



**T.C AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KADIN HASTALIKLARI VE
DOĞUM ANABİLİM DALI**

**XENOÖSTROJENLERİN (PARABENLERİN) ENDOMETRİYUM
KANSERİNDEKİ ROLÜ**

YANDAL UZMANLIK TEZİ OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

UZM.DR SELEN DOĞAN

ANTALYA 2016



**T.C AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KADIN HASTALIKLARI VE
DOĞUM ANABİLİM DALI**

**XENOÖSTROJENLERİN (PARABENLERİN) ENDOMETRİYUM
KANSERİNDEKİ ROLÜ**

YANDAL UZMANLIK TEZİ OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

UZM.DR SELEN DOĞAN

TEZ DANIŞMANI

Prof Dr Tayup ŞİMŞEK

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

**Bu tez çalışması Akdeniz Üniveritesi Bilimsel Araştırmalar Proje Kurulu tarafından
desteklenmiştir. Proje No: TSA-2015-415**

ANTALYA 2016

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında ve tüm yandal uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel birikimlerinden ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam ve tez danışmanım Prof Dr Tayup Şimşek'e , bu tez çalışmasının hayata geçmesinde büyük çaba sarf eden uzman kimyagerler Taner ErKaymaz ve Timur Tongur'a, karşılıksız sevgi ve desteklerini her daim yanımda hissettiğim başta kızım Ela Ece Doğan olmak üzere, eşim Nasuh Utku Doğan, annem Münire Sungur ve babam Mehmet Alben'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yandal uzmanlık eğitimim sürecinde birlikte çalıştığımız asistan arkadaşlarım, tüm görevli hemşire ve personele de yardımlarından ötürü teşekkürü bir borç bilirim.

Dr Selen Doğan

ÖZET

Xenoöstrojenlerin (Parabenlerin) Endometriyum Kanserindeki Rolü.

Amaç: Bu çalışmada; endometriyum kanserli hastaların endometriyum ve myometriyum dokularında, ve karsinomatöz olmayan endometriyum ve myometriyum dokularında, beş paraben molekülünün (Metilparaben, Etilparaben, N-Propilparaben, Benzilparaben, İzobutilparaben+N-Butilparaben) konsantrasyonlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmaya toplam 88 hasta dahil edilmiş, 176 adet doku analizi yapılmıştır. Çalışma grubunda 33 endometriyum kanseri ve 6 endometriyal intraepitelyal neoplazi tanısı olan hasta, kontrol grubunda 49 hasta bulunmaktadır ve her hastadan birer endometriyum ve myometriyum örnekleri toplanmıştır. Laboratuvar analizleri yüksek performanslı likit kromatografi ve kütle spektrometrisi (HPLC-MS/MS) cihazıyla yapılmıştır.

Bulgular: Çalışma grubunda hastaların %23.07 (9/39)'sinde, Kontrol grubunda ise %2.04 (1/49)'unda en az bir paraben molekülü tespit edilmiştir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=.002$). En sık tespit edilen moleküller Propilparaben ve İzobutil+Butilparaben molekülleridir (7/10 örnekte). Endometriyum kanseri grubunda, paraben tespit edilen ve edilmeyen hastaların tümör özellikleri (tümör çapı, myometriyal invazyon, yapısal grade, nükleer grade, lenfovasküler alan invazyon, tümör evresi) fark göstermemektedir.

Sonuç: Paraben molekülleri, endometriyum kanseri dokusunda normal endometriyuma göre daha fazla bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Xenoöstrojenler, Sentetik Östrojenler, Karsinogenezis, Hormon Bağımlı Kanserler, Endometriyum Kanseri

ABSTRACT

The Role of Xenoestrogens (Parabens) in Endometrial Carcinoma.

Aim: In this study we aimed to evaluate the concentrations of five paraben molecules (Methylparaben, Ethylparaben, N-Propylparaben, Benzylparaben, Isobutylparaben+N-Butylparaben) in endometrial and myometrial tissue samples of patients diagnosed with endometrial carcinoma and benign gynecologic diseases.

Material and Methods: There were 88 patient in total and chemical analysis was performed for 176 tissue samples. There were 33 patient with the diagnosis of endometrial carcinoma and 6 patient with the diagnosis of endometrial intraepithelial neoplasia in study group and 49 patient in control group. We collected one endometrial and one myometrial tissue sample from each patient. Analysis was performed using Ultrahigh performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

Results: At least one paraben molecule was detected in 23.07% (9/39) of the patient in study group, and 2.04% (1/49) of the patient in control group and the difference between groups was statistically significant ($p = .002$). N- Propylparaben and Isobutyl+N-Butylparaben were the most frequently detected (in 7/10 of the samples) paraben molecules in this study. There were no statistically significant difference regarding tumoral features (tumor diameter, myometrial invasion, architectural grade, nuclear grade, lymphovascular space invasion and tumor stage) between groups of paraben detected and nondetected endometrial carcinoma.

Conclusion: Paraben molecules were more frequently detected in endometrial carcinoma tissue samples than normal endometrium

Keywords: Xenoestrogens, Synthetic Estrogens, Carcinogenesis, Hormone Dependent Carcinomas, Endometrial Carcinomas

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

ÖZET

ABSTRACT

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

ŞEKİLLER DİZİNİ

TABLOLAR DİZİNİ

1.GİRİŞ

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KISA TARİHÇE

2.2. TANIM

2.3. TOKSİKOKİNETİK ÖZELLİKLER

2.4. PATOFİZYOLOJİ

2.4.1 Östrojenik etki mekanizmaları

2.4.2 Düşük doz etkisi-Nonmonotonik doz-yanıt eğrisi

2.5. ENDOMETRİYUM KANSERİ VE KARSİNOGENEZ

2.5.1 Parabenler ve Kanser

2.6. ÖLÇÜM METODLARI

3. MATERYAL VE METOD

3.1. DOKU KAYNAKLARI

3.2. KİMYASAL STANDARTLAR

3.3. PARABEN MOLEKÜLLERİNİN DOKUDAN EKSTRAKSİYONU VE GERİ KAZANIM ÇALIŞMALARI

3.4. KİMYASAL ANALİZ

3.4.1 UHPLC-MS/MS cihazın çalışılması ve parametreleri

3.4.2.Örneklerin Çalışılması

3.5. VERİ ANALİZİ

4.BULGULAR

5.TARTIŞMA

6.SONUÇLAR

7.KAYNAKLAR

SİMGELER VE KISALTMALAR

MePB: Metilparaben

EtPB: Etilparaben

PrPB: Propilparaben

İzoBuPB: İzobütilparaben

BuPB: Bütilparaben

PHBA: Parahidroksibenzoik asit

BisA:BisfenolA

EIN: Endometriyal intraepitelyal neoplazi

EİR: Östrojenle ilişkili reseptör

ER:Östrojen reseptör

EBK: Endokrin bozucu kimyasallar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Yedi p-hidroksibenzoik asit (PHBA) alkil esterinin (para-hidroksi alkilbenzoat) kimyasal yapısı,

Şekil 2.2. Estrojen molekülünün kimyasal yapısı

Şekil 2.3. Metil-, Propil-, Butilparaben ve GPR 30 membran reseptörü ilişkisi

Şekil 2.4. Paraben molekülü ve Sulfotransferaz (SULT) etkileşimi

Şekil 2.5. Doz-Yanıt İlişkisi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Xenoöstrojenlerin dört major grupta sınıflandırılması

Tablo 3.1. Geri Kazanım Sonuçları

Tablo 3.2. Parabenlere ait geçiş değerleri, çarpışma enerjileri ve alıkonma zamanları

Tablo3.3 İyon kaynağının değerleri

Tablo 3.4 Gradiyent programı

Tablo 4.1. Demografik Özellikler

Tablo 4.2. Endometriyum tümör dokusunda, ve normal endometrium dokusunda, raporlama limiti üzerinde tespit edilen parabenlerin HPLC-MS/MS analizi sonuçları

Tablo 4.3. Paraben tespit edilen ve edilmeyen endometriyum kanseri olgularının tümöral özellikleri

1.GİRİŞ

Doğal ve sentetik östrojenlerin etkileri uzun dönemdir bilinmekte ve araştırılmakta iken, sentetik östrojen ile ilişkili kimyasallar (Endokrin bozucu kimyasallar-EBK) ve bunların reproduktif sistem üzerine etkileri ile ilgili güncel veriler oldukça kısıtlıdır. Bu kimyasal moleküller östrojenik etki mekanizmalarını taklit ettiğinden hormon bağımlı kanserlerin gelişiminin etyopatogeneğinde suçlanmaktadır. Çalışmalar daha çok meme kanseri üzerinde yoğunlaşsa da, mekanizma olarak endometriyum kanseri gelişiminde rolü olması mantıksal olarak doğru görünmektedir. Jinekolojik onkoloji pratiğinde en sık görülen hormon bağımlı kanserlerden olan endometriyum kanseri, hastalarımızın büyük bir çoğunluğunu oluşturmakta ve görülme sıklığı giderek artmaktadır. Ancak endometriyum kanserinde EBK'ların tetikleyici/ koaktivatör rolü henüz net olmamakla birlikte bu konuda literatürde de oldukça sınırlı bilgi birikimi mevcuttur. Böyle bir pozitif ilişki gösterildiğinde bu tür kimyasalların maruziyetinden insan vücudunu korumak, koruyucu hekimlik açısından son derece önemli olacaktır. Bu durumda, bu tez çalışmasının ilerdeki kısımlarında da bahsedilecek olan, birçok sentetik östrojenik stimulusa bağlı olarak gelişebilecek hastalığın önüne de geçilebilecek, bu hastalıkların gelişimi önlenilecek ve tedavide yeni stratejiler gelişebilecektir. Bizim bu çalışmamızda bahsedilen kimyasalların bir alt grubu olan ve tüketim sektöründe koruyucu madde olarak oldukça sık kullanılan paraben moleküllerinin (Metilparaben, Etilparaben, n-Propilparaben, Benzilparaben, izobutilparaben+n-butilparaben) sağlıklı endometriyum, myometriyum ve karsinomatöz endometriyum ve buna komşu myometriyum dokularında biyoaktif form olan intakt esterler olarak birikip birikmediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK), çevremizde yaygın olarak bulunan, hayvan ve insanların endokrin sistemi ile etkileşebilen hormon benzeri kimyasal ajanlardır ve bilinen yaklaşık 800 adet EBK mevcuttur. Endokrin bozucu etki, xenoöstrojen, antiöstrojen, antiandrojen, antitiroid, antikortikoid ve ağır metaller (kurşun, kadmiyum) aracılığıyla olabilmektedir. Özellikle xenoöstrojenler 17 beta estradiol'ü taklit ederek, östrojenik son etki oluşturmaları nedeniyle önemlidir. En sık karşılaşılan xenoöstrojenler; fitoöstrojenler, izoflavonoidler, parabenler, fitalatlar, bisfenol A, poliklorinli bifeniller ve organoklorinli insektisitlerdir (DDT vs.). Xenoöstrojenler **Tablo 2.1**'de dört ana grup halinde listelenmiştir. Östrojen hormonu; kadın genital sisteminin embriyolojik gelişiminden başlayarak , gelişim tamamlandıktan sonraki dönem de dahil olmak üzere bir çok reproduktif ve nonreproduktif fonksiyonu olan bir hormon olduğundan, östrojenik etkiyi taklit edebilecek kimyasalların bu sistemlerle ilgili infertilite, polikistik over sendromu, uterin fibroidler, erken başlangıçlı puberte ve hatta kanser gibi patolojilere yol açabileceği düşünülmektedir(1). Ayrıca Amerikan endokrin cemiyetinin yayınladığı bildiride son zamanlarda hormon bağımlı kanserlerin görülme sıklığındaki artışın çevredeki EBK'lara maruziyetin artışına bağlı olabileceği vurgulanmıştır(2).

Tablo 2.1; Xenoöstrojenlerin dört major grupta sınıflandırılması

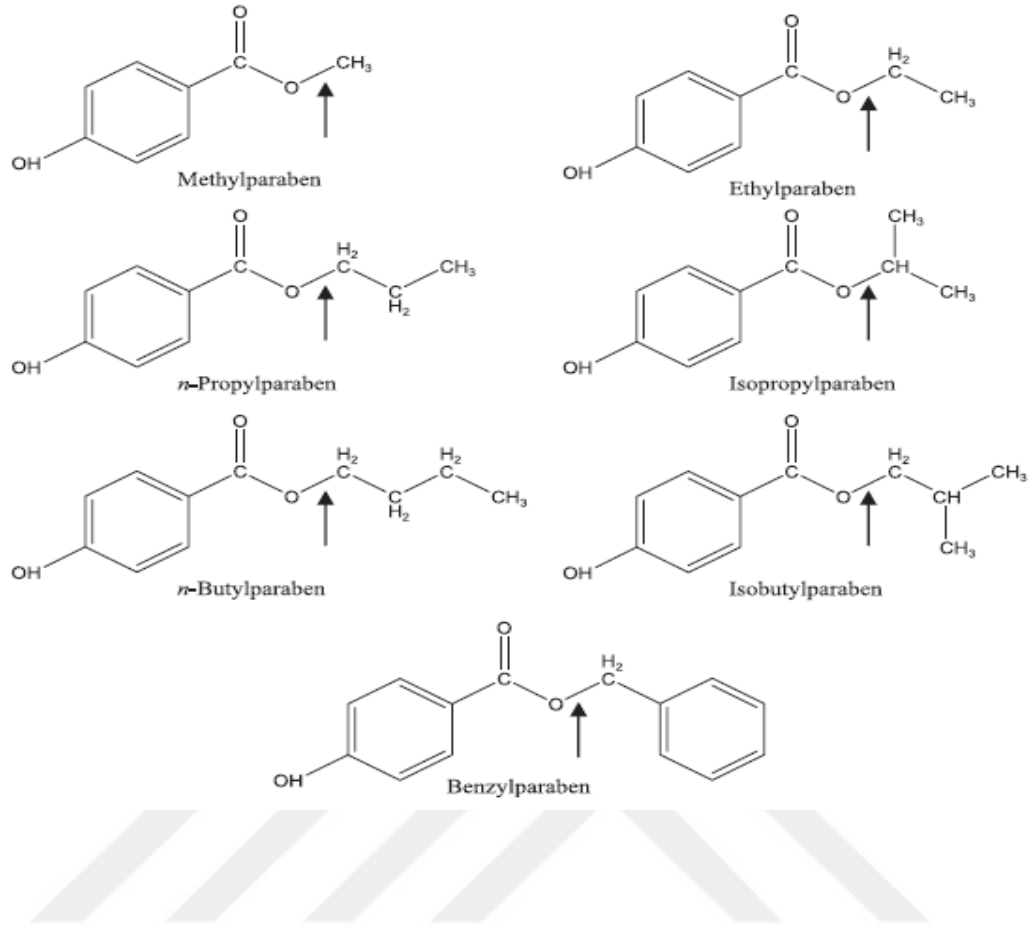
Östrojenik sınıf	Alt tip	Temsil eden bileşik
Fitoöstrojenler	Flavanonlar	Hesperetin, Naringenin, Liquiritigenin, Pinocembrin
	Flavonlar	Acacetin, 7,8-dihidroksiflavn, Mirifisin
	Prenilflavonoidler	8-Prenilnaringenin,6-Prenilnaringenin,8-Geranilnaringenin, 6-8 diprenilnaringenin, İkaritin
	İzoflavonlar	Daidzein, Daidzin, Genistein, Genistin, Glisitein, Ononin, Pruentin, Formoononetin, Peurarin, Tektorigenin, Biokanin A
	İzoflavanlar	Equol (s-Equol), Glabridin
	Dihidrokalonlar	Floretin, Florizin
	Kumestanlar	Kumestan, Kumestrol, Desmetilwedelolakton, Wedelolakton
	Lignanlar	Enterodiol, Enterolakton
	Flavonolignanlar	Silybin, Kinkonain-Ib
	Flavonoller	Quersetin
	Diğerleri	Deoksimiroestrol, Miroestrol, Resveratrol, alfa-izosparteın
Mikoöstrojenler		Zearalanon, Zearalenon, alfa-Zearalanol, alfa-Zearalenol
Sentetik		4-Metilbenzilidenkamfor, Alkilfenol, Atrazin, Bütile hidroksianizol, Bisfenol A, DDT, Dieldrin, Dioksin, Endosulfan, Eritrozin, Heptaklor, Lindan, Metoksiklor, Parabenler, Polibromine bifeniller, Poliklorine bifeniller, Fitalatlar, Propil galat
Metalloöstrojenler		Aluminyum,Antimon,Arsenit,Baryum,Kadmiyum, Krom(2), Kobalt, Bakır, Kurşu, Civa, Nikel, Selenit, Kalay, Vanadat

