

**SOYA (*GLYCINE MAX L.*)' NİN DİŞİ RATLARDA
REPRODÜKTİF SİSTEME ETKİLERİNİN
STEREOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Yeşim CEYLANTEKİN

**ANATOMİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŐMANLAR
Doç. Dr. Vural ÖZDEMİR
Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL
Tez No : 2014 - 011**

2014 – Afyonkarahisar

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOYA (*Glycine max* L.)' NİN DİŞİ RATLARDA REPRODÜKTİF
SİSTEME ETKİLERİNİN STEREOLOJİK OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Yeşim CEYLANTEKİN

**VETERİNER ANATOMİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Vural ÖZDEMİR

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Esra KÜPELİ AKKOL

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu tarafından 12.SAĞ.BİL.05 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No: 2014- 011

2014- AFYONKARAHİSAR

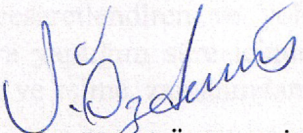
KABUL VE ONAY

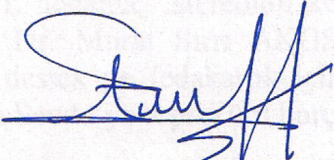
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

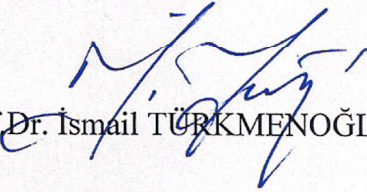
Doktora Tezi

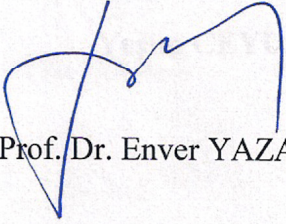
olarak kabul edilmiştir.

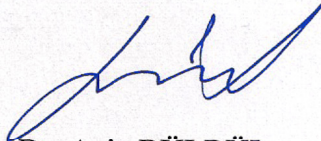
Tez Savunma Tarihi: 17.10.2014

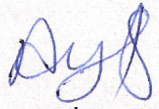

Doç.Dr. Vural ÖZDEMİR

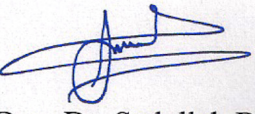

Prof.Dr. Esra KÜPELİ AKKOL


Prof.Dr. İsmail TÜRKMEÑOĞLU

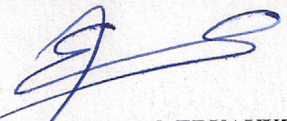

Prof.Dr. Enver YAZAR


Doç.Dr. Aziz BÜLBÜL


Doç.Dr. Aysun ÇEVİK DEMİRKAN


Doç. Dr. Sadullah BAHAR

Anatomi Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Yeşim CEYLANTEKİN'in "Soya (*Glycine max* L.)'nın Dişi Ratlarda Reprodüktif Sisteme Etkilerinin Stereolojik Olarak Araştırılması" başlıklı tezi ..31.10.2014..... günü saat ..16.00.. 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Anatomi doku ve organların yapıları ile biçimlerini inceleyen bilim dalıdır. Aynı zamanda insan ve hayvan hekimliklerinin temelini oluşturmaktadır. Stereoloji ise bu alanda çalışma yapan araştırmacıların, gerçeğe en yakın verileri elde edebilmelerini sağlayan metotlar topluluğudur. Stereoloji sayesinde bir yapının yüzey alanı, hacmi, içerdiği hücre sayısı ve hücre hacmi gibi verilere ulaşılabilir. Güncel, geçerliliği ve doğrulukları ispatlanmış olan stereolojik metotların uygulamasının artırılması, tıp alanında kullanım alanı bulabilme isteği ve günlük yaşamda sıklıkla kullandığımız soya ve soyalı gıdaların etkisinin bilinmesi bu tip bir çalışma yapılmasının gerekli olduğunu gündeme getirmiştir.

Tezimin istatistiksel analizinde ve tezimin diğer kısımlarında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL hocama, stereoloji konusunda beni cesaretlendiren ve yol gösteren Arş. Grv. Dr. Murat Sırrı AKOSMAN'a, doktora yaptığım süre içinde gösterdikleri sabır, destek ve fedakarlık için değerli aileme ve eşime, zamanından çaldığım kızım Beren Sevde'ye teşekkürü borç bilirim.

Yeşim CEYLANTEKİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay	
Önsöz	i
İçindekiler	ii
Simgeler ve Kısaltmalar	iv
Tablolar	vi
Şekiller	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Soya (<i>Glycine max</i> L.)	5
1.1.1. Soya bitkisinin özellikleri.....	5
1.1.2. Soya ve soyalı ürünlerin farmakolojik etkileri.....	6
1.1.3. Soyanın insan ve hayvan sağlığı üzerine olumlu ve olumsuz etkileri.....	6
1.1.3.1. Soyanın insan sağlığı üzerine olumlu etkileri.....	6
1.1.3.2. Soyanın hayvan sağlığı üzerine olumlu etkileri.....	8
1.1.3.3. Soyanın insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri.....	9
1.1.3.4. Soyanın hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkileri.....	10
1.1.4. Soya ve reproduktif sistem.....	11
1.2. Ovaryum	13
1.2.1. Ovaryum anatomisi.....	13
1.2.2. Ovaryum histolojisi.....	14
1.2.2.1. Foliküler gelişim.....	15
1.2.2.2. Corpus luteum.....	16
1.2.3. Ovaryum fizyolojisi.....	17
1.2.4. Ovaryumun Endokrin Fonksiyonları.....	17
1.3. Rat (<i>Rattus Norvegicus</i>)	18
1.4. Stereoloji	19
1.4.1. Stereoloji Tanımı.....	19
1.4.2. Disektör.....	20
1.4.2.1. Optik Disektör.....	21
1.4.3. Tarafsız Sayım Çerçevesi.....	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Araştırmanın Yapıldığı Yer.....	23
2.2. Deneklerin Seçimi.....	23
2.3. Deney Gruplarına Verilen Ekstrelerin Hazırlanması.....	23
2.4. HPLC ile Miktar Tayini.....	24
2.5. Deney Grupları.....	25
2.6. Deney.....	26
2.6.1. Deneysel Prosedür.....	26
2.6.2. Siklusların Belirlenmesi.....	27
2.6.3. Ratların Diseksiyonu.....	28
2.7. Dokuların Takibi ve Dokuların Saklanması.....	29
2.8. Ovaryumlardan Kesit Alma İşlemleri.....	29

2.9. Histolojik Çalışmalar.....	30
2.9. 1.Ovaryumların Boyanma İşlemleri	30
2.9.2. Parafin İşlemi.....	31
2.9.2.1. Parafinin Uzaklaştırılması İşlemi.....	31
2.10. Örneklem Şeklinin Belirlenmesi.....	32
2.11. Mikroskopta Stereolojik İnceleme.....	32
2.12. İstatistiksel Analiz	33
3. BULGULAR	34
3.1. Fitokimyasal Analiz Sonuçları.....	34
3.2. Histopatolojik Bulgular.....	34
3.2.1. Ovaryum ve Uterus Dokusunda Gözlenen Değişimler.....	34
3.3. Optik Disektör Yöntemi Kullanılarak Folikül Sayılarının Hesaplanması.....	35
3.4. Stereolojik Analiz.....	35
4. TARTIŞMA.....	43
5. SONUÇ.....	49
ÖZET	51
SUMMARY.....	52
KAYNAKLAR.....	53

SİMGELER ve KISALTMALAR

% : Yüzde

± : Standart Sapma

°C: Santigrat derece

CA: Canlı Ağırlık

CMC: Karboksimetilselüloz

DES: Dietilstilbestrol

Dk: Dakika

FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon

G: Gram

HCHO: Formaldehit

HK: Hata Katsayısı

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HRT: Hormon Replasman Tedavisi

IM: İntramuskuler

İTK: İnce Tabaka Kromatolojisi

Kg: Kilogram

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LH: Lüteinize Hormon

Mg: Miligram

Mm: Milimetre

Mm³ : Milimetreküp

µm: Mikronmetre

μm^2 : Mikronmetre kare

PDA: Photo Diode Array Dedektör

SD: Standart Sapma

SRÖ: Sistemik Rasgele Örnekleme

TSE: Türk Standartları Enstitüsü

ZP: Zona Pellucida

ZPRs: Zona Pellucida Kalıntısı

Σ : Toplam

TABLolar

	Sayfa
Tablo 1. Kromatografi Şartları.....	25
Tablo 2. Ratların Deney Öncesi ve Sonrası Canlı Ağırlıkları.....	36
Tablo 3. Ratların Relatif Ovaryum Ağırlıkları.....	36
Tablo 4. Gruplarda Primordial Folikül Sayıları.....	37
Tablo 5. Gruplarda Primer Folikül Sayıları.....	39
Tablo 6. Gruplarda Sekonder Folikül Sayıları.....	40

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1. Bilateral Uterus ve Ovaryum Diseksiyonu.....	28
Şekil 2. Parafine Gömülmüş Kesit Alma İşlemine Hazır Bir Doku Örneği.....	29
Şekil 3. Sayımda Kullanılan Fotoğraf Ataşmanı İlave Edilmiş Mikroskop....	30
Şekil 4. Boyama Sonrası Mikroskopta İncelenmek Üzere Hazır Lamlar.....	32
Şekil 5. Gruplarda Relatif Ovaryum Ağırlığı.....	37
Şekil 6. Gruplarda Primordial Folikül Sayıları.....	38
Şekil 7. Etil Asetat 100mg/kg Grubu 3. Deneğe Ait Primordial Folikül Görüntüsü.....	38
Şekil 8. Gruplarda Primer Folikül Sayıları.....	39
Şekil 9. Etanol 100 mg/kg Grubuna Ait 2. Deneğin Primer Folikül Görüntüsü.....	40
Şekil 10. Gruplarda Sekonder Folikül Sayıları.....	41
Şekil 11. Etanol 200 mg/kg Grubuna Ait 3.Deneğin Sekonder Folikül Görüntüsü.....	42
Şekil 12. Kontrol Grubu 2.Deneğe Ait Primordial, Primer ve Sekonder Folikül Görüntüsü.....	42

1. GİRİŞ

Halk arasında “soya, Çin fasulyesi” gibi isimlerle bilinen *Glycine max* L. Leguminosae familyasına ait tek yıllık, çoğunlukla Asya ülkelerinde yağ ve un olarak tüketilmek üzere yetiştirilen bir bitkidir (Modaresi et al. 2011).

