



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK ENDOKRİNOLOJİSİ BİLİM DALI**

**POLİKİSTİK OVER SENDROMU ETİYOPATOGENEZİNDE
BİSFENOL A [2, 2-BİS (4-HİDROKSİFENİL) PROPAN] VE FİTALATIN
ROLÜ VE METABOLİK PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uz. Dr. Leyla AKIN

KAYSERİ- 2013

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

**Polikistik Over Sendromu Etiyopatogenezinde Bisfenol A
(2, 2 bis 4hidroksi fenil propan) ve Fitalatın Rolü ve
Metabolik Parametreler ile İlişkisi**

Proje No: TSU-11-3710

Proje Türü:

Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Adı Soyadı: Prof Dr Mustafa Kendirci
Birimi/Bölümü: Çocuk Sağlığı ve ve Hastalıkları ABD
Çocuk Endokrinolojisi Bilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı: Leyla Akın
Birimi/Bölümü: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD
Çocuk Endokrinolojisi Bilim Dalı

Haziran 2014
KAYSERİ

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	3
ABSTRACT	4
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
6. KAYNAKLAR	49

ÖZET

Amaç: Polikistik over sendromu (PKOS) hiperandrojenemi, anovulatuvar sikluslar ve polikistik over yapısı ile karakterize metabolik ve reproduktif bozuklukların iç içe olduğu bir durumdur. Etiyopatogenezi henüz tam bilinmemektedir. Genetik faktörlerin etkili olduğuna dair kanıtlar olmakla birlikte, fenotipin ortaya çıkmasında çevresel faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, PKOS’lu adolesanlarda olası metabolik değişikliklerin sıklığını belirlemek ve endokrin bozucu kimyasallardan olan bisfenol A ve fitalatın PKOS etiopatogenezindeki rolünü araştırmak amaçlanmıştır.

Yöntem: Araştırmaya PKOS tanısı alan 13-19 yaş arası 112 olgu alındı. Kontrol grubunu adetleri düzenli ve hirsutizm bulgusu olmayan 35’i obez, 26’sı obez olmayan toplam 61 sağlıklı adolesan kız oluşturdu. Tüm olgularda antropometrik ölçümler ve ayrıntılı fizik muayene yapıldı. Hormonal ve metabolik parametreler ve HPLC yöntemi ile serum BPA, MEHP ve DEHP düzeyleri ölçüldü. PKOS ve obez kontrol olgularında OGTT yapıldı. İnsülin direnci belirteçleri olarak, HOMA-IR, QUICK-I, açlık glukoz/açlık insülin oranı, Matsuda indeksi ve OGTT sırasında toplam insülin düzeyleri hesaplandı.

Bulgular: PKOS ve kontrol grupları arasında, glukoz, açlık lipidleri, transaminazlar, insülin HOMA-IR, QUICK-I Matsuda indeksi ve AGIO değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı. PKOS’lu hastalarda serum BPA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($1,1\pm0,4$ ng/ml; $0,8\pm0,3$ ng/ml $p=0,001$). BPA düzeyleri ile jinekolojik yaş, total ve serbest testosteron DHEA-S ve Ferriman-Gallwey skoru arasında anlamlı korelasyon bulundu (sırasıyla, $r=0,29$; $r=0,52$; $r=0,44$; $r=0,37$; $r=0,43$). PKOS ve kontrol grubunda serum MEHP ve DEHP düzeyleri arasında fark bulunmadı.

Sonuç: PKOS’lu adolesanlarda serum BPA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek ve hirsutizm ve androjenler ile ilişkili bulundu. Bu sonuç bu endokrin bozucunun PKOS etiopatogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: PKOS, endokrin bozucular, bisfenol A, fitalat

ABSTRACT

Aim: Polycystic ovary syndrome (PCOS), characterized by hyperandrogenemia, anovulatory periods and polycystic ovaries is a disorder which metabolic and reproductive abnormalities overlaps. The etiopathogenesis is currently unclarified. Besides the evidence of genetic causes, enviromental factors are considered to be involved in development of phenotype. In this study, evaluation of the incidence of metabolic disturbances in adolescents with PCOS and the investigation of possible role of endocrine distruptors bisphenol A and phthalates in PCOS etiopathogenesis.

Methods: A total of 112 PCOS patients aged 13-19 years and 61 healthy controls 35 obese and 26 lean were included in the study. Physical examination and anthropometric measurements were performed in all participants. Hormonal and metabolic parameters and serum BPA, MEHP and DEHP levels with HPLC method were determined. OGTT was performed in PCOS and obese control groups. Insulin resistance was evaluated using HOMA-IR, QUICK-I, fasting glucose /insulin ratio, Matsuda index and total insulin levels during OGTT.

Results: There was no statistically significant difference between PCOS and control groups regarding serum glucose, lipids, transaminases, insulin, HOMA-IR, QUICK-I Matsuda index and FGIR. Serum BPA levels were higher in PCOS group ($1,1\pm0,4$ ng/ml; $0,8\pm0,3$ ng/ml $p=0,001$). BPA was significantly correlated with gynecological age, total and free testosterone, DHEA-S and Ferriman-Gallwey score ($r=0,29$; $r=0,52$; $r=0,44$; $r=0,37$; $0,43$ respectively). Serum MEHP and DEHP levels were not significantly different between PCOS and control groups.

Conclusion: Higher BPA levels in adolescents with PCOS compared to controls and a positive association between androgens and hirsutism and BPA were found. Upon this result, a potential role of this endocrine disruptor in PCOS etiopathogenesis is considered.

Key words: PCOS, endocrine disruptors, bisphenol A, phthalate

GİRİŞ

Dünya genelinde üreme kapasitesinin son 50 yılda değişen nedenlerle azalmış olduğu gösterilmiştir (1). Amerika Birleşik Devletlerinde 1960'dan günümüze bu azalma oranı % 44 olarak bildirilmektedir (2). Öte yandan, pubertal gelişim bozuklukları, polikistik over sendromu (PKOS) ve endometriozis gibi hormonal hastalıkların insidansında ise artış görülmektedir (3). Birlikte değerlendirildiğinde, bu durum değişen çevre koşullarının dişi üreme sistemi üzerinde olumsuz etkileri olduğunu düşündürmektedir. Son 10 yılda çevre koşullarının erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerini araştıran hayvan deneyleri ve klinik araştırmalar da giderek artmaktadır (4). Benzer bir etkilenme için dişi üreme sistemi ile ilgili çalışmalara bakıldığında ise bu alanda bir boşluk olduğu dikkati çekmektedir.

PKOS, toplumda %5-8 sıklıkla görülen ve infertiliteye neden olabilen önemli bir endokrin sorundur. Bulgular klasik olarak, adolesan dönemde başlamakla beraber, temellerin daha erken yaşlarda oluştuğu bilinmektedir (5). PKOS, hiperandrojenemi, anovulatuvar sikluslar (amenore/oligomenore) ve polikistik over yapısı ile karakterize bir durumdur. Metabolik ve reproduktif bozukluklar iç içedir. PKOS olanlarda insülin direnci, tip 2 diyabet ve endometrial kanser görülme riski yüksektir.

PKOS patogenezi henüz tam bilinmemektedir. Overlerde primordial foliküllerden primer foliküllere geçiş hızlıdır, ancak dominant folikül oluşumu ya da atreziye gidiş yetersiz olduğundan overlerde polikistik yapı oluşumu görülür. PKOS etiyopatogenezinde genetik faktörlerin etkili olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Ancak muhtemelen birden fazla genin etki ettiği karmaşık genetik bir hastalık olup, kalıtım şekli belirlenememiştir. Fenotipin ortaya çıkmasında çevresel faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (6).

Endokrin bozucular olarak adlandırılan madde ya da madde karışımları, normal endokrin fizyolojisini bozarak etki eden doğal ya da sentetik kimyasal bileşiklerdir. Ortaya çıkardıkları bozukluklar çoğunlukla genetik duyarlılık zemininde oluşur. Bildirilen endokrin bozucuların çoğunluğu östrojen sinyallerini bozarak etki gösterirler. Gen ekspresyonunu doğrudan etkileyerek, hormon etkisi göstermek suretiyle endojen hormon sentezi ve metabolizmasını bozarlar. Epigenetik etki ile de kalıtılabilen bozukluklara neden olabilirler. Endokrin bozucuların, nükleer reseptörler, nonnükleer steroid hormon reseptörleri (membran östrojen reseptörleri), nonsteroid reseptörler (serotonin, dopamin, norepinefrin reseptörleri gibi nörotransmitter reseptörler), orfan reseptörleri (aril hidrokarbon reseptörü), steroid

biyosentezini ve/veya metabolizmasını içeren enzimatik yollar ve sayısız diğer mekanizmalar ile endokrin ve üreme sistemleri üzerine etki ettikleri düşünülmektedir (7).

Bisfenol A (BPA), yemek kapları, plastik şişeler, biberonlar, konserve kutularının iç kısımları gibi çok sayıda plastik ürünün yapısında bulunması nedeniyle kolayca maruz kaldığımız bir kimyasaldır. Zayıf östrojenik etkiye sahiptir. BPA'nın oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir (8). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda BPA'ya maruz bırakılan yenidoğan ratlarda PKOS benzeri sendrom olduğu (9) ve insulin/ glukoz metabolizmasının bozulduğu gösterilmiştir (10). Yine hayvan deneylerinde BPA'nın adiposit hipertrofisine yol açtığı ve inflamatuvar adipokinleri uyardığı gösterilmiştir (11). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada da PKOS'lu kadınlarda serum BPA düzeyleri anlamlı yüksek bulunmuştur (12). Fitalatlar, birçok plastik, çeşitli endüstriyel ve ticari ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılırlar. Yumuşak plastik oyuncaklarda, yer döşemelerinde, ev temizlik ürünlerinde, tıbbi aletlerde, kan torbalarında, kozmetik ürünlerinde ve hava temizleyicilerinde bulunur. Antiandrojenik ve hafif östrojenik etkileri vardır. İnsanlarda metabolize olabilirler, ancak bunun metabolik yolağı iyi bilinmemektedir. Bir çalışmada idrarda fitalat düzeyleri ile obezite ve insülin direnci arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (13). Fitalatların, PKOS'un önemli bir bileşeni olan insülin direnci üzerine etkisi aracılığıyla etiyopatogeneizde rol oynayabileceği düşünülebilir.

Dünyanın çeşitli ülkelerinden konu ile ilgili otörlerin katıldığı "PKOS Forumu: Polikistik Over Sendromu Araştırmalarının Bugünü ve Yarını" başlıklı son bildiride (14) PKOS etiyopatogenezinin aydınlatılmasında genetik ve çevresel faktörlerin, özellikle de endokrin bozucuların etkilerinin araştırılması önerilmiştir. Biz de bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında, adolesan dönemde hirsutizm ve adet düzensizliği ile başvuran PKOS'lu olgularda bu yaş grubundaki metabolik bozuklukların sıklığını ortaya koymayı ve endokrin bozuculardan BPA ve fitalatlar ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. OVERLERİN EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİ ve HİSTOLOJİSİ

Embriyonik hayatın 7. haftasına kadar dişi ve erkek embriyodaki gonadlar morfolojik olarak aynıdır. Primordiyal üreme hücreleri 4. haftada yolk sak duvarında belirir ve 5-6. haftalarda ürogenital kıvrıma göç ederler. Ürogenital kıvrımın mezodermal (çöломik) epiteli gonadın epitelini ve stromasını oluşturmak üzere proliferer olur ve bölünen endodermal kökenli üreme hücreleri bu proliferer epitel hücreleri içerisine yerleşerek overleri oluştururlar. Yedinci haftadan sonra primordiyal üreme hücrelerinde mayoz bölünmeler gerçekleşir ve etraflarını çöломik epitel hücreler ile mezonefrik hücre artıkları sarar (15).

Over morfolojik olarak korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşur. Korteks, follikülleri de içeren dış kısmı asellüler kollajenöz bağ dokudan, iç kısmı fibroblastları andıran sıkı yerleşimli iç hücrelerden oluşmuş bir tabakadır. Medulla ise daha gevşek formda mezenkimal dokudan oluşan kan damarları, sinirleri ve bunları çevreleyen epitelium benzeri hücreleri içeren tabakadır (16).

2.2. MENSTRUAL DÖNGÜ FİZYOLOJİSİ

Hipotalamus-hipofiz-over (HPO) aksı fetal hayatta aktif iken, çocukluk döneminde uykudadır. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımının inhibisyonunun ortadan kalkmasıyla puberte döneminde tekrar aktifleşir. Bu dönemde gonadotropinlerin pulsatil salınımı artar. Menarş, pubertenin sonuna doğru, hormonal değişiklikler ile endometrial proliferasyonu sağlayacak overyan östradiol seviyeleri sağlandığında gerçekleşir.

Overyan döngü ovulasyon öncesi foliküler faz ve ovulasyon sonrası luteal faz olarak ikiye ayrılır. Menstruasyonun birinci günü, döngünün birinci günü olup, overlerden östrojen ve progesteron sekresyonu düşüktür. Ovulasyon yüksek östrojen ve LH düzeylerine bağlı olarak döngü ortasında gerçekleşir. Ardından, geride kalan Granulosa hücreleri korpus luteuma dönüşür ve progesteron üretir. Bu dönemde fertilizasyon ya da implantasyon olmazsa, korpus luteum dejenere olur ve progesteron ve östrojen düzeyleri düşer. Uterusta siklik östrojen ve progesteron değişikliklerine yanıt olarak, overlerdeki foliküler ve luteal faza karşılık proliferatif ve sekretuar faz oluşur. Menstrual döngü fizyolojisi şekil 2.1 de özetlenmiştir (17).

2.3. POLİKİSTİK OVER SENDROMU

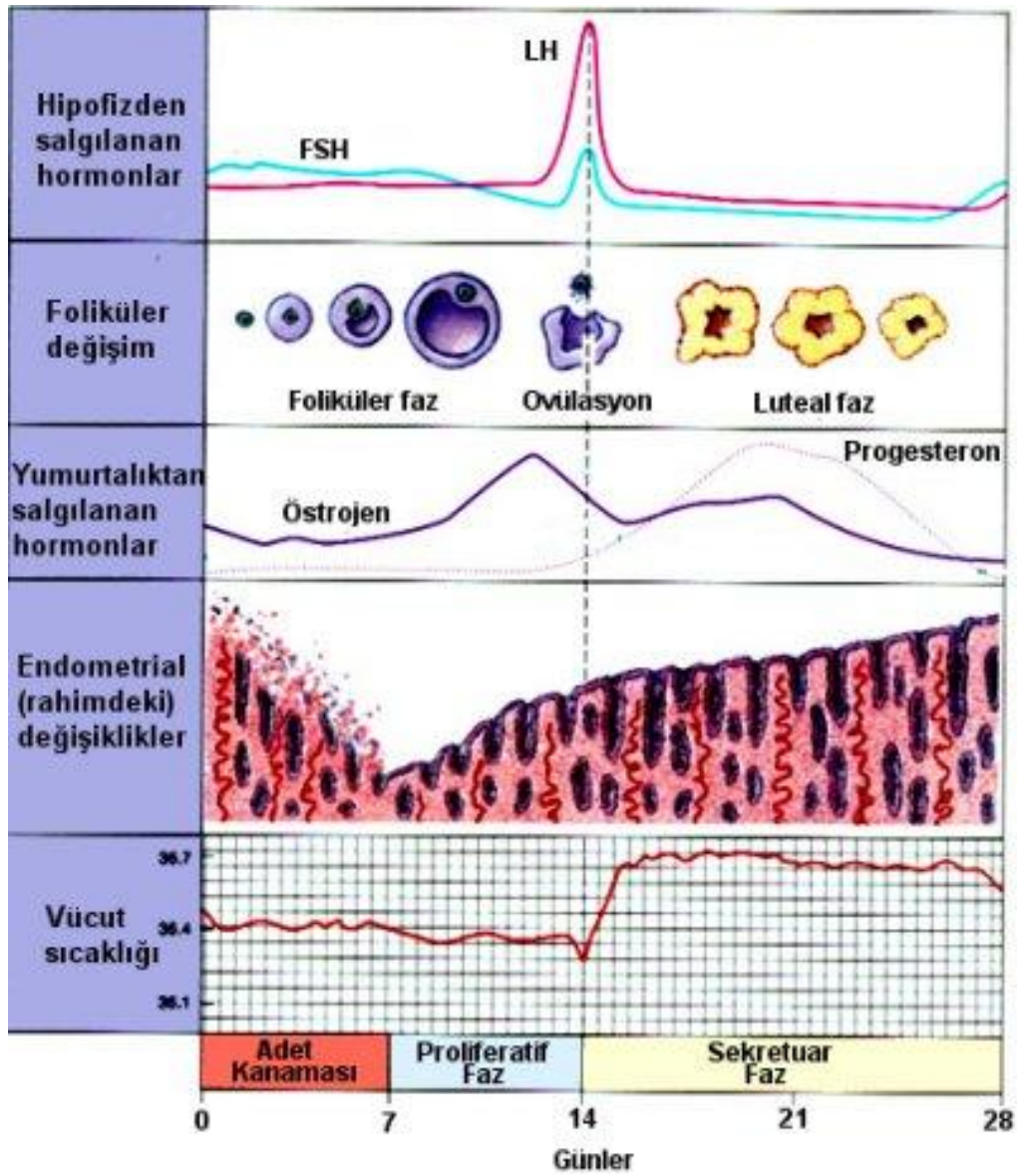
2.3.1. Tanımlama ve Epidemiyoloji

PKOS, kronik anovulasyon ve hiperandrojenizm ile karakterize, etiyolojisi henüz tam aydınlatılamamış çok faktörlü bir endokrinolojik ve metabolik bozukluktur. PKOS bulguları genellikle menarş döneminde başlar ve hayatın farklı dönemlerinde değişik klinik özellikler göstererek yaşam boyu devam eder. Doğurganlık çağındaki kadınlarda yaklaşık %5-10 oranında görülür (18). Adolesan dönemdeki prevelans, PKOS bulgularının bu dönemde sağlıklı kızlarda da görülen fizyolojik değişiklikler ile örtüşmesi nedeniyle tam olarak ortaya konulamamaktadır.

PKOS, ilk olarak 1935 yılında Stein ve Levental tarafından amenore, hirsutizm, obezite ve overlerde bilateral kistik dejenerasyonlar bulunan 7 kadın olguda tanımlanmıştır. Ancak yakın zamana kadar PKOS tanımlaması ve tanısı ile ilgili farklı yaklaşımlar olmuştur. PKOS, 1990'da NIH konferansında, kronik anovulasyon ya da oligomenore ve hiperandrojenizmin klinik ya da laboratuvar bulgularının olması olarak tanımlandı (19). Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Birliği ve Amerikan Üreme Tıbbı Birliği tarafından 2003 yılında Rotterdam'da yapılan ortak toplantıda PKOS tanısı ile ilgili uzlaşma raporu ile "Rotterdam kriterleri" olarak adlandırılan tanı kriterleri belirlenmiştir (20). 2006 yılında Androjen Fazlalığı Birliği (Androjen Excess Society) tekrar hiperandrojeneminin önemini vurgulayarak, PKOS'u hiperandrojenizm olmak kaydıyla, ovulatuvar fonksiyon bozukluğu ve /veya polikistik overlerin olması olarak tanımladı (21). 2009 yılında ise, Androjen Fazlalığı ve PKOS Birliği bu ölçütlere diğer androjen fazlalığı nedenlerinin dışlanması ölçütünü de ekledi (22).