2.1. KISA TARİHÇE

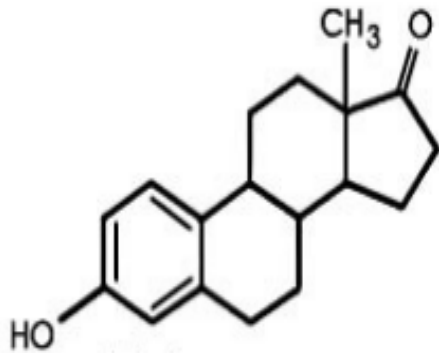
Xenoestrogenlerin olumsuz etkileri ilk olarak 2. Dünya savaşından sonraki dönemde reproduktif faaliyetlerde azalma ve yumurta kabuklarında incelme sonucu bazı türlerin sayıca azalmasıyla fark edilmiştir. Bu ve benzeri bulguların birikimiyle 1970’lerde ABD’de DDT (diklorodifeniltrikloroethane) ve poliklorinli bifenillerin kullanımı yasaklanmıştır. Ardından insan sağlığı üzerine etkilerine yönelik çalışmalar da yayınlandıkça bu konu detaylı araştırılmaya başlanmıştır. Günümüzde her bir paraben molekülünün ürünlerde kullanılabileceği üst limiti belirleyen ve denetleyen sağlık kuruluşları mevcuttur (Kozmetik içerik değerlendirme paneli, Avrupa gıda güvenlik ekspertleri, Danimarka ulusal gıda enstitüsü, Danimarka çevre koruma ajansı).

2.2.TANIM

Paraben moleülleri, para-hidroksibenzoik asit alkil esterleri (4-hidroksibenzoik asit, para-hidroksi alkilbenzoat) olup , ilaç, gıda ve kozmetik (makyaj,deodorant, kişisel temizlik ürünleri vs) sektörlerinde koruyucu molekül olarak kullanılmaktadırlar. Paraben jenerik terimi, benzilparaben (BzPB), bütılparaben (BuPB), etılparaben (EtPB), izobütılparaben (İzoBuPB), izopropılparaben (İzoPrPB) , metılparaben (MePB) ve propılparabeni (PrPB) kapsamaktadır ve kimyasal yapıları Şekil2.1’ de gösterilmiştir. Karşılaştırmalı olarak incelenmesi için estrogen molekülünün kimyasal yapısı Şekil2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Yedi p-hidroksibenzoik asit alkil esterinin (para-hidroksi alkilbenzoat) kimyasal yapısı, oklarla gösterilen kısımdan hidroliz sonucu ortak metabolit PHBA oluşmaktadır.



Şekil 2.2. Estrojen molekülünün kimyasal yapısı

Paraben moleküllerin çeşitli kombinasyonları geniş antimikrobiyel bir spektrum sağladığından tüketim ürünleri sektöründe geniş bir yelpazede mikrobiyal üremeyi inhibe etme ve raf ömrünü uzatma kapsamında koruyucu madde olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır(3). Bunun yanında değişken Ph ve ısı değerlerinde yüksek stabilite, inert yapı, ve düşük maliyeti, kullanımının yaygınlaşmasını sağlamış ve kronik maruziyet riskini artırmıştır(4). 1980'li yıllarda paraben moleküllerinin kozmetik sektöründe kullanımı güvenli olarak bildirilse de, 1990'lardan sonra in vivo ve in vitro uterotrofik etkilere dayanılarak endokrin etkileri olabileceği konusunda kaygılar başlamıştır (5). Parabenlerin naturel östrojenden (estradiol 17beta) 10-2500 kat daha az bir afiniteyle ER'ne bağlanabileceği çeşitli in vitro çalışmalarda gözlenmiş olup, bu afinitenin paraben molekülünün lineer alkil zincirlerinin uzunluğu ve dallanma sayısı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (6). Buna göre östrojen potensiasyon sıralaması methyl- < ethyl- < propyl- = isopropyl- < butyl- < isobutylparaben şeklindedir. Bütün paraben moleküllerinin ortak metaboliti olan PHBA ise in vitro çalışmalarda östrojenik açıdan inaktif bir molekülken, in vivo çalışmaların bazılarında çok düşük de olsa östrojenik aktivitesinin olabileceği yönünde bulgular mevcuttur(7).

Ayrıca genç erkek ratlarla yapılan çalışmalarda , uzun zincirli paraben moleküllerine oral maruziyet sonrasında sperm üretimi ve testosteron seviyeleri üzerine olumsuz etkilerin ortaya çıktığı da gösterilmesiyle bu moleküllerin sadece kadın genital sistemine değil erkek genital sistemine de olumsuz etkileri olduğu anlaşılmıştır(8, 9). Özellikle Darbre ve Harvey'in üst dış kadran lokalizasyonlu meme kanserlerindeki sayıca artıştan yola çıkarak ürettikleri koltuk altı deodorantları gibi kozmetiklerin bu sonuca neden olabileceği hipotezi ve bu hipotezi destekleyen çalışmaları sonucunda

paraben molekülleri, uluslararası bilim camiasında giderek artan bir ilgi odağı haline gelmiştir(10-13) . Bu ve benzeri paraben moleküllerinin kozmetik ürünlerdeki kullanımının endokrin sonuçları olabileceğine dair makalelerin hızla artması ile Avrupa Birliği Tüketim Ürünleri Bilimsel Komitesinin risk değerlendirmesi sonucunda , 2005 yılında, methyl ve ethyl paraben moleküllerinin kozmetiklerde 0.4% 'e kadar kullanımının güvenli olduğu, ancak; propyl, isopropyl, butyl, ve isobutylparaben için verilerin yetersiz olduğu bildirilmiştir. Avrupa gıda güvenliği ajansı, gıdalar yoluyla günlük kabul edilebilir alım miktarını, MePB ve EtPB molekülleri için 10mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (14). Bu konseyin 2010 yılındaki güncelleme raporunda butyl ve propylparaben molekülleri için bireysel konsantrasyonlarının toplamı 0.19 % 'u geçmediği sürece kullanımlarının güvenli olduğu bildirilmiştir(7).

2.3.TOKSİKOKİNETİK ÖZELLİKLER

Cilde uygulanan paraben molekülü deri tarafından emilir ve esteraz enzimleri ile hidrolize uğrayarak metabolize edilir. Emilim ester molekülün zincir uzunluğu ve formulasyona bağlıdır. Genellikle, deriden emilim artan zincir uzunluğu ile azalır. Emilim sonrasında paraben ve metabolitleri konjuge edilerek idrar ve safraya katılarak atılır. Ana metabolit olan PHBA büyük oranda parahidroksi hippürik asit (PHHA, PHBA'in glisin konjugatı) olarak atılır. Oral maruziyet sonrasında ise , parabenler bağırsak ve karaciğerde esteraz enzimleri aracılığıyla metabolize edilir. Oral alım durumunda üriner atılıma ek olarak safra ve feçesle de atılım gerçekleşir (15). Bu şekilde oral alım sonrasında presistemik intestinal metabolizma in vivo sistemik maruziyeti azaltmaktadır. Bu eliminasyon mekanizmaların bilinmesi bize şu bilgiyi vermektedir. Eğer intakt paraben esterleri insan dokusu ya da idrarda saptanacak olursa bu durumun etkeninin oral maruziyet olma olasılığı düşüktür. Çünkü oral maruziyet

sonrası paraben esterleri hem bağırsak hem de karaciğerde metabolize olduğundan intakt ester moleküllerin bu metabolik yollardan kurtulma olasılığı çok düşüktür. Böylece dermal maruziyetin potansiyel etken olduğu söylenebilmektedir. Özellikle son yıllarda artan çoklu kozmetiklerin kullanımına bağlı olarak, deride gerçekleşen esterazlar aracılı paraben moleküllerinin hidrolizi reaksiyonu, inkomplet olarak gerçekleşebilmektedir, buna bazı bireyler arası enzim farklılıkları da katkı sağlayabilmektedir(16).

Paraben molekülünün insanlarda emilim ve metabolizmasına bakacak olursak kandaki paraben molekülünün idrarda ana molekülün, glisin, glukuronid ya da sülfat konjugatları olarak ya da metabolitleri PHBA olarak ekskrete edildiği görülmektedir. Kronik uygulama çalışmaları paraben moleküllerinin vücutta birikim yapmadığını , intravenöz uygulamadan hemen sonra bile serum konsantrasyonlarının hızla azaldığını ve düşük seyrettiğini göstermiştir(15). Ye ve ark. insan kan örneklerinde MePB, EtPB, PrPB düzeylerini ölçmüş ve serbest PrPB için ortalama seviyeyi 0.4ng/ml en yüksek seviyeyi ise 2.3ng/ml bulmuştur. Konjuge formların da ölçülebilmesi için enzim uygulaması ardından ölçülen ortalama total PrPB 8ng/ml, en yüksek seviye ise 67.4ng/ml olarak saptanmış, bu seviyenin %87'sinin konjuge formlardan oluştuğu tespit edilmiştir(17). MePB ve EtPB için ise serumdaki seviye ortalama 42.4 ve 0.6ng/ml olarak ölçülmüş olup %90 ve %100'ünün konjuge formlar olduğu görülmüştür(17). Ishiwatari ve ark.'nın bir çalışmasında ise MePB molekülünün insan derisindeki esteraz enzimi ile komplet parçalanmaya uğramadığı gösterilmiştir. MePB test formulasyonunun (%0.15'lik), 12 saatlik uygulaması ardından stratum korneumdaki MePB konsantrasyonunun 10pmol cm^{-2} olduğu ve %0.028'lik uygulama ve tekrarlayan uygulamada (1 ay boyunca günde iki kez) MePB'in stratum korneumda

1 hafta sonraki miktarının 20pmol cm^{-2} , dört hafta sonra ise 120pmol cm^{-2} olduğu gösterilmiştir. Kullanıma iki hafta ara verildikten sonra ise MePB $<10\text{pmol cm}^{-2}$ seviyesine gerilemiştir (18). Bu çalışmanın önemi, özellikle kozmetiklerin tekrarlayan ve uzun süreli kullanımlarında ya da her biri paraben moleküllerini içeren çoklu kozmetiklerin kullanımında bu moleküllerin deride birikebileceği konusunda uyarı teşkil etmesidir. Başka bir çalışmada ise daha az lipofilik olmasına rağmen MePB'in diğer parabenlere göre deriyi daha çok penetre edebildiği de gösterilmiştir(19) .

Emilim miktarını tahmin etmek için üriner ölçümler de yapılabilmektedir. Janua ve ark. Çalışmalarında, %2 lik BuPB içeren (800mg/kişi , 10mg/kg bw) bir kremi erkek adaylara uygulamış ve idrarda serbest ve konjuge paraben miktarlarını ölçmüştür. Ortalama 2.5mg/kişi/gün serbest ve konjuge BuPB tespit edilmiştir. Bu da göstermektedir ki 800mg 'ın ortalama 2.5mg 'ı = %0.3 ü geri kazanılmıştır. Maksimum geri kazanım %0.9 olmuştur. Paraben molekülünün %50'den fazlası, ölçülmeyen sülfatlı formda elimine edildiğinden total emilim muhtemelen daha fazla olmaktadır. Bu durumda başlangıç dozun yaklaşık %2'sine kadar serbest ve konjuge BuPB'in total sistemik emilimi gerçekleşmektedir (20). Ye ve ark.'ın farklı bir çalışmasında ise MePB molekülünün %95'inin, PrPB molekülünün de %98'inin konjuge formda (sülfatlı ve glukronide) olduğu görülmüştür(21) .

Hayvan çalışmalarına bakacak olursak Frederiksen ve ark.'ın gebe ratlarla yaptığı çalışmada çeşitli dozlarda ($100, 200$ ve 400 mg/kg bw/gün) subkütan verilen EtPB ve BuPB'in ardından, fetal amniyotik sıvı, fetus ve maternal serum ölçümleri yapılmış ve bu paraben moleküllerinin plasentadan geçtiği, fetus tarafından alındığı ve fetal kompartmanda maternal kana göre bir dereceye kadar konsantre olduğu görülmüştür. Ancak bu ölçümler tek seferlik ve hemen dozlama sonrası olduğundan dağılım paterni

açısından daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Aynı çalışmada ayrıca EtPB'in kan ve doku seviyelerinin BuPB'e göre 10 kat daha fazla olması sebebiyle daha fazla absorbe edildiği sonucuna da ulaşılmıştır (22).