Soya fasulyesi üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda bitkinin vitamin, mineral (folat ve potasyum), yağ, protein ve karbonhidrat içeriğinin oldukça yoğun olduğu tespit edilmiştir (Anaç ve Ertürk, 2003; Modaresi et al. 2011). İnsan vücudu için gerekli tüm aminoasitleri içeren bu bitkinin protein miktarı % 38-40 gibi oldukça yüksek orandadır (Anaç ve Ertürk, 2003, Eldin et al. 2011, Modaresi et al. 2011). Protein kalitesi açısından, hayvansal kaynaklı besinlerin proteinlerine yakın özellik gösteren tek bitkisel protein içermesi nedeniyle özellikle Asya ülkelerinde oldukça değerli bir gıda ürünü olarak kullanım alanı bulmaktadır (Şahingöz ve Arlı, 2002; Modaresi et al. 2011). % 18 oranında yağ içeren bu bitkide yağın yaklaşık %85’ini doymamış yağ asitleri oluşturur, bu oranın % 60’ını linoleik asit ve linolenik asit oluşturur. Bu bitki yüksek karbohidrat içeriğine rağmen glisemik yükünün düşük olması, aynı zamanda ferritin formunda demir seviyelerinin yüksek olması, B12 vitamini hariç diğer B grubu vitaminler açısından zengin olması nedeniyle sağlık alanında kullanımı tercih edilen bitkiler arasında yer almaktadır (Sosic et al. 2011; Anaç ve Ertürk, 2003).

Soya canlı yaşamında içeriğindeki fitokimyasallar ve nutrasötikler açısından oldukça önemli bir besin kaynağıdır. Soya ve soya fasulyesinden hareketle hazırlanan çeşitli ürünler dünyada özellikle ABD başta olmak üzere Uzakdoğu ülkelerinde en fazla tüketilen gıda ürünlerinin başında gelmektedir. (Anaç ve Ertürk, 2003). Soya temel besin öğelerinin ötesinde ilave faydalar sağlayan, sağlığı korumada etkinlik gösteren, fonksiyonel bir gıda ürünüdür. Asrın harika bitkisi olarak kabul edilen soyaya talep, nüfus artışına paralel olarak artmaktadır (Anaç ve Ertürk 2003; Modaresi et al. 2011; Ponnusha et al. 2011).

Soya bitkisi bileşimindeki fitoöstrojenlerden dolayı sağlık alanında önemli yer tutmaktadır (Modaresi et al. 2011). Fitoöstrojenler, östrojenden türeyen, östrojenin fizyolojik ve kimyasal tüm karakterlerini içeren, endojen kaynaklı bileşiklerdir (Albert et al. 2002; Modaresi et al. 2011; Jefferson, 2010). Bunlar yapılarına bağlı olarak östrojenik ve negatif feedback etki ile antiöstrojenik etkiye sahiptirler (Tham et al. 1998; Kamiloğlu ve ark. 2002; Büyüktuncer ve Başaran 2005; Aydın, 2007; Akdemir 2008; Doğan ve Bircan, 2009; Jefferson et al. 2012)

Son yıllarda güncellik kazanan ve günümüzde de yapılan bilimsel araştırmalar sayesinde, oldukça ön plana çıkan en önemli fitoöstrojenler soyada bulunan izoflavonlardır (Büyüktuncer ve Başaran, 2005; Akdemir 2008). Fitoöstrojenlerin östrojenik etkileri, ilk olarak 1946 yılında Batı Avustralya'da, izoflavonca zengin bir çeşit yonca (*Trifolium subterraneum* L.) ile beslenen koyunlarda üreme bozukluğunun geliştiğinin fark edilmesi ile anlaşılmıştır (Büyüktuncer ve Başaran, 2005). İzoflavonların östrojen agonisti ya da antagonisti gibi davrandığı, antikanser etkisinin olduğu, hormon bağımlı hastalıkları önleyebildiği, osteoporoz ve kardiyovasküler hastalıklara karşı olumlu etkileri olabildiği, menstrual siklusu olumsuz etkileyebildiği pek çok çalışmada belirlenmiştir (Setchell et al. 1998; W Lu ve Anderson 1998; Lee et al. 2004). Soya fasulyesi ve soya ürünlerinde en çok fitoöstrojenik etkiye sahip daidzein, genistein ve glisitein olmak üzere üç tane izoflavon bulunur. (Yıldırım ve Tokgözoğlu, 2001; Albert et al. 2002; Başer, 2002; İnanç ve Tuna, 2005; Jefferson, 2010; Fukuda et al. 2011; Ponnusha et al. 2011; Jefferson et al. 2012). Organizmada genistein, östrojen reseptörü beta (ER β) ile etkileşime girdiğinde östrojen gücünün üçte biri kadar etkili olmaktadır (Yıldırım ve Tokgözoğlu, 2001). Genistein meme, ovaryum, endometrium, prostat, vasküler sistem ve kemik dokularında östrojen benzeri etkiler oluşturmaktadır (Yıldırım ve Tokgözoğlu, 2001).

Östrojenik/antiöstrojenik etkilerinin yanında soya ve soya içeren gıdalar sarılık ve ödem tedavisinde, böbrek ve dalak fonksiyonlarını etkileyerek enürezis tedavisinde de kullanılmaktadır (Fukuda et al. 2011). Diyetle et yerine soya proteini tüketilmesiyle LDL-kolesterol düzeylerinin ve koroner kalp hastalığı gelişme riskinin

azaldığı (Öcal, 2007), plazma lipid ve lipoprotein konsantrasyonları üzerine olumlu etkileri olduğu (Anthony et al. 1996; Cederroth, 2009), bağırsak, prostat kanseri gibi bazı kanserlerin tedavisinde, osteoporozun önlenmesinde/tedavisinde önemli bir role sahip olduğu (Sevilmiş, 2008; Xiao 2008; Modaresi et al. 2011) literatürlerde kayıtlıdır.

İnsanda bir gram soya proteininin tüketilmesi ile alınan genistein miktarı 1-2 mg dır. İzoflavonların biyolojik etkileri nedeniyle Amerikan toplumunun günlük genistein tüketimi 1-3 mg iken, bu miktar bazı Asya toplumlarında 20-80 mg/gün rakamlarına ulaşmaktadır (Yıldırım ve Tokgözoğlu, 2001).

Tıbbi kullanımının yanında soya fasulyesi, süt, yoğurt, peynir, kemiksiz et, dondurma, dondurma külahı, pasta, kahve, salça, yağ, margarin, alkol, soya unu, ekmek, makarna, bebek maması, patates kızartması, bisküvi, çörek, kek, fast food, hayvan yemi, yeşil gübre, plastik madde, kahve kreması, insektisit, mürekkep, dezenfektan, elektrik yalıtım maddeleri gibi ürünlerde kendine kullanım alanı da bulmuştur (Anaç ve Ertürk, 2003; Solberg, 2004; Hoşgün, 2008).

Soyanın sayılan yararlı etkilerinin yanında, fazla tüketildiğinde zararlı etkilerinin olabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Yeşilkaya, 2008; Brasil et al. 2009; Ekinci, 2009; Patisaul ve Jefferson, 2010; El din et al. 2011; Modaresi et al. 2011). Soya fasulyesi ve diğer soya ürünleri ile alınan izoflavonlar vücutta uterus, ovaryum, vajina, testis, prostat ve prostat sıvısı, karaciğer, ince bağırsak, sekum, plazma gibi doku ve organlarda diğer periferik organlardan daha yüksek miktarlarda birikim özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu organlar toksisitenin potansiyel birer hedefi olmaktadır (Akdemir, 2008; Ekinci, 2009). Ayrıca işlenmiş gıdalara eklenen soyanın endokrin sistem üzerinde de olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Patisaul ve Jefferson, 2010).

