



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BILDIRCIN YUMURTASI TÜKETİMİNİN
PUBERTE BAŞLANGICI ÜZERİNE ETKİLERİNİN KIZ
ÇOCUKLARINDA VE DİŞİ SPRAGUE-DAWLEY SIÇANLARDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. ÖZLEM SÜREKLİ KARAKUŞ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. TÜLAY GÜRAN

İSTANBUL, 2020



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BILDIRCIN YUMURTASI TÜKETİMİNİN
PUBERTE BAŞLANGICI ÜZERİNE ETKİLERİNİN KIZ
ÇOCUKLARINDA VE DIŞI SPRAGUE DAWLEY SIÇANLARDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. ÖZLEM SÜREKLİ KARAKUŞ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. TÜLAY GÜRAN

İSTANBUL, 2020

Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir
(SAG-C-TUP-130219-0049).

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Özlem SÜREKLİ KARAKUŞ

İmza

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve tez çalışmamın tüm aşamalarında beni her konuda destekleyen, her zaman bana yol gösterici olan tez danışmanım değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Tülay GÜRAN'a,

Tez çalışmamın planlanması ve gerçekleşmesinde değerli bilgi ve katkılarını benimle paylaşan ve desteklerini hiç esirgemeyen değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Abdullah BEREKET'e,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bizlere yol gösteren ve eğitimimde büyük emekleri olan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Perran BORAN başta olmak üzere tüm kıymetli Hocalarıma,

Çalışmanın yürütülmesinde büyük desteği olan, yolumu aydınlatan Marmara Üniversitesi Fizyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Berrak YEĞEN'e,

Çalışmanın yürütülmesinde büyük katkıları olan Çocuk Endokrinoloji Bilim dalı yandal asistanı Dr. Sare Betül KAYGUSUZ'a, Marmara Üniversitesi Fizyoloji Anabilim dalı araştırma görevlisi Sevil ARABACI TAMER'e ve Marmara Üniversitesi Histoloji Anabilim dalı araştırma görevlisi Nişva SAĞLAM'a,

Zorlu asistanlık sürecimin güzel insanları, güzel eşkıdemime, uzman büyüklerime ve sevgili asistan arkadaşlarıma ve çalışma fırsatı bulduğum tüm sağlık çalışanlarına,

En büyük destekçilerim; her anımı ilmek ilmek işleyen emektarım Canım Annem'e, yüreği güzel Canım Babam'a ve diğer yarım Canım Eşim'e,

Annesini beklemesini erkenden öğrenen, sevgisi dünyanın bahşedilmiş en güzel hazinesi olan Biricik Bebeğim Keremim'e, herşey için çok teşekkür ederim.

Dr. Özlem SÜREKLİ KARAKUŞ

EYLÜL 2020

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	4
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	7
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Puberte	9
2.1.1. Pubertenin tanımı	9
2.1.2. Pubertenin nöroendokrin regülasyonu.....	9
2.1.3. Pubertede fizyolojik değişiklikler	10
2.1.4. Pubertenin başlama zamanını etkileyen faktörler	12
2.2. Puberte Zamanlamasında Normal Varyasyonlar.....	12
2.2.1. Prematür adrenarş (Prematür pubarş)	12
2.2.2. Prematür telarş.....	12
2.2.3. Pubertal jinekomasti	12
2.3. Puberte Prekoks (Erken Puberte)	13
2.3.1. Puberte prekoks tanımı	13
2.3.2. Puberte prekoks etyolojik sınıflama	13
2.3.3. Puberte prekoks klinik bulgular	15
2.3.4. Puberte prekoks laboratuvar bulguları.....	15
2.3.5. Puberte prekoks görüntüleme.....	16
2.3.6. Puberte prekoks tedavisi	17
2.4. Dişi Sıçanlarda Üreme Fizyolojisi.....	18
2.4.1. Dişi sıçanlarda puberte	18
2.4.2. Dişi sıçanlarda pubertenin nöroendokrin mekanizması.....	19
2.5. Endokrin Bozucular.....	21
2.6. Bıldırcın Yumurtası	22

2.6.1.	Bıldırcın yumurtası içeriği	22
2.6.2.	Bıldırcın yumurtası tüketim durumu	22
2.6.3.	Bıldırcın yumurtası kullanımı	22
2.7.	Östrojenler.....	23
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1.	Klinik Çalışma.....	24
3.1.1.	Çalışma gruplarının seçimi	24
3.1.2.	Çalışmaya dahil edilme ve çıkarılma kriterleri	25
3.1.3.	Verilerin toplanması	25
3.2.	Hayvan Deneyi Çalışması.....	26
3.2.1.	Ratların bakımı.....	26
3.2.2.	Deney dizaynı.....	26
3.2.3.	Grupların tayini	27
3.2.4.	Deney dışı bırakma kriterleri	30
3.2.5.	Ratların Antropometrik Ölçümleri	30
3.2.6.	Vaginal Açıklık Belirlenmesi.....	30
3.2.7.	Ratların Östrus Siklusu	32
3.2.8.	Cerrahi İşlemler.....	32
3.2.9.	Histolojik değerlendirme	33
3.2.10.	Biyokimyasal değerlendirme	34
3.2.11.	Lipit peroksidasyon-malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) ölçümü	36
3.2.12.	İstatistiksel Analiz	37
4.	BULGULAR	38
4.1.	Klinik Çalışma Verileri.....	38
4.2.	Hayvan Deneyi Çalışması Verileri.....	40
4.2.1.	Genel toksisite	40
4.2.2.	Vücut Ağırlığı ve Büyümenin Değerlendirilmesi	41
4.2.3.	Vaginal açıklık zamanı	43
4.2.4.	Vaginal smear değerlendirilmesi.....	44
4.2.5.	Over Histolojisi	48
4.2.6.	Uterus histolojisi.....	51
4.2.7.	Biyokimyasal değerlendirme	55

4.2.8.	Lipit peroksidasyon-malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) değerlendirmesi	57
5.	TARTIşMA	58
6.	KAYNAKLAR.....	62
7.	EKLER.....	65



KISALTMALAR

Ark: Arkadaş

BY: Bildircin yumurtası

DHEAs: Dehidroepiandrosteron

ELİSA: Enzyme like immunosorbent assay

E2: 17β-estradiol

FSH: Folikül stimule edici hormon

GABA: Gama aminobütirik asit

GEP: Gerçek erken puberte

GnRH: Gonadotropin releasing hormon

GSH: Glutatyon

Hcg: Human koryonik gonadotropin

HHG: Hipotalamus-hipofiz- gonad

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü

LDL: Düşük ağırlıklı lipoprotein

LH: Luteinize edici hormon

MDA: Malondialdehit

PN: Postnatal

PP: Puberte prekoks

PPP: Periferik puberte prekoks

SPP: Santral puberte prekoks

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1: Dişi sıçanlarda puberteden yetişkinliğe geçiş döneminin olayları ve zaman akış çizelgesi

Şekil-2: Dişi sıçanların üreme anatomisi

Şekil-3: Doğada bulunan östrojen grupları

Şekil-4: Deney dizaynı

Şekil-5: Deney prosedürünün aşamaları

Şekil-6: Ratların antropometrik ölçümleri

Şekil-7: Vaginal açıklık belirlenmesi ve smear alımı

Şekil-8: Organların diseksiyonu

Şekil-9: Standartların dilüsyonu

Şekil-10: Sırasıyla vücut ağırlığı, boy uzunluğu ve vücut kitle indeksi verilerine göre, aynı yaştaki kontrol ve prematür telarş gruplarının karşılaştırması

Şekil-11: Kontrol ve prematür telarş grubunun az, orta ve yoğun bildirgin yumurtası tüketim durumunun karşılaştırması

Şekil-12: Orogastrik gavajla beslenmenin ilk günü (PN 14. gün)'nden itibaren her gün ölçülen vücut ağırlıklarının 5 gün aralıklarla karşılaştırılması

Şekil-13: Orogastrik gavajla beslenmenin ilk günü (PN 14. gün)'nden itibaren her gün ölçülen burun-kuyruk uzunluğunun 5 gün aralıklarla karşılaştırılması

Şekil-14: Vücut ağırlığının gruplara göre karşılaştırılması

Şekil-15: Baş-anüs uzunluğunun gruplara göre karşılaştırılması

Şekil-16: Östrus siklusunun evreleri

Şekil-17: Kontrol grubunun smear görüntüleri

Şekil-18: Rastgele 100 hücre sayımında kornifiye hücre oranları

Şekil-19: Over ağırlığı/vücut ağırlığının gruplar arası karşılaştırılması

Şekil-20: Uterus ağırlığı/vücut ağırlığının gruplar arası karşılaştırılması

Şekil-21: Birim mm² over alanına düşen preantral folikül sayısının gruplar arası karşılaştırması

Şekil-22: Birim mm² over alanına düşen antral folikül sayısının gruplar arası karşılaştırması

Şekil-23: Endometriyal epitel kalınlığının gruplar arası karşılaştırması

Şekil-24: Endometriyal stroma kalınlığının gruplar arası karşılaştırması

Şekil-25: Endometriyal gland sayısının gruplar arası karşılaştırması

Şekil-26: Miyometriyum kalınlığının gruplar arası karşılaştırması

Şekil-27: Grupların smear, uterus ve over histolojisinin karşılaştırmalı resimleri

Şekil-28: FSH düzeyinin gruplar arası karşılaştırması

Şekil-29: LH düzeyinin gruplar arası karşılaştırması

Şekil-30: Östradiyol düzeyinin gruplar arası karşılaştırması



TABLolar LİSTESİ

Tablo-1: Tanner meme gelişimi evreleri

Tablo-2: Tanner kızlarda pubik kıllanma evreleri

Tablo-3: Tanner erkek genital gelişimi evreleri

Tablo-4: Puberte Prekoks etyolojik sınıflama

Tablo-5: Dişi sıçanların bazı özellikleri

Tablo-6: Dişi sıçanlarda vaginal sitoloji ve hücre tipleri

Tablo-7: Deney grupları ve rat sayıları

Tablo-8: Prematür telarş ve kontrol grubunun demografik özellikleri

Tablo-9: Prematür telarş ve kontrol grubunun bildirgin yumurtası kullanım durumu

Tablo-10: Dekapitasyon günü yapılan antropometrik ölçümler

Tablo-11: Organ ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması

Tablo-12: Birim mm² over alanına düşen folikül sayılarının gruplar arası karşılaştırması

Tablo-13: Uterusa ait histolojik incelemelerin gruplar arası karşılaştırılması

Tablo-14: Biyokimyasal parametreleri gruplara göre değerlendirilmesi

Tablo-15: Karaciğer ve böbrek dokularının MDA ve GSH düzeyleri

ÖZET

Giriş ve Amaç: Son yıllarda endokrin bozucular adı verilen doğal hormon ve hormon benzeri etki gösteren kimyasallara çevresel maruziyetin, endokrin sistem dengesini etkileyebileceği yolunda veriler gelmeye başlamıştır. Klinikte puberte prekoks bulguları ile karşılaştığımız hastalarda, bu endokrin bozuculara maruziyeti sorguladığımızda özellikle bıldırcın yumurtası tüketimi dikkati çekmektedir. Bu nedenle, öncelikle prematür telarş şikayeti ile başvuran hastalardaki bıldırcın yumurtası kullanım durumunu belirlemeyi ve bıldırcın yumurtasının sıçanların pubertal gelişimi üzerinde oluşturacağı değişiklikleri belirlemeyi hedefledik.

Gereç-Yöntem:

Klinik ön çalışma: Prematür telarş ile başvuran 6- 8 yaş aralığındaki 55 kız hastanın dosyaları retrospektif olarak incelendi ve ailelerine anket yapılarak bıldırcın yumurtası kullanım durumu, kullanılmışsa sıklığı ve miktarı hakkında bilgiler soruldu. Prematür telarş ile başvuran hastaların başvuru yaşları ortalaması 7 yaş 2 ay olarak belirlenmesi üzerine kontrol grubu olarak 6 - 8 yaş aralığında takibimizde bulunan Tip 1 Diyabetes Mellitus tanılı ve diyabet kontrolü iyi olan 54 kız hastanın dosyaları retrospektif olarak incelendi ve ailelerine aynı şekilde anket yapıldı. Bıldırcın yumurtası tüketim durumu, prematür telarş ve kontrol gruplarında karşılaştırıldı.

In vivo rat modeli çalışması: Sprague-Dawley female ratlar, su ile negatif kontrol, yağ ile negatif kontrol, 17 β -estradiol (E2) ile pozitif kontrol ve bıldırcın yumurtası (BY) 300 mg/kg, 1000 mg/kg, 3000 mg/kg doz grupları olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Postnatal (PN) 14. günden itibaren her gün vücut ağırlığı ve burun-kuyruk uzunluğu ölçülerek; ağırlığına göre, grubuna uygun şekilde belirlenen dozlarla orogastrik yoldan sonda ile beslendi. PN 22. günden itibaren vaginal açıklık bakılmaya başlandı ve PN 30. gün antropometrik ölçümleri alındı, vaginal smear alındı, dekapite edilerek kan alındı ve organ diseksiyonu yapıldı. Uterus, over, karaciğer, böbrek ve beyin organlarının ağırlıkları, vücut ağırlıklarına oranlanarak rölatif organ ağırlıkları bulundu. Vaginal smearlar, over ve uterus dokuları histolojik incelemeye alındı. Serumdan folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinize edici hormon (LH), östrojen, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), leptin, kolesterol, düşük yoğunluklu

lipoprotein (LDL), kreatinin, enzyme linked immunosorbent assay (ELİSA) yöntemi ile çalışıldı. Karaciğer ve böbrek dokularında, lipit peroksidasyon-malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) ölçümü yapıldı.

Bulgular:

Klinik ön çalışma: Prematür telarş grubunun, kontrol grubuna göre vücut ağırlığı, boy uzunluğu ve vücut kitle indeksi (vki) daha fazla idi. Prematür telarş grubunun %60'ının, kontrol grubunun ise %27,8'inin hayatlarının bir döneminde bıldırcın yumurtası kullandığı saptandı. Bıldırcın yumurtası tüketimi, kontrol grubunda az (%20,4) veya orta (%7,4) iken, yoğun tüketim hiç görülmedi. Prematür telarş grubunun ise %18,2'sinin az, %21,8'inin orta, %20'sinde yoğun tüketim bildirildi.

In vivo rat modeli çalışması: Ratların vücut ağırlığı ve burun-kuyruk uzunluğu günden güne artış göstermekle birlikte, gruplar arası anlamlı farklılık görülmedi. Vaginal açıklık, E2 grubunun hepsinde PN 25. günde, BY 300 mg/kg grubunda 2 hayvanda PN 26. günde ve yağ grubunda 2 hayvanda PN 26 ve 30. günlerde görüldü. Diğer hayvanlarda çalışmanın sonlandırıldığı PN 30. günde halen vaginal açıklık yok idi. Vaginal smear incelemelerinde su grubunun anestrus evresi ile prepubertal, diğer grupların ise östrus siklusu ile pubertesinin başlamış olduğu belirlendi. Vaginal smearda östrojenik aktivite belirtisi olan kornifiye hücre oranında ise en yüksek E2 grubu olmak üzere, BY 300 mg/kg ve 1000 mg/kg doz gruplarında doz bağımlı anlamlı artış görüldü. Rölatif uterus ağırlığının, E2 grubu ve BY 300 mg/kg ve 1000 mg/kg doz gruplarında arttığı, rölatif over ağırlığının E2 grubu ve BY 1000 mg/kg grubunda arttığı görüldü. Over folikül sayıları, E2 grubunda anlamlı olarak fazla iken; diğer gruplarda farklı değildi. Uterus histolojisinde, endometriyal gland sayısı E2, BY 300 mg/kg ve 1000 mg/kg gruplarında kontrole göre istatistiki olarak anlamlı yüksek bulundu. Endometriyal stroma kalınlığı ise E2 ve 1000 mg/kg grubunda anlamlı yüksek bulundu. FSH düzeyi, E2, 1000 mg/kg grubunda; östradiyol düzeyi ise E2, 300 mg/kg ve 1000 mg/kg doz gruplarında yüksek bulundu. Diğer biyokimyasal parametreler gruplar arası anlamlı farklılık görülmedi.

Sonuç: Kız çocuklarında prematür telarş ile başvuranlarda, kontrol grubuna göre bıldırcın yumurtası kullanımının daha sık olduğu görülmektedir. Hayvan deneyi

Çalışmamızda; smear bulgularında proöstrus evresi görölmesi, vajinal epitelin kornifiye olması, rölatif uterus ve over ağırlıklarındaki artış ve FSH ve östradiyol düzeyleri ile bıldırcın yumurtasının puberte üzerine etkisi olduğu ve 17β-estradiol kadar olmasa bile östrojenik etkisi olduğu görölmektedir.

Anahtar kelimeler: Bıldırcın yumurtası, puberte prekoks, endokrin bozucular



ABSTRACT

Background and Aim: Natural hormones and some synthetic chemicals which we are frequently exposed to in our surrounding environment, may disrupt the balance in our endocrine system and cause undesirable effects. In some patients with precocious puberty, we encountered history of quail eggs consumption which raised the question of whether it has an endocrine disrupting effect. Based on this observation, we investigated the effect of quail egg on puberty by two line of studies. First, we determined the exposure to quail egg in girls with premature thelarche. Secondly, we investigated the effect of quail egg consumption on the pubertal development of female Sprague-Dawley rats.

Method:

Clinical preliminary research: The files of 55 female patients between the ages of 6 and 8 who presented with premature thelarche were examined retrospectively and their families were asked about the use of quail eggs and their frequency if used. As the mean age at presentation of the patients presenting with premature thelarche was determined as 7 years and 2 months, the files of 54 female patients with Type 1 Diabetes Mellitus and good glycemic control who were followed up as a control group between the ages of 6 and 8 were retrospectively analyzed and their families were surveyed in the same way.

In vivo rat model: Sprague-Dawley female rats divided into 6 groups as negative control with water, negative control with oil, positive control with 17 β -estradiol (E2) and quail egg (BY) 300 mg/kg, 1000 mg/kg, 3000 mg/kg dose groups. All rats were gavaged orogastrically with doses determined according to their weight; after body weight and nose-tail length were measured every day. Vaginal opening is checked from the postnatal 22nd day. Anthropometric measurements, vaginal smear and blood were taken by decapitation on the postnatal 30th day and organ dissection was performed. Vaginal smears, ovarian and uterine histology were performed. Serum follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estrogen, insulin-like growth factor (IGF-1), leptin, cholesterol, low density lipoprotein (LDL), creatinine levels were measured using specific rat enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

kits. Lipid peroxidation-malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were measured in liver and kidney tissues.

Results:

Clinical preliminary research: Premature thelarche group had higher body weight, height and body mass index (BMI) compared to control group. It was found that %60 of the premature thelarche and %28 of the controls used quail eggs at sometime in their lives. Quail egg consumption was mild (%20.4) or moderate (%7.4) in the control group, but no heavy consumption was observed. In the premature thelarche group, there was %18.2 mild, %21.8 moderate and %20 heavy consumption in the history.

In vivo rat model: Although the body weight and nose-tail length of the rats increased day by day, there was no significant difference between the groups. Vaginal opening was seen on PN 25th day in all E2 group, 2 rats in the BY 300 mg/kg group on the 26th day and 2 rats from the fat group on PN 26 and 30th days. When the study was terminated, there was no vaginal opening in other rats. Vaginal smear findings were compatible with prepuberty in the control group whereas the other groups had evidence of puberty. In the vaginal smear, cornified cells indicating estrogenic activity was observed in the BY 300 mg/kg and 1000 mg/kg dose groups, with E2 group being highest. Relative uterine weight increased in E2 and BY 300 mg/kg and 1000 mg/kg dose groups, while relative ovarian weight increased in E2 and BY 1000 mg/kg groups. While the number of ovarian follicles were significantly higher in E2 group; they were not different in other groups. Uterine histology was significant for higher number of endometrial glands in E2, BY 300 mg/kg and 1000 mg/kg groups compared to the controls. Endometrial stroma thickness was significantly higher in E2 and 1000 mg/kg groups. FSH level was found to be high in E2 and BY 1000 mg/kg group. Estradiol level was determined to be high in E2, BY 300 mg/kg and 1000 mg/kg dose group. Others biochemical parameters did not differ significantly between groups.

Conclusions: It is observed that quail eggs are used more frequently in those presenting with premature thelarche compared to the control girls. In our animal experiment; based on vaginal smear findings, cornification of the vaginal epithelium,

increase in uterus and ovarian weights and FSH and estradiol levels, the consumption of quail eggs appear to have a facilitatory effect on pubertal development.

Keywords: Quail eggs, precocious puberty, endocrine disruptors



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Puberte, sekonder cinsiyet karakterlerinin ve üreme fonksiyonlarının kazanıldığı fizyolojik bir süreçtir. Pubertenin kızlarda 8, erkeklerde 9 yaşından önce başlaması erken puberte olarak kabul edilmektedir. Günümüzde daha iyi sosyoekonomik ve beslenme koşullarına sahip çocuklarda ve çevre kirliliği ile değişen çevresel faktörlere paralellik göstermek üzere, normal puberte daha küçük yaşlarda başlayabilmektedir (1).

Gerçek erken puberte (GEP), hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin organik bir nedenle ya da fonksiyonel olarak erken olgunlaşmasıdır. GEP, GnRH nöronları üzerindeki santral baskılayıcı sistemlerin etkinliğini yitirmesi ve uyarıcı sistemlerin ön plana çıkması sonucu oluşmaktadır. Bu değişimi kafa içi organik lezyonlar ya da yapısal anomaliler (organik, nörojenik GEP) oluşturabildiği gibi, tamamen işlevsel bir erken olgunlaşma (idiopatik GEP) sonucu da gelişebilmektedir.

