

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**YÜKSEK FRUKTOZLU MISIR ŞURUBU (HFCS) İÇEREN İÇECEKLERİN
İNSÜLİN REZİSTANSI ÜZERİNDEN
POLİKİSTİK OVER SENDROMU (PKOS) İLE İLİŞKİSİNİN
SIÇAN DENEYSEL MODELİ İLE İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ceyhun GÖZÜKARA

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet VAR

Manisa, 2013

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	III
KISALTMALAR	IV
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.1. Glukoz	3
II.2. Fruktoz	4
II.3. Yüksek fruktozlu mısır şurubu	8
II.4. İnsülin ve insülin direnci	12
II.5. Polikistik over sendromu	17
III. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
III.1. Çalışma Grubu	21
III.2. Araç ve Gereçler	22
III.3. Yöntemler	22
III.4. İstatistiksel Analizler	30
IV. BULGULAR	31
V. TARTIŞMA	48
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
VII. ÖZET	58
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	61
IX. KAYNAKLAR	64

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda geçirdiğim uzmanlık eğitimi süresi boyunca verdikleri destek ve katkılarından dolayı tez hocam ve danışmanım Prof.Dr. Ahmet VAR başta olmak üzere değerli hocalarım Prof.Dr. Fatma TANELİ'ye, Prof.Dr. Ece ONUR'a, Prof.Dr. Cevval ULMAN'a, Prof.Dr. Zeki ARI'ya, Yrd. Doç. Dr. Yeşim GÜVENÇ'e,

Yardımlarından dolayı Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. M. İbrahim Tuğlu'ya ve Asistanları Işıl Aydemir ve Alican Gümürdü'ye,

Dört yıl boyunca çalışmalarımızı uyumlu bir şekilde yürüttüğümüz tüm asistan ve teknisyen arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan, sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşlerime,

Bu süreçte gösterdiği olağanüstü destek ve sabır için, varlığıyla, sevgi ve şefkatiyle beni onurlandıran hayat arkadaşım, sevgili eşim Sezen'e,

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ceyhun GÖZÜKARA

KISALTMALAR

- BMI:** Vücut kitle indeksi
CO₂: Karbondioksit
CV: Varyasyon katsayısı
DHEA: Dihidroepiandrostenedion
DHEAS: Dihidroepiandrostenedion sülfat
DHT: Dihidrotestosteron
DM: Diabetes mellitus
E2: Östradiol
E3: Östriol
FSH: Folikül stimüle edici hormon
GnRH: Gonodotropin salgılatıcı hormon
GPx: Glutasyon peroksidaz
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein
H-E: Hematoksilen eozin
HOMA: Homeostasis model assessment
HT: Hipertansiyon
IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1
IVF: İnvitro fertilizasyon
İHK: İmmunhistokimya
LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
LH: Luteinizan hormon
LPO: Lipid peroksidasyonu
MDA: Malondialdehid
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NO: Nitrik oksit
O₂⁻: Süperoksit
OH: Hidroksil
PKOS: Polikistik over sendromu
ROS: Reaktif oksijen türevleri
SHBG: Seks hormon bağlayıcı globulin
SOD: Süperoksit dismutaz
TBA: Tiyobarbiturik asit
TBARS: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
USG: Ultrasonografi

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Polikistik Over Sendromu (PKOS) birçok genetik ve çevresel etmenin etkili olduğu kronik anovulasyon ve hiperandrojenizm ile nitelenen bir endokrin bozukluktur. Reprodüktif dönemdeki kadınların %6-8'inde görülür (1). Anovulasyona bağlı kadın infertilitesinin en sık nedenidir. Patogenez net olarak açıklanamamakla birlikte insülin direnci merkezde rol oynuyor gibi görünmekte ve obeziteden bağımsız olarak olguların yaklaşık %50-70'inde bulunmaktadır (2). İnsülin direnci ve buna bağlı olarak gelişen fazla insülin salınımı androjen yapımının artmasına, fazla androjen ise menstrüel bozukluklara, over kistlerinin gelişimine ve hirsutizme sebep olmaktadır. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1(IGF-1) reseptörleri ve insülin reseptörleri benzer yapıdadır. IGF-1 'in teka hücrelerinin LH'a karşı androjen cevabını artırıcı etkisi mevcuttur. IGF-1 reseptörlerinin insülin tarafından aktive edilmesi teka hücrelerinde androjen sentezini artırmaktadır. Artmış insülin, seks steroidleri üzerinde bir etki yapmaksızın karaciğerde seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) sentezini inhibe eder. SHBG'nin azalması daha fazla östrojen ve androjenin biyolojik etkinlik göstermesini sağlamaktadır. Hiperinsülinemi ve hiperandrojenemi PKOS gelişiminde iki ana etmenddir ancak henüz neden oluştukları ve birbirleriyle ilişkileri net olarak aydınlatılamamıştır (3).

Fruktoz ve fruktoz bazlı tatlandırıcılar yiyecek ve içeceklere en fazla eklenen tatlandırıcılardır. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu (High Fructose Corn Syrup, HFCS) mısır şurubundaki glukozun fruktoza izomerizasyonu ile elde edilmektedir. HFCS-55, %55 fruktoz, %42 glukoz içermekte olup birçok tatlandırılmış içekte yaygın olarak kullanılır (4). 1960'ların ortasından önce sukroz (% 50 fruktoz, %50 glukoz içerir) dominant tatlandırıcı olarak kullanılırken gıda endüstrisinin gelişimiyle takip eden dekatlarda HFCS, sukrozun yerini almıştır. Epidemiyolojik çalışmalar son 4 dekatta HFCS eklenerek işlenmiş veya

hazırlanmış yiyecek ve içeceklerin tüketimeinin dramatik bir şekilde arttığını ortaya koymuştur. Son zamanlardaki çalışmalar özellikle fruktoz eklenmiş yiyecek ve içeceklerin tüketimeinin insülin rezistansı, dislipidemi ve obezite ile ilişkili olduğunu göstermiştir (5). Tatlandırılmış içeceklerin insülin rezistansına yol açması ve insülin rezistansının PKOS’da patogeneizde merkezi rol oynaması bu içeceklerin tüketimeinin PKOS ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda HFCS içeren içeceklerin tüketilmesinin insülin rezistansı ve PKOS etiyopatogenezi ile olası ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. HFCS içeren içeceklerin tüketilmesiyle gelişebilecek insülin rezistansı ve bunun yol açacağı PKOS açısından incelenerek oluşacak problemleri saptamanın ve önleyici hekimlik açısından bu içeceklerin tüketimeinin azaltılmasına dikkat çekmenin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. Glukoz

İnsan organizmasının temel besin maddelerinden olan karbonhidratlar, günlük enerji gereksiniminin %50-60 kadarını karşılamaktadır. İnsanlar için temel karbonhidratlı besin bitkisel kaynaklı nişastadır. Nişasta sindirimi ağızda başlar, midenin asit ortamında durur ve bağırsakta devam eder. α -Amilaz tükürük bezlerinden ve pankreastan salınan bir endoglikozidazdır. Bu enzimin etkisiyle bağırsak lümeninde oluşan ürünler maltoz, maltotrioz ve 5-9 glukoz biriminden oluşan oligosakkaritler ile sınırlı dekstrinlerdir. Hayvansal kaynaklı polisakkarit olan glikojenin sindirimi de benzer ürünler oluşturur. Bu ürünlerden serbest glukozun açığa çıkması bağırsak lümenini çevreleyen hücrelerden salınan α -glikozidaz (maltaz), α -dekstrinaz (izomaltaz), sukraz (sukroz- α -glikozidaz), laktaz ve trehalaz enzimleri tarafından sağlanır.

Glukozun emilimi: Glukoz ve galaktoz ortak transport sistemine sahiptir. Bağırsak hücrelerinin lümenine bakan yüzünde SGLT 1 (sodyum-glukoz transporter) adı verilen bir taşıyıcı protein vardır. Bu taşıyıcı protein üzerinde sodyum için iki glukoz için bir bağlanma noktası vardır. Sodyumun bağlanması ile proteinde yapısal bir değişiklik meydana gelerek glukozun taşıyıcıya bağlanması kolaylaştırılır. Bağırsak epitel hücresinde ise sodyum taşıyıcıdan uzaklaşır. Konformasyonu değişen taşıyıcının glukozla ilgisi azalır ve glukoz serbestleşir. Hücre içine giren sodyum aktif transportla hücreler arası boşluğa atılır. Bu Na-K ATPaz pompası ile sağlanır. Glukoz ise ya pasif difüzyonla, ya da GLUT-2 denilen taşıyıcının yaptığı kolaylaştırılmış difüzyonla hücreler arası boşluğa oradan kana geçer.

Glukoz metabolizması: Glukoz metabolizmasında ana yol glikolizdir. Glikoliz hemen tüm canlı hücrelerde işleyen, organizmaya enerji sağlayan bir reaksiyon

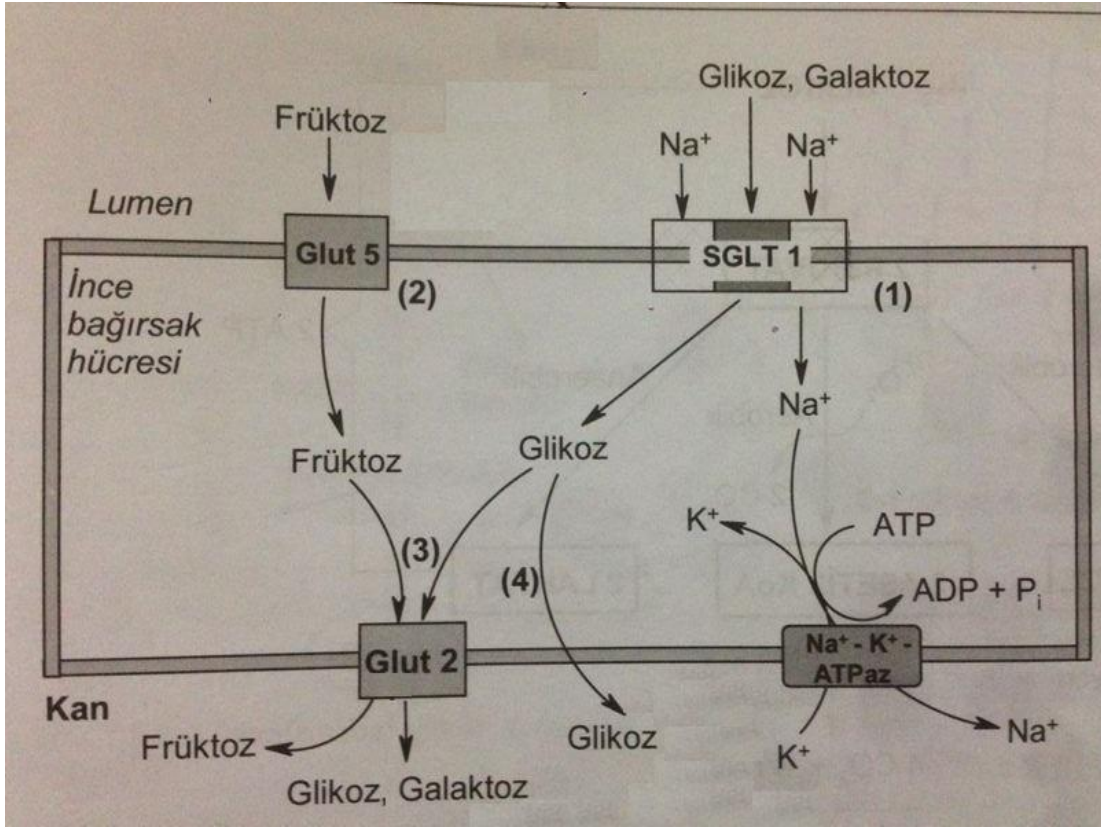
dizisidir. Glikoliz sırasında bir glukoz molekülü önce iki molekül trioz fosfata dönüşmekte bu sırada 2 molekül ATP harcanmaktadır. Daha sonra 2 molekül trioz fosfattan 2 molekül piruvat oluşmakta, bu dönüşüm sırasında substrat düzeyinde fosforilasyonla 4 ATP kazanılmaktadır. 1 molekül glukozun 2 molekül piruvata dönüşümündeki net kazanç 2 ATP'dir. Bu yolda elde edilen enerjinin çok az olmasına rağmen, mitokondri içermeyen eritrosit gibi dokuların enerji gereksinimlerinin karşılanmasında ve kas aktivitesinin yoğun olduğu, dolayısıyla oksijen miktarının yetersiz kaldığı koşullarda enerji elde etmek için çok gereklidir. İnsan dahil birçok canlı glukozu hem aerobik hem de anaerobik ortamlarda oksitleyebilmektedir. Anaerobik ortamda piruvat hücrenin sitozol fraksiyonunda laktata dönüşür. Aerobik koşullarda ve mitokondrisi bulunan hücrelerde ise piruvat önce asetil koenzim A'ya, daha sonra sitrik asit siklusu aracılığıyla CO₂ ve H₂O'ya oksitlenir. Glukozun indirekt oksidasyonu da denilen bu yol, organizmaya 30 veya 2 ATP'lik bir enerji kazandırır (6).

II.2. Fruktoz

Fruktoz önemli bir besinsel monosakkarittir. Fruktoz; meyve şekeri olarak da bilinir. Meyvelerde, balda, disakkarit olan sukrozda ve HFCS'de bulunur (7). En önemli fruktoz kaynağı hazır gıda üretiminde yaygın olarak kullanılan yüksek fruktozlu mısır şurubudur. Glukoz ve fruktoz benzer formüle sahiptir. Glukoz ile aynı enerji yüküne sahiptir. Açlık kan fruktozu 1 mg/dL düzeyindedir (8).

Fruktoz Emilimi: Karbonhidratlar intestinal brush border hidrolaz enzimleri ile monosakkaritlere (glukoz, galaktoz, fruktoz) parçalanırlar daha sonra absorbe edilirler. Fruktoz apikal membrandan GLUT5 aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyonla alınır. Glukoz ve galaktozun aksine, fruktoz gastik boşalmayı geciktirerek gıda alımını inhibe edebilir, yavaş bir şekilde absorbe olmasına öncülük eder. Glukoz ve/veya fruktoz GLUT 2 mRNA ekspresyonunu artırabilir. Oysa GLUT 5 mRNA transkripsiyonu sadece fruktoz tarafından artırılır ve böylece fruktoz kendi absorpsiyonunu artırır. Glukoz ve/veya galaktozun fruktoz

absorbansını artırdığı çalışmalarda gösterilmiştir. Mekanizması net olarak anlaşılmasa da glukoz varlığında iki monosakkaritin disakkaridaz ilişkili transport sistemi ile kombine olarak absorbe olduğu ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalar glukozun pasif difüzyon yoluyla fruktoz emilimini artırdığını savunurken, diğerleri intestinal lümeninde artan fruktoza yanıt olarak brush border membrana GLUT2 desteği yapıldığını savunmaktadır. Özetle fruktoz glukozdan farklı bir transport sistemi kullanır ve hem glukoz varlığında hem de fruktoz varlığında fruktoz emilimi artar. Bu veriler özellikle HFCS, sukroz ve bal gibi hem glukoz hem fruktoz içeren gıdaların sindirimi sırasında fruktoz emiliminin daha fazla olabileceğini düşündürmektedir (9).

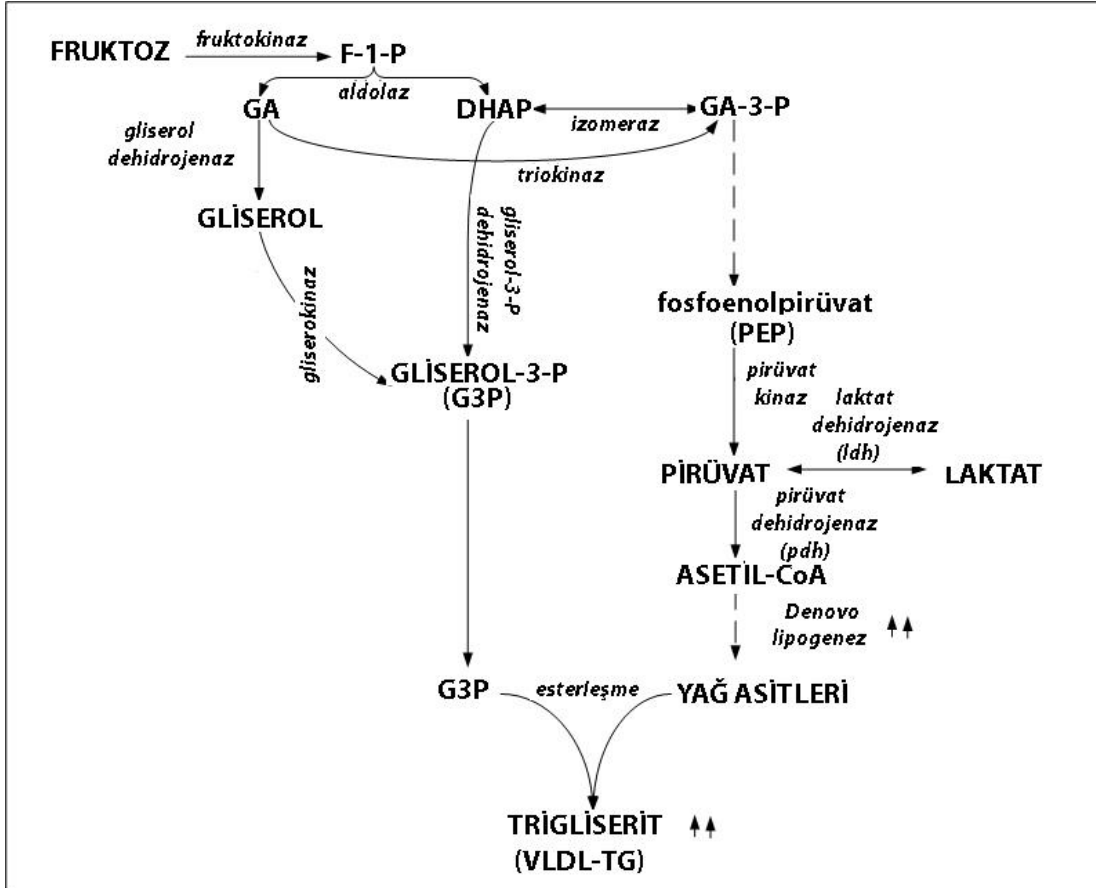


Şekil 1:Fruktoz ve glukoz intestinal absorpsiyonu

Fruktoz Metabolizması: Fruktozun transport ve metabolizması insüline bağımlı değildir, metabolizması hızlıdır ve böbrek eşik değeri düşüktür. Büyük bir kısmı