Şekil

2.1:



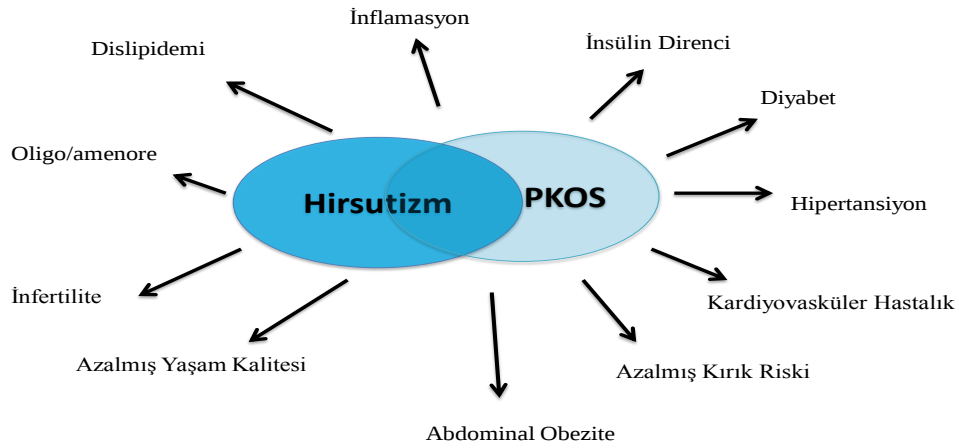
Normal menstrual döngü fizyolojisi (17)

2.3.2. PKOS'un Klinik özellikleri

PKOS klinik bulguları bireyler arasında farklılıklar gösterir. Bazı hastalar hiperandrojenemi bulgusu olmadan sadece anovulasyonla başvururken, bazılarında başvuru yakınması adet düzensizliği olmaksızın sadece hirsutizm olabilir. Anovulatuvar sikluslar disfonksiyonel uterin kanamalarına ve infertiliteye neden olabilir.

PKOS üreme çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrinopati olup, infertilite, endometrial patolojiler ve kardiyometabolik hastalık riski açısından önemlidir. PKOS'un klinik ve

biyokimyasal özellikleri heterojendir (23). PKOS genetik yatkınlık zemininde, çevresel faktörlerin de etkisi ile hormonal ve metabolik bozuklukların iç içe olduğu karmaşık çok faktörlü bir bozukluktur. PKOS klinik bulguları peripubertal yıllarda ortaya çıkar ve bu durum fetal programlanma ve/veya erken postnatal olayların bu hastalık tablosunun etiopatolojisinde sorumlu olabileceğini düşündürür. PKOS'un düşük doğum ağırlığı, büyümenin hızlı yakalanması ve prematür pubarş ile ilişkilerinin ortaya konması etiolojinin gelişimsel yönünü düşündürmektedir (24).



Şekil 2. 2: PKOS ve hirsutizmin klinik ve biyokimyasal özellikleri (23)

2.3.2.1. Hiperandrojenizm

Hiperandrojenizm PKOS'un önemli bir bulgusu olup, PKOS'lu erişkin kadınlarda uzun dönem metabolik ve kardiyovasküler riskler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (25). Hiperandrojenemi tablo 2.1 de görüldüğü üzere klinik ve/veya biyokimyasal olabilir. Hiperandrojenizmin klinik özellikleri, hirsutizm, akne ve androjenik alopesi olarak sayılabilir.

Tablo 2.1: Rotterdam PKOS tanı ölçütleri

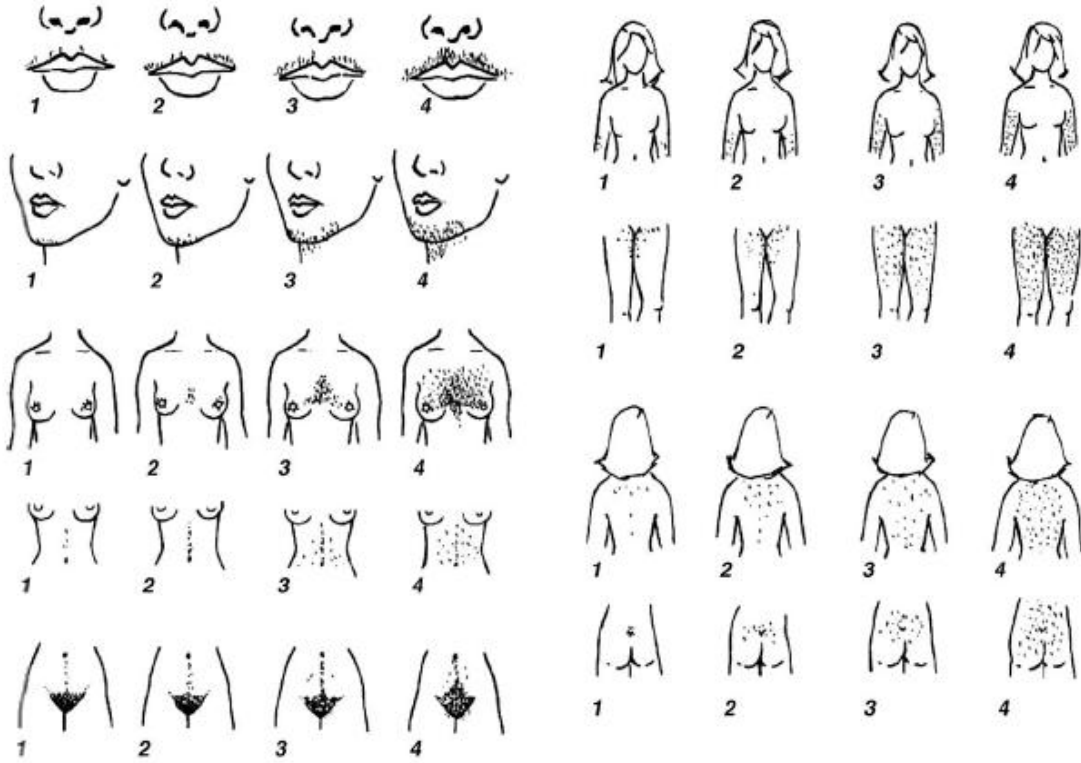
- 1) 6 aydan fazla süren oligomenore veya anovulasyon (oligomenore, < 6/ yıl adet görme)
 - 2) Klinik ve /veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları
 - 3) Ultrason görüntüleme ile polikistik over bulguları (her overde 2-9 mm çaplı 12'den fazla follikül olması ve/veya over volümünün 10 ml'yi geçmesi)
 - 4) Diğer hiperandrojenizm nedenlerinin dışlanması (KAH, Cushing ve androjen üreten tümörler gibi)
-

* Dördüncü ölçüt mutlaka olmak şartıyla, ilk 3 ölçütten 2'sinin bulunması PKOS tanısı için yeterlidir.

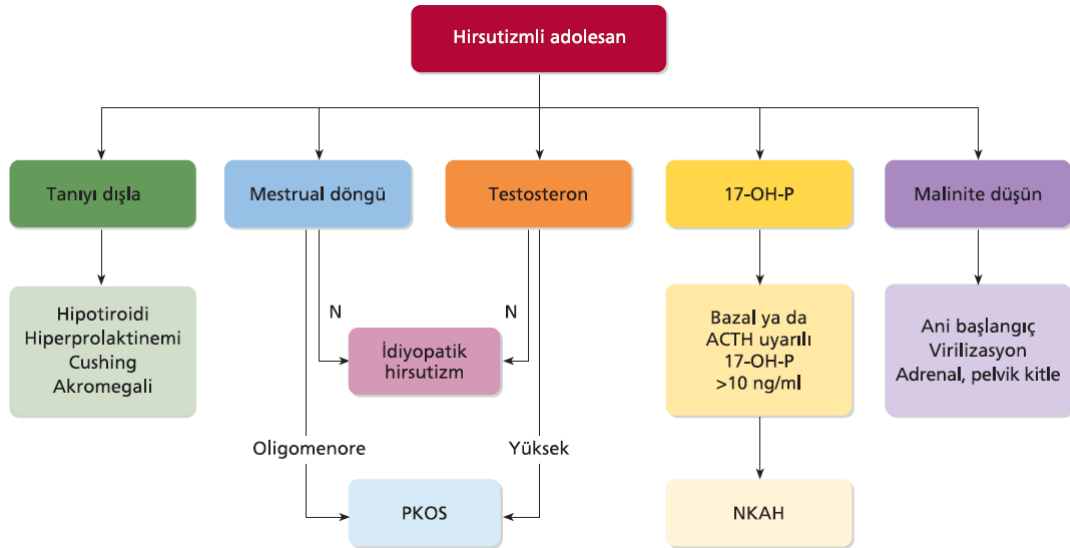
Hirsutizm, dişi cinsiyette görülen androjene duyarlı bölgelerde erkek tipinde terminal kılların artması olarak tanımlanır. Üreme çağındaki kadınlarda % 5-25 oranında görüldüğü bildirilmektedir (22). Hirsutizm androjen fazlalığı ya da derideki artmış androjen etkisi sonucu oluşabilir. Hirsutizmi olanlarda 5 α -redüktaz enziminin dermal aktivitesinin artmış olduğu gösterilmiştir (26). İdiyopatik hirsutizm, düzenli menstruasyon döngüsü, normal overler ve normal androjen düzeyleri ile karakterizedir. Hirsutizmi olan hastaların % 95' inde nedenin PKOS ya da idiyopatik hirsutizm olduğu bilinmektedir. Hirsutizm varsa, Ferriman Gallwey skorlaması (FGS) kullanılarak derecelendirme yapılmalıdır (Şekil 2.3). Bu skorlamaya göre orijinal yayında 11 vücut bölgesi 0-4 puan arasında değerlendirilir. Ancak ön kol ve bacakların androjenlere karşı daha az duyarlı olduğu düşünülerek 9 bölgenin değerlendirmesi önerilmektedir. Puan toplamı 8 ve üzerinde ise hirsutizm kabul edilir, 8-15 arasında ise hafif, 15'in üzerinde ise orta-ağır hirsutizm olarak yorumlanır (27,28). Hirsutizm ile başvuran adolesanlarda tanısal yaklaşım şekil 2.4 de özetlenmiştir (29).

2.3.2.2. Oligomenore/Amenore

Menstrual düzensizlik ölçütleri erişkinler ve adolesanlar arasında farklılık gösterir. Erişkinlerde oligomenore yılda dokuz kezden az adet görme, ya da siklusların 38-40 günden uzun sürmesi olarak tanımlanır. Adolesanda ise postmenarşyal ilk yılda, yılda 4 kezden az, ikinci yılda, yılda 6 kezden az, 3-5 yıl arasında ise yılda 8 kezden az olması olarak tanımlanır. Amenore ise gebelik olmaksızın 3 aydan uzun süre menstruasyon yokluğudur. Bu durumda hipotalamus ve hipofize ait nedenler (hiperprolaktinemi, aşırı egzersiz, aşırı kalori kısıtlaması gibi) araştırılmalıdır (30).



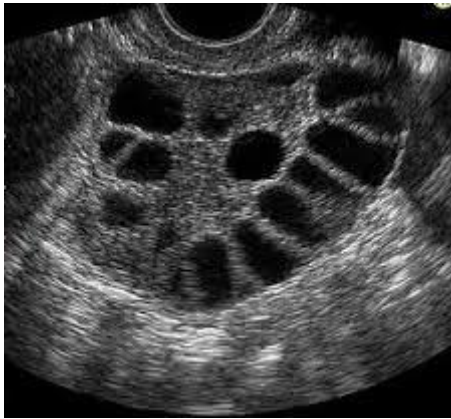
Şekil 2.3: Ferriman-Gallwey skorlaması (0: kıllanma yok, 4: viril kıllanma).



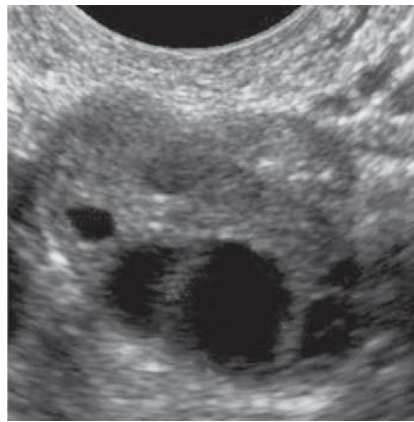
Şekil 2.4: Hirsutizmlı adolesanda tanısal yaklaşım

2.3.3. Ultrasonografide PKO değerlendirilmesi

Adolesan kızlarda ultrasonografi (USG)'nin tecrübeli radyologlarca yapılması önemlidir. Kadınlarda transvajinal yol pratik ve güvenilir olsa da bekâr adolesanlarda transabdominal yapılması önerilmektedir. Ancak özellikle obez kızlarda overlerin görülmesi %16 olguda sonuçsuz kalabilmektedir (31). USG ile her bir overde longitudinal kesitte iki örtüşmeyen planda follikül sayımı ve dağılımı belirlenmelidir. Folliküller rastgele dağılabilir veya over kenarında inci dizisi gibi sıpıtanabilir. Stromal ekojenite myometriyumun ekojenitesi ile kıyaslanarak düşük, normal veya parlak ekojenite şeklinde not edilir. Stromal alanın sıptanması PKOS ile normal adolesanların ve multifoliküler over tablosunun ayırımında önemlidir (32). USG ile incelemeler siklusun 8-23. günleri arasında veya progestin ile oluşturulan mensten 3-5 gün sonra yapılmalıdır. Rotterdam Ölçütlerine göre foliküler fazda yapılan USG'de 2-9 mm çapında 12 ve üzerinde folikül görülmesi ya da artmış over volümü (>10 ml) polikistik over tanısı için yeterlidir (20). Rotterdam Ölçütlerine ek olarak over alanının 500-550 mm²'yi geçmesi ek ölçüt olarak alınabilir. Over alanı ' $boy \times en \times \pi/4$ ' formülü ile hesaplanmalıdır (33). Polikistik over yapısının sağlıklı bireylerde de görülebileceğı bilinmelidir.



a-PKO görüntüsü



b- Normal over

Şekil 2.5. Ultrasonografide PKO ve normal over görüntüsü

2.3.4. PKOS Patofizyolojisi

2.3.4.1. Androjen ile ilgili bozukluklar

PKOS ve Ovaryen aktivite

PKOS'lu olguların çoğunda GnRH uyarı testinde, overlerde aşırı androjen yapımını düşündüren artmış androjen yanıtları sıptanmıştır (34). Ayrıca, deksametazon ile adrenal baskılanma

yapıldığında da hiperandrojeneminin devam ettiği görülmüştür (35). PKOS'da LH pulsasyonunun düzensiz ve amplitüdünün artmış olduğu bilinmektedir (36). Yüksek LH düzeyleri Teka hücrelerinden androjen yapımını uyarır ve oosit gelişimini olumsuz yönde etkiler. Artmış overyan androjen yapımının tek sorumlusu LH değildir, hücre kültürü çalışmalarında PKOS'da Teka hücrelerinde androjen prekürsörlerinden testosterona dönüşümün de arttığını gösterilmiştir (37).

PKOS'lu kadınlardan elde edilen Teka hücrelerinin normal Teka hücrelerine göre aşırı miktarda androjen yapımı ve salınımı gerçekleştirdiği gösterilmiştir. LH, Teka hücrelerinden androjen yapımını düzenlerken, FSH Granulosa hücrelerinde aromataz aktivitesini düzenleyerek, androjenik prekürsörlerden östrojen yapımını belirler. Hücre kültürü, substraktif hibriditasyon gibi çeşitli yöntemlerle artmış CYP17, CYP11A1 ve HSD3B2 ekspresyonunun aşırı androjen biyosentezinde rol aldığı ortaya konmuştur (38).

PKOS ve Adrenal Hiperaktivite

PKOS'lu hastaların % 25-50 sinde ACTH uyarısına 17-OH progesteron yanıtı artmış bulunmuştur (39). İnsülin, 17, 20 liyaz aktivitesini artırarak adrenal bezlerde 17-OH pregnenolonun DHEA-S' a dönüşümünü artırır (40). PKOS'lu kadınların % 60-80' inde dolaşımda testosteron düzeyleri yüksektir. Yaklaşık % 25'inde ise DHEA-S düzeyleri yüksektir (23). PKOS'lu hastalarda idrarda kortizol metabolitlerinin arttığı gösterilmiş ve bu durumun hipotalamus-hipofiz-adrenal aksında kompansatuar bir aktifleşmeye yol açtığı düşünülmüştür (41).

2.3.4.2. Folikülogenez ile ilgili bozukluklar

Polikistik overlerde sağlıklı overlere göre, 2-6 kat daha fazla primer, sekonder ve küçük antral foliküller görülür. Tam mekanizması bilinmemekle birlikte bu durum anormal androjen sinyalizasyonu ile ilişkili görünmektedir. Anovulatuvar bir kadında foliküler büyüme dominant folikül oluşmadan hemen önce duraklar. Bu duraklama sırasında, hiperandrojenik bir çevrede foliküler hücrelerin, insülin ve /veya LH ile aşırı uyarılması söz konusudur (42).

2.3.4.3. Gonadotropinler ile ilgili bozukluklar

PKOS'lu bireylerde GnRH puls sıklığı bozulmuştur. Bu durum normal FSH düzeyine karşın aşırı LH salınımı ile sonuçlanır (43). Artmış LH konsantrasyonu overyan Teka hücrelerinden

androjen yapımına neden olurken, göreceli FSH eksikliği, Granulosa hücrelerinde androjenlerin östrojenlere yetersiz aromatzasyonu ile sonuçlanır. Foliküler gelişim olumsuz etkilenir ve luteal progesteron salınımı olmaz, böylece kalıcı hiperandrojenizm ve ovulatuvar disfonksiyon ortaya çıkar (44).