Gerçek erken pubertenin en sık görülen şekli özellikle kızlarda idiopatik puberte prekoksstur (2). Çevresel kimyasallara maruz kalmak, beslenme, genetik ve epigenetik yollar, büyüme ve gelişmeyi etkilemektedir. Bu sebeple, idiopatik puberte prekokssta, endokrin bozucular dikkati çekmektedir. Fitalat ve bisfenol A içerikli endokrin bozucuların puberte süresinde değişiklik yaptığı düşünülmektedir (3, 4).

Sosyoekonomik faktörler ve diyet puberte prekoks arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır (5, 6). Sağlıksız diyet ile beslenme, geleneksel ve protein ağırlıklı diyetlere ile karşılaştırıldığında; sağlıksız diyetle beslenenlerde puberte prekoks geliştiği gözlemlenmektedir (4).

Bıldırcın yumurtası, oldukça yüksek bir protein deposudur. İçeriğindeki besleyici maddelerin yoğunluğu nedeniyle yaygın olarak tüketilen tavuk yumurtasından farklıdır. Yumurta denilince ilk akla gelen kolesterol olsa da; tavuk yumurtası ile karşılaştırıldığında, bıldırcın yumurtasında daha düşük seviyelerde saptanmıştır (7).

Bıldırcın yumurtası, diğer yumurtalardan daha fazla protein yapıtaşı olan aminoasit içermekle birlikte, ampirik bilgiler doğrultusunda birtakım başka özellikleri olduğu

düşünülmektedir. Bıldırcın yumurtası, çocukların bedensel ve zihinsel gelişimine yardımcı olmakla birlikte, bağışıklık sistemini güçlendirdiğine inanılmaktadır. Öksürük, grip, bronşit gibi üst solunum yolu enfeksiyonu geçiren çocukların, bıldırcın yumurtası tükettikten sonra kısa sürede kurtulduğu ve iştahlarının arttığı söylenmektedir (8, 9).

Puberte prekoks ile başvuran hastalarda, endokrin bozucular açısından ayrıntılı hikâye sorgulanmakta ve bıldırcın yumurtası kullanımı dikkati çekmektedir. Bıldırcın yumurtası ile beslenmenin puberte üzerine etkisine literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle, bıldırcın yumurtası ile beslenmenin puberte üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Puberte

2.1.1. Pubertenin tanımı

Puberte, reproduktif fonksiyonlarının kazanıldığı ve seksüel matüritenin sağlandığı, çocukluktan erişkinliğe geçişin olduğu bir süreç olarak tanımlanır. Bu zaman zarfında, gonadlarda gametler olgunlaşır, sekonder seks karakterleri oluşur, adölesan büyüme atağı olur ve büyük fizyolojik değişiklikler olur (10).

2.1.2. Pubertenin nöroendokrin regülasyonu

Puberte süreci nöroendokrin faktörler ve hormonlar tarafından kontrol edilmektedir. Pulsatil Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) salınımı ve buna bağlı olarak pulsatil Lüteinize Edici Hormon (LH) ve Folikül Stimule Edici Hormon (FSH) salınımının uyarılması ile matürasyon başlar. Hipotalamus-hipofiz-gonadal aks döngüsü ve geri besleme (feed-back) mekanizması ile hormonal kontrol sağlanır. GnRH hipotalamik nöronlardan salgılanır ve selektif olarak ön hipofizdeki gonadotrop hücreleri uyarak, FSH ve LH salınımını stimüle eder (11).

Hipotalamo-hipofizer-gonadal aks, gestasyonel 20. haftada fonksiyoneldir ve gestasyonun sonuna kadar aktif kalır. Postnatal 1. ayda spontan olarak GnRH pulsaları oluşur. Erkek yenidoğanda doğumdan sonraki ilk birkaç dakika içinde dolaşımdaki LH artar ve bunu ilk 3-21 saatteki testosteron artışı izler. Yüksek LH düzeyleri ilk 6 ayda azalır ve puberte başlangıcına kadar düşük kalır. FSH ise erkek yenidoğanda ilk 3 ay yüksektir ve sonra düşmeye başlar. Postnatal 2-4. aylarda dolaşımdaki testosteron düzeyleri de artmaktadır. Buna karşın, kız yenidoğanlarda LH ilk birkaç ay hafif yüksek iken FSH ilk 5 ay yüksektir. Yaşamın ilk altı ayından sonra FSH, LH ve gonad kaynaklı steroidlerin tümü düşük düzeydedir ve puberte başlangıcına kadar hipotalamo-hipofizer gonadal sistem, sessiz döneme girer. Puberte, prepubertal dönemde sessiz olan hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın reaktivasyonu ile ortaya çıkar. Puberte başlangıcıyla, özellikle geceleri olmak üzere, hipofiz bezinden gonadotropin salınımı pulsatil şekilde başlar (10, 11).

Birçok nörotransmitter ve nöromodölatör, eksitasyon ve inhibisyon görevleri ile pubertal gelişim sürecine yön vermektedir. Prepubertal GnRH salınımının inhibisyonunda, başta gamma-amino bütirik asit (GABA) olmak üzere, endojen opioidler ve melatonin yer almaktadır. GnRH salınımının hipotalamustaki başlıca eksitator nörotransmitteri glutamattır. Diğer GnRH sekresyon stimulatorleri leptin, norepinefrin, dopamindir (10, 11).

GnRH uyarısı ile ön hipofiz gonadotrop hücrelerden salınan FSH erkeklerde; LH kontrolü altındaki testosteron ile birlikte normal spermatogenezin başlangıcı ve devamı için gereklidir. Kızlarda ise overyan foliküllerin büyümesi ve androjenlerden östrojen üretimi için gereklidir. LH; erkeklerde Leydig hücrelerinden testosteron, kızlarda ise ovulasyon başladıktan sonra overyan östrojen salınımını uyarır.

2.1.3. Pubertede fizyolojik değişiklikler

Puberte ile birlikte görülen fiziksel ve hormonal değişiklikler, seksüel matürasyon belirtisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Pubik kıllanma ve meme gelişimi, 8-10 yaş arasında görülmektedir. Pubik ve aksiller kıllanma, pubertede hipofizer-gonadal matürasyondan bağımsız olarak adrenal androjenlerin artışı (adrenarş) ile görülür. Meme gelişimi ise over kaynaklı östrojenlerin artışına (gonadarş) bağlıdır. Overyan östrojenlerin artışı ile ortalama 11-13 yaşlarında menarş görülür. Kızlarda pubertenin erken dönemlerinden itibaren olan östrojen artışı, epifizyal matürasyon ve boy uzamasını uyarır ve bunlar da pubertenin belirtileri olarak karşımıza çıkar. Erkeklerde, testiküler büyüme 9,5-13,5 yaş aralığında (ortalama 12 yaş) olur ve bunu pubik kıllanma ve penis büyümesi takip eder (10).

Adrenarşın başlangıcı yavaş, progresif bir gelişimsel süreçtir ve olay erken çocuklukta adrenal androjenlerin (Dehidroepiandrosteron, dehidroepiandrosteron sülfat ve androstenedion) yapımındaki artış ile ilişkilidir. Adrenarş gonadarştan 1-2 yıl önce olur, ama klinik belirtilerin ortaya çıkış zamanı değişkenlik gösterir (10).

Pubertal değişimleri değerlendirirken Tanner evrelemesi kullanılır (Tablo-1, 2, 3) (11). Kızlarda puberte başlangıcı meme gelişimi ile belirlenir (Tanner evre 2 meme gelişimi, inspeksiyon ve palpasyon ile değerlendirilir) (Tablo-1). Erkeklerde ise testiküler büyüme (Tanner evre 2 genital gelişim, testiküler hacmin 4 ml'nin üzerinde oluşu veya

testiküler uzunluğun 25 mm'den yüksek oluşu ile değerlendirilir.) ile değerlendirilir (Tablo-3) (12).

Tablo-1: Tanner meme gelişimi evreleri (11)

Evre 1	Meme gelişimi olmamıştır, prepubertal.
Evre 2	Areola ve papillada kabarıklık ve areola çapında artma olmuştur.
Evre 3	Meme büyümüş ve areola çapı genişlemiştir, areola ve meme konturları birbirinden ayrı değildir.
Evre 4	Areola meme konturlarından ayrı hacim kazanır
Evre 5	Meme gelişimi erişkin büyüklüğüne ulaşmış, areola geri çekilip papilla dışı doğru kabarmıştır.

Tablo-2: Tanner kızlarda pubik kıllanma evreleri (11)

Evre 1	Pubik kıllanma henüz başlamamıştır.
Evre 2	Labia majör boyunca veya mons veneriste seyrek, az pigmente, ince, düz veya hafif kıvrımlı kıllardan oluşan kıllanma vardır.
Evre 3	Kıllar daha kalın, pigmente, kıvrık ve sık olmak üzere, monsa daha geniş bir alana yayılmıştır.
Evre 4	Kıllanma monsu tamamen kaplamış ve uyluk iç yüzlerine uzamıştır.
Evre 5	Erişkin özelliklerinde kıllanma mevcuttur.

Tablo-3: Tanner erkek genital gelişimi evreleri (11)

Evre 1	Pubik kıllanma yok, genital gelişme infantildir, testis volümü 4 ml altındadır.
Evre 2	Penis kökünde seyrek hafif pigmente, düz veya kıvrıkcık uzunca tüyler, peniste hafif büyüme, skrotum derisinde pigmentasyon başlamış, testis volümü 4-9 ml.
Evre 3	Kıllanma daha belirgin ve yaygın, kıllar koyu renkte ve kıvrıkcık, penis boy ve çevresinde belirgin büyüme, skrotumda belirgin pigmentasyon, testis volümü 10-14 ml.
Evre 4	Kıllanmanın dağılımı erişkine benzer, peniste büyüme devam eder, skrotum pigmentasyonu daha da artar, testis volümü 15-19 ml.
Evre 5	Kıllanma artar, bacakların medial kısımlarına ve umbilikusa doğru yayılmaya başlar, erişkin büyüklükte penis, testis volümü 20 ml ve üzerindedir.

2.1.4. Pubertenin başlama zamanını etkileyen faktörler

Pubertal gelişimin zamanlaması, genetik, beslenme, çevresel ve sosyoekonomik faktörlerden etkilenir (1). Aynı etnik köken, aile içerisinde, monozigotik ikizler arasında puberte zamanlaması korelidir. Kalıtım, %50 ile %80 arasında olmak üzere puberte zamanlamasında ciddi rol oynamaktadır. Beslenme ve sağlık koşulları da zamanlamaya etki eden diğer faktörlerdir (13).

2.2. Puberte Zamanlamasında Normal Varyasyonlar

2.2.1. Prematür adrenarş (Prematür pubarş)

Kızlarda 8 yaşından önce, erkeklerde 9 yaşından önce görülen, diğer seksüel matürasyon kriterleri olmaksızın, seksüel kıllanma (aksiller, pubik veya her ikisi birden) ile karakterize pubertal gelişimdir (14).

2.2.2. Prematür telarş

İzole prematür telarş sık görülen bening bir durumdur. Kızlarda, 2 yaşından önce, diğer pubertal belirtiler görülmezsizin, meme gelişimi görülür. Kıllanma yoktur, büyüme ve kemik yaşı normaldir (14).

2.2.3. Pubertal jinekomasti

Erkek çocuklarda pubertede %40-70 oranında görülen iyi huylu, kendiliğinden gerileyen göğüs dokusu büyümesidir. Androjenlerin artışı ile östrojene dönüşüm artarak ve meme dokusunun östrojene duyarlılığı artarak meme dokusu gelişimine neden olur. Yaklaşık 2 yıl sürer ve genellikle kendiliğinden geriler (11).

2.3. Puberte Prekoks (Erken Puberte)

2.3.1. Puberte prekoks tanımı

Puberte ile ilgili herhangi bir bulgunun kızlarda 8 yaşından, erkeklerde 9 yaşından önce başlamasına puberte prekoks (erken puberte) denir. Puberte ile ilgili bulgular; Tanner evrelemesine göre kızlarda evre 2 meme gelişimi ve pubik kıllanma, erkeklerde testis volümünün 4 ml'nin üzerinde olması ve evre 2 pubik kıllanma olarak değerlendirilir. Bilinen en sık neden idiyopatik santral puberte prekokstur (3). Puberte prekoks'a, kız çocuklarında erkek çocuklarından 10-20 kat daha sık rastlanır (2).

2.3.2. Puberte prekoks etyolojik sınıflama

Puberte prekoks gerçek (santral-GnRH bağımlı) veya yalancı (periferik-GnRH bağımsız) (PPP) olarak sınıflandırılmaktadır (11). Etiyolojik sınıflama, Tablo-4'de verilmiştir.

2.3.2.1. Santral (gerçek, komplet) puberte prekoks

Santral puberte prekoks (SPP), hipotalamus-hipofiz-gonad (HHG) aksının organik bir sebeple ya da fonksiyonel olarak, normal puberteye benzer bulgularla erken olgunlaşmasıdır. Prepubertal dönemde HHG aksının baskılanmasındaki SSS inhibitörleri ve seks steroid bağımlı negatif feedback mekanizmasının etkinliğini bozan kafa içi lezyonlar ya da organik olmayan fonksiyonel değişimler SPP'ye neden olmaktadır. HHG aksının komplet aktivasyonu ve pubertal bulguların hastanın cinsiyetine uygunluğu nedeniyle, bu tür puberteye "komplet izoseksüel puberte prekoks" da denilmektedir.

SPP, santral sinir sistemi lezyonu ile ilişkili olduğunda organik nedenli olarak tanımlanır. Organik lezyon olasılığı erkeklerde daha yüksek olmakla birlikte küçük yaşlardaki kızlarda da %10-15 oranında görülmektedir. En önemli organik neden, her iki cinste de hamartomlardır (2).

En sık gördüğümüz şekli, özellikle kızlarda idiyopatik SPP’dir. SPP ile takip edilen kızların %85’i idiyopatik, erkeklerin %60’ı organik nedenlidir. İdiyopatik diyebilmek için, diğer nedenlerin ekarte edilmiş olması gerekir (13).

Tablo-4: Puberte Prekoks etyolojik sınıflama

Santral Puberte Prekoks	Periferik Puberte Prekoks
Yapısal	Over-testis-sürrenal patolojiler
İdiyopatik	Hcg salgılayan tümörler (ektopik PP)
Organik	Mc. Cune Albright Sendromu
✓ SSS tümörleri	
✓ Suprasellar kist	
✓ Kafa travması	
✓ Hamartomlar	
✓ Granülomlar	
✓ Hidrosefali	
✓ Enfeksiyon	
✓ Kranial ışınlama	
✓ Anoksi	
✓ Hipotroidi	
✓ İyatrojenik	
✓ Nörokutanöz Sendromlar (Nörofibrmatözis, Tuberoskleroz, Mc. Cune Albright Sendrom)	
✓ Dismorfik sendromlar (Silver Sendromu, Kabuki make up Sendromu)	

2.3.2.2.Periferik (yalancı, inkomplet) puberte prekoks

Periferik puberte prekoks (PPP), gonadotropin bağımlı olmayan erken pubertal gelişimdir. Baskılanmış gonadotropin veya prepubertal dönemde pubertal düzeyde seks steroidleri ile karakterizedir (14).

Seks steroidlerinin dışardan alınması, ektopik hCG salgılayan lezyonlar, gonadal ya da sürrenal patolojiler etyolojide rol oynayan nedenlerdir (15). Salgılanan hormona göre pubertal bulgular izoseksüel ya da heteroseksüel olabilir. Erken gelişen sekonder cinsel özellikler genetik cinse uygunsa izoseksüel, uygun değilse heteroseksüel puberte prekoks denilir.

2.3.3. Puberte prekoksda klinik bulgular

SPP'de bulgular normal puberte gibi görülürken, PPP'de salgılanan hormona göre farklılık gösterebilir. Bulgular açısından cinsiyete göre de farklılık görülür. SPP'de erkeklerde genelde organik kökenli olduğu için hızlı bir ilerleyiş görülürken; kızlarda daha çok idiyopatik nedenli olduğu için yavaş ilerleyen bir süreç görülür.

Kızlarda önce meme gelişimi, ardından pubik kıllanma ve zaman içinde periyodikleşen vajinal kanamalar, boy uzamasında artış olarak görülür. Erkeklerde bilateral testis boyutlarında büyüme, makrogenitalya, pubik kıllanma, akne, ses kalınlaşması, aksiller kıllanma ve boy uzamasında artış olarak görülür. Yaşıtlarına göre iri olan bu çocukların final boyları epifiz plakları erken kapandığından, genetik potansiyellerinin altında kalır (2, 11).

PPP'de heteroseksüel bulgular arasında, kızlarda akne gelişimi, ses kalınlaşması, kliteromegali, androjen duyarlı bölgelerde kıllanma gibi virilizan bulgular varken; erkeklerde feminizan bulgular vardır. Erkeklerde izoseksüel puberte prekoksta, akne, ter kokusu, makrogenitalya, pubik kıllanma, musküler yapı, sık ereksiyon, gece boşalmaları başlıca özelliklerdir (2).

SPP'de baş ağrısı, nöbet, görme bozukluğu gibi santral sinir sistemi bozukluğu bulguları görülür (12). PPP'de testis boyutları prepubertal olduğu halde, makrogenitalya gelişen erkeklerde androjen salgılayan tümörler veya adrenal hiperplazi akla gelmelidir (11).

2.3.4. Puberte prekoks laboratuvar bulguları

Puberte prekoks tanısında, oksolojik parametreler (ilerlemiş kemik yaşı ve artmış büyüme hızı), hormon düzeyleri ve GnRH (gonadotropin releasing hormon) uyarı testi

kullanılır (14). LH, FSH, östrojen (kızlarda), testosteron (erkeklerde), DHEA-S, 17-hidroksiprogesteron düzeylerine ve tiroid fonksiyon testlerine bakılır (15).

Kızlarda östrojen, normal pubertal dönemdeki gibi dalgalanma göstermekle birlikte 12 pg/ml'nin üzerindedir. Erkeklerde ise testosteron sabahları 20 ng/dl'nin üzerindedir. Bazal LH düzeyi 0.3 mIU/ml ve üzeri pubertal kabul edilirse de genellikle bazal gonadotropin değerleri normal sınırlar içinde saptanabilir. Bu nedenle, kesin tanı için GnRH uyarısında LH ve FSH yanıtları belirlenmeli ve uyarılmış gonadotropin düzeylerine bakılmalıdır. GnRH uyarı testinde, sabah 100 mg GnRH iv verilip, 120 dakika içerisinde her 30 dakikada bir kan alınır (2). Kızlarda LH düzeyinin 5 mIU/ml ve üzerinde; erkeklerde ise 8 mIU/ml'nin üzerinde olması pubertal yanıttır. GnRH uyarı testi ve gonadotropin cevabının gösterilmesi, SPP tanısı için altın standarttır (13). PPP'da östrojen veya testosteron artmışken, LH ve FSH düzeyleri baskılanmıştır. Over ve testis tümörlerinde östrojen 100 pg/ml'nin, testosteron 45 ng/dl'nin üzerindedir. Prematür telarş ve prematür adrenarşta ise, prepubertal gonadotropin düzeyleri, hafif artmış veya normal düzeylerde östrojen veya testosteron düzeyleri görülür. Prematüre telarşda GnRH uyarısının FSH predominant yanıt alınır. Prematür adrenarşta DHEA ve DHEA-S pubertal düzeylerde saptanır (13).

2.3.5. Puberte prekoksda görüntüleme

Kemik yaşı değerlendirmesi ile epifizyal matürasyona bakılır. Puberte prekoksda genellikle kemik yaşı kronolojik yaştan ileridir (İki standart sapmanın üzerindedir). Kemik yaşı, erişkinlikteki final boy hakkında da bilgi verir (12).

Puberte prekoks tanısında artmış uterus hacmi ve endometriyum kalınlığı pelvik ultrasonografi ile gösterilir (14). Puberte prekoks tanısında, %89 sensitivite ve spesifite ile uterus hacmi 2 mL'den fazladır. Prepubertal kızlarda uterus yüksekliği 35 mm'den az olmalı; over uzun çapı 20 mm'yi geçmemelidir. Overlerin bilateral olarak büyük olması SPP'in önemli ölçütlerinden biridir. Uterus yüksekliğinin artması (≥ 35 mm) ve tubular şeklinin armut benzeri bir görünüm alması tanıtıcı bir bulgudur. Puberte öncesi homojen ya da mikrokistik özellik gösteren overler multikistik ya da makrokistik/foliküler yapı kazanırlar. Endometrium ekojenitesi kalınlaşıp, belirginleşebilir. Endometrium kalınlığı 5 mm'e ulaşınca genellikle menarş

görülebilmektedir (2). PPP'li erkeklerde testiküler ultrasonografi görülür ve nonpalpabl olan lezyonlar da görülebilir (12).

SPP'li bütün vakalarda kranial manyetik rezonans görüntüleme (MR) yapılır ve hipotalamik lezyon olup olmadığı görülür. Erkeklerde %40-90, kızlarda %8-33 oranlarında lezyon saptanır (12).

2.3.6. Puberte prekoks tedavisi

Santral puberte prekoks (SPP) ile periferik puberte prekoks (PPP) takip ve tedavi açısından yaklaşım farkı olduğu için birbirinden iyi ayırt etmek gerekir (14).

SPP tedavisinde amaç; pulsatil gonadotropin salınımının baskılanması, normal pubertal yaşa kadar maturasyonun kontrol altında tutulması, erken epifizyal kapanmanın engellenmesi, çocuğun psikososyal olarak korunması ve kızlarda erken yaşlardan itibaren maruz kalınan yüksek östrojenin oluşturacağı etkilerden korunmasıdır (2).

Tedavi endikasyonları (2);

- ✓ Kızlarda bulgular 7 yaşından önce başlamışsa (7-8 yaş arası gri bölge, tedavi tartışmalıdır.)
- ✓ Hızlı pubertal seyirin gösterilmesi durumunda (Yıllık kemik yaşı artımının, takvim yaşı artımına oranı 1.2'nin üstüne çıkması ve iki pubertal evre arasının 3-6 ay kadar kısa olması hızlı ilerlemeyi gösterir.)
- ✓ Yavaş ilerleyen idiyopatik SPP'de ise tedavi önerilmemektedir ancak psikososyal problemler dikkate alınmalıdır.
- ✓ Erkeklerde bulgular 9 yaşından önce başlamışsa tedavi önerilmektedir.