karaciğerde olmak üzere bağırsak, kas ve yağ dokusunda metabolize edilir. Genel olarak fruktoz iki farklı şekilde glikolitik yola girer. Birincisi; karaciğerde fruktoz fruktokinaz tarafından fosforillenerek fruktoz 1-fosfata çevrilir. Bu enzimin fruktoza ilgisi yüksektir (K_m 'i düşük). Fruktoz 1-fosfat daha sonra fruktoz-1 fosfat aldolaz (Aldolaz B) tarafından dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehite çevrilir. Dihidroksiaseton fosfat bir izomeraz etkisi ile gliseraldehit 3-fosfata dönüşebildiği gibi, gliseraldehit bir kinaz etkisiyle de gliseraldehit 3-fosfata dönüşebilir. Daha sonra bu iki trioz fosfat aldolaz enzimi ile birleştirilir ve sırasıyla fruktoz 1,6-bifosfat, fruktoz 6-fosfat ve glukoz 6-fosfat oluşturur. Fruktoz 1-fosfatın glikoliz ara maddelerine dönüşümünde heksokinaz ve fosfofruktokinaz 1 reaksiyonları devre dışı kaldığı için fruktoz karaciğerde glukozla oranla çok daha hızlı metabolik değişime uğramaktadır. İkincisi; karaciğer ve kas yakıt olarak öncelikle glukozu kullanır. Heksokinazın fruktoza olan ilgisi, glukozla olan ilgisinin 1/20'si kadar olduğu için karaciğerde ve kaslarda çok az fruktoz-6 fosfat oluşur. Yağ dokusu bu nedenle daha fazla fruktoza maruz kalır ve bu dokuda fruktoz heksokinaz tarafından fruktoz 6-fosfata dönüştürülerek fosforillenir (7). Fosforilasyon sırasında adenosin trifosfat (ATP) tükenir ve intrasellüler fosfat düzeyi azalır. Bu basamak glukokinazla olan glukozun fosforilasyonundan farklıdır. Glukoz metabolizmasında, ATP tükenmesi ve aşırı fosforilasyon bir feedback sistemi ile (hız kısıtlayıcı enzim aracılığıyla) önlenir. Fruktoz ise glukozdan farklı olarak; devam eden reaksiyonlar ile ya glukoneogenez ile glukoz oluşumuna ya da de novo trigliserid sentezine yönlendirilir. Bu durum glukoz metabolizmasına göre farklıdır. Fruktozun fruktoz-1-fosfata dönüşümü aşamasında hız kısıtlayıcı enzim etkisi yoktur. Bu nedenle fruktoz kaynaklı ara metabolitler glikoliz yoluna dahil olarak gliserol ve yağ asidi sentezinde kullanılır ve trigliserid oluşumuna neden olurlar. Yüksek miktarda fruktoz tüketimi sonucunda da; serum yağ asidi düzeyleri artar ve insülin bağımsız yağ depolanmasına neden olarak obesiteye (özellikle de abdominal bölgede yağlanmaya) neden olur (8). Ayrıca karaciğerde piruvat ve laktat üretimini artırır, glukoz toleransını düşürür, insülin direncini artırır ve serbest yağ asitlerinin

dengeğini oksidasyondan esterleşme yönüne çevirerek VLDL sekresyonunu artırır (10). Fruktozun metabolize edilmesi sırasında intrasellüler ATP azalması görülür ve adenosin monofosfat (AMP) sonunda ürik asite dönüşür. Fruktoz alımından sonraki 30-60 dakika içerisinde ürik asit yalnızca hücre içerisinde değil aynı zamanda dolaşımda da artar (8).



Şekil 2:Karaciğerde fruktoz metabolizması

Fruktoz, İnsülin Direnci, Obezite ve Metabolik Sendrom: Obezitenin hastalık olarak sınıflanmasının üzerinden henüz 50 yıl geçmişken günümüzde bir epidemi haline gelmiştir. Özellikle çocuk ve adolesanlarda hızla artması yeni çevresel faktörlerin soruna dahil olabileceğini düşündürmüştür. Epidemi halini almasındaki çevresel ana etmen fazla kalori alımı ve hareketsizlik olarak ele alınmaktadır. Fruktoz içeriği yüksek işlenmiş gıda tüketimindeki artışın patojenik rolü üzerinde durulmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar fruktozdan zengin

gıdaların ve şeker tüketiminin artışı ile obezite insidansının artışı arasında korelasyon olduğunu göstermiştir. Yüksek fruktozlu diyetle beslenen sıçanlarda yapılan pek çok çalışmada metabolik sendrom, hipertrigliseridemi, bozulmuş glukoz toleransı, insülin direnci, hiperürisemi, endotelial disfonksiyonu, hipertansiyon ve vücut ağırlığında artış saptanmıştır. Aynı miktarda glukozla beslenen sıçanlarda aynı durum gözlenmemiştir. Bununla ilgili bir takım mekanizmalar ortaya atılmıştır. Akut fruktoz tüketimi insülin ve leptin salınımını uyarmamakta, postprandial ghrelin supresyonu da yapmamaktadır. Uzun dönemde ise yüksek fruktozlu gıdalarla beslenmek kalori alımını artırarak kilo alımı ve obeziteye neden olmaktadır. Sıçan ve insan çalışmalarında kronik fruktoz tüketiminin leptin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. Bu durumun leptin direncinin bir göstergesi olduğunu ve obezitenin altında yatan ana mekanizma olduğunu ileri sürmüşlerdir (11).

II.3. Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu (HFCS)

HFCS mısırdan elde edilen, sukroza alternatif olarak üretilen sıvı bir tatlandırıcıdır. Kimyasal ve enzimatik hidroliz teknikleri kullanılarak sıvılaştırma, parçalama ve izomerizasyon aşamaları ile üretilmektedir. Kompleks bir proses sonunda farklı fruktoz içeriklerine sahip 3 farklı şurup elde edilir. HFCS 90 %90 fruktoz, %5 glukoz, HFCS 55 %55 fruktoz, %42 glukoz, HFCS 42 %42 fruktoz, %53 glukoz içerir (12).

HFCS'nun kalan kısmını bağlı glukoz, maltoz (di-glukoz) ve maltotrioz (tri-glukoz) oluşturur (13). Bu üç farklı fruktoz içerikli HFCS içerisinden bir tanesi gıda üreticilerine daha çekici gelmiştir. Sukrozdan daha fazla fruktoz içermesi nedeniyle daha lezzetli olan HFCS 55 özellikle gazlı içecekler, meyve suları, çikolata, kek, şekerleme, reçel, marmelat ve jöle gibi geniş bir kullanım alanı bulmuştur. HFCS 42 ise daha hafif bir tatlandırıcı olduğundan ve doğal tatları maskelemediğinden baharat, sos, çorba, konserve meyve gibi işlenmiş gıdalarda daha yaygın kullanılmaktadır (12). 1960'ların ortasına kadar sukroz

(%50 fruktoz, %50 glukoz) yiyecek ve içecek endüstrisinde en sık kullanılan tatlandırıcıyken, takip eden dekatlarda gıda endüstrisinin gelişmesi ve HFCS üretimindeki artışla birlikte HFCS işlenmiş gıdalardaki sukrozun yerini almıştır (14).

HFCS'nin tatlandırıcı olarak tanıtılmasından çok kısa süre sonra geniş bir kullanım alanı bulmasındaki ilk etken fiyatının sukrozdan daha ucuz olmasıdır. Günümüzde Amerika'da tatlandırıcı kullanılan gıda ve içeceklerin %40'ında tatlandırıcı olarak HFCS bulunmaktadır. Sukrozda eşit miktarda glukoz ve fruktoz birbirine glikozitik bağlarla bağlıdır, metabolizması sırasında bu bağlar koparak monosakkarit bileşenlerine dönüşerek metabolize edilir. Oysa HFCS hem daha fazla fruktoz içerir hem de içeriğindeki fruktoz ve glukoz serbest halde bulunmaktadır bu sayede vücutta daha hızlı metabolize olmaktadır(12). Fruktoz sukrozdan daha tatlıdır. Tatlılık derecesi sukroz için 100 kabul edildiğinde, glukozun tatlılık derecesi 74, fruktozunki ise 173'tür (15).

Sakkaroz Göre Tatlılık (%)	
Monosakkarit	Şeker Alkolü
Glikoz 50–74	Sorbitol 35–60
Früktoz 130–173	Mannitol 45–60
Galaktoz 30	Ksilitol 200–250
Disakkarit	Karbonhidrat Olmayan Tatlandırıcı
Sakkaroz 100	Sakkarin 200–700
Laktoz 20	Aspartam 160–200
Maltoz 32	Sükraloz 600

Şekil 3:Sukroza göre tatlılık (%)

Bu verilere göre HFCS-42 1.16 kat, HFCS-55 1.28 kat sukrozdan daha tatlı olmalıdır. Buna karşılık Hanover ve White çalışmalarında referans olarak

sukrozun tatlılığını 100 aldıklarında fruktozun tatlılığını 117, HFCS 55'in tatlılığını 99 bulmuşlardır. İçinde sukroza göre daha fazla fruktoz bulunduran HFCS 55'in tadının sukrozdan daha az olmasını anlamak zordur (16). 2008 yılında Amerika'da USDA (United States Departments Of Agriculture) verileri incelenerek yapılan çalışmada 1970 ile 1999 yılları arasında HFCS tüketiminin %1000 artış gösterdiği saptanmıştır. 2 yaş ve üzeri Amerikalılarda günlük HFCS tüketimi 50g/kişi veya 189kcal/kişi olarak hesaplanmıştır. Amerikada diyetle alınan fruktozun ana kaynağı HFCS'dir (12).

2006 yılı itibarı ile dünyada yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi yaklaşık 12.5 milyon ton iken, ülkemizde 2010 yılı itibarı ile 400 bin ton civarındadır. Avrupa Birliği ülkelerinde nişasta bazlı şeker için ortalama %2'lik kota bulunurken, şeker pancarından şeker üretiminde birinci ve ikinci sırayı paylaşan ülkelere Fransa'da bu oran %0.42, Almanya'da ise %0.89'dur. Türkiye'de ise 2001 yılında çıkarılan Şeker Yasası ile nişasta bazlı şeker kotası %10 olarak belirlenmiş ve Bakanlar kuruluna bu miktarı %50 artırma ve azaltma yetkisi verilmiştir. Bakanlar Kurulu da bu yetkiye dayanarak nişasta bazlı şeker kotasını derhal %50 artırarak %15'e çıkarmıştır (17).

HFCS tüketimindeki artış araştırmacıları sağlık açısından olası olumsuz etkilerini araştırmaya itmiştir. Son üç dekatta obezite, kardiyovasküler hastalık ve metabolik sendrom insidansı artışına HFCS tüketimindeki artışın sebep olduğunu ileri süren çalışmalar son 10 yıl içinde yayınlanmıştır. Ancak HFCS ve sukrozun metabolik etkileri arasındaki farkın net olarak ortaya konmadığını, HFCS'nin doğrudan obeziteye sebep olmadığını, genel popülasyonda yüksek kalorili besin tüketimi ve hareketsizliğin obezite için asıl problem teşkil ettiğini bildiren yayınlar da mevcuttur (12).

Çok sayıdaki çalışmada obezite, diyabet ve metabolik sendromda HFCS rolü incelenmiştir. Bu çalışmaların en önemli bulguları şunlardır; kilo alımı ve obezite, insülin direnci gelişimi, lipogenez ve trigliserid artışı, non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, gerekenin üzerinde kalori alımı sonucu leptin direnci ve düzenlenme yeteneği azalmış doyumluk, glikolizasyonu artan proteinler ve olası

tip 2 diyabet. Yayınlanan raporların çalışma tasarımlarında çok fazla çeşitlilik mevcuttur. Özellikle saf fruktoz kullanılan hayvan tabanlı çalışmalarda çok olumsuz metabolik etkiler saptanmıştır (16,18-21).

Özetle;

HFCS'nin sukroza oranla pek çok avantajı vardır:

1. HFCS sukrozdan daha ucuzdur.
2. Fruktoz içeriği yüksek olan HFCS sukrozdan daha tatlıdır.
3. HFCS sukrozdan daha iyi çözünmektedir.
4. Sukroza göre stabilitesi daha yüksek ve belli şartlarda kristalizasyonu daha düşüktür.
5. HFCS sıvı formdadır bu da taşınmasını ve özellikle sıvı içeceklerde kullanılmasını daha kolaylaştırmaktadır.
6. HFCS asidik karakterli olduğu için koruyucu etkiye sahiptir, kullanıldığı formülasyonlarda diğer koruyucuların kullanım oranlarını düşürebilmektedir.
7. HFCS, tadı maskeleyen tatlandırma özelliğine sahip olduğu için aromalı gıdalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.
8. Ürünlerin lezzet ve tüketim kalitesini artırmaktadır.

Dezavantajları ise:

1. Daha az insülin salgılanmasına neden olduğu için doyma hissini etkilemektedir.
2. Fruktoz fazlası hızla trigliseride çevrilmekte ve özellikle yağ dokusunda depolanmaktadır.
3. HFCS'nin genetiği değiştirilmiş mısırdan üretilmesi, genetiği değiştirilmiş ürünlerden duyulan endişeleri bu ürüne de taşımaktadır.
4. Ürünlerin lezzet ve tüketim kalitesini artırdığı için aşırı gıda tüketimine, aşırı kalori alımına neden olmaktadır.
5. Başta obezite olmak üzere, insülin direnci, hipertrigliseridemi, metabolik sendrom, non alkolik yağlı karaciğer hastalığı gibi birçok sağlık sorununa yol açtığı bildirilmektedir (12,17).

II.4. İnsülin Ve İnsülin Direnci

İnsülin: İnsülin pankreastaki langerhans adacıklarının beta-hücreleri tarafından üretilen, 21 amino asitlik A zinciri ile 30 amino asitlik B zincirinden oluşmuş bir polipeptit hormondur (22,23). A ve B zincirleri iki disülfid köprüsü aracılığıyla birbirine bağlanmıştır. İnsülin preprohormon olarak ribozomda sentezlendikten sonra hidrofobik pre kısmı molekülün endoplazmik retikulum sisternasına yönlendirilmesini sağlayarak ayrılır. Proinsülindeki C zinciri A ve B zincirleri arasındaki disülfid köprülerinin oluşumu için gerekli konformasyonu sağlar. Proinsülin golgiye taşınarak sekretuar granüllerde depolanır. Proinsülinin %95'i insüline çevrilir. İnsan pankreası günde 40-50 ünite insülin salgılar. İnsülin salgılanmasını uyaran faktörler;

- Kan glukozunun artması,
- Proteinle beslenme, özellikle lösin, arginin, lizin amino asitlerinin yüksek kan düzeyleri,
- Gastrik inhibitör polipeptid, kolesistokinin, sekretin, gastrin, VIP, glukagon gibi hormonların artışı,
- Sülfonilüre grubu ilaçlar, β -adrenerjik agonistler,
- Büyüme hormonu, kortizol, plasental laktojen, östrojen ve progesteronun uzun süreyle aşırı düzeyleri

İnsülin karaciğer, kas ve yağ dokusu olmak üzere üç ana hedef dokuya etki yapar. İnsülin kana salgılandıktan sonra hedef dokuya ulaşır ve membran reseptörüne bağlanır. İnsülinin etkisinde birinci basamak iki α iki β dört altbirimden oluşmuş reseptöre bağlanarak, reseptörün otofosforilasyonla tirozin kinaz aktivitesini başlatmaktadır. Tirozin kinaz aktivitesi İnsülin Reseptör Substrat-1(IRS-1) gibi çeşitli proteinlerin fosforilasyonunu uyarır. İnsülin etkisiyle glukozun %50'si enerjiye(glikoliz), %30-40'ı yağa, %10'u glikojene çevrilir.

İnsülinin Etkileri: İnsülin etkileri, hormon membran reseptörüne bağlandıktan sonra hücre içinde reseptörün tirozin kinaz bölgelerinin otokataliziyle başlar. Yemekten sonra salgılanan insülin, karaciğer ve kas dokusunda glikogenez, yağ dokusunda lipogenez ve çeşitli dokularda protein sentezini uyararak anabolik yönde etki eder.

İnsülin karaciğerde glikolizi ve glikojen sentezini artırır. Lipolizi baskılar, lipogenezi ve lipoprotein lipazı uyarır. Glikoneogenezi ve protein katabolizmasını inhibe eder. Yağ dokusunda triaçilgliserol sentezini uyarır. Kas dokusunda glukoz transportunu artırır. Glikojen sentezini ve glukoz metabolizmasını hızlandırır. Amino asidin hücrelere girişini ve protein sentezini artırır (23).

İnsülin Direnci: İnsülin direnci, insülinin glukozu hücre içine gönderme etkisinin azalması veya kaybolması olayıdır. Bu olay sonunda kanda artan glukoz, insülin salgılama mekanizmasını uyarır. Böylece hiperglisemi ve hiperinsülinemi birlikte oluşur. Bu özellik insülin direncinin en göze çarpan tablosudur. İnsülinin karaciğer, kas ve yağ dokusundaki etkilerine karşı direnç oluşarak, karaciğer kaynaklı glukoz yapımı artar. Kas ve yağ dokusuna insülin aracılığıyla olan glukoz alımı azalır.

İnsülin direnci olan bireylerde ancak fazla miktarda insülin ile normal karbonhidrat metabolizması idame ettirebilmektedir. Pankreasta bir bozukluk olmadığı sürece kompensatuvar hiperinsülinemi ile normal karbonhidrat metabolizması idame ettirilir. Beta hücrelerinde programlanmış bir defekt var ise, bir süre sonra beta hücresi kompensatuvar hiperinsülinemiye sağlayamaz. Bozulmuş glukoz toleransı veya Tip 2 diabetes mellitus gelişir. Hiperinsülineminin ateroskleroza uyardığı endotel ve intima kalınlaşmasını arttırdığı söylenirse de, ateroskleroza yol açan neden hiperinsülinemi değil, hiperinsülinemi tablosu gösteren insülin direncidir. Çünkü UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) çalışmasında dışarıdan verilen ve sıkı diyabet kontrolü sağlayan hiperinsülinemi değerindeki insülinin kardiovasküler

komplasyonlara yol açmadığı aksine komplasyonların azaldığı gözlenmiştir. İnsülin tedavisi hiperinsülinemi oluşturmasına karşın glisemik kontrolü sağlayarak ve lipoprotein lipazı aktive ederek anti aterojen etki gösterir. Yoğun insülin tedavisi küçük yoğun LDL miktarını ve lipoproteinlerin glikolizasyonunu ve oksidasyonunu azaltarak, olumlu etkiler gösterir. Ancak glisemik kontrol ile lipid düzeylerindeki iyileşme hiçbir zaman tamamen normale dönüşü sağlayamaz (24).