İn vitro çalışmalarda deriyi penetre eden ana molekül ve metabolitlerin toplam miktarının %15-57 arasında değiştiği görülmektedir. Bu miktar in vivo çalışmalardaki idrar ölçümlerinden elde edilen dermal uptake tahminlerinden (%46-94) hafifçe daha azdır. Parabenlerin insan derisinden penetrasyonlarının yaklaşık olarak yapıldığı tahminlerde , risk değerlendirmesi yapılırken , cosmetic ingredient review ve Cowan-Ellsberry gibi kaynaklar, kabaca %50-80 oranını kullanmaktadır (16, 23, 24). Rat derisi üzerinde yapılan bir in vitro çalışmada uygulanan PrPB'in %30'unun deriyi penetre ettiği ve 8 saatlik temas süresi ardından MePB esteri penetrasyon oranının %60'a, EtPB'in penetrasyon oranının %40lara kadar çıkabildiği gösterilmiştir(25). İn vitro metabolizma çalışmalarında, insan derisinin, paraben hidrolizini; insan karaciğeri, rat karaciğeri ve rat derisine göre daha yavaş yaptığı görülmüştür. Başka bir çalışmada, BuPB molekülünün, rat derisinde insan derisine göre daha hızlı parçalandığı gözlemlenmiştir. Bu da insan derisinde, ana komponentin vücuda alımının, rat deri modeline göre hesaplanan alımdan daha fazla olacağını göstermektedir (26). Dermal ürün maruziyetlerinde; kullanılan formülün ne olduğu, formülde alkol varlığı (invitro çalışmalarda esterase inhibisyonu yaptığı gösterilmiş) da önem arz etmektedir. Ethanolün MePB'in dermal penetrasyonunu kuvvetlendirdiğini, hatta hidrolizini inhibe ettiğini ve MePB'in BuPB'e transesterifikasyon ile konversiyonunu tetiklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur(27-30). Transesterifikasyon reaksiyonunun önemli olan kısmı bu sayede daha az östrojenik aktivitesi olan molekülden daha potent östrojenik aktivitesi olan molekülün ortaya çıkmasıdır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalardan öğrendiklerimiz insanlarda maruziyet sonrasında serbest paraben seviyelerinin kanda oldukça düşük olduğunu, hayvanlarda da yine düşük hatta negatif olabildiğini göstermektedir ancak uzun süreli ve kombine maruziyetlerde sonuç farklı olabilmektedir. Ratlarda oral ve dermal maruziyet sonrası idrarda ekskrete edilen ana molekül ve metabolitlerin total miktarına bakıldığında ise bu seviyenin yüksek olduğu görülmektedir, buradan çıkarılacak sonuç ise paraben moleküllerinin önemli oranda vücut tarafından alındığı ancak hızla metabolize edilerek ekskrete edildiğidir. Kan dolaşımına katıldıktan sonra organlara dağılım gerçekleşmekte ancak hızlı hidrolizasyon ve konjugasyon sebebiyle ana molekülün konsantrasyonu aktif hedef dokuda oldukça düşük olmaktadır. Bu örneği sistemik dozu %2 olan BuPB için yapılan hesaplamalarla beraber yukarıda vermiştik(15).

2.4.PATOFİZYOLOJİ

2.4.1.Östrojenik etki mekanizmaları

Sentetik östrojenik moleküller bir çok mekanizma ile östrojenik sonuç etkiyi oluşturabilmektedir. Östrojen reseptörüne bağlanıp direk hormonal etki oluşturabildiği gibi, reseptöre bağlanıp onu bloke edip, kendisi etki oluşturmada esas endojen hormonun etkisini bloke edebilir ya da hormon reseptörlerinin yapım-yıkım döngüsünü etkileyerek endojen hormonun etkisi üzerinden de indirek etki oluşturabilirler. Bu sonuç etkilerden hangisinin oluşacağını belirleyen faktörler östrojenik ligandın yapısı, konsantrasyonu, koregülatörlerin varlığı ve dokuda eksprese edilen östrojen reseptörünün subtipidir (31).

Normal reproduktif dönemde primer fizyolojik östrojen estradioldür ve aromataz enzimi aracılığıyla androjenlerden sentezlenir. Aromataz enzimi gonadlarda,

beyinde, ve yağ dokuda bulunmaktadır. Estradiol diğer steroid hormonlar gibi kanda serbest (bağlı olmayan, konjuge olmayan), biyo ulaşılabilir (düşük afinite ile albumin gibi taşıyıcı proteinlere bağlı), ve inaktif (yüksek afinite ile seks hormon bağlayıcı globulin ya da alfa fetoprotein gibi taşıyıcı proteinlere bağlı) formlarda bulunur. Sadece %2 gibi küçük bir fraksiyonu serbest formda bulunur ve hücre içine pasif difüzyonla girmektedir(32). Bu bağlı formların, sistemi dengede tutarak fazla hormon stimulusundan organizmayı koruduğu düşünülmektedir. Xenoöstrojenlerin bir kısmının ise endojen östrojene göre biyoaktif fraksiyonun çok daha yüksek olduğuna (inaktif form ya hiç yok ya da çok düşük düzeyde) dair çalışmalar mevcuttur (33). Bu kimyasalların endojen östrojen gibi, dengeleyici bir bağlı formu da olmadığından çok küçük bir konsantrasyon değişikliği bile dolaşımdaki endojen hormon dengesini bozabilecektir(34).

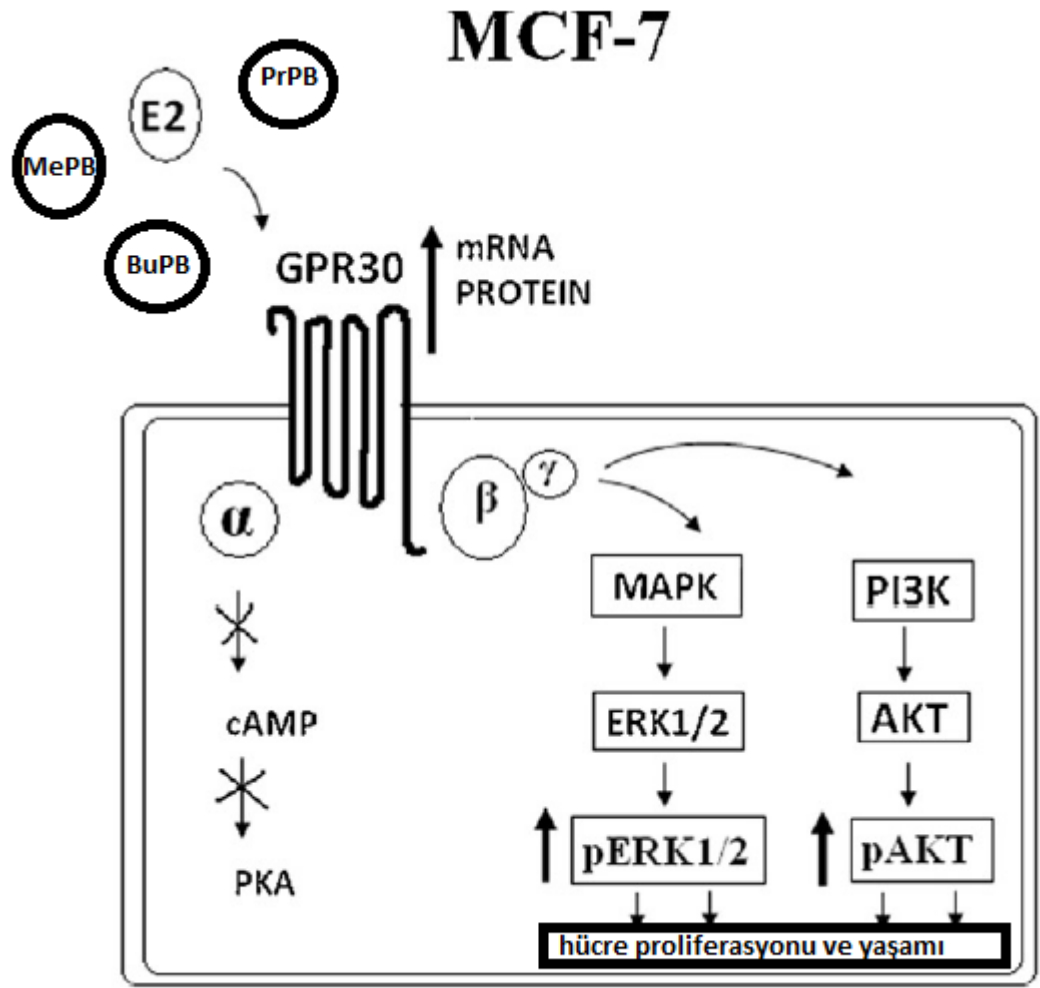
Normal fizyolojik süreçte lipofilik bir steroid hormon olan östrojen hormonu, nükleer östrojen alfa ve beta reseptörleri aracılığı ile etki ederek DNA üzerindeki östrojen yanıt elemanları denen araçlar vasıtasıyla gen ekspresyonunu yöneterek etki etmektedir. Östrojen reseptörü üzerinde ligand ve DNA bağlayan farklı kısımlar mevcuttur. Bunlar dışında östrojen reseptöründe ligand bağımsız aktivasyon fonksiyonu kısmı (AF1) ve ligand bağımlı aktivasyon fonksiyonu kısmı (AF2) da bulunmaktadır ve bu kısımların dağılımı dokudan dokuya değişmektedir (memede AF2 baskınken, endometriyal hücrelerde AF1 baskın) (35). Endojen ya da xenobiotik östrojenden oluşan ligand, bu nükleer reseptörlere bağlandığında reseptörde aktive edici bir konformasyonel değişiklik meydana gelmekte (homo-heterodimer, her iki reseptörden hangisinin var olduğuna göre değişir) ve bu değişiklik östrojen yanıt elemanları ile iletişimi sağlamaktadır. Farklı ligandların farklı konformasyonel değişiklikler ile

spesifik komodulator proteinlerin aktivasyonunu sagladigi bilinmektedir. Xenoostrojenler de bu reseptorler araciligiyla farkli konformasyonel degisikliklere yol acararak oestrojenik, antiostrojenik ya da mix doku spesifik agonist/antagonist(SERM) etki gosterebilmektedir (36, 37). Bu nukleer reseptorler aracili iletim, transkripsiyon ve protein sentezi icin genomik aktivasyon gerektirdiginden nispeten yavas bir hızda gercekleşmektedir.

ER alfa düşük ve orta düzeyde bütün fizyolojik sistemlerde , orta seviyede yağ doku ve erkek üreme sisteminde ve yüksek seviyede kadın genital sistemi, meme dokusu ve hipofiz bezinde eksprese edilmektedir. ER beta ise düşük ve orta düzeyde santral sinir sisteminde, immün sistemde ve erkek reproduktif sisteminde, yüksek seviyelerde de over ve prostat dokusunda eksprese olmaktadır (32). Endometrium dokusundaki ER ekspresyonu ise siklusa ve hücrenin lokasyonuna göre değişiklik göstermektedir. Sekretuar fazda fonksiyonel tabakadaki epitelyal ve stromal hücrelerde oestrojen reseptör alfa down regüle iken, bazal tabakadaki aynı hücre tiplerinde oestrojen reseptör alfa düzeyi siklus boyunca korunmaktadır. ER beta'nın ekspresyonu ise siklus boyunca küçük dinamik degisiklikler göstermektedir. Ayrıca endometriyumun vasküler endotelinde mevcut olan başlıca reseptör izoformunun da ER beta olduğu bilinmektedir (38). Myometriumda da premenopozal ve postmenopozal durumlara göre farklı oranlarda olmak üzere ER alfa ve beta eksprese edilmektedir. ER betanın, ER alfanın transkripsiyonel aktivitesini regüle etme görevi olduğu, bu nedenle bu iki reseptör izoformunun birbirine göre rölatif ekspresyon düzeylerinin agonist veya antagonist yanıt oluşumunda anahtar belirleyici olduğu gösterilmiştir(39). Oestrojenik stimulusun en önemli etkenlerden biri olduğu endometriyum kanserinde, tümör diferansiasyonu kötüye doğru gittikçe oestrojen reseptör alfa ve progesteron reseptör ekspresyonunun

azaldığı, ayrıca östrojen reseptör alfa ve COX-2 enzim ekspresyonunun ters ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu da endometriyum kanseri patofizyolojisinde östrojenin, inflamatuvar mediyatörler üzerinden de tumor progresyonuna katkı sağlayabileceğiyle ilişkili kanıtlardan birisidir (40, 41).

Östrojenin etki mekanizmalarından bir diğeri de gen uyarımı ile ilişkili olmayan hızlı, plazma membran reseptörü aracılı yanıttır. Bu yanıtta membran reseptörü alfa, membran reseptörü beta ve yedi transmembran reseptörü yapısındaki GPER (eski ismiyle GPR30 reseptörleri) reseptörleri rol oynamaktadır. Bu reseptörler oldukça hızlı bir şekilde çeşitli kimyasal sinyal kaskadlarını tetikleyerek kinaz ve fosfataz sistemlerini aktive eder ve sonuçta enzim, hormon sekresyon aktivasyonu ya da kalsiyum akışı gibi sonuç etkiler oluştururlar. Birçok hormon bağımlı kanserde bu reseptör geninin ekspresyonunda artış olduğu bilinmektedir (42). Genistein, BisA ve parabenlerin bu alternatif östrojen yolağını kullanarak hızlı bir sonuç etki oluşturabileceği meme kanseri hücre kültürlerinde gösterilmiştir (**Şekil2.3**) (43, 44). Wozniak ve ark. çalışmalarında, BisA'nın pikomolar ve nanomolar konsantrasyonlarda bile, bahsedilen membran reseptörleri üzerindeki etkisinin estradiol kadar potent olabileceğini göstermişlerdir(45). Bu farklı ve kompleks reseptör mekanizmaları üzerinden gelişen sonuç etkiler bilinenin aksine xenoöstrojenlerin in vivo ortamda tahmin edilenden çok daha potent olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 2.3. Metil-, Propil-, Butilparaben ve GPR 30 membran reseptörü ilişkisi

(44)

Normalde in vivo koşullarda östrojen etkisi östrojenin sülfat konjugasyonunu sağlayan sulfotransferaz enzimi ve sülfat gruplarını ayırarak serbest östrojen sağlayan sülfataz enzimi arasındaki denge ile sağlanır. Bazı endokrin bozucu kimyasalların ve hatta paraben moleküllerinin sulfotransferaz enzim inhibisyonu yoluyla serbest östrojen seviyelerini arttırarak indirek olarak östrojenik etkiyi kuvvetlendirdiği gösterilmiştir(Şekil2.4) (46)

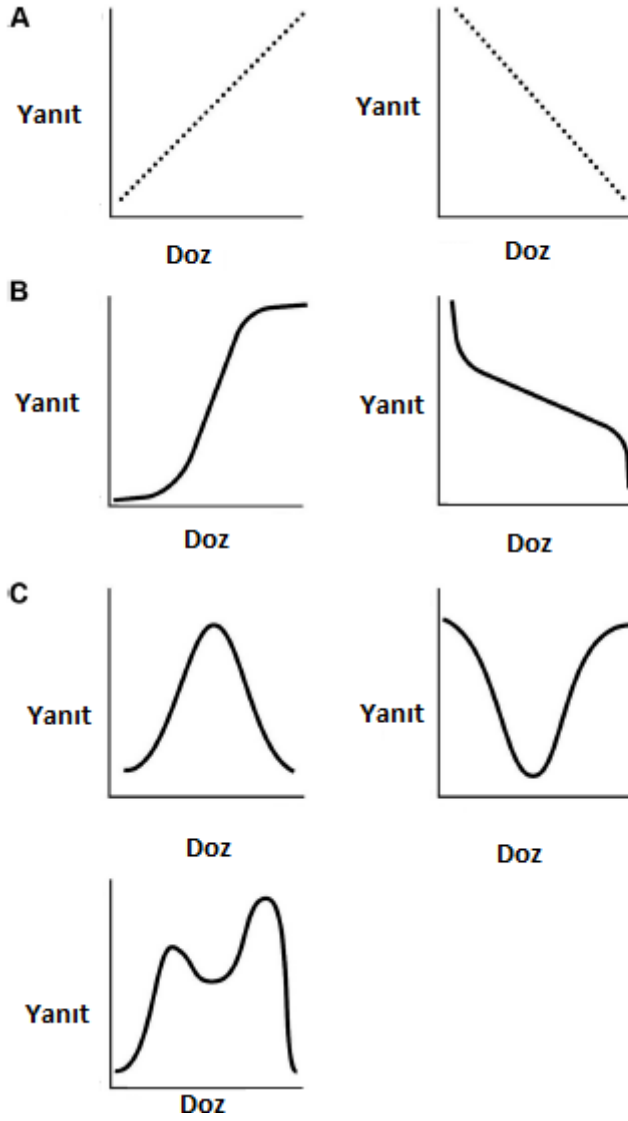
grubundan östrojen ilişkili reseptörler aracılığı ile de etki edebileceği gösterilmiştir. Bu reseptörler transkripsiyonel koaktivatörlerle etkileşerek (östrojen yanıt elemanları vs.), ligand yokluğunda transkripsiyonel aktivasyon sağlayabilmektedir. Zang ve arkadaşları parabenlerin östrojenle ilişkili reseptör gamma üzerinde kuvvetli bir inverse antagonistik etki göstererek bu moleküllerin meme karsinogenezindeki rolünün önemini ortaya koymuştur(48).