SPP tedavisinde GnRH agonistleri kullanılır. GnRH agonistleri, pütiter GnRH reseptörlerini baskılar, gonadotropinlere duyarsızlaştırır (14). Leuprolide asetat için doz 0.3mg/kg/28gün'dür (3.75 mg/28gün düşük doz – 7.5 mg/28gün yüksek doz). Tedavinin etkinliği için düzenli ilacın kullanımı ve kullanımın denetlenmesi önemlidir. Düzensiz kullanımlarda tedavi etmekten ziyade, uyaran olarak etki edebilir. Klinik bulgularda gerileme, yıllık kemik yaşı artımının takvim yaşı artımına oranının <1.2 olması, GnRH uyarısına alınan LH yanıtının baskılanması tedaviye yanıtı

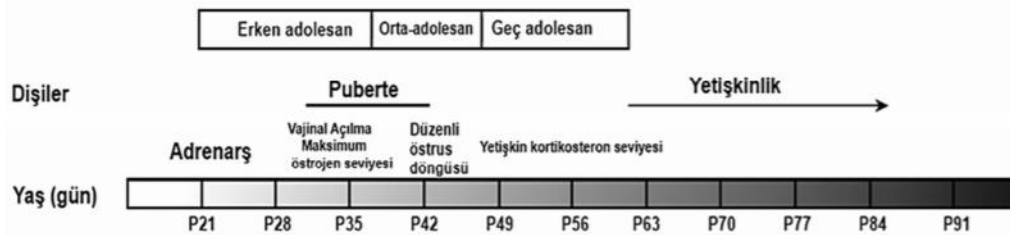
göstermektedir. Tedavide başarı sağlanamıyorsa 21 günde bir uygulamaya geçilip yine başarılı olunamazsa doz arttırımı yapılmaktadır (2).

PPP tedavisi nedene yöneliktir. Sürrenal ve gonad kökenli kitlelerin eksizyonu ve malign karakterde olanlara radyoterapi ve kemoterapi gereklidir. Geç tip adrenal hiperplazide glukokortikoid ve mineralokortikoid tedavisi, ek olarak gereklilik halinde androjen reseptör antagonisti kullanılabilir. McCune Albright sendromunda kemik yaşının hızlı ilerlemesine engel olmak amacıyla aromataz inhibitörleri veya selektif östrojen reseptör modülatörleri kullanılabilir (11).

2.4. Dişi Sıçanlarda Üreme Fizyolojisi

2.4.1. Dişi sıçanlarda puberte

Dişi sıçanlarda, pubertenin indikatörü vaginal açıklık ve ilk proöstrustur (16). Puberte yaşı, beslenme koşulları, yaşam alanı, çevre koşulları, ratların genetiği, anne karnındaki yavru sayısı, anne karnındaki bulunuş şekli gibi birçok durumdan etkilenmektedir. Örneğin; beslenmesi iyi olan ve anne karnında az sayıda kardeş ile doğanlar puberteye daha erken girdiği gözlenmiştir. Vaginal açıklık, postnatal 33-42. günler arasında açılır. Düzenli östrus siklusları, vaginal açıklıktan 1 hafta sonra başlar (Şekil-1). Dişi sıçanlarda puberte ve üreme fonksiyonları ile ilgili bazı özellikler Tablo-5’de görülmektedir.



Şekil-1: Dişi sıçanlarda puberteden yetişkinliğe geçiş döneminin olayları ve zaman akış çizelgesi

Tablo-5: Dişi sıçanların bazı özellikleri

Erişkin vücut ağırlığı (dişi): 200-300 g

Doğum ağırlığı: 5-6 g

Gebelik süresi: 21-23 gün

Yavru sayısı: 6-12

Laktasyon süresi: 20-22 gün

Pubertas : 2-4 ay

Seksüel siklus : 4-5 gün

Proöstrus : 12 saat

Östrus : 12 saat

Metöstrus : 20 saat

Diöstrus : 57 saat

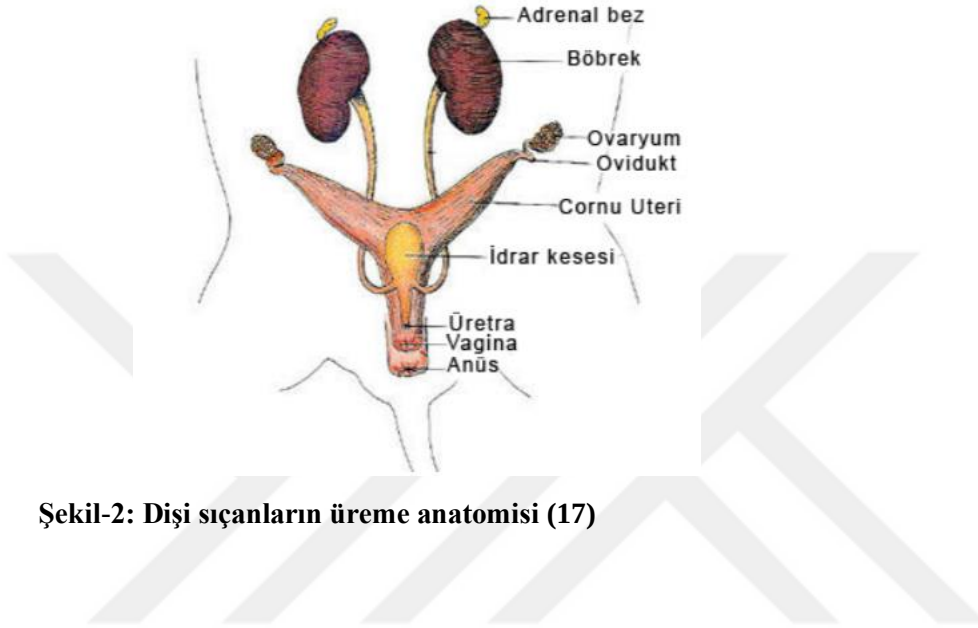
Ovulasyon : Spontan

2.4.2. Dişi sıçanlarda pubertenin nöroendokrin mekanizması

Reproduktif döneme geçişin en önemli olayı infantil dönemdeki FSH düzeyinin artışıdır. Bu artış, folikül gelişimini uyarır ve overlerde FSH ve LH reseptör matürasyonunu artırır. Infantil dönem sonunda, LH dalgalanmalar ile östradiyol düzeyinin artması sonucu hipotalamik-pituiter ünite aktivasyonu ile proöstrusa geçiş sağlanır. Overler immatür olduğu için ilk ovulasyon hemen gerçekleşmez. Juvenil periyod süresince [postnatal 21-32. Gün], artan prolaktin ve growth hormon ile düşük ama pulsatil LH düzeyi ile overler gelişir. Juvenil periyod sonunda büyük amplitüdlü LH pikleri ile senkronize nöronlardan LHRH salgılanır. LH, proöstrus evresinde pik yaparken, östrusta en düşük düzeydedir. FSH, östrusta en yüksek düzeyine ulaşır. Diöstrusta FSH ve LH düşük saptanır. Bu süreçte, GH ve PRL artış paterni ile puberteden final matürasyona geçilmiş olur. Serum östradiyol ve progesteron düzeylerinde yeterince artış olunca, östradiyol pozitif feedback gösterir ve ovulasyon olur (16). Östradiyol, proöstrusta en yüksek seviyesine ulaşırken, östrusta başlangıç seviyesine geri döner.

2.2.3. Dişi sıçanlarda üreme anatomisi

Dişi sıçanlarda uterus "Y" şeklindedir. İki ayrı lümen ve iki ayrı ositum ile servikse açılırlar (17). Uterus uçları , ovidukt ile overlere bağlanır (Şekil-2). Overler foliküller ile doludur.



Şekil-2: Dişi sıçanların üreme anatomisi (17)

2.2.4. Dişi sıçanlarda östrus siklusu

Dişi sıçanlarda seksüel sikluslar mevsimsel değişkenlik göstermemekle birlikte yıl boyu sürmektedir (18). Östrus siklusları 4-5 gün sürmektedir. Dört dönemden oluşur: Proöstrus, östrus, metöstrus, diöstrus. Anöstrus dönem ise, reproduktif sistemin sessiz kaldığı ve üremenin olmadığı dönemdir (19). Bazı kaynaklar geç juvenil dönemi, anöstrus olarak 5. Dönem olarak kabul etmektedir (20).

Geç juvenil dönem, anöstrus yaklaşık postnatal 30.güne gelmektedir. LH düzeyinde değişiklikler başlamıştır. Uterus küçük (ağırlığı 100 mg'dan küçük), intrauterin lümende sıvı yok ve vagina kapalıdır (20).

Proöstrus 12 saat sürer. Bu evrenin sonunda dişi erkeği kabul etmeye başlar (18). Vajinal sitolojide çekirdekli epitel hücreleri görülür. Uterus genişlemeye başlamıştır ve lümen içi sıvı görülmeye başlanır. Geç proöstrus dönemde uterus ağırlığı 200 mg'ın üzerine çıkar. Overlerde foliküller genişlemiştir. Çoğu sıçanda vagina hala kapalıdır (20).

Östrus evresi de 12 (9-15) saat sürer. İlk ovulasyon günüdür. Intraluminal sıvı hala görülmeyebilir (20). Vagina açılmıştır ve vaginal sitolojiye hakim olan hücre tipi çekirdekli hücrelerdir (%75). Geri kalanını (%25) kornifiye hücreler oluşturur (18).

Metöstrus 21 saat sürer ve artık dişi erkeği kabul etmez. Çekirdekli ve kornifiye hücrelerle beraber çok sayıda lökosit görülür (18).

Diöstrus 57 saat sürer ve vajinal sitolojide lökositler predominanttır. Overlerde matür korpus lutea görülür (20).

Tablo-6: Dişi sıçanlarda vaginal sitoloji ve hücre tipleri (21)

Evre	Nötrofil	Küçük çekirdekli epitel hücre	Büyük çekirdekli epitel hücre	Kornifiye hücre	Hücre yoğunluğu
Proöstrus	0 - +	++ - +++	0 - +	0 - +	Az - orta
Östrus	0 - +	0 - ++	0 - ++	++ - +++	Orta - çok
Metöstrus	+ - +++	+ - ++	+ - ++	+ - +++	Orta - çok
Diöstrus	++ - +++	+ - ++	+ - ++	0 - +	Az - orta

0= hücre yok, += az, ++=orta, +++=yoğun

2.5. Endokrin Bozucular

Hormon benzeri etki gösteren veya hormon reseptörlerini etkileyen fiziksel, kimyasal etmenler endokrin bozucular olarak adlandırılmaktadır. Endokrin bozucular, östrojen, androjen, tiroid hormonu gibi hormonları taklit ederek hormonal yolların fazlaca uyarılmasını veya reseptör düzeyinde blokaj oluşturarak fonksiyonlarının değişimine yol açarlar. Pestisitler, tekstil ürünleri, yangın söndürücüler, plastikler, parfümler, deterjanlar, losyonlar, boyalar ve yemeklerde bile endokrin bozucu kimyasallara rastlanılmaktadır (3).

2.6. Bıldırcın Yumurtası

2.6.1. Bıldırcın yumurtası içeriği

Bıldırcın yumurtası, oldukça yüksek bir protein deposudur. İçeriğindeki besleyici maddelerin yoğunluğu nedeniyle yaygın olarak tüketilen tavuk yumurtasından daha yararlı olduğu iddia edilmiştir (22). Tavuk yumurtası ile karşılaştırıldığında, bıldırcın yumurtasında kolesterolün daha düşük (7) veya aynı miktarda olduğunu gösteren çalışmalar vardır (23).

2.6.2. Bıldırcın yumurtası tüketim durumu

Bıldırcın yumurtası tüketimi; Sayılı ve ark. yaptığı çalışmaya göre, Tokat ili kentte yaşayanlarda ortalama %45,83 olarak bulunmuştur. Aile başına bıldırcın yumurtası tüketim miktarı, genel ortalama 30.59 adet/yıl olduğu görülmüş. Kişi başına düşen bıldırcın yumurtası tüketimi ise genel ortalama 7,69 adet/yıl olarak tespit edilmiş. Aylık geliri 2000 TL'nin altında olanlarda kişi başı bıldırcın yumurtası tüketimi 6,14 adet/yıl iken, 2000 TL üzerinde olanlarda 9,72 adet/yıl olarak bulunmuş. Bıldırcın yumurtası temini ise %88 üzerinde süpermarketlerden temin edildiği belirtilmiş (8).

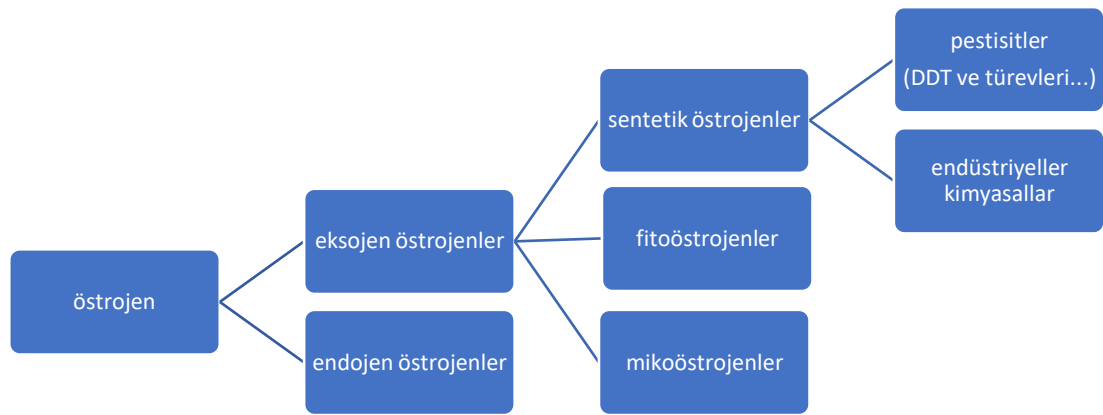
2.6.3. Bıldırcın yumurtası kullanımı

Bıldırcın yumurtası tüketiminin, çocukların bedensel ve zihinsel gelişimine yardımcı olduğu, bağışıklık sistemini güçlendirdiği, öksürük, grip, bronşit gibi hastalıkların, bıldırcın yumurtası tükettikten sonra kısa sürede geçtiği ve hastaların iştahlarının arttığı üreticiler tarafından iddia edilmektedir (22). Tamamlayıcı ve alternatif tıp uygulamaları ile uğraşanlar tarafından astımlı çocuklarda önerildiği bilinmektedir (24). Sayılı ve ark. yaptığı çalışmaya göre; katılımcıların %95.46'sı çocuklarının beyin gelişimine katkıda bulunması, bağışıklık sistemini güçlendirmesi ve vitaminden zengin olduğu düşüncesiyle bıldırcın yumurtası kullandıklarını ifade etmiştir (8).

2.7. Östrojenler

Östrojen, her iki cinste de üreme sistemin önemli hormonlarıdır. Östrojenin fazla olması meme, endometriyum, over ve prostat kanserine yol açarken,; eksikliği ise menapoz semptomlarına, kardiyovasküler hastalıklar ve osteoporoza yol açmaktadır. İnsanların ve hayvanların çeşitli hücrelerinden üretilen östrojene, endojen östrojen denir. Eksojen östrojen ise doğal kaynaklı ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılır. Doğal kaynaklı östrojenlerin, bitkiler tarafından üretilenine fitoöstrojen, mikroorganizmalar tarafından üretilenine mikoöstrojen denilmektedir. Sentetik östrojenler, kimyasal östrojen ve çevresel östrojen olarak iki gruba ayrılır. Kimyasal metotlar ile elde edilen östrojene kimyasal östrojen, çeşitli sanayi kolları tarafından çevreye yayılan ve östrojenik etki gösteren östrojen çevresel östrojen denir (Şekil-3).

Fitoöstrojenler son yıllarda hormon replasman tedavilerinde kullanılabilirliği, güvenilirliği ve etkinliği üzerine oldukça fazla çalışma vardır. Ksenobiyotikler, östrojenik etkiye sahip çevresel kirleticilerdir ve reproduktif organlar ve erkek fertilitesi üzerine olumsuz etkilere sahiptir. Ksenobiyotiklerin aksine, fitoöstrojenlerin menapoz semptomlarına karşı koruyuculuğu sağlık üzerine yararlı etkileri olduğunu düşündürmüştür (25).



Şekil-3: Doğada bulunan östrojen grupları (26)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bıldırcın yumurtasının puberteyi tetiklediği yönündeki, klinik gözlemlerimize dayanarak, hasta dosyaları tarandı ve anket çalışması yapıldı. Çalışma, 09.2020.386 protokol kodu ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'na onaylandı.

Çalışmanın hayvan deneyi kısmı, Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 09.07.2018 tarih ve 70.2018.mar protokol numarası ile etik yönden uygun bulunarak, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Başbüyük Yerleşkesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'nin SAG-C-TUP-130219-0049 proje no'lu kararı gereğince karşılandı.

3.1. Klinik Çalışma

3.1.1. Çalışma gruplarının seçimi

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi (MÜPEAH) Çocuk Endokrinoloji Polikliniğine başvuran ve başvuru şikayeti erken meme gelişimi (prematür telarş) olan, 6-8 yaş arasındaki 55 kız, çalışma grubu olarak belirlendi.

Kontrol grubu ise, MÜPEAH Çocuk Endokrinoloji Polikliniğinde tip 1 diyabetes mellitus tanısı ile izlenen, düzenli insülin kullanan, kan şekerleri kontrol altında olan, HbA1C düzeyleri diyabette olması istenilen düzeylerde olan, 6-8 yaş arası takibimizde olan ve pubertesi 8 yaşından sonra (normal zamanda) başlamış, toplam 54 hastadan oluşturuldu.

6 yaş öncesinde bıldırcın yumurtası kullanımı sorgulamak için ebeveynlere anket yapıldı ve hasta dosyaları incelendi. Çalışmaya katılmayı kabul eden kız çocukların veli/vasisinden aydınlatılmış onam belgesi alındı.

3.1.2. Çalışmaya dahil edilme ve çıkarılma kriterleri

Prematüre telarş grubu için;

Alınma kriterleri:

İdiopatik etyoloji

İlk başvurusu prematüre telarş olan

6-8 yaş arası takibimizde olan

Altta yatan hastalığı olmayan

Kız cinsiyet

Pubik kıllanması olmayan

Çıkarılma kriterleri:

Organik etyolojisi olan puberte prekoks olması

İlk başvurusu prematüre telarş olmaması

6-8 yaş arası takibimizde olmaması

Altta yatan hastalığı olması

Erkek cinsiyet

Pubik kıllanma olması

Kontrol grubu için;

Alınma kriterleri:

Tip 1 Diyabetes Mellitus hastası

İnsülinleri düzenli uygulayan

HbA1c düzeyleri kontrol altında olan,

6-8 yaş arası takibimizde olan

Pubertesi 8 yaşından sonra başlayan

Kız cinsiyet

Çıkarılma kriterleri:

İnsülinleri düzenli uygulamaması

HbA1c düzeyleri kontrol altında olmaması,

6-8 yaş arası takibimizde olmaması

Pubertesi 8 yaşından önce başlaması

Erkek cinsiyet

3.1.3. Verilerin toplanması

Hastaların dosyaları retrospektif olarak incelendi ve dosya verileri üzerinden demografik, klinik ve laboratuvar bilgileri elde edildi.

Ebeveynlerine anket soruları ile 6 yaşından önce bıldırcın yumurtası kullanım durumları ve kullanmışlarsa kullanma sıklıkları soruldu.

Kullanma sıklıkları;

- Az tüketim, yılda 10 adet ve altında kullanım
- Orta tüketim, ayda 3 ve üzeri kullanım veya yılda 10-20 adet ve 1 yıldan uzun süre kullanım
- Yoğun tüketim, haftada 3 ve üzeri kullanım veya ayda 10-20 adet ve 1 yıldan uzun süre kullanım olarak belirlendi.

Sayı ve ark. yapmış oldukları çalışmada, bıldırcın yumurtası kullanımını kişi başı 9,7 adet/yıl olarak bulmuşlar. Buradan yola çıkarak, az tüketim kriteri oluşturuldu (8).

3.2. Hayvan Deneyi Çalışması

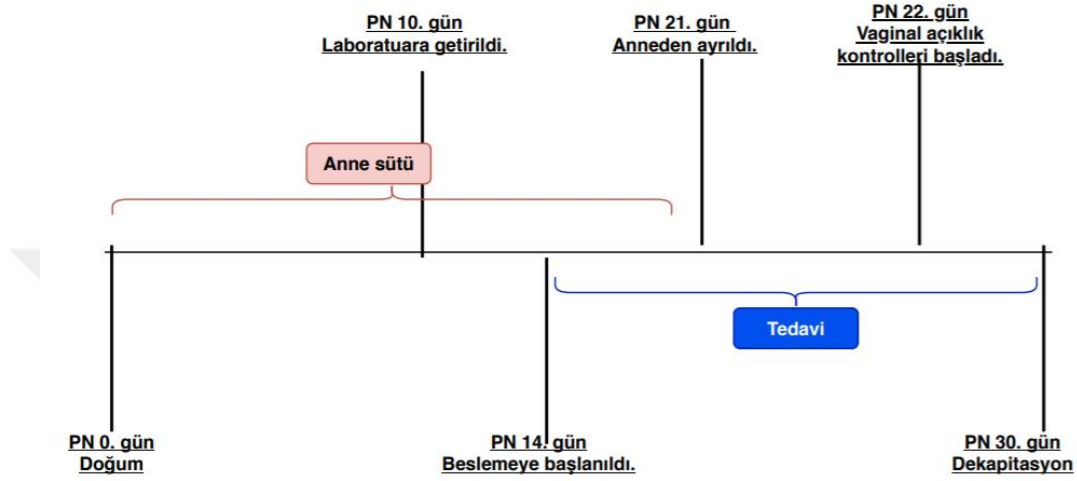
3.2.1. Ratların bakımı

Sprague-Dawley tipi albino 8 adet dişi rattan 36 dişi yavru temini sağlandı. Doğum sonrası ilk 10 günü, Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAMER)'nde tamamladıktan sonra Marmara Üniversitesi Başbüyük Yerleşkesi Fizyoloji Laboratuvarı'na getirildi. *Ad libitum* su ve standart yemin bulunduğu, 12 saatlik aydınlık ve karanlık döngülerle, sıcaklık (22 ± 2 ° C) ve bağıl nemin (65-70) uygun şartlarda sağlandığı klimalı bir odaya yerleştirildi. Deney, Mart-Nisan 2019 tarihlerinde Fizyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. ELİSA kitleri, Temmuz 2019'da Zeytinburnu Molgen Laboratuvarı'nda çalışıldı. Tüm deney protokolleri, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından onaylandı. Laboratuar hayvanlarının bakımı ve kullanımı için kılavuz bu çalışmada başarıyla kullanıldı.