Normal insülineminin vasküler direnç üzerine olumlu etkisi vardır. Obez olmayan, insülin direnci bulunmayan normoglisemik bireylere insülin infüzyonu ekstremitelerde kan akımını, kalp debisini artırır. Obez ve insülin direnci bulunanlarda insülin, iskelet kasının vasküler direncini azaltamaz dolayısıyla kan akımını artıramaz, böylece kalp debisini de arttıramaz. Bu kişilerde ve tip 2 diyabetiklerde insülinin endotel hücrelerinden nitrik oksit (NO) üretimini uyaran fosfatidilinozitol-3 kinaz (PI-3 kinaz) yolunda defektler olduğu gözlenmiştir. Kısaca insülin direnci insülinin vazodilatasyon etkisinin gelişmesini engeller. Bu da hipertansiyonun gelişmesinde önemli rol oynar.

IRAS (Insulin Resistance Atherosclerosis Study) çalışmasında insülin direnci ile karotis intima-media kalınlığı arasında korelasyon bulunması insülin direncinin aterosklerozda bağımsız etken olduğunun işareti olarak kabul edilmiştir. Ancak bu ilişki ancak beyazlarda bulunabilmiştir (25).

İnsülin direnci hücreler olarak prereseptör, reseptör ve postreseptör olmak üzere üç düzeyde sınıflandırılmaktadır. İnsülin direncinin oluşmasında postreseptör düzeyindeki defektler daha önemli rol oynar (26).

İnsülin direncinin hücreler sınıflaması

A. Prereseptör düzeyinde insülin direnci:

1. Anormal beta hücre salgı ürünleri: İnsülin geninde yapısal mutasyonlar sonucu, anormal defektif insülin molekülleri oluşur. Ayrıca proinsülin

molekülünde proteolitik parçalanma bölgesindeki yapısal anormaliye bağlı olarak, proinsülin-insülin dönüşümü tam olmaz. Tüm bu nedenlerle endojen insüline karşı doku yanıtı azalarak direnç oluşur.

2. Dolaşan insülin antagonistleri: Bunlar kortizol, büyüme hormonu, glukagon, katekolamin gibi hormonal antagonistler, serbest yağ asitleri, anti insülin antikoru ve insülin reseptör antikoru gibi hormonal olmayan insülin antagonistleridir.

3. İskelet kası kan akımında ve kapiler endotel hücrelerde bozukluklar

B. Reseptör düzeyinde insülin direnci:

1. Reseptör sayısının azalması: Tip 2 diyabetiklerde reseptör afinitesinde herhangi bir değişiklik olmaksızın insülin reseptör sayısında azalma söz konusudur.

2. Reseptör mutasyonları

C. Postreseptör düzeyinde insülin direnci:

Son yıllarda insülin direncinin oluşmasında en önemli katkıyı postreseptör defektlerin sağladığı ileri sürülmektedir (26). Bunlar;

1. İnsülin reseptör tirozin kinaz aktivitesinin azalması

2. İnsülin reseptör sinyal ileti sisteminde anomaliler

3. Glukoz transportunda azalma

4. Glukoz fosforilasyonunda azalma

5. Glikojen sentetaz aktivitesinde bozulma

6. Glikolizis/glukoz oksidasyonunda defektler

İnsülin direncinin anatomo-patolojik sınıflaması

A. İskelet kasında insülin direnci: Kas gibi periferik dokular insülin direncinin primer yeridir. Yapılan birçok çalışmada da tip 2 DM li hastalarda insülin ile uyarılmış glukoz kullanımında defektin en fazla olduğu yerin iskelet kası olduğu gösterilmiştir (27). İskelet kasında insüline bağlı glukoz kullanımında defekt tip 2 diyabetikler dışında non-diyabetiklerde de görülmektedir.

B. Yağ dokusunda insülin direnci: Yağ dokusundaki hormon sensitif lipaz, trigliseridleri esterleşmemiş yağ asidi (NEFA) ve gliserole parçalar. Bu işlem normalde insülin tarafından inhibe edilir. Bu yüzden yağ dokusundaki lipolizis insüline çok hassastır. Tip 2 DM ve şişmanlıkta ise insülinin antilipolitik bu etkisine karşı direnç gelişmektedir. Bundan dolayı insülin direnci veya insülin eksikliği hormon duyarlı lipazın aktivitesinde artışa yol açarak NEFA salınmasını artırır.

C. Karaciğerde insülin direnci: Genel olarak, tip 2 DM da, karaciğerin de insülin etkisine dirençli olduğu kabul edilmektedir. Bu hastalarda açlık hiperglisemisinin tamamının karaciğer glukoz yapımındaki artışa bağlı olduğu kabul edilmektedir. Karaciğerden glukoz yapımı glikojenolizis ve glikoneogenez yolu ile olur. Hepatik glukoneogenezdeki artışın kesin mekanizması bilinmemekle beraber hiperglukagonemi ve laktat, alanin ve gliserol gibi glikoneojenik prekürsörlerin artışı sözkonusudur.

İnsülin Direnci Ölçüm Metodları

Günümüzde periferik insülin direncini değerlendirme metodlarını şu şekilde sınıflayabiliriz.

1. İnsülin duyarlılık indeksleri
2. İnsülin- glukoz - C-peptid oranları
3. Oral glukoz tolerans testi (OGTT)
4. Continuous Infusion of Glucose with Model Assessment (CIGMA)

5. Minimal Model ile FSIVGTT
6. İnsülin tolerans testi
7. Hiperinsülinemik Öglisemik Klemp Testi (HECT)
8. Homeostasis Model Assesment (HOMA) (28).

Altın standart tanı yöntemi, öglisemik insulin klemp testidir. Pahalı ve zahmetli bir test olup, klinik pratikte kullanılmaz. Klinik pratikte en sık kullanılan yöntem HOMA formülüdür. Normal bireylerde HOMA değeri 2.7'den düşük olarak bildirilmektedir, 2.7'nin üzeri ise değişik derecelerde insülin direncini yansıtır.

[HOMA: açlık insülini ($\mu\text{U/ml}$) x açlık plazma glukozu (mg/dl) / 405)] (29).

II.5. Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PKOS) doğurganlık çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluktur. Sendromun prevalansı yaklaşık %6-8 olarak bildirilmektedir (30). İlk kez 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından, yedi hastadan oluşan bir seride polikistik overler ve amenore birlikteliği şeklinde rapor edilmiştir (31). Aradan geçen 80 yılda PKOS alanında önemli gelişmeler kaydedilmiş olmakla birlikte, günümüzde halen sendromun etyopatogenezi ve tanı kriterleri hakkında tartışmalar süregelmektedir. En yaygın olarak kullanılan tanı kriterleri, 1990 yılında Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) tarafından düzenlenmiş bir konferansta oluşturulmuştur (32). Buna göre, PKOS tanısı için klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ile kronik anovulasyon bulunması ve Cushing sendromu, hiperprolaktinemi, klasik olmayan konjenital adrenal hiperplazi gibi PKOS benzeri kliniğe yol açabilecek diğer nedenlerin ekarte edilmesi gereklidir. Buna karşılık, 2003 yılında 1990 NIH kriterleri yeniden gözden geçirilmiş ve öncekine benzer şekilde diğer etyolojik nedenler ekarte edildikten sonra sendrom tanısının üç kriterden (oligo-

anovulasyon, klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ve ultrasonografide polikistik overler) ikisinin birlikteliği ile koyulması önerilmiştir (33-34).

Kronik anovulatuvar infertilitenin en sık nedeni olan PKOS, multisistemik reproduktif-metabolik bir sendrom olarak tip 2 diyabet, dislipidemi, kardiyovasküler hastalık ve endometriyal karsinoma gibi uzun dönem sağlık riskleri taşıması nedeniyle günümüzde bir halk sağlığı problemi olarak da ön plana çıkmaktadır.

PKOS genellikle peripubertal dönemden itibaren başlayan menstruel düzensizlikler (oligo-amenore, disfonksiyonel uterus kanaması), hiperandrojenizm bulguları (hirsütizm, akne, ciltte yağlanma, androjenik alopesi) ve infertilite ile karşımıza çıkmaktadır. Polikistik over sendromunun bulgu ve belirtileri arasında Hirsütizm %60-90, Oligomenore %50-90, İnfertilite %55-75, Polikistik over %50-75, Obezite %40-60, Amenore %25-50, Akne %25, Disfonksiyonel uterus kanaması %30, normal menstrüel patern %22 oranında görülmektedir (35).

Hastaların laboratuvar incelemesinde over ve adrenal kökenli androjenik hormonlarda artışla karakterize hiperandrojenemi gözlenir. Ayrıca, LH (lüteinizan hormon) düzeylerinde ve LH/FSH oranında artış olabilir. Yaklaşık %25-60 olguda hiperinsulinemi ve insulin direnci saptanabilir (36,37).

PKOS Etyopatogenezi

Etyoloji kesin olarak bilinmemekle birlikte PKOS, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkmış sık görülen ve kompleks bir hastalık olarak değerlendirilebilir. Sendromun fizyopatolojisinde gonadotropin dinamiğinde değişiklikler, steroidogenez defektleri, insülin salınım ve etki bozuklukları beraberinde genetik faktörler ön plana çıkmaktadır.

İnsulin direnci ve beraberinde kompensatuvar hiperinsulinemi hem zayıf hem de obez PKOS hastalarında görülebilen bir bulgudur (36). PKOS'da insülin direncinin değerlendirilmesinde çalşılan populasyonun özellikleri ve kullanılan

insulin direnci ölçüm metotları sonuçlar üzerinde önemli etkiye sahiptir (38). Sendromda insulin etki anormalliklerinin mekanizması net olarak bilinmemektedir (39). İlk kez 1980 yılında Burghen ve arkadaşları tarafından obez PKOS'lu hastalarda hiperandrojenizm ve hiperinsulineminin pozitif lineer korelasyonunun bulunmasının ardından birçok çalışmada zayıf ve obez PKOS hastalarında insulin direnci gösterilmiştir, ancak ne obezite ne de tek başına androjen fazlalığı PKOS'de görülen insülin etki bozukluğunu açıklamamaktadır (39,40). Ayrıca, her PKOS hastasında insulin direnci olmadığı gibi, insulin direnci ölçümü PKOS tanı kriterleri arasında da yer almaz (38). PKOS'da insulin direnci ve hiperinsulinemi overde androjen sentezini ve ayrıca seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) düzeylerini azaltarak serbest testosteron düzeyini arttırmaktadır. İnsülin direncini inceleyen bazı çalışmalarda, insülinin reseptöre bağlanması normal iken, insülin-aracılı glukoz transportunun azalmış olduğu (artmış serin fosforilasyonuna bağlı postreseptör defekt) saptanmıştır (39).

PKOS ve Obezite

Obezite PKOS'lu kadınlarda sık görülür ve genetik faktörler, fiziksel aktivite ve diyetle bağlantılı olabilir. Android tip veya santral obezite KVH riski ile bağımsız bir ilişki içerisindedir ve tek başına obeziteden daha önemli bir prediktördür. PKOS'lu kadınlarda android tipte obezite sıkça görülmektedir. Anovulasyonu ve PKOS'u olan kadınlarda obezite sıklığının %50'nin üzerinde olduğu bilinmektedir (41). Obezite, normal ovulasyonu bozan üç değişiklik yapmakta olup, zayıflama ile bu değişikliklerin hepsi düzelebilmektedir:

1. Periferde androjenlerin östrojenlere aromatisasyonunda artış.
2. Serbest östradiol ve testosteron düzeylerinin artmasına neden olan SHBG düzeylerinde azalma.
3. Overin stroma dokusunda androjen sentezini uyaran insulin düzeyinde artış.

PKOS ve insülin direnci

Hiperandrojenizmin insülin direncine neden olmadığı gösterilmiştir (41-43). Ancak hiperinsülineminin hiperandrojenizme neden olduğu bilinmektedir. İnsülin, in vitro olarak kendi reseptörü veya IGF-1 reseptörü üzerinden overlerde androjen üretimini artırır (44). İn vivo olarak ise insülinin 17 alfa hidroksilaz ve 17.20 desmolaz enzim sistemi (P450c17) üzerinde stimüle edici etkisi olduğu gösterilmiştir (45). İnsülin androjen düzeylerini dolaylı olarak da etkileyebilir. Örneğin gonadotropik hormon salgılatıcı hormona (GNRH) karşı gonadotropik hormonların (LH, FSH) cevabını artırarak androjen düzeylerini artırabilir (46). Bunun yanı sıra insülin, SHBG'nin karaciğerde üretimini azaltma yoluyla biyolojik olarak aktif androjen olan serbest testosteronun dolaşımdaki miktarını artırarak da hiperandrojenizme neden olabilir. İnsülin karaciğerde insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein- I 'in (IGFBP- I) yapımını engellerken IGF-I 'in overlere bağlanmasını artırabilir (47-48). IGF-I hem LH'nin overlerde androjen üretimi üzerindeki etkisini artırır, hem de overlerden androjen salınımını artırır. Polikistik over sendromunda adrenallerde ve overlerdeki P450c17 enziminin liaz aktivitesinde artış olduğu düşünülmektedir (45). Bu enzimin aktivitesi serin fosforilasyonu ile artar (49). Buna göre, serin fosforilasyonunun insülin direnci oluşumunda ve androjen üretiminin artmasındaki temel olay olduğu öne sürülmüştür (50). İnsülin direnci olan bireylerde artmış insülin düzeylerinin, insülin etkisine direnç olmasına rağmen nasıl diğer dokularda, örneğin overlerde insülin aracılı hiperandrojenizme neden olduğu tartışılmakla birlikte, insüline direncin bir bireydeki tüm hücre tiplerinde değil, sadece bazı hücre tiplerinde olabileceği gösterilerek insülin dirençli bireylerde artmış olan insülinin, insülin aracılı hiperandrojenizme neden olabileceği ispatlanmıştır (51-52).

III. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

III.1. Çalışma Grubu

Çalışma için Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları etik kurulundan onam alınmıştır. Çalışmamızda, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen ağırlıkları 150-350 gr. arasında değişen erişkin 41 adet dişi Wistar albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Temin edilen hayvanların daha önce çiftleşmemiş ve herhangi bir deneysel çalışmada kullanılmamış olmasına dikkat edilmiştir. Sıçanların laboratuvar koşullarına adaptasyonu amacıyla 22°C ısıda 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusu uygulanarak sıçan yemi serbest olarak (ad libitum) verilmiştir. Deneysel uygulamalar, deney hayvanlarının bulunduğu ortamdan uzak ve sessiz bir çalışma ortamında yapılarak ve uygulamalar sırasında sert ve ani hareketlerden kaçınılarak stres yaratılmamaya çalışılmıştır. Çalışmaya alınan her bir dişi sıçan başlangıç ağırlığını saptamak için tartılmış ve glukometre ile AKŞ ölçülmüştür. Araştırmamızda kullanılan Wistar Albino cinsi 41 adet dişi sıçan 5 gruba ayrılarak gruplara aşağıda belirtilen diyet en az 6 hafta süre boyunca uygulanmıştır:

- **Kontrol Grubu (n:11):** Standart yem+ musluk suyu
- **Glukoz Grubu (n:7):** Standart yem + %30(w/v) Glukozlu musluk suyu
- **Fruktoz Grubu (n:7):** Standart yem + %30(w/v) Fruktozlu musluk suyu
- **HFCS-55 Grubu (n:8):** Standart yem + %30(v/v) HFCS-55- musluk suyu
- **HFCS-90 Grubu (n:8):** Standart yem + %30(v/v) HFCS-90- musluk suyu

6 hafta sonra her bir dişi sıçanın östrus fazı, her sabah standart vajinal sürüntü metoduyla tespit edildi. Vajinal sürüntüler günde bir kez, 09:00-10:00 arasında alındı. Deneklerin vulva bölgesi %70 etil alkolle silindikten sonra, steril tahta çubukların pamukla kaplanmış uç kısımları nemlendirildi. Vajina

duvarından, nazikçe sürüntü alınıp, lam üzerine yayıldı. Oda sıcaklığında kuruyan sürüntülere %70 metanol uygulanıp, yine oda sıcaklığında kurutularak fiksasyon sağlandı. %1'lik Toluidin mavisi (Sigma-USA) ile 5 dakika boyanan preparatlar distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra entellan ile kapatıldı. Mikroskop altında incelenen sürüntülerden hücre popülasyonunun %90'ını nükleussuz kornifiye hücrelerin oluşturduğu sürüntü veren denekler östrus fazında kabul edildi. Östrus fazında olan sıçanlar seçilerek genel anestezi altında (75 mg/ kg Ketamin ve 10 mg/ kg Xylazine) intrakardiyak kan örnekleri ve over örnekleri alınmıştır. Alınan kan örnekleri 30 dakika içerisinde +4⁰C'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ependorf tüplerine ayrılmıştır. Ayrılan plazmalar ve eritrosit paketleri biyokimyasal analizlerin yapılacağı zamana kadar -80 ⁰C'de saklanmıştır. Plazma örneklerinden rutin biyokimyasal parametreler, leptin, MDA ve SOD, DNA/RNA Oksidatif Hasar belirteci; eritrositlerden ise GPx çalışıldı.

III.2. Araç ve Gereçler

a. Santrifüj	Hettich Rotina 35 R / Soğutmalı (Germany)
b. Derin Dondurucu	Thermo (-80 ⁰ C)
c. Cam Pipetler	Precicolor HBG (Germany)
d. Vorteks	Yellowline (USA)
e. Elisa okuyucu	EL-x 800 (USA)
f. Spektrofotometre	UV 1601 (Japan)
g. Gama sayıcı	ISOCOM I (USA)
h. Histoloji mikroskopu	Olympus BX-40

III.3. Yöntemler

Biyokimyasal İncelemeler

Plazma örneklerinde glukoz, total kolesterol, trigliserit, HDL, LDL düzeyleri tam otomatik biyokimya analizöründe (Beckman Coulter AU2700,

Brea, California, USA) endpoint kolorimetrik yöntemle orijinal reaktifleri ile çalışılmıştır.

Plazma örneklerinde leptin düzeyleri ELISA (enzim linked immunosorbant assay) yöntemiyle ticari kitle (BioVendor research and diagnostic products, Karasek, Czech Republic) çalışılmıştır. Leptin kitinin intra-assay varyasyon katsayısı (CV) % 1,9, inter-assay CV 'si %4,4 olarak bildirilmiştir.

Plazma örneklerinde insülin düzeyleri EIA (enzim immuno assay) yöntemiyle ticari kitle (Bertin pharma, Montigny Le Bretonneux, France) çalışılmıştır. İnsülin direnci HOMA formülü ile hesaplanmıştır.

Plazma örneklerinde DNA/RNA oksidatif hasar düzeyleri EIA (enzim immuno assay) yöntemiyle ticari kitle(Cayman Chemical Company, Michigan, USA) çalışılmıştır. Kitin intra assay CV'si 3000 pg/ml konsantrasyonda%6,2 iken 263,4 pg/ml konsantrasyonda %4,7, 52 pg/ml konsantrasyonda %11,6 olarak saptanmıştır. İnter assay CV katsayıları ise 3000 pg/ml konsantrasyonda %8,4, 263,4 pg/ml konsantrasyonda %5,5, 52 pg/ml konsantrasyonda %10,7 olarak bildirilmiştir.

