



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Sıçanlarda letrozolün indüklediği polikistik over sendromunda fisetinin etkileri

Effects of fisetin to letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats

Beradiye Çelikçi¹, Rüstem Anıl Uğan², Erdem Toktay³

¹Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Pr., ²Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Turkey

³Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kars, Turkey

Cukurova Medical Journal 2021;46(2):508-515

Abstract

Purpose: The aim of this study is to evaluate the antioxidant effects of fisetin on letrozole induced PCOS (polycystic ovarian syndrome) in rats.

Materials and Methods: A total of 36 Albino Wistar female rats were used in the study. Letrozole at a dose of 1 mg/kg dissolved in 1% carboxymethyl cellulose (2ml/kg) was administered orally to rats for 21 days to induce the PCOS model. After 21 days, metformin and fisetin were administered to their groups for 7 days. The ovaries of the animals were removed and stored under suitable conditions for biochemical and histological examinations.

Results: The glutathione (GSH) levels decreased and the malondialdehyde (MDA) levels increased in the PCOS group compared to the healthy group. It was determined that GSH levels increased and MDA levels decreased in PCOS+MET+FIS25 (PCOS+metformin 20 mg/kg+fisetin 25 mg/kg) and PCOS+MET+FIS50 (PCOS+metformin 20 mg/kg+fisetin 50 mg/kg) groups in a dose dependent manner. Histological findings showed that the PCOS group contained more cystic follicles than the control group. It was observed that cystic follicles and the apoptotic and necrotic cells contained in follicles decreased in the PCOS+MET+FIS25 and PCOS+MET+FIS50 groups in a dose dependent manner.

Conclusion: As a result, fisetin showed beneficial effects in the treatment of PCOS by preventing the oxidative damage that metformin cannot eliminate. Fisetin prevented and protected new cells from going to necrosis by showing antioxidant activity. Therefore, it would be beneficial to add fisetin to the metformin treatment.

Keywords: PCOS, Metformin, Fisetin, Oxidative Stress, letrozole

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı sıçanlarda letrozolle oluşturulmuş PKOS (polikistik over sendromu) üzerinde fisetinin antioksidan etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 36 adet Albino Wistar dişi sıçan kullanıldı. Dişi sıçanlara, PKOS modelini indüklemek için 21 gün boyunca %1 karboksimetil selüloz (2 mL/kg) içinde çözülmüş 1 mg/kg dozunda letrozol oral yolla uygulanmıştır. PKOS oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca metformin ve fisetin kendi gruplarına uygulandı. Hayvanların overleri alındı ve biyokimyasal, histolojik incelemeler için uygun koşullarda saklandı.

Bulgular: PKOS grubunda sağlıklı gruba göre glutatyon (GSH) seviyelerinde düşüş, malondialdehit (MDA) seviyelerinde artış görüldü. PKOS+MET+FIS25 (PKOS+20 mg/kg metformin+25 mg/kg fisetin) ve PKOS+MET+FIS50 (PKOS+20 mg/kg metformin+50 mg/kg fisetin) gruplarında doza bağlı olarak GSH seviyelerinin yükseldiği, MDA seviyelerinin düştüğü tespit edildi. Histolojik bulgularda PKOS grubunda kontrol grubuna göre çok sayıda kistik folikül içerdiği görüldü. PKOS+MET+FIS25 ve PKOS+MET+FIS50 gruplarında doza bağlı olarak kistik foliküllerin ve foliküllerin içerdiği apoptotik ve nekrotik hücrelerin azaldığı görüldü.

Sonuç: Sonuç olarak, fisetin metforminin ortadan kaldıramadığı oksidatif hasarı engelleyerek faydalı etkiler göstermiştir. Fisetin antioksidan aktivite göstererek yeni hücrelerin nekroza gitmesini engellemiş ve korumuştur. Bundan dolayı metformin tedavisine fisetin eklenmesi faydalı olacaktır.

Anahtar kelimeler: PKOS, Metformin, Fisetin, Oksidatif Stres, letrozol

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Rüstem Anıl Uğan, Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Turkey E-mail: anil.ugan@atauni.edu.tr
Geliş tarihi/Received: 30.12.2020 Kabul tarihi/Accepted: 22.02.2021 Çevrimiçi yayın/Published online: 03.05.2021

GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınların %5-10'unu etkileyen¹, temel olarak kronik oligo-anovulasyon, hiper-androjenizm ve insülin rezistansı ile ilişkili bir hastalık tablosudur². PKOS üzerine yapılan histolojik araştırmalarda, ovulasyonun neredeyse hiç meydana gelmediği, ovaryum yüzeylerinin düzleştiği, tunica albuginea kalınlaştığı görülmektedir³. Aynı zamanda, stromada çok sayıda atrofik sekonder folikülün var olduğu ve korpus luteumun olmadığı görülmektedir⁴. Etiyolojisi tam olarak anlaşılacakla birlikte, PKOS'ta androjen, luteinize edici Hormon (LH) düzeyinde artış görülürken folikül stimüle edici hormon (FSH) düzeyinde azalma görülmüştür⁵.