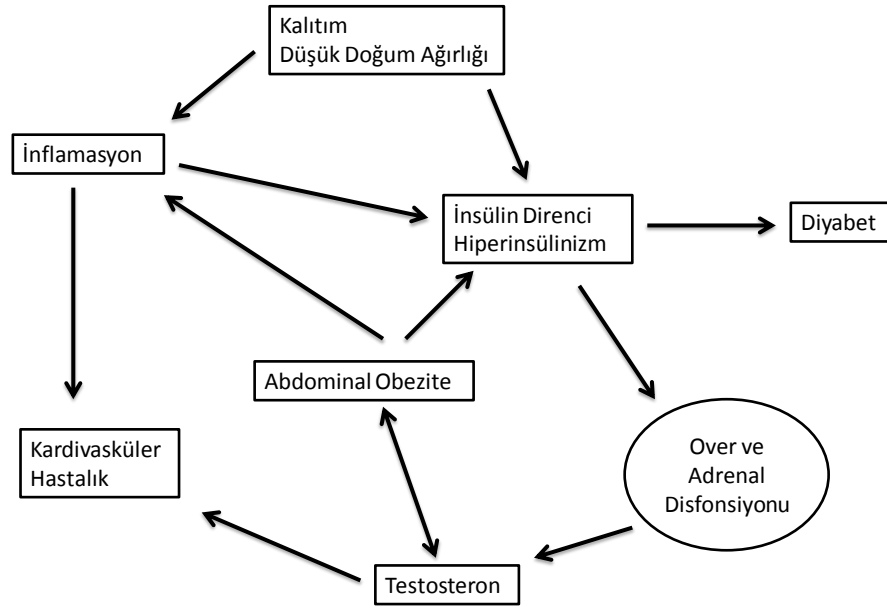
2.3.4.4. İnsülin ile ilgili bozukluklar

PKOS ve insülin direnci arasında ilişki ilk kez 1980’de tanımlanmıştır (45). Ancak, PKOS da insülin direncinin esas mekanizması henüz bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda, PKOS’lu hastalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, insülin reseptörlerinin sayısı ve afiniteleri arasında fark olmadığı gösterilmiştir. Bu durum, insülin direncinin reseptör aracılı sinyal ileti şelalesindeki bir bozukluğa bağlı olabileceğini düşündürmektedir (46).

PKOS’lu kadınların önemli bir bölümü obez ya da fazla kiloludur. İnsülin PKOS’ da görülen hiperandrojeneminin patogeneğinde hem doğrudan hem dolaylı olarak rol oynamaktadır. İnsulin LH ile sinergistik etki göstererek Teka hücrelerinden androjen yapımını artırır. Karaciğerde SHBG yapımını inhibe ederek dolaşımda biyolojik etkinliği daha fazla olan serbest testosteronun artışına neden olur. Hiperinsulinemi durumunda total testosteron düzeyleri normalin üst sınırına yakın ya da hafif yüksek iken, serbest testosteron artmış olup hirsutizme neden olabilir.

İnsülin overlerde ve adrenal bezlerde p450c17 aktivitesini uyararak androjen yapımının artmasına neden olur. PKOS’da hiperinsülinizm anovulasyonun mekanizmasında da rol oynamaktadır. İnsulin LH etkisini artırarak Teka hücrelerinde androjen yapımının yanı sıra Granulosa hücrelerindeki steroidogeneizde de etkilidir. Bu durum Granulosa hücrelerinde erken terminal farklılaşmaya ve antral foliküllerin duraklamasına neden olur. PKOS patogenezi, insülin direnci, hiperinsülinemi, hiperandrojenemi arasında bir kısır döngüye benzetilebilir (Şekil 2.6). (23).

Obezite arttıkça yağ dokusunda makrofajlar artmaktadır. Adipokin ve sitokin salınımında değişiklikler adiposit biyolojisini etkileyerek insülin direncine neden olur. PKOS’lu kadınlarda tip 2 diyabet riski artmıştır, ancak bu durum sadece artmış insülin direnci ile açıklanamaz. PKOS’lu adolesan ve kadınlarda metabolik sendrom riski artmıştır (47).



Şekil 2.6. PKOS’da hiperinsulinemi - hiperandrojenemi kısır döngüsü

2.3.4.5 Genetik faktörler

PKOS etiyolojisinde genetik faktörlerin etkili olduğunu gösteren çalışmalar giderek artmaktadır (48, 49). Ayrıca, PKOS’un endokrin ve metabolik özelliklerinin de kalıtıldığına dair veriler mevcuttur (50). Kalıtım şekli henüz ortaya konulmamakla birlikte, muhtemelen birden fazla genin etkilendiği kompleks bir endokrin bozukluk olduğu düşünülmektedir.

2.3.5. PKOS tedavisi

Adolesanlarda PKOS tedavisi 3 ana bulguya yöneliktir.

1. Adet düzensizliği
2. Hiperandrojenizmin cilt bulguları, hirsutizm ve akne
3. Obezite ve insülin direnci

PKOS’un her bir semptomu için tedavi seçenekleri vardır. Adolesandaki bulguların önceliğine göre tedavi planlanır. Adet düzensizliği ve kronik anovulasyon varlığında endometrial hiperplazi riski olması nedeniyle tedavi gereklidir. Ayrıca tedavi edilmezse disfonksiyonel uterin kanamaları nedeniyle anemi gelişebilir.

Hirsutizm yönetiminde amaç, hirsutizm ve reproduktif sorunların giderilmesi, olası metabolik bozuklukların önlenmesi ya da tedavi edilmesi ve mümkünse altta yatan nedenin ortadan

kaldırılmasıdır. Etkin bir tedavinin sağlanabilmesi için bilinmesi gereken bazı önemli noktalar şunlardır: 1) Tedavi süreklilik gerektirir ve ilaç etkilerinin ortaya çıkması için 6-12 ay süre gereklidir. 2) Tedavi hastaların özelliklerine ve beklentilerine göre bireysel olarak düzenlenmelidir. 3) Tedavi bu konuda uzman hekimler tarafından izlenmelidir.

Hirsutizme yönelik ağda, epilasyon ve lazer gibi kozmetik yöntemler kullanılabilir. Topikal olarak, bir ornitin dekarboksilaz inhibitörü olan eflornitin krem formunda önerilebilir. Antiandrojenler ve özellikle androjen reseptörü üzerine etkili (spironolakton, siproteron asetat, flutamid) olanlar hirsutizm tedavisinde etkilidir. Kombine oral kontraseptif ilaçlar (OKS), PKOS'lu adolesanlarda hirsutizm, akne ve adet düzensizliğinin tedavisinde en sık kullanılan farmakolojik ajanlardır. OKS'ler içerdiği östrojen ile hem LH supresyonu yaparak overyan androjen yapımını azaltır hem de hepatik SHBG yapımını artırarak serbest testosteron düzeyini düşürürler. Progestin bileşeni ise, endometriumu östrojen etkisine karşı korur. Kombine OKS'ler ayrıca ciltte 5 alfa redüktaz aktivitesini azaltarak dehidrotestosteron maruziyetini azaltırlar. Akne tedavisinde OKS ilaçlar oldukça yararlıdır. Dermatolog danışımı ile antibiyotikler, topikal benzoyl peroksit, 13-cis-retinoik asit de kullanılabilir (51).

Yapılan çalışmalarda PKOS olgularında kilo verme ile serum androjen düzeylerinin azaldığı ve ovulasyonun tekrar başladığı gösterilmiştir. Ayrıca hiperinsülinemi ve insülin direnci de ortadan kalkabilir. Düzenli egzersiz ile insülin düzeyi azalır. Bu nedenle tedavinin bir parçası olarak mutlaka düzenli egzersiz önerilmelidir. İnsülin duyarlılığını artıran ilaçlar, özellikle metformin, PKOS tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Metforminin insülin direncini azalttığı, androjenleri düşürdüğü ve menstruasyon sıklığını düzenlediği gösterilmiştir. Adolesan PKOS'lularda özellikle obezite, insülin direnci ve bozulmuş glukoz toleransı varsa önerilmektedir (52). Hirsutizmli adolesan olgulara psikolojik destek de verilmesi gerekmektedir.

2.4. ENDOKRİN BOZUCU KİMYASALLAR

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK), endojen hormonlar ile etkileşime girerek (agonist ve /veya antagonist etkiler ile) endokrin sistem fonksiyonlarını bozan sentetik ya da çevrede doğal olarak bulunan bileşiklerdir. Bu maddeler, hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedirler. Amerika Birleşik Devletleri Çevresel Koruma Ajansı östrojenik, antiöstrojenik ya da antiandrojenik etkiye sahip yüzlerce EBK tanımlamıştır. EBK çeşitli gruplar altında incelenebilir. Başlıca endokrin bozucular; fitoöstrojenler, organohalojenler, pestisitler, ftalatlar, ağır metaller, ilaçlar ve diğerleri

(Bisfenol A, B ve F, Etan dimetan, Sulfonat, Metanol, Benzofenol, N-butyl benzen, 4-nitrotoluen, 2,4-diklorofenol) olarak sayılabilir (53).

EBK'in overler üzerindeki etkileri estrogen reseptörleri (ER α ve ER β) ve androjen reseptörleri (AR) aracılığıyla olabilir. ER α temel olarak Teka hücrelerinde, ER β ise Granulosa hücrelerinde eksprese olur. Endokrin bozucu kimyasallar, ER α ve PPAR γ gibi nükleer reseptörlere doğrudan bağlanarak agonistik etki göstermektedir. Antagonistik olarak bağlanabildiği nükleer reseptörler de vardır (54). Endokrin bozucular ayrıca P450 ailesi üyelerinden CYP19 ve CYP3A1'in enzimatik aktivitesini inhibe edip, testosteronu östradiole dönüştürerek veya P450 enzimlerinin ekspresyonunu aktive ederek dolaylı yolla da etkili olabilmektedir (55).

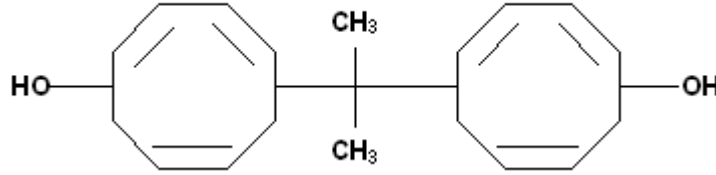
2.4.1. BİSFENOL -A

Bisfenol-A (BPA) bir ksenoöstrojen olup, günlük yaşamda sıklıkla maruz kaldığımız önemli bir kimyasal endokrin bozucudur. Günlük maruziyet, plastik yemek kapları (özellikle ısıtıldığında ya da mikrodalgaya konulduğunda), biberonlar, karbonsuz çıktı kâğıtları gibi çok çeşitli yollarla olmaktadır. Polivinil klorid (PVC) plastikler, kompakt disk, termal faks kâğıtları, boya ve çeşitli içecek kutularının iç yüzeyinin kaplandığı plastik film yapımında BPA kullanılır. Ayrıca diş hekimliğinde beyaz renkli diş dolgu malzemelerinin bileşiminde ve birçok elektrik ve elektronik parça yapımında da kullanılmaktadır (56).

Dünya genelinde toplam BPA üretimi yıllık 6 milyon tondan fazladır (57). CDC raporlarına göre BPA ölçümü yapılan erişkinlerin yaklaşık % 95 inde idrarda BPA saptanmıştır (58). Daha önceki çalışmalarda BPA'nın östrojenik özellikleri olduğu ve plasenta yoluyla ve anne sütü ile geçebileceği gösterilmiştir (59). Çalışmalar depolimerizasyon ile BPA'nın yiyeceklere, formula mamalara ve tükürük salgısına geçebileceğini göstermiştir (60). BPA'nın insan serumunda, foliküler sıvıda, amniyotik sıvıda ve fetal serumda saptanması insanlarda BPA maruziyetinin dramatik artışına işaret etmektedir (61,62). Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde kalan bebeklerde muhtemelen tıbbi cihazlarda fazla kullanılması nedeniyle BPA düzeyleri daha yüksektir (63). Çocuk ve adolesanların idrarlarında BPA düzeyleri erişkinlere göre daha yüksek bulunmuştur (64).

BPA maruziyeti ile overlerde morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler gerçekleştiği gösterilmiştir (65). Granulosa hücreleri; overyan folikül büyümesi, steroidogenez, oositin beslenmesi ve canlılığının devam etmesi için gerekli temel hücrelerdir. Hayvan deneyleri ve in vitro çalışmalarda BPA'nın uterotrofik etki, sperm yapımında azalma, prolaktin salınımında artma gibi östrojenik etkilerinin olduğu bildirilmektedir (66,67). BPA'nın ER α ve ER β reseptörleri

aracılığıyla etki ettiği gösterilmiştir (68). Bisfenol A'nın moleküler yapısı Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Bisfenol A'nın moleküler yapısı.

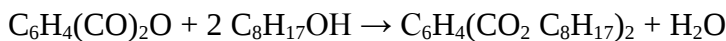
Bisfenol A'nın biyodegradasyonu sırasında minör ve majör olmak üzere iki metabolizma yolu belirlenmiş ve Bisfenol A'nın 4-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksiasetofenon gibi ara bileşiklere ve karbondioksit kadar parçalandığı gösterilmiştir (69). BPA'nın kısa bir biyolojik yarılanma ömrü (5–6 saat) vardır ve faz II metabolizma tarafından glukuronize olarak, alımından sonra hızla idrarda elimine olur (70). Aynı zamanda yağda depolanabilme özelliği de vardır (71).

Avrupa Birliği ve ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) BPA için maksimum kabul edilebilir dozu veya referans dozunu 0.05 mg/kg/gün olarak belirlemiştir (72).

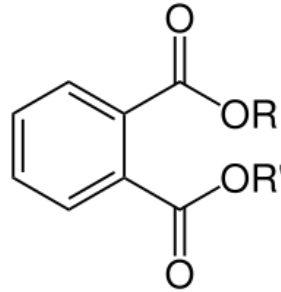
2.4.2. FİTALATLAR

Fitalatlar, fitalik asit esterleri olup, plastiklerin saydamlık, esneklik, dayanıklılık kazandırılmasında sıklıkla kullanılan endüstriyel bileşiklerdir. Özellikle PVC yumuşatılmasında sıkça kullanılmaktadır. Bazı ilaçların enterik kaplarında, makyaj malzemeleri, parfüm, saç spreyi ve kişisel bakım ürünlerinde, tıbbi alet ya da cihazlarda, yapı malzemelerinde, deterjanlar, sıvı sabun, paketlenme ürünleri, yumuşak plastik oyuncaklar, yazıcı mürekkepleri, yapıştırıcılar, elektronik ürünler, boyalar, yiyecekler, tekstil ürünleri gibi hayatımızın her alanında kullanılan pek çok malzemede bulunur (73, 74).

Fitalatlar, birlikte bulundukları plastikler ile aralarında kovalent bağ olmadığı için kolayca çevreye yayılırlar. Plastikler eskidikçe ve kırıldıkça bu yayılma daha da artar (75). Fitalat maruziyeti doğrudan olabileceği gibi genel çevresel kirlenme yoluyla da olabilir. En sık kullanılan fitalatlar; di(2-etilhekzil) fitalat (DEHP), diizodesil fitalat (DIDP) ve diizononil fitalat (DINP) olarak sayılabilir (76). DEHP renksiz bir sıvı olup, yağda çözünür ve suda çözünmez. Fitalik anhidrid ve 2-etilhekzanol reaksiyonu sonucu oluşur.



DEHP ucuz olması ve uygun özellikleri nedeniyle özellikle PVC kaplama üretiminde çok kullanılmaktadır. DEHP için temel kaynak plastik ambalajlarda bulunan gıdalardır.



Şekil 2.8: Fitalatların genel kimyasal yapısı

Dünyada yıllık yaklaşık 3 milyar kilogram DEHP üretilmektedir (77). Plastik ürünlerde % 1-40 oranında bulunur. DEHP medikal ürünlerde (intravenöz tüpler, torbalar, kateterler, nasogastrik sondalar, kan torbaları, havayolu tüpleri vs.) kullanılmaktadır (78). Bu yüzden, özellikle bu malzemelere sıkça maruz kalan, yenidoğan hasta bebekler, sık transfüzyon gerektiren hematolojik hastalar, dializ hastaları gibi gruplarda risk fazladır (79). Avrupa Komisyonu Sağlık ve Çevresel Riskler Bilimsel Komitesi'ne (SCHER) göre, bu özel gruplarda DEHP maruziyeti günlük tolere edilebilir dozun

ötesindedir (80). Amerikan Pediatri Akademisi, DEHP içermeyen alternatif ürünleri önermektedir. Fitalatların insandaki farmakokinetiği ile ilgili bilgiler sınırlıdır. İnsan ve hayvan çalışmalarından elde edilen verilere göre DEHP metabolizması 30'un üstünde metabolitin olduğu bir dizi karmaşık reaksiyon ile gerçekleşir. MEHP (mono-etilhekzil fitalat), DEHP'nin en toksik metabolitlerinden biridir (81).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Katılımcılar

Araştırmaya Ocak 2011 ve Ağustos 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinolojisi Polikliniğine adet düzensizliği ve/veya kıllanma artışı yakınması ile başvuran olgulardan PKOS tanısı alan 13-19 yaş arası 112 olgu alındı. Kontrol grubunu yaş grubu uyumlu, adetleri düzenli ve hirsutizm bulgusu olmayan 35'i obez, 26'sı obez olmayan toplam 61 sağlıklı adolesan kız oluşturdu. Tüm olgular postmenarşyal en az bir yılı

tamamlamıştı. Oligomenore durumunda bu süre en az 2 yıl olarak belirlendi. Tüm olgulara ayrıntılı sistemik fizik muayene yapıldı. Boy ve ağırlık G-TECH marka ve GL-150 model elektronik tartı ve stadiyometre ile ölçüldü. Boy ölçümleri vertikal pozisyonda çıplak ayak ile ayaklar bitişik ve paralel, omuz ve kalçalar cihaza temas edecek şekilde pozisyon sağlandıktan sonra yapıldı. VKİ, ' $ağırlık (kg) / boy (m)^2$ ' formülü ile hesaplandı. Total ve segmental vücut yağ oranı ölçümü BIA yöntemi ile Tanita BC-418MA marka cihaz (Tanita Corporation, Tokyo, Japan) ile yapıldı. En az 10 dk dinlenme sonrası sfingomonometrik yöntemle kan basıncı ölçüldü. Bel çevresi, kostaların alt sınırı ile süperior iliak krestini birleştiren çizginin orta noktasında ve hafif bir ekspiriumun sonunda ölçüldü. Hirsutizm derecelendirmesi aynı hekim tarafından Ferriman-Gallwey skorlaması kullanılarak yapıldı. Herhangi bir hastalığı olanlar, herhangi bir ilaç kullanmakta olanlar ve son 1 yıl içinde OKS yada herhangi bir antiandrojen tedavi veya insülin duyarlılığını artıran ilaç kullanma öyküsü olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından onaylandı. Erciyes Üniversitesi Araştırma projeleri desteği alındı. Tetkiklere başlanmadan önce tüm olgulardan ve ailelerinden bilgilendirilmiş onam alındı.

3.2. Tanımlamalar

3.2.1. PKOS

PKOS tanısı için modifiye Rotterdam ölçütleri kullanıldı. Buna göre; hiperandrojineminin diğer nedenleri (Nonklasik KAH, Cushing sendromu, androjen salgılayan tümörler, hiperprolaktinemi, ekzojen testosteron alımı vb) dışlanmak kaydıyla aşağıdaki 3 ölçütten ikisinin varlığı ile PKOS tanısı konuldu (20).