Plazma örneklerinde süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri enzimatik kolorimetrik yöntem ile Cayman Chemical Company, Michigan, USA kitleri ile çalışıldı. Kitin çalışma prensibi, ksantin oksidaz/hipoksantin sistemi ile oluşturulan süperoksit radikalının tetrazolium tuzu ile renkli bileşik oluşturmasına dayanmaktadır. Ortamdaki SOD miktarı süperoksit radikalini dismutate edeceğinden rengin şiddeti SOD konsantrasyonu ile ters orantılıdır. SOD'un bir ünitesi, süperoksit radikalının %50 dismutasyonu için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Kite ait intra-assay CV değeri %3,2, inter-assay CV değeri %3,7 olarak bildirilmiştir. Kitin ölçüm aralığı 0.025-0.25 U/ml SOD değerleri arasındadır.

Plazma örneklerinde malondialdehit (MDA) düzeyleri spektrofotometrede endpoint kolorimetrik yöntemle ticari kitle (Oxisresearch, California, USA) çalışılmıştır. Reaksiyonun prensibi, bir molekül MDA'nın 2 molekül kromojenik reaktif N-metil-2-fenilindol ile +45⁰C'de reaksiyona girerek renkli karbosiyanin maddesini oluşturmasına dayanmaktadır. Bu maddenin absorbansının 586 nm dalga boyunda ölçülmesi ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Kitin CV'si prospektüsünde %3,7'nin altında olarak bildirilmiştir.

Tam kan örneklerinde glutatyon peroksidaz (GPx) düzeyleri spektrofotometrede kinetik yöntemle ticari kitle (Randox, Crumlin, United Kingdom) çalışılmıştır. Kitin prensibi, indirgenmiş glutatyonun (GSH) kumen hidroperoksit ile GPx'ın katalizlediği reaksiyonlaokside glutatyona (GSSG) oksitlenmesi ve oksitlenen GSSG'nın glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) kullanılarak 340 nm dalga boyunda meydana gelen absorbans azalmasının izlenmesine dayanmaktadır. Örnekteki hemoglobin miktarı drabkin reaktifi ile spektrofotometrede kolorimetrik yöntemle ölçülerek GPx aktivitesi U/g Hb olarak hesaplanmıştır.

Plazma örneklerinde serbest testosteron düzeyleri RIA (radioimmuno assay) yöntemiyle ticari kitle (Beckman Coulter, Prague, Czech Republic) çalışılmıştır. Serbest testosteron kitinin intraassay CV'si %6,2'nin altında, inter assay CV 'si %9,7'nin altında bildirilmiştir.

Histolojik İnceleme

Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi

Deney hayvanları, Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde etik kurallara uygun olarak çalışma 5 grup halinde yürütülmüştür. Alınan ovaryum doku örnekleri ışık mikroskop ile değerlendirilmek üzere % 10 formalin

solüsyonu ile 24-48 saat süreyle oda ısısında tespit edilmiştir (Tablo 1). Doku örnekleri, rutin ışık mikroskopi parafin doku takibi yöntemi ile takip edilerek; derecesi giderek artan alkol serileri ile dehidratasyon işlemini takiben, ksilen ile şeffaflaştırılarak parafine gömülmüştür.

Tablo 1.Parafin Doku Takip Protokolü

A. TESPİT	% 10 FORMALİN	24-48 SAAT
	AKAR SU	24 SAAT
B. DEHİDRATASYON	% 60 ALKOL	½SAAT
	% 70 ALKOL	½SAAT
	% 80 ALKOL	½SAAT
	% 95 ALKOL	½SAAT
	% 100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
	% 100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C. ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL:KSİLEN (1:1)	½SAAT
	KSİLEN I	1 SAAT
	KSİLEN II	1 SAAT
D. İNFİLTRASYON	KSİLEN-PARAFİN (1:1)	½SAAT
	PARAFİN I	1 SAAT
	PARAFİN II	1 SAAT
E. GÖMME	PARAFİN	

Histopatolojik Değerlendirme

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutulmuştur. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den%60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akarsu altında yıkanmıştır. Kesitler Hematoksilen Eozin (H-E) ile boyanmıştır. Aynı şekilde 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır (Tablo 2). Işık mikroskopunda incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir.

Tablo 2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95ALKOL	2 DAKİKA
	% 80ALKOL	2 DAKİKA
	% 70ALKOL	2 DAKİKA
	% 60ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	% 80 ALKOL	1 DAKİKA
	% 95 ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA VEYA ETÜVDE	
	KSİLEN	1 SAAT
KAPAMA	ENTELLAN	

Gruplardan elde edilen ovaryum örneklerinin H-E boyalı kesitlerinde, kortekste bulunan gelişen follikül, primer folikül, sekonder folikül, Graff follikülü ve korpus luteum sayımları yapılmıştır.

İndirekt İmmunohistokimya Boyaması

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletilmiştir. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulanmıştır. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edilmiştir. Bloklama solüsyonu dokudan

uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar e-NOS, i-NOS ile bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco, USA) ile 30'ar dakika boyanmıştır. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyanmıştır. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatılmıştır. İmmunohistokimyasal değerlendirme incelenerek yok veya zayıf (+1) ve en şiddetli (+5) aralığında skorlanarak değerlendirilmiştir.

TUNEL Metodu

TUNEL Yöntemi ile apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti kullanılmıştır. 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edilmiştir. Ardından 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinize edildikten sonra azalan alkol serileri ile 2'şer dakika (%95, %80, %70, %60) rehidratasyon uygulanarak ve dokular serum fizyolojik ile oda ısısında 5 dakika (%0.85 NaCl) muamele edilmiştir. 5 dakika PBS (fosfat buffer solüsyonu) ile oda ısısında yıkandıktan sonra kesitler %4 paraformaldehit ile 15 dakika oda ısısında muamele edilmiştir. Tekrar 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkanarak ve 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml Proteinaz K 20 dakika doku kesitlerine uygulanmıştır. PBS ile yıkamayı takiben %4'lük paraformaldehit ile 5 dakika yeniden fiksasyon yapılarak ve 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkanmıştır. Kesitler 5- 10 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dakika plastik cover slipler kesitleri kapatacak şekilde bekletilmiştir. 15 dakikalık SSC yıkamasının ardından 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkanmıştır. 3- 5 dakika hidrojen peroksit uygulanması sonrası 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkanarak, 1/500 oranında

PBS ile hazırlanan Streptavidin HRP solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübasyona tabi tutulmuştur. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkanarak ve ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapılarak, birkaç kez distile su ile yıkama yapılmıştır. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapılmıştır. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanmaya çalışılmıştır. Negatif kontrol için primer antikor yerine PBS, pozitif kontrol olarak da apoptozis olduğu bilinen testis dokuları kullanılmıştır. İmmunohistokimyasal değerlendirmede preparatlara boyanın yoğunluğu ve dağılımına göre + (1), +++++ (5) olarak körlemesine semi-kantitatif puanlama yapılmıştır. Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Morfometrik Analiz

Alınan örneklerin H-E boyamaların Resim 1'de gösterilmiştir.

Görülen patolojik bulgular:

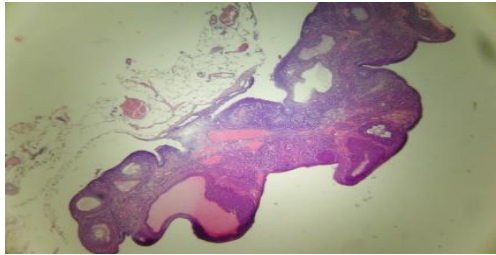
Sadece folikül sayısında azlık +1,

Beraberinde folikül dejenerasyonu ve oosit yokluğu +2,

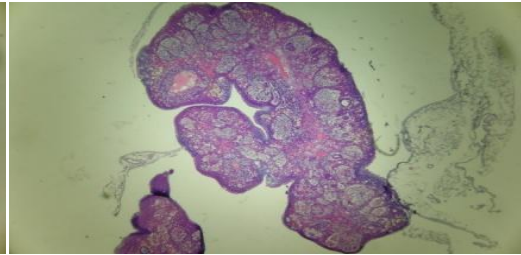
Beraberinde hemoraji ve ödem +3,

Beraberinde kistik yapılar +4,

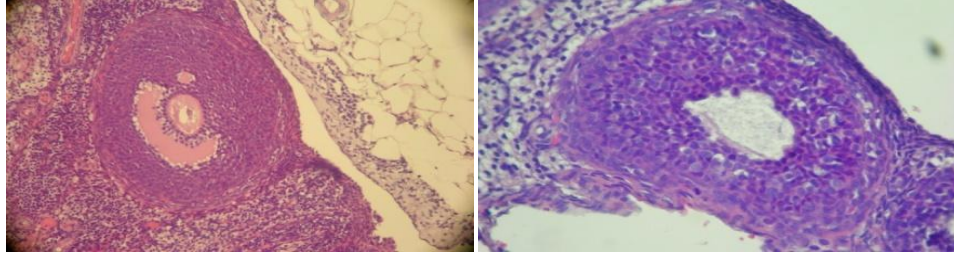
Beraberinde fibrozis +5 olarak değerlendirilmiştir.



Normal Folikül(X40)

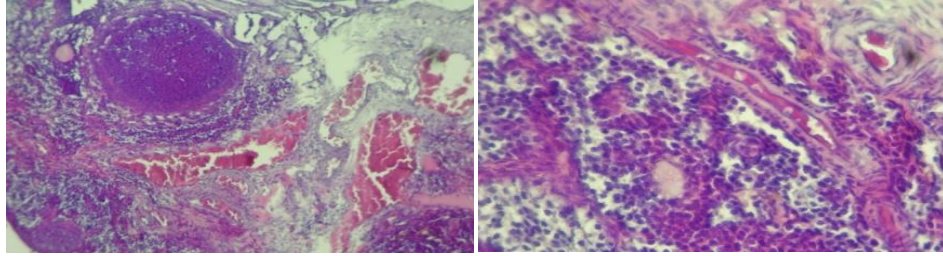


Az Folikül(x40)

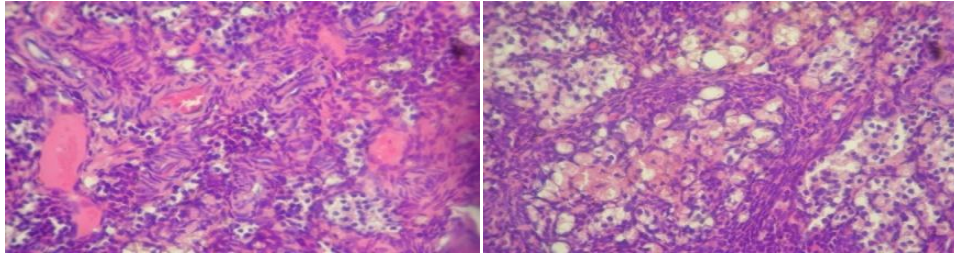


Oosit içeren folikül(x200)

Oosit olmayan Folikül



hemoraji ve kistik yapılar gözlenen(X400) Fibrozis gözlenen(x400)



Hemoraji(X400)

Hemoraji+Fibrozis

Resim 1. Patolojik skorlamada kullanılan histolojik parametreler için alınan görüntülerde azalmış folikül sayısı, folikül dejenerasyonu, ödem, hemoroji, konjesyon ve fibrozis görüntüleri.

Ayrıca immunohistokimya görüntülerinde boyamanın yoğunluğuna ve dağılımına göre yok veya en az +1 ile en çok +5 arasında skorlanmıştır.

İstatistiksel Analizler

Tüm analizler SPSS 16.0programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Grupların deney öncesi ve sonrası ağırlıkları ile deney öncesi açlık kan glukoz düzeyleri ve deney sonrası açlık kan glukoz düzeyleri arasındaki farkların karşılaştırılmasında Wilcoxon Ranks testi kullanılmıştır. Biyokimyasal analizlerde çalışma grupları arasındaki farkların karşılaştırılmasında Mann Whitney U-testi, histolojik verilerin yüzdelerinin karşılaştırılmasında ise Pearson ki kare testi kullanılmıştır. Tüm testlerde $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

Çalışmaya Wistar Albino cinsi 41 dişi sıçan dahil edildi. Çalışma grupları aşağıdaki şekilde organize edilerek; 11 sıçandan oluşan standart yem ve içme suyu tüketen kontrol grubu, 7 sıçandan oluşan standart yem ve %30'luk glukozlu içme suyu tüketen glukoz grubu, 7 sıçandan oluşan standart yem ve %30'luk fruktozlu içme suyu tüketen fruktoz grubu, 8 sıçandan oluşan standart yem ve %30'luk HFCS 55'li içme suyu tüketen HFCS 55 grubu ve 8 sıçandan oluşan standart yem ve %30'luk HFCS 90'lı içme suyu tüketen HFCS 90 grubu olmak üzere 5 grup dahil edildi.

Grupların çalışma başlangıç ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında bir fark saptanmamıştır ($p=0.333$). Grupların çalışma başlangıç ağırlıkları ile çalışma sonu ağırlıkları karşılaştırıldığında glukoz, fruktoz ve HFCS- 90 gruplarında anlamlı ağırlık artışı saptanmıştır (Tablo 3). Gruplara ait biyokimyasal analiz sonuçları tablo 4 'de gösterilmiştir.

Tablo 3.Grupların ağırlık artışlarının karşılaştırması

Grup	Başlangıç ağırlığı (g)	Son ağırlık (g)	p
Kontrol	201.9±43 (150-311)	202.3±43.2 (151-314)	0.62
Glukoz	192.4±22.2 (163-230)	209.7±26.3 (176-254)	0.01
Fruktoz	179±22.1 (150-208)	199.5±21.9 (168-224)	0.01
HFCS 55	202.8±24.2 (150-226)	207.1±11.1 (191-229)	0.67
HFCS 90	200.7±14.5 (187-232)	207.5±13.4 (195-232)	0.04

Tablo 4.Çalışma gruplarında Biyokimyasal veriler

	Kontrol (n=11)	Glukoz (n=7)	Fruktoz(n=7)	HFCS 55(n=8)	HFCS 90(n=8)
	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
	(Min-Max)	(Min-Max)	(Min-Max)	(Min-Max)	(Min-Max)
*Glukoz 0	81,2±9,1	88,1±12,8	89,5±7	96,6±17,4	97,8±29
(mg/dL)	(65-95)	(72-102)	(76-96)	(71-121)	(68-148)
*Glukoz 1	105,1±23,9	112,4±20,5	183,4±47,9	155±33,6	157,8±44,9
(mg/dL)	(65-134)	(95-156)	(117-251)	(123-227)	(78-219)
İnsülin	2,6±2,4	2,22±1,75	1,6±0,57	12,1±22,3	8,8±11,1
(uU/mL)	(0,6-8,7)	(0,4-4,2)	(0,8-2,3)	(0,4-31)	(0,7-35)
HOMA	0,74±0,79	0,61±0,47	0,72±0,34	6,11±12,8	3,4±3,7
	(0,15-2,81)	(0,13-1,14)	(0,48-1,47)	(0,17-37,69)	(0,13-11,8)
Leptin	100,2±63	108,4±50,5	105,2±50,5	184,3±142,3	176,8±94,4
(pg/mL)	(38,15-262)	(53,2-200)	(27-169,9)	(49,27-484,4)	(75-330,3)
Kolesterol	79,4±21,7	73,7±20,6	79,5±21,7	63,6±31,7	59±30,9
(mg/dL)	(53-123)	(48-99)	(48-115)	(29-121)	(21-122)
Trigliserit	53,1±21,7	60,2±30,4	73,7±42,4	73,1±27,2	97,6±43,6
(mg/dL)	(30-96)	(35-126)	(40-140)	(38-118)	(38-160)
HDL-K	37,9±11,5	36,4±11,9	38,2±10,2	31,5±14	29,3±15
(mg/dl)	(21-60)	(23-54)	(24-54)	(16-54)	(10-58)
LDL-K	30,8±10,8	25,4±13,9	27,2±1,7	19,8±19,8	13,8±18,7
(mg/dL)	(20-54)	(2-41)	(3-53)	(2-58)	(1-56)
S.Testosteron	0,24±0,15	1,07±0,38	0,27±0,28	0,46±0,26	0,16±0,07
(pg/mL)	(0,1-0,5)	(0,6-1,7)	(0,1-0,9)	(0,1-0,8)	(0,1-0,3)
SOD	1,12±0,51	1,32±0,17	1,61±0,22	1,5±0,11	1,56±0,13
(U/mL)	(0,2-1,8)	(1,2-1,7)	(1,2-1,9)	(1,3-1,7)	(1,3-1,7)
GPx	91,8±34,5	132,9±60,5	139,7±34,9	285,2±102	63,1±46
(U/g Hb)	(50-152,9)	(76,5-230)	(87,3-199,8)	(132,5-446,9)	(10-125,2)
Malondialdehit	28,9±21,4	330,5±195	25,2±11,5	65,9±52,1	21,1±13,7
(µM)	(7-57,8)	(125-687)	(10,1-40)	(10,5-181)	(8,39-48,3)
DNA/RNA	6212,2±2149,4	8834,3±2299,3	9940,8±3074,4	6014,9±2749,8	7267,1±2027,6
Oksidatif Hasar	(3085,3-9260)	(5908,7-12485)	(5982-13677)	(2670,3-10212)	(5214-10212)
(pg/mL)					

*Glukoz 0: Çalışma öncesi açlık kan glukozu

*Glukoz 1: Çalışma sonrası açlık kan glukozu

Grupların çalışma öncesi açlık kan glukozları ile çalışma sonrası açlık kan glukozları karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı farklılık saptanmıştır (Tablo 5). Grupların kontrol grubuna göre biyokimyasal parametreleri karşılaştırıldığında elde edilen p değerleri tablo 6'da, birbirleriyle karşılaştırıldıklarında elde edilen p değerleri tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Grupların açlık kan glukozu artışlarının karşılaştırması

Grup	Glukoz 0 (mg/dL)	Glukoz 1 (mg/dL)	p
Kontrol	81.2±9.1 (65-95)	105.1±23.9 (65-134)	0.041
Glukoz	88.1±12.8 (72-102)	112.4±20.5 (95-156)	0.043
Fruktoz	89.5±7 (76-96)	183.4±47.9 (117-251)	0.018
HFCS 55	96.6±17.4 (71-121)	155±33.6 (123-227)	0.012
HFCS 90	97.8±29 (68-148)	157.8±44.9 (78-219)	0.012

Tablo 6.Kontrol grubuna göre biyokimyasal verilerinin p değerleri karşılaştırması