Aşırı androjen üretimiyle birlikte, periferik yağ dokusunda fazla androjenlerin östrojenik hormonlara dönüştürüldüğü ve artmış östrojen seviyesinin hipofiz bezinden FSH salıverilmesini baskıladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, foliküllerin ovulasyonu ve korpus luteum dönüşümü meydana gelmediği için progesteron üretimi de baskılanmaktadır. Sonuçta, PKOS'ta östrojen artışına bağlı olarak anovulatuvar sikluslar gözlenmektedir. Oluşan anovulatuvar sikluslar PKOS'a bağlı infertilitenin ana sebebidir. Bunun yanında aşırı serbest radikal üretiminin kadın fertilesi üzerine olumsuz etkileri olduğu da bilinmektedir⁶. Literatürde, PKOS'a bağlı gelişen endometriyozis ve açıklanamayan infertilite patogeneğinde artmış serbest radikal üretiminin olduğu gösterilmiştir⁷. PKOS'ta oksidatif stresin şiddetlenmesi folikül mikro-çevresini etkileyerek apoptozu uyarır, böylece hem oosit kalitesi hem de oosit ile ilişkili diğer yapılarda oluşan bozukluklar infertiliteye neden olur^{8,9}. Bununla ilişkili olarak, literatürde apoptotik granuloza hücrelerinin miktarının PKOS'lu bireylerde yüksek bulunmasının ve malondialdehit (MDA) seviyelerindeki artışın, folikül gelişimi ve oosit maturasyonu üzerine etkilerinin olduğu düşünülmektedir¹⁰.

İnfertilite görülen hastalara antioksidan verilmesi ya da in vitro fertilizasyona (IVF) giden hastaların oosit medyumlarına antioksidan maddelerin eklenmesi fertilité ve IVF başarı oranlarını arttırmaktadır¹¹. Sonuçta PKOS tedavisinde hormonal akstaki bozuklukların giderilmesi ve oksidatif hasarında engellenmesi infertilitenin önüne geçebilir. Nitekim yapılan pek çok PKOS çalışmasında, antioksidan bileşiklerin reaktif oksijen radikallerini azalttığı ve

PKOS'ta oluşan hasarın geri dönmesinde faydalı etkiler gösterdiği görülmüştür¹²⁻¹⁴.

PKOS sırasında ortaya çıkan bir diğer önemli klinik problem insülin direncidir¹⁵. Uzun süren PKOS ile ilişkili insülin direnci; tip 2 diyabete, hipertansiyona ve obeziteye yol açmaktadır¹⁶. PKOS'da ortaya çıkan sistemik problemler de oksidatif hasara katkıda bulunmaktadır. PKOS tedavisinde insülin direncinin ortadan kaldırılması amacıyla metformin rutin olarak kullanılmaktadır¹⁶. Ancak metformin, sistemik ve lokal hasarın giderilmesinde tek başına yetersiz kalmaktadır^{17,18}. Bu amaçla metformin tedavisinin yanında güçlü antioksidanların kullanılması ovaryum hasarını azaltarak infertilitenin önüne geçebildiği görülmektedir^{17,19}.

Flavonoid polifenoller sınıfından bir flavonol olan fisetin (3,7,3',4'-tetrahydroxy flavone), soğan, salatalık, elma, üzüm, hurma, fındık ve çilek gibi pek çok bitki, meyve ve ağaçta bulunan bir bileşiktir²⁰. Literatürde güçlü antioksidan özellikleri gösterilmiştir^{21,22}. Antioksidan özelliklerinin yanında anti kanser ve kemoterapötik özellikleri de bilinmektedir^{23,24}. Anlaşılacağı üzere, güçlü antioksidan özellikleri fisetini oksidatif strese karşı kullanılacak güçlü bir ajan adayını yapmaktadır.

Bu çalışmanın literatüre katkısını açıklamak gerekirse, PKOS halen güncel klinik bir problem olmaya devam etmektedir. PKOS'taki en büyük sorun ise var olan oksidatif stresin hastalarda over rezervini azaltması ve ilerleyen aşamalarda infertilitenin ortaya çıkmasıdır. Her ne kadar PKOS tedavisinde metformin kullanılıyor olsa da metformin oluşan oksidatif hasarı giderememektedir. PKOS'ta metformine ek olarak uygulanacak fisetinin ise oksidatif hasarı azaltarak over rezervini koruyacağını beklemekteyiz. Böylece PKOS ilişkili infertilitenin önüne geçilebileceği konusunda yeni umutlar ortaya çıkacaktır. Bundan dolayı, bu çalışmada, aramotaz enzim inhibitörü olan letrozol ile deneysel olarak oluşturulmuş PKOS modelinde ortaya çıkan oksidatif hasara karşı fisetinin olası etkilerini ve metforminin etkisine ilave etkilerini biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanları

Bu çalışmamızda, (ATADEM) Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ağırlıkları 200-250 gram

arasında değişen toplam 36 adet Wistar Albino dişi sıçan kullanıldı. Çalışmalarımızın tüm aşamalarının etik kurallara uygun olduğu, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2019/15-220 numaralı karar ile onaylandı. Deneyde "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prensiplerine uygun davranılmıştır. Deney süresince, sıçanlara yeterli kadar (ad libitum) su ve yem verildi. Sıçanlar, deney öncesi ve süresince gruplar halinde laboratuvarında talaşların bulunduğu plastik kafeslerde, normal oda sıcaklığında (22 ± 2 °C), %50-60 nem oranında ve 12/12 saat gündüz/gece döngüsünde barındırıldı.