1. Oligo/anovulasyon (< 6 /yıl adet görme)
2. Klinik ve /veya biyokimyasal hiperandrojenizm
3. Ultrasonografik değerlendirmede PKO saptanması

3.2.2. Obezite

Obezite tanısı yaşa ve cinse göre VKİ ≥ 95 . persentil olması durumunda konuldu (82).

3.2.3. Hirsutizm/ Hiperandrojenemi

Ferriman Gallwey skoru 8 ve üzerinde olanlar hirsutizm olarak kabul edildi. Biyokimyasal hiperandrojenemi tanısı için total testosteron 55 ng/dl üzerinde olması esas alındı (83). 17-OH-

P düzeyi >2 ng/ml olanlarda ACTH uyarı testi yapılarak nonklasik KAH tanısı ekarte edildi (84).

3.2.4. İnsülin direnci

İnsülin direnci (İD) belirteçleri olarak, HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment- Insulin Resistance), QUICK-I (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index), açlık glukoz/ açlık insülin oranı (AGİO), Matsuda indeksi ve OGTT sırasında toplam insülin düzeyleri hesaplandı.

$$HOMA = \text{Açlık insülin } (\mu\text{U /ml}) \times \text{Açlık glukozu (mg/ dl)} / 405$$

$$QUICKI = 1 / [\log (\text{açlık insülin}) + \log (\text{açlık glukoz})] \quad (85)$$

$$10\,000$$

$$\text{Matsuda indeksi} = \frac{1}{\sqrt{[(\text{açlık insülin} \times \text{açlık glukoz}) \times (\text{OGTT sırasında ortalama insülin} \times \text{ortalama glukoz})]}}$$

formülleri ile hesaplandı (86).

İnsülin direnci için, sınır değerler, HOMA-IR >3.16 (87), OGTT sırasında toplam insülin değeri > 300 µU/ml (88), AGİO < 7 (89), QUICKI < 0.357 (90) olarak kabul edildi.

3.3. Ultrasonografik inceleme

USG incelemeler spontan ya da progestin ile oluşturulan menstrual siklusun 2-5. günleri arasında transabdominal olarak Siemens Antares marka cihaz ile konveks prob kullanılarak 5-8 mHz frekans aralığında yapıldı. Ultrasonografide 2-9 mm çapında 12 ve üzerinde folikül görülmesi ya da artmış over volümü (≥10 ml) saptanması durumunda PKO tanısı konuldu (20).

3.4. Laboratuvar Ölçümleri

Kanlar santrifüj edildikten sonra, parametreler serumda çalışılmak üzere analiz anına kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

3.4.1. Hormonal tetkikler

Menstrual siklusun 2-5. günlerinde sabah açlıkta serum FSH, LH, estradiol, 17-OH-P, DHEA-S, androstenedion, total ve serbest testosteron ve SHBG düzeyleri çalışıldı. Serum progesteron düzeyleri ise siklusun ikinci yarısında değerlendirildi.

LH, FSH, estradiol, progesteron, PRL, sT3, sT4 ve TSH düzeyleri ADVIA Centaur XP Siemens marka cihazda uygun ticari kitler kullanılarak immün kemilüminesan yöntem ile çalışıldı. ACTH, kortizol ve insülin düzeyleri ise Immulite 2000 XPi marka cihazda uygun ticari kitler kullanılarak immün kemilüminesan yöntem ile ölçüldü.

Total testosteron, 17-OH-P ve DHEA-S düzeyleri DIAsource marka kit kullanılarak, radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle, serbest testosteron ve androstenedion düzeyleri Immunotech marka kit kullanılarak RIA yöntemi ile ve SHBG düzeyi Immunotech marka kit kullanılarak immunoradiometrik (IRMA) yöntem ile çalışıldı ve Berthold LB 2011 gamma counter cihazında okundu.

3.4.2. Biyokimyasal tetkikler

Tüm olgularda sabah açlıkta alınan kan örneklerinde bazal serum glukoz, trigliserid, total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, ALT, AST düzeyleri çalışıldı. Tüm PKOS olgularında ve obez kontrol grubunda sabah açlıkta 1.75 g/kg (maks. 75 g) ile oral glukoz tolerans testi yapıldı. 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda serum glukoz ve insülin düzeyleri çalışıldı. Serum glukoz ve lipidleri Abbott Architect c16000 cihazında rutin enzimatik yöntemler kullanılarak ölçüldü.

3.4.3. Endokrin bozucu kimyasalların ölçümü

Serum fitalat ve BPA düzeyleri Erciyes Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Metabolizma Biriminde Agilent 1100 series HPLC cihazında çalışıldı.

Kan örnekleri sabah açlıkta, venöz yolla ve plastik ile kontaminasyonun önlenmesi amacıyla düz cam tüplere alındı. Tüpler plastik ile temas etmeyecek ve güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde temiz alüminyum folyo ile kapatıldı. 800 g'de santrifuje edildikten sonra, temiz cam alikotlara alınarak yine alüminyum folyo ile kapatıldı ve çalışılncaya kadar -80 °C'de saklandı.

Bisfenol-A ölçümü

Ölçümler, Agilent 1100 series marka HPLC kromatografik sistem ve C-18 (250 mm X 4.6 mm) kolon kullanılarak yapıldı. Detektör olarak, 227 nm dalga boyunda ekstraksiyon ve 313 nm dalga boyunda emisyon içeren fleurosans detektör kullanıldı. Mobil faz A (%70) asetonitril

ve mobil faz B (%30) su olmak üzere çift pompa kullanılarak işlem gerçekleştirildi. Kromatografik analiz, 25 °C de, 1 ml/dakika akış hızında 20 µl enjeksiyon hacminde yapıldı.

Analizlerde ilk aşama olarak, serum numunelerinin ekstraksiyonu yapıldı. Bunun için, 500 µl numune üzerine 100 µl 0.01 mol/L amonyum asetat tampon ve 4 ml n-hekzan ve dietileterin 70:30 oranında karışımı ilave edildi. Numuneler santrifüj edildikten sonra, organik faz nitrojen akışı altında buharlaştırıldı. Ardından numuneler HPLC uyumlu asetonitril ile 100 µl'ye tamamlanarak analiz edildi.

Çalışmada stok standart solusyonlar 0.50 mg/ml BPA olarak metanol içerisinde hazırlandı. Standart çalışma solusyonları ise, değişen konsantrasyonlarda stok standart solusyonunun yine metanol ile dilüe edilmesi suretiyle elde edildi (91).

Çalışma sonucunda, BPA için retansiyon zamanı 3.7 dk olarak belirlendi. Çalışma standartlarından elde edilen pik alanlarına göre, lineer kalibrasyon eğrisinin çizilerek numunelerin pik alanlarından hesaplama yapıldı.

Fitalat ölçümü

DEHP ve MEHP konsantrasyon ölçümleri, HPLC cihazında (Hewlett Packard Agilent 1100 Series, Viyana, Avusturya) analitik C-18 ODS2 kolonu (250 mm X 4.6 mm, Waters, Milford, MA) kullanılarak yapıldı. Seperasyonlar oda ısısında gerçekleştirildi. Mobil faz 90:10 (hacim/hacim) oranında asetonitril ve %0.1 ortofosforik asit karışımından oluşturuldu. Mobil faz günlük hazırlandı ve akış hızı 1 ml/dk idi. Pikler 230 nm dalga boyunda UV dedektör ile saptandı. Stok standart solüsyonlar 2000 ppm DEHP ve MEHP içerecek şekilde asetonitril içerisinde hazırlandı. Standart çalışma solüsyonları ise, değişen konsantrasyonlarda mobil faz ile stok solüsyonlarının dilüe edilmesi suretiyle hazırlandı. Standart solüsyonlar +4 derecede yaklaşık 1 ay stabil kalabilmektedir. Analiz öncesi ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. 200 µl numune üzerine 400 µl 1 N NaOH ve 100 µl %50 H₃PO₄ ve 600 µl asetonitril ilave edildi. Her bir numune 30 sn süresince 10 dakika 3500 rpm de santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrıldı ve tekrar residü 600 µl asetonitril ile ekstrakte edildi. Aynı koşullar altında ikinci bir santrifügasyondan sonra, süpernatantlar buharlaştırıldı. Son aşamada, 400 µl mobil faz ilavesinden sonra, kromatografi sistemine 100 µl olarak enjekte edildi (92, 93). Kalibrasyon eğrileri, standartların pik alanlarına göre elde edilerek numune konsantrasyonları hesaplandı.

İstatistiksel Analizler

Bu çalışmanın istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics 21.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Veriler, aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{X} \pm SD$) olarak gösterildi. Kategorik değişkenler ki-kare testinin exact yöntemi ile karşılaştırıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Çalışma ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenler için Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis analizinden yararlanıldı. Kruskal Wallis analizi sonucu fark çıkan gruplarda çoklu karşılaştırmalarda parametrik olmayan Dunn testinden yararlanıldı. Parametreler arasındaki korelasyonların incelenmesinde Pearson ve Spearman korelasyon testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ değeri kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya 13-19 yaş arası PKOS'lu 112 ve PKOS olmayan 61 olmak üzere toplam 173 olgu alındı. Verilerin değerlendirilmesinde; olgular öncelikle PKOS olanlar ve kontrol grubu olarak ikiye ayrılarak incelendi. PKOS ve kontrol gruplarının tanımlayıcı özellikleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Ardından obez olup olmama durumuna göre olgular obez-PKOS, obez olmayan-PKOS, obez-kontrol ve obez olmayan-kontrol olmak üzere 4 alt gruba ayrıldı. PKOS ve kontrol gruplarında serum hormon düzeyleri karşılaştırıldığında; PKOS grubunda serum LH, 17-OH progesteron, androstenedion, DHEA-S ve total testosteron düzeyleri anlamlı yüksek bulundu (Tablo 4.2)

Tablo 4.1: PKOS ve kontrol gruplarında antropometrik ve klinik bulguların karşılaştırılması

	PKOS (n= 112)	KONTROL (n= 61)	p
Yaş (yıl)	15.4 $\pm$ 1,2	15.0 $\pm$ 1,7	0,084
Jinekolojik yaş (yıl)	3,2 $\pm$ 1,5	2,7 $\pm$ 1,5	0,022
Boy (cm)	160,4 $\pm$ 6,7	160.0 $\pm$ 5,5	0,498
Ağırlık (kg)	66,9 $\pm$ 18,0	67,3 $\pm$ 15,4	0,547
VKİ (kg/m ²)	25,8 $\pm$ 6,1	26,2 $\pm$ 6,1	0,627
Vücut yağı (%)	33,5 $\pm$ 9,0	34,6 $\pm$ 10,6	0,511
Sistolik kan basıncı (mmHg)	113,6 $\pm$ 12,6	110,3 $\pm$ 11,8	0,336

Diastolik kan basıncı (mmHg)	71,7±9,0	74,6±11,5	0,270
Bel çevresi (cm)	82,3±15,3	83,5±14,1	0,742
Ferriman-Gallwey skoru	15,8±7,6	3,7±3,1	<0,001
Akne (%)	39,4	19,7	0,010
Akantozis nigrikans (%)	25,5	18,0	0,342

Tablo 4.2: PKOS ve kontrol gruplarında serum hormon düzeylerinin karşılaştırılması

	PKOS (n= 112)	KONTROL (n=61)	p
FSH (mIU/ml)	5,7±2,8	5,4±2,1	0,884
LH (mIU/ml)	9,9±6,9	6,6±5,6	0,033
Estradiol (pg/ml)	77,4±68,4	81,8±61,9	0,552
Progesteron (ng/ml)	1,0±1,0	2,2±4,4	0,249
17-OH-Progesteron (ng/ml)	2,1±1,5	1,5±1,9	<0,001
Androstenedion (ng/ml)	2,4±1,3	1,5±0,7	<0,001
DHEA-S (ng/ml)	2544,4±1002,9	1909,1±823,3	0,002
Total testosteron (ng/dl)	96,4±45,3	40,5±26,2	<0,001
Serbest testosteron (pg/ml)	2,5±1,2	1,9±0,4	0,083
SHBG (nmol/l)	34,2±28,6	26,4±16,7	0,338

PKOS ve kontrol gruplarında metabolik parametreler karşılaştırıldığında; serum açlık glukozu, lipidleri ve aminotransferazlar arasında anlamlı fark yoktu (Tablo 4.3). Bazal insülin, HOMA-IR, QUICK-I, Matsuda indeksi ve açlık glukoz/açlık insülin oranları arasında da bir fark bulunmadı. Değişik indeksler kullanılarak değerlendirilen insülin direnci durumunun PKOS ve kontrol gruplarında karşılaştırılması Tablo 4.4’de görülmektedir.

Tablo 4.3: PKOS ve kontrol gruplarında metabolik parametreler ve insülin direnci göstergelerinin karşılaştırılması

	PKOS (n=112)	KONTROL (n=61)	p
Glukoz (mg/dl)	75,0±10,9	77,6±8,9	0,297
Trigliserid (mg/dl)	101,3±50,2	108,8±41,5	0,123
Total kolesterol (mg/dl)	150,1±29,7	155,5±27,1	0,149
HDL-K (mg/dl)	45,8±10,4	46,1±11,2	0,928
LDL-K (mg/dl)	86,7±23,6	86,2±25,4	0,671
ALT (U/L)	20,8±14,4	20,5±8,3	0,245
AST (U/L)	23,3±11,6	22,3±5,1	0,099
İnsülin (mIU/ml)	18,4±20,0	17,1±10,2	0,330
HOMA-IR	3,7±4,4	3,9±2,3	0,067
QUICK-I	0,33±0,03	0,32±0,03	0,132
Matsuda İndeksi	5,1±3,7	3,8±2,1	0,134
Açlık glukoz/insülin oranı	7,1±6,8	6,5±6,1	0,448

Tablo 4.4: PKOS ve kontrol grubunda insülin direnci durumunun karşılaştırılması

	PKOS (n=112) (%)	KONTROL (n=61) (%)	p
Hiperinsülinemi	11,5	6,5	0,522
HOMA-IR > 3,16	39,0	43,6	0,379
QUICK-I < 0,357	71,4	54,8	0,052
AGİO < 7	69,5	57,8	0,115
OGTT sırasında toplam insülin >300 mIU/ml	47,6	62,1	0,210

Obez olgular kendi aralarında karşılaştırıldığında; PKOS olan ve olmayanlar arasında insülin direnci belirteçleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.5). Öte yandan, PKOS olguları obezite durumuna göre, kendi içinde karşılaştırıldığında; obez PKOS'lu grupta insülin direnci, obez olmayan PKOS olgularına göre belirgin artmış bulundu (Tablo 4.6).

Tablo 4.5: Obez PKOS ve obez kontrol gruplarında insülin direnci durumunun karşılaştırılması

	Obez PKOS (%)	Obez KONTROL (%)	p
Hiperinsülinemi	18,8	6,9	0,192
HOMA-IR > 3,16	54,2	69,6	0,303
QUICK-I < 0,357	91,8	82,1	0,273
AGİO < 7	91,8	75,0	0,086
OGTT sırasında toplam insülin >300 mIU/ml	67,3	64,3	0,807

Tablo 4.6: Obez ve obez olmayan PKOS olgularında insülin direnci durumunun karşılaştırılması

	Obez PKOS (%)	Obez olmayan PKOS (%)	p
Hiperinsülinemi	18,8	5,8	0,061
HOMA-IR > 3,16	54,2	25,0	0,004
QUICK-I < 0,357	91,8	53,6	<0,001
AGİO < 7	91,8	50,0	<0,001
OGTT sırasında toplam insülin > 300 mIU/ml	67,3	30,4	<0,001

PKOS'lu olgular, obez olanlar ve olmayanlar olarak ayrıldığında, tablo 4.7'de görüldüğü üzere, VKİ, vücut yağı yüzdesi, kan basıncı, bel çevresi ve akantozis nigrikans varlığı açısından gruplar arasında anlamlı fark vardı. Hormon tetkiklerinden, obez PKOS grubunda serum SHBG düzeyleri anlamlı düşük ve serbest testosteron düzeyi anlamlı yüksekti. İnsülin direnci belirteçleri ve LDL dışındaki açlık lipidleri de gruplar arası anlamlı farklı idi (tablo 4.8).

Tablo 4.7: Obez ve obez olmayan PKOS olgularında klinik ve antropometrik parametrelerin karşılaştırılması

	Obez PKOS (n=52)	Obez olmayan PKOS (n=60)	p
Yaş (yıl)	15,4±1,2	15,5±1,2	0,937
Jinekolojik yaş (yıl)	3,3±1,5	3,2±1,5	0,788
VKİ (kg/m ²)	31,1±4,7	21,2±2,1	<0,001
Vücut yağ yüzdesi (%)	41,5±6,4	27,2±5,0	<0,001
Sistolik kan basıncı (mmHg)	119,1±14,2	108,5±8,2	<0,001
Diastolik kan basıncı (mmHg)	74,3±10,5	69,2±6,5	0,018
Bel çevresi (cm)	96,5±11,3	71,6±6,0	<0,001
Ferriman-Gallwey skoru	15,7±8,1	15,8±7,3	0,719
Akne (%)	34,7	43,3	0,236
Akantozis nigrikans (%)	50,0	5,0	<0,001

Tablo 4.8: Obez olan ve obez olmayan PKOS olgularında hormon düzeyleri ve metabolik parametrelerin karşılaştırılması

	Obez PKOS (n=52)	Obez olmayan PKOS (n=60)	p
FSH (mIU/ml)	5,3±1,5	6,1±3,6	0,041
LH (mIU/ml)	9,6±6,4	10,2±7,4	0,871
Estradiol (pg/ml)	67,1±43,5	86,9±84,6	0,513
Progesteron (ng/ml)	1,3±1,6	0,8±0,5	0,750
17-OH-Progesteron (ng/ml)	2,1±1,3	2,2±1,6	0,726
Androstenedion (ng/ml)	2,5±1,3	2,4±1,3	0,711
DHEA-S (ng/ml)	2506,6±984,5	2576,8±1026,0	0,788
Total testosteron (ng/dl)	99,3±40,1	93,8±49,5	0,169
Serbest testosteron (pg/ml)	3,1±1,4	2,1±0,96	0,002
SHBG (nmol/l)	25,2±27,9	41,3±27,6	<0,001

Glukoz (mg/dl)	82,8±9,3	79,8±10,2	0,289
Trigliserid (mg/dl)	113,3±60,6	90,4±35,6	0,106
Total kolesterol (mg/dl)	154,1±31,1	146,4±28,2	0,216
HDL-K (mg/dl)	42,0±8,5	49,2±10,7	<0,001
LDL-K (mg/dl)	90,8±24,0	82,7±22,7	0,131
ALT (U/L)	26,4±18,9	15,8±4,9	<0,001
AST (U/L)	25,3±15,9	19,6±4,2	0,006
İnsulin (mIU/ml)	24,5±25,2	13,1±12,0	<0,001
HOMA-IR	5,1±5,6	2,5±2,3	<0,001
QUICK-I	0,32±0,02	0,35±0,04	<0,001
Matsuda İndeksi	3,5±2,5	6,6±4,1	<0,001
AGİO	4,7±3,6	9,2±8,2	<0,001

PKOS grubunda serum BPA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0,001$). PKOS olan ve olmayan olgular arasında serum MEHP ve DEHP düzeyleri arasında fark saptanmadı (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: PKOS ve kontrol gruplarında serum BPA, MEHP ve DEHP düzeylerinin karşılaştırılması

	PKOS (n= 112)	KONTROL (n=61)	p
BPA (ng/ml)	1,1±0,4	0,8±0,3	0,001
MEHP (µg/ml)	0,29±0,2	0,36±0,3	0,303
DEHP (µg/ml)	2,6±0,3	2,7±0,4	0,387

Tüm olgularda serum BPA düzeyleri ile anlamlı korelasyon gösteren klinik, hormonal ve metabolik parametreler tablo 4.11’ de özetlenmiştir.