	Glukoz 0	Glukoz 1	İnsülin	HOMA	Leptin	Total Kolesterol	Trigliserit	HDL-K	LDL-K	Serbest Testosteron
Glukoz	0.171	0.446	0.393	0.500	0.25	0.393	0.234	0.393	0.342	0.000
Fruktoz	0.026	0.001	0.410	0.221	0.25	0.428	0.111	0.500	0.309	0.369
HFCS55	0.026	0.002	0.063	0.029	0.049	0.080	0.086	0.108	0.080	0.029
HFCS90	0.229	0.004	0.034	0.011	0.016	0.026	0.016	0.073	0.010	0.136

Tablo 7. Kontrol grubu hariç diğer grupların birbirine göre biyokimyasal verilerinin p değerleri karşılaştırılması

	Glukoz 0	Glukoz 1	İnsülin	HOMA	Leptin	Total Kolesterol	Trigliserit	HDL-K	LDL-K	Serbest Testosteron
HFCS 90-FRUKTOZ	0.343	0.209	0.008	0.014	0.065	0.053	0.149	0.082	0.052	0.288
HFCS 90-HFCS 55	0.417	0.357	0.377	0.377	0.42	0.377	0.135	0.377	0.215	0.007
HFCS 90-GLUKOZ	0.386	0.019	0.041	0.016	0.052	0.149	0.053	0.208	0.059	0.001
FRUKTOZ - HFCS 55	0.209	0.102	0.016	0.025	0.13	0.124	0.409	0.177	0.162	0.064
FRUKTOZ -GLUKOZ	0.475	0.002	0.475	0.203	0.47	0.351	0.261	0.375	0.424	0.003
HFCS 55-GLUKOZ	0.124	0.004	0.074	0.032	0.15	0.149	0.178	0.209	0.225	0.003

Grupların kontrol grubuna göre oksidatif stres parametreleri karşılaştırıldığında elde edilen p değerleri tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Kontrol grubuna göre oksidatif stres parametrelerinin p değerleri karşılaştırılması

GRUP	SOD (U/mL)	GPx (U/g Hb)	Malondialdehit (µM)	DNA/RNA Oksidatif Hasar (pg/mL)
GLUKOZ	0.445	0.057	0.000	0.013
FRUKTOZ	0.010	0.008	0.446	0.008
HFCS55	0.012	0.000	0.016	0.500
HFCS90	0.006	0.142	0.339	0.080









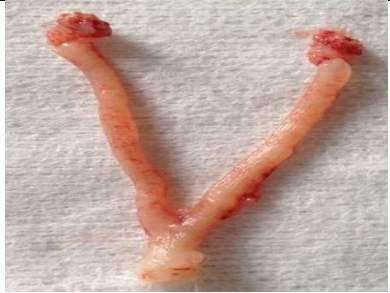

Grupların oksidatif stres parametreleri birbirleriyle karşılaştırıldığında elde edilen p değerleri tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Kontrol grubu hariç diğer grupların birbirine göre oksidatif stres verilerinin p değerleri karşılaştırılması

GRUP	SOD (U/mL)	GPx (U/g Hb)	Malondialdehit (μ M)	DNA/RNA Oksidatif Hasar (pg/mL)
HFCS 90- FRUKTOZ	0.238	0.003	0.193	0.025
HFCS 90- HFCS 55	0.115	0.001	0.006	0.104
HFCS 90- GLUKOZ	0.013	0.019	0.001	0.091
FRUKTOZ- HFCS 55	0.070	0.006	0.025	0.009
FRUKTOZ- GLUKOZ	0.022	0.203	0.001	0.221
HFCS 55- GLUKOZ	0.017	0.003	0.002	0.025

Çalışma Gruplarında Ovaryumların Makroskopik Verileri

Over morfolojisi için deneklerin örnekler alınmadan önce çekilen fotoğraflarında makroskopik olarak değişime uğramış PKOS gelişiminin onaylandığı görünümler izlenmiştir (Resim 2).

GRUPLARIN MAKROSKOBİK FOTOĞRAFLARI	
	
KONTROL	
	
GLUKOZ	
	
FRUKTOZ	
	
HFCS 55	
	
HFCS 90	

Resim 2.Grupların over dokusunun makroskopik fotoğrafları

Normal overler ile karşılaştırıldığında fruktoz, HFCS 55 ve HFCS 90 gruplarında PKOS benzeri bulgular ve sıçanlarda polikistik olarak büyümüş overlerin varlığı makroskopik incelemede gözlenmiştir.

Ovaryum Örneklerinin Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Değerlendirilmesi

Histopatolojik ve immunohistokimyasal boyamalar aynı kişi tarafından değerlendirilmiştir. İmmunohistokimyasal boyamalar boyama dağılımı ve yoğunluğuna göre +1-+5 arasında körlemesine semikantitatif olarak değerlendirilirken, H-E histokimyasal boyama folikül sayısında azlık +1, beraberinde folikül dejenerasyonu ve oosit yokluğu +2, beraberinde hemoroji ve ödem +3, beraberinde kistik yapılar +4, beraberinde fibrozis +5 olarak değerlendirilmiştir. Histopatolojik bulgular ve gruplar arası anlamlılık tablo 10'da özetlenmiştir.

Tablo 10.Histopatolojik bulgular ve gruplar arası anlamlılık

		Kontrol	Glukoz	Fruktoz	HFCS 55	HFCS 90
VEGF	+2	%45.5 (n=5)	%28.6 (n=2)			
	+3	%54.5 (n=6)	%57.1 (n=4)	%28.6 (n=2)		%25 (n=2)
	+4		%14.3 (n=1)	%57.1 (n=4)	%50 (n=4)	%50 (n=4)
	+5			%14.3 (n=1)	%50 (n=4)	%25 (n=2)
	*p		a,d	b	c	B
TUNEL	+1	%27.3 (n=3)				
	+2	%54.5 (n=6)	%57.1 (n=4)			
	+3	%18.2 (n=2)	%42.9 (n=3)	%28.6 (n=2)		%50 (n=4)
	+4			%57.1 (n=4)	%50 (n=4)	%37.5 (n=3)
	+5			%14.3 (n=1)	%50 (n=4)	%12.5 (n=1)
	*p		a,e,f,g	b	b	B
eNOS	+1	%27.3 (n=3)				
	+2	%45.5 (n=5)	%42.9 (n=3)	%14.3 (n=1)		
	+3	%27.3 (n=3)	%57.1 (n=4)	%42.9 (n=3)	%50 (n=4)	%37.5 (n=3)
	+4			%42.9 (n=3)	%50 (n=4)	%50 (n=4)
	+5					%12.5 (n=1)
	*p		a,e,g	h	b	h
H-E	+1	%72.7 (n=8)				
	+2	%27.3 (n=3)		%28.6 (n=2)		
	+3		%14.3 (n=1)	%57.1 (n=4)	%37.5 (n=3)	%62.5 (n=5)
	+4		%57.1 (n=4)	%14.3 (n=1)	%62.5 (n=5)	%37.5 (n=3)
	+5		%28.6 (n=2)			
	*p		a	b	b	b

*p değerleri

Kontrolle göre: a>0,05 b<0,01 c<0,001 h<0,05

HFCS55-Glukoz: d<0,01 g<0,05

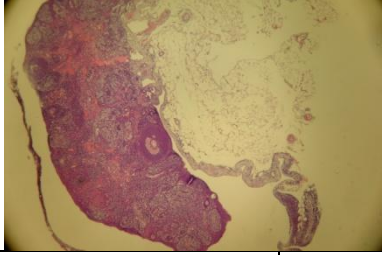
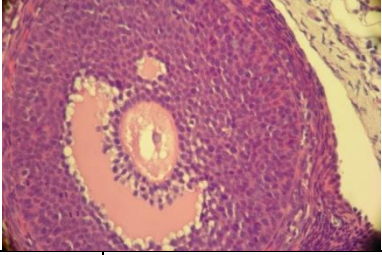
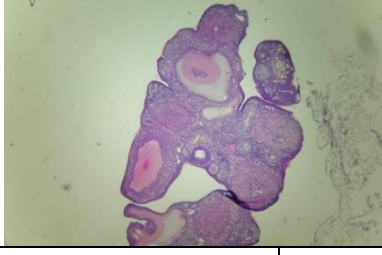
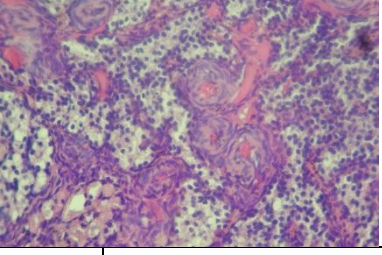
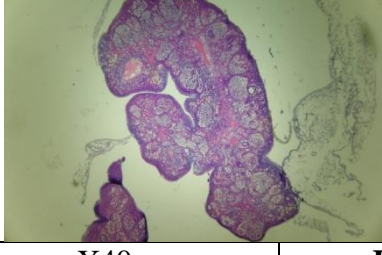
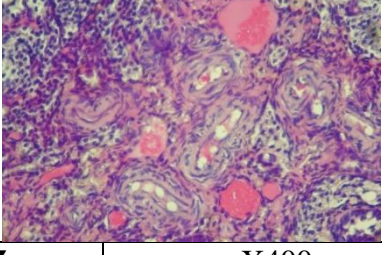
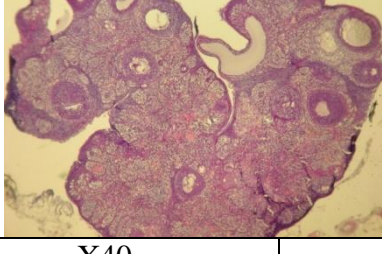
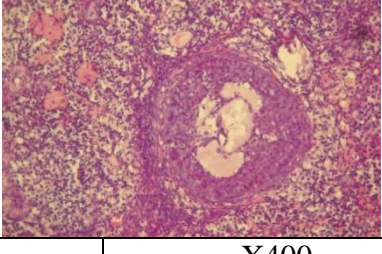
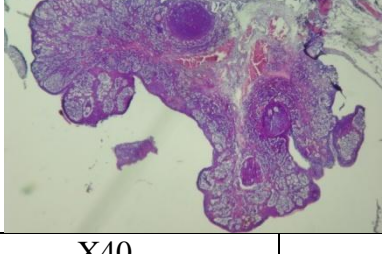
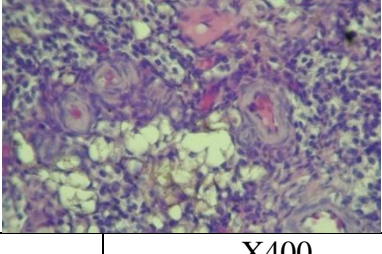
HFCS90-Glukoz: e<0,05

Fruktoz-Glukoz: f<0,05

Sıçanlardan elde edilen ovaryum kesitlerinin, H-E ile boyanarak değerlendirilmesinde, proöstrus döneminde tanımlanan bulgulara ek olarak, ovulasyona bağlı graaf follikülleri ve ovulasyon sonrasında gerçekleşen korpus luteum yapılarında artış izlenmiştir. Büyüyen oositin etrafında zona pellusida yapısı, granüloza hücrelerinin oositi çevrelemesiyle oluşan korona radyata hücreleri, granüloza hücreleri ile devam eden kumulus ooforus yapısı ve gelişmekte olan büyük bir antrum izlenmiştir. Teka internanın geniş kan damarları içerdiği ve teka eksternanın sıkı, fibröz bağ dokusu yapısında olduğu izlenmiştir.

Polikistik over bulguları veren örneklerde en belirgin olarak dikkati çeken çeşitli çaplarda primer, sekonder ve graaf follikülleriyle çok sayıda korpus luteumun yer almakta olmasıdır. Poligonal eozinofilik boyanan granüloza ve teka hücreleri folikül çevrelerinde oldukça belirgin biçimde izlenmektedir. Stromal elemanların dağılımı vasküler yapılarda konjesyon dışında özellik göstermemektedir. Bu gruba ait sıçanlardan elde edilen ovaryum kesitlerinin H-E ile boyanarak değerlendirilmesinde, dışta tek sıralı kübik germinal epitel, altında sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea izlenmiştir. Ovaryumun korteksinde gelişmekte olan primer, sekonder, Graaf follikülleri ve içte gevşek bağ dokusu yapısında medulla normal histolojik yapıda gözlemlendi. Oosit etrafında zona pellusida, granüloza hücrelerinin aralarında antrumun gelişmesi ile sekonder ve graaf folliküllerinin olduğu, folliküllerin bağ dokusuna komşu kısmında sıkı bağ dokusu yapısında teka eksterna ve iç kısmında kan damarlarından zengin teka interna yapısı gözlemlenmiştir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında özellikle fruktoz, HFCS 55 ve HFCS 90 gruplarında patolojik bulgular olarak artmış konjesyon ve kanlanma, gelişme geriliği gösteren foliküller ve oosit oluşamama durumu, kapsülde kalınlaşma ile parankim ve stromada fibrozis belirtileri izlenmiştir (Resim 3).

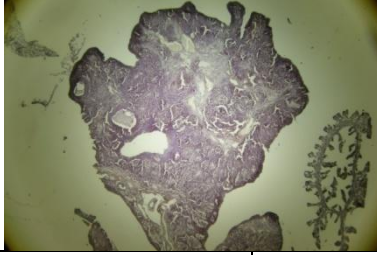
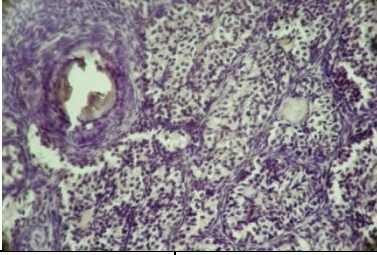
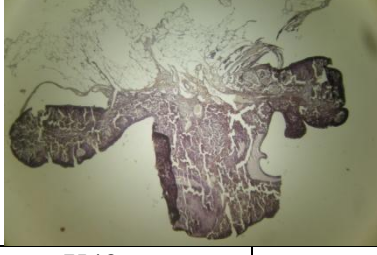
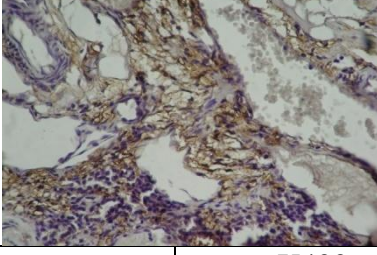
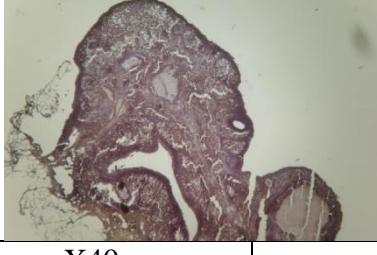
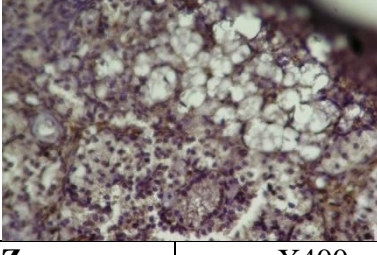
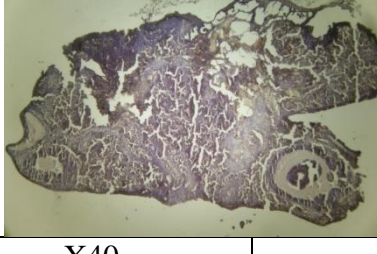
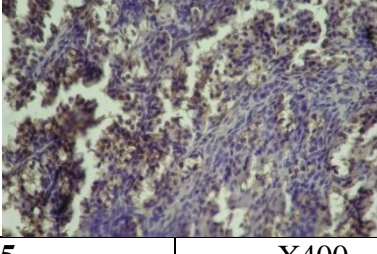
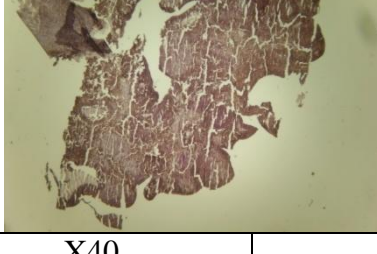
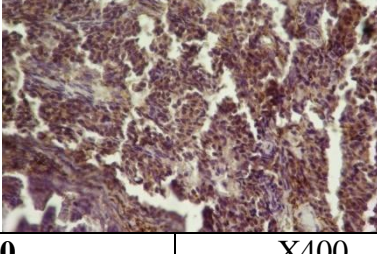
HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMALARI		
	KONTROL	
X40		X400
	GLUKOZ	
X40		X400
	FRUKTOZ	
X40		X400
	HFCS-55	
X40		X400
	HFCS-90	
X40		X400

Resim 3.Grupların H-E boyamaları

Normal diyetle beslenen sıçanların içme sularına karıştırılan glukoz, fruktoz, HFCS 55 ve HFCS 90 karışımlarının over dokusu üzerindeki histolojik etkileri H-E boyamaları ile incelendiğinde fruktoz içeren gruplarda overlerin oldukça etkilendiği görüldü.

Örneklerin morfometrik incelemesinde özellikle fruktoz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde kontrole göre artmış histopatolojik bulguların olduğu bulunmuştur (Tablo 10).

Örneklerin oksidatif stres parametresi olarak İHK yöntemi ile boyanan eNOS immunoreaktivitesine bakıldığında kontrol grubunda özellikle folüküllerde granuloza ve teka hücrelerinin boyandığı ancak korpus luteum ile çevresindeki parankimde boyamanın daha da çoklaştığı izlendi. Gruplar karşılaştırıldığında fruktoz, HFCS 55 ve HFCS 90 gruplarında boyama yoğunluğu ve dağılımında belirgin bir artışın olduğu izlenmiştir (Resim 4).