Soyanın tüketim süresinin de alınan miktar kadar önemli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Grant et al. 1995). Farklı dozlarda soya fasulyesi, barbunya fasulyesi, börülce içeren diyet 700 gün boyunca sıçanlara uygulanmış, organ ve vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde tüm baklagil temelli diyetler ilk 250 gün boyunca büyüme oranlarını ve yem dönüşüm verimliliğini azaltırken, 250 gün sonra sıçanlarda ağırlık artışının kontrol grubuna benzer sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Grant et al. 1995).

Soya ve soya içeren gıdaların tüketimi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda sağlıklı ve güvenilir dozlarda alınması Food and Drug Administration (Gıda ve ilaç İdaresi), The American Heart Association (Amerikan Kalp Derneği) ve diğer sağlık organizasyonları tarafından tavsiye edilmektedir (Hasler, 2004). Sağlıklı yetişkin bir bireyin ideal bir diyetle günlük yaklaşık 10-25 g soya proteini tüketmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Tüketilen soya miktarına göre yarar zarar ilişkisi Hilakivi-Clarke tarafından yapılan bir çalışmada belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre gebelikte uterusun genisteine maruz kalması sonucu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağımlı olarak göğüs tümörü insidansının arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle gebelikte soya alımından kaçınılması gerektiği belirtilmiştir. Pediatri grubunda ise izoflavonların en iyi kaynağı olarak gösterilen, ihtiyaç duyulan günlük soya miktarı yaşamın ilk haftalarında 24,8 mg, 4 aydan 1 yaşına kadar da 41,0 mg'a kadar artabileceği belirtilmiştir. Sonuç olarak soya alımının, infantlarda da güvenli ve etkili doz alımı ile normal gelişim ve büyüme için alternatif olacağı belirtilmiştir (Hasler, 2004).

Fitoöstrojenlerin, infant diyeti üzerinde etkileri araştırılmış ve yüksek oranda soya tüketimine maruz kalan infantlarda bağırsak fonksiyonlarında (Setchell et al. 1998) ve sperm sayısında azalma (Lee et al. 2004) gibi olumsuz etkiler olacağı belirtilmiştir.

Aydın (2007), tarafından erkek köpeklerde 13 hafta boyunca oral yolla 150 mg/kg/gün dozda verilen genisteinin testis, epididimis, prostat büyüklüklerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Dişi köpeklerde ise 500 mg/kg/gün olarak uygulanan dozun, 4-13. haftalarda uterus ağırlığında artışa neden olduğu belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada farelere doğumdan sonraki 21. günden itibaren farklı dozlarda genistein ve daidzein içeren fitoöstrojen diyeti uygulanmıştır. Yüksek doz fitoöstrojen uygulaması nedeniyle ovulasyonla eş zamanlı olması beklenen geç sekretuar evrenin erken oluşması sonucu fertilitenin etkilenebileceği düşünülmüştür (Abbasoğlu, 2010). Soya ve soya izoflavonları üzerinde pek çok çalışma yapılmış olmasına karşın bitkinin üreme sistemine ve özellikle de dişi üreme sistemine olan etkilerine yönelik çalışmalar yetersizdir.

Çalışmamızın amacı, soya fasulyesinin üreme organları üzerinde etkilerini modern bir metot olan stereolojik yöntemler kullanarak değerlendirmektir. Soyanın dişi genital sistemi üzerinde etkilerini araştıran çalışma sayısının azlığı ve stereolojik olarak yeni bir yöntem olan optik disektör yönteminin çalışmamızda kullanılması bu konuda yapılacak diğer çalışmalara ışık tutması açısından oldukça önemlidir.

1.1. Soya (*Glycine max* L.)

1.1.1. Soya Bitkisinin Özellikleri

Uzak Dogru'nun en eski tarım ürünlerinden birisi olan soya fasulyesinin Anavatanı Çin'dir. *Glycine max* sistematik ismi İsveçli botanikçi Later Carl von Linnaeus tarafından verilmiştir. "*Glycine*" Latince'de "tatlı" anlamına gelmekte ve baklagillerin tüm yer fıstığı türleri için kullanılmaktadır. "*max*" kelimesi ise "geniş" anlamındadır ve soya bitkisinde yer alan geniş nodullardan ileri gelmektedir (KeShun, 1997).

Soya bitki proteini ve gıda bütünleyicisi olarak gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Soyanın protein içeriğinin yüksek olması nedeniyle, bu kuçuk ve eski fasulye "sarı mucevher", "buçuk hazine", "doganın mucize proteini" gibi isimler almıştır. Günümüzde ise soya duñyadaki acılık sorununa bir çare ve geleceğin proteini olarak görülmektedir (KeShun, 1997). Bileşimindeki izoflavonların 17 β -östradiol gibi östrojenik sterollere yapıca benzemesi ve insan vücudunda doğal östrojen gibi davranmaları nedeniyle bu bileşikler fitoöstrojen olarak adlandırılmaktadır (Yıldırım ve Tokgözoğlu, 2001; Albert et al. 2002; Başer, 2002; Jefferson, 2010; Ponnusha, 2011; Jefferson et al. 2012; Ünsal ve Sarıyar, 2008).

1.1.2. Soya ve Soyalı Ürünlerin Farmakolojik Etkileri

Leguminosae familyasına ait soya fasulyesinin fitokimyasalları: izoflavonlar, fitosteroller, proteaz inhibitörleri, inozitol hekzafosfat ve saponinlerdir. Bitki fenoliklerinin en önemli bileşenlerinden biri olan izoflavonların antibakteriyel, antiviral, antifungal etkileri oldukça güçlüdür. Aydın tarafından yapılan bir çalışmada, soya ve soyalı ürünlerin en aktif biyolojik izoflavonları olan genistein ve daidzeinin *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı antibakteriyel etkinlik gösterdiği, antibakteriyel aktivite yönünden ise genisteinin daidzeine göre daha etkin olduğu belirlenmiştir (Aydın, 2007).

Genisteinin β -D glikozit formu, soya ürünlerinin izoflavon içeriğinin (%55-65 oranında) büyük kısmını oluştururken, %30-35'ini daidzein, %10'unu da glisit oluşturur (Jefferson et al. 2012). Soyadaki genistein, fitoöstrojenler içinde en yüksek östrojenik etkiyi gösterir (Cederroth, 2009; Jefferson et al. 2012). Endojen östrojenlere yapısal benzerliği nedeniyle genistein, α ve β östrojen reseptörlerine kolay bağlanabilme özelliğine sahiptir (Aydın, 2007).

1.1.3. Soyanın İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Olumlu ve Olumsuz Etkileri

1.1.3.1. Soyanın İnsan Sağlığı Üzerine Olumlu Etkileri

Soya fasulyesi son derece besleyici, yüksek protein içeriği, aminoasit dengesi, kolay sindirilebilir olması, üretiminin kolay olması nedeniyle insan ve hayvan sağlığında oldukça önemli bir yere sahip bir besin ögesidir. Bu nedenle günümüzde soyaya olan eğilim giderek artmaktadır (Anaç, 2003).

Soya fasulyesinden elde edilen 453 gramlık soya ununda 31 yumurtanın, 6 büyük şişe sütün, 900 gramlık kemiksiz etin ihtiva ettiği kadar protein bulunduğu laboratuvar deneyleriyle ispatlanmıştır (Ünsal ve Sarıyar, 2008).

Soya fasulyesinin kolesterolü düşürdüğü, meme, uterus ve prostat kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu (Setchell ve Cassidy, 1999; W.lu et al. 2000; Stark ve Madar, 2002; Jung et al. 2004; İnanç, 2005; Okwu et al. 2007; Hoşgün, 2008), osteoporozu ve osteopeniyi önlediği, kardiyovasküler hastalıkların insidansını ve trombosit agregasyonunu azalttığı (Arjmandı et al. 1996; Yıldırım ve Tokgözoğlu, 2001; Kamiloğlu ve ark. 2002; Büyüktuncer ve Başaran, 2005; Okwu et al. 2007; Xiao, 2008; Byun ve Lee, 2010; Sosic et al. 2011), hafıza güçlendirici etkiye sahip olduğu, menopoz döneminde hormonal denge, diyabet ve böbrek yetmezliğinde olumlu etkilerinin bulunduğu (Tham et al. 1998; Albert et al. 2002; Naciff et al. 2002; Şahingöz ve Arlı, 2002; Anaç, 2003; Kim et al. 2006; Aydın, 2007; Ünsal ve Sarıyar, 2008; Byun ve Lee, 2010; Modaresi et al. 2011; Ponnusha et al. 2011) kadınlarda ani ateş basması, uykusuzluk, migren, eklem ağrıları gibi semptomların tedavisinde kullanılabildiği (Başer, 2002) pek çok çalışmada gösterilmiştir. Soya ve ürünleri hormon replasman tedavisi (HRT) ile ilişkili risk olmaksızın doğal bir alternatif ürün olarak piyasada yer almaktadır (Allred et al. 2001). Soya izoflavonu olan genistein çeşitli kanserlerin tedavisinde veya önlenmesinde potansiyel kemopreventif/ terapötik bir ajandır (Santell et al. 1997). Steroid yapıda olmayan bu bileşikler östrojenik, enzim faaliyetlerini durdurucu ve antioksidan etkiye sahiptir (Yıldırım ve Tokgözoğlu, 2001; Başer, 2002; Sosic et al. 2011).