Kimyasallar

Letrozol (Sigma-aldrich): Letrozolün %1 karboksimetil selüloz (CMC) içinde süspande edilmiştir. Metformin (Sigma-aldrich): Metformin serum fizyolojikte süspande edilerek hesaplanan dozlarda oral yolla gavaj ile gruplara verildi. Fisetin (Santa Cruz A.Ş., İstanbul, Türkiye): Serum fizyolojikte süspande edilerek belirlenen dozlara göre hesaplama yapılarak oral yolla gavaj ile verildi. Ksilazin (Xylasinbio, İntermed. Ankara, Türkiye): Çalışmada intraperitoneal (IP) olarak sedasyon için anestezi aşamasında ketamin ile birlikte verildi. Ketamin (Ketalar, Pfizer, 50 mg/ml flakon, İstanbul, Türkiye): IP olarak anestezide ksilazin ile kombine olarak verildi.

Deneysel gruplar

Sıçanlar rasgele her grupta 6 sıçan olacak şekilde 6 gruba ayrıldı.

- Grup 1: Kontrol (Sağlıklı)
- Grup 2: PKOS (21 gün 1 mg/kg *Letrozol*)
- Grup 3: PKOS+FIS50 (21 gün 1 mg/kg *Letrozol* + 7 gün 50 mg/kg Fisetin)
- Grup 4: PKOS+MET (21 gün 1 mg/kg *Letrozol* + 7 gün 20 mg/kg Metformin)
- Grup 5: PKOS+MET+FIS25 (21 gün 1 mg/kg *Letrozol* + 7 gün 20 mg/kg Metformin ve 25 mg/kg Fisetin)
- Grup 6: PKOS+MET+FIS50 (21 gün 1 mg/kg *Letrozol* + 7 gün 20 mg/kg Metformin ve 50 mg/kg Fisetin)

Deneysel hayvan modeli

Deneysel PKOS oluşturma işleminde sıçanlara 1 mg/kg letrozol 21 gün boyunca %1 CMC içinde süspande edilerek oral yolla gavaj kullanılarak

verildi²⁵. Sağlıklı grubuna aynı miktar taşıyıcı uygulandı. Sağlıklı ve PKOS gruplarındaki sıçanlar 21 gün sonunda, 50 mg/kg ketamin/15 mg/kg ksilazin kombinasyonu ile anestezi altına alındıktan sonra over dokuları alındı ve hayvanlar sakrifiye edildi. PKOS+MET, PKOS+FIS50, PKOS+MET+FIS25 ve PKOS+MET+FIS50 gruplarında 21 gün letrozol uygulanmasının ardından 7 gün boyunca her gün belirtilen gruplara gavaj ile fisetin (25 ve 50 mg/kg/gün)^{26,27} ve metformin (20 mg/kg/gün)²⁸ oral yolla uygulandı. Toplamda 28 günün sonunda fisetin ve metformin verilışı sonlandırılarak sıçanlar 50 mg/kg ketamin/15 mg/kg ksilazin kombinasyonu ile anestezi altına alındıktan sonra over dokuları alındı ve hayvanlar sakrifiye edildi. Deney sonunda tüm hayvanların ovaryum doku örneklerinin bir kısmı biyokimyasal inceleme için -80°C'de saklandı. Bir kısmı ise histopatolojik inceleme amacıyla %3,7'lik Formaldehit solüsyonuna alındı.

Histopatolojik analiz

Over dokuları %3,7'lik Formaldehit solüsyonunda 48 saat fikse edildi. Fiksasyondan sonra tüm over dokularının rutin histopatolojik işlenmesi daha önce açıklandığı gibi gerçekleştirildi²⁹. Doku işlendikten sonra histopatolojik olarak her bir parafin bloktan 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Ovaryum dokusu slaytları hematoksilin-eozin ile boyandı³⁰.

Biyokimyasal analizler

Sıçan over dokuları -80 °C'de tutuldu. Tüm doku örnekleri ayrı ayrı sıvı azot yardımıyla TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) cihazı ve bu cihazın paslanmaz çelik jar ve bilyeleri kullanılarak toz haline getirildi. Daha sonra 2 ml'lik tüp içerisine tüm dokulardan 100 mg toz örnek, (PBS) fosfat tamponu ve küçük paslanmaz çelik bilye koyuldu ve TissueLyser II cihazı kullanılarak homojenize edildi. Daha sonra santrifüj edildi ve supernatant kısım biyokimyasal ölçümlerimizde kullanıldı.

Glutatyon (GSH)³¹ ve MDA³² seviyeleri daha önceki çalışmalardaki manuel yöntemler modifiye edilerek ölçüldü³³⁻³⁵. Gruplar arası oluşan renk değişimlerinin tespiti 96 kuyucuklu plaka okuyabilen spektrofotometre (Biotek, Epoch, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Protein konsantrasyonları protein standartları ile Lowry metodu kullanılarak tespit edildi (Thermo Fisher, modified lowry protein assay kit)³⁶. Biyokimyasal veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

İstatistiksel analiz

Çalışmadaki biyokimyasal verilerin istatistiksel analizleri IBM 20.00 SPSS programı kullanılarak gerçekleştirildi. GSH ve MDA bulgularımızda gruplar arası çoklu karşılaştırma, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc Duncan testi kullanılarak gerçekleştirildi ($p < 0,05$).