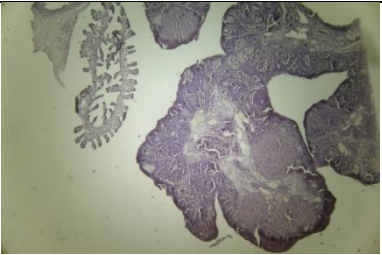
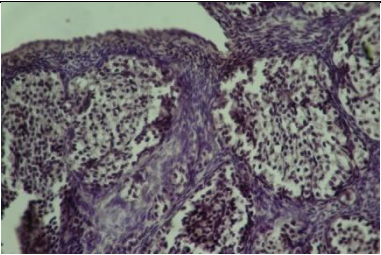
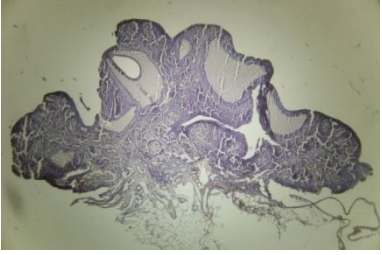
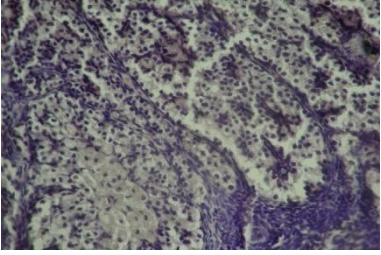
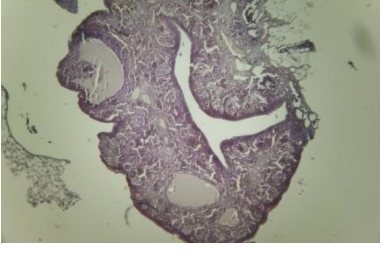
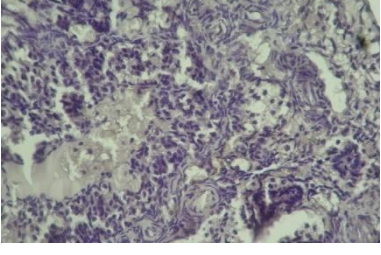
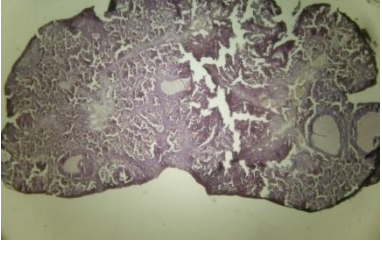
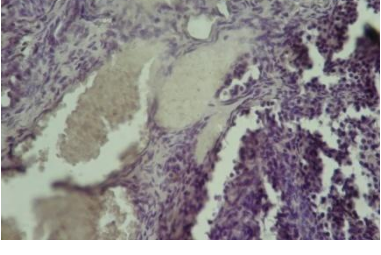
eNOS ANTİKOR BOYAMALARI		
	KONTROL	
X40		X400
	FRUKTOZ	
X40		X400
	GLUKOZ	
X40		X400
	HFCS-55	
X40		X400
	HFCS-90	
X40		X400

Resim 4.Grupların eNOS antikor boyamaları

Normal diyetle beslenen sıçanların içme sularına karıştırılan şeker ve karışımlarının over dokusu üzerindeki histolojik etkileri eNOS boyamaları ile incelendiğinde özellikle fruktoz gruplarında overlerin daha fazla etkilendiği görüldü.

İmmünreaktivitenin yoğunluğu ve dağılımının miktarı açısından yapılan morfometrik analizde eNOS boyamasının daha fazla olduğu ve özellikle fruktoz, HFCS 55 ve HFCS 90 gruplarında artmış stres ortamına işaret ettiği izlenmiştir (Tablo 10).

Şeker uygulamalarının over dokusunda oluşturduğu oksidatif stresin hücre ölümü ile ilişkisinin incelenmesi amacı için örneklerin TUNEL boyaması yapılarak programlanmış hücre ölümü veya apoptoz mekanizmasının varlığı araştırılmıştır. Kontrol grubunda gelişen foliküllerde ve korpus luteum ile etrafını saran parankimde varlığı saptanan TUNEL pozitif hücrelerin özellikle fruktoz, HFCS 55 ve HFCS 90 gruplarında daha belirgin olduğu saptanmıştır (Resim 5).

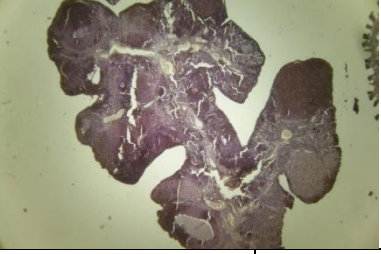
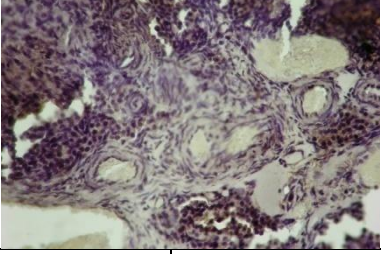
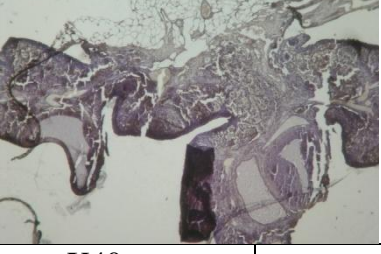
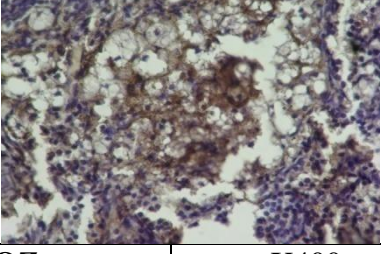

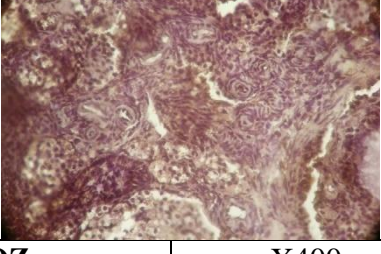
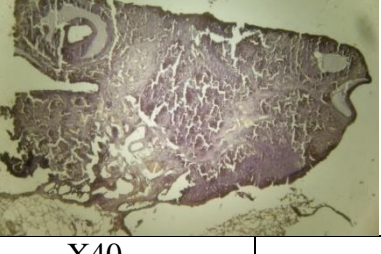
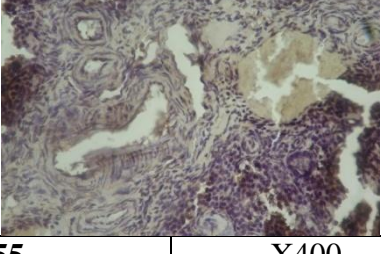
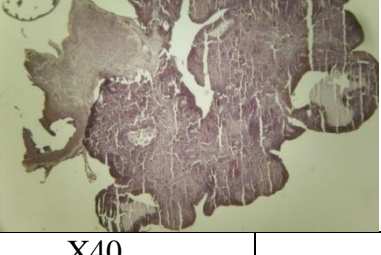
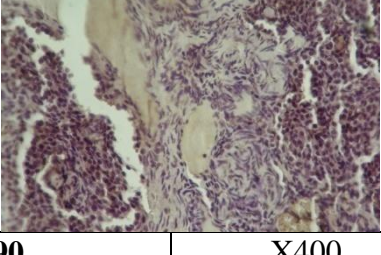
TUNEL BOYAMALARI		
	KONTROL	
X40		X400
	FRUKTOZ	
X40		X400
	GLUKOZ	
X40		X400
	HFCS-55	
X40		X400

Resim 5.Grupların TUNEL boyamaları

Normal diyetle beslenen sıçanların içme sularına karıştırılan şeker ve karışımlarının over dokusu üzerindeki histolojik etkileri TUNEL boyamaları ile incelendiğinde özellikle fruktoz gruplarında overlerin daha belirgin etkilendiği görüldü.

Gruplar arasındaki farkı göstermek üzere yapılan morfometrik analizde fruktoz, HFCS 55 ve HFCS 90 gruplarında anlamlı bir apopitoz artışının varlığı izlenmiştir. Kontrol grubunda izlenen apopitoz yoğunluğu ve dağılımına benzer ancak belirgin bir artışın varlığı saptanmıştır (Tablo 10).

Şeker uygulamalarının over dokusunda oluşturduğu oksidatif stresin damarlanma ile ilişkisinin incelenmesi amacı için örneklerin VEGF boyaması yapılarak yeni damar oluşumunun varlığı araştırılmıştır. Kontrol grubunda gelişen foliküllerde ve korpus luteum ile etrafını saran parankimde varlığı saptanan VEGF pozitif hücrelerin özellikle fruktoz, HFCS 55 ve HFCS 90 gruplarında daha belirgin olduğu saptanmıştır (Resim 6).

VEGF ANTİKOR BOYAMALARI		
	KONTROL	
X40		X400
	FRUKTOZ	
X40		X400
	GLUKOZ	
X40		X400
	HFCS-55	
X40		X400
	HFCS-90	
X40		X400

Resim 6.Grupların VEGF boyamaları

Normal diyetle beslenen sıçanların içme sularına karıştırılan şeker ve karışımlarının over dokusu üzerindeki histolojik etkileri VEGF boyamaları ile damarlanma yönünden incelendiğinde özellikle fruktoz gruplarında belirgin bir biçimde arttığı görüldü.

Örnekler arasında farkı görmek amacı ile yapılan morfometrik analizde fruktoz, HFCS 55 ve HFCS 90 gruplarında damarlanmanın arttığı izlenmiştir (Tablo 10).

V. TARTIŞMA

Bu çalışmada PKOS deneysel modeli oluşturmak üzere sıçanlara değişik oranlarda glukoz ve fruktoz içeren şekerli sular içirilerek insülin direnci, tip 2 diyabet ve bu zeminde gelişebilecek obezite ile over histopatolojik değişikliklerinin incelenmesi amaçlanarak yapılan deneylerde klinik tabloyu oldukça iyi yansıtan sonuçlar elde edildi. Plazma ve tam kan örneklerinde rutin biyokimyasal parametreler ile oksidatif stres belirteçleri bakılarak histolojik olarak da over dokusunun histokimyasal ve immunboyamalarında özellikle fruktoz içeren örneklerde belirgin patolojik değişiklikler ortaya kondu. Ödem, konjesyon ve kist oluşumundan fibrozis bulgularına kadar geniş bir aralıkta gerçekleşen histopatolojik değişikliklerin artmış oksidatif strese bağlı olduğu eNOS, artan serbest radikallere bağlı olarak fazlaşan bir hücre ölümünün gerçekleştiği ve burada apoptoz mekanizmasının kullanıldığı TUNEL boyamaları ile ayrıca artan damarlanma da VEGF boyamaları ile ortaya kondu.

PKOS doğurganlık çağındaki kadınları etkileyen yaygın bir endokrin hastalıktır. PKOS reproduktif (infertilite, hiperandrojenizm, hirsutizm), metabolik (insülin direnci, bozulmuş glukoz toleransı, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar) ve psikolojik (artmış anksiyete, depresyon, kötüleşmiş hayat kalitesi) özellikler içeren klinik tablodur. PKOS patofizyolojisi büyük ölçüde belirsiz ve oldukça karmaşıktır. PKOS prevalansı çeşitli faktörlere bağlı olarak %4-18 olarak tahmin edilmektedir. Fenotip yaygın olarak genotip, etnik köken ile yaşam şekli ve vücut ağırlığı gibi çevresel faktörlerle ilişkilidir. Son dekatlarda obezite ve kilo artışı tüm dünyada majör kronik hastalıklardır. Obezite PKOS'un hiperandrojenizm, hirsutizm, infertilite ve gebelik komplikasyonlarını artırmaktadır. Obezite ve insülin direnci birlikte tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıkları artırır. Ek olarak obezite insülin direncini artırır ve PKOS'un reproduktif ve metabolik özelliklerini ağırlaştırır. Obezitenin anovulasyon, gebelik kaybı ve gebeliğin geç komplikasyonları (preeklampsi, gestasyonel diyabet) ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Obez PKOS hastalarında klomifen sitrat,

gonadotropinler ve laparoskopik ovaryen diyatermi gibi çeşitli tedavilerde başarısızlık ve tedaviye geç yanıt alma sorunları görülmüştür. Obez PKOS hastalarında vücut ağırlığında %5'lik bir azalmayla spontan ovulasyon ve spontan gebelik geliştiği rapor edilmiştir. PKOS olan veya olmayan obez kadınlarda gebe kalma öncesinde kilo kaybı canlı doğum oranını artırmaktadır. Obezite tedavisi yaşam tarzı değişikliği (diyet, egzersiz), farmakolojik tedavi ve obezite cerrahisini kapsamaktadır. Özetle PKOS olan obez hastalarda kilo kaybı ilk basamak tedavi olmalıdır (53-57).

PKOS ve tip 2 DM benzer epidemiyolojik ve patofizyolojik faktörler içeren obeziteyle ilişkili durumlardır. İnsülin direnci önemli bir faktördür. Ancak insülin direnci PKOS ve tip 2 DM gelişmesine farklı mekanizmalarla katkı sağlar. PKOS'ta hiperinsülinemi overyen ve adrenal steroidogenezi uyararak pleiyotropik etki gösterir, tip 2 DM'de insülin direnci β hücrelerini tüketerek disglisemiye sebep olan insülin hiposekresyonuna neden olur. PKOS ve Tip 1 diyabet arasındaki bağlantının dolaşımdaki suprafizyolojik insülin konsantrasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Obezitenin salgın gibi yayılmasıyla PKOS ve tip 2 DM gibi obezite ile ilişkili durumlar daha da önem kazanacaktır. Her durumun mekanizmasını net olarak anlamak için araştırma yapmak öncelikli olmalıdır (11,56-59).

Epidemiyolojik veriler işlenmiş veya hazırlanmış yiyecek ve içeceklere eklenen şekerin dramatik bir şekilde arttığını göstermiştir. Fruktoz ve fruktoz bazlı tatlandırıcılar en yaygın eklenen şekerlerdir ve yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS-55: %55 fruktoz,%42 glukoz ve %3 sakkarit) tüm kalorik tatlandırıcıların %40'ını oluşturur. Yüksek miktarda şeker içeren yiyecek ve içeceklerin tüketilmesinin iskemik kalp ve böbrek hastalıkları ile obezite, insülin rezistansı, dislipidemi prevalansındaki artışla ilişkili olabileceği endişesi oluşmuştur. Şekerin zararlı etkilerinin altta yatan moleküler mekanizmaları tamamen anlaşılammıştır ve bunların aydınlatılması fruktoz bazlı tatlandırıcıların sağlık riski açısından önemlidir. Metabolik hastalıkların gelişiminde fruktozun fazla miktarda tüketiminin anahtar rolünün daha iyi

anlaşılması, dünya çapında, insülin dirençli, obez ve diyabetik nüfusun sayısındaki artışı engellemeye, böylece zararlı beslenme davranışlarını önlemek için yeni stratejiler planlamaya katkı sağlayabilir (11,54-57,59).

Tordoff ve arkadaşları (60), kadın ve erkeklerden oluşan çalışma gruplarına üç hafta süresince 150 g/gün olmak üzere HFCS ile tatlandırılmış soda ve aspartam ile tatlandırılmış soda vermişlerdir. HFCS ile tatlandırılmış soda tüketen gruptaki kilo artışı diğer gruba göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Anderson ve arkadaşları (61), 11 tip 2 diyabetes mellituslu ve 3 tip 1 diyabetes mellituslu orta yaşlı erkeğin diyetine günde 50-60 g fruktoz eklemişler 24 hafta sonunda vücut ağırlıklarında anlamlı artış saptamışlardır. Astrup ve arkadaşları (62), kilolu gönüllülere 10 hafta süresince yüksek miktarda sukroz (toplam enerji alımlarının %28'i) vermişler, vücut ağırlıklarında, yağ kütlelerinde ve kan basınçlarında artış saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda yukarıda adı geçen çalışmalara paralel olarak glukoz, fruktoz, HFCS-90 gruplarında anlamlı ağırlık artışı saptandı (sırası ile p değerleri 0.01, 0.01,0.04). Bizler HFCS-55 grubunda anlamlı bir artış bulamadık (p=0.67). HFCS-90 değerlerinin de p değeri 0.05'e yakın olduğu göze alınırsa HFCS-55 ve 90 solüsyonlarının sıçanlarda kilo alımına etkilerinin saf fruktoz ve glukozla oranla daha az olduğu dikkati çekmiştir. Özellikle HFCS-55'de kilo alımı etkisi yoktur veya ihmal edilebilir düzeydedir.

Maffei ve arkadaşları (63), glukoz ve fruktozun leptin üretimi üzerine etkisini incelemek için rhesus maymunlarına intravenöz olarak serum fizyolojik, glukoz ve fruktoz infüzyonu yapmışlar ve glukoz, insülin, leptin düzeylerini ölçmüşlerdir. Glukoz infüzyonun 4-8. saatleri arasında glukoz, insülin ve leptin düzeylerinin progressif olarak arttığını fruktoz infüzyonu yapılanlarda ise 8 saat süresince glukoz, insülin ve leptin düzeylerinde herhangi bir artış olmadığını göstermişlerdir. Havel ve arkadaşları (64), 12 kadına bir gün boyunca üç öğün yemek ve fruktoz içeren içecek, farklı bir günde üç öğün yemek ve glukoz içeren içecek vermişlerdir. Test günü boyunca içeceklerden alınan enerji toplam enerji alımının %30'unu geçmeyecek şekilde düzenlenmiştir. Fruktozlu içecek tüketilen

günde yapılan ölçümlerde glukozlu içecek tüketilen güne göre daha düşük postprandial glukoz, insülin ve leptin düzeyleri saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda leptin düzeylerinde fruktoz ve glukoz gruplarında bir fark saptanmazken, HFCS 90 ve HFCS 55 gruplarında anlamlı artış saptanmıştır (p değerleri sırasıyla 0.016,0.049). Bu bulgular leptin düzeylerindeki artışın ağırlık artışından bağımsız bir mekanizmayla gerçekleştiğini düşündürmüştür. İnsülin direnci ve hiperleptinemi hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Widjaja ve arkadaşlarının (65) yaptığı bir çalışmada leptin konsantrasyonlarının yüksekliğinin BMI, yaş ve insülin direnci ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Galletti ve arkadaşlarının (66) yaptığı çalışmada ise hiperleptineminin BMI ve insülin direncinden bağımsız olarak hipertansiyonla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamız leptin artışının insülin direnci ile ilişkili olabileceğini, özellikle HFCS solüsyonları kullanımının leptin konsantrasyonunu artırabileceğini düşündürmektedir. Deney süremiz yaklaşık 2 ay sürdüğünden bu kadar kısa sürede kilo alımının leptin gen ekspresyonunu indüklemeyebileceği fakat uzun sürede BMI ile leptin arasında pozitif bir korelasyon olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Thornburn ve arkadaşları (67), enerji içeriğinin %35'inin fruktozdan sağlandığı diyetle 4 hafta beslenen sıçanlarda, insülin duyarlılığında azalma ve hepatik insülin aktivitesinde azalma saptamışlardır. Blakely ve arkadaşları (68), 15 ay enerjilerinin %15'inin fruktozdan sağlandığı diyetle beslenen sıçanlardan normal diyetle beslenen sıçanlara kıyasla açlık serum glukoz ve insülin değerlerinde anlamlı artış saptamışlardır. Ueno ve arkadaşları (69), 2 hafta boyunca kalorilerinin %66'sı fruktozdan sağlanan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla iskelet kası ve karaciğerde insülin reseptör mRNA sentezinde ve insülin reseptör sayısında azalma saptamışlardır. Ayrıca kan basıncı ve plazma TG düzeylerini artmış, plazma insülin, glukoz ve kilo alımında bir fark bulamamışlardır. Akut dönemde fruktoz verilmesinin dolaşımdaki leptin ve insülin seviyelerini düşürdüğü ve insülin yükselmesinin 6 aylık dönemde ortaya çıkabileceğini bildiren çalışmalar vardır (70,11).