Soyanın en önemli özelliklerinden biri de antioksidan etkiye sahip olmasıdır (Wei et al. 1995; Burak ve Çimen, 1999; Albert et al. 2002; İnanç, 2005; Kim et al. 2006; Aydın, 2007). Antioksidan etkinliği sayesinde canlı dokulardaki oksidatif stresi önler. Soya bitki fenolikleri antibakteriyel, antiviral, antifungal etkilere de sahiptir (Burak ve Çimen, 1999; Aydın, 2007).

Bazı çalışmalar soya ve izoflavonlarının vücut ağırlığı dengesini etkilediğini ortaya koymuştur. Soyanın, hızla artan obezite sorununda olumlu etkilerinin olduğu, kilo düşürücü etkilerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durum besin değeri yüksek olan soyanın daha stratejik bir öneme sahip olmasına neden olmaktadır (Sosic et al. 2011).

1.1.3.2. Soyanın Hayvan Sağlığı Üzerine Olumlu Etkileri

Soya, dengeli aminoasit, protein, enerji, temel yağ asitleri, vitamin ve mineraller açısından hayvansal yem olarak besin değeri kuvvetli, doğal bir kaynaktır. Yüksek yararlanabilirlik oranı ve arzu edilen yağ asidi bileşiminden dolayı tam yağlı soya, tüm hayvanların beslenmesi için oldukça gerekli ve sindirilebilirliği fevkalade olan bir besin kaynağıdır (Olgun ve ark. 2008). Soya, sadece dane veya küspesi için değil aynı zamanda kaba yem olarak da ruminantlar için kullanılan önemli bir yem hammaddesidir. Laktasyondaki süt inekleri ile büyüme dönemindeki düvelere soya kuru otu veya yonca verildiğinde benzer performans göstermektedirler. Soya silajının, yonca silajıyla karşılaştırıldığı bir araştırmada, soya silajının süt ineklerinin performansı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Araştırmada soya silajının süt kompozisyonlarından süt yağ düzeyine olan etkisinin önemli olduğu, soya silajının süt yağ düzeyini artırdığı; soya silajıyla beslenen ineklerin yonca silajıyla beslenen ineklerden daha az kuru madde, ham protein, organik madde tükettiği tespit edilmiştir (Ayaşan, 2011).

Soya küspesi diğer küspelerden daha çabuk ve daha iyi bir şekilde hayvana yararlı olmaktadır. Soya ile beslenen hayvanlarda canlı ağırlık artışının belirgin düzeyde arttığı ve süt veriminin iyi olduğu da gözlenmiştir (Olgun ve ark. 2008).

Büyükbaş, küçükbaş, kanatlı, su ürünlerinde yüksek protein ve yağ içeriği, kolay sindirilebilir olması nedeni ile en çok tercih edilen yem hammaddesidir. Tam yağlı soya hayvan beslenmesinde devrim sayılabilecek ölçüde en iyi besin kombinasyonlarını beraberinde getirmektedir (Anaç, 2003). Soya küspesi dünya çapında çiftlik ve kümes hayvanlarının ana protein kaynağıdır (Yılmaz ve Efe, 1998). Yapılan hayvan çalışmalarında, izoflavonların uterus kalınlığını arttırdığı tespit edilirken, izoflavon tüketiminin yüksek olduğu bölgelerde yaşayan erkeklerde prostat kanseri görülme oranının düşük olduğu belirlenmiştir. İzoflavonoidlerin prostat kanseri hücrelerindeki büyümeyi inhibe ettiği saptanmıştır (İnanç ve Tuna, 2005). Yapılan başka bir çalışmada soya izoflavonunun ratlarda total kolesterolü %12 oranında düşürdüğü gözlenmiştir (Öcal, 2007).

1.1.3.3. Soyanın İnsan Sağlığı Üzerine Olumsuz Etkileri

Soyanın çeşitli yan etkilerinin de olduğu çeşitli araştırmalarda belirlenmiştir (Modaresi et al. 2011). Kadınlarda soya tüketimi ile uterus ve ovaryum morfolojisi ve görevleri arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (Brasil et al. 2009; Modaresi et al. 2011). Endokrin sistemi bozan kimyasallar (Endocrine Disrupting Chemicals-EDCs) olarak tanımlanan endokrin bozucular sınıfında yer alan ve soyada bulunan genistein, zayıf bir östrojenik maddedir. Neonatal ve yetişkin dönem boyunca soya veya soyalı gıda tüketenlerde anormal östrus siklusuna ve uterotopik etkilere neden olduğu rapor edilmiştir (Brasil et al. 2009). Soyanın fertilitedeki rolü ise tartışmalıdır. Fitoöstrojenlerin fertiliteye yararlı ya da zararlı olup olmadığı henüz netleşmemiştir. Menstrual siklus uzunluğunu arttırdığını gösteren çok sayıda çalışma dışı fertilitesinde soyanın rolüne dikkat çekmiş ve gerçekten çok büyük bir ilgi odağı haline gelmiştir (Büyüktuncer ve Başaran, 2005; Eldin et al. 2011).

Erkeklerde ise testis ağırlığında, sperm sayısında, testesteron hormon seviyesinde azalma olduğu belirtilmiştir. Soyanın erkeklerde, infertiliteye neden olduğu ve spermatogenezise olumsuz etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Eldin et al. 2011; Modaresi et al. 2011). Yapılan bir çalışmada 2 g/kg genistein ile desteklenmiş soya bazlı diyet verilen farelerde üreme performansında azalma olduğu gözlenmiştir (Santell et al. 1997).

Üreme sisteminde bazı patolojilere sebep olmakla birlikte, tiroid peroksidaz enzimini inhibe ederek tiroid patolojilerine neden olmaktadır (Yeşilkaya, 2008).

Bebek mamalarında da yaygın bir şekilde kullanım alanı bulan soya proteini mama içeriğinin yaklaşık %25'inde bulunmaktadır. Çocuklar için yararlı olup olmadığı, ek olarak soya diyetinin bebekler için güvenilirliği oldukça tartışmalıdır (Chen ve Rogan, 2004; Patisaul ve Jefferson, 2010). Soya maması ile beslenen ve izoflavonlara maruz kalan bebeklerde uzun vadeli kullanımında yan etkilerin olduğu belirlenmiştir (Sobic et al. 2011). Ayrıca soya ve soya içeren mama ile beslenmenin galaktozemiye neden olduğu da başka bir çalışmada belirlenmiştir (Modaresi et al. 2011).

1.1.3.4. Soyanın Hayvan Sağlığı Üzerine Olumsuz Etkileri

İzoflavonlar, bitkilerde genelde bağlı halde, glikozitleri halinde (genistein, genistin gibi) bulunur, hekzanla yağı alınmış soya ununda % 0,1 oranında genistein bulunabilmektedir. Soya fasulyesinin 1 kg'ının östrojenik etkinliği 6 mg Dietilstilbestrol'inkine (DES) eşittir. Uterusta büyümeye yol açma bakımından genistein, DES den 100000 kez daha zayıf etkilidir. Soyanın intrinsik etkinliğin bu ölçüde zayıf olması ise bir şans olarak görülmektedir. Fakat inek ve koyunların bu maddeleri uzun süre yemesi veya otlaması durumunda kısırılıktan yavru atmaya ve verim azalmasına kadar giden problemler oluşturmaktadır (Kaya ve Yavuz, 1993).

Yapılan bir çalışmada hematolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişikliklerin toksikolojik yönden önem taşımadığı, reproduktif sistemle ilgisinin genisteinin östrojenik aktivitesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Aydın, 2007).

Fitoöstrojenlerin fazla tüketilmesi durumunda, gonodotropin salınımının feedback sistemine karışabileceği ve hayvanlarda fertilitate problemlerine neden olabileceği de belirlenmiştir (Kamiloğlu ve ark. 2002). Fitoöstrojenler, çeşitli hayvan türlerinde uterotopik akiviteye neden olmakta ve geçici ya da kalıcı infertilite ile sonuçlanmaktadır (Santell et al. 1997). Son yıllarda soya fasulyesinde bulunan fitoöstrojenlerin ve bunların aktif metabolitlerinin ineklerde doğurganlığı azalttığı belirlenmiştir. Fazla miktarda soya verilen ineklerde erken embriyo ölümleri de kaçınılmaz olduğu belirtilmektedir (Piotrowska et al. 2006).

Doğan ve Bircan tarafından yapılan bir çalışmada, balık yeminde bulunan fitoöstrojenlerin, balıklarda östrojenik etkiye sebep olduğu bunun yanında düşük büyüme oranına yol açtığı görülmüştür (Doğan ve Bircan, 2009).

Carnivor diyetlerinde ana protein kaynağı olarak kullanılan soyanın içindeki hormonal bileşiklerine bağlı olarak reproduktif sisteme zarar verebileceği bildirilmiştir. Soya küspesinin üretimi sırasındaki aşırı sıcaklık uygulaması, allerjenik faktörler, üreaz bileşiklerini vb. kapsayan antinutrisyonel faktörlerin oluşmasına neden olmaktadır (Aydın, 2007).

Soya, kalsiyum absorpsiyonunu engelleyen fitin yönünden zengindir. Bu durum kalsiyumun diyetle fazla oranda katılması sonucu anksiyeteye neden olmaktadır. Kedi ve köpeklerde, son yıllarda artan hipertiroidizm olgularıyla mamalarda yüksek düzeyde saptanan soya fitoöstrojenlerinin (özellikle genistein) bu etkiden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Aydın, 2007).