Tablo 4.10: Tüm çalışma grubunda serum BPA düzeyleri ile anlamlı korelasyon gösteren klinik, hormonal ve metabolik parametreler

	r	p
Jinekolojik yaş	0,29	0,01
Ferriman-Gallwey skoru	0,43	<0,001
Total testosteron	0,52	<0,001
Serbest testosteron	0,44	0,009
DHEA-S	0,37	0,004

PKOS’lu adolesanlarda (n=112) serum BPA düzeyleri ile klinik, hormonal ve metabolik parametrelerin korelasyonlarına bakıldığında da benzer sonuçlar elde edildi: Total testosteron (r= 0,53; p=<0,001), yaş (r=0,33; p=0,02), jinekolojik yaş (r=0,32; p=0,02), DHEA-S (r=0,41; p=0,006). Ancak PKOS olmayan grupta (n=61) BPA düzeyleri ile hiçbir parametre arasında ilişki bulunmadı.

Tablo 4.11: Tüm çalışma grubunda serum MEHP düzeyleri ile anlamlı korelasyon gösteren klinik, hormonal ve metabolik parametreler

	r	p
Bel çevresi	0,28	0,02
Glukoz	0,26	0,02
Total kolesterol	0,27	0,03
AST	0,32	0,009
İnsülin	0,40	0,002
HOMA-IR	0,46	<0,001

Serum MEHP düzeyleri tüm grupta bel çevresi, glukoz, total kolesterol, AST ve insülin direnci ile ilişkili idi (Tablo 4.11).

PKOS’lu olgularda ise özellikle insülin direnci ve transaminazlar ile olan ilişki daha kuvvetli bulundu (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: PKOS’lu olgularda serum MEHP düzeyleri ile anlamlı korelasyon gösteren klinik, hormonal ve metabolik parametreler

	r	p
Bel çevresi	0,29	0,04
Glukoz	0,35	0,01
İnsulin	0,53	<0,001
AST	0,52	<0,001
ALT	0,37	0,01
HOMA-IR	0,60	<0,001
Toplam insülin (ogtt)	0,37	0,01

Serum DEHP düzeyleri tüm grupta MEHP, serum sialik asit düzeyleri, insülin direnci ve açlık lipidleri ile korele bulundu (tablo 4.13).

Tablo 4.13: Tüm çalışma grubunda serum DEHP düzeyleri ile anlamlı korelasyon gösteren klinik, hormonal ve metabolik parametreler

	r	p
MEHP	0,29	0,01
İnsulin	0,30	0,01
HOMA-IR	0,31	0,01
QUICK-I	-0,31	0,01
Matsuda indeksi	-0,29	0,02
Toplam insülin (ogtt)	0,27	0,03
Total kolesterol	0,39	0,01
Trigliserid	0,32	0,02

PKOS ve obez gruplar kendi içinde incelendiğinde, DEHP ile insülin direnci arasındaki ilişki daha kuvvetli idi (tablo 4.14 ve tablo 4.15). Ayrıca, obez adolesanlar içinde MEHP ve DEHP'nin birbirleri ile korelasyonu daha belirgindi (tablo 4.15).

Tablo 4.14: PKOS'lu adolesanlarda serum DEHP düzeyleri ile anlamlı korelasyon gösteren klinik, hormonal ve metabolik parametreler

	r	p
Total kolesterol	0,37	0,01
Trigliserid	0,36	0,02
İnsülin	0,31	0,02
HOMA-IR	0,33	0,02
Toplam insülin (ogtt)	0,40	0,003
Matsuda indeksi	-0,34	0,01

Tablo 4.15: Obez adolesanlarda serum DEHP düzeyleri ile anlamlı korelasyon gösteren klinik, hormonal ve metabolik parametreler

	r	p
Bel çevresi	0,35	0,02
MEHP	0,40	0,009
Total kolesterol	0,39	0,01
Trigliserid	0,41	0,007
LDL	0,32	0,03
İnsülin	0,42	0,007
HOMA-IR	0,44	0,004
QUICK-I	-0,42	0,006
Toplam insülin (ogtt)	0,33	0,03
Matsuda indeksi	-0,36	0,02

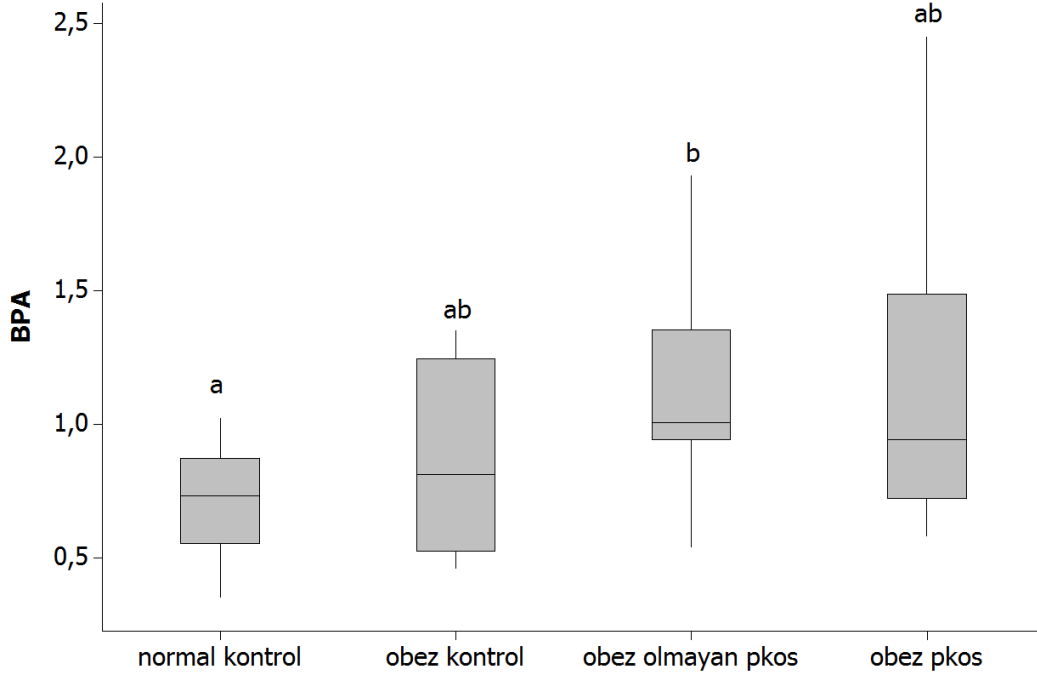
Çalışma grubunda serum LH/ FSH oranının, çalışmada incelenen hormon düzeyleri ve endokrin bozucu kimyasallar ile ilişkisine bakıldığında, sadece total testosteron ile pozitif ilişkili olduğu görüldü ($r=0,27$, $p=0,003$).

Obez olan ve olmayan olgular arasında çalışmada incelenen endokrin bozucuların karşılaştırılması tablo 4.16’de görülmektedir.

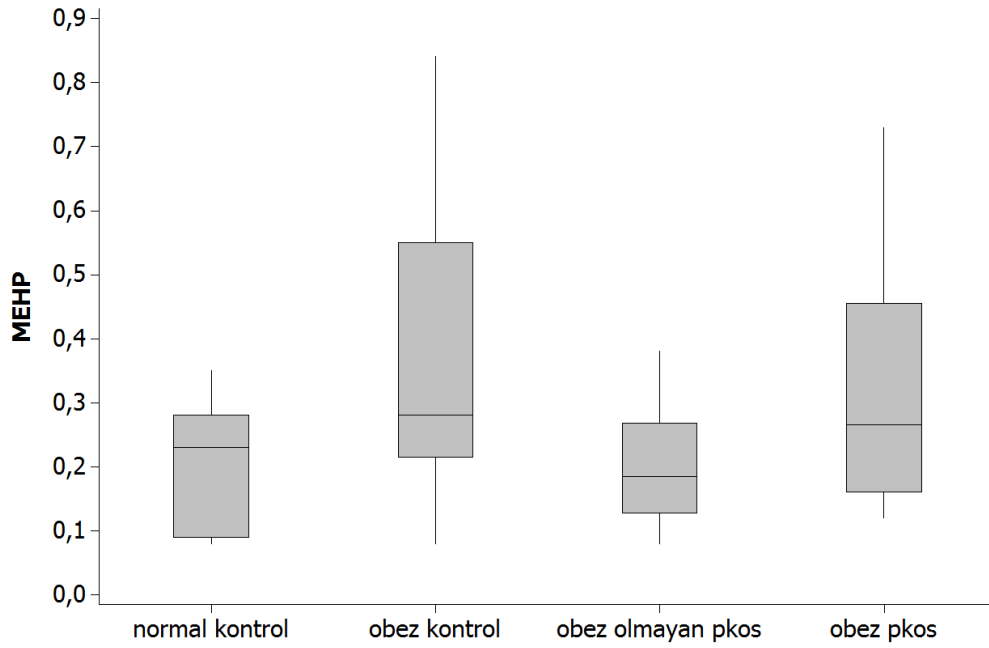
Tablo 4.16: Obez ve obez olmayan gruplarda BPA, MEHP ve DEHP düzeylerinin karşılaştırılması

	Obez olgular (n=87)	Obez olmayan olgular (n=86)	p
BPA (ng/ml)	1,0±0,4	1,0±0,4	0,904
MEHP (µg/ml)	0,38±0,3	0,21±0,1	0,006
DEHP (µg/ml)	2,6±0,3	2,7±0,3	0,654

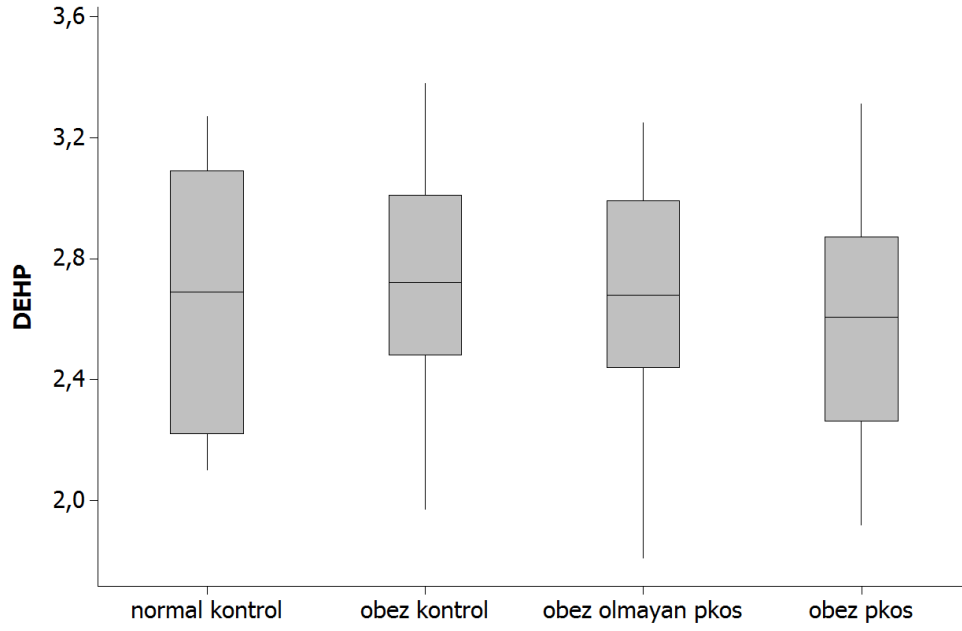
Serum BPA düzeyleri PKOS grubunda, kontrollere göre yüksek olmakla birlikte ($p=0,001$), olgular alt gruplara ayrıldığında bu farkın özellikle normal kilolu bireyler arasında olduğu görüldü. Obez PKOS grubunda serum BPA düzeyleri hem obez, hem normal kilolu kontrollere göre yüksek olmakla beraber bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Obez ve normal kontrol grubu arasında da anlamlı fark yoktu. PKOS’lu adolesanlarda, PKOS olmayanlara göre serum BPA düzeyleri obeziteden bağımsız olarak yüksek bulundu. (Grafik 4.1)



Grafik 4.1: PKOS ve obezite durumuna göre alt gruplarda BPA düzeylerinin karşılaştırılması. Grafikte farklı harflerle kodlanan (aynı harfi içermeyen) altgruplar arasında bulunan p değeri <0.05 tir



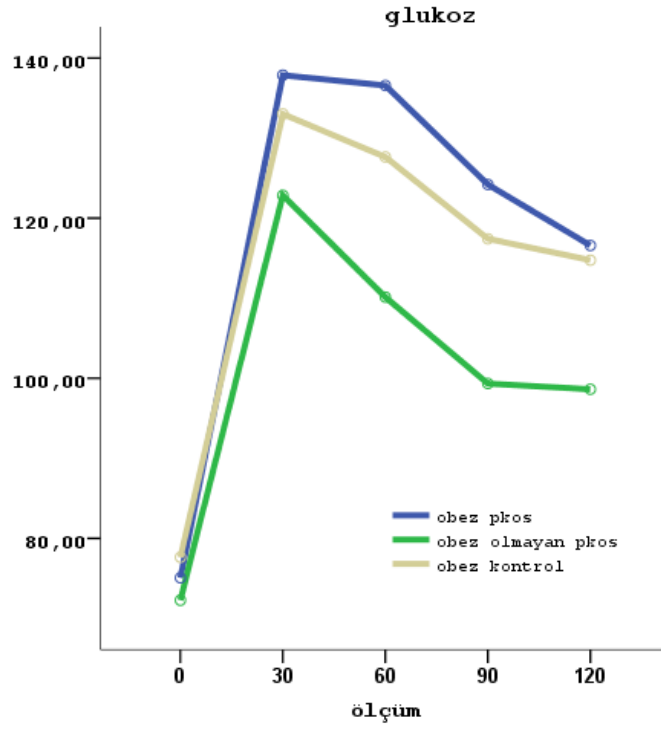
Grafik 4.2: PKOS ve obezite durumuna göre alt gruplarda MEHP düzeylerinin karşılaştırılması



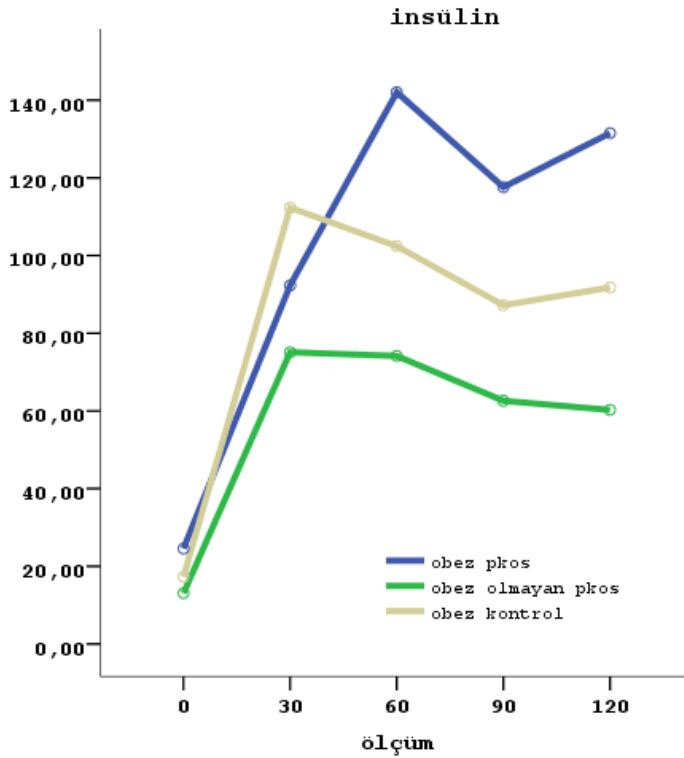
Grafik 4.3: PKOS ve obezite durumuna göre alt gruplarda DEHP düzeylerinin karşılaştırılması

PKOS ve obezite durumuna göre ayrılmış alt gruplarda serum MEHP ve DEHP düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı. (Grafik 4.2 ve Grafik 4.3)

OGTT sonuçları değerlendirildiğinde; glukoz düzeyleri obez PKOS'lu adolesanlarda ve PKOS olmayan obezlerde normal kilodaki PKOS olgularına göre yüksekti (grafik 4.7). Benzer şekilde, OGTT sırasında insülin düzeyleri de obez PKOS grubunda en yüksek seyretti (grafik 4.4).



Grafik 4.4: Obez PKOS, obez olmayan PKOS ve obez kontrol gruplarında OGTT sırasında glukoz düzeylerinin karşılaştırılması



Grafik 4.5: Obez PKOS, obez olmayan PKOS ve obez kontrol gruplarında OGTT sırasında insülin düzeylerinin karşılaştırılması

OGTT sırasında eş zamanlı 0., 30., 60., 90., 120. dakikalarda alınan tüm örneklerde obez PKOS grubunda, obez olmayan PKOS grubuna göre glukoz değerleri anlamlı yüksekti. PKOS olmayan obez kontrollerde ise 90. ve 120. dk glukoz değerleri obez olmayan PKOS olgularına göre yüksek bulundu. Obez olgular içinde ise, PKOS olan ve olmayanlar arasında glukoz ölçümleri arasında fark yoktu (Tablo 4.21). Gruplar arasında OGTT sırasında insülin değerlerinin karşılaştırılması ise tablo 4.17 de görülmektedir.