3.2.2. Deney dizaynı

Doğdukları gün, postnatal 0. Gün olarak kabul edildi. Postnatal 10. gün laboratuvara getirildi. Postnatal 14. gün beslenmeye başlandı. Postnatal 21. gün sütten kesildiler ve anne ile erkek yavru ratlar ayrı kafeslere alındı. Aynı batından doğan dişi ratlar kendi kafeslerinde bakımlarına devam edildi. Postnatal 14. günde yavruların cinsiyeti

belirlendi ve dişiler işaretlendi. Postnatal 14. günden postnatal 30. güne kadar bütün ratlar bulunduğu gruba uygun şekilde beslendi. Her gün vücut ağırlıkları ve burun-kuyruk boy ölçümleri yapıldı. Postnatal 22. günden itibaren vaginal açıklık kontrol edildi. Postnatal 30. gün dekapitasyon yapıldı.



Şekil-4: Deney dizaynı

3.2.3. Grupların tayini

Yavru sayısı azaldıkça hayvanların ağırlığı artış gösterdiği için, yavru sayısı minimum 8-maksimum 12 olan gebe ratlar seçildi. Her annenin en az 2 dişi yavrusu olduğu görüldü. Random gruplara ayrıldı. İn utero ve postnatal çevresel faktörlerden etkilenmemesi amacıyla aynı anneden doğan ratlar, grup farkı gözetmeksizin aynı kafeste takip edildi.

Gruplar, aşağıdaki şekilde belirlendi.

Grup I (Su- Negatif kontrol): Su ile negatif kontrol grubu belirlenmiş ve bu gruptaki hayvanlara, oral gavaj ile her 10 gr vücut ağırlığına 0.1 mL olacak şekilde su verildi. Bildircin yumurtasının çözünürlüğü su ile sağlandığı için su ile negatif kontrol grubu oluşturuldu.

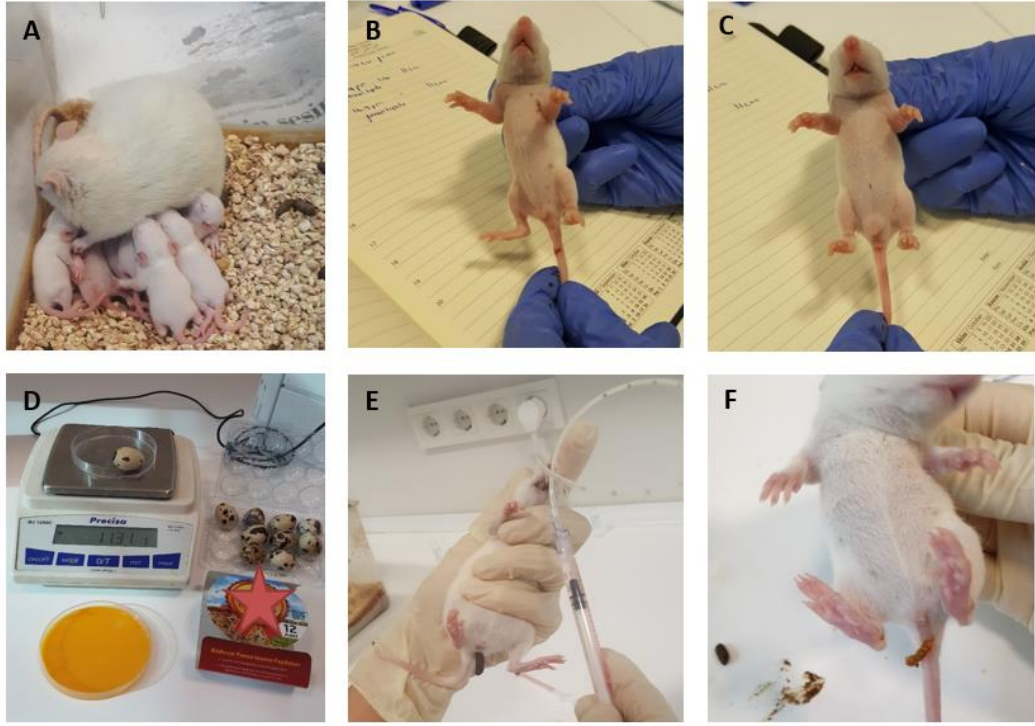
Grup II (Yağ- Negatif kontrol): Yağ ile negatif kontrol grubu belirlenmiş ve bu gruptaki hayvanlara, oral gavaj ile her 10 gr vücut ağırlığına 0.1 mL olacak şekilde sıvıyağ verildi. Pozitif kontrol grubuna verilen 17 β -estradiol çözünürlüğü yağ ile sağlandığı için yağ ile negatif kontrol grubu oluşturuldu.

Grup III (Bildircin yumurtası 300 mg/kg): Bildircin yumurtası 300 mg/kg grubu olarak belirlenen bu gruptaki hayvanlara, oral gavaj ile her 10 gr vücut ağırlığına verilecek olan 0.1 ml'lik solüsyonda 3 mg bildircin yumurtası ve geri kalanı su olacak şekilde hazırlanan solüsyon verildi.

Grup IV (Bildircin yumurtası 1000 mg/kg): Bildircin yumurtası 1000 mg/kg grubu olarak belirlenen bu gruptaki hayvanlara, oral gavaj ile her 10 gr vücut ağırlığına verilecek olan 0.1 ml'lik solüsyonda 10 mg bildircin yumurtası ve geri kalanı su olacak şekilde hazırlanan solüsyon verildi.

Grup V (Bildircin yumurtası 3000 mg/kg): Bildircin yumurtası 3000 mg/kg grubu olarak belirlenen bu gruptaki hayvanlara, oral gavaj ile her 10 gr vücut ağırlığına verilecek olan 0.1 ml'lik solüsyonda 30 mg bildircin yumurtası ve geri kalanı su olacak şekilde hazırlanan solüsyon verildi.

Grup VI (17 β -estradiol - Pozitif kontrol): 17 β -estradiol 50 mcg/kg grubu olarak belirlenen bu gruptaki hayvanlara, oral gavaj ile her 10 gr vücut ağırlığına verilecek olan 0.1 ml'lik solüsyonda 0,5 mcg bildircin yumurtası ve geri kalanı yağ olacak şekilde hazırlanan solüsyon verildi.



Şekil-5: Deney prosedürünün aşamaları. İlk 21 gün anne ve tüm yavruların aynı kafeste izlendi (A). PN 14. Günde yavruların cinsiyeti belirlendi. Dişiler üretra, vagen ve anüs açıklıkları olması ve memelerinin belirgin olması ile ayırt edildi ve kuyrukları işaretlendi (B). Erkeklerde vagen açıklığının olmaması ve memelerin olmaması ile ayırt edildi (C). Bıldırcın yumurtaları 11 ile 16 gr arası değişkenlik göstermekle birlikte, kabuğu kırılıp homojenize edildi ve dilüsyon su ile yapıldı (D). Orogastrik gavajla ağız içinde sola dayalı geçilerek sonda kesilmesi engellendi ve travmatize olmadan mideye ulaşıldı (E). Kanlı defekasyon (F), 3000 mg/kg grubundan ratta görüldü ve bu doz grubu deney dışı bırakıldı.

Orogastrik sonda ile beslenme yapıldı. Her gün vücut ağırlıkları ölçülerek, vücut ağırlıklarına göre beslenme yapıldı. Her 10 gr vücut ağırlığına 0.1 ml solüsyon verilmesi şekilde planlandı. Örneğin; 1000 mg/kg doz alacak olan hayvan, vücut ağırlığı 10 gr ise alacağı 0,1 ml'lik solüsyonda 10 mg yumurta içeriği olacak şekilde hesaplandı.

Bıldırcın yumurtası dozları, çocukların kilosu ve bıldırcın yumurtası gramajının oranına göre hesaplandı. Bir bıldırcın yumurtası ortalama 10-16 gramdır. Onbeş kilogram bir çocuk bir yumurta yerse 1000 mg/kg şeklinde ortalama doz bulundu ve alt ve üst limitler belirlendi.

Bıldırcın yumurtası, herkesin ulaşabileceği yaygın market zincirlerinden temin edildi. Pozitif kontrol grubuna ise 17 β -estradiol (E2) verilmesi planlanmış ve 50 mcg/kg olarak belirlenen doz literatürden elde edilmiştir (1).

Tablo-7: Deney grupları ve rat sayıları

Deney Grupları	Rat Sayıları
Grup I (Su-Negatif kontrol)	5
Grup II (Yağ-Negatif kontrol)	5
Grup III (Bıldırcın yumurtası 300 mg/kg)	8
Grup IV (Bıldırcın yumurtası 1000 mg/kg)	6
Grup V (Bıldırcın yumurtası 3000 mg/kg)	6
Grup VI (17 β -estradiol-Pozitif kontrol)	6

3.2.4. Deney dışı bırakma kriterleri

Orogastrik sonda ile besleme tekniğine bağlı olarak zarar gören hayvanlar ve düşkünlük, beslenememe, kilo kaybı gibi durumların gözlenmesi halinde ötenazi yapılarak deney dışı bırakıldı.

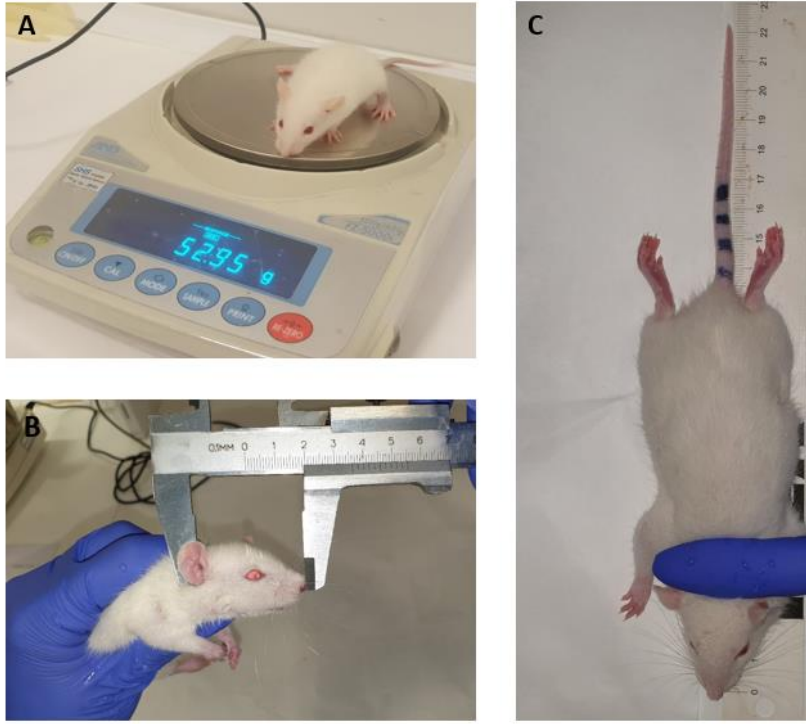
3.2.5. Ratların Antropometrik Ölçümleri

Tüm gruplarda yer alan sıçanların vücut ağırlıkları, burun-kuyruk boy uzunlukları deney süresince her gün ölçüldü ve kaydedildi.

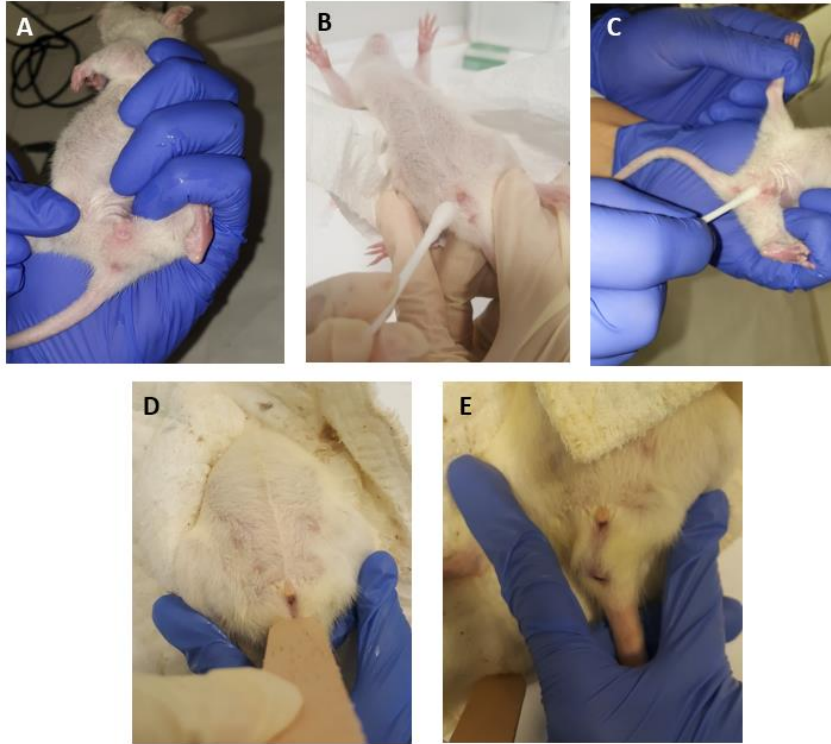
Dekapitasyon günü; vücut ağırlıkları, burun-kuyruk boy uzunlukları, burun-anüs boy uzunlukları, baş uzunlukları ölçüldü (Şekil-6).

3.2.6. Vajinal Açıklık Belirlenmesi

Dişi sıçanlarda vajinal açıklığın görülmesi veya ilk proöstrus dönemi puberteye giriş olarak kabul edilmektedir (17). Tüm gruplarda yer alan sıçanların 22. gününden itibaren vajinal açıklıklarının takibi yapıldı ve kayıt altına alındı (Şekil-7).



Şekil-6: Ratların antropometrik ölçümleri. Vücut ağırlığı (A), kafa uzunluğu (B), burun kuyruk uzunluğu (C) ölçümleri görülmektedir. Kafa uzunluğunu ölçmede kullandığımız kaliper B’de görülmektedir.



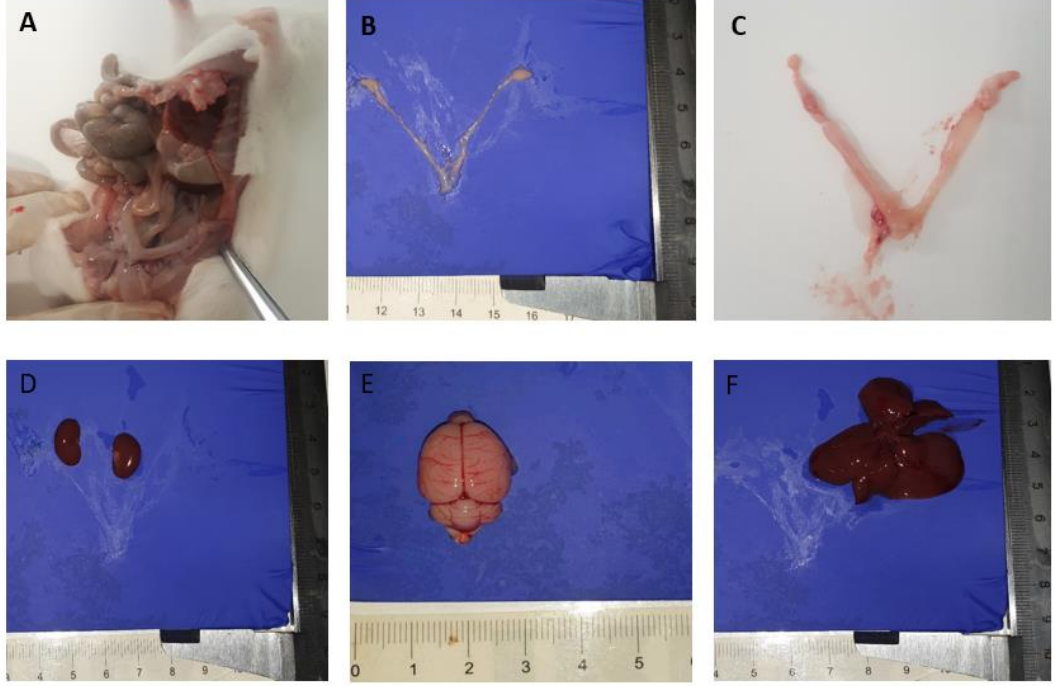
Şekil-7: Vaginal açıklık belirlenmesi ve smear alımı. Kapalı vagen görünümü (A), kapalı vagenden smear alımı (B), vagen içerisinde pamuk çubuğun angajmanı (C), açık vagen görünümü (D ve E).

3.2.7. Ratların Östrus Siklusu

Ratlarda menstrüel döngü, ortalama 4-5 gün sürmektedir ve bu döngü proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus evrelerinden oluşmaktadır. Hayvanların menstrüel döngüsü, vajinal smear yöntemi ile belirlendi (Şekil-7). Deneyin sonlandırılacağı gün sıçanlardan alınan smear örnekleri mikroskop altında incelendi. PN 30. günde ratlar dekapite edildi. Vajinal açıklık, normal şartlar altında 33 – 42. günlerde görülür (18). PN 30. günden sonra tüm ratların vaginal kanalı açılacağı için, normal şartlar altında beklenen süreden daha önce tüm ratların dekapite edilmesi planlandı.

3.2.8. Cerrahi İşlemler

Cerrahi işlemlere başlamadan önce hayvanlar hafif eter anestezisi altına alındı. Anestezi sağlandıktan sonra, dekapite edilerek Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) için 2-3 mL kadar kan alındı. İnsizyon yolu ile hayvanın karın bölgesi açıldı. Beyin, böbrekler, karaciğer, uterus ve over dokuları yağ dokularından arındırılarak alındı ve ayrı ayrı tartılarak kaydedildi (Şekil-8). Ardından bu dokuların fiksasyon işlemleri gerçekleştirildi.



Şekil-8: Organların diseksiyonu. Organların batın içerisindeki yerleşimi (A), negatif kontrol grubunun uterusu (B), östrojen grubunun uterusu (C), böbrekler (D), beyin (E), karaciğer (F) ile gösterilmiştir.

3.2.9. Histolojik değerlendirme

Serum fizyolojik ile nemlendirilmiş pamuklu çubukla sıçanlardan vajinal sürüntü örnekleri alındı ve temiz bir lama aseptik şekilde yayıldı. İşlem sırasında her hayvan için ayrı pamuklu çubuk, lam ve lamel kullanıldı. Sıçanlara ait örnekler havada kurutulduktan sonra Giemsa boyası ile boyandı. Distile su ile yıkanan örnekler entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlarda vajinal epitel hücreleri ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Tokyo, Japonya) altında x20/x40 büyütme ile incelendi. Vajinal epitel hücrelerini tanımlamak amacıyla Cora ve ark. tarafından belirtilen kriterler kullanıldı (27).

Tüm gruplardan alınan overdokuları %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde 72 saat fikse edildi. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildikten sonra dokular ksilene alınarak şeffaflanmaları tamamlanana kadar bekletildi. Ardından doku örnekleri 60°C'lik etüvde bulunan sıvı parafinde 4 saat bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde bloklandı. Over doku parafin bloklarından yaklaşık 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Morfolojik değerlendirme ve

folikül sayımı amacıyla kesitler Hematoksilen ve Eosin (H&E) boyası ile boyandı. H&E boyası ile boyanan kesitlerde primordiyal/primer, preantral, antral ve preovulatuvar foliküller sayıldı. Dejenere olan foliküller not edildi. Folikül sayımında Plowchalk ve ark. tarafından modifiye edilen Pederson ve Peters sınıflaması kullanıldı (28, 29). Kesitlerden x4 objektif ile çekilen fotoğraflarda Image J programı kullanılarak over alanı hesaplandı.

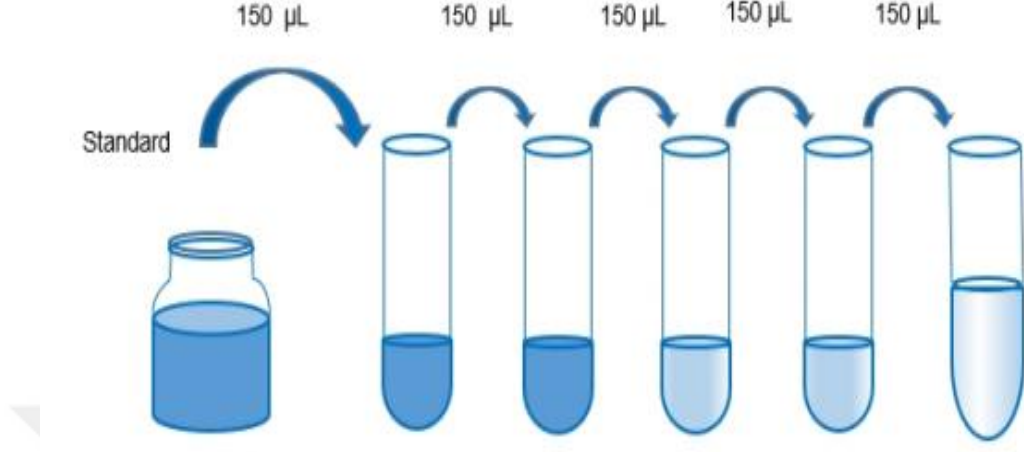
Tüm gruplardan alınan uterus dokuları %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde 48 saat fikse edildi. Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildikten sonra dokular ksilene alınarak şeffaflanmaları tamamlanana kadar bekletildi. Ardından doku örnekleri 60°C'lik etüvde bulunan sıvı parafinde 3 saat bekletildikten sonra gömme cihazı ile kasetler içerisinde bloklandı. Uterus doku parafin bloklarından yaklaşık 4 µm kalınlığında kesitler alındı ve H&E boyası ile boyandı. Epitel uzunluğu, stroma kalınlığı, myometrium kalınlığı Image J programı kullanılarak ölçülüp kesitte görülen gland yapıları sayıldı. Ayrıca uterus kavite alanı Image J kullanılarak hesaplandı.