BULGULAR

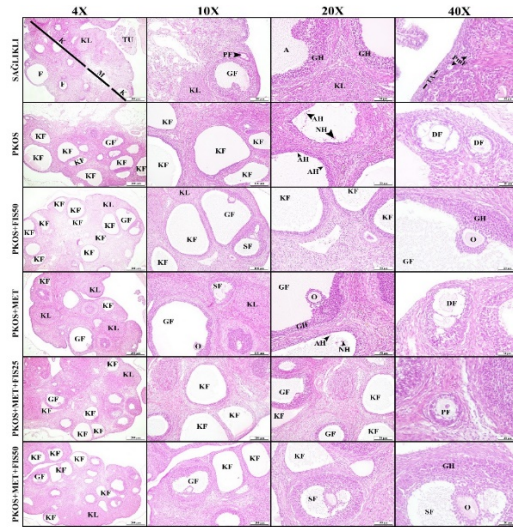
Gruplar arası ovaryum histopatoloji değerlendirmesine göre; Sağlıklı grupta korteks ve medulla bölgeleri incelendi. Kortekste farklı büyüklüklerde sağlıklı foliküller ve korpus luteum yapıları gözlemlendi. Daha büyük büyütme oranlarında sağlıklı görünümü primer folikül, graf folikülü, görüldü. Graf folikül duvarında sıralı düzenli ve normal görünümü granuloza hücreleri izlendi (Şekil 1). PKOS grubunda kortekste farklı büyüklüklerde çok sayıda kistik ovarian foliküller görüldü. Kistik foliküller arasında nadir olarak iyi görünümü olmayan graf foliküllerine rastlandı. Kistik foliküllerin ayrıntılı yapısal incelemesinde sağlıklı folikül duvarında bulunan granuloza hücre tabakasının bulunmadığı ya da çok incelmiş görüldüğü incelenen bu tabakanın granuloza hücrelerinde apoptotik ve nekrotik hücrelere rastlandı. Öte yandan ovaryum içerisinde henüz gelişmeye başlamış yeni folikül yapılarında dejeneratif değişiklikler incelendi (Şekil 1). PKOS+FIS50 grubunda PKOS grubuna benzer şekilde çok sayıda kistik folikül ve nadir olarak graf folikülü izlendi. PKOS grubuna göre belirgin farklılık ise kistik foliküller içerisinde apoptotik ve nekrotik hücrelere daha az rastlanmış olmasıdır. Ayrıca nadir izlenen graf folikülünde granuloza hücrelerinin ve oositin sağlıklı bir görünümde olduğu ayırt edildi (Şekil 1). PKOS+MET grubunda PKOS grubuna göre belirgin şekilde kistik foliküllerin sayısında ciddi bir azalma ve boyutlarında belirgin bir küçülme gözlemlendi. Bunun yanında PKOS grubuna benzer şekilde kistik foliküller içerisinde apoptotik ve nekrotik hücrelere rastlandı. Bununla birlikte gelişim aşamasında görülen foliküllerde dejeneratif görünüm izlendi (Şekil 1). PKOS+MET+FIS25 grubunda PKOS+MET grubuna benzer şekilde kistik foliküllerin sayısında ciddi bir azalma ve boyutlarında belirgin bir küçülme gözlemlendi. Bunun yanında kistik foliküller içerisinde apoptotik ve nekrotik hücrelere rastlanmamış olması dikkat çekiciydi. Ayrıca yeni gelişim aşamasındaki foliküllerin sağlıklı görünümde

olduğu izlendi (Şekil 1). PKOS+MET+FIS50 grubunda PKOS+MET+FIS25 grubuna benzer bulgulara rastlandı. Bu grupta da kistik foliküller içerisinde apoptotik ve nekrotik hücrelere rastlanmadı. Ayrıca gelişim aşamasındaki sekonder folikül yapısının sağlıklı oosit ve granuloza hücreleri görüldü (Şekil 1). Histopatolojik bulguların anlaşılır olması amacıyla daha önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak kistik folikül sayısı, apoptotik ve nekrotik hücre varlığı yok (-), az (+), orta (++) ve fazla (+++) olacak şekilde skorlandı (Tablo 1).

Tablo 1. Histopatoloji skorlama tablosu

	Kistik Folikül Sayısı	Apoptotik Ve Nekrotik Hücreler
Sağlıklı	-/+	-
PKOS	+++	++
PKOS+FIS50	+++	-/+
PKOS+MET	+	+
PKOS+MET+FIS25	+	-
PKOS+MET+FIS50	+	-

PKOS: Polikistik Over Sendromu, MET: Metformin 20 mg/kg, FIS25: Fisetin 25 mg/kg, FIS50: Fisetin 50 mg/kg.