Tablo 4.17: OGTT sırasında eş zamanlı alınan glukoz ve insülin değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

OGTT esnasında		Obez PKOS - Obez olmayan PKOS	Obez PKOS - Obez Kontrol	Obez Kontrol – Obez olmayan PKOS
0.dakika	Glukoz (mg/dl)	*		
	İnsülin (µg/dl)	*		*
30.dakika	Glukoz (mg/dl)	*		
	İnsülin (µg/dl)	*		
60.dakika	Glukoz (mg/dl)	*		
	İnsülin (µg/dl)	*		*
90.dakika	Glukoz (mg/dl)	*		*
	İnsülin (µg/dl)	*		
120.dakika	Glukoz (mg/dl)	*		*
	İnsülin (µg/dl)	*		

*: $p < 0.05$

TARTIŞMA VE SONUÇ

PKOS etiyolojisi ve patogenezi henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. PKOS'da endokrin anormallikler; hipotalamus, hipofiz, overler, adrenal bezler, pankreas, karaciğer ve yağ dokudaki bozukluklar sonucu olabilir (94, 95). Bu çalışmanın verileri ilk planda PKOS'un obezite ve insülin direnci ile ilişkisi ve incelenen metabolik parametrelerin PKOS etiyopatogenezindeki rolü çerçevesinde tartışılacaktır. Ardından PKOS'da hiperandrojeneminin overyan ve adrenal bileşenleri ve bunun metabolik parametrelerle ilişkisi irdelenecektir. Üçüncü bölümde ise PKOS'un çevresel faktörler ayağını incelemeye yönelik, araştırmamızın temel konusunu oluşturan endokrin bozucular, ftalatlar (MEHP ve DEHP) ve BPA'nın PKOS etiyopatogenezinde çeşitli basamaklardaki olası etkileri incelenecektir.

Obezitenin PKOS patofizyolojisinde olumsuz etkileri ile ilgili çok sayıda veri olmakla birlikte, PKOS'un obezite için predispozan bir etken olduğuna dair kesin kanıt yoktur (96). Benzer şekilde, PKOS ve insülin direnci birlikteliği çok sayıda çalışmada bildirilmiş olmakla birlikte, insülin direncinin PKOS'un kardinal bulguları olan hiperandrojenizm, PKO ve kronik anovulasyon riskini artırdığına dair kanıtlar sınırlı ve tartışmalıdır (97, 98). Obezite, erişkin PKOS olgularının % 40-50'sinde görülmektedir (99, 100). Obezite prevalansı genel kadın popülasyonuna göre, PKOS'lu hastalarda artmıştır. PKOS sıklığı ise obezlerde, normal kilolulara göre fazladır (101). Liang ve ark. (102) PKOS'lu kadınlarda metabolik sendrom ve bozulmuş glukoz toleransı riski açısından esas belirleyicinin vücut ağırlığı olduğunu ortaya koymuşlardır. Hiperinsülinemi ve/veya insülin direnci normal kilolu olanlarda daha az olmakla birlikte (%50) PKOS'lu kadınlarda sıklıkla görülür (103). Adolesan PKOS'lularda obezite sıklığının %35-80, insülin direncinin ise %25 civarında olduğu bildirilmiştir (104-106). Bu yaş grubunda PKOS olgularında insülin direncinin obezite ile ilişkisi konusunda farklı sonuçlar vardır (107). Bu çalışmada noninvazif yöntemler kullanılarak insülin direncini gösteren mevcut indeksler hesaplandı. Obez adolesanlarda PKOS olsun olmasın insülin direnci belirgin artmış bulundu. PKOS'lu olgular arasında obez olanlarda insülin direnci obez olmayanlara göre anlamlı yüksekti. Buna karşılık, obez PKOS'lularda insülin direnci açısından obez kontrollere göre fark yoktu. Bu bulgular, adolesan PKOS olgularında insülin direncini belirlemede obezitenin asıl belirleyici olduğunu düşündürmektedir.

PKOS'da insülin reseptöründe, yapısal, sayısal ya da bağlama afinitesi ile ilgili bozukluk saptanmadığından, insülin direncinden büyük olasılıkla postreseptör mekanizma sorumludur (108,109). Hiperandrojenizm yağ hücrelerinin fonksiyonunu düzenleyerek dolaylı yoldan

insülin direncine katkıda bulunur (110). Yapılan çalışmalar sistemik insülin direnci durumuna her dokunun Akt fosforilasyon ya da henüz tanımlanmamış mekanizmalar yoluyla farklı biçimde yanıt verebileceğini düşündürmektedir (111). PKOS'lu bireylerde paradoksik olarak, sistemik insülin direncine karşılık overler insülin etkisine duyarlıdır. Bu nedenle, insülin reseptör blokajı, insülinin overlerde kendi reseptörü üzerinden testosteron yapımı uyarısını azaltır (112).

PKOS için 1960'lardan beri çeşitli hayvan modelleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (113-115). Farklı modellerin farklı avantaj ve dezavantajları olmakla birlikte bu karmaşık klinik tablonun tüm özelliklerinin oluşturulduğu tek bir model henüz yoktur. Artırılmış testosteron düzeyleri ile oluşturulan rodent PKOS modellerinde insanda görülen PKOS tablosunun hormonal ve metabolik pek çok özelliği geliştirilmiştir (114). Bu durum hiperandrojeneminin asıl patoloji olduğunu düşündürür. Öte yandan insülin/ leptin reseptör 'knockout' farelerde PKOS'daki reproduktif bozukluklar ortaya çıkmıştır ve obezite ve insülin direncinin PKOS'da rolü olduğunu düşündürmüştür (115).

İnsan çalışmalarında da PKOS'da hiperinsülinemi ve hiperandrojeneminin hangisinin diğerine neden olduğu ya da her ikisinin bağımsız faktörler mi olduğu tartışılmaktadır (44). PKOS'lu kadınlarda bilateral oofektomi, uzun etkili GnRH kullanımı ya da antiandrojen kullanımına rağmen hiperinsülineminin devam etmesi, artmış androjen yapımını asıl belirleyen faktörün hiperinsülinemi olduğunu düşündürmektedir (34, 116). PKOS'da oksidatif stres ve inflamasyonun hem moleküler hem dolaşımdaki belirteçlerinin androjenlerle ilişim gösterdiği bulunmuştur (117, 118). Bu durum hiperandrojeneminin tetiklediği hiperglisemi ilişkili inflamasyon ya da tam tersi, glukoz-uyarılı inflamasyonun overlerden androjen yapımını uyarması şeklinde açıklanabilir (117). Bu çalışmada obez ve normal kilolu PKOS olguları hiperandrojenemi açısından karşılaştırıldığında, obez olgularda SHBG düşük, serbest testosteron düzeyleri yüksek bulundu. PKOS olgularının % 39'unda HOMA-IR yüksekti. HOMA-IR yüksek ve normal olgularda androjen düzeylerine bakıldığında ise, IR olan grupta serbest testosteron düzeylerinin arttığı görüldü.

İnsülinin PKOS'lu bireylerde hiperandrojenemiye artıracak doğrudan ve dolaylı etkileri vardır (119, 120). İnsülin doğrudan overlerden androjen sekresyonunu artırabilir ya da LH uyarılı androjen yapımını artırabilir (121). Dolaylı olarak ACTH uyarılı androjen yapımını ve GnRH uyarısına bağlı LH pulsunun amplitüdünü artırabilir. Hepatik SHBG yapımını ve/veya IGFBP-1 yapımını azaltır ve böylece serbest testosteron ve androjen yapımını artıran IGF-1 artar (122, 123). İnsülinin ayrıca PKOS için karakteristik olan mid-antral foliküler duraklamada

katkısı vardır (124). Bu çalışmada, hiperandrojenemi tanı ölçütleri olarak total ve serbest testosteron alınmakla birlikte PKOS grubunda adrenal androjenler anlamlı yüksek bulunmuştur.

PKOS etiyolojisinde artmış P450c17 aktivitesinin rol oynadığı gösterilmiş olup bu enzimi düzenleyen moleküler faktörlerin incelenmesi güncel bir araştırma alanıdır (125). PKOS'lu kadınların over dokularındaki in vitro çalışmalarda Teka hücrelerinde steroidojenik enzimlerin (özellikle P450c17, 3 β hidroksisteroid dehidrogenaz) aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir (126). PKOS'lu kadınların % 25 inde ACTH uyarısına aşırı yanıt gözlemlendiği ve dolayısıyla DHEA, DHEA-S ve androstenedionun arttığı bildirilmiştir (40). Bu çalışmada hirsutizm nedeniyle başvuran tüm olgularda hiperandrojeneminin diğer nedenlerini dışlamaya yönelik yapılan bazal hormon düzeyleri ve ACTH uyarı testleri ile geç başlangıçlı KAH tanısı alan olgular çalışma dışı bırakıldı. Bununla birlikte, serum 17-OHP, androstenedion ve DHEA-S düzeyleri PKOS grubunda anlamlı yüksek bulundu.

PKOS'da en sık gözlenen nöroendokrin bozukluk, GnRH puls sıklığındaki artıştır. Bu durum hipofizden LH salınımının ve LH/ FSH oranının artışına neden olur (127). Yüksek LH yoğunlukları Teka hücrelerinden androjen üretimine ve göreceli FSH eksikliği de Granulosa hücrelerinde androjenlerin östrojene aromatisasyonunun azalmasına, foliküler gelişimin, luteal progesteron yapımının azalmasına ve dolayısıyla kalıcı hiperandrojenizm ve ovulatuvar disfonksiyona neden olur (44). Çalışmalardan elde edilen veriler PKOS'da GnRH salınım sıklığındaki bu artışın, endojen olmaktan çok, overyan geri bildirim mekanizması ile ilgili bir bozukluktan kaynaklandığını desteklemektedir (128, 129). Fizyolojik olarak, luteal fazda salınan progesteron, GnRH salınım sıklığını azaltır. Ayrıca ekzojen progesteron verilmesiyle de benzer etki elde edilir (130). PKOS'da endojen progesteron yetersizliğinin yanı sıra androjen etkisiyle hipotalamik progesteron reseptörlerinde duyarsızlaşma da söz konusudur. Bu durum kısır döngü şeklinde LH salınımını ve androjen yapımını artırır (131). Bu çalışmada total testosteron düzeyleri ve LH/ FSH oranı arasındaki pozitif ilişki bu durum ile açıklanabilir. Çalışmamızda incelenen çevresel faktörler (BPA ve ftalatlar) ve oksidatif stres belirteçlerinin bu oranda etkili olabileceği düşünülmüş ancak böyle bir ilişki saptanmamıştır.

PKOS etiopatogenezinde, genetik yatkınlık zemininde çevresel faktörlerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Hızla endüstrileşen dünyamızda, bu değişime paralel olarak üreme sistemi ile ilgili sorunlarda artış olduğu dikkat çekmektedir (1-3). İnsan dişi germ hücreleri ilk trimesterde farklılaşmaya başlar. Primordial foliküller ikinci ve üçüncü trimesterde oluşur. Bu foliküller 15-50 yıl gibi uzun bir dönem sessiz kalabilirler (132). PKOS'da primordial

foliküllerden primer foliküllere geçiş hızlanmıştır ve her bir primer foliküldeki Granulosa hücresi sayısı artmıştır. Daha sonra bu foliküller dominant folikül gelişimi ya da atrezi olmaksızın overyan kortekste birikirler. Oositler vücuttaki en uzun ömürlü, yenilenmeyen hücreler olup, yaşam boyu ölçümü zor olan çevresel faktörlere maruz kalırlar (133). Yine de normal over gelişimi göz önüne alındığında ve hayvan çalışmaları ve insanlardaki epidemiyolojik çalışmalar değerlendirildiğinde overlerin endokrin bozucu kimyasallara duyarlı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada esas olarak, günlük yaşamımızda sıklıkla maruz kaldığımız endokrin bozucu kimyasallardan BPA ve ftalatların PKOS patofizyolojinde olası rolü incelenmek istenmiştir.

Deneysel çalışmalarda, BPA'nın overyan steroidogenez, folikülogenez ve over morfolojisinde değişiklik yaptığı gösterilmiştir (134-136). BPA düzeylerinin cinsiyetler arasında farklılık gösterdiği ilk kez Takeuchi ve ark (137) tarafından gösterildi (erkeklerde ort 1.49 ± 0.11 ng/ml, kadınlarda 0.64 ± 0.10 ng/ml). Aynı ekip tarafından küçük bir grupta yapılan bir çalışmada BPA düzeyleri ovulatuvar fonksiyon bozukluğu olan kadınlarda olmayanlara göre yüksek bulunmuştur. Bahsedilen bu çalışmada 19 PKOS ve 26 düzenli adet gören kadının ELISA yöntemiyle ölçülen serum BPA düzeyleri incelenmiş ve VKİ ($r=0.50$ $p<0.001$), total testosteron ($r=0.39$, $p<0.001$), androstenedion ($r=0.68$ $p<0.001$), DHEA-S ($r=0.51$ $p<0.001$) ve serbest testosteron ($r=0.50$, $p<0.001$) düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdikleri saptanmıştır (138). Hem erkeklerde hem hiperandrojenemik kadınlarda BPA düzeylerinin yüksek olması olası iki nedeni akla getirmiştir. Birincisi, BPA'nın androjen yapımını stimüle etmesi, ikincisi ise androjen metabolizması ve atılımının BPA tarafından inhibe edilmesidir. Bu etkilerin iki yönlü olduğu ileri sürülmektedir. Şöyle ki, in vitro çalışmalarda BPA'nın overyan Teka hücrelerinde testosteron sentezini artırdığı gösterilmiştir (139). Öte yandan, androjenler BPA'nın karaciğerden eliminasyonunu inhibe ederler. BPA karaciğerde mikrosomlar tarafından glukronide olur ve bir uridin difosfat–glukronozil transferaz (UGT) izoformu tarafından katalize edilerek, hızla feçesle ve idrarla vücuttan atılır. UDP aktivasyonunun androjenler tarafından azaltıldığı bildirilmiştir (140). Ayrıca BPA karaciğerde androjen metabolizmasını bozar ve SHBG'e kuvvetle bağlanarak serbest androjen artışına neden olur (141). BPA, testosteron hidroksilasyon metabolizmasını inhibe eder ve testosteron ile arasında bir kısır döngü oluşur (138). Bu çalışmada serum BPA düzeyleri PKOS olgularında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. BPA, hem genelde, hem PKOS'lu olgular arasında, total ve serbest testosteron ve DHEA-S düzeyleri ile önemli derecede ilişkili idi. Xu ve ark. (142) fare Granulosa hücrelerinde BPA'nın Granulosa hücre proliferasyonunu inhibe

ettiğini bildirdiler. Graselli ve ark. (66) domuz over folikülleri üzerindeki in vitro çalışmada BPA'nın steroidogenezi etkileyerek Granulosa hücre fonksiyonunu bozduğunu ortaya koydular. Ayrıca BPA'nın test edilen tüm konsantrasyonlarda progesteron sentezini inhibe ettiğini buldular. Bu çalışmada BPA ile progesteron arasında bir ilişki saptanmamış olmakla birlikte, PKOS patofizyolojisinde iyi bilinen progesteron azlığının PKOS'da artmış bulunduğumuz BPA ile alakalı olduğu düşünülebilir.

Yenidoğan ratlarda, Bisfenol-A içeren tekrar kullanılabilen plastik konteynerlere maruz bırakıldıklarında PKOS benzeri metabolik ve endokrin bozukluklar olduğu gözlenmiştir. BPA, serum testosteron, östradiol ve progesteron düzeylerini değiştirerek fertilitiyi azaltmıştır (143). Yakın zamanda BPA'ya maruz bırakılan yenidoğan ratlarda PKOS benzeri tablo geliştiği ve insülin salınımı ve glukoz metabolizması ile ilgili bozukluklar ortaya çıktığı gösterilmiştir (144). Bugüne kadar literatürde insanda PKOS ve BPA ilişkisini inceleyen iki çalışma mevcuttur (12, 138). Bunlardan ilkinde, çalışma grubu oldukça heterojen olup, 6'sı obez olmak üzere toplam 19 PKOS olgusu dahil edilmiştir (138). İkinci çalışmada ise, Kandaraki ve ark (12) 71 PKOS'lu kadın ve kontrol grubunda yaptıkları çalışmada PKOS'lu grupta BPA düzeylerini yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, BPA düzeyleri ile total testosteron ($r=0,19$ $p<0.05$), androstenedion ($r=0,25$ $p<0.05$) ve Matsuda indeksi ($r=0,27$ $p<0.05$) arasında ilişki bulunmuştur. Bizim çalışmamız ise, literatürde bu konudaki üçüncü çalışma olup, adolesan yaş grubundaki PKOS'lu hastalarda serum BPA düzeylerinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Ayrıca olgularda OGTT yapılarak, PKOS-BPA ve insülin direnci ve dislipidemi ilişkisinin incelenmiş olması bakımından da özgün ve değerlidir.

Yenidoğan BPA maruziyetinin PKOS'un diğer metabolik bileşenlerine neden olup olmayacağı araştırma konusudur. Literatür incelendiğinde, özellikle deneysel çalışmalarda, BPA'nın hem insülin hem androjenler ile ilgili mekanizmalarla alakalı olduğu görülmüştür (195, 144, 145). Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmaların sonuçları BPA'nın hormon sinyal yolları üzerindeki etkilerinin çok geniş ve karmaşık olduğu yönünde birleşmektedir (146). BPA, ER α ve ER β dışında androjen reseptörüne de bağlanabilir (147). BPA östradiole benzer şekilde glukozu düşürür ve insülini artırır. Yakın zamanda, BPA'nın insan serumunda bulunabilen konsantrasyonlarda Langerhans adacık hücrelerinde östrojen reseptörü ER α aracılığı ile pankreatik insülin salınımını düzenleyebildiği gösterildi (145). Bu durum BPA maruziyetinin glukoz homeostazı ile ilgili hastalıklara yol açabileceğini düşündürmektedir.

İnsan çalışmalarına bakıldığında, NHANES 2003-2004 verilerine göre, ABD erişkin popülasyonunu temsil eden bir grupta idrar BPA düzeyleri ile kardiyovasküler hastalık, tip 2 diyabet ve hepatik enzim bozuklukları arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (148). Hayvan deneyleri ve hücre kültürü çalışmalarında bu yanıtın biyolojik temellerini açıklayan bulgular vardır (145-147). PKOS klinik yelpazesi göz önünde bulundurulduğunda, yukarıda bahsedilen metabolik bozuklukların ortak oluşu, BPA'nın PKOS patogeneğinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu etki androjenler üzerinden olabileceği gibi, insülin direnci yolu ile gerçekleşebileceği de öne sürülebilir. PKOS etiopatogeneğinde sorumlu olduğu düşünülen hiperandrojenemi, hiperinsülinemi ve oksidatif stres birlikteliği dikkate alındığında PKOS grubundaki BPA artışının sadece androjen metabolizmasında bir inhibisyonla kaynaklanmadığını ve BPA'nın bu yolları stimüle eden bir unsur olabileceğini düşünülebilir. Ancak çalışmamızda serum BPA düzeyleri ile insülin direnci göstergeleri arasında bir ilişki bulunmazken, androjenler ile kuvvetli korelasyon saptanmış ve mevcut verilerle bu hipotez doğrulanamamıştır.