Ratlarda, fitoöstrojenler hipofizer LH sekresyonunu ve aktivitesini engeller. Fitoöstrojenlerin, ovaryen fonksiyon hastalıklarına yol açtığı, östrus siklusunu ve ovulasyonu bozabileceği belirtilmiştir (Piotrowska et al. 2006).

1.1.4. Soya ve Reprodüktif Sistem

Östrojenik aktivite ilk keşfedildiğinden beri insanlar ve hayvanlar üzerinde, genisteinin uterus ve ovaryum fonksiyonları üzerine etkilerinin değerlendirildiğini gösteren bir dizi çalışma yapılmıştır (Santell et al. 1997; Diel et al. 2001; Albert et al. 2002; Naciff et al. 2002; Jefferson, 2010).

Soya tüketiminin üreme organları ile ilişkisi değerlendirildiğinde, soyanın miktarına bağlı olarak üreme organlarının fonksiyonunun değiştiği belirtilmiştir. Soya tüketimi fazla olan Asyalı kadınlarda luteal östrojen seviyesinin baskılandığı literatürlerde kayıtlıdır (Jefferson, 2010). Soya proteinin aşırı tüketiminin (100 mg soya izoflavon/gün) ratlarda ovaryum fonksiyonlarının azalmasına ve doğurganlık oranının düşmesine, hayvanların doğal döngüselliğini engelleyerek genellikle anovulasyona neden olduğu, hipotalamus üzerinde negatif etki ile ovulasyonu baskıladığı ve bu etkinin doğum kontrol haplarına benzer bir etki yarattığı belirlenmiştir. Düşük seviyede soya tüketiminin ovaryumlar üzerine zararlı etkiler oluşturmadığı ve erişkin kadınlarda doğurganlığa etkisinin ya çok az olacağı ya da hiçbir etkisinin olmayacağı belirtilmiştir. Postmenopozal kadınlarda yapılan çalışmada 50 mg izoflavon alımının serum hormon seviyelerinde hiçbir farka neden olmadığı belirlenmiştir (Albert ve ark. 2002; Potocka ve ark. 2005; Gorski ve ark. 2006; Jefferson, 2010).

2008 yılında SUNY Downstate Medical Center tarafından sunulan klinik vaka raporunda kadın üreme sağlığını bozabilen 14 yaşından beri yüksek dozda soya alımının sekonder infertiliteye neden olduğu, soya tüketimi azaltıldığında ise infertilitenin ortadan kalktığı kaydedilmiştir (Jefferson, 2010).

Naciff ve ark. (2002), tarafından yapılan bir çalışmada, neonatal dönemden itibaren dişi ratlara verilen soya yetişkinlikte değerlendirildiğinde, daha az sayıda implantasyon bölgesi, üreme görevlerinde azalma, her doğumda canlı doğum sayısında azalma, ovaryum kisti, endometrial hiperplazi geliştiği, soya izoflavonlarının dişi menstrual siklusunu etkileyebileceği, foliküler fazı uzatabileceği belirtilmiştir.

Sosic ve ark. (2011), tarafından yapılan bir çalışmada, hormon düzeyleri üzerine izoflavonların hiçbir etkisinin olmadığını belirtmiştir. Oysa Gorski ve ark. (2006), tarafından yapılan çalışmada, soya izoflavonlarının, hormonların dolaşımdaki seviyelerini düşürdüğü ve gonadotropin düzeylerini azalttığı belirlenmiştir. Fitoöstrojen diyeti doğurganlığın azalmasına neden olmaktadır. Bununla ilgili ilk çalışma Avusturalya'da 1940 yılında koyunlar üzerinde yapılmıştır. Koyunlarda spontan abortus ve üreme anomalilerinin yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. (Sosic et al. 2011).

Bahr ve ark. (2005), tarafından yapılan bir çalışmada, 3 aylık overektomik ratlara 12 hafta boyunca izoflavon, soya proteini ya da kazein uygulanmış ve overektomik rat gruplarında vücut ağırlığının arttığı, uterus ağırlığının azaldığı, izoflavon diyeti alımının overektomize ratlarda üreme sisteminde yararlı etkilerinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Lee ve ark. (2004), tarafından yapılan çalışmada, puberte boyunca genistein verilmiş erkek farelerin üreme sistemine etkilerini inceledikleri bir çalışmada, genisteinin (2,5 mg/kg/gün ve 5 mg/kg/gün), sperm sayısında hafif bir azalmaya, sperm hareketi kalitesinde ise artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Soya gibi östrojenik kimyasallara erken yaşta maruz kalma üreme fonksiyonlarında anomaliye neden olurken üreme organı ağırlıkları da azalmıştır.

Diel ve ark. (2001), tarafından yapılan bir çalışmada, genisteinin 25, 50, 100 mg/kg oranları ratlarda uterus ve vajinal epitelyum ıslak ağırlıklarının doza bağlı olarak artış gösterdiği, östrojen agonisti olarak görev yaptığı belirlenmiştir.

Naciff ve ark. (2002), 17 α -etil estradiol, bisfenol ve genisteinin dişi ratların üreme sisteminde etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, soyanın kemik, karaciğer, beyin, kardiyovasküler sistem, immun sistem ve üreme sistemin de etkili olabileceğini östrojenik aktiviteye sahip bu bileşiklerin fetal gelişim boyunca üreme organlarının gelişimini değiştirdiği ve bu durumun doğumdan sonra ya da yetişkinlik boyunca sürdüğü belirtilmiştir. Rimoldi ve ark. (2007), tarafından yapılan bir çalışmada, ovarektomize sıçanlara 3 ay süre ile iki doz genistein ve 17 β östrodiol verilmiş ve etkileri karşılaştırılmıştır. Yüksek doz verilen sıçanlarda uterin ağırlıkta artış, vajinada ise hiperplastik epitelyum ve atrofik yapıların geliştiği gözlenmiştir.

Erlandsson ve ark. (2005), tarafından yapılan çalışmada, hem ovarektomi yapılmış hem de plasebo opere edilmiş farelerde genisteinin, estradiol verilen grupta uterus ağırlığını önemli oranda artırdığı, sadece overektomi yapılan kontrol grubunda ise uterus ağırlığını azalttığı belirtilmiştir.

1.2. Ovaryum

1.2.1. Ovaryum Anatomisi

Dişi hayvanlarda bulunan ovaryum, canlıda biri sağ biri sol tarafta bulunan bir çift organdır. Ovaryum parlak beyaz, beyaz ya da grimtrak renktedir. Ağırlığı yaşa, fizyolojik duruma bağlı olarak değişkenlik gösterir. Ovaryumun facies medialis, facies lateralis olmak üzere iki yüzü, margo liber, margo mesovaricus olmak üzere iki kenarı ve extremitas tubaria ile extremitas uterina olmak üzere iki ucu vardır (Dursun, 2008).

Yetişkin ratlarda ovaryum foliküllerle dolu bir yapıdadır ve böbreklerin cranial kısmında yer alırlar. Helezonik yapıdaki ovidukt, ovaryumu bikornual yapıdaki uterusu bağlar (Mülazımoğlu, 2011).

Her ovulasyondan sonra yumurtanın yerinde corpus luteum oluşur. Bu durum da bütün hayvanlarda ovaryumlara kabartılı bir görünüm verir (Dursun, 2008).

Buluğ öncesi dönemde ovaryumlar, küp biçimi hücrelerden oluşan bir tabaka ile örtülüdür. Bunun altında bütün organları çevreleyen lifli bir kapsül olan albuginea kılıfı yer almaktadır (Dursun, 2008; Kaplan Parıltı, 2011).

Üreme, ovaryumlardaki ovumun gelişimi ile başlar. Her seksüel siklusun ortasında tek bir yumurta, bir ovaryum folikülünden abdominal boşluğa atılır. Daha sonra bu yumurta fallop tüplerinden uterusu geçer. Eğer bir sperm tarafından döllenirse, uterusu implante olarak, bir fetüs ve bir plasentayla fetal membranlar gelişir (Kaplan Parıltı, 2011).

1.2.2. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumların yüzeyleri germinal epitel olarak bilinen basit veya kübik epitelle kaplıdır. Germinal epitelin altında, ovaryuma beyazımsı rengini veren tunica albuginea olarak adlandırılan bir bağ dokusu katmanı bulunur. Tunica albugineanın altında oositleri içeren ovaryum foliküllerinin bol miktarda bulunduğu kortikal bölge yer alır. Foliküller, kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içinde gömülüdür. Stroma fibroblastlar içerir ve bunlar hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıtlar verir. Ovaryumun en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medullar bölgedir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (Kaplan Parıltı, 2011).

1.2.2.1. Foliküler Gelişim

Bir ovaryum folikülü, özel bir epitelyum hücre ile çevrili oositten oluşan bir yapıdır. Folikül gelişimi sırasında, özel stroma hücreleri tarafından çevrelenmiş epitelyum hücreleri ve epitelyum hücreleri arasında gelişen sıvı ile dolu bir boşluktan oluşur. (Dellmann ve Eurell, 1998).