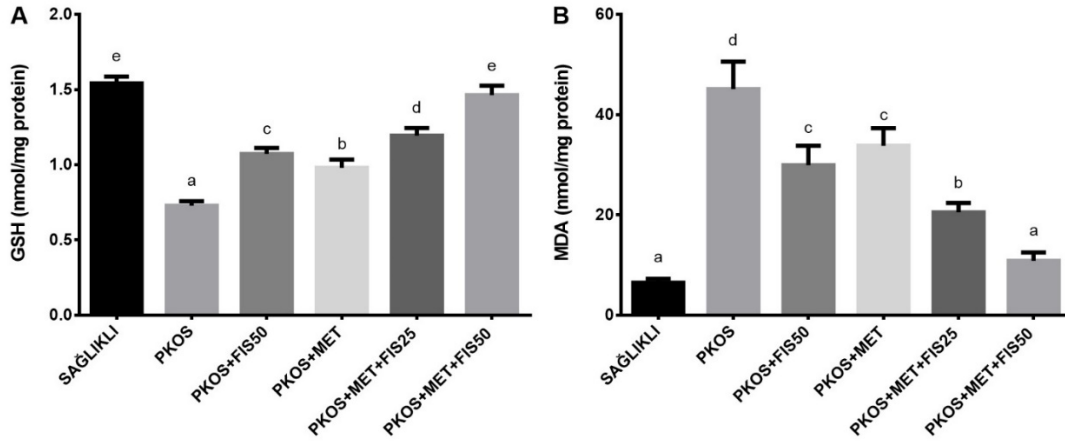


Şekil 1. Hematoksilen ve eozin boyama bulguları

(K: Korteks, M: Medulla, F: Folikül, KL: Korpus Luteum, GF: Graf Folikülü, SF: Sekonder Folikül, PF: Primer Folikül, PmF: Primordial Folikül, KF: Kistik Folikül, DF: Dejeneratif Folikül, TA: Tunika Albuginea, A: Antrum, O: Oosit, GH: Granuloza Hücreleri, AH: Apoptotik Hücre, NH: Nekrotik Hücre). PKOS: Polikistik Over Sendromu, MET: Metformin 20 mg/kg, FIS25: Fisetin 25 mg/kg, FIS50: Fisetin 50 mg/kg.

GSH seviyelerinin gruplar arası değerlendirmesine göre (Şekil 2); sağlıklı grubu ile karşılaştırıldığında, PKOS grubundaki GSH seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü görülürken; PKOS+MET ve PKOS+FIS50 gruplarındaki GSH seviyelerinin PKOS grubuna göre anlamlı derecede arttığı tespit edildi. PKOS grubuna kıyasla, PKOS+MET+FIS25 ve PKOS+MET+FIS50 gruplarındaki GSH seviyelerinde doza bağımlı bir şekilde anlamlı yükseliş meydana geldiği tespit edildi. Bunun yanında, hem PKOS+MET+FIS25 hem de PKOS+MET+FIS50 gruplarının GSH seviyelerinde PKOS+FIS50 ve PKOS+MET gruplarına göre anlamlı derecede yükseliş meydana geldiği tespit edildi (Tablo 2). MDA seviyelerinin gruplar arası değerlendirmesine göre (Şekil 2); sağlıklı

grubu ile karşılaştırıldığında PKOS grubundaki MDA seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülürken, PKOS+MET ve PKOS+FIS50 gruplarındaki MDA seviyelerinde PKOS grubuna göre anlamlı derecede azalma tespit edildi. PKOS+MET ve PKOS+FIS50 gruplarının MDA seviyeleri birbirleriyle karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark görülmedi. PKOS grubuna kıyasla, PKOS+MET+FIS25 ve PKOS+MET+FIS50 gruplarındaki MDA seviyelerinde doza bağımlı bir şekilde anlamlı azalma meydana geldiği tespit edildi. Bunun yanında hem PKOS+MET+FIS25 hem de PKOS+MET+FIS50 gruplarının MDA seviyelerinde PKOS+FIS50 ve PKOS+MET gruplarına göre anlamlı derecede azalma meydana geldiği tespit edildi (Tablo 2).



Şekil 2. Over dokularında oksidatif stres parametre sonuçları.

Çubukların üstünde aynı harf olması çubukların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını, çubukların üstünde farklı harf olması one way-ANOVA post-hoc Duncan testine göre çubukların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (p < 0,05). Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmektedir. GSH: Glutatyon, MDA: Malondialdehit, PKOS: Polikistik Over Sendromu, MET: Metformin, FIS25: Fisetin 25 mg/kg, FIS50: Fisetin 50 mg/kg.

Tablo 2. Over dokularında oksidatif stres parametre sonuçları

	GSH	MDA
Sağlıklı	1,54±0,05	6,45±0,79
PKOS	0,72±0,03	45,07±8,49
PKOS+FIS50	1,07±0,04	29,92±3,85
PKOS+MET	0,97±0,05	33,76±3,51
PKOS+MET+FIS25	1,19±0,05	20,48±1,86
PKOS+MET+FIS50	1,46±0,06	10,83±1,69

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmektedir. GSH: Glutatyon, MDA: Malondialdehit, PKOS: Polikistik Over Sendromu, MET: Metformin, FIS25: Fisetin 25 mg/kg, FIS50: Fisetin 50 mg/kg.

TARTIŞMA

PKOS sebebi bilinmeyen klinik güncel bir problemdir^{3,4}. Hastalığın gelişiminde genetik, çevresel ve hormonal sebepler yer almaktadır³⁷. Sistemik yüksek androjen sonucunda ortaya çıkan PKOS, östrojen ve progesteron hormon sekresyonunda bozukluklar, anormal folikül gelişimi ve anormal menstrual sıklusa yol açmaktadır³⁸⁻³⁹. Bu problemlere ilaveten, PKOS sırasında ovaryumda yüksek miktarda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres sonucunda ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (ROT) antioksidan savunma sisteminin bozulmasına neden

olmaktadır⁴⁰⁻⁴². ROT'lar ovaryumda olgunlaşma aşamasına ve olgunlaşmış birçok folikül için risk oluşturmaktadır. Buna ilaveten oksidatif stres, endometriyosis, açıklanamayan infertilite gibi dolaylı yollarla üreme organlarını etkileyebildiği gösterilmiştir⁴⁰⁻⁴². Her ne sebeple olursa olsun oksidatif stres infertilite için gerçek bir problemdir.