Her bir paraben molekülünün ER alfa ve betaya bağlanma afinitesi farklıdır ve bu moleküller her iki izoformdan birini özellikle tercih etmemektedir. Paraben moleküllerinin bu reseptörler aracılığı ile östrojene paralel bir şekilde östrojen bağımlı genlerin ekspresyonunu (progesteron reseptör, östrojen reseptör alfa vs..) artırdığı gösterilmekle birlikte, bazı genlerin de paraben moleküllerine, östrojenden farklı bir yanıt profili gösterdiği görülmektedir (49, 50). Bu nedenle paraben moleküllerine değişik dokularda değişik kombinasyonlarda farklı yanıtlar oluşabilmektedir. Parabenler bu özellikleri ile diğer bir xenoöstrojen molekül grubundan olan fitoöstrojenlerden ayrılmaktadır. Kumesterol, Genistein ve Daidzen gibi fitoöstrojenler ER beta'ya daha fazla afinite göstermektedir (51). Ayrıca full östrojen antagonisti bir molekülle, paraben moleküllerinin hücrel proliferatif etkilerinin bloke edilebilmesi, bu moleküllerin etkilerinin ER bağımlı olduğu ve östrojen agonisti oldukları hipotezini desteklemektedir(50) . Östrojenle aynı reseptör mekanizmasını kullanan bu moleküller için, östrojenle aynı etkiyi oluşturacak doz aynıdır diye bakacak olursak, örnek olarak BuPB için 100 ng/ml^{-1} e eşit olan serum konsantrasyonunun östrojenik eşivalansı hesaplanabilmektedir. BuPB'in 17beta-estradiole göre 10.000 kat daha az potent olduğu bilindiğinden bu konsantrasyonun östrojenik karşılığı 10 pg/ml^{-1} olacaktır ve bu değerler, normal dokulardaki endojen konsantrasyonla da ilişkili olabilecek bir

düzeydedir (meme dokusunda yaklaşık 55 pg/ml⁻¹)(34). Ayrıca BuPB ve MePB ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda MePB'nin daha fazla sayıda gen ekspresyonunda değişiklik sağladığı görülmüştür bu da aslında östrojen reseptör alfa afinitesine göre hesaplanan östrojenik potens sıralamasında en zayıf olan MePB 'in en güçlü olan BuPB'den daha fazla sonuç etki oluşturabilme potansiyelini göstermektedir(49). Aslında ligand bağlanma afinitesinin düşük olmasının tam olarak karşılığı, östrojen reseptörünü satüre etmek için daha yüksek konsantrasyonda liganda ihtiyaç duyulmasıdır. Yani paraben molekülleri, 17 beta estradiol ile aynı afiniteyle ER alfaya bağlanabilmek için daha yüksek dozda ortamda bulunmalıdır. Ligand efikasisi ise ligandın reseptörle ilişkili sinyal yollarını etkileme kapasitesidir. Buna reseptör dimerizasyonu, nukleusa translokasyon, DNA'daki östrojen yanıt elemanlarına bağlanma ve gen aktivasyonu örnek gösterilebilir. İnsan meme kanseri hücre proliferasyonu çalışmalarında (MCF-7 hücre kültürü) gösterildiği üzere, paraben moleküllerinin afinitesinin düşük olması efikasisinin de düşük olacağı anlamını taşımamaktadır (52-55). Yeterli miktarda paraben molekülünün ortamda varlığı durumunda, 17 beta estradiolle aynı oranda yanıt oluşturabilmektedir. Paraben molekülleriyle ilgili yoğun çalışmaları olan Philippa Darbre'nin bir derlemesinde bahsettiği gibi parabenler her ne kadar zayıf östrojenik etkili olarak tanımlanıp parsiyel agonistik etkileri vurgulansa da uzun süreli uygulamalar ve takipler yapıldığında -ki bu gerçek çevresel maruziyet profiline çok daha çok uygundur; düşük dozlarda bile doz artışına gerek duyulmadan full agonistik etkinin oluşabileceğini rapor etmiştir (16). Darbre ve ark., uzun uygulamalar ve takiplerle birlikte her biri düşük dozda olan paraben moleküllerin çoklu karışım kombinasyonlarının da, aynı şekilde hücresel proliferasyonu oluşturabilme potansiyeli bulunduğunu vurgulamışlardır(16).

2.4.2.Düşük Doz Etkisi ve Nonmoonotonik Doz-Yanıt Eğrisi

Endojen hormonlar çok düşük dozlarda (pikomolar) aktivitelerini göstermektedirler. Dolaşımdaki tipik fizyolojik endojen estradiol düzeyi, 10-900 pg/ml şeklindedir. Bağlı fraksiyonlar çıkarılarak düzeltme yapıldığında ise serbest form 0.1-9 pg/ml civarında olmaktadır. Çevresel kökenli sentetik östrojen etkisi gösteren moleküller (xenoöstrojenler) ise daha düşük düzeylerde de aktivite gösterebilse de tipik olarak nanomolar ve mikromolar aralığında aktivite göstermektedirler . Endokrin bozucu kimyasallar ve etki mekanizmaları toksikoloji bilimi tarafından incelenmektedir. Yılların birikimi ve çalışmalardan çıkan sonuçlara göre toksikoloji biliminde ‘zehiri doz belirler’ dogması oluşmuştur. Bunun temelinde çoğunlukla kimyasallarda lineer doz-yanıt ilişkisinin olması yer almaktadır. Ancak endokrin bozucu kimyasallar için bu geleneksel betimle geçersizdir. Çünkü yapılan çalışmalar EBK’ların yüksek doz etkileriyle predikte edilemeyen düşük doz etkileri olabileceğini göstermiştir. Nonmonotonisite ise endokrin bozucu kimyasallarla ilgili bir diğer önemli özelliktir. Nonmonotonik doz yanıt eğrisi, doz ve etki arasında nonlineer bir ilişki olduğu anlamına gelmektedir. Burada etkisi ölçülmek istenen doz incelenirken, doz-yanıt eğrisinin eğimi, herhangi bir yerde yön değiştirebilmektedir. Bu da özellikle düşük dozda maruziyetin olduğu bu kimyasallara karşı yüksek dozla yapılan çalışmalarda gözlenen etkiden farklı bir etki oluşabileceği anlamına gelmektedir (34, 56). Bu doz-yanıt eğrilerini **Şekil 2.5**’te inceleyebiliriz.



Şekil 2.5. Doz-Yanıt İlişkisi A: Lineer doz yanıt ilişkisi, bir doz bilindiğinde farklı bir doza karşı yanıt tahmin edilebilir. B: Monotonik, nonlineer doz yanıt ilişkisi, en düşük ve enyüksek doz yanıtını bilmek orta düzey dozlara yanıtı predikte etmez. C: Nonmonotonik doz-yanıt ilişkisi, ters U, düz U, multifazik; bir dozun etkisini bilmek diğer dozlar için predikasyon sağlamaz (34)

İşte bu nonmonotonik doz yanıt ilişkisi nedeniyle endokrin bozucu kimyasallarla ilgili yapılan çalışmalardaki sonuçlar daha farklı dozlar için genellenemez ve tahmin edilemez. Daha düşük bir doz, çok yüksek bir dozdan daha fazla sonuç etki

oluşturabilir. Özellikle östrojenisite tayininde altın standart olarak kullanılan uterotrofi analizi temelli hayvan çalışmalarındaki endokrin bozucu kimyasallarla farklı sonuçlar elde edilmesinin sebebinin de bu toksikodinamik özelliklerinden kaynaklanmakta olduğu düşünülmektedir

2.5. ENDOMETRİYUM KANSERİ VE KARSİNOGENEZ

Endometriyum kanseri klinikopatolojik özellikleri açısından Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki grupta incelenir. Bu dualistik model Bokhmen'in 1983 yılındaki hipotezine dayanmaktadır. Tip 1 endometriyum kanseri daha çok premenopozal ve perimenopozal kadınlarda, östrojen etkisi altında, atipili endometriyal hiperplazi ya da endometriyal intraepitelyal neoplazi (EIN) aracılığıyla gelişmektedir. Bu tümörler östrojen ve progesteron reseptörleri açısından pozitiflik gösterir ve iyi diferansiye endometrioid adenokarsinomlardan oluşmaktadır. Daha az lenf nodu metastazı, daha az myometriyal invazyon ve daha iyi prognoz özellikleri göstermektedir. Bütün endometriyum kanserlerinin %70-80 gibi bir kısmı bu grup tümörlerden oluşmaktadır. Tip 2 endometriyum kanseri ise daha çok postmenopozal kadınlarda, östrojenle ilişkisiz bir şekilde, normal endometriyumdan denovo karsinogenez aracılığıyla gelişmektedir(57).

Östrojen ve progesteron hormonu biyolojik düzeyde karşılıklı etkileşimlerle hormon duyarlı doku olan endometriyumda dengeyi sağlar. Bu etkileşime, progesteronun östrojen reseptör downregülasyonuna neden olması gösterilebilir. Endometriyal doku RNA ekspresyon profillerinin incelenmesi, normal endometriyumdan karsinomatöz sürece geçişteki transkripsiyonel değişiklikleri gözlemleme şansı vermiştir. Burada tip 1 endometriyoid karsinomda gözlenen profille

östrojen etkisi altında oluşan normal proliferatif endometriyum profilinin benzer olduğu görülmüştür. Östrojen bir takım tümör supresör genleri modüle ederek, hücre proliferasyonunu tetikleyip, apoptozisi inhibe etmekte ve buna bağlı olarak random mutasyon görülme olasılığını artırmaktadır. Her ne kadar serbest radikal oluşumu ile de mutagenezi arttırsa da esas mekanizmanın hücre proliferasyonu üzerinden ilerlediği düşünülmektedir(58).

Erken evre endometriyum kanserinde en önemli anormallik mismatch repair (MMR) gen hasarlarıdır. Bu gen hasarı tip 1 endometriyum kanseri karsinogenezinde oldukça önemlidir. Bu genler DNA sekansından bağımsız olarak epigenetik değişikliklerle hipermetilasyon yoluyla inaktive edilmekte ve DNA hasarı onarılamamaktadır(35). Son yapılan çalışmalarda MMR gen proteinleri ve kan östrojen seviyeleri arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmış, östrojen seviyesinde artışla doz bağımlı olarak endometrial epitelyal hücrelerdeki MMR aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacı yüksek östrojen seviyelerinin, östrojenle paralel olarak artan MMR aktivitesi nedeniyle kanser gelişimi için uygun bir ortam olmadığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte 20-60pg/ml aralığındaki östrojen seviyelerinde bu genlerin ekspresyonu ya hiç gerçekleşmemekte ya da çok düşük düzeyde gerçekleşmektedir. Ancak hücresel çoğalma bir yandan devam ettiğinden genetik hatalarda birikme gerçekleşmekte ve karsinogeneze uygun bir ortam oluşmaktadır. Yazar bu rölatif olarak düşük östrojen seviyelerinde oluşan karsinojenik duruma ‘kanser penceresi’ ismini vermiş ve bu pencerenin özellikle perimenopozal dönemde oluştuğunu vurgulamıştır (59). Tip 1 endometriyum kanseri için diğer sorumlu mutasyonlar, PTEN tümör supresör gen mutasyonu, B-katenin mutasyonu ve k-ras onkogen aktivasyonu şeklindedir. Tip 2 endometriyum kanserinde ise en sık karşılaşılan

genetik mutasyonlar p53 tümör supresyon gen mutasyonu, Her-2-neu onkogen aktivasyonları şeklindedir. Pten, 10. Kromozomda yerleşik bir tümör supresör gendir ve apoptozisi indükler. Mutasyon halinde apoptoz gerçekleşmediğinden hücre çoğalması devam eder. Endometriyum kanserli hastaların %30-50'sinde bu mutasyonun görüldüğü bilinmektedir ve bu mutasyon özellikle erken evrede gerçekleşmektedir. Hücre adezyon molekülü olan e-kaderin molekülünün bir komponenti olan b-katenin mutasyonu, hücre çoğalması ve diferansiasyonu yolağında etkili olan wnt sinyal yolağında önemli bir role sahiptir. K-ras onkogeni ise MAP-kinaz yolağında sinyal iletimi fonksiyonu olan bir protein kodlamakta, mutasyonu halinde sürekli devam eden bir hücresel proliferasyon ve sonunda da karsinogenez gerçekleşmektedir(35).

Bir çok mekanizmanın rol oynadığı endometriyal karsinogenezi, tek bir gen mutasyonu ya da östrojenin neden olduğu proliferasyon stimulusu ile açıklamak mümkün değildir. Ancak Tip1 endometriyum karsinogenezinde ana mekanizma; epigenetik değişikliklerle meydana gelen DNA metilasyonu ve sonrasında gelişen MMR gen anormallikleri, bu anormalliklere bağlı gelişen, onkogen mutasyonları, tümör supresör gen inaktivasyonları ve en sonunda da oluşan kaotik hücre proliferasyonu ve kanser şeklindedir.