Foliküler sınıflama aşağıda belirtildiği gibi yapılmaktadır:

a) Primordial Foliküller: Primordial foliküller, basit yassı (squamo) granuloza hücreleri tarafından çevrelenmiş bir primer oosit olarak tanımlanır (Myers et al. 2004; Dellmann ve Eurell, 1998; Kuyucu 2011). Ovaryum rezervini temsil eden primordial foliküller tek katlı yassı pre-granuloza hücreleri ile çevrili diploten oositten oluşur. İnsanda primordial folikül gelişimi en erken 4. ayda başlar ve en geç postnatal 6. ayda biter (Öktem ve Urman, 2011).

Sıçanlarda yenidoğan ovaryumunda 400.000 kadar folikül bulunur. Folikül miktarı hayat boyunca aşamalı olarak azalır. Menopozdan hemen sonra tamamen yok olur. Sıçan ovaryumunda görülen foliküllerin çoğunluğu yaklaşık 20 µm çapa sahip olan primordial foliküllerdir ve erken postnatal dönemde gelişirler. Primordial foliküller, foliküller içerisinde en küçük ve en fazla olanlarıdır. Bunlar ovaryumların periferinde yer alırlar (Kuyucu, 2011). Tunica albugineanın hemen altında kalın bir tabaka oluştururlar. Bazı squamo granuloza hücreleri ile ağırlıklı olarak kübik granuloza hücrelerine sahip foliküller birincil olarak sınıflandırılır (Myers et al. 2004). Primordial foliküldeki oosit 25µm çapında küre şeklinde bir hücredir (Yoldan ve Yüce, 2005).

b) Primer Foliküller: Tek katlı folikül hücresi ile çevrelenmiş oosite primer folikül denir. Foliküler hücreler çoğalıp primer oosit etrafında birkaç tabaka oluşturunca folikül çok katlı primer folikül adını alır. Foliküler hücreler granuloza hücreleri olarak adlandırılır (Myers et al. 2004). Primer oositin çapı artarak 100-150 µm'ye çıkar. Nükleus büyür. Bazı golgi kompleksleri hücreden dışarı çıkar, endoplazmik retikulum ribozomdan zengin hale gelir, mitokondri sayısında artış olur. Foliküler hücreler kübik hale gelir. Bu evre sırasında zona pellusida oluşur ve oositi onu

çevreleyen foliküler hücrelerden ayırır. Stromal hücreler çok katlı primer folikül etrafında organize olarak damardan zengin bir hücresel tabaka olan teka interna ve bağ dokusundan zengin teka eksternayı oluşturur (Bacha, 1990; Junqueira et al. 1993; Yoldan ve Yüce, 2005).

c) Sekonder Foliküller: Görünür antrum tabakası olmayan birden fazla kübik granuloza hücresi ile çevrelenmiş foliküllere sekonder folikül denir (Myers et al. 2004).

d) Erken Antral Foliküller: Antral bir folikül iken gelişmekte olan bir antral boşluğu olan foliküllere denir (Myers et al. 2004).

e) Açıkça belirlenmiş bir antral boşluk (Myers et al. 2004).

f) Preovulator foliküller (Ovulasyon öncesi): Folikül türlerinin en büyüğüdür ve bir kümülüs granuloza hücre tabakası ile tanımlanır (Myers et al. 2004).

g) Sağlıklı folikülün zona pellucidası (ZP) ve atretik folikülün son evresini temsil eden zona pellucidanın kalıntısı (ZPRs) (Myers et al. 2004).

h) Zona pellucidanın, komşu kan damarlarından kolayca ayrılabilen yüksek büyütmesi (Myers et al. 2004). Mevcut araştırmada Myers ve ark (2004)'nın folikül sınıflaması dikkate alındı.

1.2.2.2. Corpus luteum

Folikülün çatlaması ve ovumun atılmasından önce granuloza hücrelerinin büyüklüğü artar ve sarı pigmentin birikimi ile karakteristik bir hal alırlar. Lutein olarak bilinen bu pigment luteinizasyon sürecine girmekte ve corpus luteum olarak adlandırılmaktadır (Akçabay, 2010). Corpus luteum, oositini atan folikülün son evresidir. Bu evre Luteinize hormon (LH) reseptörlerini içerir ve uyarılması corpus

luteumun ana steroidi olan progesteron'un sentezini artırır. Gebelik gerçekleştiğinde corpus luteum devam eder. Ovulasyonu baskılamak ve endometriumu implantasyona hazırlamak üzere progesteronun yüksek seviyede kalmasını sağlar. Gebelik olmazsa corpus luteum geriler ve dejenere olur. Skar dokusu olan corpus albicans halini alır (Kaplan Parıltı, 2011).

1.2.3. Ovaryum fizyolojisi

Ovaryumlar, korteks ve medulla olmak üzere iki bölümden oluşur. Korteks bölümünü germinal hücreler, çeşitli evrelerdeki foliküller, teka hücreleri, granüloza hücreleri ve çeşitli evrelerdeki corpus luteum hücreleri oluşturur. Medulla ise teka hücreleri, bağ dokusu kan damarları ve sinirlerden oluşur (Çölçimen, 2013).

Ovaryumların korteksi oositlerin depolanması, beslenmesi, atılması ve ovulasyon sonrası kalan corpus luteumun devamı ve eritilmesi ile ilgili fiziksel ve kimyasal gereksinimleri içerir (Çölçimen, 2013).

1.2.4. Ovaryumun Endokrin Fonksiyonları

Ovaryumların endokrin fonksiyonları foliküldeki teka ve granüloza hücreleri tarafından yerine getirilir. Bunlar LH ve Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) tarafından kontrol edilirler. Başlıca ovaryum hormonları ise progesteron ve östrojenlerden östradiol ve östrondur (Kaplan Parıltı, 2011; Banks, 1993).

Oosit büyümesinin en hızlı olduğu dönem foliküler büyümenin birinci evresidir.

Baskın olan folikül, foliküler büyümenin en son aşamasına ulaşabilir ve ovulasyonu gerçekleştirebilir buna olgun folikül ya da graff folikül denir (Junqueira ve Carneiro, 2006). Primordial folikülden olgun folikül oluşuncaya kadar tüm büyüme süreci yaklaşık 90 gün sürer (Junqueira ve Carneiro, 2006).

1.3. Rat (*Rattus Norvegicus*)

Ratlar burun, dudaklar, kulaklar, ayakaltı, avuç içleri hariç vücudu tipik memeli tüyleri ile kaplı rodentlerdir. Erkek ratlarda büyüme 2 yaşına kadar devam edebilirken, dişi ratlar hayatlarının ilk birkaç ayında olgun hale gelirler.

Ratlarda doğum ağırlığı yaklaşık 6 g, pubertaya ulaşma dönemi ise 8-10 haftadır. Dişi ratlarda pubertanın indikatörü vajinal açıklık ve ilk proöstrusdur. Vajinal açıklık ilk defa 33-42. günlerde, vücut ağırlığı ise yaklaşık 100 gram iken oluşur. Düzenli östrus siklusları yaklaşık olarak vajinal açıklık başlangıcından itibaren bir hafta sonra meydana gelir (Mülazımoğlu, 2011).

Ovaryum tek sıralı kübik ya da prizmatik epitel ile örtülüdür ve bu epitel *bursa ovarica* tek katlı yassı epiteline hilusta karışarak kaybolur. Rat ovaryum foliküllerinin ortalama büyüklükleri, 25-30 μm (primordial), 30-400 μm (büyüme aşamaları), 650-700 μm (Graff folikülü) olarak; oositlerinin ise 18-20 μm (primordial), 40-60 μm (primordial folikülden graff folikül oluşumuna kadar olan büyüme aşamaları) ve 80-90 μm (Graff folikülü) olduğu bildirilmektedir. Ovulasyon östrus esnasında şekillenmektedir (Bayraktaroğlu, 2012).

1.4. Stereoloji

1.4.1. Stereoloji Tanımı

Stereoloji, üç boyutlu yapıların iki boyutlu kesitlerinden elde edilen verilere dayanarak, bu yapıların gerçekteki üç boyutlu özellikleri ile ilgili bilgiler edinilmesini sağlayan bilim dalıdır (Keleş, 2007; Çolakoğlu, 2006).

Yapılan mikroskobik çalışmaların başlangıçtan günümüze kadar, yapılar içindeki tanecik sayısını bulmak için birçok yöntem kullanılmıştır. Her birinin hata kaynaklarına sahip olması nedeni ile çok fazla yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerin hatalarını düzeltmek için de yeni metotlar geliştirilmiştir. Sonuç olarak stereoloji, güvenilirliği açısından en çok dikkat çeken ve sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Ünal ve ark. 2002; Kaplan Parıttı, 2011).

Stereolojik metotlar kurallarına uygun bir şekilde uygulandığında, örnekleme sayısı arttırıldıkça gerçek değere daha fazla ihtimalle yaklaşmak mümkün olacaktır. Stereoloji, etkin (daha kısa sürede daha az hatalı iş yapmayı sağlayan) ve tarafsız (gerçek değerden sistematik bir sapmaya sebep olmayan) metotları ile problemleri ortadan kaldırmak üzere geliştirilmiş bir bilim dalıdır. Stereolojik metotlar tarafsızdır (Çolakoğlu, 2006; Brasil et al. 2009).