Fitalatlar ile ilgili bölüme gelindiğinde, özellikle literatürde bize PKOS etiopatogeneğinde fitalatların rolü olabileceğini düşündüren yayınlar tartışılacaktır. Yılda 1-4 milyon ton üretimle DEHP dünyada en yaygın kullanılan çevre kirleticiler arasındadır (149). Çok yeni bir çalışmada, farelerde perinatal dönemde toplumdaki tahmini insan maruziyeti dozunda DEHP'in her iki cinste östrojen sentezini azaltarak, erişkin dönemde kalıcı moleküler ve morfolojik hipofizer-gonadal değişikliklere neden olduğu gösterildi (150). Zebra balığında yapılan yeni bir çalışmada, DEHP'in oosit büyümesi, olgunlaşması ve ovulasyon üzerine olumsuz etkileri olduğu gösterildi (151). Erkek ratlarda fitalatların kriptorşidizme, testiküler hasara ve epididim, vas deferens, seminal veziküller, prostat ve dış genital yapıda malformasyonlara yol açtığı gösterilmiştir (152-154). Dişi ratlarda DEHP'in overlerde atreziye uğramış tersiyer folikül sayısında artışa neden olduğu bildirildi (155). MEHP, ratlarda Granulosa hücrelerinde progesteron yapımını inhibe eder ve testosteronu östradiole dönüştüren hız sınırlayıcı enzim olan aromataz yapımını azaltır (156, 157). Antral foliküller, steroidogenez yapabilen temel folikül tipidir. Yakın zamanda Gupta ve ark. (158) dişi fare in vitro folikül kültürlerinde DEHP ve MEHP'in E₂ üretimini ve hücre döngüsü düzenleyicilerini azaltmak suretiyle antral folikül gelişimini doğrudan inhibe ettiğini gösterdiler.

Dişi ratlarda fitalatların üreme sistemine olumsuz etkilerini inceleyen çalışmalar olmasına karşın, insanda sadece epidemiyolojik çalışmalar mevcuttur (159-161). İn utero DEHP maruziyetinin kadınlarda gebelik süresinin kısalmasına yol açtığı bildirilmiştir (160).

İnsanlarda gebelikte DEHP gibi ftalatlar maruziyetin erkeklerde genital anomalilere neden olduğu bildirilmiştir (161). Kronik DEHP maruziyeti ile endometriosis, prematür doğum ve gebelik komplikasyonları ile karşılaşmıştır (162-164). In vitro fertilizasyon planlanan kadınlardan elde edilen Granulosa-lutein hücrelerinden yapılan yeni bir çalışmada MEHP'in insan Granulosa-lutein hücrelerinde E₂ yapımını spesifik olarak inhibe ettiği ve steroidogenezi ratlardakine benzer şekilde etkilediği gösterildi (165). 2000-2011 yılları arasında İngilizce literatürdeki ftalat maruziyetinin etkilerini araştıran insan çalışmalarının değerlendirildiği bir derlemede, DEHP ve metabolitlerinin (MEHP dahil) anogenital mesafe, nörolojik gelişim, gebelik yaşı, sperm kalitesi, IGF-1 düzeyleri üzerine ve DNA hasarı, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, astım gibi olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Ancak bu etkilerin mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır (166).

Genel toplumdaki maruziyet dozlarında henüz bilinmeyen bir mekanizma ile DEHP testosteron konsantrasyonunu artırır ve sperm yapımını azaltır. Gunnarsson ve ark. (167) MEHP'in gonadal steroidogenezi etkilerini in vitro inceledikleri çalışmada, her iki cinste de MEHP'in bazal steroidogenezi stimüle ettiğini ortaya koydular. Puerto Rico'lu kız çocuklarında prematür telarşda MEHP ve DEHP düzeyleri artmış bulunmuş, bu durum artmış steroidogenezi ile ilişkilendirilmiştir (159). Bazı deneysel çalışmalarda, ftalatların, özellikle DEHP'in Leydig hücrelerinde fetal testosteron sentezini azalttığı gösterilmiştir. Teka hücrelerinde böyle bir etkinin olup olmadığı bilinmemektedir (154). Dişi hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar overlerin ftalatlar için bir hedef organ olduğunu işaret etmektedir. İn vivo çalışmalarda prenatal ve postnatal DEHP maruziyeti over foliküllerinin sayısında değişikliğe yol açmaktadır (155).

Hayvan çalışmaları, DEHP'in endokrin bozucu özellikleri nedeniyle reproduktif toksisiteye yol açtığını düşündürmektedir. Dişi ratlarda 2000 mg/ kg/ gün dozunda 12 gün DEHP maruziyetinin östradiol sentezini azalttığı, östrus döngüsünü uzattığı ve anovulasyona neden olduğu gösterilmiştir. DEHP'in 4 hafta süreyle 3000 mg/ kg/ gün uygulandığında ise döngülerin düzensizleştiği ve ortalama siklus süresinin arttığı görülmüştür (168). Rat overlerinden Granulosa hücre kültürü temelinde yapılan çalışmalarda, MEHP'in östradiol sentezini azalttığı bulunmuştur (169). Ancak izole Granulosa hücre kültürleri Teka hücreleri ve oositleri içermediğinden, bu çalışmalar MEHP'in foliküler organizasyon ve steroid sentezi yolağına etkileri hakkında fikir vermez. Öte yandan, overyan folikül kültürlerinde Teka hücreleri, Granulosa hücreleri ve oositler birlikte bulunur. Inada ve ark. (170) rat overyan folikül kültürü ile yaptıkları çalışmada, MEHP'in tüm konsantrasyonlarda, steroid hormon

düzeylerinde (progesteron, androstenedion, testosteron ve östradiol) kombine bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Siklus uzaması, anovulasyon ve hormonal etkileri gösteren bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, fitatların PKOS gelişiminde rolü olabileceğini akla getirmektedir.

Ölümsüzleştirilmiş fare Leydig tümör hücrelerinde, MEHP'in steroid hormon sentezinde kolesterol miktarını artırarak progesteron ve testosteron yapımını arttırdığı gösterilmiştir (167). Inada ve ark. nın çalışmalarında, 10-30 µg/ml MEHP progesteron, androstenedion, testosteron ve estradiol düzeylerinde artışa neden olmuş, öte yandan 100 µg/ml uygulandığında progesteron düzeyi artarken, AS, testosteron ve östradiol düzeyleri azalmıştır. Bu konsantrasyonda P/AS oranı belirgin artarken, AS/T ya da T/E oranı değişmemiştir. P/AS oranındaki bu artış, MEHP'in progesteronun androstenediona dönüşümünü kuvvetle inhibe ettiğini düşündürmüştür (170). Progesteronun androstenediona dönüşümü P 450C17 ile katalizlenir ve MEHP'in fare Leydig tümör hücrelerinde P 450C17 mRNA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (167). Daha önce de belirtildiği gibi son zamanlarda PKOS etiyopatogenezi ile ilgili çalışmalar P450C17 ekspresyonundaki değişiklikler üzerinde yoğunlaşmaktadır. MEHP'in deneysel zeminde gösterilen bu etkisi bize fitatların PKOS patofizyolojisinde rolü olabileceğini düşündürmüştür. Bir başka çalışmada rat Leydig hücre kültüründe de MEHP'in steroid sentezi üzerinde benzer bifazik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. 30 µg/ml de testosteron artışına neden olurken, 3 mg/ml de azalmaya yol açmıştır. MEHP 100 µg/ml de foliküler gelişimi inhibe eder ve Granulosa hücrelerinin apoptozisi ile sonuçlanır (171). Dişi ratlarda DEHP verilmesiyle östradiol yapımının azaldığı ve preovulatuvar foliküllerin küçük olduğu gösterilmiştir (170). Daha önce de belirtildiği gibi küçük preovulatuvar foliküller PKOS'da görülen bir özelliktir. DEHP'in deneysel düzeyde bu etkiye yol açmış olması yine PKOS etiyopatogenezinde etkili olabileceğini düşündürülebilir.

DEHP'in rodent hayvan modellerinde reproduktif toksikan ve kanserojen olduğu bilinmektedir. Düzenli siklusu olan erişkin dişi ratlarda DEHP maruziyetinin ovulasyonu baskıladığı ve siklus süresini uzattığı bulunmuştur. Bu etki östradiol sentezini azaltıp, FSH artışına neden olma ve ovulasyon için gerekli LH dalgalanmasının olmaması nedeniyledir. Bu ratlarda morfolojik olarak polikistik overler oluşmuştur (172). Bahsedilen çalışmada hormonal ve morfolojik analizler DEHP maruziyetinin preovulatuvar Granulosa hücrelerinde spesifik etkiye sahip olduğunu desteklemektedir. MEHP doğrudan Granulosa hücrelerinde progesteron yapımını baskılar. Sonuç olarak, DEHP maruziyetinin ratlarda hipoöstrojenik, hipoprogestinik ve anovulatuvar siklusa neden olduğu gösterilmiştir. Bütün bu hayvansal çalışma sonuçları

bize MEHP ve/veya DEHP'in insanda PKOS gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmüştür. Bir grup Rus kadın fabrika işçisinde yüksek dozda n-bütıl ve di-n-oktil fitalat maruziyeti sonrası anovulasyonun artarak, gebelik oranlarının düştüğü ve düşüklerin arttığının gözlenmesi de hipotezimizi dolaylı olarak destekleyen bir veri olarak değerlendirilmiştir (173).

Bu tez çalışmasında PKOS etiyopatogenezinde DEHP/MEHP etkisini araştırmaya yönlendiren çalışmalardan birisi de Svechnikova ve ark.'nın (174) ratlarda yaptığı bir çalışmadır. Bu çalışmada bilim adamları prepubertal dişi ratlara DEHP verildiğinde LH düzeyinde artış ile beraber progesteron ve östradiol düzeylerinde azalma olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu ratlardan elde edilen primer Granulosa hücre kültürlerinde LH ve FSH uyarısına progesteron yanıtının düşük olduğu bulunmuştur. Aynı ratların hipofiz hücre kültürlerinde ise GnRH'a LH yanıtının artmış olduğunu göstermişlerdir. PKOS mekanizmasındaki hormonal değişiklikler ile olan bu benzerlik, bize fitalatların PKOS etiyopatogenezinde rolü olabileceğini düşündürmüştür.

Literatürde PKOS ile fitalat ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yukarıda bahsedilen çalışma sonuçlarından anlaşılacağı üzere fitalatların hormonlar üzerindeki etkisi başta doz olmak üzere çok faktörlü ve karmaşık görünmektedir. Bu çalışmada PKOS olan ve olmayan olgular arasında serum MEHP ve DEHP düzeyleri açısından fark saptanmadı. Ayrıca, bu endokrin bozucular ile testosteron, estradiol, gonadotropinler ve progesteron gibi hormon düzeyleri arasında bir korelasyon bulunmadı. Deneysel çalışmaların sonuçları dikkate alındığında, bu durum, bu karmaşık hormonal etkileşim tablosunda kesitsel olarak değerlendirilen serum düzeylerinin ölçüt alınmasının yeterli olmayacağını düşündürebilir. Bu çalışma ile insanda PKOS ve fitalatların ilişkisini değerlendirmek üzere hücre düzeyinde yapılacak çalışmaların daha aydınlatıcı olacağı kanaati oluşmuştur.

Genellikle reproduktif çalışmalar tek bir çevresel endokrin bozucunun sağlık üzerine etkilerine odaklanır. Ancak, bu kimyasallar arasındaki etkileşimler çok önemli olabilir. Ortak etki, sinerjistik, antagonistik, artırıcı ya da inhibe edici etkileşimlerin bir sonucu olabilir (144). İnsanlar aynı zamanda birçok EBK'a maruz kalabileceği için etkilerin yorumlanmasında bu olası sinerjistik ya da inhibe edici etkileşim göz önünde bulundurulmalıdır.

"Obezogen" terimi lipid metabolizması ve adipogenezi obezite oluşumu yönünde uygunsuz düzenleyen molekülleri tanımlamakta olup, ilk kez 2006 yılında kullanıldı. Daha sonraları kilo alımı gibi metabolik sinyalizasyonu etkileyen EBK alt grubu ise "metabolik bozucular" olarak sınıflandı (175). Fitalatlar aday obezogenler olarak düşünülmektedir.

Peroksizom proliferatör-aktif reseptörler (PPAR) lipid metabolizması ve hücre farklılaşmasında anahtar düzenleyicilerdir. Çeşitli fitalatlar ve metabolitlerinin PPAR aktivatörü etkisi gösterilmiştir. DEHP bir peroksizom proliferatörüdür ve aktif metaboliti MEHP'nin PPAR alfa ve gamma'ya aktive ederek Granulosa hücrelerinde aromataz enzimini baskılayarak, E₂ sentezini azalttığı gösterilmiştir (176).

EBK'nin obeziteyi etkilediğine dair verilerin çoğu laboratuvar deneylerinden elde edilmiştir (175). Sınırlı sayıda epidemiyolojik çalışma vardır. Postnatal dönem ve erişkinlerde maruziyetin etkileri ile ilgili veriler daha da sınırlıdır. 6-8 yaş arası 90 kız çocuğunda yapılan bir çalışmada idrar fitalat metabolitlerinde fazla kilolu ve obez olanlarda normallere göre istatistiksel anlamlılığa erişmeyen bir yükseklik saptanmıştır. Stahlhut ve ark (13) NHANES verilerinden elde edilen bir analizde idrar fitalat düzeyleri ile bel çevresi, VKİ ve insulin direnci ölçütleri arasında pozitif ilişki saptamışlardır.

Bu çalışmada serum DEHP düzeyleri tüm grupta MEHP, insulin direnci ve açlık lipidleri ile korele bulundu. Obez olan grupta insulin direnci ve MEHP ile ilişki daha belirgindi. Bu sonuçlar DEHP'nin lipid ve enerji metabolizması üzerinde doğrudan ya da dolaylı etkisini düşündürmektedir. MEHP'nin obezlerde anlamlı artmış olması da olası obezogen etki ile açıklanabilir.

Bu çalışma popülasyonu adolesan yaş grubunda literatürdeki en geniş PKOS serilerinden biridir. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından birisi adolesan dönemde, bazı fizyolojik durumların PKOS bulguları ile örtüşmesi nedeniyle tanı ile ilgili sorun olabileceğidir. Çalışmamızda tanı ölçütleri olarak Rotterdam Ölçütleri kullanılmış olmakla beraber olguların tamamında hiperandrojenizm olması nedeniyle mevcut diğer ölçütler kullanıldığında da tanı örtüşmekte bu durum hasta grubumuzdaki tanı doğruluk oranını kuvvetlendirmektedir. Yine PKOS tanısı konulan olgularda menarş sonrası en az 2 yıl geçmiş olması esas alınarak PKOS tanısında hata payı en aza indirilmiştir.

Özetle, bu çalışma ile endokrin bozuculardan BPA'nın ilk kez adolesan PKOS olgularında artmış olduğu ve androjenler ile korelasyon gösterdiği tespit edildi. Yine literatürde ilk kez değerlendirilen fitalat-PKOS ilişkisinde, fitalatlardan serum MEHP ve DEHP konsantrasyonlarının PKOS olgularında kontrol grubundan farklı olmadığı bulundu. Ancak MEHP ve DEHP'nin özellikle obezlerde bel çevresi, insulin direnci ve açlık glukoz ve lipidleri ile ilişkili bulunduğu ve bu ilişkinin PKOS grubunda daha belirgin olduğu ortaya konuldu.

Sonuç olarak, bu çalışma endokrin bozucuların PKOS etiyopatogenezinde, hem hormonal hem de metabolik düzeyde rolü olabileceğine dair ipuçları sunmuştur. Daha kapsamlı deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarla bu konunun daha ayrıntılı incelenip açığa kavuşturulabileceği kanısına varılmıştır.

Bu çalışmada ortaya konulan hedeflere ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Foster WG, Neal MS, Han MS, Dominguez MM. Environmental contaminants and human infertility: hypothesis or cause for concern? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008; 11:162–76.
2. Hamilton BE, Ventura SJ. Fertility and abortion rates in the United States, 1960–2002. *Int J Androl* 2006; 29:34–45.
3. Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM et al. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril*. 2008; 90:911-40.
4. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996; 104:741–803.
5. Rosenfield RL. Clinical review: Identifying children at risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:787-96.
6. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2007; 370:685-97.
7. Phillips KP, Foster WG. Key developments in endocrine disrupter research and human health. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008; 11:322-44
8. Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology* 2003; 188:117-124.

9. Fernandez M, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Libertun C. Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environ Health Perspect*. 2010; 118:1217–1222.
10. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD. Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: implications for the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 304:49–54.
11. Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, et al. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 2008; 116:1642–1647.
12. Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Livadas S et al. Endocrine Disruptors and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Elevated Serum Levels of Bisphenol A in Women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96:480-4.
13. Stahlhut RW, van Wijgaarden E, Dye TD, et al. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* 2007; 115:876–882.
14. Pasquali R, Stener-Victorin E, Yildiz BO et al. Forum: Research in Polycystic Ovary Syndrome Today and Tomorrow. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011; 74:424-33.
15. Robboy SJ. Embryology of the female genital tract. In: Kurman R (ed): *Bleustein's Pathology of the Female Genital Tract*, 5th ed. New York, Springer- Verlag, 2002, pp. 3-31.
16. Rosai J. In: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. Vol 2, 9th ed. Mosby. Edinburgh, London, New York, Oxford. 2004; pp.1649-1709.
17. Peacock A, Alvi NS, Mushtaq T. Period problems: disorders of menstruation in adolescents. *Arch Dis Child*. 2012; 97:554-60.
18. Biro FM, Emans SJ. Whither PCOS? The challenges of establishing hyperandrogenism in adolescent girls. *J Adolesc Health*. 2008; 43:103-5.

19. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: Towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine F (eds). *Polycystic Ovary Syndrome*. Boston: Blackwell Scientific, 1992; pp. 377–384.
20. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004; 81:19-25.
21. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4237–45.
22. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society: The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* 2009; 91:456.
23. Glinborg D, Andersen M. An update on the pathogenesis, inflammation, and metabolism in hirsutism and polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2010; 26:281-96.
24. Ibanez L, Potau N, Francois I, de Zegher F. Precocious pubarche, hyperinsulinism, and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduced fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:3558-62.
25. de Groot PC, Dekkers OM, Romijn JA, Dieben SW, Helmerhorst FM. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011; 17:495-500.
26. Azziz R, Carmina E, Sawaya ME. Idiopathic hirsutism. *Endocr Rev* 2000; 4:347–62.
27. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assesment of body hair in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961; 21:1440-7.
28. Bona G, Bozzola M, Buzi F et al. Hirsutism. *Minerva Pediatr*. 2007; 59:289-98.
29. Akın L. Adolesanlarda hiperandrojenizm. *Türk Aile Hek Derg* 2012; 16:48-52.