Oksidatif strele ilişkili olarak yapılan çalışmalarda, genellikle ROT'ların güçlü bir antioksidan özellikteki bileşikler yardımıyla uzaklaştırılması amaçlanmaktadır^{43,44}. Bu amaçla biz de çalışmamızda antioksidan etkinliği iyi bilinen fisetini PKOS sırasında ortaya çıkan oksidatif stresi dengelemek amacıyla kullandık. Bunun yanında fisetinin yalnız başına PKOS üzerindeki etkisini de göstermek istedik.

Literatürde deney hayvanlarında PKOS modeli oluşturmak ve klinikteki durumu taklit etmek amacıyla östrojen metabolizmasına etki eden başlıca letrozol, dehidroepiandrosteron, dihidrotestosteron ve östrodiol valerat gibi bileşikler kullanılmaktadır^{45,46}. Çalışmamızda PKOS modeli oluşturmak amacıyla aramotaz enzim inhibitörü olan letrozol kullanılmıştır^{47,48}.

Histopatolojik analize bakıldığında PKOS grubunda kistik foliküllerin görülmesi deney hayvan modelimizin başarılı bir şekilde oluştuğunu ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, PKOS grubunda foliküller yapılarında izlenen apoptotik ve nekrotik hücreler oksidatif stresin varlığını göstermektedir. Birçok çalışma deney modelimizi destekler niteliktedir^{49,50}. PKOS+MET grubunda kistik foliküllerin neredeyse hiç görülmemesi PKOS'un rutin tedavisinde metforminin kullanışlı sebebinin açıklamaktadır^{18,51}. Fakat folikül yapılarında gözlemlediğimiz nekrotik ve apoptotik hücreler oksidatif stresin ortadan kaldırılmasında metforminin yetersiz kaldığını da ortaya koymaktadır. PKOS'lu hayvanlara sadece fisetin uygulanan grupta, fisetinin tek başına PKOS'a bağlı ortaya çıkan kistik folikülleri engelleyemediği fakat gelişen foliküller üzerinde koruyucu roller üstlendiği görülmektedir. PKOS+MET+FIS25 ve PKOS+MET+FIS50 gruplarında kistik foliküllerin ortadan kalktığı ve öte yandan diğer foliküllerin de oksidatif stres hasarından korunmuş olduğu görülmektedir. Literatürde pek çok çalışma bizim bulgularımızı destekler niteliktedir^{13,14}.

PKOS'un hastalık seyri açısından önemli olan diğer bir parametre oksidatif stres hasarının gösterilmesidir. Bunun için çalışmamızdaki tüm gruplarda over

dokularının GSH ve MDA seviyeleri ölçülmüştür. Oksidatif stres hasarının hücre duvarında meydana getirdiği lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehid seviyelerinin gösterilmesi oksidatif stresin gösterilmesinde önemli bir bulgudur. Öte yandan GSH doku içi antioksidan kapasiteyi göstermek için yaygın olarak tercih edilen bir parametredir. PKOS grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre GSH seviyesinin düştüğü ve MDA seviyesinin arttığı saptandı. Metformin ve fisetin uygulandığında GSH seviyelerinin yükseldiği, MDA seviyelerinin düştüğü gözlemlendi. Yüksek doz fisetinin, düşük doz fisetine göre antioksidan aktivitede daha etkili olduğu ve metformin tedavisini olumlu yönde desteklediği tespit edildi. Literatürde bir çalışmada karaciğer hasarı oluşturulmuş sıçanlarla MDA seviyelerindeki artışın fisetin verilmesine bağlı olarak azaldığı saptanırken⁵² başka bir çalışmada fisetinin GSH seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir⁵³. Bir diğer çalışmada, fisetinin ROT'ları düşürdüğü ve glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon s-transferaz (GST) ve diğer antioksidan enzimleri restore ettiği gösterilmiştir⁵⁴. Bunlara ek olarak bir diğer çalışmada fisetinin Miyeloperoksidaz seviyesini azalttığı gösterilmiştir⁵⁵. Bu bulgular bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Çalışmamızın kısıtlılığı olarak PKOS'a özel belirteçler ölçülmemiştir fakat bu konu hakkında daha detaylı çalışmalar yapılabilir ve PKOS ve fisetin arasındaki yeni yollar aydınlatılabilir.

Sonuç olarak, PKOS tedavisinde fisetin metforminin yerini tutmayabilir fakat metforminin ortadan kaldıramadığı oksidatif hasarı engelleyerek faydalı etkiler göstermiştir. Fisetin folikül oluşumunu engelleyemese de antioksidan aktivite göstererek yeni gelişen folikülleri oksidatif stres hasarına karşı korumuştur. Bundan dolayı metformin tedavisine fisetin en azından gıda takviyesi olarak eklenmesi faydalı olacaktır.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: BÇ, RAU; Veri toplama: RAU, BÇ; Veri analizi ve yorumlama: RAU, ET; Yazı taslağı: RAU, ET; İçeriğin eleştirel incelenmesi: RAU; Son onay ve sorumluluk: BÇ, RAU, ET; Teknik ve malzeme desteği: ET, RAU; Süpervizyon: RAU, BÇ; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Etik Onay: Bu çalışma için Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2019/15-220 numaralı karar ile onaylandı.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Yazarın Notu: Bu çalışma, Beradiye ÇELİKÇİN'in mezuniyet araştırma projesi tezi olarak savunulmuştur. Bu çalışma, Eczacılık Fakültesindeki deney hayvanları laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığına desteklerinden ötürü şükranlarımızı sunarız.