Etkinlik kısa sürede, daha az değişkenlik gösteren verilerin elde edilmesi anlamına gelir (Odacı ve ark. 2005). Stereolojik metotların en önemli özelliği, iş yükünü azaltarak istenilen doğrulukta sonuçların daha kısa sürede elde edilmesini sağlamaktır (Odacı ve ark. 2005; Çolakoğlu, 2006).

Bir organdaki toplam hücre sayısını belirlemek için o organın tümünü kesip, kesitlerdeki hücreleri tek tek saymak çoğu yapı veya organ için imkansız ve çok zaman alıcıdır. Bu nedenle örnekler üzerinde en uygun yöntemle bu değerleri tespit etmek çok daha akılcı ve pratiktir. Örneklemenin işe karıştığı bir ölçüm yönteminde, doğru sonuçların elde edilebilmesi için uygulamanın tarafsız olması gerekir. Eğer bir yöntem uygulaması esnasında bir taraflılık gösteriyorsa, sonuçlar çoğu zaman gerçek değerden farklı olabilir (Odacı ve ark. 2005). Örnekleme ve ölçümler sonucu elde

edilen veriler gerçek değerlerden belli farklılık gösterir. Fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak kabul edilebilir değişkenlik sınırları içerisinde tutulduğunda, elde edilen hesaplama değeri de güvenilir bir sonuç olarak kabul edilir (Odacı ve ark, 2005; Çolakoğlu 2006; Karacan, 2008).

Stereolojik metotların temelini Sistematik Rasgele Örneklem (SRÖ) stratejisi oluşturmaktadır. Bu örneklem biçiminin temel özelliği, çalışılacak olan yapıdan örnekler almanın gerekli olduğu durumlarda, yapının her noktasının eşit örneklenme şansına sahip olmasını sağlamasıdır (Keleş, 2007; Karacan, 2008).

Stereoloji özellikle morfolojik çalışmalarda tanecik sayımı ve hesaplamalarında vazgeçilmez bir konuma ulaşmış ve sayısal verilerle ilgili çalışmalarda altın standart haline gelmiştir. Sağlam matematiksel temellere ve ispatlara dayandığı için güvenilir sonuçlar elde edilmesine imkan sağlar (Çolakoğlu, 2006; Bayram, 2008).

1.4.2. Disektör

Disektör; bilinen bir “t” mesafesi ile birbirinden optik veya fiziksel olarak ayrılmış ardışık kesit düzlemlerinden oluşur. Üç boyutlu bir hacimde sayı parametresinin hesaplanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. Optik ve fiziksel disektör olmak üzere iki tipi vardır. Bu yöntemin temelleri ilk defa Cruze–Orive tarafından tanımlanmıştır. Modern plan-tabanlı stereolojik yöntemlerin ilki olarak kabul edilmektedir. Bu şekilde ilgilenilen yapının tüm bileşenlerinin tek tek değerlendirilmesine gerek kalmadan, alınan seri kesitlerle, biyolojik ortamlardaki sayısal çoklukların hesaplanmasında doğru ve tarafsız sonuçlara ulaşılabileceği gösterilmiştir (Ünal ve ark. 2002).

Disektör ilk kez 1984 yılında Sterio tarafından tanımlanmıştır. Disektörün en önemli özelliği çalışılan alanda hata kaynaklarından bağımsız bir şekilde tarafsız hesaplamayı sağlamasıdır. Disektör yöntemi ile objelerin büyüklüğü, kesitlerin alınma yönü, sayılacak olan partikül büyüklüğü gibi tanımlar tarafsız hesaplanır (Ünal ve ark. 2002).

Disektör sayımındaki temel yaklaşım, iki kesit çiftinden birinde bulunup diğerinde bulunmayan, aynı taneciğe ait izdüşümlerin sayılmasıdır. İzdüşümü örnek kesitte bulunup, gözlem kesitinde bulunmayan tanecikler sayılır. Bu tarz bir yaklaşımdaki mantık, iki kesit düzlemi arasında herhangi bir “ucu” bulunan taneciklerin “uçlarını” saymaktır. Her tanecik genelde, bir yöne doğru tek bir ileri uca sahip olduğundan, bu tip bir sayım, tanecik sayısı değerinin tarafsız olarak hesaplanmasını sağlar. Önemli olan kesitleri karşılaştırırken, aynı taneciğe veya farklı taneciklere ait olan izdüşümlerin belirgin biçimde birbirinden ayırt edilmesidir (Sterio, 1984; Ünal ve ark. 2002).

Disektör sayımı için seçilen bu kesit çiftleri üzerinde belli alanlar sınırlandırılır. Her bir kesitte, birbirlerine karşılık gelen alanların bulunması gerekir. Alanlar belirlendikten sonra, sayımların gerçekleştirilebilmesi için, uygun büyüklükteki belli bir bölgenin bir sayım çerçevesiyle sınırlandırılması, disektör sayım metodunun diğer önemli bir basamağıdır (Ünal ve ark, 2002).

1.4.2.1. Optik Disektör

Stereolojik bir metot olan optik disektör yöntemi pratik ve etkin bir yöntemdir. Yeni bir yöntem olan optik disektör yöntemi Gundersen tarafından 1986 yılında ortaya konulmuştur. Fiziksel olarak iki ayrı kesitte karşılaştırma yapma zahmetinden kurtarmıştır. Tek bir kalın kesit hacmi içinde ard arda alınan optik kesitlerden faydalanılarak yapılır. Optik disektör yönteminde alınacak kesit kalınlığı, sayılan en uzun partikülden daha büyük olmalıdır. Sayıma öncelikle kesitin üst yüzeyinden başlanır. Görüntünün ilk netleştiği yüzey kesitin üst yüzeyi, netliğin kaybolduğu yer de kesitin alt yüzeyi olarak belirlenir. İki yüzey arasındaki partiküller sayılarak kayıt altına alınır. Optik disektör yüksekliği partikül sayımının yapıldığı bölgedir (Gundersen, 1986; Bayram, 2008).

Bu yöntem, stereolojik sayım yöntemi uygulamalarını kolaylaştıran özelliklere sahiptir. Optik disektör tekniği, tek kesitte çalışmaya ve daha az kesit alınmasına olanak sağladığı için işlem hızını artırır. Partiküllerin daha detaylı görünmesini, çok yoğun yerleşimli partiküllerin kolay sayılmasını sağlayan bir yöntemdir. Kesit kalınlığını ölçmek için birinci olarak mikrokator denilen, mikroskop tablasının hareketlerini ölçerek z eksenindeki derinlik boyutunu belirleyen aletler ve ikinci olarak ise mikrovidanın kalibre edilmesi yöntemleri geliştirilmiştir. Kesitin kesilme yüzeyindeki bozukluk nedeni ile gelişebilecek sorunları ve sayılan yapıların tekrar sayılmasını önlemek için kesitin alt ve üst yüzeylerinden belli bir mesafe belirlenmesi (3-5 µm) ve bu yüzeylerde sayım yapılmaması gerekmektedir. Bu mesafelere alt ve üst güvenlik kuşağı denir. Sayım bu güvenlik kuşağı arasındaki yüksekliğinde yapılır. Bu şekilde yapılan bir sayım, o disektör hacmi içerisinde bulunan partikül sayısını verir (Kurtuluş, 2005).

1.4.3. Tarafsız Sayım Çerçevesi

Stereolojik yöntemin tarafsızlığını ve doğruluk seviyesini yükseltmek için tarafsız sayım çerçevesi belirlenir. Sayım çerçevesi, özel bir emniyet alanı oluşturur. Bu çerçeve kesişen, iki kenarı kalın ve düz, diğer iki kenarı ince ve kesikli çizgi ile çevrelenmiş kare ve dikdörtgen şeklindedir. Sayım esnasında, sol ve alt kenarlar ile bunların uzantılarına değen yapılar dikkate alınmazlar (Yasak Kenarlar). Yalnızca çerçevenin tamamen içinde olan, sağ ve üst kenarlara (serbest kenarlar) değerek kısmen çerçeve içinde olan yapılar sayılırlar. Dış kısımda kalan yapılar ise dahil edilmezler (Bayram, 2008; Korkmaz ve Tümkaya, 1997).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Araştırmanın Yapıldığı Yer

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nde ve Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.2. Deneklerin Seçimi

Bu çalışma öncesi Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (16/02/2012; AKÜHADYEK-83-12) izin alındı. Çalışmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edilen, ağırlıkları 180-220 g arasında olan 2 aylık toplam 64 adet dişi Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar deney süresince 16x30x40cm ebatında kafeslerde tutuldu. Kafeslerde altlık materyali olarak iri talaş kullanıldı. Laboratuar ortamı 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü, ısı 21 ± 2 °C ve nem oranı %50 olacak şekilde düzenlendi. Suluk olarak, sürekli kafeslerin üzerinde bulundurulan cam suluklar kullanıldı. Ratların beslenmesi için, Türk Standartları Enstitüsü (TSE) standartlarına uygun olarak yaptırılan pelet yem seçildi. Ratların yem ve suya sınırsız ulaşmaları (*ad libitum*) sağlandı. Çalışma süresince her iki günde bir kafesler düzenli olarak temizlendi, yem ve suları yenilendi. Hayvanlar kafeslere alınmadan önce ağırlıkları tartılarak istatistiksel fark olmayacak ($p=0,992$) şekilde dağılımları sağlandı ve bu sonuca göre ağırlıklarına göre kafeslere ayrıldı.

