“POLİKİSTİK OVER SENDROMLU (PKOS) ERGEN KIZLARDA CYP19 GEN
POLİMORFİZMİ VE BİSFENOL A MARUZİYETİNİN ROLÜ ” KONU BAŞLIKLİ
ÇALIŞMAYA İLİŞKİN ANKET FORMU**

Sayın katılımcı,

Bu anket formu "POLİKİSTİK OVER SENDROMLU (PKOS) ERGEN KIZLARDA CYP19 GEN POLİMORFİZMİ VE BİSFENOL A MARUZİYETİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI" adlı araştırma kapsamında, Polikistik over sendromu olan ergen hastalarda, bu hastalığın yaş ve ailedeki genetik faktörlerle ilişkisinin araştırılması ve Bisfenol A maruziyetinin bu hastalığın gelişimindeki rolünün belirlenmesi amaçlanmaktadır.. Sonuçlar PKOS hastalığının gelişiminde bireysel duyarlılığın ve Bisfenol A maruziyetinin etkisinin belirlenmesine ve Bisfenol A maruziyetinin önlenmesine yönelik yeni protokollerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Anket formunda 26 adet soru yer almaktadır. Sorulara yanıt verme süreniz 15 dakikadır. Araştırmaya katılmak gönüllülük esasına dayalıdır. Araştırma sürerken herhangi bir zamanda istemeniz durumunda sorumlu araştırmacıyı bilgilendirmek koşulu ile araştırmadan ayrılabilirsiniz. Araştırma sırasında sizden alınan bilgiler araştırmacıda saklı kalacak ve toplanan veriler yalnızca bilimsel amaçla kullanılacaktır. Ankette bulunan sorulara vereceğiniz yanıtların doğruluğu, araştırmanın niteliği açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle, ankette bulunan sorulara doğru yanıt vermenizi rica eder, işbirliğiniz için teşekkür ederiz.

Sorumlu Araştırmacı

Prof.Dr.İsmet ÇOK

EK-3. (devam) Gönüllülere Yönelik Anket Formu

HASTANIN EBEVEYNİNİN CEVAPLAYACAĞI SORULAR (Lütfen kızınız ile birlikte cevaplayınız)
SORULAR

1. Kızınızın Yaşı:
2. Kızınızın Kilosu:
3. Kızınızın Boyu:
4. Kızınızın doktora başvurma sebebi, şikayetleri nelerdir?
5. Sizde (anne) veya diğer kız çocuklarınızda benzer şikayetler var mıdır? Herhangi bir teşhis konu mu? ☐ Evet ☐ Hayır
6. Kızınızın ilk adet görmeye başladığı tarih nedir?
7. Kızınızın en son adet gördüğü tarih nedir?
8. Erken (çocukluk döneminde) göğüs büyümesi veya erken tüylenme gibi şikayetleri oldu mu? ☐ Evet ☐ Hayır
9. Kızınıza erken ergenlik teşhisi konu mu? ☐ Evet ☐ Hayır
10. Kızınızın bildiğiniz herhangi bir hastalığı var mı? ☐ Evet ☐ Hayır Varsa adı:
11. Kızınızda veya ailenizde genetik bir hastalık var mı? (ailesel şeker, kanser gibi) ☐ Evet ☐ Hayır ☐ Bilmiyorum Varsa adı:
12. Kızınızın düzenli kullandığı herhangi bir ilaç var mı? ☐ Evet ☐ Hayır Varsa adı:

Aşağıdaki soruların sorulma amacı, kızınızın Bisfenol A adı verilen ve erken ergenlik, polikistik over sendromu gibi sorunlara yol açabildiğinden şüphelenilen maddeye ne kadar temas halinde olduğunu belirleyebilmektir. Bu nedenle lütfen miktarlar konusunda hassas yanıtlar veriniz.

13. Çocuğunuz içme suyunu hangi kaynaktan sağlıyor? ☐ Şehir şebekesi ☐ Hazır su ☐ Kuyu suyu
14. 13. soruya yanıtınız hazır su ise çocuğunuz kaç yıldır hazır su kullanıyor?
15. Çocuğunuzun dışarıda hamburger gibi fast food yeme alışkanlığı var mı? Varsa **aylık ortalama** miktarı belirtiniz.

EK-3. (devam) Gönüllülere Yönelik Anket Formu

☐ Ayda 1 kez ☐ Ayda 1-3 kez ☐ Ayda 3-5 kez ☐ Ayda 5 den fazla

16. Çocuğunuzun teneke kutuda satılan kola, soğuk çay gibi içecekleri tüketme alışkanlığı var mıdır? Cevabınız evet ise lütfen miktarını belirtiniz.