2.5.1. Parabenler ve Kanser

Paraben bileşikleri ve kanser ilişkisi konusunda çalışmalar en çok bilinen hormon bağımlı kanserlerden biri olan meme kanseri üzerinde yoğunlaşmıştır. İntakt paraben esterlerinin meme kanseri dokusunda ilk kez gösterilmesinin ardından (60), bir çok çalışma ile pozitif ilişki olabileceği iddia edilmiştir. Östrojen hormonu potent mitojen olarak bilinen bir hormondur. ER alfa aracılı bu mitojenik etki meme

kanserinde c-Myc ve Siklin D1 onkogenlerinde aktivasyona yol açarak, G1'den S fazına hücre siklusunda progresyonu destekleyip, selüler proliferasyon oluşumunu sağlarken, bir yandan DNA instabilitesine neden olmakta ve apoptozu baskılamaktadır(61-63). Normal fizyolojik süreçte, siklus ortasında ovulasyonu takiben korpus luteumdan salgılanan progesteron hormonu, ER alfa'yı down regüle ederek, östrojenin bu stimulan-proliferatif etkisini karşılamaktadır (38, 64). Parabenlerle yapılan çalışmalarda, östrojenle paraben moleküllerinin benzer yollar kullanması (ortak reseptör mekanizmaları ve gen uyarımları) sebebiyle, östrojenik etkiye benzer sonuçlar ortaya konmuştur. Örneğin BePB molekülünün, MCF-7 meme kanseri hücre kültüründe hücresel proliferasyonu tetiklediği gösterilmiştir (54), ayrıca, PrPB molekülünün, Akt kinaz yolağı aktivasyonu sonucu apoptoz inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir(44). Yine MCF-7 insan meme kanseri hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada, bu hücre kültürü uzun dönem (20 hafta boyunca) MePB, PrPB, BuPB moleküllerine maruz bırakıldıktan sonra oluşan yanıt incelendiğinde, hücrelerin migrasyon kapasitesinde artış olduğu gözlenmiştir. Bu değişimin, E-kaderin ve B-katenin seviyelerinde azalma ile gerçekleştiği, bu azalmanın da epitelyo-mezenşimal geçiş ve metastaz süreci ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir(65). Bununla birlikte özellikle dermokozmetikte yaygın kullanılan MePB molekülünün ultraviyole B ışığı ile kombinasyonu sonucu, hücre ölümü, oksidatif stres, nitrik oksit üretimi, lipid peroksidasyonunda artış görüldüğü başka bir çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda MePB molekülünün UV ışınlarıyla indüklenen keratinosit hasarını arttırdığı sonucuna varılmıştır(66). Başka bir çalışmada parabenlerin DNA hasarlandırıcı etkileri rat epididim spermatozoaları üzerinde gösterilmiştir(67). Yine oldukça yeni bir çalışmada ER alfa ve HER2 pozitif insan BT-474 meme kanseri hücre kültüründe, HER reseptör ligandı Heregülinin,

BuPB'in meme kanseri hücre proliferasyonu ve gen ekspresyonunda artışa yol açan sonuç etkisinin, ER alfa aracılı olduğu ortaya konmuştur. Bu da göstermektedir ki daha önceki nontoksik dozlar olarak tanımlanan maruziyet dozlarında, paraben molekülleri endojen birtakım koaktivatörler ve reseptörleri aracılığıyla aktivite gösterebilmekte; östrojenik sonuç etki oluşturabilmektedir. Bir diğer söyleyişte koaktivatör varlığında, paraben molekülleri çok daha düşük dozlarda ER alfa'yı uyarabilmektedir (63). Oldukça yeni olan bu çalışmanın ışığında yeni çalışmaların sonuçları elde edildikçe bu kimyasalların potansiyel zararları daha net ortaya koyulabilecek ve meme kanseri gibi diğer bir hormon bağımlı olan ve oldukça sık rastlanan endometriyum kanserindeki etkileri de daha detaylı incelenebilecektir.

Endometriyum kanseri ve parabenler ile ilişkili literatürde henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Endometrium kanserinin, yüksek beden kitle indeksi, nuliparite, menstruasyonda erken başlangıç yaşı ve menopozal geçiş döneminin uzun sürmesi gibi bilinen bütün risk faktörleri artmış yaşam boyu östrojen maruziyeti ile ilişkilidir. Bu nedenle artmış östrojen maruziyetine sebep olabilecek her türlü dış etken de potansiyel karsinojen olarak endometriyum kanserinde incelenmelidir. Paraben moleküllerinin, her ne kadar eskiden zayıf östrojenik moleküller olduğu düşünüldüğünden, tüketim ürünlerinde kullanımları güvenli olarak bildirilse de, son zamanlarda uzun süreli kombine maruziyetlerin oldukça etkin şekilde östrojenik yanıt oluşturabileceği gösterilmiştir. Her ne kadar bu xenoöstrojenik moleküllerin ana bileşik olarak parçalanmadan kalıp, vücutta birikme eğiliminde olmadığı bilinse de, böyle bir birikim olması halinde uzun süreli maruziyete neden olacağından bu çalışmada paraben moleküllerinin sağlıklı endometriyum, myometriyum ve endometriyum kanser dokularında birikip birikmediğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Günlük kullanılan

ürünler nedeniyle sıkça maruz kalınan paraben moleküllerinin, normal endometriyum, myometriyum ve karsinojenik endometriyumda birikip birikmediğine yönelik bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Bu anlamda bu çalışma İngilizce ve Türkçe literatürde ilk olacaktır.

2.6. ÖLÇÜM METODLARI

Xenoöstrojenlerin çevresel ortamda yaygın olarak bulunmasına bağlı olarak bilim adamları bu bileşiklerin vücudumuzda ne şekilde bir yol izlediğini ve etkileri olabileceğini merak edip araştırmaya başladıktan sonra ilk çalışmalar bu moleküllerin çeşitli çevresel matrisler zemininde (toprak, su, hava, gıda örnekleri –süt vs) ardından da insan idrarında çeşitli analitik metodlarla tespiti üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak idrarda ölçüm bu moleküllere maruziyet prevalansı ile ilgili bilgi vermekte iken paraben moleküllerinin idrarda varlığı insan sağlığına olumsuz etkilerini kanıtlamamaktadır. Bu konuda bilgi elde edebilmek için hedef doku ile etkileşime geçen konsantrasyonların bilinmesi elzemdir. Paraben bileşikleri ile ilgili aktif kimyasal yapının serbest intakt bileşikler olduğundan daha önce bahsetmiştik. Dolayısıyla risk değerlendirmesinde glukronid ya da sulfat konjugatları ya da ortak metabolit olan PHBA konsantrasyonlarının ölçümünden ziyade, ana bileşiklerin ölçümü değer kazanmaktadır. Paraben molekülleri geleneksel olarak gaz kromatografisi ya da yüksek performanslı liquid kromatografi ile ölçülmektedir. Genel anlamda total analiz çeşitli basamaklarda gerçekleşmekte bunlar; örneğin ön hazırlığı, ekstraksiyon-yıkama fazı, ayrıştırma-ölçüm fazlarından oluşmaktadır. Ön hazırlık interferans ya da konjuge olmuş bileşiklerin hidrolizi amaçlı yapılmaktadır (68). Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS)

yönteminde, ayırım ve ölçüm için , ekstraksiyonla birlikte silyl ya da floroasetil derivatifi olarak derivatizasyon ve örneklerin yıkanması gerekebilmektedir. Ayrıca 1ml gibi büyük miktarda örneklere ihtiyaç duyulmaktadır. Biyolojik matrislerde örneğin idrarda paraben moleküllerinin ölçümü için likit kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) tercih edilmektedir. GC-MS ile LC-MS arasındaki tercih hangi kimyasalın ölçüleceğine ve bu kimyasalın volatilité, polarite ve termal stabilitesine göre değişmektedir. Hızlı ve yüksek rezolusyonlu kromatografik ayırmayla kombine kütle spektrometrisinin (UHPLC-MS/MS) yüksek sensitivite, selektivite ve spesifikite özellikleri nedeniyle bazı çalışmalarda da UHPLC-MS/MS tercih edilmektedir(69) .

3. MATERYAL VE METOD

3.1 DOKU KAYNAKLARI

Mevcut çalışma için etik kurul onayı Akdeniz Üniversitesi Araştırma Etik Kurul komitesinden alınmıştır. Hastalardan bilgilendirilmiş onam alındıktan sonra, endometrium ve myometrium dokuları, 2015 ve 2016 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde ameliyat edilen endometriyum adenokanseri hastalarından ve benign jinekolojik patolojileri olan hastalardan elde edilmiştir. Endometriyum kanseri tanısı olan ve benign histolojik özellikteki dokular, frozen incelemede tanı doğrulandıktan sonra, çalışmaya dahil edilmiştir. Histerektomi sırasında frozen incelemeye gönderilen uterus materyali açıldığında, makroskopik tümörü olan hastaların, tümörlü endometriyal dokusundan ve hemen bu alana komşu myometrium dokusundan, en az 1ml olmak üzere doku örnekleri toplanırken, kontrol grubu olan benign jinekolojik patoloji nedeni ile opere olan hastaların, frozen incelemeye gönderilen uterus dokularından, makroskopik olarak normal görünen endometriyal alan ve bu alana komşu myometriyal alandan yine en az 1ml olan doku örnekleri toplanmıştır. Formalinle fiks edilmemiş taze dokulardan alınan bu örneklerin her biri farklı vial kutusuna yerleştirilmiş , hemen -80 derecede dondurularak analiz sürecine kadar Patoloji Anabilim dalı tarafından muhafaza edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen örnekler, arabik sayılarla numaralandırılarak endometriyum adenokanseri ve EIN tanılı hastalardan oluşan hasta grubu H, kontrol grubu K ile kodlanmıştır. Örneklerin toplama süreci tamamlandıktan sonra, dokuların hazırlığı, kimyasalların ekstraksiyonu ve UHPLC MS/MS cihazı ile kimyasalların dokulardaki düzeyinin ölçümleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Gıda güvenliği ve tarımsal araştırmalar merkezi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen endometriyum kanseri hasta grubunun tamamı, probe küretaj işlemi ile endometriyum adenokanseri doku tanısı koyulmuş ve sonrasında kemoterapi ya da radyoterapi almadan, primer cerrahi tedavi amaçlı, belirtilen tarih aralığında kliniğimize başvuran hastalardan oluşmaktadır. Bu şekilde kliniğimize başvuran ve preoperatif doku tanısı endometrioid tip endometriyum kanseri olan bütün hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu hastaları ise bilinen aktif kanser tanısı olmayan, benign patolojiler nedeniyle kadın doğum kliniğinde belirtilen zaman aralığında opere olmuş hastalardan oluşmaktadır.

3.2 KİMYASAL STANDARTLAR

Kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta tercih edilmiştir. Standart maddeler olan %99'luk EtPB (ürün kodu: PHR1011), %99'luk n-PrPB (ürün kodu: PHR1010), %99'luk BePB (ürün kodu: 380709), %97'lik izoBuPB (ürün kodu: 715077) ve %99'luk n-BuPB (ürün kodu: PHR1022) SigmaAldrich firmasından temin edilmiştir. %98.5'luk metilparaben (ürün kodu: 47889) Supelco'dan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan çözgen ve kimyasallar olan %99.8'lik Aseton (ürün kodu: 100012) ve %99.9'luk Metanol (ürün kodu: 106007) MerckMillipore firmasından; %99.5'lik Etanol (ürün kodu: 8462) J.T. Baker firmasından; %98'lik Formik Asit (ürün kodu: 94318) Fluka firmasından; %99'luk Amonyum Asetat (ürün kodu: 70221) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Millipore Milli-Q saf su sisteminden üretilen su çalışmada kullanılmıştır.

3.3 PARABEN MOLEKÜLLERİNİN DOKUDAN EKSTRAKSİYONU VE GERİ KAZANIM ÇALIŞMALARI

Elli ml’lik falkon tüpüne 1 g doku örneği $\pm 0,01$ g hassasiyetle tartılmıştır (geri kazanım çalışması için tartım anından sonra örnek standart eklemesi yapılmıştır). Örnek üzerine 25 ml aseton:etanol (1:1) karışımından oluşan ekstraksiyon sıvısı eklenmiştir. Ağzı kapatılan örnek tüpleri santrifüjlü inkübatörde 10°C sıcaklık ve 250 rpm’de gece boyu santrifüje bırakılmıştır. Santrifüj işleminin ardından tüpler santrifüj edilmiştir. Azot altında çalışan oda sıcaklığındaki suya batırılmış kurutma düzeneği ile tüm ekstraksiyon sıvısı buharlaştırılmıştır. Buharlaştırma işlemi bittikten sonra %70’lik metanol içeren sulu çözeltiden 5 ml tüplere eklenmiştir ve çalkalama yapılmıştır. Eklenen metanolik sulu çözelti de azot altında tamamen uçurulmuştur. 2 ml mobil faz A:metanol (70:30) karışımı uçurma işlemi tamamlanmış tüpe eklenip karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 1.5 ml’lik vialle alınıp cihaza enjekte edilmiştir. Geri kazanım sonuçları **Tablo 3.1’** de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Geri Kazanım Sonuçları 10 µg/L (LOQ seviyesi) seviyesindeki geri kazanım çalışması sonucu elde edilen % geri kazanım, standart sapma, %RSD sonuçları, LOQ değerleri ve 50 µg/L seviyesindeki geri kazanım çalışması sonucu elde edilen % geri kazanım sonuçları

	% Geri kazanım (n=10) 5µg/L spike	SD (standart sapma)	%RSD	LOQ µg/L (kuantifikasyon limiti)	% Geri kazanım (n=5) 50 µg/L spike
metilparaben	77,11	0,50	8,52	5,02	81,46
etilparaben	75,06	0,45	11,01	4,56	78,97
n-propilparaben	72,45	0,47	12,66	4,75	75,52
izobütilparaben + n-butilparaben	80,22	0,46	11,2	4,62	83,61
benzilparaben	74,50	0,44	9,32	4,44	79,55

3.4. KİMYASAL ANALİZ

3.4.1 UHPLC-MS/MS cihazın çalışılması ve parametreleri

Analizlere başlamadan önce bileşenlerin standart çözeltileri kullanılarak kütle dedektöründe optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Yüksek konsantrasyonda hazırlanan single standart çözeltiler kullanılarak “tune” olarak adlandırılan işlem yapılmış ve bileşenler MS/MS’e tanıtılmışlardır. Bu işlem ile bileşenlere ait ana kütleler ve bu kütlelere uygulanan çarpışma enerjileri sonucunda parçalandıkları geçiş iyonları tespit edilmiştir. Elde edilen birbirinden farklı kütle/yük (m/z) değerleri bileşenler için seçicidir. Çift kütle dedektör sistemlerinde 3 adet sıralı kuadropol bulunmaktadır; bunlar sırasıyla Q1, Q2 ve Q3. İlk kuadropolde (Q1) ana kütleyle bir proton verilmesi ($M+1$) ile pozitif iyonlaşma veya ana kütlede bir proton alınması ($M-1$) ile negatif iyonlaşma meydana gelmektedir. Elde edilen verilere göre paraben bileşenleri negatif iyonlaşma göstermişlerdir (**Tablo 3.2**). Q1’de elde edilen ana iyon filtrelenerek Q2’ye geçmektedir. Q2’de ana kütlelere argon gazı ve hızlandırma voltajları uygulanarak parçalanır ve geçişiyonu oluşur. Q3’de ise ikinci kuadropolden elde edilen yeni iyon parçacıkları filtrelenerek her bir paraben için spesifik ürün iyon spektrumu elde edilmesi sağlanmış olur. Analiz metodu geliştirilirken, kütle dedektöründeki bu çalışmalara ek olarak, elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağında da uygun sprej voltajı, kapiller sıcaklığı, perdeleme (sheath) gaz, yardımcı (auxillary) gaz denemeleri yapılmıştır, optimum değerler bulunmuştur (**Tablo3.3**). Bu işlemlerden sonra konsantrasyonları bilinen saf standartlar kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizilmiştir ve örneklerin kantitatif değerlendirilmesi de bu eğriler kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 3.2. Parabenlere ait geçiş değerleri, çarpışma enerjileri ve alıkonma zamanları

	Ana iyon (m/z)	Geçiş iyonu (m/z)	arpışma enerjisi (V)	Alıkonma zamanı (dak)
Metilparaben	151.1	92.1	15	0,88
Etilparaben	165.1	92.1	15	1,14
N- Propilparaben	179.1	92.1	15	1,74
İzobütilparaben + N- Bütilparaben	193.1	92.1	15	2,36
Benzilparaben	227.3	92.1	15	2,33

Tablo3.3. İyon kaynağının değerleri

Kapiler sıcaklığı	270 ⁰ C
Perdeleme (sheath) gaz	30 Arb
Yardımcı (auxillary) gaz	10 Arb
Sprey voltajı	3500 V
İyonizasyon modu	Negatif

Kütle dedektöründe yapılan optimizasyon çalışmalarının yanında sıvı kromatografisi kısmında da optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Birbirinden farklı iki adet mobil faz (inorganik ve organik bazlı) ve gradiyent akış programı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz bileşenlerinin optimum seviyede ayırımı için uygun mobil faz çözelti oranları, gradiyent akış programı, kolon fırın sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi örnek analizlerinden önce denemeler yapılarak bulunmuştur. Analiz süresi 5 dakika, kolon fırın sıcaklığı 40⁰C, enjeksiyon hacmi de 10 µl olarak belirlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan mobil fazlar ve içerikleri şu şekildedir; mobil faz A su:metanol (95:5), %0.1 formik asit ve 4 mM amonyum asetat karışımından oluşurken, mobil faz B sadece metanol içermektedir. Denemeler sonunda elde edilen gradiyent program **Tablo 3.4'**de verilmiştir.