3.2.10. Biyokimyasal değerlendirme

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi antijen veya antikor taramasında kullanılan serolojik testlerden biridir. Bu yöntem, özgül antijen antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim substratı kullanılarak renk oluşumu esasına dayanan bir testtir. Elimizde neye özgü olduğunu bildiğimiz antijen ile örneklerdeki antikoru, tipini ve miktarını saptayabiliriz. Eğer elimizde antikor var ise antikora özgü olan antijeni ve miktarını ölçebiliriz. Bu yöntem ile serumdan LH, FSH, östradiyol, leptin, IGF-1, kolesterol, LDL, kreatinin düzeyleri çalışıldı.

ELISA için, aprotinin içeren tüplere (BD, A.B.D) her bir hayvandan yaklaşık 2-3 mL kan alınmıştır. Daha sonra alınan kanlar 10.000 devir hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan serum kısmı; her bir ependorf tüpe yaklaşık 200 µL içerecek şekilde ayrılmış ve -80 °C'de ELISA yapılana kadar muhafaza edildi.

-80°C'den çıkarılan örnekler önce -20°C'ye daha sonra +4°C'ye alınarak serumların kademeli olarak çözünmesi sağlandı.



Şekil-9: Standartların dilüsyonu

3.2.10.1. Standartların hazırlanması

Her tüpe 150 µL Standart Diluent eklendikten sonra; stok standart tüpünden 150 µL seri dilüsyon ile görseldeki gibi dağıtıldı. Her aşamadan önce pipetaj yapılarak eşit dağılması sağlandı (Şekil-9).

3.2.10.2. Yıkama solüsyonu

30X Yıkama solüsyonu distile su ile 1X olacak şekilde dilue edildi ve yıkama aşamalarında bu solüsyon kullanıldı.

3.2.10.3. Assay prosedürü

1-Çalışmaya başlamadan önce tüm gerekli reaktifler kitin protokolüne uygun olarak hazırlandı.

2-Hazırlanan standart tüplerinden belirlenen kuyulara 50 µL standart eklendi.

3-Örneklerin test edileceği kuyulara 40 µL sample diluent eklendi. Aynı kuyulara 10 µL örnek eklendi. Blank olarak belirlenen kuyu boş bırakıldı.

4-Plate bir sealer ile kapatılarak ve 37 ° C'de 45 dakika inkübe edildi.

5-İnkübasyon sonrasında tüm kuyulardaki örnekler aspire edildi. 250 µL yıkama solüsyonu ile 5 kere yıkama yapıldı. 5. yıkama sonrasında plate bir filtre kağıdı üzerine ters çevirilerek plate kalan yıkama solüsyonundan arındırıldı.

6-Blank kuyusu hariç, tüm kuyulara 50 µL HRP-Konjugat saptama antikoru eklendi.

- 7-Plate yeni bir sealer ile kapatıldı ve 37 ° C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 8-Yıkama işlemi 5. adımdaki gibi beş kez tekrarlandı.
- 9-Her kuyuya 50 µL kromojen A çözeltisi ve arkasından 50 µL bir kromojen B çözeltisi eklendi.
- 10-Hafifçe karıştırıldı ve 15 dakika boyunca 37 ° C'de inkübe edildi. Bu aşamada ışıktan korundu.
- 11-İnkübasyon sonrası her kuyuya 50 µL Stop Solution eklendi. Kuyulardaki rengin maviden sarıya değişimi gözlemlendi.
- 12-On- on beş dakika içerisinde, Optik Yoğunluğu (O.D.), 450 nm'de Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™) kullanarak okuma yapıldı.
- 13-Standard eğri dört parametrelili lojistik (4-PL) ile oluşturuldu ve örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.11. Lipit peroksidasyon-malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) ölçümü

Oksijen serbest radikalleri, hücre membranı yapısındaki lipitlerinin peroksidasyonuna yol açar. Lipit peroksit, otokatalitik zincir reaksiyonunu stimüle ederek; ciddi membran, organel ve hücre hasarına yol açar. Lipit peroksidasyonun en bilinen son ürünü MDA'dır. Biz de çalışmamızda, karaciğer ve böbrek dokularındaki MDA'yı ölçerek lipit peroksidasyonu değerlendirmeyi hedefledik.

Her hayvandan alınan karaciğer ve böbrek doku örnekleri -20°C'lik derin dondurucularda MDA ve GSH düzeyleri ile myeloperoksidaz (MPO) aktivitelerinin değerlendirilmesi için saklanıp, dokular Ultra Turrax doku homojenizatörü kullanılarak buzda bekletilmiş trikloroasetik asit (1 g doku başına 10 ml %10 TCA) ile homojenize edildi.

Lipid peroksidasyonu ürünlerinin düzeyinin incelenmesi için MDA seviyeleri tiobarbitürik asit reaktif madde oluşumu gözlemlenerek ölçümü yapıldı. Lipid peroksidasyonu, $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tükenme katsayısı kullanılarak MDA cinsinden açıklanıp sonuçlar nmol MDA/gram doku cinsinden belirtildi.

Glutatyon seviyeleri modifiye Ellman prosedürü kullanılarak ölçüldü. 4°C'de 10000 devir/dk'lık santrifüjde 10 dakika santrifüj edildikten sonra 0.5 ml'lik süpernatantın 2 ml'lik 0.3 mol/l Na₂HPO₄·2H₂O solüsyona eklendi. DTNB (0,4 mg/ml %1 sodyum

sitrat)’den 0.2 ml’lik bir solüsyon da başta hazırlanan solüsyona eklenmesinden hemen sonra 412 nm absorbans değerinde ölçümü yapıp GSH seviyeleri tükenme katsayısı olan $1.36 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ’de hesaplandı ve sonuçlar GSH/g cinsinden belirtildi.

3.2.12. İstatistiksel Analiz

Her iki çalışma sonunda elde edilen veriler, GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak değerlendirildi. Veriler, ortalama $\pm$ standart hata (ort $\pm$ SH) olarak ifade edilip, in vivo rat çalışması verilerin analizinde One-Way ANOVA ve student’s t testleri, klinik çalışmada ise Kikare ve student’s t test kullanıldı. Tüm analizlerde, p değerinin 0.05’den az olduğu durumlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Çalışma Verileri

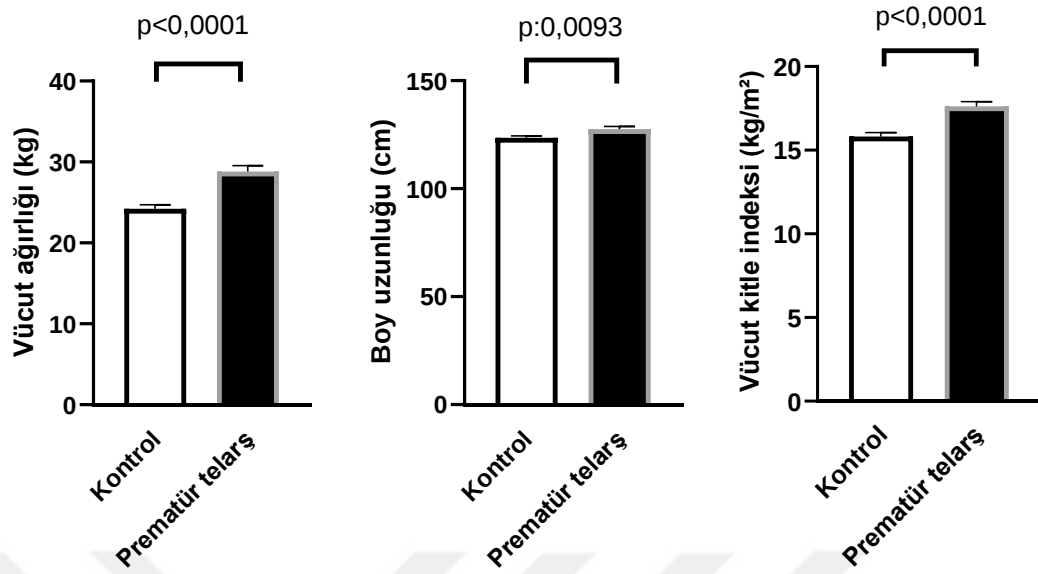
İzole prematür telarş ile başvuran hastaların başvuru yaşları ortalaması 7 yaş 2 ay olarak saptandı. Kontrol grubu hastalarında düzenli takipleri 3 ayda bir olduğu için 7 yaş 2 ay $\pm$ 2 ay sırasındaki verileri analize alındı.

Tablo-8: Prematür telarş ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	Kontrol grubu (n=54)	Prematür telarş grubu (n=55)
Başvuru yaşı / değerlendirme yaşı (yıl)	7 yaş 2 ay $\pm$ 2 ay	7 yaş 2 ay
Kilo (kg)	24,21 $\pm$ 0,51	28,82 $\pm$ 0,71 *
Boy (cm)	123,6 $\pm$ 0,88	127,6 $\pm$ 1,22 *
Vki (kg/m²)	15,81 $\pm$ 0,24	17,62 $\pm$ 0,28 *
Doğum kilosuna (g)	3173 $\pm$ 76,8	3071 $\pm$ 86
Kemik yaşı (yıl)		8,9 $\pm$ 0,23
Anne menarş yaşı (yıl)		12,4 $\pm$ 0,18
Başvurudaki meme tanner evreleri (n)	Evre 1: 54 (%100) Evre 2: 0 Evre 3: 0 Evre 4: 0 Evre 5: 0	Evre 1: 0 Evre 2: 9 (%16,4) Evre 3: 38 (%69,1) Evre 4: 8 (%14,5) Evre 5: 0

Student t testi. Değerler, standart hata ile verilmiştir.

*p değeri <0,05 anlamlıdır.



Şekil-10: Sırasıyla vücut ağırlığı, boy uzunluğu ve vücut kitle indeksi verilerine göre, aynı yaştaki kontrol ve prematür telarş gruplarının karşılaştırması

Prematür telarş grubunun kilosunun, boyunun ve vücut kitle indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazla olduğu görüldü (Şekil-10).

Prematür telarş grubunun kemik yaşı ortalaması $8,9 \pm 0,23$ olmakla birlikte, takvim yaşından ileridir (Tablo-8).

Prematür telarş grubunun doğum kilolarının ortalaması 3071 ± 86 g, kontrol grubunun $3173 \pm 76,8$ olarak saptanmış olup, anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo-8).

Prematür telarş grubunun anne menarş yaşı 12,4 saptandı (Tablo-8).

Prematür telarş grubunun %16,4'ünün evre 2, %69,1'ünün evre 3, %14,5'inin evre 4 meme gelişimi olduğu, hepsinin pubik kıllanma açısından evre 1 olduğu anlaşıldı (Tablo-8).

Prematür telarş grubunun %60'ını, kontrol grubunun ise %27,8'inin hayatlarının bir döneminde bıldırcın yumurtası yediği belirlendi (Şekil-11). Az tüketenler, kontrol grubunda %20,4 iken; prematür telarş grubunda %18,2 idi. Orta düzeyde tüketim kontrol grubunda %7,4 iken; prematür telarş grubunda %21,8 idi. Yoğun tüketim kontrol grubunda hiç yokken, prematür telarş grubunda %20 olarak saptandı (Tablo-9). Bıldırcın yumurtası tüketiminin, prematür telarş üzerine etkisinin istatistiki olarak anlamlı olduğu saptandı ($p:0,008$) (Şekil-11, Tablo-9).

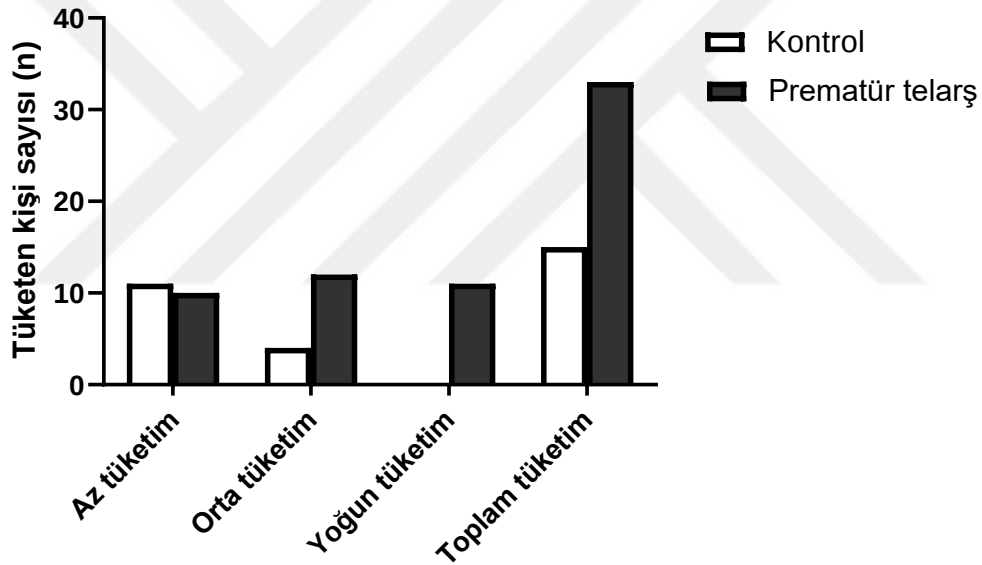
Tablo-9: Prematür telarş ve kontrol grubunun bildirgin yumurtası kullanım durumu

Bildircin yumurtası kullanım durumu	Kontrol grubu (n:54)		Prematür telarş grubu (n:55)	
	Sıklık	Yüzde (%)	Sıklık	Yüzde (%)
Hiç tüketmeyen	39	%72,2	22	%40
Az tüketim	11	%20,4	10	%18,2
Orta tüketim	4	%7,4	12	%21,8
Yoğun tüketim	0	%0	11	%20
Toplam	54		55	

*Az tüketim, yılda 10 adet ve altında kullanım

*Orta tüketim, ayda 3 ve üzeri kullanım veya yılda 10-20 adet ve 1 yıldan uzun süre kullanım

*Yoğun tüketim, haftada 3 ve üzeri kullanım veya ayda 10-20 adet ve 1 yıldan uzun süre kullanım olarak belirlendi.



Şekil-11: Kontrol ve prematür telarş grubunun az, orta ve yoğun bildirgin yumurtası tüketim durumunun karşılaştırması. Ki-kare test, p:0,008.

4.2. Hayvan Deneyi Çalışması Verileri

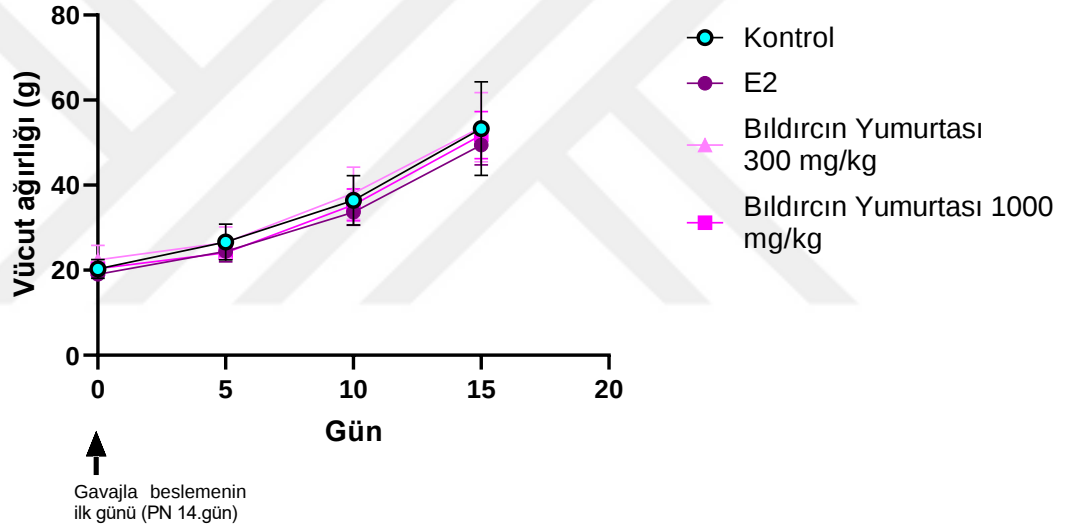
4.2.1. Genel toksisite

Bildircin yumurtası 3000 mg/kg doz ile beslenen ratlarda, diğer ratlarda görülmeyen diyare, kanlı dışkılama ve ölüm gözlemlendi. Farklı zamanlarda farklı kafeslerdeki 2 rat PN 22. günde ölü bulundu. Bir başka ratta, PN 22. Gün diyare gözlemlendi. Bir

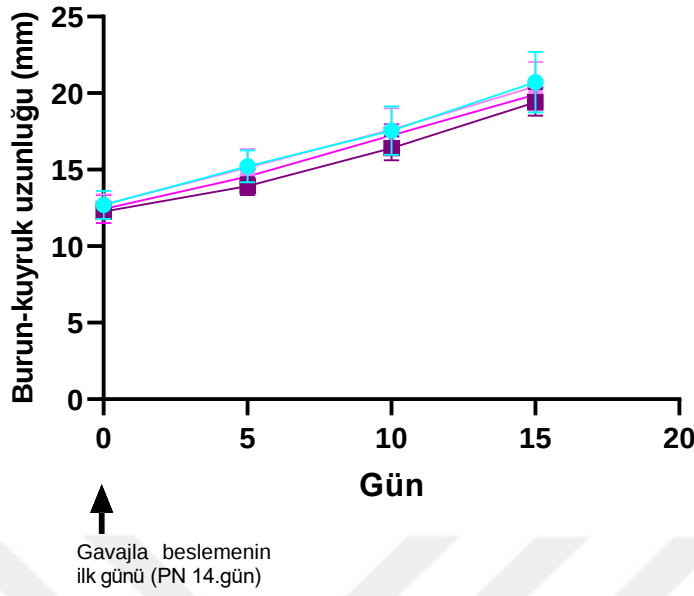
diğer ratta ise anüsünün kanlı olduğu kanlı dışkılaması olduğu görüldü. Bu sebeple, 3000 mg/kg'ın toksik doz olduğu düşünöldü ve bu grup deney dışı bırakıldı. Bıldırcın yumurtası 300 mg/kg ile beslenen bir ratta gavajla besleme tekniğine bağı sağ kolda hemiparezi gözlemlenmesi üzerine ötenazi gerçekleştirildi.

4.2.2. Vücut Ağırlığı ve Büyümenin Değerlendirilmesi

PN 14. günden itibaren gavajla beslenmenin başlanması itibari ile her gün bakılan vücut ağırlığının günlere göre arttığı ancak artışların gruplar arası anlamlı olmadığı görüldü (p: 0,9986) (Şekil-12).



Şekil-12: Orogastrik gavajla beslenmenin ilk günü (PN 14. gün)'nden itibaren her gün ölçölen vücut ağırlıklarının 5 gün aralıklarla karşılaştırılması



Şekil-13: Orogastrik gavajla beslenmenin ilk günü (PN 14. gün)’nden itibaren her gün ölçülen burun-kuyruk uzunluğunun 5 gün aralıklarla karşılaştırılması

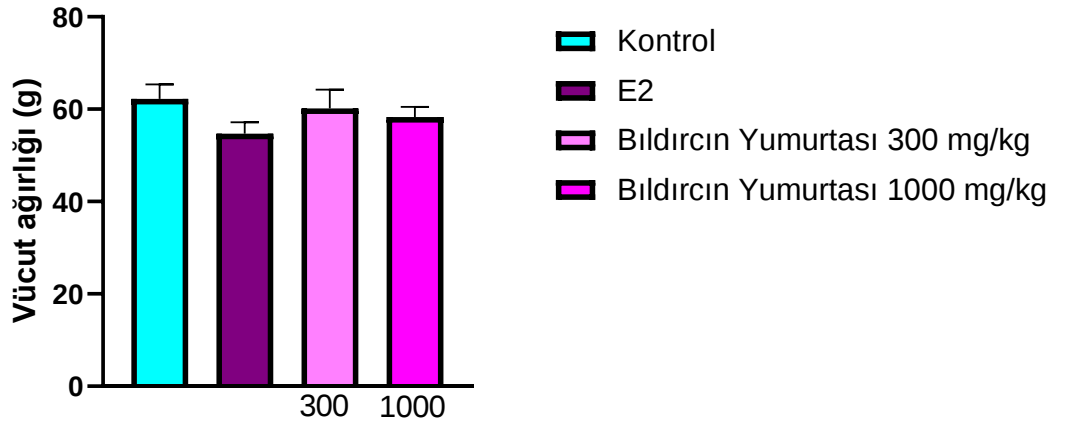
PN 14.günden itibaren gavajla beslenmenin başlanması itibari ile her gün bakılan burun-kuyruk uzunluğunun gün gün artış gösterdiği ancak gruplar arası anlamlılık olmadığı görüldü (p: 0,9921) (Şekil- 13).

Dekapitasyon günü yapılan vücut ağırlığı, kafa uzunluğu, burun-kuyruk uzunluğu, burun-anüs uzunluğu gibi antropometrik ölçümlerde gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo-10, Şekil-14, Şekil-15).