Author Contributions: Concept/Design : BÇ, RAU; Data acquisition: RAU, BÇ; Data analysis and interpretation: RAU, ET; Drafting

manuscript: RAU, ET; Critical revision of manuscript: RAU; Final approval and accountability: BC, RAU, ET; Technical or material support: ET, RAU; Supervision: RAU, BC; Securing funding (if available): n/a.

Ethical Approval: This study was approved by Atatürk University Animal Experiments Local Ethics Committee with the decision number 2019 / 15-220.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

Acknowledgement: This study has been defended as the graduation research project of Berdiye ÇELİKÇİ. This study was carried out in the laboratory of the Faculty of Pharmacy. We would like to express our gratitude to the Dean of the Faculty of Pharmacy of Atatürk University for their support.

KAYNAKLAR

1. Hashemi S, Ramezani Tehrani F, Farahmand M, Bahri Khomami M. Association of PCOS and its clinical signs with sexual function among Iranian women affected by PCOS. *J Sex Med.* 2014;11:2508-14.
2. Bağış HT, Hacıvelioğlu S, Haydardedeoğlu B, Şimşek E, Çok T, Parlakgümüş A et al. Prevalance of insulin resistance, impaired glucose tolerans test and diabetes mellitus in women with polycystic ovary syndrome; analysis of 235 patients. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi.* 2008;5:99-104.
3. Polson DW, Adams J, Wadsworth J, Franks S. Polycystic ovaries-a common finding in normal women. *Lancet.* 1988;1:870-2.
4. Crosignani PG, Nicolosi AE. Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Hum Reprod Update.* 2001;7:3-7.
5. Hong Y, Yin Y, Tan Y, Hong K, Zhou H. The flavanone, naringenin, modifies antioxidant and steroidogenic enzyme activity in a rat model of letrozole-induced polycystic ovary syndrome. *Med Sci Monit.* 2019;25:395-401.
6. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10:49.
7. Ozer A, Bakacak M, Kiran H, Ercan O, Kostu B, Kanat-Pektas M et al. Increased oxidative stress is associated with insulin resistance and infertility in polycystic ovary syndrome. *Ginekol Pol.* 2016;87:733-38.
8. Szafarowska M, Jerzak M. Ovarian aging and infertility. *Ginekol Pol.* 2013;84:298-304.
9. Meden-Vrtovec H. Ovarian aging and infertility. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2004;31:5-8.
10. Tola EN, Koroglu N, Ergin M, Oral HB, Turgut A, Erel O. The role of follicular fluid thiol/disulphide homeostasis in polycystic ovary syndrome. *Balkan Med J.* 2018;35:306-10.
11. Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:112.
12. Atef MM, Abd-Ellatif RN, Emam MN, Abo El Gheit RE, Amer AI, Hafez YM. Therapeutic potential of sodium selenite in letrozole induced polycystic ovary syndrome rat model: Targeting mitochondrial approach (selenium in PCOS). *Arch Biochem Biophys.* 2019;671:245-54.
13. Basheer M, Rai S, Ghosh H, Ahmad Hajam Y. Therapeutic efficacy of melatonin against polycystic ovary syndrome (PCOS) induced by letrozole in Wistar Rat. *Pak J Biol Sci.* 2018;21:340-47.
14. Rajan RK, M SS, Balaji B. Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism. *Pharm Biol.* 2017;55:242-51.
15. Marshall JC, Dunaif A. Should all women with PCOS be treated for insulin resistance? *Fertil Steril.* 2012;97:18-22.
16. Mathur R, Alexander CJ, Yano J, Trivax B, Azziz R. Use of metformin in polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199:596-609.
17. Amini L, Tehranian N, Movahedin M, Ramezani Tehrani F, Ziaee S. Antioxidants and management of polycystic ovary syndrome in Iran: A systematic review of clinical trials. *Iran J Reprod Med.* 2015;13:1-8.
18. Lashen H. Role of metformin in the management of polycystic ovary syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2010;1:117-28.
19. Melo AS, Ferriani RA, Navarro PA. Treatment of infertility in women with polycystic ovary syndrome: approach to clinical practice. *Clinics (Sao Paulo).* 2015;70:765-9.
20. Khan N, Syed DN, Ahmad N, Mukhtar H. Fisetin: a dietary antioxidant for health promotion. *Antioxidants & redox signaling.* 2013;19:151-62.
21. Sengupta B, Banerjee A, Sengupta PK. Investigations on the binding and antioxidant properties of the plant flavonoid fisetin in model biomembranes. *FEBS Lett.* 2004;570:77-81.
22. Kashyap D, Garg VK, Tuli HS, Yerer MB, Sak K, Sharma AK et al. Fisetin and quercetin: promising flavonoids with chemopreventive potential. *Biomolecules.* 2019;9(5).
23. Rengarajan T, Yaacob NS. The flavonoid fisetin as an anticancer agent targeting the growth signaling pathways. *Eur J Pharmacol.* 2016;789:8-16.
24. Lall RK, Adhami VM, Mukhtar H. Dietary flavonoid fisetin for cancer prevention and treatment. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60:1396-405.
25. Rajan RK, Balaji B. Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism. *Pharm Biol.* 2017;55:242-51.
26. Hemanth Kumar B, Arun Reddy R, Mahesh Kumar J, Dinesh Kumar B, Diwan PV. Effects of fisetin on hyperhomocysteinemia-induced experimental endothelial dysfunction and vascular dementia. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95:32-42.
27. Jacob S, Thangarajan S. Effect of gestational intake of fisetin (3,3',4',7'-Tetrahydroxyflavone) on