Tablo 3.4. Gradiyent program

Dakika	% Mobil faz A	% Mobil faz B	Akış hızı (µl/dakika)
0.00	50	50	300
3.00	20	80	300
3.50	0	100	300
4.50	0	100	300
5.00	50	50	300

3.4.2.Örneklerin Çalışılması

Tez çalışmasında örneklerdeki paraben bileşenlerin kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesinde, Thermo TSQ Quantum Access Max ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (UHPLC-MS/MS) kullanılmıştır. Bu sistem ThermoAccela UHPLC pompa, otoörnekleyici, degazer, kolon fırını ve çift kütle dedektöründen (MS/MS) oluşmaktadır. Kütle dedektöründe iyonlaşma, elektrosprey iyonizasyon (ESI) yöntemi ile yapılmıştır. Paraben bileşenlerinin kromatografik olarak ayırımı ise ThermoHypersil Gold 50mm x 2.1mm x 1.9µm partikül boyutlu C18 kolon kullanılarak yapılmıştır.

Standartlar $\pm 0,01$ mg hassasiyetli Precisa XR 125SM terazide, ekstraktlar ise $\pm 0,01$ g hassasiyetli Kern PFB1200 terazide tartılmışlardır. Örnekler Sartorius StedimCertomat IS çalkalamalı inkübatörde ekstrakte edilmiş, Eppendorf Centrifuge 5810R'de santrifüj edilmiş, Teknosem TAB 40-WEL evaporatorde de uçurulmuşlardır.

3.5 VERİ ANALİZİ

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 15 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu, analitik yöntemlerden Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Deskriptif analizler normal dağılan sayısal değişkenler için ortalama, normal dağılmayan sayısal değişkenler için ortanca , ordinal değişkenler için frekans (%) olarak verildi. Normal dağılan sayısal değişkenler student t testi, normal dağılmayan sayısal değişkenler ve ordinal değişkenler ise Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. P değerinin $<.05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya toplam 88 hasta dahil edilmiştir. Her hastadan; bir endometriyum, bir myometriyum olmak üzere iki örnek alınmıştır. Çalışma sonunda toplam paraben analizi yapılan doku sayısı 176'dır. Çalışmaya dahil edilen hastalardan; 30 hasta endometrioid tip endometriyum adenokarsinomu, 1 hasta endometriyum müsinöz adenokarsinomu, 2 hasta berrak hücreli endometriyum karsinomu, 6 hasta EIN tanısı olan hastalardan oluşmaktadır. Berrak hücreli karsinom olan hastalardan birinin preopeatif endometriyal örnekleme sonucu endometrioid adenokarsinom histolojisinde olduğundan çalışmaya dahil edilmiş ancak nihai patoloji berrak hücreli karsinom olarak raporlanmıştır. Müsinöz alttıpte tanı alan hasta da adenokarsinom alttıpi olduğu için çalışmaya dahil edilmiştir. EIN tanısıyla çalışmaya alınan 3 hastanın preoperatif endometriyal örneklemelelerinde, aynı histopatolojik özellikler mevcut olup, bu hastalar baştan çalışma grubuna dahil edilmiş, diğer 3 hastadan ise başlangıçta kontrol grubu için örnek toplanmış, ancak nihai patoloji sonucu EIN ile uyumlu rapor edildiğinden hastalar çalışma grubuna alınmıştır. Sonuç olarak çalışma grubu 39 hasta (78 doku örneği), kontrol grubu ise 49 hasta (98 doku örneği)'dan oluşmaktadır. Gruplardaki hastaların demografik özellikleri **Tablo4.1** de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Demografik Özellikler

	Çalışma Grubu (39)	Kontrol grubu (49)	P değeri
Yaş (ortalama)	57.3 ±7.9	49.2±5.8	<.001
Gravida (ortanca)	3	3	>.05
Parite (ortanca)	2	2	>.05
Beden Kitle İndeksi (ortanca)	31	27.5	.008
Postmenopozal (%)	78.4	26.3	<.001
Sigara Kullanımı (%)	25	16.7	>.05
Eğitim Durumu ≤ İlkokul (%)	69.4	56.7	.038
Aylık Gelir <1000TL (%)	45.7	41.4	>.05
Yerleşim (Şehir) (%)	55.6	66.7	>.05
Günlük kullanılan ilaç sayısı ≥2 (%)	50	40	>.05
Deodorant / Koltuk altı stick Nemlendirici krem /güneş kremi en az birini ≥ haftada iki (%)	35.5	40	>.05
Korunma Yöntemi Kullanım Geçmişi (RİA/KOK) %	20	33.3	>.05

Çalışma grubunda EIN tanısı olan hastalardan birinin endometriyum örneği; kontrol grubunda ise bir hastanın endometriyum örneği, başka bir hastanın da myometriyum örneği , analiz esnasında kayba uğradığından sonuç elde edilememiştir. Kontrol grubunda sınıflandırılan hastaların en sık tanısı myoma uteri %48.9 (24/49), adenomyozis %24.4 (12/49), ve benign over kistleri %10.2) (5/49) dir.

Endometriyum kanseri ve endometriyal intraepitelyal neoplazi hastalarının dokularından oluşan çalışma grubunda, endometriyumda en az bir paraben molekülü tespit edilme oranı %23.07 (9/39), kontrol grubunda ise %2.04 (1/49) dir ve bu raporlama limiti (>5ng/g) üzerinde tespit edilen değerler **Tablo 4.2.** de listelenmiştir. Çalışma ve kontrol grubunda, endometriyum dokularında, paraben tespit edilme oranları karşılaştırıldığında, en az bir paraben molekülü tespit edilme olasılığı, çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (p: .002).Çalışmanın tamamında en sık tespit edilen Paraben molekülleri ise PrPB ve İsoBuPB+BuPB molekülleridir ve eşit sıklıkta tespit edilmiştir %70 (7/10). Endometriyum kanserinde tespit edilen paraben molekülü ortalaması ise 43.58 ng/g olarak tespit edilmiştir. Hem çalışma grubunda, hem de kontrol grubunda hiçbir myometriyum dokusunda paraben molekülü tespit edilmemiştir.

Tablo 4.2. Endometriyum tümör dokusunda (H), ve normal endometrium dokusunda (K), raporlama limiti üzerinde tespit edilen parabenlerin HPLC-MS/MS analizi sonuçları

Örnek Kodu	Metilparaben (ng/g)	Etilparaben (ng/g)	N-propilparaben (ng/g)	Benzilparaben (ng/g)	İsobutilparaben +N-Butilparaben (ng/g)	Total (ng/g)
H1	<RL	<RL	60.56	9.14	118.24	187.94
H3	<RL	<RL	14.99	<RL	37.8	52.79
H4	<RL	<RL	7.86	<RL	<RL	7.86
H9	<RL	<RL	18.22	<RL	<RL	18.22
H10	<RL	<RL	6.35	<RL	5.75	12.1
H11	<RL	<RL	<RL	<RL	10.01	10.01
H12	<RL	<RL	7.39	<RL	71.07	78.46
H28	<RL	<RL	11.8	<RL	7.65	19.45
H29	<RL	<RL	<RL	<RL	5.46	5.46
K22	<RL	<RL	<RL	22.4	<RL	22.4

RL:Raporlama Limiti,>5ng/g

Tablo 4.3. Paraben tespit edilen ve edilmeyen endometriyum kanseri olgularının tümöral özellikleri

Grup 1										Grup2																											
Örnek Kodu	H1	H3	H4	H9	H10	H11	H12	H28	H29	H5	H6	H7	H8	H13	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H24	H25	H26	H27	H30	H31	H33	H34	H35	H36	H37	H38	P			
Tümör Çapı (mm)	20	20	45	70	7	20	55	30	50	40	15	50	22	35	20	55	21	22	30	35	25	15	15	50	35	95	5	45	60	15	27	35	5	p>.05			
Myometriyal İnvazyon	<%50	-	>%50	>%50	<%50	<%50	<%50	<%50	<%50	<%50	<%50	>%50	<%50	<%50	<%50	>%50	<%50	-	>%50	>%50	<%50	>%50	<%50	>%50	<%50	>%50	<%50	<%50	<%50	<%50	<%50	>%50	>%50	>%50	>%50	p>.05	
Yapısal Grade	3	Berrak Hücreli	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	Berrak Hücreli	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	2	p>.05			
Nükleer Grade	3	Berrak Hücreli	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	3	1	Berrak Hücreli	2	1	2	2	2	2	2	3	1	2	2	2	2	2	2	p>.05		
Lenfovasküler Alan İnvazyonu	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	p>.05		
Evre	IA	IA	IB	II	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IA	IA	IA	IB	IA	IA	IIIc1	IB	IA	IA	IA	IB	IA	IB	IA	IA	IA	IA	IB	IB	IB	IIIc1	p>.05		
Paraben Total Düzeyi (ng/g)	187.94	52.79	7.86	18.22	12.1	10.01	78.46	19.45	5.46	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	<RL	p>.05		

Grup1: Paraben tespitedilen çalışma grubu, Grup2: paraben tespit edilmeyen çalışma grubu, RL: Raporlama limiti (>5ng/g)

Paraben moleküllerinden en az birinin tespit edildiği endometriyum kanseri olgularıyla herhangi bir paraben molekülü tespit edilmeyen olguların tümör özellikleri karşılaştırıldığında paraben tespit edilen grupta ortalama tümör çapı 35.2 ± 20.7 mm, diğer grupta ise 32.1 ± 20.1 mm olarak tespit edilmiştir ($p > .05$). Myometriyal invazyon , yapısal grade , nükleer grade , lenfovasküler alan invazyonu ve tümör evresi açısından da paraben tespit edilen ve edilmeyen iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Tümörün yapısal ve nükleer grade özelliklerine göre grade 2 ve 3 (yüksek grade) ayrı bir grupta, grade 1 (düşük grade) ayrı bir grupta analiz edilmiştir. Yapısal grade 2 ve 3 olan, paraben saptanmayan grupta 6 hasta (6/24) tespit edilmiş ve bu vakaların %25'ini oluşturmuştur. Paraben saptanan tümör grubu içindeki grade 2 ve 3 tümörü olan hasta sayısı ise 5 (5/9) olarak tespit edilmiş olup grup içindeki oranı %55.5'dir. Bu açıdan paraben tespit edilen ve edilmeyen gruplarda yüksek ve düşük grade açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p > .05$).

5.TARTIşMA

Endometriyum kanseri gelişmiş ũlkelerde en sık görülen kadın genital sistem kanseridir. Risk faktörleri arasında, obezite, erken menarş, geç menopoz, diyabet, hipertansiyon, endojen ya da ekzojen östrojen kaynaklarına maruziyet bulunmaktadır. Eksojen strojen kaynağı olarak xenostrojenlerden parabenler günümüzde oldukça dikkat ekmektdir. Bu tez çalışmasında parabenlerin potansiyel östrojenik etkilerini gösterebilmesi açısından, insan sağlıklı endometriyal, myometriyal ve hastalıklı endometriyal ,myometriyal dokularında intakt (aktif) esterler olarak birikip birikmediği araştırılmıştır.

Bu çalışmada endometriyum kanseri tanısı alan 33 ve EIN tanısı alan 6 hastanın endometriyum dokularındaki paraben moleküllerinin intakt esterler olarak miktarı ölçülmüş, hastaların kendi uteruslarından tümöre komşu olan myometriyum dokusu da alınıp değerlendirilerek sonuçların güvenilirliği için ikinci bir kontrol doku grubu oluşturulmuştur. Kontrol grubunun karsinomatöz olmayan endometriyal ve myometriyal örneklerinde de ölçümler yapılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu şekilde çalışma; hem kanser olmayan farklı kişilerin dokuları, hem de kanser tanısı alan aynı kişinin farklı dokularında da ölçüm yapılarak çift kontrollü olarak sürdürülmüştür. Bu da çalışmanın sonuçlarının güvenilirliğini arttırmaktadır.

Çalışmamızda; Darbre'nin ilk çalışmasında elde ettiği, baskın MePB birikimi (tespit edilen paraben moleküllerinin %62'si) (60) ve Barr'ın da MePB'e eşit ya da rölatif olarak daha fazla olarak tespit ettiği PrPB birikiminin aksine (70) daha çok uzun alkil zincirli paraben molekülleri (PrPB, İzoBuPB- BuPB) tespit edilmiş, kısa alkil zincirli MePB ve EtPB molekülleri hiçbir örnekte saptanmamıştır. Paraben moleküllerinin

özellikle hiçbir myometriyum örneğinde saptanmaması dikkat çekerken, bu durumun myometriyumun yoğun kas dokusu içeriğinden kaynaklanmış olabileceği gibi, bulgular bu moleküllerin toksikokinetik özellikleri incelenerek daha detaylı anlaşılabilir.

Ratlar üzerinde yapılan bir farmakokinetik çalışmada, oral ve dermal 100mg/kg paraben molekülü uygulaması sonrası sistemik maruziyet oranının her iki uygulama içinde, MePB>PrPB>BuPB şeklinde sıralandığı ortaya konmuştur (71). Bu çalışmaya göre MePB her ne kadar en kısa alkil zincir yapısına sahip olup en zayıf östrojenik etkili paraben molekülü olarak bilinse de en yüksek dermal penetrasyon potansiyeline sahip paraben olduğu görülmektedir. Ancak BuPB , PrPB gibi uzun zincirli moleküllerin hidroliz reaksiyonu, hem deri hem de karaciğerde çok daha yavaş olmaktadır. Bu da bizim çalışmamızda neden ağırlıklı olarak uzun zincirli paraben moleküllerini tespit ettiğimizi açıklayabilir.