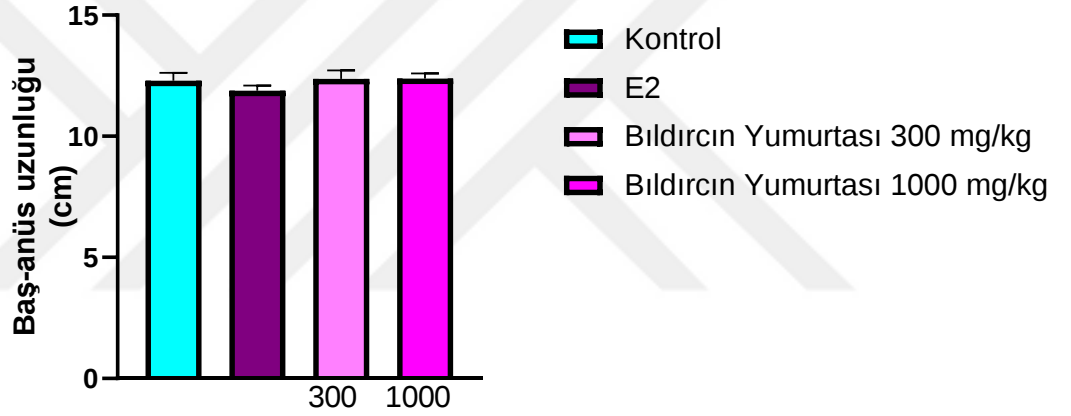
Tablo-10: Dekapitasyon günü yapılan antropometrik ölçümler

Dekapitasyon günü antropometrik ölçümler	Kontrol (n=10)	E2 (n=6)	BY 300 mg/kg (n=8)	BY 1000 mg/kg (n=6)
Vücut ağırlığı (g)	62,24 ±3,13	54,67 ±2,50	60,19 ±4,04	58,30 ±2,19
Kafa uzunluğu (cm)	3,30 ±0,059	3,38 ±0,054	3,47 ±0,086	3,40 ±0,057
Burun-kuyruk uzunluğu (cm)	21,41 ±0,732	20,27 ±0,472	21,13 ±0,532	20,83 ±0,270
Burun- anüs uzunluğu (cm)	12,29 ±0,334	11,88 ±0,215	12,36 ±0,353	12,38 ±0,216

One-way ANOVA test



Şekil-14: Vücut ağırlığının gruplara göre karşılaştırılması (p:0,4397)



Şekil-15: Baş-anüs uzunluğunun gruplara göre karşılaştırılması (p:0,7195)

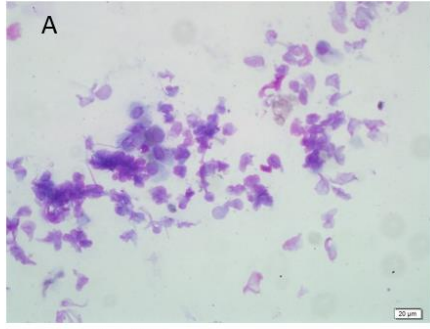
4.2.3. Vaginal açıklık zamanı

Pozitif kontrol grubu olan östrojen alan grubun hepsinde PN 25. günde vaginal açıklık görüldü. BY 300 mg/kg grubundan 2 rat ve yağ grubundan 1 ratta PN 26. günde, yağ grubundan başka bir ratta PN 30. Günde vaginal açıklık görüldü. Diğer gruplarda vaginal açıklık gözlemlenmedi.

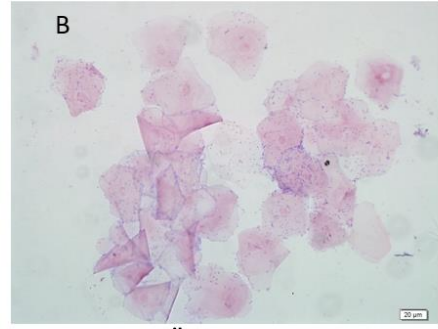
4.2.4. Vaginal smear değerdendirilmesi

4.2.4.1. Tüm lam değerdendirmesi

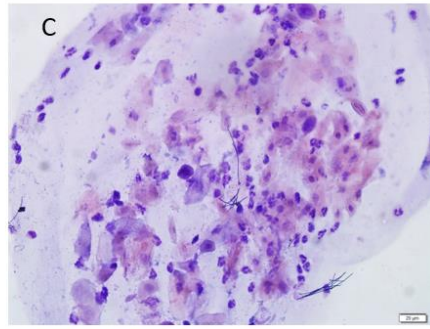
Tüm lam hücreleri sayıldı ve östrus siklus evrelemesi için değerdendirildi. Vaginal açıklık görülen ratların sikluslarının evreleri net olarak belirlendi (Şekil-16). Ancak vaginal açıklığı görülmeyen özellikle su ile negatif kontrol oluşturulan grubun selülaritesinin oldukça az olması ve belirli bir hücre hakimiyeti olmamasıyla birlikte prepubertal olduğu düşünöldü (Şekil-17). Proöstrus evresinde parabazal hücre ve intermediyer hücrelerin hakim olduğu, östrus evresinde ise selülarite yoğun ve bol miktarda çekirdeğini kaybetmiş kornifiye hücrelerin hakim olduğu, metöstrus evresinde ise zeminin kirli, mukuslu, selülaritenin yoğun, kornifiye hücre ve lökosit hakimiyetinin olduğu, diöstrus evresinde selülarite az, lökosit hakimiyetinin olduğu bilinmektedir. Smear değerdendirmesinde BY 300 mg/kg ve 1000 mg/kg gruplarının proöstrusa girdikleri ve kornifiye hücrelerin çekirdeklerinin yapısı ve çekirdeklerini henüz kaybetmemiş olma durumu ile östrus sikluslarının yeni başladığı düşünöldü. E2 grubunun ise, tüm hücrelerinin çekirdeğini kaybetmiş kornifiye hücreler olması ile östrusta olduğu göröldü. Yağ ile oluşturulan negatif kontrol grubunun ise hücre hakimiyetinin lökositlerde olduğu saptandı.



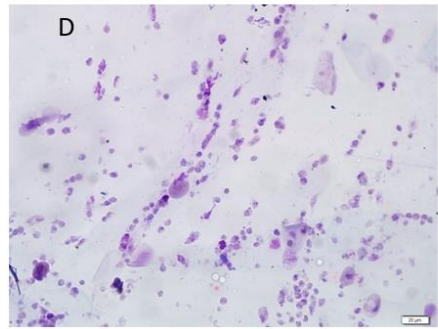
Proöstrus



Östrus

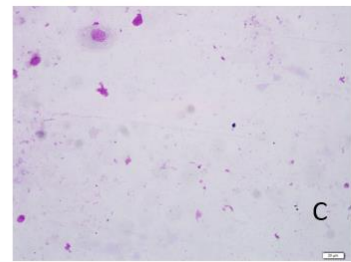
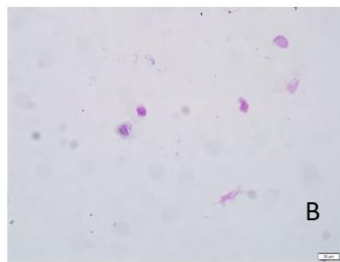
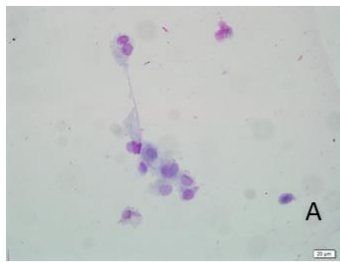


Metöstrus



Diöstrus

Şekil-16: Östrus siklusunun evreleri (x400). BY 300 mg/kg grubuna ait bir ratın smear görünümü (A) olan *Proöstrus* evresinin, parabazal hücre ve intermediyer hücrelerden oluştuğu görülmektedir. Östrojen grubundan bir ratın smearında (B) görülen *Östrus* evresinde ise selülarite yoğun ve bol miktarda çekirdeğini kaybetmiş kornifiye hücreler hakimdir. Östrojen grubundaki bir başka ratın smearında (C) gördüğümüz *Metöstrus* evresinde ise zeminin kirli, mukuslu, selülaritenin yoğun, kornifiye hücre ve lökosit hakimiyetinin olduğu görülmektedir. Yağ grubundan bir ratın smearında (D) görülen *Diöstrus* evresinde selülarite az, lökosit hakimiyetinin olduğu görülmektedir.



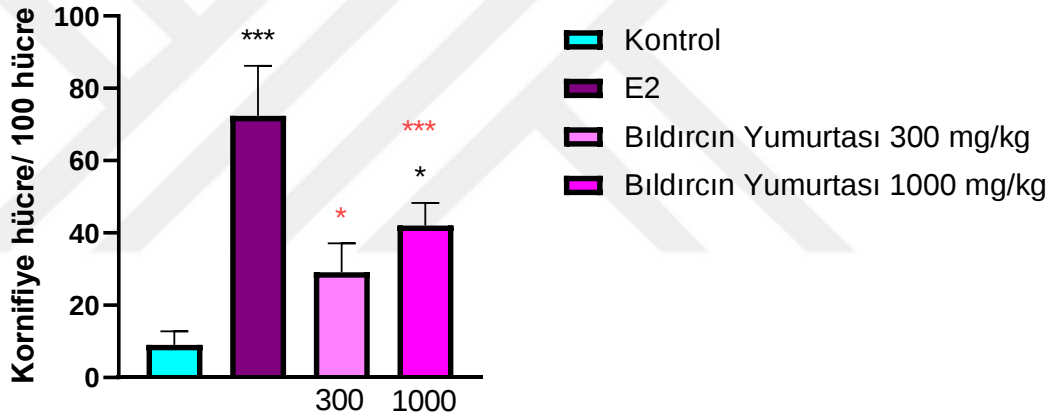
Şekil-17: Kontrol grubunun smear görüntüleri (x400). Selülaritenin oldukça az, küçük boyutlardaki epitel hücreleri, parabazal hücreler ve intermediyer hücrelerin olduğu prepubertal görünüm.

4.2.4.2.Rastgele 100 hücre sayımı

Rastgele 100 hücre sayımı yapılarak, hâkim hücre grupları belirlendi. Östrojenik aktivite belirtisi olan kornifiye hücre sayısının oranı belirlendi (30). Gruplar arası anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0,0001$). Kornifiye hücre en fazla E2 grubunda görüldü. Kontrole göre, 300 mg/kg ve 1000 mg/kg doz gruplarında doz bağımlı artış olduğu görüldü (p değerleri sırasıyla 0,0323 ve 0,0004) (Şekil-18).

Kornifiye hücre oranı =

$$\frac{\text{kornifiye hücre sayısı}}{\text{kornifiye hücre sayısı} + \text{çekirdekli hücre sayısı} + \text{lökosit sayısı}} \times 100$$



Şekil-18: Rastgele 100 hücre sayımında kornifiye hücre oranları

4.2.5. Organ Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Beyin, böbrek, karaciğer, over ve uterus ağırlıkları ölçülerek vücut ağırlıklarına oranlandı. Rölatif beyin, böbrek ve karaciğer organ ağırlığı bakımından kontrol ve deney grupları arasında fark yok iken, rölatif uterus ve over ağırlığının deney gruplarında anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü (Tablo-11).

Tablo-11: Organ ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması

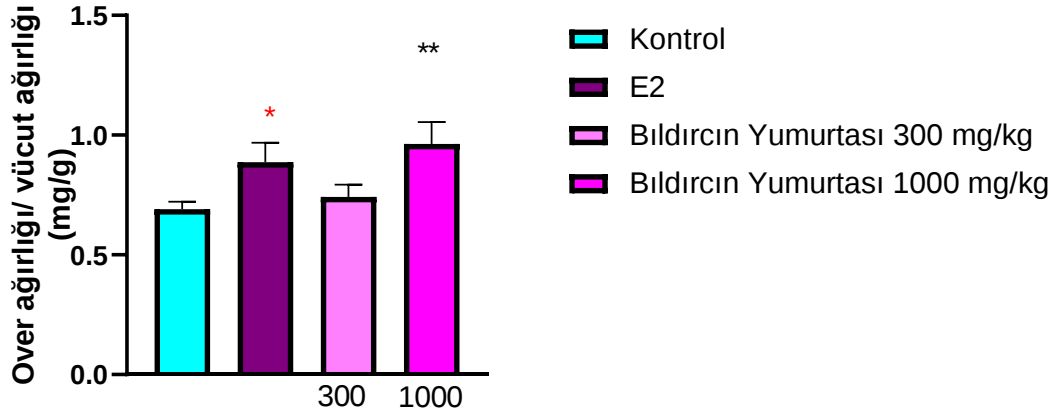
Organ ağırlığı/vücut ağırlığı	Kontrol (n=10)	E2 (n=6)	BY 300 mg/kg (n=8)	BY 1000 mg/kg (n= 6)
Over ağırlığı (g /vücut ağırlığı)	0,69 ±0,032	0,88 ±0,081*	0,74 ±0,051	0,96 ±0,0908**
Uterus ağırlığı (g/vücut ağırlığı)	1,006 ±0,089	2,66 ±0,274 ***	1,43 ±0,084 **	1,42 ±0,108 *
Beyin ağırlığı (g/vücut ağırlığı)	21,31 ±1,995	20,93 ±0,810	19,99 ±1,088	21,09 ±0,671
Böbrek ağırlığı (g/vücut ağırlığı)	10,37 ±0,274	9,787 ±0,133	10,45 ±0,273	11,20 ±0,301
Karaciğer ağırlığı (g/vücut ağırlığı)	43,90 ±1,026	44,94 ±0,873	45,86 ±1,202	45,65 ±1,009

One-way ANOVA test ve Student t test.

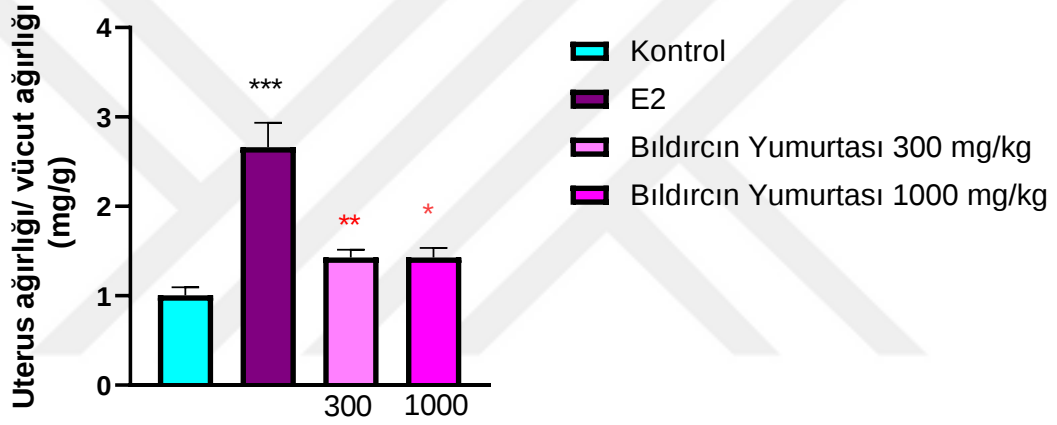
One-way ANOVA test’de *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 anlamlılık göstermektedir. Student’s t testteki *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 anlamlılığını göstermektedir.

Rölatif over ağırlığının, 1000 mg/kg grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü (p:0,012). E2 grubunda ise kontrole göre anlamlı olarak daha fazla olduğu saptandı (p:0,0197) (Şekil-19).

Rölatif uterus ağırlığının, östrojen grubunda diğer gruplara göre anlamlı farklılık gösterdiği görüldü (p<0,001). E2 grubunun rölatif uterus ağırlığı diğer gruplardan daha fazladır. 300 mg/kg ve 1000 mg/kg doz grupları kontrolle kıyaslandığında kontrol grubundan daha ağır oldukları görüldü (p değerleri sırasıyla 0,0039, 0,0107) (Şekil-20).



Şekil-19: Over ağırlığı/vücut ağırlığının gruplar arası karşılaştırılması



Şekil-20: Uterus ağırlığı/vücut ağırlığının gruplar arası karşılaştırılması

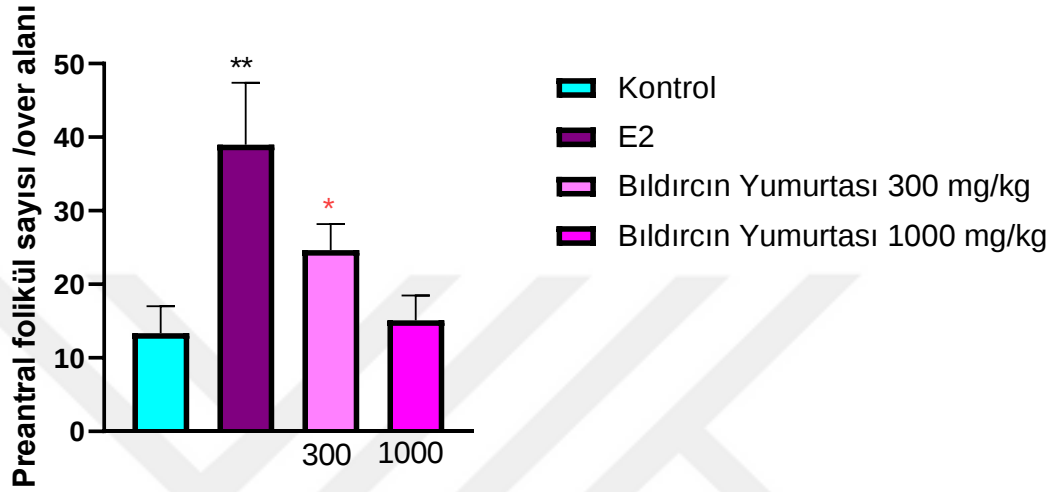
4.2.5. Over Histolojisi

Primordiyal folikül, preantral folikül, antral folikül sayıları, ölçülen over alanına oranlanarak değerlendirildi. Toplam preantral folikül sayısı ise preantral ve dejenere preantral folikül sayısının toplamını ifade etmektedir. Toplam antral sayısı ise antral, dejenere antral ve oositi olmayan antral folikül sayısının toplamını belirtmektedir.

Korpus luteum, hiçbir preparatta görülmedi.

Graff folikül (preovulatuvar folikül) her grupta bir ratta görülmekte ve her preparattaki sayı 1 ve 3 arası değiştiği görüldü. Her grupta bir ratta görüldüğü için istatistiki değerlendirmeye alınmadı.

Preantral folikül sayısı, gruplar arası karşılaştırmada sadece östrojen grubunda anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü (p:0,0044) (Şekil-21). Doz grupları kontrol ile karşılaştırıldığında; 300 mg/kg grubunun kontrole göre preantral folikül sayısında anlamlı artış olduğu anlaşıldı (p: 0,0444) (Şekil-21).



Şekil-21: Birim mm² over alanına düşen preantral folikül sayısının gruplar arası karşılaştırması

Toplam preantral folikül sayısında ise, gruplar arası karşılaştırmada sadece östrojen grubunda anlamlılık saptandı (p:0,0005) (Tablo-12).

Tablo-12: Birim mm² over alanına düşen folikül sayılarının gruplar arası karşılaştırması

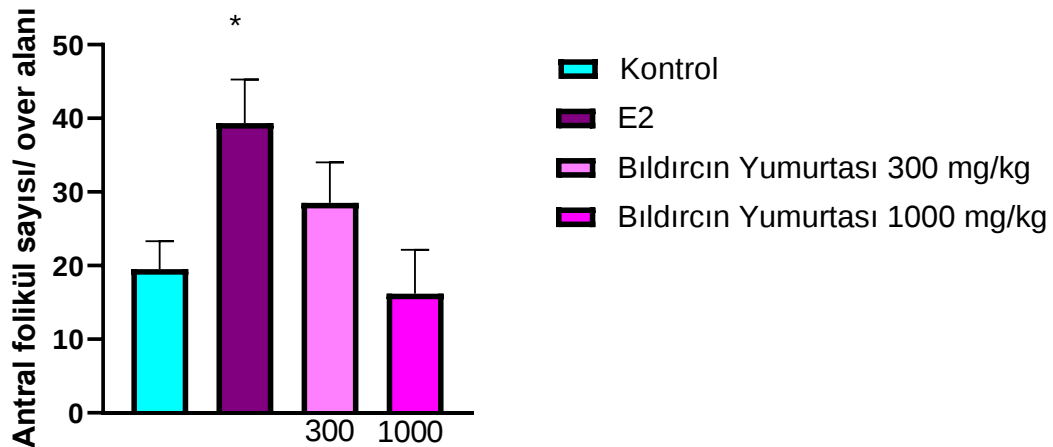
Sayı /over alanı (mm ²)	Kontrol (n=10)	E2 (n= 6)	Bıldırcın Yumurtası - 300 mg/kg (n=8)	Bıldırcın Yumurtası - 1000 mg/kg (n=6)
Primordiyal folikül	87,78 ±22,98	171,4 ±36,56	124,1 ±25,95	113,5 ±31,97
Preantral folikül	13,34 ±3,66	38,96 ±8,43**	24,66 ±3,54*	15,09 ±3,37
Antral folikül	19,53 ±3,79	39,34 ±5,94*	28,52 ±5,49	16,19 ±5,96
Toplam preantral folikül	26,61 ±8,18	69,71 ±7,56***	41,34 ±5,14	21,73 ±3,06
Toplam antral folikül	55,42 ±6,25	77,41 ±13,79	61,67 ±7,60	68,01 ±11,98

One-way ANOVA test ve Student's t test.

One-way ANOVA test'de *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 anlamlılık göstermektedir.

Student's t testteki *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 anlamlılığını göstermektedir.

Antral folikül sayısında ise, östrojen grubunda diğer gruplara göre anlamlı artış olduğu görüldü (p: 0,028) (Şekil-22). Doz grupları, kontrolle karşılaştırıldığında 300 mg/kg grubunda sayı olarak artış görülse de istatistiki olarak anlamlı fark saptanmadı.