Bizim çalışmamızda da fruktoz verilen grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında insülin ve leptin düzeyleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Glukoz düzeyleri fruktoz grubunda kontrole göre anlamlı bir artış görülmesine rağmen (kontrol grubunda açlık kan glukozu $112,4 \pm 20,5$, fruktoz grubunda açlık kan glukozu $183,4 \pm 47,9$, $p=0.002$) insülin düzeylerinin baskılanmasının bir sonucu olarak HOMA skorunda fark bulunamadı. Bununla beraber artmış glukoz düzeyleri insülinin düzeylerindeki bu düşüklüğün bir sonucu olabileceği gibi insülinden bağımsız bir mekanizma ile glukozu yükseltmiş olabilir. Glukozdan farklı olarak fruktoz alımı; devam eden reaksiyonlar ile ya glukoneogenez ile glukoz oluşumuna ya da de novo trigliserid sentezine yönlendirilebilir. Bizim çalışmamızda da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm fruktoz gruplarında trigliserit düzeylerinde artış saptanmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sadece HFCS 90 grubunda bulunmuştur (fruktoz, HFCS 55, HFCS 90 gruplarında sırasıyla $ort \pm SD$ ve p değerleri, $73,7 \pm 42,4$, $73,1 \pm 27,2$, $97,6 \pm 43,6$, $p= 0.111$, 0.086 , 0.016). Çalışmamızın kısıtlılıkları olarak denek sayısının az ve deney süresinin kısa olması fruktoz ve HFCS 55 grubunda istatistiksel anlamlı farkın oluşmamasına neden olmuş olabilir. Bu konuda Catena ve arkadaşlarının (71) yaptığı bir çalışmada 2 hafta boyunca %66 fruktoz içeren diyetle beslenen sıçanlarda normal diyetle beslenen sıçanlara göre plazma trigliserid düzeylerinin ve kan basıncının daha yüksek olduğunu saptanmış olup plazma insülin ve glukoz düzeyleri ile vücut ağırlıklarında fark bulamamışlardır. Bocarsly ve arkadaşları (72), ise erkek sıçanlardan oluşan gruplardan birine 8 hafta boyunca normal besinlerine ek olarak %8 HFCS solusyonu 12 saat/gün, diğer gruba %10 sukroz solusyonu 12 saat/gün ve son gruba %8 HFCS 24 saat/gün vermişlerdir. %8 HFCS solusyonu tüketen gruptaki kilo artışı diğer iki gruba göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Uzun dönem etkilerini incelemek için 6 ay süreyle HFCS tüketen sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı kilo artışı ile birlikte serum trigliserid düzeylerinde anlamlı artış saptamışlardır.

Arikawe ve arkadaşları (73), 8 hafta boyunca %25 fruktozla karıştırılmış yemle besledikleri sıçanlarda normal diyetle beslenen sıçanlara kıyasla glukoz, insülin, testosteron ve DHEAS düzeylerini yüksek saptamışlardır. Over dokusunu incelediklerinde fruktoz tüketen gruptaki foliküllerin daha büyük olduğunu ve bunların çoğunun subkapsüler alanda overe nodüler görünüm verecek şekilde toplandığını göstermişlerdir. Özdemir ve arkadaşları (74), 28 PKOS hastası ve 27 sağlıklı kontrolden oluşan grupların LC-MS/MS metoduyla ölçtükleri idrar 8-hidroksi- 2 deoksiguanozin düzeyleri arasında bir fark bulamamışlardır. Macut ve arkadaşları (75), 34 PKOS tanılı non-obez kadın ile yaş ve BMI uyumlu 23 sağlıklı kadında spektrofotometrik yöntemle MDA, SOD ve GPx düzeylerini ölçmüşler, PKOS grubunda MDA düzeyini anlamlı yüksek bulurken, SOD ve GPx düzeylerinde bir fark saptamamışlardır. Kurdoğlu ve arkadaşları (76), 13 hiperinsülinemik, 18 normoinsülinemik PKOS hastası ile 29 sağlıklı kadında serum MDA, GSH ve glutatyon S-transferaz enzim düzeylerini ölçtüklerinde, PKOS hastalarında MDA düzeylerini yüksek, GSH ve glutatyon S-transferaz düzeylerini düşük bulmuşlardır. Kuşçu ve ark.(77), 31 non-obez PKOS hastası ile 23 sağlıklı kontrolde serum MDA ve SOD düzeylerini kıyasladıklarında hasta grubunda anlamlı yükseklik saptamışlardır. Sabuncu ve ark (78), 27 PKOS hastası ile 18 kontrol olgusunda eritrosit MDA, SOD ve GPx düzeylerini karşılaştırmışlar ve hasta grubunda MDA ve SOD düzeylerini anlamlı yüksek bulurlarken GPx düzeylerinde bir fark bulamamışlardır. Başkol ve ark (79), 30 PKOS hastası ile 20 sağlıklı kontrolde serum GPx ve NO düzeylerini karşılaştırdıkları çalışmada bir fark saptamamışlardır. Bizler çalışmamızda glukoz grubunda serum MDA ve DNA/RNA oksidatif hasar düzeylerini anlamlı yüksek bulurken (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.013$); fruktoz grubunda SOD, GPx ve DNA/RNA oksidatif hasar düzeylerini yüksek (sırasıyla $p=0.01$, $p=0.008$, $p=0.008$), HFCS 55 grubunda ise SOD, GPx ve MDA düzeylerini yüksek olarak (sırasıyla $p=0.012$, $p=0.000$, $p=0.016$) saptadık. HFCS 90 grubunda SOD düzeyini anlamlı yüksek ($p=0.006$) olarak saptadık. Genel olarak değerlendirildiğinde antioksidan enzimlerin fruktoz içeren tüm gruplarda artmış

olduğu dikkati çekmektedir. Artmış antioksidanlar fruktoz gruplarındaki oksidatif stresi azaltmada etkin rol oynayabilirler. Sadece glukoz ve fruktoz içeren gruplarda özellikle nükleik asit oksidasyonu daha fazla görünmektedir (sırası ile $p=0,013$, $p=0,008$). HFCS içeren gruplarda DNA/RNA oksidatif hasarın olmaması, sadece HFCS-55'de MDA yüksekliğinin bulunması ve artmış antioksidan enzim düzeyleri bu gruplardaki hasarın kısmen sınırlı olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda ovulasyon sürecinde sıçan ovaryum örneklerindeki folikül sayıları, gelişimi ve oosit oluşumu ile gerileme sürecinde korpus luteum oluşumu, parankim değişiklikleri ve fibrozis süreci H-E boyamalarında değerlendirilerek oluşan histopatolojik bulguların oksidatif stres, apoptoz ve damarlanma açısından ilişkisi eNOS, TUNEL ve VEGF boyamaları ile ortaya kondu. Literatürde değişik nedenlerle incelenen sıçan overindeki değişikliklere benzer şekilde ancak ilk defa ortaya konan patolojik bulgular yüksek fruktoz içerikli tatlandırıcıların over hasarı yaptığı ve folikül gelişimini olumsuz yönde etkilediği bulundu. Proöstrus evresinde; ovaryum dokusunda primer, sekonder ve Graaf follikülü yapılarında artış ile birlikte ovaryum dokularının normal histolojik yapısını koruduğu ve östrus evresinde; ovaryumda graaf follikülleri ve korpus luteum yapılarında artış olduğu gözlemlendi. Bu aşamalarda normal overde bazal seviyede oksidatif stres olduğu, buna bağlı olarak özellikle korpus luteum ve çevresinde apoptoz gerçekleştiği ayrıca yine bu dönemde damarlanmanın arttığı bilinmektedir (80-83). Bizim çalışmamızda kontrol örneklerindeki bulguların literatürle uyumlu olduğu ayrıca fruktoz içeren örneklerde bu parametreler açısından artmış bir patolojinin var olduğu saptandı.

Önceki çalışmalarda sıçanlarda PKOS modeli yapılmaya çalışılarak overyan hipertrofi, tunika albugineada kalınlaşma, subkapsüler kistik foliküler yapılar, matür folikül yapıları, overyen stromada hiperplazi, intersitisyel hücrelerdeki artış, folliküler atrofi, nadir izlenen geç primer ve sekonder folliküller, granüloza tabakasında incelme ve atrofik patern, dejeneratif çeşitli folliküllere ait görünüm, teka interna tabakası hücrelerinde sayıca artış ve teka

hücrelerinde artmış lipid vakuolleri, graaf follikül görülmemesi ile polikistik overin özelliklerine uyan bulgular saptanmıştır. Kontrol ve sham grubunda ise over dokusu özellikleri genellikle birbirlerine benzer özelliklerde olup primer, sekonder ve tersiyer folliküller, çok sayıda korpus luteum, granüloza ve teka hücrelerinde belirginlik izlenmiş olarak bildirilmiştir. Yazarlar bunu PKOS durumunda artmış bir oksidan stresin varlığını ve bunun karşılığında kompensatuar olarak yetersiz de olsa antioksidanlarda bir artış olarak açıklamışlardır (84-85). Direk olarak etkinin yanısıra şeker karışımlarının ve mısır şuruplarının leptin, insülin, büyüme faktörleri ve ghrelin gibi faktörler üzerinden de over dokusunu etkilediği düşünülmektedir (16,82,86).

Şeker uygulamaları yapılan ve PKOS bulguları saptanan sıçan örneklerinin gösterildiği çalışmamızda bu patolojik bulguların oksidatif stres ile ilişkisini ortaya koymak amaçlı yapılan eNOS immunboyamalarında bazal seviyede var olan (87), östrus dönemindeki sıçan overlerinde özellikle fruktoz içeren uygulamalarda arttığı bulundu. Önceki çalışmalarda over hasarında başkedenler ile başka dokularda arttığı saptanan bu belirtecin (87-89), fruktoz yüklenmesi ile de overde arttığı bulgusunun literatürekazandırıldığı düşünüldü. Bir başka çalışmada yüksek fruktozlu içeceklerin karaciğer enzimlerini arttırmakla kalmayıp sıçan modelinde patolojik değişikliklerin oluştuğuna işaret etmişlerdir (90). Bir başka çalışmada kullanılabilir D3 vitamini ile overde oluşturulan PKOS değişikliklerinin geri dönüştürülebildiği gösterilmiştir (91).

Artan serbest radikaller sonucu oluşan stresin hücre ölümü ile ilişkisini ortaya koymak amaçlı TUNEL boyamalarında çalışmamızda apopitoz mekanizmasının over dokusunda var olduğu ve gelişen foliküller ile korpus luteum ve çevresinde kullanıldığı gösterildi. Hücrelerin yaklaşık yarısının boyandığı görüntüler daha önceki çalışmalara benzer şekilde gerçekleşti (92). Fruktoz uygulamaları ile artan hücre ölümünün bu şekerin over dokusuna yaptığı olumsuz etkilerinde apopitoz mekanizmasının kullanıldığını gösterdi. Yapılan son çalışmalar bu mekanizmanın yanısıra otofaji ve benzeri diğer hücre

ölümlerinin de PKOS benzeri bulgular içeren over örneklerinde kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Oksidatif stres gelişiminde ve artan eNOS boyamalarında yeniden damar oluşumunun etkisinin incelenmesi amacı ile yapılan VEGF boyamalarında damarlanmanın yüksek fruktoz uygulamalarının olduğu gruplarda arttığını bunun da artan eNOS ile uyumlu olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar önceki çalışmalarla (93), kontrol grubu için uyumlu bulunduğu gibi kültürdeki over hücrelerinde stres altında benzer sonuçlar verdiğini gösterdi.

Tatlandırılmış içeceklerin insülin rezistansına yol açması ve insülin rezistansının polikistik over sendromunda patogeneizde merkezi rol oynaması bu içeceklerin tüketiminin polikistik over sendromu ile ilişkili olabileceğinin gösterildiği bu çalışmada sadece su verilen kontrol grubuna karşılık glukoz, fruktoz, HFCS-55 ve HFCS-90 verilen gruplardakanda glukoz, insülin, leptin, lipid paneli, free testosteron düzeyleri çalışılarak fruktoz, HFCS-55 ve HFCS-90 gruplarında açlık kan glukozunda anlamlı artış, HFCS-55 ve HFCS-90 gruplarında HOMA ve leptin düzeylerinde anlamlı artış, HFCS-90 grubunda anlamlı trigliserit artışı bulundu. Aynı deneklerin östrus dönemi ovaryumlarında da histopatolojik değerlendirme yapıldı ve özellikle fuktoz kullanılan gruplarda overin patolojik olarak değişikliğe uğradığı, oluşan patolojinin temelinde artmış oksidatif stres ortamının bulunduğu, bu artışın apoptoz mekanizması ile hücre ölümünü arttırdığı ve over dokusunun artmış damarlanma ile kendisini korumaya çalıştığı görüldü.

Bu sonuçlar fruktozun şüphe duyulan tatlandırıcı olarak kullanılması ile ilgili olumsuz görüşü desteklemekte ve son zamanlarda artan tip 2 DM ve infertilite nedeni olabileceğine kuvvetle işaret etmektedir. Alınan sonuçların moleküler düzeyde incelenerek mekanizmalarının açıklanmasının insan sağlığı açısından önemliolacağı düşünöldü.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. Fruktoz ve türevlerinin tüketilmesinin PKOS'a benzer şekilde sıçan overlerini patolojik olarak değişikliğe uğrattığı, oluşan patolojinin temelinde artmış oksidatif stres ortamının bulunduğu, bu artışın apoptoz mekanizması ile hücre ölümünü ve neovaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir.
2. Fruktoz ve türevlerinin tüketiminin oksidatif stres oluşturarak özellikle DNA/RNA üzerinde hasar meydana getirdiği, gelişen oksidatif hasarı önlemek için antioksidan enzim düzeylerinde artış meydana geldiği saptanmıştır.
3. Yine bu gruplarda hipergliseminin ortaya çıktığı özellikle HFCS55 ve HFCS 90 tüketen gruplarda insülin direnci geliştiği bulunmuştur.
4. Fruktoz ve türevlerini tüketen gruplarda hipertrigliseridemi saptanmıştır.

Fruktoz ve türevlerinin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği, önleyici hekimlik açısından bu içeceklerin tüketiminin azaltılmasına dikkat çekmenin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

VII. ÖZET

YÜKSEK FRUKTOZLU MISIR ŞURUBU (HFCS) İÇEREN İÇECEKLERİN İNSÜLİN REZİSTANSI ÜZERİNDEN POLİKİSTİK OVER SENDROMU (PKOS) İLE İLİŞKİSİNİN SİÇAN DENEYSEL MODELİ İLE İNCELENMESİ

Amaç: Çalışmamızda HFCS içeren içeceklerin tüketilmesinin insülin rezistansı ve PKOS etiopatogenezi ile olası ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışma için Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları etik kurulundan onam alınmıştır. Çalışmamızda, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen ağırlıkları 150-350 gr. arasında değişen erişkin 41 adet dişi Wistar albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 5 gruba ayrılarak gruplara aşağıda belirtilen diyet en az 6 hafta süre boyunca uygulanmıştır:

Kontrol Grubu (n:11): Standart yem + musluk suyu, Glukoz Grubu (n:7): Standart yem + %30(w/v) Glukozlu musluk suyu, Fruktoz Grubu (n:7): Standart yem + %30(w/v) Fruktozlu musluk suyu, HFCS-55 Grubu (n:8): Standart yem + %30(v/v) HFCS-55- musluk suyu, HFCS-90 Grubu (n:8): Standart yem + %30(v/v) HFCS-90- musluk suyu

Altı hafta sonra her bir dişi sıçanın östrus fazı, her sabah standart vajinal sürüntü metoduyla tespit edildi. Östrus fazında olan sıçanlar seçilerek genel anestezi altında intrakardiyak kan örnekleri ve over örnekleri alınmıştır. Plazma örneklerinden rutin biyokimyasal parametreler ile leptin, MDA ve SOD, DNA/RNA Oksidatif Hasar belirteci; eritrositlerden ise GPx çalışılmıştır. Over dokularına H-E boyaması, immunohistokimyasal olarak TUNEL, eNOS ve VEGF boyamaları yapılmıştır. İstatistiksel analizde SPSS 16.0 programı kullanıldı.

Bulgular: Bu çalışmada standart yeme ek olarak su verilen kontrol grubuna karşılık glukoz, fruktoz, HFCS-55 ve HFCS-90 verilen gruplarda serumda glukoz, insülin, leptin, lipit paneli, free testosteron düzeyleri çalışılarak fruktoz,

HFCS-55 ve HFCS-90 gruplarında açlık kan glukozunda anlamlı artış, HFCS-55 ve HFCS-90 gruplarında HOMA ve leptin düzeylerinde anlamlı artış, HFCS-90 grubunda anlamlı trigliserit artışı bulundu. Fruktoz gruplarında antioksidan sistem enzimlerinde artış saptanmıştır. Aynı deneklerin östrus dönemi ovaryumlarında da histopatolojik değerlendirme yapıldı ve özellikle fuktoz kullanılan gruplarda overin patolojik olarak değişikliğe uğradığı, oluşan patolojinin temelinde artmış oksidatif stres ortamının bulunduğu, bu artışın apopitoz mekanizması ile hücre ölümünü arttırdığı ve over dokusunun artmış damarlanma ile kendisini korumaya çalıştığı görüldü.