Bazı eski çalışmalar; hayvan ve insan çalışmalarında elde edilen günlük paraben maruziyeti ve doz/etkinlik karşılaştırmaları, östrojenin en düşük etki ve etkisizlik dozları ile karşılaştırıldığında , parabenlerin östrojenik sonuç etki oluşturma risklerinin biyolojik olarak mümkün olmadığını savunurken(72); ilerleyen yıllarda, etkisiz konsantrasyondaki paraben molekülünün, diğer paraben molekülleriyle beraber uygulanmasının, MCF-7 meme kanseri hücre kültüründe hücresel çoğalmayı tetikleyebileceğini ortaya koyan çalışmalarda yayınlanmıştır (73) . Ayrıca bu tek başına etkisiz dozdaki paraben karışımının endojen östrojenik etkiyi de kuvvetlendirdiği gözlenmiştir. Son yıllarda paraben moleküllerinin diğer endokrin bozucu östrojenik etkisi olan BisA ve octylphenol gibi xenoöstrojenlerle , ER aracılı östrojenik potensiyasyon etkisi gösterebileceğini ortaya koyan çalışmalar yayınlanmıştır (74).

Paraben moleküllerinin oldukça düşük östrojenik etkili moleküller olarak bilinmesi ve zararsız olduklarının düşünülmesi sebebiyle bu kimyasallar tüketim ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda, hormon bağımlı kanserlerin görülme sıklığındaki artışın, tanı metodlarındaki gelişmeler ve yaşam şekli değişiklikleri yanında bu kimyasalların yaygın kullanımına bağlı da olabileceği 2015 yılında yayınlanan endokrin cemiyetlerinin ortak bir derlemesinde bildirilmiştir (2). Bu nedenle bu kimyasalların östrojenik potansiyeli; endometriyum ve meme kanseri gibi kadın sağlığını ilgilendiren hormon bağımlı gelişim gösteren kanserlerin oluşumunda rol oynayabilme potansiyeli nedeniyle, oldukça önemlidir. Ancak bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz endometriyum kanseri dokusundaki kontrol grubuna göre ve aynı hastanın myometriyumuna göre yüksek intakt paraben seviyeleri bu moleküllerin kanserindeki rolünü direkt açıklamak için yeterli değildir. Çalışmamız anlık kesitsel bir tespit uygulaması olduğundan, bu moleküllerin endometriyal dokuda (normal ve kanseröz) tespit edilmiş olması bu kimyasalların bu dokularda birikim gösterdiği ya da bu bulgunun bu kimyasallara uzun dönem maruziyetin direkt bir göstergesi olmamakla birlikte bu potansiyel östrojenik kimyasalların östrojene hassas dokularda bulunabiliyor olması, uygun şartlar oluştuğunda reseptör için hazırda bulunan bir ligand olarak, kendi başına ya da endojen östrojenik etkilerin potansiasyonu yoluyla etki oluşturabilme potansiyeli açısından oldukça önemlidir.

Kimyasalların östrojenik potansiyelini ölçmek için kullanılan altın standart in vivo test, uterotrofik etkilerin (uterin ağırlık artışı) ölçülmesidir. Paraben molekülleriyle yapılan uterotrofik etki çalışmalarında birbirine karşıt sonuçlar ortaya çıkmıştır. Routledge ve ark. oral yoldan 800-1200mg/kg/gün dozda paraben ile ratlarla yaptığı ve Hossaini'nin çalışmalarında oral yoldan 100-1000 mg/kg/gün paraben ile yaptığı

fare çalışmasında uterotrofik etki gözlemlenmezken (6, 75), Lemini immatür dişi farelerde 0.6-6.5mg/kg/gün subkütan uygulama ile uterotrofik etki gözlemlenmiştir. Yetişkin overleri çıkarılmış dişi CD1 farelerde ise uterotrofik etki 6-55mg/kg/dün dozunda elde edilebilmiştir (76). Vo ve ark. 2010 yılında juvenil peripubertal rat modelinde yaptıkları çalışmalarında, oral yoldan verilen 62.5, 250, 1000mg/kg/gün dozdaki paraben moleküllerine karşı; vajinal açıklıkta gecikme, östrojen sikluslarda azalma, uterin morfolojide değişiklikler (myometriyal hipertrofi), overlerde histopatolojik değişiklikler gibi yanıtlar elde etmiştir(77). Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda farklı sonuçların nedeninin, çalışılan hayvanın cinsi, paraben dozları, maruziyet süresi ve veriliş yolu gibi nedenlerle oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca uterotrofik etkiye ER alfa aracılık ettiğinden, paraben moleküllerinin ER alfa aracılı olmayan etkileri ölçüm dışı kalmaktadır. Çok yüksek dozda paraben uygulaması ile negatif sonuç elde edilen çalışmalarda, hormesis etkisi de (düşük dozda stimülasyon, yüksek dozda inhibisyon) göz ardı edilmemeli ve yüksek doz çalışmaların negatif sonuçları extrapole edilmemelidir (56, 78). Parabenler ve diğer xenoöstrojenik kimyasallarla gözlenen nonmonotonik doz yanıt eğrisi özelliği (ters U) nedeniyle, belli bir dozdaki etki diğer dozlar için oluşacak etkiyi predikte etmediğinden, paraben moleküllerinin çeşitli dozlarıyla elde edilen veriler de extrapole edilmemelidir (9, 56) . Paraben moleküllerinin östrojenik potansi, östrojen reseptör alfa'ya afinitesi üzerinden hesaplandığından, paraben moleküllerinin zayıf östrojenik olmaları hipotezi sadece östrojen reseptör alfa aracılı etkileri olduğu varsayımına dayanmaktadır. Ancak son çalışmalar göstermiştir ki; östrojen ve paraben uygulamaları sonrasında oluşan sonuç etkilere bakıldığında, benzer kısımları olsa da farklı genlerin aktive ve inhibe olduğu görülmektedir(49). Bu da her ne kadar ER alfa için de olsa da farklı

mekanizmaların da paraben moleküllerinin sonuç etkilerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu alternatif yollardan biri de EİR'dir. Yakın zamanda paraben moleküllerinin EİR gama üzerinden kuvvetli ters antagonist etki gösterdiğini kanıtlayan bir makale yayınlanmıştır(48). Bu reseptörler yapısal regülatörler olup, ligand yokluğunda transkripsiyonel koaktivatörlerle etkileşime girip transkripsiyonel aktivasyon sağlamaktadır. EİR'ler yapısal olarak aktiftir ve endojen naturel östrojene yanıtızsızdır(79). Zhang çalışmasında meme kanseri dokusunda elde edilen paraben seviyeleri ile, EİR gama uyarımı için gerekli paraben seviyelerini karşılaştırdığında, meme dokusundaki seviyenin reseptörlerin uyarımı için gerekli olan dozun üzerinde olduğunu ve bu dozdaki paraben molekülünün reseptörleri uyurabileceğini vurgulamıştır(48). Yamamoto ve ark, endometriyum kanserinde EİR gama selektif agonisti DY131 ile yaptıkları çalışmada, EİR gamanın, östrojen reseptör alfa pozitif hücrelerde, östradiol ile indüklenmiş, östrojenle ilişkili yanıt elemanın transkripsiyonel aktivitesinde azalmaya neden olduğu, bu agonistin östrojen reseptör alfa negatif endometriyum kanser hücrelerinin çoğalmasını provake ettiğini göstermiştir(79).

Endojen östrojenin tersine birçok xenoöstrojen (DES, DDT,4-Nonilfenol vs..) yapı olarak daha stabildir ve vücutta daha uzun kalmaktadır. Paraben moleküllerinin LogK_{ow} (oktanol-su ayrışım katsayısı) değerleri 1-5 arasındadır ve bu lipidden zengin dokularda birikebileceğini göstermektedir. Bu yağ dokuda birikme eğilimi bazı çalışmalarda gösterilmiştir (42, 80). Ancak paraben molekülleriyle ilgili bu konudaki çalışmalar oldukça kısıtlıdır. İlk olarak 2004 yılında Philippa Darbre, 20 insan meme kanseri dokusunda ortalama 20.6±4.2ng/g intakt paraben esteri birikimini gösterdikten

sonra bu konuya ilgi artmıştır. Ancak bu çalışma bu konuda yeni araştırmalar için yol gösterici olsa da, kontrol grubu içermemesi nedeniyle oldukça eleştiri almıştır. Ayrıca Darbre'ye göre paraben molekülleri; artan moleküler ağırlık ve uzayan alkil yan zincirleri ile dağılım katsayısında artış özelliği gösterdiğinden ve lipofilik moleküller olduğundan, intakt moleküller olarak yağdan zengin dokularda birikebileceklerdir. Ancak Darbre'ye göre, en az lipofilik paraben olan MePB, kendi çalışmasında, meme tümörü dokusunda en yüksek oranda tespit edilen paraben molekülüdür. Bu çalışmadan sonra 2012 yılında, Barr ve arkadaşları paraben molekülü analizini, meme dokusunu kadranlara ayırarak gerçekleştirmiş ve 40 mastektomi spesimeninden elde edilen 160 meme tümör dokusu örneğinden %99'unda en az bir intakt paraben formunu tespit etmişlerdir. Ayrıca toplam beş paraben formunu da örneklerin %60'ında tespit etmişlerdir. Gram başına tespit edilen en yüksek toplam medyan değerler, PrPB ve MePB için tespit edilmiştir ve şu şekildedir; 16.8 (0-2052.7) ng/g, 16.6 (0-5102.9) ng/g . Diğer moleküller için ise daha düşük düzeyler tespit edilmiştir ve şöyledir; N-BuPB 5.8 (0-95.4) ng/g , EtPB 3.4 (0-499.7) ng/g ve izoBuPB 2.1 (0-802.9) ng/g. Bu çalışmada toplam beş paraben molekülü için medyan değer 85.5ng/g (0-5134.5) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada paraben maruziyetinin kökeni tespit edilemese de daha önce hayatı boyunca hiç koltuk altı deodorant kullanımı tariflemeyen yedi hastada bu moleküllerin tespit edilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada yaş, emzirme süresi, tümör yerleşimi ve tümörün ER düzeyi ile paraben seviyeleri arasında bir korelasyon tespit edilememiştir(70). Wang ve ark'ın oldukça yeni olan çalışmasında, 20 adet insan yağ dokusunda, çevresel fenolik ve xenobiyotik heterosiklik aromatik içerikler araştırılmış en sık tespit edilen paraben moleküllerinin EtPB (%60) ve PrPB (%50) olduğu görülmüştür. Bu moleküllerin geometrik ortalama göre konsantrasyonları

sırasıyla 0.90 ve 0.49 ng/g olarak tespit edilmiştir(42). Paraben moleküllerinin ana metaboliti olan PHBA ise 17.400ng/g gibi oldukça yüksek bir dozda tespit edilmiş ve yağ dokudaki bu düzeydeki birikimin invitro testlerde aktif olan düzeye oldukça yakın olduğunu belirtmiştir. Aynı yazarın daha önceki idrar analizi çalışmasındaki paraben konsantrasyonlarıyla karşılaştırıldığında yağ dokuda tespit edilen değerlerin bir ya da iki kat daha düşük olduğu gözlenmiştir (81). Barr'ın çalışmasındaki konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında ise , yağ dokuda tespit edilen MePB düzeyi belirgin olarak daha düşüktür (42).

Paraben moleküllerinin metabolizması ester bağlarının hidrolizi ve glukronidasyon reaksiyonları ile sağlanmaktadır. Bu reaksiyonlar molekülün alkil zincir özelliklerine göre, karaciğer mikrozomları ve plazmada gerçekleşmektedir. Erkek donörlerin plazmalarıyla yapılan in vitro bir çalışmada, MePB ve EtPB molekülleri plazmada yüksek oranda stabil iken, 24 saat sonra başlangıç konsantrasyonun %95'i şeklinde ortamda bulunmaktadır. PrPB, BuPB ve BePB ise aynı koşullarda, başlangıç konsantrasyonun %50'si kadardır yani bu üç paraben molekülü diğer iki tanesine göre kanda daha instabildir. Karaciğer mikrozomları ise bu molekülleri alkil zincir uzunluklarına göre , kısa zincirli olanlar en hızlı olmak üzere, çok hızlı bir şekilde hidrolize etmektedir (en uzun ömürlü molekül BuPB: 87dk) (82). Yazar bu hızlı reaksiyonlar nedeniyle paraben moleküllerinin insan dokularında akumulasyonunun mümkün olmadığını belirtse de, az sayıda olan doku birikim çalışmalarının çoğunluğu, meme gibi yağdan zengin dokularda yapılmıştır ve belirli miktarlarda paraben moleküllerinin intakt esterler olarak (ana molekül) bu dokularda birikebildiği gösterilmiştir. Zaten lipofilik moleküller olan EBK'nın meme dokusu ve süt gibi yağdan zengin alanlarda toplanması beklenen bir sonuçtur. Ancak diğer dokulardaki birikim

(örneğin; bizim çalışmamızdaki endometriyum) farklı farmakokinetik özelliklerle açıklanabilir. Albumine bağlanan paraben moleküllerinin hidrolizden korunabileceği ve kanda stabil olarak bulunabileceği daha önce Abbas ve ark.'ın çalışmasında gösterilmiştir (82), ancak yakın zamanda yayınlanan bir makalede paraben moleküllerinin albumine çok zayıf bağlandığı, bu moleküllerin çoğunlukla serbest formda olmaları nedeniyle dokulara ulaşmalarının kolay olduğu, bunun da dokularda paraben molekül birikiminde rolü olabileceği vurgulanmıştır(83).

Doku birikimi dışında, maruziyet göstergesi olarak ürün analizleri bir çok popülasyon için yapılmış ve literatürde yayınlanmıştır. Bunlardan Amerikan toplumunda genel popülasyonda yapılmış olan analizlerde kadınların %99.9'unda MePB, %98.3'ünde PrPB, %73.6'sında BuPB idrarda tespit edilmiş, erkeklerin %99.3'ünde MePB, %90.2'sinde PrPB, %35.9'unda BuPB tespit edilmiştir(84). Danimarka'da erkek popülasyonda yapılan çalışmada ise idrar analizinde %98 örnekte paraben molekülleri tespit edilmiştir(85). İspanya'da da gebe kadınların ve çocukların idrar örneklerinde yapılan analizlerde örneklerin %100'ünde paraben molekülleri tespit edilmiştir (86). Toplum tabanlı yapılan çalışmalarda paraben moleküllerinin medyan serum düzeylerine bakacak olursak, MePB, EtPB ve PrPB için tespit edilen sonuçlar, 10.9 µg/L, 0.2 µg/L ve 1.4 µg/L şeklindedir ve tespit sıklığı EtPB için %53, MePB için %100 olarak bildirilmiştir(17). Bazı çalışmalarda ise daha düşük değerler bildirilmiştir. Frederiksen ve ark.'nın çalışmasında ise daha düşük değerler bildirilmiştir ve şöyledir; MePB ve PrPB için, 0.89 µg/L ve 0.23 µg/L ; EtPB, BuPB ve BePB için ise tespit limitinin altında değerler bildirmiştir (85).