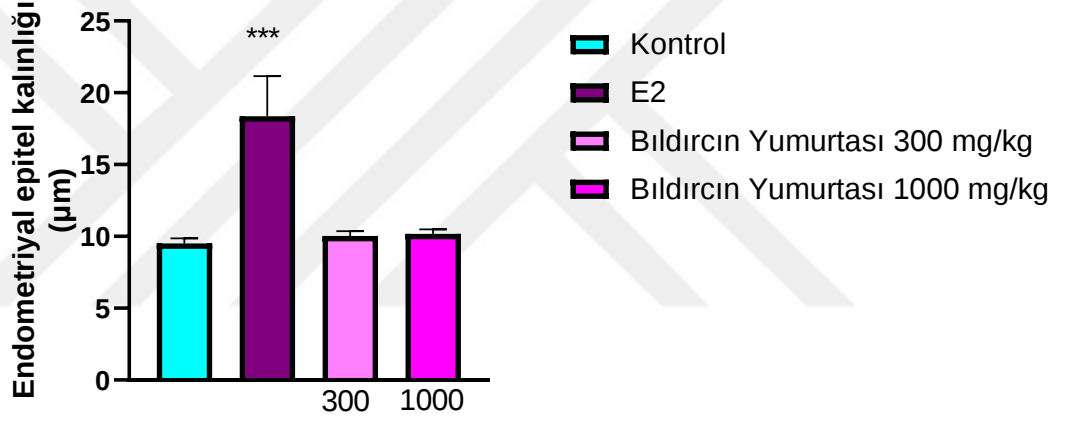
**Şekil-22: Birim mm² over alanına düşen antral folikül sayısının gruplar arası karşılaştırması**

Toplam antral folikül sayısı ve primordiyal folikül sayısı gruplar arası anlamlılık göstermedi (Sırasıyla p:0,404, p:0,2435) (Tablo-12).

4.2.6. Uterus histolojisi

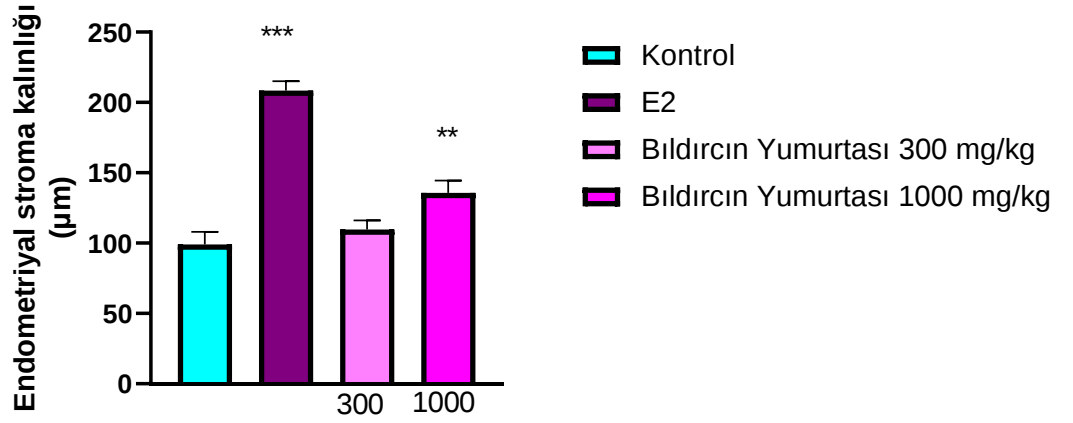
Uterus incelemelerinde endometriyum epitel kalınlığı, endometriyum stroma kalınlığı, endometriyal gland sayısı, miyometriyum kalınlığı ve uterin kavite ile ilgili ölçümler değerlendirmeye alındı.

Endometriyal epitel kalınlığı, sadece östrojen grubunda anlamlı artış olduğu görüldü ($p<0,0001$). Diğer gruplarda istatistiki anlamlılık saptanmadı (Şekil-23).



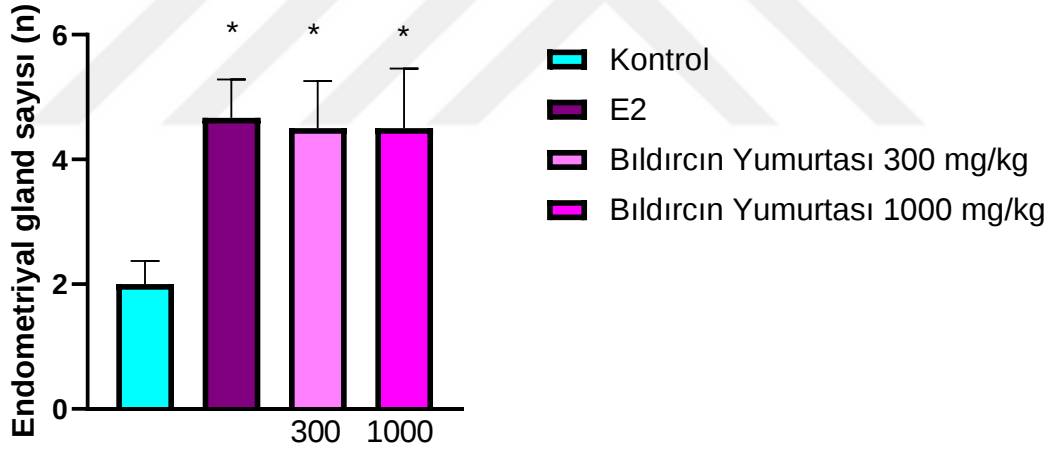
Şekil-23: Endometriyal epitel kalınlığının gruplar arası karşılaştırması

Endometriyal stroma kalınlığı, östrojen ve 1000 mg/kg grubunda anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,0001$). Kontrol grubuna göre, 300 mg/kg grubunda artış olsa da istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil-24).



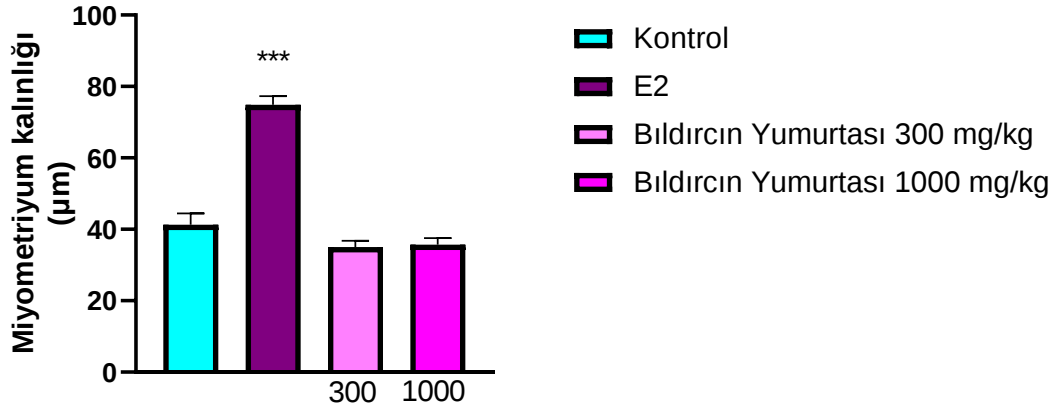
Şekil-24: Endometrial stroma kalınlığının gruplar arası karşılaştırması

Endometrial gland sayısı, E2, 300 mg/kg ve 1000 mg/kg gruplarında anlamlı olarak artış gösterdi ($p:0,0159$) (Şekil-25).



Şekil-25: Endometrial gland sayısının gruplar arası karşılaştırması

Miyometriyum kalınlığının, sadece östrojen grubunda anlamlı artışı görüldü ($p<0,001$). Diğer gruplarda istatistiki olarak anlamlılık saptanmadı (Şekil-26).



Şekil-26: Miyometriyum kalınlığının gruplar arası karşılaştırması

Uterin kavite östrojen grubunda anlamlı farklılık gösterirken ($p < 0,001$), diğer gruplarda anlamlılık saptanmadı (Tablo:13).

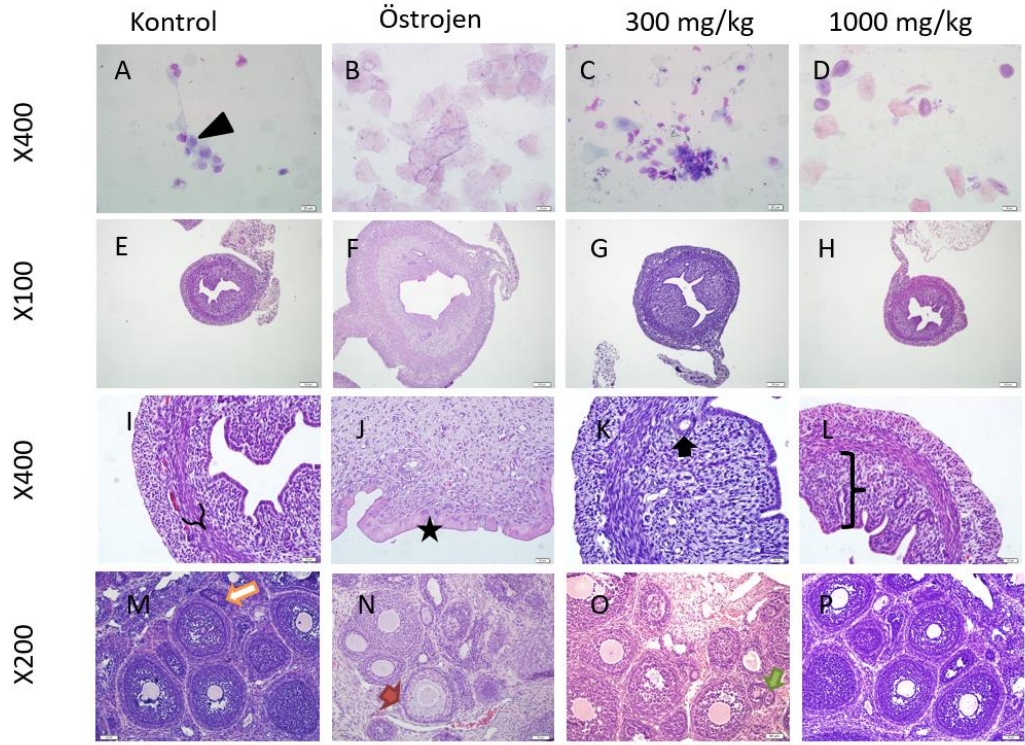
Tablo-13: Uterusa ait histolojik incelemelerin gruplar arası karşılaştırılması

	Kontrol (n=10)	E2 (n=6)	BY 300 mg/kg (n=8)	BY 1000 mg/kg (n=6)
Endometriyal epitel kalınlığı (µm)	9,51 ±0,36	18,37 ±2,79***	10,04 ±0,324	10,17 ±0,328
Endometriyal stroma kalınlığı (µm)	99,04 ±9,05	208,5 ±6,73***	109,7 ±6,49	135,8 ±8,59**
Miyometriyum kalınlığı (µm)	41,31 ±3,15	74,87 ±2,44***	35,00 ±1,78	35,69 ±1,83
Endometriyal gland sayısı	2,00 ±0,372	4,66 ±0,614*	4,50 ±0,755*	4,50 ±0,957*
Uterin kavite (µm ²)	43,26 ±4,202	97,29 ±11,59***	31,59 ±4,149	32,69 ±1,060

One-way ANOVA test

One-way ANOVA test’de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ anlamlılık göstermektedir.

Grupların karakteristik histopatolojik değerlendirme bulguları Şekil-27’de görülmektedir.

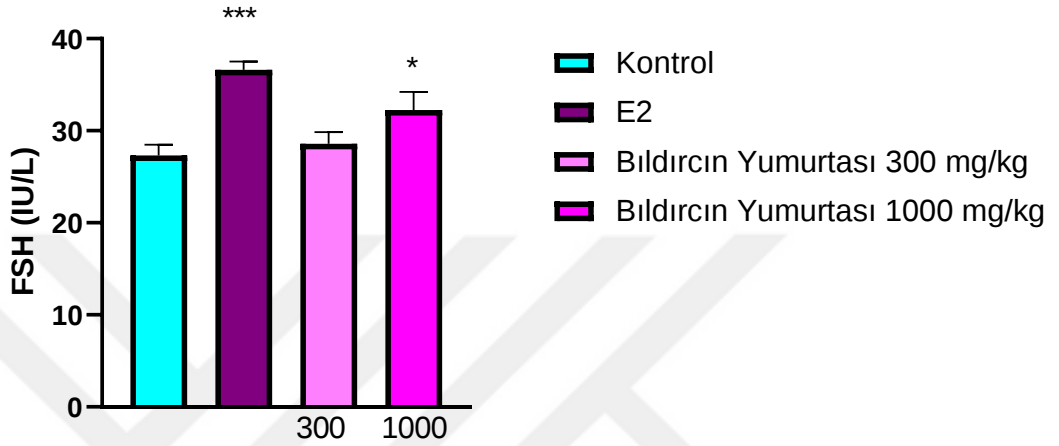


Şekil-27: Grupların smear, uterus ve over histolojisinin karşılaştırmalı resimleri.

Kontrol grubunun smearında (A); selülarite az, parabazal (ok ucu ile gösterim) ve intermedier hücreler görülmektedir ve prepubertaldir. Östrojen grubunun smearında (B); bol miktarda çekirdeğini kaybetmiş kornifiye hücreler ile östrus evresinde olduğu görülmektedir. BY 300 mg/kg grubunun smearında (C) ise orta proöstrusta; 1000 mg/kg grubunun ise geç proöstrusta (D) olduğu görülmektedir. Kontrol grubunun x100 büyütme uterus kesitinde (E), östrojen grubuna (F) göre, uterus boyutu oldukça küçük, uterin kavite daha küçük görülmektedir. Aynı değerlendirme, 300 mg/kg grubu (G) ve 1000 mg/kg grubu (H) ile yapıldığında kontrole göre boyut ve uterin kavite genişliğinde doza bağımlı artış görülmektedir. Uterus kesitlerinin x400’lük büyütmelerinde ise karşılaştırmalı olarak kontrol grubunun (I) tüm katmanları kesite girmektedir. Kontrolde (I), parantez ile işaretli yer miyometriyum kalınlığıdır. Östrojen grubunun (J) epitel kalınlığı (yıldız ile gösterim) diğerlerine göre oldukça artmıştır. Endometriyal gland (ok ile gösterim), 300 mg/kg grubunda (K) gösterilmektedir. Endometriyal stroma (parantez ile gösterim), 1000 mg/kg grubunda (L) gösterilmiştir. Over kesitleri ise x200 büyütme ile kontrol grubunda (M), östrojen grubunda (N), 300 mg/kg grubunda (O), 1000 mg/kg grubunda (P) gösterilmektedir. M’deki beyaz ok ile preantral folikül, N’deki kırmızı okla antral folikül, O’daki yeşil okla primoridyal folikül örneklenmektedir.

4.2.7. Biyokimyasal değerlendirme

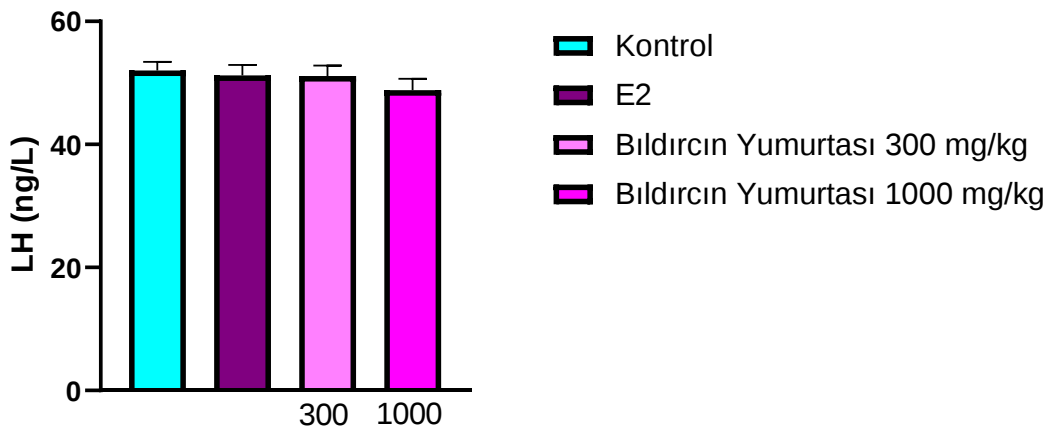
FSH düzeyinin, östrojen grubunda ve 1000 mg/kg grubunda anlamlı yüksek olduğu görüldü ($p<0,0003$). Kontrole göre, 300 mg/kg grubunda anlamlı artış saptanmadı (Şekil-28).



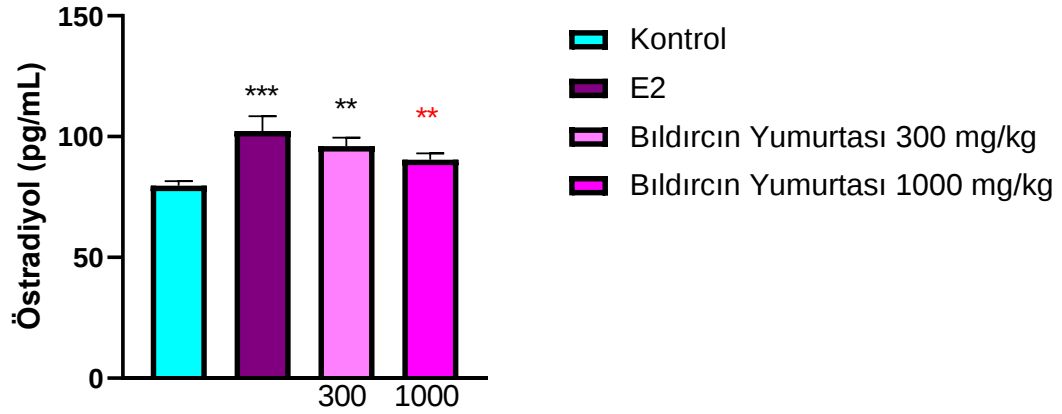
Şekil-28: FSH düzeyinin gruplar arası karşılaştırması

LH düzeyleri açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı ($p:0,5881$) (Şekil-29).

Östradiyol düzeyinin, östrojen grubu, BY 300 mg/kg ve 1000 mg/kg gruplarında anlamlı artış gösterdiği görüldü ($p:0,0012$) (Şekil-30).



Şekil-29: LH düzeyinin gruplar arası karşılaştırması



Şekil-30: Östradiyol düzeyinin gruplar arası karşılaştırması

IGF-1, leptin, kolesterol, LDL, kreatinin gruplar arası ve kontrole göre karşılaştırılmalarında istatistiki olarak anlamlılık saptanmadı (Tablo-14).

Tablo-14: Biyokimyasal parametreleri gruplara göre değerlendirilmesi

	Kontrol (n=10)	E2 (n=6)	BY 300 mg/kg (n=8)	BY 1000 mg/kg (n=6)
FSH (IU/L)	27,31 ±1,168	36,61 ±0,900***	28,57 ±1,290	32,25 ±1,963*
LH (ng/L)	52,05 ±1,395	51,23 ±1,712	51,13 ±1,717	48,80 ±1,899
LH/FSH	1,936 ±0,093	1,401 ±0,045***	1,801 ±0,054	1,553 ±0,141*
Östradiyol (pg/mL)	79,64 ±1,894	102,4 ±6,072***	96,09 ±3,533**	90,48 ±2,60**
IGF-1 (ng/L)	31,90 ±1,208	33,60 ±1,763	35,38 ±0,8951	32,15 ±1,239
Leptin (µg/L)	8,299 ±0,226	7,963 ±0,039	8,418 ±0,255	9,028 ±0,231
Kolesterol (µmol/L)	1149 ±19,76	1155 ±44,79	1143 ±33,12	1258 ±62,71
LDL (µmol/L)	189,0 ±6,651	181,1 ±10,05	191,4 ±7,522	182,9 ±5,065
Kreatinin (µmol/L)	175,8 ±9,616	159,5 ±8,892	200,7 ±8,348	185,1 ±10,11

One-way ANOVA test ve Student's t test

One-way ANOVA test'de *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 anlamlılık göstermektedir.

Student's t testteki *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 anlamlılığını göstermektedir.

4.2.8. Lipit peroksidasyon-malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) değerlendirmesi

Karaciğer dokusunda bakılan MDA ve GSH düzeyleri, gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi (p değeri MDA için 0,7127; GSH için 0,2066) (Tablo-15).

Böbrek dokusunda çalışılan MDA VE GSH düzeyleri, gruplar arasında istatistiki anlamlı farklılık saptanmadı (p değeri MDA için 0,5362; GSH için 0,1382) (Tablo-15).

Tablo-15: Karaciğer ve böbrek dokularının MDA ve GSH düzeyleri

	Kontrol (n=10)	E2 (n=6)	BY 300 mg/kg (n=8)	BY 1000 mg/kg (n=6)
Karaciğer MDA (nmol/g doku)	35,56 ±0,607	34,11 ±0,612	33,22 ±1,114	33,34 ±0,595
Karaciğer GSH (nmol/g doku)	3,675 ±0,024	3,752 ±0,023	3,735 ±0,026	3,708 ±0,035
Böbrek MDA (nmol/g doku)	36,25 ±0,783	40,68 ±1,642	36,30 ±0,870	37,67 ±0,994
Böbrek GSH (nmol/g doku)	3,057 ±0,157	3,139 ±0,066	3,038 ±0,079	2,710 ±0,070

5. TARTIŞMA

Son yıllarda, kız çocuklarında ergenlik başlama yaşındaki erkene kayma trendi dikkat çekmektedir. Prevalansı toplumlara göre değişmekle birlikte; 2009 yılında İstanbul’da yapılan bir çalışmaya göre 4-8 yaş arası toplanan 820 kız çocuğu üzerinden, prematür telarş prevalansı %8,9 olarak bulunmuştur (31).