30. Rosenfield RL. Adolescent Anovulation: Maturational Mechanisms and Implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Aug 2. doi: 10.1210/jc.2013-1770
31. Khan U. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2007; 20:101-4.
32. Kurtoğlu S, Hatipoğlu N, Akın L. Çocukluk çağında hirsutizm ve polikistik over sendromuna yaklaşım. *Türkiye Klinikleri J Endocrin-Special Topics* 2009; 2:70-80.
33. Porter MB. Polycystic ovary syndrome: the controversy of diagnosis by ultrasound. *Semin Reprod Med* 2008; 26:241-51.
34. Ehrmann DA, Rosenfield RL, Barnes RB, Brigell DF, Sheikh Z. Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. *N Engl J Med.* 1992; 327:157-62.
35. Azziz R, Black VY, Knochelhauer ES, Hines GA, Boots LR. Ovulation after glucocorticoid suppression of adrenal androgens in the polycystic ovary syndrome is not predicted by the basal dehydroepiandrosterone sulfate level. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:946-50.
36. García-Rudaz MC, Ropelato MG, Escobar ME, Veldhuis JD, Barontini M. Augmented frequency and mass of LH discharged per burst are accompanied by marked disorderliness of LH secretion in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 1998; 139:621-30.
37. Balen AH. Hypersecretion of luteinizing hormone and the polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 1993; 8 (Suppl 2):123-8.
38. Glinborg D, Hermann AP, Brusgaard K, Hangaard J, Hagen C, Andersen M. Significantly higher adrenocorticotropin-stimulated cortisol and 17-hydroxyprogesterone levels in 337 consecutive, premenopausal, caucasian, hirsute patients compared with healthy controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:1347-53.
39. Zhang LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL. Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:10619-23.

40. Kumar A, Woods KS, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol* 2005; 62: 644–49.
41. Stewart PM, Shackleton CH, Beastall GH, Edwards CR. 5 alpha-reductase activity in polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 1990; 335:431-3.
42. Witchel SF. Hirsutism and polycystic ovary syndrome. In: *Pediatric Endocrinology*. Liftshitz F (ed) 5th Ed, New York: Informa Healthcare Inc, 2007; pp. 325-48.
43. Taylor AE, McCourt B, Martin KA et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2248–2256.
44. Bremer AA. Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metab Syndr Relat Disord*. 2010; 8:375-94.
45. Talbot JA, Bicknell EJ, Rajkhowa M, Krook A, O’Rahilly S, Clayton RN. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1979–1983.
46. Lim SS, Norman RJ, Davies MJ, Moran LJ. The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2013;14:95-109.
47. Franks S, Webber LJ, Goh M et al. Ovarian morphology is a marker of heritable biochemical traits in sisters with polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:3396–3402.
48. Kent SC, Gnatuk CL, Kunselman AR, Demers LM, Lee PA, Legro RS. Hyperandrogenism and hyperinsulinism in children of women with polycystic ovary syndrome: a controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:1662–1669.
49. Sam S, Coviello AD, Sung YA, Legro RS, Dunaif A. Metabolic phenotype in the brothers of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 2008; 31:1237–1241.

50. Lakkakula BV, Thangavelu M, Godla UR. Genetic variants associated with insulin signaling and glucose homeostasis in the pathogenesis of insulin resistance in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30:883-95.
51. Somani N, Harrison S, Bergfeld WF. The clinical evaluation of hirsutism. *Dermatol Ther* 2008; 21:376-91.
52. Glueck CJ, Wang P, Fontaine R, Tracy T, Sieve-Smith L. Metformin to restore normal menses in oligo-amenorrheic teenage girls with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Adolesc Health.* 2001; 29:160-9.
53. Tabb MM, Blumberg B. New models of action for endocrine disrupting chemicals. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 475-482.
54. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2009; 30:293-342.
55. Staples CA, Dorn PB, Klecka G, O'block, ST, Haris LR. A review of the environmental fate, effects and exposures of Bisphenol A. *Chemosphere* 1998; 36: 2149-2173.
56. European Chemicals Bureau, European Union Risk Assessment Report 4,4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A). EINECS No: 201-245-8 Office for Official Publications of the European Communities, ECB, 2003.
57. Fenichel P, Chevalier N, Brucker-Davis F. Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. *Ann Endocrinol (Paris).* 2013; 74:211-20.
58. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect* 2008; 116:39–44.
59. Ye X, Kuklenyik Z, Needham LL, Calafat AM. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 831:110-115.

60. vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM et al. Chapel Hill Bisphenol A Expert Panel Consensus Statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol* 2007; 24:131–138.
61. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007; 24:139–177
62. Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, et al. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol* 2008; 28:258–263.
63. Calafat AM, Weuve J, Ye X, et al. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 639–644.
64. Becker K, Goen T, Seiwert M, et al. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212:685–692.
65. Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 25: 254–5.
66. Grasselli F, Baratta L, Baioni L et al. Bisphenol A disrupts granulosa cell function. *Domest Anim Endocrinol*. 2010; 39:34-9.
67. Zhang GL, Zhang XF, Feng YM et al. Exposure to bisphenol A results in a decline in mouse spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev*. 2013; 25:847-59.
68. Kurosawa T, Hiroi H, Tsutsumi O et al. The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocr J* 2002; 49:465–471.
69. Lobos JH, Leib TK, Su TM. Biodegradation of Bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol*, 1992; 58:1823-1831.
70. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, et al. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1281–1287.
71. Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufik J, et al. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 2007; 24:259–264.

72. Vom Saal FS, Nagel SC, Timms BG, Welshons WV. Implications for human health of the extensive bisphenol A literature showing adverse effects at low doses: a response to attempts to mislead the public. *Toxicology* 2005; 212:244–252.
73. Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP). Atlanta, GA: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2002.
74. Sampson J, de Korte D. DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services. *Transfus Med* 2011; 21:73-83.
75. Latini G, Ferri M, Chiellini F. Materials degradation in PVC medical devices, DEHP leaching and neonatal outcomes. *Curr Med Chem*. 2010;17:2979-89.
76. Heudorf, U, Mersch-Sundermann, V, Angerer, J. Phthalates: Toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2007; 210:623–634.
77. European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General. Opinion on Medical Devices Containing DEHP Plasticized PVC: Neonates and Other Groups Possibly at Risk From DEHP Toxicity. Brussels, Belgium: Scientific Committee on Medical Products and Medical Devices; 2002.
78. North EJ, Halden RU. Plastics and environmental health: the road ahead. *Rev Environ Health*. 2013; 28:1-8.
79. Simmchen J, Ventura R, Segura J. Progress in the removal of di-[2-ethylhexyl]-phthalate as plasticizer in blood bags. *Transfus Med Rev*. 2012; 26:27-37.
80. Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J. Online cleanup by multidimensional LC-ESIMS/ MS for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B*. 2003; 784:169 –182.
81. Koch HM, Calafat AM. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009; 364:2063-78.

- 82.** Ozturk A, Mazicioglu MM, Hatipoglu N et al. Reference body mass index curves for Turkish children 6 to 18 years of age. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008; 21:827–836
- 83.** Silfen ME, Denburg MR, Manibo AM et al. Early endocrine, metabolic, and sonographic characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS): comparison between nonobese and obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:4682–8.
- 84.** Moran C, Azziz R, Carmina E et al. 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:1468–74.
- 85.** Katz A, Nambi SS, Mather K et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2402–2410.
- 86.** Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22:1462–1470.
- 87.** Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, et al. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 2005; 115:500–503.
- 88.** Sen Y, Kandemir N, Alikasifoglu A, Gonc N, Ozon A. Prevalence and risk factors of metabolic syndrome in obese children and adolescents: the role of the severity of obesity. *Eur J Pediatr* 2008; 167:1183–1189.
- 89.** Gunczler P, Lanes R. Relationship between different fastingbased insulin sensitivity indices in obese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006; 19:259–265.
- 90.** Hřebíček J, Janout V, Malincíková J, Horáková D, Cízek L. Detection of insulin resistance by simple quantitative insulin sensitivity check index QUICKI for

epidemiological assessment and prevention. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:144–147.

91. Xiao Q, Li Y, Ouyang H, Xu P, Wu D. High-performance liquid chromatographic analysis of bisphenol A and 4-nonylphenol in serum, liver and testis tissues after oral administration to rats and its application to toxicokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006; 830:322-9.
92. Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P, Carlucci G. Simultaneous determination of di-(2-ethylhexyl)-phthalate and mono-(2-ethylhexyl)-phthalate in human plasma by HPLC. *Anal Lett.* 2003; 36:2645–2654.
93. Durmaz E, Ozmert EN, Erkekoglu P et al. Plasma phthalate levels in pubertal gynecomastia. *Pediatrics.* 2010; 125:122-9.
94. Olszanecka-Glinianowicz M, Kuglin D, Dąbkowska-Huć A, Skalba P. Serum adiponectin and resistin in relation to insulin resistance and markers of hyperandrogenism in lean and obese women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;154:51-6.
95. Deligeoroglou E, Vrachnis N, Athanasopoulos N et al. Mediators of chronic inflammation in polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28:974-8.
96. Hoeger KM, Oberfield SE. Do women with PCOS have a unique predisposition to obesity? *Fertil Steril.* 2012;97:13-7.
97. Legro RS, Chiu P, Kusanman AR, Bentley CM, Dodson WC, Dunaif A. Polycystic ovaries are common in women with hyperandrogenic chronic anovulation but do not predict metabolic or reproductive phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:2571–9.
98. Welt CK, Gudmundsson JA, Arason G et al. Characterizing discrete subsets of polycystic ovary syndrome as defined by the Rotterdam criteria: the impact of weight on phenotype and metabolic features. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:4842–8.
99. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26:883–96.

100. Hoeger K. Obesity and weight loss in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001; 28:85–97.
101. Martinez-Bermejo E, Luque-Ramirez M, Escobar-Morreale HF. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Minerva Endocrinol.* 2007; 32:129–40.
102. Liang SJ, Liou TH, Lin HW, Hsu CS, Tzeng CR, Hsu MI. Obesity is the predominant predictor of impaired glucose tolerance and metabolic disturbance in polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2012; 91:1167-72.
103. Hwang KR, Choi YM, Kim JJ et al. Effects of insulin-sensitizing agents and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Exp Reprod Med.* 2013; 40:100-5.
104. Leibel NI, Baumann EE, Kocherginsky M, Rosenfield RL. Relationship of adolescent polycystic ovary syndrome to parental metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:1275–1283.
105. Rossi B, Sukalich S, Droz J, et al. Prevalence of metabolic syndrome and related characteristics in obese adolescents with and without polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:4780–4786.
106. Nandalike K, Strauss T, Agarwal C, et al. Screening for sleep-disordered breathing and excessive daytime sleepiness in adolescent girls with polycystic ovarian syndrome. *J Pediatr.* 2011;159:591–596.
107. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev.* 2012; 33:981-1030.
108. Ciaraldi TP, el-Roeiy A, Madar Z, Reichart D, Olefsky JM, Yen SS. Cellular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 5:577–583.
109. Dunaif A, Xia J, Book C-B, Schenker E, Tang Z. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1995; 96:801–810.

110. Corbould A. Chronic testosterone treatment induces selective insulin resistance in subcutaneous adipocytes of women. *J Endocrinol* 2007; 192: 585-94.
111. Ciaraldi TP, Aroda V, Mudaliar S, Chang RJ, Henry RR. Polycystic ovary syndrome is associated with tissue-specific differences in insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:157-63
112. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112:1796–1808.
113. Singh KB. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertil Steril* 2005; 84:1228–1234.
114. Walters KA, Simanainen U, Handelsman DJ. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Hum Reprod Update* 2010; 16:543–558.
115. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod.* 2012; 86:149, 1-12.
116. Barnes RB, Rosenfield RL, Burstein S, Ehrmann DA. Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1989;320:559–565.
117. González F. Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids.* 2012; 77:300-5.
118. González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Increased activation of nuclear factor κ B triggers inflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:1508–12.
119. Cara JF, Rosenfield RL. Insulin-like growth factor I and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells. *Endocrinology* 1988; 123:733–739.
120. Hernandez ER, Resnick CE, Holtzclaw WD, Payne DW, Adashi EY. Insulin as a regulator of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells: cellular

mechanism(s) underlying physiological and pharmacological hormonal actions. *Endocrinology* 1988; 122:2034–2043.

121. Moghetti P, Castello R, Nigri C et al. Insulin infusion amplifies 17 alpha-hydroxycorticosteroid intermediates response to adrenocorticotropin in hyperandrogenic women: apparent relative impairment of 17,20-lyase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:881–886.
122. Suikkari AM, Koivisto VA, Rutanen EM, Yki-Jarvinen H, Karonen SL, Seppala M. Insulin regulates the serum levels of low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:266–272.
123. Lee PD, Conover CA, Powell DR. Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 204:4–29.
124. Franks S, Gilling-Smith C, Watson H, Willis D. Insulin action in the normal and polycystic ovary. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28:361–378
125. Chua AK, Azziz R, Goodarzi MO. Association study of CYP17 and HSD11B1 in polycystic ovary syndrome utilizing comprehensive gene coverage. *Mol Hum Reprod*. 2012;18:320-4
126. Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol* 1999;13:946–957.
127. Blank SK, McCartney CR, Chhabra S et al. Modulation of gonadotropinreleasing hormone pulse generator sensitivity to progesterone inhibition in hyperandrogenic adolescent girls—implications for regulation of pubertal maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:2360–2366.
128. Nippoldt TB, Reame NE, Kelch RP, Marshall JC. The roles of estradiol and progesterone in decreasing luteinizing hormone pulse frequency in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69:67–76.
129. Romano GJ, Krust A, Pfaff DW. Expression and estrogen regulation of progesterone receptor mRNA in neurons of the mediobasal hypothalamus: An in situ hybridization study. *Mol Endocrinol* 1989; 3:1295–1300.

130. Soules MR, Steiner RA, Clifton DK, Cohen NL, Aksel S, Bremner WJ. Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58:378–383.
131. Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL et al. Polycystic ovarian syndrome: Evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin- releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4047–4052.
132. Moniruzzaman M, Miyano T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *J Reprod Dev.* 2010; 56:559-66.
133. Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21:96-103.
134. Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E. Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol* 2007; 24:253–258.
135. Schonfelder G, Flick B, Mayr E, Talsness C, Paul M, Chahoud I. In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious Effects in the vagina. *Neoplasia* 2002; 4:98–102
136. Markey CM, Coombs MA, Sonnenschein C, Soto AM. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev* 2003; 5:67–75
137. Takeuchi T, Tsutsumi O. Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Bioch Bioph Res Com* 2002; 291:76–78.
138. Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 2004; 51:165–169.
139. Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y et al. Elevated serum bisphenol A levels under hyperandrogenic conditions may be caused by decreased UDP-glucuronosyltransferase activity. *Endocr J* 2006; 53:485–491

140. Hanioka N, Jinno H, Nishimura T, Ando M. Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver. *Arch Toxicol* 1998; 72:387–394.
141. Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL et al. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5925–5933.
142. Xu J, Osuga Y, Yano T, et al. Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292:456–62.
143. Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E. Prenatal exposure to Bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect* 2009; 117:879–885
144. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol-A disrupts pancreatic cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 2006;114:106–112
145. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquié M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E, Nadal A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One*. 2008; 3:2069.
146. Bondesson M, Jönsson J, Pongratz I et al. A CASCADE of effects of bisphenol A. *Reprod Toxicol*. 2009; 28:563-7
147. Kaddar N, Bendridi N, Harthé C et al. Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. *Anal Chim Acta*. 2009; 645:1-4.
148. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*. 2008; 300:1303-10.
149. McKee RH, Butala JH, David RM, Gans G. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates:addressing the data gaps. *Reprod Toxicol* 2004;18:1–22.

150. Pocar P, Fiandanese N, Secchi C et al. Exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in utero and during lactation causes long-term pituitary-gonadal axis disruption in male and female mouse offspring. *Endocrinology*. 2012;153:937-48.
151. Carnevali O, Tosti L, Speciale C, Peng C et al. DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. *PLoS ONE* 2010; 5:10201
152. Foster PM. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl* 2006; 29:140–147.
153. Welsh M, Saunders PT, Fisker M et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 2008;118:1479–90.
154. Hu GX, Lian QQ, Ge RS, Hardy DO, Li XK. Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20:139-45.
155. Grande SW, Andrade JM, Talsness CE et al. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Reproductive effects on adult female offspring rats. *Toxicology* 2007; 229:114–122.
156. Treinen KA, Dodson WC, Heindel JJ. Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;106:334–340.
157. Lovekamp TN, Jetten AM, Davis BJ. Dual activation of PPAR [alpha] and PPAR [gamma] by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 201:133–141.
158. Gupta RK, Singh JM, Leslie TC, Meachum S, Flaws JA, Yao HH. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 242:224-30.

159. Colón, I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ. Health Perspect.* 2000; 108:895–900.
160. Latini G, De Felice C, Presta G et al. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and duration of human pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111:1783–1785.
161. Marsee K, Woodruff TJ, Axelrad DA, Calafat AM, Swan SH. Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environ Health Perspect* 2006; 114:805–809.
162. Kim SH, Chun S, Jang JY, Chae HD, Kim CH, Kang BM. Increased plasma levels of phthalate esters in women with advanced-stage endometriosis: a prospective case-control study. *Fertil Steril.* 2011; 95:357-9.
163. Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, Verrotti A, DE Felice C. In utero exposure to phthalates and fetal development. *Curr Med Chem.* 2006;13:2527-34.
164. Whyatt RM, Adibi JJ, Calafat AM et al. Prenatal di(2-ethylhexyl)phthalate exposure and length of gestation among an inner-city cohort. *Pediatrics.* 2009; 124:1213-20.
165. Reinsberg J, Wegener-Toper P, van der Ven K, van der Ven H, Klingmueller D. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 239:116-23.
166. Jurewicz J, Hanke W. Exposure to phthalates: reproductive outcome and children health. A review of epidemiological studies. *Int J Occup Med Environ Health.* 2011; 24:115-41.
167. Gunnarsson D, Leffler P, Ekwurtzel E, Martinsson G, Liu K, Selstam G. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate stimulates basal steroidogenesis by a cAMP-independent mechanism in mouse gonadal cells of both sexes. *Reproduction.* 2008; 135:693-703.
168. Takai R, Hayashi S, Kiyokawa J et al. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in female rats. *J Toxicol Sci.* 2009; 34 1:111-9.

169. Lovekamp-Swan T, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect.* 2003;111:139-45.
170. Inada H, Chihara K, Yamashita A et al. Evaluation of ovarian toxicity of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) using cultured rat ovarian follicles. *J Toxicol Sci.* 2012; 37:483-90.
171. Ge RS, Chen GR, Dong Q et al. Biphasic effects of postnatal exposure to diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats. *J Androl.* 2007; 28:513-20.
172. Martino-Andrade AJ, Chahoud I. Reproductive toxicity of phthalate esters. *Mol Nutr Food Res.* 2010; 54:148-57.
173. Wolff MS, Teitelbaum SL, Windham G, Pinney SM, Britton JA, Chelimo C, Godbold J, Biro F, Kushi LH, Pfeiffer CM, Calafat AM. Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls. *Environ Health Perspect.* 2007; 115:116-21.
174. Svechnikova I, Svechnikov K, Söder O. The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J Endocrinol.* 2007;194:603-9.
175. Grün F, Blumberg B. Endocrine disrupters as obesogens. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 304:19-29.
176. Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C. PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 304:43-8.