Sajid ve ark. 2015 yılında yayınladıkları, mikrodalga yardımcı mikro solid faz ekstraksiyon metoduyla over kanseri (15 örnek) ve benign over tümörlerinde (15

örnek), paraben moleküllerinin tespitine yönelik çalışmalarında; malign over tümörü dokularında daha yüksek paraben seviyeleri tespit etmiştir. Bu çalışmada diğer çalışmalarla uyumlu bir şekilde , en yüksek oranda, MePB ve PrPB molekülleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada esas amaç yöntem test edilmesi olduğundan, analiz sonuçları ile ilgili detaylı bilgi verilmemiştir(87).

Sonuç olarak hasta sayısının kısıtlı olması nedeniyle , tümör özellikleri ile ilgili arada bir bağlantı bulunamamış olsa da endometriyum kanseri dokusunda paraben molekülleri normal endometriyum ve myometriyum dokularına göre daha fazla tespit edilmesi bu moleküllerin potansiyel etkileri de düşünüldüğünde oldukça önemli bir bulgudur ve daha geniş kapsamlı (daha fazla hasta sayısı içeren, etkileşim yollarının ortaya konduğu) çalışmalarla desteklendikten sonra endometriyum kanseri etyopatogenezinde önemli bir kısmı ilgilendirecek olması nedeniyle bu çalışmanın, bundan sonraki endometriyum kanseri önleme, tedavi etme stratejilerine de ışık tutacağı düşünülmektedir.

6.SONUÇLAR

Endometriyum kanseri dokusunda normal endometriyuma göre belirgin olarak daha fazla paraben molekülü tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hiçbir myometriyum dokusunda paraben molekülü tespit edilmemiştir. Paraben tespit edilen ve edilmeyen endometriyum kanseri hastalarının tümöral özellikleri fark göstermemektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM, Heindel J, Ho SM, Hunt P, et al. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril*. 2008;90(4):911-40.
2. Gore A, Chappell V, Fenton S, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine reviews*. 2015;36(6):E1-E150.
3. Charnock C, Finsrud T. Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2007;32(6):567-72.
4. Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental health perspectives*. 1999;107(Suppl 6):907.
5. Ethylparaben P. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethyl paraben, propyl paraben, and butylparaben. *Journal of the American College of Toxicology*. 1984;3(5):147-209.
6. Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicology and applied pharmacology*. 1998;153(1):12-9.
7. SCCS E. Opinion on parabens. EU Scientific Committee on Consumer Safety. 2011.

8. Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Archives of toxicology*. 2002;76(7):423-9.
9. Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(12):1807-13.
10. Darbre PD. Underarm cosmetics and breast cancer. *Journal of Applied Toxicology*. 2003;23(2):89-95.
11. Darbre PD. Underarm cosmetics are a cause of breast cancer. *European Journal of Cancer Prevention*. 2001;10(5):389-94.
12. Darbre PD. Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *Journal of inorganic biochemistry*. 2005;99(9):1912-9.
13. Darbre PD. Recorded quadrant incidence of female breast cancer in Great Britain suggests a disproportionate increase in the upper outer quadrant of the breast. *Anticancer research*. 2005;25(3C):2543-50.
14. Anton R, Barlow S, Boskou D, Castle L, Crebelli R, Dekant W, et al. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Commission related to para hydroxybenzoates (. *The EFSA Journal*. 2004;83:1-26.
15. Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol*. 2010;30(2):301-12.
16. Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of applied toxicology*. 2008;28(5):561-78.

17. Ye X, Tao LJ, Needham LL, Calafat AM. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum. *Talanta*. 2008;76(4):865-71.
18. Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, Yoshino T, Matsukuma S, Tsuji T. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *Journal of applied toxicology*. 2007;27(1):1-9.
19. El Hussein S, Muret P, Berard M, Makki S, Humbert P. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis–dermis layers (ex-vivo study). *Experimental dermatology*. 2007;16(10):830-6.
20. Janjua NR, Frederiksen H, Skakkebaek NE, Wulf HC, Andersson AM. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int J Androl*. 2008;31(2):118-30.
21. Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ Health Perspect*. 2006;114(12):1843-6.
22. Frederiksen H, Taxvig C, Hass U, Vinggaard AM, Nellemann C. Higher levels of ethyl paraben and butyl paraben in rat amniotic fluid than in maternal plasma after subcutaneous administration. *Toxicol Sci*. 2008;106(2):376-83.
23. Andersen FA. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. *International journal of toxicology*. 2008;27:1-82.
24. Cowan-Ellsberry CE, Robison SH. Refining aggregate exposure: example using parabens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2009;55(3):321-9.

25. Pedersen S, Marra F, Nicoli S, Santi P. In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. *International journal of cosmetic science*. 2007;29(5):361-7.
26. Harville HM, Voorman R, Prusakiewicz JJ. Comparison of paraben stability in human and rat skin. *Drug metabolism letters*. 2007;1(1):17-21.
27. Mbah C. Studies on the lipophilicity of vehicles (or co-vehicles) and botanical oils used in cosmetic products. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;62(5):351-3.
28. Lakeram M, Paine A, Lockley D, Sanders D, Pendlington R, Forbes B. Transesterification of p-hydroxybenzoate esters (parabens) by human intestinal (Caco-2) cells. *Xenobiotica*. 2006;36(9):739-49.
29. Kitagawa S, Li H, Sato S. Skin permeation of parabens in excised guinea pig dorsal skin, its modification by penetration enhancers and their relationship with n-octanol/water partition coefficients. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1997;45(8):1354-7.
30. Oh S, Fujii M, Takeda Y, Yoda K, Utoguchi N, Matsumoto M, et al. The effect of ethanol on the simultaneous transport and metabolism of methyl p-hydroxybenzoate in excised skin of Yucatan micropig. *International journal of pharmaceutics*. 2002;236(1):35-42.
31. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews*. 2001;81(4):1535-65.
32. Pelch KE, Beeman JM, Niebruegge BA, Winkeler SR, Nagel SC. Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in mammals. *Hormones & Reproduction of Vertebrates*. 2011:329-71.

33. Nagel SC, Vom Saal FS, Welshons WV. The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Experimental Biology and Medicine*. 1998;217(3):300-9.
34. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr DR, Lee D-H, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*. 2012;33(3):378-455.
35. Banno K, Yanokura M, Iida M, Masuda K, Aoki D. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: Involvement of genetics and epigenetics. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2014;40(8):1957-67.
36. Nagel SC, Hagelbarger JL, McDonnell DP. Development of an ER action indicator mouse for the study of estrogens, selective ER modulators (SERMs), and xenobiotics. *Endocrinology*. 2001;142(11):4721-8.
37. Naciff JM, Jump ML, Torontali SM, Carr GJ, Tiesman JP, Overmann GJ, et al. Gene expression profile induced by 17 α -ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicological Sciences*. 2002;68(1):184-99.
38. Critchley HO, Brenner RM, Henderson TA, Williams K, Nayak NR, Slayden OD, et al. Estrogen Receptor β , But Not Estrogen Receptor α , Is Present in the Vascular Endothelium of the Human and Nonhuman Primate Endometrium 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(3):1370-8.
39. Hall JM, McDonnell DP. The Estrogen Receptor β -Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of

- the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens 1. *Endocrinology*. 1999;140(12):5566-78.
40. Collins F, MacPherson S, Brown P, Bombail V, Williams AR, Anderson RA, et al. Expression of oestrogen receptors, ER α , ER β , and ER β variants, in endometrial cancers and evidence that prostaglandin F may play a role in regulating expression of ER α . *BMC cancer*. 2009;9(1):1.
41. Wallace AE, Gibson DA, Saunders PT, Jabbour HN. Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma. *Journal of Endocrinology*. 2010;206(2):141-57.
42. Wang L, Asimakopoulos AG, Kannan K. Accumulation of 19 environmental phenolic and xenobiotic heterocyclic aromatic compounds in human adipose tissue. *Environment international*. 2015;78:45-50.
43. Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2006;102(1):175-9.
44. Wróbel AM, Gregoraszczuk EŁ. Action of methyl-, propyl-and butylparaben on GPR30 gene and protein expression, cAMP levels and activation of ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells and MCF-10A non-transformed breast epithelial cells. *Toxicology Letters*. 2015;238(2):110-6.
45. Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor- α -mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environmental health perspectives*. 2005:431-9.

46. Prusakiewicz JJ, Harville HM, Zhang Y, Ackermann C, Voorman RL. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology*. 2007;232(3):248-56.
47. Wróbel A, Gregoraszczuk EŁ. Effects of single and repeated in vitro exposure of three forms of parabens, methyl-, butyl- and propylparabens on the proliferation and estradiol secretion in MCF-7 and MCF-10A cells. *Pharmacological Reports*. 2013;65(2):484-93.
48. Zhang Z, Sun L, Hu Y, Jiao J, Hu J. Inverse antagonist activities of parabens on human oestrogen-related receptor γ (ERR γ): in vitro and in silico studies. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;270(1):16-22.
49. Pugazhendhi D, Sadler A, Darbre P. Comparison of the global gene expression profiles produced by methylparaben, n-butylparaben and 17 β -oestradiol in MCF7 human breast cancer cells. *Journal of Applied Toxicology*. 2007;27(1):67-77.
50. Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER α and PR. *Food and Chemical Toxicology*. 2001;39(12):1225-32.
51. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-63.
52. Byford J, Shaw L, Drew M, Pope G, Sauer M, Darbre P. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2002;80(1):49-60.

53. Darbre P, Byford J, Shaw L, Horton R, Pope G, Sauer M. Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. *Journal of Applied Toxicology*. 2002;22(4):219-26.
54. Darbre P, Byford J, Shaw L, Hall S, Coldham N, Pope G, et al. Oestrogenic activity of benzylparaben. *Journal of Applied Toxicology*. 2003;23(1):43-51.
55. Pugazhendhi D, Pope G, Darbre P. Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *Journal of Applied Toxicology*. 2005;25(4):301-9.
56. Vandenberg LN. Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitam Horm*. 2014;94:129-65.
57. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology*. 1983;15(1):10-7.
58. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(29):4783-91.
59. Miyamoto T, Shiozawa T, Kashima H, Feng Y-Z, Suzuki A, Kurai M, et al. Estrogen up-regulates mismatch repair activity in normal and malignant endometrial glandular cells. *Endocrinology*. 2006;147(10):4863-70.
60. Darbre P, Aljarrah A, Miller W, Coldham N, Sauer M, Pope G. Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of applied toxicology*. 2004;24(1):5-13.
61. Caldon CE, Sutherland RL, Musgrove EA. Cell cycle proteins in epithelial cell differentiation: implications for breast cancer. *Cell Cycle*. 2010;9(10):1918-28.
62. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(8):558-72.

63. Pan S, Yuan C, Tagmount A, Rudel RA, Ackerman JM, Yaswen P, et al. Parabens and human epidermal growth factor receptor ligand cross-talk in breast cancer cells. *Environmental health perspectives*. 2016;124(5):563.
64. Okulicz WC, Balsamo M, Tast J. Progesterone regulation of endometrial estrogen receptor and cell proliferation during the late proliferative and secretory phase in artificial menstrual cycles in the rhesus monkey. *Biology of reproduction*. 1993;49(1):24-32.
65. Khanna S, Dash PR, Darbre PD. Exposure to parabens at the concentration of maximal proliferative response increases migratory and invasive activity of human breast cancer cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology*. 2014;34(9):1051-9.
66. Handa O, Kokura S, Adachi S, Takagi T, Naito Y, Tanigawa T, et al. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology*. 2006;227(1):62-72.
67. Park C, Nah W, Lee J, Oh Y, Gye M. Butyl paraben-induced changes in DNA methylation in rat epididymal spermatozoa. *Andrologia*. 2012;44(s1):187-93.
68. Yusa V, Ye X, Calafat AM. Methods for the determination of biomarkers of exposure to emerging pollutants in human specimens. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012;38:129-42.
69. Vela-Soria F, Rodríguez I, Ballesteros O, Zafra-Gomez A, Ballesteros L, Cela R, et al. Simplified matrix solid phase dispersion procedure for the determination of parabens and benzophenone-ultraviolet filters in human placental tissue samples. *Journal of Chromatography A*. 2014;1371:39-47.

70. Barr L, Metaxas G, Harbach C, Savoy L, Darbre P. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *Journal of Applied Toxicology*. 2012;32(3):219-32.
71. Aubert N, Ameller T, Legrand J-J. Systemic exposure to parabens: pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14 C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food and chemical toxicology*. 2012;50(3):445-54.
72. Golden R, Gandy J, Vollmer G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Critical reviews in toxicology*. 2005;35(5):435-58.
73. Darbre PD. Underarm antiperspirants/deodorants and breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2009;11(3):1.
74. Kim S, Jung E, An B, Hwang I, Vo T, Kim S, et al. Additional effects of bisphenol A and paraben on the induction of calbindin-D (9K) and progesterone receptor via an estrogen receptor pathway in rat pituitary GH3 cells. *J Physiol Pharmacol*. 2012;63(5):445-55.
75. Hossaini A, Larsen J-J, Larsen JC. Lack of oestrogenic effects of food preservatives (parabens) in uterotrophic assays. *Food and Chemical Toxicology*. 2000;38(4):319-23.
76. Lemini C, Jaimez R, Ávila ME, Franco Y, Larrea F, Lemus AE. In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicology and industrial health*. 2003;19(2-6):69-79.

77. Vo TT, Yoo Y-M, Choi K-C, Jeung E-B. Potential estrogenic effect (s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reproductive toxicology*. 2010;29(3):306-16.
78. Calabrese EJ, Baldwin LA. Defining hormesis. *Human & experimental toxicology*. 2002;21(2):91-7.
79. Yamamoto T, Mori T, Sawada M, Kuroboshi H, Tatsumi H, Yoshioka T, et al. Estrogen-related receptor- γ regulates estrogen receptor- α responsiveness in uterine endometrial cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2012;22(9):1509-16.
80. Tapiero H, Ba GN, Tew K. Estrogens and environmental estrogens. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2002;56(1):36-44.
81. Wang L, Wu Y, Zhang W, Kannan K. Characteristic profiles of urinary p-hydroxybenzoic acid and its esters (parabens) in children and adults from the United States and China. *Environmental science & technology*. 2013;47(4):2069-76.
82. Abbas S, Greige-Gerges H, Karam N, Piet M-H, Netter P, Magdalou J. Metabolism of parabens (4-hydroxybenzoic acid esters) by hepatic esterases and UDP-glucuronosyltransferases in man. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2010;25(6):568-77.
83. Greige-Gerges H, Kaissi R, Magdalou J, Jraij A. Reviewing the binding of a series of parabens to human serum albumin. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2013;34(3):186-94.
84. Smith KW, Braun JM, Williams PL, Ehrlich S, Correla KF, Calafat AM, et al. Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women,

including before and during pregnancy. Environmental health perspectives. 2012;120(11):1538.

85. Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson A-M. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology. 2011;21(3):262-71.

86. Casas L, Fernández MF, Llop S, Guxens M, Ballester F, Olea N, et al. Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children. Environment international. 2011;37(5):858-66.

87. Sajid M, Basheer C, Narasimhan K, Choolani M, Lee HK. Application of microwave-assisted micro-solid-phase extraction for determination of parabens in human ovarian cancer tissues. Journal of Chromatography B. 2015;1000:192-8.