Tartışma: Diyete eklenen fruktozun ağırlık artışına neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda literatüre paralel olarak glukoz, fruktoz, HFCS-90 gruplarında anlamlı ağırlık artışı saptandı. Literatürde fruktozla beslenen sıçanlarda hepatik insülin aktivitesinde ve insülin duyarlılığında azalma saptanan çalışmalar olduğu gibi akut dönemde fruktoz verilmesinin dolaşımdaki leptin ve insülin seviyelerini düşürdüğü ve insülin yükselmesinin 6 aylık dönemde ortaya çıkabileceğini bildiren çalışmalar da vardır. Bizim çalışmamızda HFCS 55 ve HFCS 90 grubunda HOMA indeksinde artış saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda fruktoz tüketiminin kısa dönemde leptin düzeyini artırmadığı bildirilmektedir. Leptin düzeyinin BMI ve insülin direnci ile korele olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi, her iki parametreden bağımsız bir şekilde leptin düzeylerinin değiştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bizim çalışmamızda leptin düzeylerinde HFCS 90 ve HFCS 55 gruplarında anlamlı artış saptanmıştır. Bu bulgular leptin düzeylerindeki artışın ağırlık artışından bağımsız bir mekanizmayla gerçekleştiğini, insülin direnci ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Genel olarak değerlendirildiğinde antioksidan enzimlerin fruktoz içeren tüm gruplarda artmış olduğu dikkati çekmektedir. Fruktoz gruplarındaki artan oksidatif stresi azaltmak için bir savunma mekanizması olarak antioksidan enzimlerde artış gerçekleşmiş olabilir. Çalışmanın makroskobik bulguları sonucunda HFCS yüklemesiyle deneysel olarak PKOS

oluştugu histolojik olarak gösterildi. Önceki yayınlarda da gösterilmiş bulunan oksidatif stres, kontroldeki bazal seviye ile karşılaştırıldığında HFCS'li gruplarda eNOS boyaması ile ortaya kondu. HFCS tüketimine bağlı over dokusunda hücre ölümü önceki çalışmalarda da gösterilmiş hatta programlanmış hücre ölümünün diğer biçimleri olana otofaji vb ölümleri de bir mekanizma olarak kullandığı saptanmış olup çalışmamızla uyumlu literatür bilgisi olarak kabul edilmiştir. Oksidatif hasar ve artmış hücre ölümüne bir cevap olarak kanlanmanın arttığı ve yeni damar oluşumunun uyarıldığı VEGF boyaması ile gösterildi. Bu çalışmadan çıkan histolojik anlamdaki en önemli sonuç HFCS yüklemesinin over dokusunda oluşturduğu belirgin ve anlamlı hasardır.

Anahtar Kelimeler: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, insülin direnci, Polikistik Over Sendromu.

VIII. SUMMARY

THE RELATIONSHIP OF HIGH FRUCTOSE CORN SYRUPE CONTAINING DRINKS THROUGH INSULINE RESISTANCE ON POLYCYSTIC OVARY SYNDROME IN EXPERIMENTAL RAT MODEL

Aim: We aimed to evaluate the effects of high fructose corn syrupe (HFCS) drinks on insulin reistance and polycystic ovary syndrome (PCOS) etiopathogenesis in the present study.

Materials and method: This study was approved by the Experimental Ethical Committee of Celal Bayar University. Forty–one Wistar Albino 150-350 grams female rat were included in the study. Rats were fed with different drinks for 6 weeks according to the 5 study groups; control group (n=11) normal water drink, glucose group (n=7) %30(w/v) glucose drink, fructose group (n=7)%30(w/v) fructose drink, HFCS-55 group (n=8) %30(v/v) HFCS-55 drink, and HFCS-90 group (n=8) %30(v/v) HFCS-90 drink. Female rats were screened for their oestrus phase every morning by micrscopic evaluation of the vaginal smear. Rats at oestrus phase were sacrificed, intracardiac blood samples were obtained and ovaries were removed for histopathologic evaluations.

Serum glucose, insülin, leptin, cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, free testosterone, leptin, malondialdehyde, superoxide dismutase, 8-hydroxy-2deoxyguanosine and eritrocyte glutatione peroxidase concentrations were analysed. Leptin, insülin, superoxide dismutase and 8-hydroxy-2deoxyguanosine were analysed by ELISA methods. Glucose, cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol malondialdehyde and glutatione peroxidase were analysed by photometric methods. Free testosterone were analysed by radioimmun assay methods. LDL-cholesterol were calculated by Fridewald formula and HOMA index (glucoseXinsulin/405). In histopathological evaluation hemotoxylane eosin dye, TUNEL, eNOS and VEGF

immunohistochemical dyes were performed to ovary samples. Statistical evaluation were performed using SPSS 16.0 software.

Results: Fasting glucose concentrations were found to be significantly elevated in fructose, HFCS-55 and HFCS-90 groups. HOMA and leptin concentrations were found to be significantly elevated in HFCS-55 and HFCS-90 groups. Triglyceride were found to be elevated in HFCS-90 group. Antioxidant enzymes were found to be elevated in fructose, HFCS-55 and HFCS-90 groups. Morphometric evaluation scores of the ovaries were found to be significantly elevated fructose, HFCS-55 and HFCS-90 groups compared to control group.

Discussion: Fructose supplementation has shown to result in weight gain in previous studies in literature. In the present study we observed significant weight gain in glucose, fructose and HFCS-90 groups. Although decrease in hepatic insulin activity and insulin sensitivity were observed in fructose fed rats in literature, acute fructose supplementation result in decreases in leptin and insulin concentrations, fructose supplementation for 6 months lead to insulin increase in additional studies. In the present study we found increases in HOMA index in HFCS 55 and HFCS 90 groups. It has been shown that fructose consumption did not elevate leptin concentrations in short term. Although leptin concentrations were shown to be correlated with BMI and insulin resistance in literature, contradictory studies also revealed that leptin has changed independent of BMI and insulin resistance. In the present study leptin levels were found to be significantly elevated in HFCS 90 and HFCS 55 groups. These results revealed that leptin increases could be independent from weight gain and may be related to insulin resistance. Antioxidant enzymes were found to be elevated in fructose, HFCS-55 and HFCS-90 groups and we believe this is due to compensate the increase in oxidative stress in these groups.

Macroscopic findings show that HFCS supplementation resulted in experimental PCOS in histological evaluation. eNOS scores were found to be

increased in HFCS 90 and HFCS 55 groups compared to control group. We believe eNOS increase is may be due to oxidative stress resulted from HCFS supplementation. Apoptotic cell increase due to HFCS supplementation detected by TUNEL method has been shown in ovary in previous studies in literature. We found similar increase in TUNEL score in fructose, HFCS 90 and HFCS 55 groups. VEGF score, a neovascularisation marker, has been shown to increased in fructose, HFCS 90 and HFCS 55 groups in the present study.

In conclusion, we believe that HFCS supplementation has resulted in significant injury in ovaries as detected by increased TUNEL, VEGF, .eNOS scores and increased HOMA index, triglyceride, leptin, and antioxidant marker concentrations.

Key Words: High Fructose Corn Syrup, Insulin Resistance, Polycystic Ovary Syndrome.

IX. KAYNAKLAR

1. Leon Speroff, Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, Anovulation and The Polycystic Ovary 2005;465-91.
2. Ojaniemi M, Pugeat M. An adolescent with polycystic ovary syndrome. Eur J.Endocrinol. 2006;155(1):149-52.
3. Evliyaoğlu O. Polikistik over sendormu ve hisrutizm. Türk Ped Arş. 2011; 46.
4. Lowndes J, Kawiecki D, Pardo S, Nguyen V, Melanson JM, Yu Z. The effects of four hypocaloric diets containing different levels of sucrose or high fructose corn syrup on weight loss and related parameters. Nutrition Journal 2012;11:55.
5. Light HR, Tsanzı E, Gigliotti J, Morgan K, Tou CT. The type of caloric sweetener added to water influences weight gain, fat mas and reproduction in growing sprague dawley female rats. Experimental Biology and Medicine 2009, 234:651-661.
6. Gürdöl F, Ademoğlu E. Karbonhidrat metabolizması, Glikoliz reaksiyonları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2010;194.
7. Gürdöl F, Ademoğlu E. Karbonhidrat metabolizması, Fruktoz ve Sorbitol Mekanizması. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2010;219.
8. Bulut İK, Mir S. Fruktoz ve böbrek hastalıkları. Cumhuriyet Tıp Dergisi 2011;33:499-507.
9. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MSA. Fructose Might Contribute to the Hypoglycemic Effect of Honey. Molecules 2012;17:1900-15.
10. Levi B, Werman MJ. Long-Term Fructose Consumption Accelerates Glycation and Several Age-Related Variables in Male Rats. Journal of nutrients 1998;1442-9.
11. Shapiro A, Mu W, Roncal C et al. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;295(5):1370-5.

12. Parker K, Salas M, Nwosu V. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology* 2010;5:71-8.
13. White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. *Am J Clin Nutr.*2008;88:1716–21.
14. Melanson KJ, Angelopoulos TJ, Nguyen V, et al. High-fructose corn syrup, energy intake, and appetite regulation. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:1738– 44.
15. Gürdöl F, Ademoğlu E. Karbonhidratlar, Monosakkaritlerin Bazı Kimyasal Özellikleri, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2010;49.
16. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:537–43.
17. Karaoğlu M. Yüksek fruktozlu mısır şurubu. *Gıda mühendisliği dergisi* 2011:33-38.
18. Elliot SS, Keim NL, Stern JS, et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;79 (4):537-43.
19. Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, et al. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes* 2005;54 (7):1907-13.
20. Forshee RA, Story ML, Allison DB. A critical examination of the evidence relating high fructose corn syrup and weight gain. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2007;47(6):561-82.
21. Gross LS, Li L, Ford ES, Simin L. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;79 (5):774-9.
22. Murat B. Pre-Diyaliz, Hemodiyaliz Ve Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi Hastalarında İnsülin Direncinin Karşılaştırılması [Tez] İstanbul; Haydarpaşa Numune Eđt. Arş.2004

23. Gürdöl F, Ademoğlu E. Pankreas Hormonları, İnsülin. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2010;580-3.
24. Groop LC, Saloranta C, Shank M, et al. The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and non insulin dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 1991;72:96-107.
25. Oğuz A. Diabetes mellitus ve ateroskleroz. Yenigün M, ed; Her Yönüyle Diabetes Mellitus. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001;697-711.
26. Altuntaş Y. İnsülin direnci ve ölçüm metodları. Yenigün M, ed; Her Yönüyle Diabetes Mellitus. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001;839-52.
27. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. Am J Cardiol. 1998;81:18-25.
28. Bahadır Ö. Metabolik Sendromlu Hastalarda Telmisartan ve Losartanın İnsülin Direnci Üzerine Etkileri [Tez]. İstanbul; Göztepe Eđt. Arş. 2006.
29. Metabolik Sendrom Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneđi, 2009.
30. Azziz R, Woods KS, Reyna R, et al. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:2745-9.
31. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol 1935;29:181-91.
32. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome. In: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Merriam GR (eds). Polycystic ovary syndrome. Boston: Blackwell Scientific Publications 1992;377-84.
33. 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.
34. Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004;19:41-7.
 35. Goldzieher JW, Green JA. The polycystic ovary I. Clinical and histological features. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961;22:325-338.
 36. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989;38:1165-74.
 37. Legro RS, Finegood D, Dunaif A. A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2694-8.
 38. Yildiz BO, Gedik O. Assessment of glucose intolerance and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2004;8:649-56.
 39. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774-800.
 40. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50:113-6.
 41. Geffner ME, Kaplan SA, Bersch N et al. Persistence of insulin resistance in polycystic ovarian disease after inhibition of ovarian steroid secretion. *Fertil Steril* 1986;45:327-33.
 42. Azziz R, Deal CL, Potter HD, et al. Regulation of extragonadal insulinlike growth Factor binding protein-3 by testosterone in oophorectomized women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:1747-51.

43. Singer E Bhargava, G Poretsky L. Persistent insülin resistance after normalization of androgen levels in a woman with congenital adrenal hyperplasia. *J Reprod Med.* 1989;34:921-2.
44. Barbieri R1, Makris A. Ryan KJ. Effects of insülin on steroidogenesis in cultured procine ovarian theca. *Fertil Steril* 1983;40:237-41.
45. Ferrannini E. Vichi S. BeckNielsen H, et al. European group for the study of insulin resistance (EG1R). İnsulin action on age. *Diabetes* 1996;45:947-53.
46. Adashi EY, Hsueh AJW, Yen SSC. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone released by cultured pituitary cells. *Endocrinology* 1981;108:1441-9.
47. Pao C1, Fanner PK. Begovie S. et al. Regulation of insiilin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein 1 gene transcription by hormones and provision of amino acids in rat hepatocytes. *Mol Endocrinol.* 1993;7:1571-8.
48. Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, et al. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. *Obstet Gynecol Surv.* 2002;57:755-67.
49. Zhang B, Berger J, Hu E, et al. Negative regulation of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor alpha. *Mol endocrinol.* 1996;10:1457-66.
50. Zacur HA, Polycystic ovary syndrome, hyperandrogenism and insulin resistance. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001;28;21-33.
51. Ciarldi Tp, Morales AJ, Hickman MG, et al. Lack of insulin resistance in fibroblasts from subjects with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1998;47:940-6.
52. Memili S, Şar F, Memili V ve ark. Polikistik Over Sendromunda İnsülin Direnci ve Antropometrik Ölçümler. *Haseki Tıp Bülteni* 2009;47:1;6-12.

53. Vos MB, Kimmons JE, Gillespie C, et al. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape J Med.* 2008;10(7):160.
54. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab.* 2005;21;2(1):5.
55. Poynten AM, Gan SK, Kriketos AD, et al. Circulating fatty acids, non-high density lipoprotein cholesterol, and insulin-infused fat oxidation acutely influence whole body insulin sensitivity in nondiabetic men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):1035-40
56. Collino M, Benetti E, Rogazzo M, et al. 2012, Reversal of the deleterious effects of chronic dietary HFCS-55 intake by PPAR- δ agonism correlates with impaired NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Pharmacol.* 2013;15;85(2):257-64.
57. Rippe JM, Kris Etherton PM. Fructose, sucrose, and high fructose corn syrup: modern scientific findings and health implications. *Adv Nutr.* 2012;3(5):739-40.
58. Behr-Roussel D, Oudot A, Caisey S, et al. Daily treatment with sildenafil reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in an animal model of insulin resistance. *Eur Urol.* 2008;53(6):1272-80.
59. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest.* 2009;119(5):1322–34.
60. Tordoff MG, Alleva AM. Effect of drinking soda sweetened with aspartame or high-fructose corn syrup on food intake and body weight. *Am J Clin Nutr.* 1990;5:963–9.
61. Anderson JW, Story LJ, Zettwoch NC, Gustafson NJ, Jefferson BS. Metabolic effects of fructose supplementation in diabetic individuals. *Diabetes Care* 1989;12:337–44.

62. Astrup A, Raben A, Vasilaras TH, Moller AC. Sucrose in soft drinks is fattening: a randomized 10 week study in overweight subjects. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:405.
63. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight reduced subjects. *Nat Med.* 1995;1:1155–61.
64. Havel PJ, Elliott SS, Tschöp M, et al. Consuming high fructose meals reduces 24 hour circulating insulin and leptin concentrations and does not suppress circulating ghrelin in women. *J Invest Med.* 2002;50:26.
65. Rifai K, Stephan C, Vidjaja A, et al. Leptin and insulin response to long-term total parenteral nutrition depends on body fat mass. *Clinical Nutrition* 2006; 25,5:773-9.
66. Galletti F, Barbato A, Versiero M, Circulating leptin levels predict the development of metabolic syndrome in middle-aged men: an 8-year follow-up study. *J Hypertens* 2007;25(8):1671-7.
67. Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr.* 1989;49:1155–63.
68. Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S, Prather ES. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J Nutr.* 1981;111:307–14.
69. Ueno M, Bezerra RM, Silva MS, et al. A high-fructose diet induces changes in pp185 phosphorylation in muscle and liver of rats. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33:1421-7.
70. Teff KL, Elliott SS, Tschöp M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D, Havel PJ. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2963–72.

71. Catena C, Giacchetti G, Novello M, et al. Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens.* 2003;16:973-8.
72. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;97(1):101-6.
73. Arikawe AP, Iranloye BO, Ogunsola AO, et al. Chronic Fructose Consumption As a Model of Polycystic Ovary Syndrome In Pregnant Female Sprague-Dawley Rats. *Afr. J. Biomed. Res.* 2012;15:1.
74. Özdemir Ş, Serdar M, Sezer S, Çelik H, Torun G, Özdemir Ö, Atalay C, Yıldırım Kaya M. The measurement of urinary 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHdG) level with LC-MS/MS method in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Turkish Journal of Biochemistry* 2012;37:382.
75. Macut D, Simic T, Lissounov A, et al. Insulin resistance in non-obese women with polycystic ovary syndrome: relation to byproducts of oxidative stress. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2011;119(7):451-5.
76. Kurdoglu Z, Ozkol H, Tuluçe Y, Koyuncu I, Oxidative status and its relation with insulin resistance in young non-obese women with polycystic ovary syndrome, *J Endocrinol Invest.* 2012;35(3):317-21.
77. Kuşçu NK, Var A. Oxidative stress but not endothelial dysfunction exists in non-obese, young group of patients with polycystic ovary syndrome, *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009;88(5):612-7
78. Sabuncu T, Vural H, Harma M, Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease, *Clin Biochem.* 2001;34(5):407-13.
79. Baskol G, Aygen E, Erdem F, ve ark. Assessment of paraoxonase 1, xanthine oxidase and glutathione peroxidase activities, nitric oxide and

- thiol levels in women with polycystic ovary syndrome, *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2012;91(3):326-30.
80. Campbell BK, Kendall NR, Onions V, Scaramuzzi RJ. The effect of systemic and ovarian infusion of glucose, galactose and fructose on ovarian function in sheep. *Reproduction.* 2010;140(5):721-32.
81. Miao ZL, Guo L, Wang YX, et al. The intervention effect of Rosiglitazone in ovarian fibrosis of PCOS rats. *Biomed Environ Sci.* 2012;25(1):46-52.
82. Melanson KJ, Zukley L, Lowndes J, et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose consumption on circulating glucose, insulin, leptin and ghrelin and on appetite in normal-weight women. *Nutrition* 2007;23(2):103-12.
83. Yu Z, Lowndes J, Rippe J. High-fructose corn syrup and sucrose have equivalent effects on energy-regulating hormones at normal human consumption levels. *Nutr Res.* 2013;33(12):1043-52.
84. Dikmen A, Ergenoglu AM, Yeniel AO, ve ark. Evaluation of glycemic and oxidative/antioxidative status in the estradiol valerate-induced PCOS model of rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;160(1):55-9.
85. Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr.* 2012;51(4):445-54.
86. Akar F, Uludağ O, Aydın A, ve ark. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(6):2135-41.
87. Zik B, Altunbas K, Tutuncu S, ve ark. Effects of capsaicin on nitric oxide synthase isoforms in prepubertal rat ovary. *Biotech Histochem.* 2012;87(3):218-25.

88. Jablonka-Shariff A ve Olson LM. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2000;55(4):412-21.
89. Babacanoglu C, Yildirim N, Sadi G, ve ark. Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol.* 2013;60:160-7.
90. Figlewicz DP, Ioannou G, Bennett Jay J, et al. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiol Behav.* 2009;98(5):618-24.
91. Masszi G, Benko R, Csibi N, et al. Endothelial relaxation mechanisms and oxidative stress are partly restored by Vitamin D3 therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Life Sci.* 2013;93(4):133-8.
92. Sapmaz-Metin M, Topcu-Tarladaçalisir Y, Uz YH ve ark. Vitamin E modulates apoptosis and c-jun N-terminal kinase activation in ovarian torsion-detorsion injury. *Exp Mol Pathol.* 2013;95(2):213-9.
93. Julio-Pieper M, Lara HE, Bravo JA, Romero C. Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta1 in the rat ovary. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:57.