Bazı çalışmaların da gösterdiği üzere, çevresel endokrin bozuculara maruziyetin puberte prekoks ile ilişkili olduğunu düşünülmektedir. Dietilhekzil fitalat, dietil fitalat, di-n-butil fitalat gibi kimyasallar ve zearalenon gibi mikotoksinler, puberteyi etkilediği konusunda veriler bulunan endokrin bozuculardır. Aşçı ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada; üriner zearalenonun düzeyinin prematür telarşla takip edilen kız çocuklarında 2 kat, idiyopatik santral puberte prekoks ile takip edilenlerde 2,5 kat daha yüksek bulmuşlardır (32). Ratlar üzerinde yapılan çalışmada ise; zearalenonun ratlar üzerinde hipotalamik kisspeptin-GPR54-GnRH yolağını erken aktive ettiği, gonadotropin salınımı erkenden stimüle ettiği, vaginal açılmayı erkene çektiği ve periferde uterotropik etkisi ile santral puberte prekoksia yol açtığı gösterilmiştir (1). Bir başka rat çalışmasında, dietil fitalatın hipotalamik fonksiyonları etkileyerek puberte prekoksia yol açtığı gösterilmiştir (33).

Biz de, hem klinik hem hayvan deneyi çalışması ile bildirgin yumurtasının puberte üzerindeki etkisini araştırdık. Klinik çalışmada prematür telarş ile başvuran hastaların %60’ının; kontrol grubunun ise %27,8’inin hayatlarının bir döneminde bildirgin yumurtası kullanımı olduğunu belirledik. Prematür telarş ile başvuranlarda, kontrol grubuna göre bildirgin yumurtası kullanımının daha sık olduğu görülmektedir.

Bu klinik bulgularımızı desteklemek amaçlı yapmış olduğumuz hayvan deneyi çalışmamızda; bildirgin yumurtası ile beslenen grupta, direk 17 β -estradiol alan gruba benzer şekilde vajinal epitelin kornifiye olması, uterus ve over ağırlığındaki artış ve FSH ve östradiyol düzeylerinde artış görülmesi bildirgin yumurtasının puberteyi tetikleyici etkisini göstermektedir. Bildirgin yumurtasının, östradiol kadar güçlü etkileri olmasa bile, östrojenik etkisi olduğu görülmektedir. Oral yolla verilen östradiolün hipotalamik-pituter-gonadal aksı tetiklediği Yang ve ark. tarafından gösterilmiştir (1).

Klinik çalışmamızda prematür telarş ile başvuran hastalarda, kontrole göre vücut ağırlığının, boy uzunluğunun ve vücut kitle indeksinin yüksek olduğunu görmekteyiz. Vücut kitle indeksindeki artış ve artmış yağ dokusunun puberte başlamasını kolaylaştırıcı etkisi bilinmektedir (31). Öte yandan bıldırcın yumurtasının boy uzaması, kilo alımı, beyin gelişimi gibi çocuğun büyüme ve gelişimini desteklediği iddia edilmekle birlikte (8), rat çalışmamızda bıldırcın yumurtası verilen ratlarda vücut ağırlığı, boy uzunluğu gibi antropometrik ölçümlerin kontrol grubuna göre farklılık göstermemesine rağmen puberte bulgularına yol açmış olması, bıldırcın yumurtasının puberte tetikleyici etkisinin yağ dokusu artışından bağımsız olarak gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Sıçanlarda pubertenin indikatörü vaginal açıklık ve ilk proöstrustur (17). Vaginal epitel hücrelerinin kornifiye olması ve kornifiye oranının artması östrojenik etkiyi göstermektedir (25). Çalışmamızda vaginal smear bulguları ile değerlendirildiğinde, bıldırcın yumurtası gruplarının proöstrusta oldukları ve kornifiye hücre oranlarının yüksek olması ile kontrol grubundan önce pubertelerinin başladığını göstermektedir. Endokrin bozucuların reproduktif sistem üzerine etkilerini konu alan çalışmalarda, birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiş ve maruz kalınan kimyasalın özelliğinin, etkisinin, miktarının, maruz kalınan dönemin ve maruziyetin süresinin önemli olduğu belirtilmiştir (34). Sedha ve ark. fitalatların östrojenik etkileri üzerine yaptıkları çalışmada; uterotropik assay olarak 3 günlük maruziyetleri ile dietilstilbestirolün pozitif kontrol olarak uterus ve over ağırlığını artırırken, di-izobutil fitalat ve di-izononil fitalatın uterus ve over ağırlığını etkilemediğini görmüşlerdi (35). Puberte çalışması olarak 20 günlük maruziyetlerinde ise fitalatların uterusu etkilemediğini ancak toksisiteye bağlı olarak di-izobutil fitalatın over ağırlığını azalttığı belirlemişlerdi (35). Immatür ratlar üzerinde yapılan östrojenik etkili bir mikotoksin olan zearalenon (1) ve eser elementlerden olan manganez (36) maruziyetlerinde benzer şekilde uterus ağırlığının arttığını, over ağırlığının ise azaldığı gösterilmiştir. Ratlarda subkronik olarak, sadece fitoöstrojen maruziyeti ile dietilstilbestirolle kombine fitoöstrojen maruziyetlerini karşılaştıran bir çalışmada; sadece dietilstilbestirolün 10 haftalık maruziyet ile hem uterus hem over ağırlığını arttırdığı, sadece fitoöstrojenle 10 haftalık maruziyetin ise uterus ve overin ağırlığını etkilemediği; dietilstilbestirol ile kombine fitoöstrojenlerin 8 haftalık maruziyetiyle ise uterus ağırlığını etkilemeksizin

over ağırlığında anlamlı artışa yol açtığı gösterilmiştir (37). Saududdin ve ark. yaptığı çalışmaya göre tek başına östrojen, hem uterus hem over ağırlığını artırırken, östrojenden sonra testosteron verildiğinde over ağırlığının azaldığını ancak uterus boyutlarında etkilenme olmadığı; östrojen üzerine progesteron verildiğinde ise over boyutu artmaya devam ederken uterus ağırlığının azaldığı gösterilmiştir (38). Preovulatuvar rat overlerinde protein kaynağı ve dağılımı üzerine yapılan bir çalışmada; ratlara PN 24. günlerinde önce at koryonik gonadotropini daha sonra human koryonik gonadotropin verilerek saatler içerisinde serum plazma protein düzeyine ve over ağırlıklarının değişimine bakılmış. Over ağırlığının saatler içerisinde %50-100 artış gösterdiği, ekstrasellüler ve intrasellüler boşluğun arttığı, over içerisindeki total protein oranının ve onu oluşturan plazma proteini ile yeni üretilen protein miktarının arttığı gözlemlenmiştir (39). İnsanlarda ise puberte döneminde uterus ve over volüm ve ağırlıklarının arttığı bilinmektedir (12). Çalışmamızda bildirgin yumurtası ile beslenen ratlarda östrojen verilen grupta benzer şekilde over ve uterus volümlerinin artması bildirgin yumurtasının östrojenik ve uterotropik etkisine işaret etmektedir.

Over foliküllerinin sayısı ve boyutu, serum FSH düzeyi ile ilişkilidir. FSH'ın görevi foliküllerin preovulatuvar foliküle kadar ki büyümesini desteklemektir (40). Östrojen de folikül büyümesinde önemi rol oynamakla birlikte, folikül sayısı ile serum östrojen düzeyi koreledir (40). Biz çalışmamızda, östrojen alan grupta, bütün folikül sayıları fazla iken anlamlı farklılık preantral ve antral foliküllerde görüldü. Östrojen grubu kadar olmasada, 300 mg/kg grubunda tüm folikül sayıları diğer gruplardan yüksek olmakla birlikte kontrole göre anlamlı artış preantral folikül sayısındadır.

Yang ve ark. yapmış olduğu çalışmada, östrojen alan ratlarda PN 20.gününde vaginal açıklık görülmüştür. PN 20. gün (vaginal açıklık), PN23. gün (vaginal açıklık sonrası ilk diöstrus) , PN 35. gün (kontrol grubunun vaginal açıklığı görülen gün) ve PN. 38. gün (kontrol grubunun vaginal açıklık sonrası ilk diöstrusu) serumdaki FSH, LH ve östrojen düzeylerine bakılmış. PN 20. günden 38. güne kadar FSH, LH ve östradiyol düzeylerinin giderek arttığı ve kontrol grubundan yüksek olduğu görülmüş (1). Bizim çalışmamızda ise, östrojen grubunda FSH ve östradiyol düzeyi yüksek ancak LH düzeyi gruplar arası anlamlı farklılık göstermemektedir. Rat fizyolojisine baktığımızda; LH düzeyinin vaginal açıklık günü pik yaptığı, vaginal açıklıktan sonraki ilk diöstrusta düşük seviyelere indiği ve ikinci proöstrusta tekrar pik yaptığı

görülmektedir. LH, PN 21 günden vaginal açıklık görülene kadar ki zamanda ise düşük düzeyde kalmakla birlikte gün gün değişmekte olduğu görülmektedir (41). Çalışmamızda gruplar arasında LH düzeyinde farklılık olmamasının tüm ratlar PN 30. günde sakrifiye edildiği için siklus evrelerinin hatta o ana kadar ki siklus sayılarının bile farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Deney dışı bıraktığımız 3000 mg/kg grubundaki kayıplar ve ishal bulguları, 3000 mg/kg'ın toksik doz olduğunu düşündürmüştür. Daha önce tavuk yumurtası ile ortak proteinlere bağlı veya izole bıldırcın yumurtası proteinlerine bağlı enterokolite yol açan alerjiler ve anafilaksi gelişimi ile ilgili veriler (42), bizim 3000 mg/kg doz grubundaki bulgularımızı desteklemektedir.

Sonuç olarak; yapmış olduğumuz preliminar çalışmada bıldırcın yumurtası tüketiminin klinik, biyokimyasal ve histopatolojik olarak östrojenik etki ile pubertal bulguların gelişimine yol açtığı gösterilmiştir. Çalışmamızda bu etkinin bıldırcın yumurtasının yapısındaki endojen bir bileşiğe mi yoksa üretim çiftliklerinde kullanılan hayvan yemi ya da koşullara mı bağlı olduğu açıklanamamakla birlikte puberte bulguları erken başlayan kızlarda bıldırcın yumurtası gibi endokrin bozucu özelliği olan besin ve maddelere maruziyet sorgulanmalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Yang R, Wang YM, Zhang L, Zhao ZM, Zhao J, Peng SQ. Prepubertal exposure to an oestrogenic mycotoxin zearalenone induces central precocious puberty in immature female rats through the mechanism of premature activation of hypothalamic kisspeptin-GPR54 signaling. *Molecular and cellular endocrinology*. 2016;437:62-74.
2. BERBEROĞLU M. Erken puberte. *Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi*. 2010;4(1):56-64.
3. Buluş AD, Aşci A, Erkekoglu P, Balci A, Andiran N, Koçer-Gümüşel B. The evaluation of possible role of endocrine disruptors in central and peripheral precocious puberty. *Toxicology mechanisms and methods*. 2016;26(7):493-500.
4. Ahsan N, Ullah H, Ullah W, Jahan S. Comparative effects of Bisphenol S and Bisphenol A on the development of female reproductive system in rats; a neonatal exposure study. *Chemosphere*. 2018;197:336-43.
5. Chen C, Chen Y, Zhang Y, Sun W, Jiang Y, Song Y, et al. Association between dietary patterns and precocious puberty in children: a population-based study. *International journal of endocrinology*. 2018;2018.
6. KAÇAR E, KELEŞTİMUR H. Dişi Sıçanlarda Yağlı Diyetin ve Işık Uyarısının Pubertal Olgunlaşma ve Serum Leptin Seviyeleri Üzerine Etkileri.
7. Alarşlan O. Modern bıldırcın üretimi ve temel besleme ilkeleri. Baskı, Ankara. 2006.
8. Sayılı M, Sezer M, Koçak A, Gözener B. Tokat İli Kentsel Alanda Bıldırcın Ürünleri Tüketim Düzey ve Alışkanlıklarının Belirlenmesi. 2014.
9. Oladipo GO, Nlekerem CM, Ibukun EO, Kolawole AO. Quail (*Coturnix japonica*) egg yolk bioactive components attenuate streptozotocin-induced testicular damage and oxidative stress in diabetic rats. *European journal of nutrition*. 2018;57(8):2857-67.
10. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocrine reviews*. 2001;22(1):111-51.
11. Gül Ü. Puberte prekoks tanılı hastaların klinik özellikleri ve tedavi sonu bulgularının retrospektif olarak değerlendirilmesi. 2012.
12. Carel J-C, Leger J. Precocious puberty. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(22):2366-77.
13. Nathan BM, Palmert MR. Regulation and disorders of pubertal timing. *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2005;34(3):617-41.
14. Stanhope R. Disorders of puberty. *Medicine*. 2009;37(9):494-6.
15. Klein DA, Emerick JE, Sylvester JE, Vogt KS. Disorders of puberty: an approach to diagnosis and management. *American family physician*. 2017;96(9):590-9.
16. Ojeda SR, Aguado LI, Smith S. Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: the rat as a model. *Neuroendocrinology*. 1983;37(4):306-13.
17. Mülazımoğlu S, İde T, Aslan S. Ratlarda üreme. Yücel O (Editör) Küçük deney hayvanlarından rat Ankara: J Clin Anal Med. 2012:39-44.
18. Soylu SM. Rat fizyolojisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. 2012;23:2.
19. Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic pathology*. 2008;36(3):375-84.
20. Knobil E. Knobil and Neill's physiology of reproduction: Gulf Professional Publishing; 2006.
21. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic pathology*. 2015;43(6):776-93.
22. Öztürk S. Allerji ve Astımdan Korunma ve Kurtulma Yollar: Cinius Yayınları; 2016.

23. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya D. Comparison of the cholesterol content of Brazilian chicken and quail eggs. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2003;16(2):147-53.
24. TUNCEL T, ÇETEMEN A, KARABEL M, KELEKÇİ S, Şen V, Gürkan MF. Astım ve/veya allerjik rinitli çocuklarda tamamlayıcı ve alternatif tıp uygulamaları. *Asthma Allergy Immunology/Astım Allerji Immunoloji*. 2014;12(3):146-51.
25. Jawaid T, Awasthi A, Kamal M. Estrogenic activity of a hydro-alcoholic extract of *Bambusa arundinaceae* leaves on female wistar rats. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2015;6(1):19.
26. ESENER OBB, BOZKURT DDHH, ABD HVE. ÇEVRESEL ÖSTROJENLERİN ERKEK KANATLI HAYVANLARIN GENİTAL ORGANLARI ÜZERİNE ETKİSİ. 2007.
27. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic pathology*. 2015;43(6):776-93.
28. Plowchalk D, Smith B, Mattison D. Assessment of toxicity to the ovary using follicle quantitation and morphometrics. *Methods in Toxicology*. 1993;3(Part B):57-68.
29. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Reproduction*. 1968;17(3):555-7.
30. Parhizkarsup S, Latiffsup LA, Rahmansup SA, Dollahsup MA, Parichehr H. Assessing estrogenic activity of *Nigella sativa* in ovariectomized rats using vaginal cornification assay. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;5(2):137-42.
31. Atay Z, Turan S, Guran T, Furman A, Bereket A. The prevalence and risk factors of premature thelarche and pubarche in 4-to 8-year-old girls. *Acta Paediatrica*. 2012;101(2):e71-e5.
32. Asci A, Durmaz E, Erkekoglu P, Pasli D, Bircan I, Kocer-Gumusel B. Urinary zearalenone levels in girls with premature thelarche and idiopathic central precocious puberty. *Minerva Pediatrica*. 2014;66(6):571-8.
33. Liu T, Wang Y, Yang M, Shao P, Duan L, Li M, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces precocious puberty in adolescent female rats. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2018;21(8):848.
34. Rasier G, Toppari J, Parent A-S, Bourguignon J-P. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;254:187-201.
35. Sedha S, Gautam A, Verma Y, Ahmad R, Kumar S. Determination of in vivo estrogenic potential of Di-isobutyl phthalate (DIBP) and Di-isononyl phthalate (DINP) in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015;22(22):18197-202.
36. Kim SI, Jang YS, Han SH, Choi MJ, Go EH, Cheon Y-P, et al. Effect of manganese exposure on the reproductive organs in immature female rats. *Development & reproduction*. 2012;16(4):295.
37. Jeng Y-J, Kochukov M, Nauduri D, Kaphalia BS, Watson CS. Subchronic exposure to phytoestrogens alone and in combination with diethylstilbestrol-pituitary tumor induction in Fischer 344 rats. *Nutrition & metabolism*. 2010;7(1):40.
38. SAIDUDDIN S, ZASSENHAUS HP. Effect of testosterone and progesterone on the estradiol receptor in the immature rat ovary. *Endocrinology*. 1978;102(4):1069-76.
39. Lipner H, SMITH MS. A method for determining the distribution and source of protein in preovulatory rat ovaries. *Journal of Endocrinology*. 1971;50(2):187-200.
40. Shi Z, Zhang H, Ding L, Feng Y, Xu M, Dai J. The effect of perfluorododecanonic acid on endocrine status, sex hormones and expression of steroidogenic genes in pubertal female rats. *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY). 2009;27(3-4):352-9.

41. Döhler KD, Wuttke W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*. 1975;97(4):898-907.
42. Caro Contreras FJ, Giner Muñoz MT, Martín Mateos MA, Plaza Martín AM, Sierra Martínez JI, Lombardero M. Allergy to quail's egg without allergy to chicken's egg. case report. *Allergologia et immunopathologia*. 2008;36(4):234-7.





MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	70.2018.mar	ÇALIŞMA: TEZ		
	PROJE ADI	Bildircin Yumurtasının Puberte Üzerine Etkileri			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Tülay GÜRAN			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER			
	DESTEKLEYİCİ				
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: 09. 07. 2018				
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımlar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkelere doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.				
ÜYELER					
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksef ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

	PROTOKOL KODU	09.2020.386
	PROJE ADI	BILDIRCIN YUMURTASININ PUBERTE ÜZERİNE ETKİLERİ
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	PROF. DR.TÜLAY GÜRAN

KARAR BİLGİLERİ	Tarih :12.06.2020
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekliliği, amacı, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek projenin yenilenmesi gerekmektedir.

ÜYELER					
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİREKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. Atilla KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof. Dr. Şefik GÖRKEY	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Dış Hekimi	M.Ü Dış Hekimliği Fak./Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Prof. Dr. Besir Metek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç. Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç.Dr. Meltem KÖRAY	Dış Hekimi	İstanbul Üniv. Dış Hekimliği Fak./Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç.Dr. Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Doç.Dr. Pinar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	
Gözde Aynur MİRZA	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	☐ Var ☐ Yok	☐ Evet ☐ Hayır	

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Bu formun amacı katılmanız rica edilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek ve katılmanız ile ilgili izin almaktır.

Sayın

Sizi Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Endokrinoloji Polikliniği tarafından yürütülen **“Bıldırcın Yumurtasının Puberte Üzerine Etkileri”** başlıklı ankete dayalı bir **araştırmaya** davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını, bu araştırmanın gönüllü katılımcılara getireceği olası fayda ve rahatsızlıklarını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. İsterseniz bu bilgileri aileniz ve/veya yakınlarınız ile tartışınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Bu anket çalışmasına katılmayı kabul ettiğiniz takdirde, gerekli yerleri siz ve sorumlu araştırmacı tarafından doldurulmuş bu formun bir kopyası saklamanız için size verilecektir.

Araştırmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Size verilen **anket formlarındaki** soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayın. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır ve kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Çalışmaya katılmama veya herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkında sahipsizsiniz. Her iki durumda da bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır.

Araştırma Sorumlusu

Dr. Özlem SÜREKLİ KARAKUŞ

Araştırmayla İlgili Bilgiler:

Araştırmanın Amacı:

Erken ergenlik şikâyeti ile başvuran hastalarda, hormon bozucular açısından ayrıntılı hikâye sorgulandığında bildirgin yumurtası kullanımı dikkati çekmektedir. Bildirgin yumurtası ile beslenmenin ergenlik üzerine etkisine hakkında şimdiye kadar bilgi birikimine rastlanmadığı için tarafımızca hayvan deneyi yapılmış ve anlamlı sonuçlar gözlenmiştir. İnsanlar üzerindeki etkinliği görmek ve durumu ortaya koymak amaçlı anket çalışması yapılması planlanmıştır.

İzlenecek Olan Yöntem ve Yapılacak İşlemler:

Poliklinik muayenesine geldiğinde 30 saniyede tamamlanacak maksimum 3 soru sorulacak ve yüz yüze görüşme yöntemi ile tarafımızca anketler doldurulacaktır.

Araştırmanın Süresi:

Mart 2020- Haziran 2020 tarihleri arasında yapılması planlanmaktadır.

Katılması Beklenen Gönüllü Sayısı:

Minimum 50 kişi ile yapılması planlanmıştır.

Araştırmanın Yapılacağı Yer:

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Endokrinoloji Polikliniği

Araştırmaya Katılan Araştırmacılar:

Prof. Dr. Tülay GÜRAN

Asistan Dr. Özlem SÜREKLİ KARAKUŞ

Katılma ve Çıkma:

Bu anket çalışmasına katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahiptir. Ayrıca sorumlu araştırmacı gerek duyarsa sizi çalışma dışı bırakabilir. Çalışmaya katılmama, çalışmadan çıkma veya çıkarılma durumlarında bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır.

Gizlilik:

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak ve kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Çalışmaya Katılım Onayı:

Sayın Dr. Özlem Sürekli Karakuş tarafından Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Çocuk Endokrinoloji Polikliniği'nde tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi amacıyla araştırmacı tarafından araştırmadan çıkartılabileceğimi de biliyorum. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğimi biliyorum.

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Özlem Sürekli Karakuş tarafından, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Çocuk Endokrinoloji Polikliniği 'nden ve 0545 794 6349 no'lu telefondan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalamış bulunduğum bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün (Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin

Veli veya Vasisinin (kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Özlem	Soyadı	Sürekli Karakuş
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	03.11.1989
Uyruğu	T.C	Tel	0545 794 6349
E-mail	docozlem@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	2015

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1	Pratisyen Hekim	İstanbul Pendik Toplum Sağlığı Merkezi	5 ay
2	Asistan Doktor	Marmara Ün. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	4 yıl

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Orta	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu #

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
77,5								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	79,6	83	78,7

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Graph Pad	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