☐ Haftada 1 kez ☐ Haftada 1-3 kez ☐ Haftada 3-5 kez ☐ Haftada 5 den fazla

17. Çocuğunuz için **plastik malzeme ile kaplanmış gıda maddelerini** (streç film ile kaplanmış sandviç, plastik vakumla kaplanmış ısıtılmaya hazır gıda gibi) alma alışkanlığınız var mı?

☐ Her zaman ☐ Bazen ☐ Hiçbir zaman

18. Çocuğunuz **plastik** bir şişeyi (mesela su şişesi) içindeki içecek tükendikten sonra tekrar doldurup birçok kez kullanır mı?

☐ Her zaman ☐ Bazen ☐ Hiçbir zaman

19. Çocuğunuz için mikrodalga fırında **plastik kap içinde** yemek ısıtır mısınız?

☐ Evet ☐ Hayır ☐ Eskiden ısıtırdım

20. Çocuğunuz için **plastik** biberon ve/veya emzik veya suluk kullandınız mı?

☐ Evet ☐ Hayır

21. Çocuğunuzun **oynadığı oyuncaklar** daha çok hangi tip materyalden yapılmıştır?

☐ Çoğu plastik ☐ Çoğu metal ☐ Çoğu ahşap

22. 21. soruya “çoğu plastik” cevabını verdiyseniz, bu oyuncakların **kalitesi** hakkında bilgi sahibi misiniz?

☐ Hayır dikkat etmem ☐ Evet kaliteli ve pahalı oyuncak alırım
☐ Özellikle bilinen markaları tercih ederim ☐ Çin üretimi markaları **almamaya** gayret ederim.

23. Çocuğunuza leke tutmayan kumaştan elbiseler giydirir misiniz?

☐ Hayır ☐ Evet

24. Çocuğunuzun bebeklik ve çocukluk döneminde evinizde leke tutmaz halılar/koltuklar kullandınız mı?

EK-3. (devam) Gönüllülere Yönelik Anket Formu

[] Evet hala kullanıyoruz [] Evet ama şu an kullanmıyoruz [] Hiçbir zaman.

25. Çocuğunuzun ağızda kompozit (amalgam olmayan renksiz) dolgu diş var mı?

[] Evet [] Hayır

26. 25. soruya cevabınız evet ise çocuğunuzun ağızındaki ilk dolguyu çocuğunuz kaç yaşında iken yaptırdınız?

HEKİM TARAFINDAN DOLDURALACAK KISIM

Tarih:

Hasta Dosya No:

Anketi Yapan Uzman Adı-Soyadı:

1. PKOS Var [] Yok []
2. Var ise ne kadar zamandır?
3. Ailesinde (anne veya kız kardeş/abla) PKOS gözlenmekte midir? **Eğer annesinde PKOS varsa lütfen ondan da numune (kan ve idrar) alınız.**
4. PKOS tedavisi amacıyla herhangi bir ilaç kullanılıyorsa adı ve ne kadar süredir kullanıldığı
5. PKOS ile beraber aşağıdaki durumlar gözlenmekte midir?

	VAR	YOK	NOTLAR
Menstrual bozukluk			
Hirsutizm			
İnsülin Direnci			
Obezite			
Hepatosteatoz			

6. Yapılan biyokimyasal ölçümler nelerdir? Bu ölçümler yapıldığında hasta mensturasyon döneminde miydi? Eğer öyle ise kaçınıcı gündedir? **Lütfen biyokimya sonuçlarını anket formuna ekleyiniz**

Açlık kan şekeri	OGTT 2. Saat kan şekeri	DHEASO ₄
İnsülin	OGTT toplam insülin	Androstenedion
AST	LH	Progesteron
ALT	FSH	Prolaktin
Total Kolesterol	E ₂	SHBG(sex hormon bağlayıcı globulin)
HDL	Total Testosteron	
LDL	Serbest Testosteron	
Trigliserit	17OH Progesteron	

EK-3. (devam) Gönüllülere Yönelik Anket Formu

7. Eğer hastada PKOS dışında hiperandrojenizm nedeni olabilecek aşağıdaki diğer durumlar varsa lütfen çalışmaya **dahil etmeyiniz.**

Hiperprolaktemi

Androjen-sekresyon tümörler

Cushing sendromu

Klasik olmayan konjenital adrenal hiperplazi

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : İPEK, Çağrı
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011
Lise	Çorum Fen Lisesi	2006

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2016- devam ediyor	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	Müfettiş
2013-2016	Çankaya İlçe Sağlık Müdürlüğü	Eczacı
2011-2013	Serbest Eczane Sahip ve Mesul Müdürlüğü	Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Kadioglu, E., Altun, B., İpek, Ç., Döğre, E., Bideci, A., Attaran, H., and Çok, İ. (2018). The role of DENND1A and CYP19A1 gene variants in individual susceptibility to obesity in Turkish population-a preliminary study. *Molecular biology reports*, 45(6), 2193–2199.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..