- developmental methyl mercury neurotoxicity in f1 generation rats. *Biol Trace Elem Res.* 2017;177:297-315.
28. Jahan S, Abid A, Khalid S, Afsar T, Qurat Ul A, Shaheen G et al. Therapeutic potentials of Quercetin in management of polycystic ovarian syndrome using Letrozole induced rat model: a histological and a biochemical study. *J Ovarian Res.* 2018;11:26.
 29. Aksak Karamese S, Toktay E, Unal D, Selli J, Karamese M, Malkoc I. The protective effects of beta-carotene against ischemia/reperfusion injury in rat ovarian tissue. *Acta Histochem.* 2015;117:790-7.
 30. Toktay E, Selli J, Gurbuz MA, Tastan TB, Ugan RA, Un H et al. Effects of soy isoflavonoids (genistein and daidzein) on endometrial receptivity. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23:1603-09.
 31. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25:192-205.
 32. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
 33. Ugan RA, Un H, Kose D, Cadirci E, Tastan TB, Yayla M et al. Can aprepitant used for nausea and vomiting be good gastrointestinal complaints? *N-S Arch Pharmacol.* 2020;393:2463-72.
 34. Ugan RA, Un H, Gurbuz MA, Kaya G, Kahramanlar A, Aksakalli-Magden ZB et al. Possible contribution of the neprilysin/ACE pathway to sepsis in mice. *Life Sci.* 2020;258.
 35. Un H, Ugan RA. Protective effects of phloretin and phloridzin on indomethacin-induced gastric ulcers in mice: characterization of potential molecular mechanisms. *Cukurova Medical Journal.* 2020;45:1459-66.
 36. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
 37. De Leo V, Musacchio MC, Cappelli V, Massaro MG, Morgante G, Petraglia F. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016;14:38.
 38. Mortensen M, Rosenfield RL, Littlejohn E. Functional significance of polycystic-size ovaries in healthy adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:3786-90.
 39. Blank SK, Helm KD, McCartney CR, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome in adolescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1135:76-84.
 40. Papalou O, Victor VM, Diamanti-Kandarakis E. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome. *Curr Pharm Des.* 2016;22:2709-22.
 41. Zuo T, Zhu M, Xu W. Roles of oxidative stress in polycystic ovary syndrome and cancers. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:8589318.
 42. Liu J, Zhang D. [The role of oxidative stress in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2012;43:187-90.
 43. Kose SA, Naziroglu M. N-acetyl cysteine reduces oxidative toxicity, apoptosis, and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Free Radic Res.* 2015;49:338-46.
 44. Kose SA, Naziroglu M. Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Biol Trace Elem Res.* 2014;158:136-42.
 45. Hossain MM, Cao M, Wang Q, Kim JY, Schellander K, Tesfaye D et al. Altered expression of miRNAs in a dihydrotestosterone-induced rat PCOS model. *J Ovarian Res.* 2013;6:36.
 46. Wilkinson M, Brown RE, Imran SA, Wilkinson DA. Letter to the editor: hypothalamic kisspeptin in female rat models of PCOS. *Endocrinology.* 2017;158:2011.
 47. Lang Q, Yidong X, Xueguang Z, Sixian W, Wenming X, Tao Z. ETA-mediated anti-TNF-alpha therapy ameliorates the phenotype of PCOS model induced by letrozole. *PLoS One.* 2019;14:e0217495.
 48. Li C, Chen L, Zhao Y, Chen S, Fu L, Jiang Y et al. Altered expression of miRNAs in the uterus from a letrozole-induced rat PCOS model. *Gene.* 2017;598:20-26.
 49. Wang F, Yu B, Yang W, Liu J, Lu J, Xia X. Polycystic ovary syndrome resembling histopathological alterations in ovaries from prenatal androgenized female rats. *J Ovarian Res.* 2012;5:15.
 50. Gozukara I, Dokuyucu R, Ozgur T, Ozcan O, Pinar N, Kurt RK et al. Histopathologic and metabolic effect of ursodeoxycholic acid treatment on PCOS rat model. *Gynecol Endocrinol.* 2016;32:492-7.
 51. Tsilchorozidou T, Prelevic GM. The role of metformin in the management of polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003;15:483-8.
 52. A Hussein S, A Ragab O, A El Senosi Y, A Abdel-Muttalib S. Biochemical effect of fisetinon experimentally induced liver damage in rats. *Benha Vet Med J.* 2018;34:98-107.
 53. Adinehbeigi K, Razi Jalali MH, Shahriari A, Bahrami S. In vitro antileishmanial activity of fisetin flavonoid via inhibition of glutathione biosynthesis and arginase activity in *Leishmania infantum*. *Pathog Glob Health.* 2017;111:176-85.
 54. Zhao L, Zhang J, Pan L, Chen L, Wang Y, Liu X et al. Protective effect of 7,3',4'-flavon-3-ol (fisetin) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in vitro and in vivo. *Phytomedicine.* 2019;58:152865.
 55. Pal HC, Athar M, Elmetts CA, Afaq F. Fisetin inhibits UVB-induced cutaneous inflammation and activation of PI3K/AKT/NFkappaB signaling pathways in SKH-1 hairless mice. *Photochem Photobiol.* 2015;91:225-34.