2.3. Deney Gruplarına Verilen Ekstrelerin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan soya fasulyesi tohumları Cukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Çalışma materyali üzerinde fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarının yürütülebilmesi amacıyla toplanan soya fasulyesi aşamalı olarak ekstraksiyona tabii tutuldu.

n-Hekzan Ekstrenin Hazırlanması

Soya fasulyesi (100 g) üç defa 1000 ml n-hekzan ile oda sıcaklığında 48 saat ara ara çalkalanmak suretiyle ekstre edildi. Birleştirilen n-hekzanlı ekstreler alçak basınç altında, rotavaporda 40 °C sıcaklıkta yoğunlaştırıldı ve vakumlu desikatörde alçak basınç altında kurutuldu (n-Hekzan ekstresi verim: %17,2).

Etil asetat Ekstresinin Hazırlanması

n-hekzan ile ekstre edildikten sonra kalan bakiye üç defa 1000 ml etil asetat ile oda ısısında 48 saat süre ile manyetik karıştırıcı vasıtasıyla ekstre edildi. Birleştirilen etil asetatlı ekstreler alçak basınç altında, rotavaporda 40 °C sıcaklıkta yoğunlaştırıldı ve vakumlu desikatörde alçak basınç altında kurutuldu (Etil asetat ekstresi verim: %21,8).

Etanollü Ekstrenin Hazırlanması

Etil asetat ile ekstre edildikten sonra kalan bakiye 1000 ml %0,1 asetik asit içeren %70'lik etanol ile oda sıcaklığında 48 saat boyunca çalkalanarak 4 defa ekstre edildi. Birleştirilen etanollü ekstreler alçak basınç altında, rotavaporda 40 °C sıcaklıkta yoğunlaştırıldı ve vakumlu desikatörde alçak basınç altında kurutuldu (Etanol ekstresi verim: %48,9) (Carrao-Panizzi et al. 2002).

2.4. HPLC ile Miktar Tayini

Hekzan, etil asetat ve etanol ekstrelerinin yapılan ince tabaka kromatografisi (İTK) analizinde hekzan ve etil asetat ekstresinin herhangi bir izoflavon içermediği, etanol ekstresinin ise yoğun bir şekilde izoflavon içerdiği tespit edilmiştir. Bu bilgi ışığında etanol ekstresinin reproduktif sisteme etkileri olabileceği düşüncesi ile etanol ekstresi üzerinden HPLC tekniğinin yürütülmesine karar verilmiştir.

Bu amaçla; 30 g toz edilmiş numune % 0,1 asetik asit içeren %70'lik etanolde 2 gün boyunca masere edildi. Etanollü ekstre süzöldükten sonra rotavaporda alçak basınç altında 40°C'de yoğunlaştırıldı. Standart olarak kullanılan daidzein (EC 207-635-4, 25 mg) ve genistein (EC Number 207-174-9, 25 mg) Sigma-Aldrich Chemicals'dan temin edildi. HPLC için uygun analitik solvanlar kullanıldı. İzoflavon stok solösyonları 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı.

Ekstrenin temel bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan HPLC şartları aşağıda belirtildiği şekildedir.

Tablo 1. KROMATOĞRAFİ ŞARTLARI

Cihaz:	Varian Modular Analytical HPLC Systems
HPLC Kolon:	C18 column (5 Mikro, 250 mm; 4,6 mm)
Kolon Fırın Sıcaklığı □ı:	40°C
Mobil Faz:	%0,2 formik asit (Mobil faz A) asetonitril (Mobil faz B)
Akış Hızı:	0,6 ml/min
Dedektör:	Photo Diode Array Dedektör (PDA)
Dalga Boyu:	254 nm

3. 5. Deney grupları

Ratlar 8 ayrı gruba ayrıldı ve her grupta 8 hayvan olacak şekilde sınıflandırıldı.

Grup A: Negatif kontrol grubu (herhangi bir madde/solvan uygulanmayan grup).

Grup B: Pozitif kontrol grubu (numunelerin deney hayvanlarına uygulanabilmesi için ekstre süspansiyonunda kullanılacak olan %0,5'lik CMC çözeltisi= Karboksimetil selüloz).

Grup C: 100 mg/kg dozda n-Hekzan ekstresinin uygulandığı grup

Grup D: 200 mg/kg dozda n-Hekzan ekstresinin uygulandığı grup

Grup E: 100 mg/kg dozda etil asetat ekstresinin uygulandığı grup

Grup F: 200 mg/kg dozda etil asetat ekstresinin uygulandığı grup

Grup G: 100 mg/kg dozda etanollü ekstrenin uygulandığı grup

Grup H: 200 mg/kg dozda etanollü ekstrenin uygulandığı grup

2.6. Deney

2.6.1. Deneysel Prosedür

Ratlara 1 ay boyunca her gün kendi gruplarına ait dozajda soya ekstresi gavaj yolu ile verildi. Her günlük doz 1ml hacminde, soya yoğunluğu 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozunda olacak şekilde verildi. Gavaj uygulaması her gün 15:00- 17:00 saatleri arasında yapıldı.

Deneyin 20. gününden itibaren hayvanların östrus siklusları vajinal smear yolu ile belirlendi ve Myers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi diöstrus döneminde olan hayvanlar belirlendi. Deneyin son günü (30. gün) tekrar smear bakılarak diöstrus dönemindeki hayvanlar genel anestezi altında servikal dislokasyon yolu ile ötenazi edilerek organ numuneleri çıkarıldı. Bu dönemde olmayan hayvanların diöstrusa girmesi beklendi (Myers et al. 2004).

2.6.2. Siklusların Belirlenmesi

Ratlar puberte başlangıcından yaşlılığa kadar siklik aktivite gösteren ve mevsime bağlı olmayan poliöstrik hayvanlardır (Oba ve ark. 2001; Solberg, 2004; Yılmaz ve ark. 2006). Rat östrus siklusu ortalama 4-5 gün sürer. Östrus siklusu 4 dönemi kapsar. Bunlar proöstrus, östrus, metaöstrus, diöstrusdur. Corpus luteum en yüksek büyüklüğüne erken diöstrus döneminde ulaşır ve en yüksek progesteron düzeylerine de östrus siklusunun 2. gününde ulaşılır. Ratlarda reproduktif performansı artırma amaçlı olarak östrus döneminin saptanması için bir çok yöntem mevcuttur. Bu yöntemler arasında davranışsal değişikliklerin gözlenmesi ve bu araştırmada kullanılan vaginal sitolojik bakı ve vaginanın elektrik iletkenliğinin ölçülmesi sayılabilir. Östrus 9-15 saat sürmektedir ve dişide hareket artışı, baş ve sırta vurunca kulakların titremesi, pelvik stimülasyon sonrası lordozis hareketi görülmektedir (Mülazımoğlu ve ark. 2011).

Mevcut araştırmada sikluslar günlük vajinal smearlar alınarak belirlendi. Çalışmada hayvanlara etkili bir saptama için vaginal sitolojik örneklemeyi gün içinde aynı saatte ve hayvanları mümkün olduğunca irrite etmeden alındı. Literatüre bağlı kalarak proöstrus, östrus ve metaöstrus, diöstrus olmak üzere 4 farklı menstrual evre belirlendi (Yılmaz ve ark. 2006; Mülazımoğlu ve ark. 2011). Smear alınırken rat sırt üstü yatar pozisyonda, kafası aşağıya gelecek şekilde tutularak, kuyruk ve kuyruk kökünden tespit edildi. Vajina %0,2'lik serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra pastör pipeti ile smear alındı, lama yayıldı ve kuruması beklendi. Smear uygulamaları 12 saatte bir yapıldı ve ardından mikroskopta histopatolojik değişimler değerlendirildi. Diöstrus döneminde olan ratlar tespit edildi. Belirlenen sikluslar her hayvanın ayrı olmak üzere hergün aynı saatte kayıt altına alındı. Hayvanların smear takiplerinde düzenli östrus siklusuna sahip olup olmadığını tespit etmek için smear işlemlerine başlamadan 1 hafta önce düzenli smear alınmaya başlandı.

Proöstrus: Düzgün nukleuslu, tek veya gruplar oluşturmuş epitel hücreleri mevcuttur ve yaklaşık 12 saat sürer. Bu dönemde özellikle prepubertal ratlarda uterus sıvı ile doludur (Solberg, 2004; Tapısız ve Özat, 2009; Mülazımoğlu ve ark. 2011).

Östrus: Yüzlerce büyük kornifiye dejenere nükleuslu hücreler mevcuttur. Östrus başlangıcında smearda kornifiye olmuş hücreler artış gösterir. Lökositler bu dönemde görülebilir. Östrus esnasında vaginal duvar kuru ve vulva ödemlidir. (Solberg, 2004; Tapısız ve Özat, 2009; Mülazımoğlu ve ark. 2011).

Metaöstrus: Bu dönem ovulasyondan sonra görülür ve yaklaşık 21 saat sürer. Bir çok lökosit ve çok az kornifiye hücre mevcuttur. Metaöstrus ve diöstrusta vagina duvarı nemlidir (Solberg, 2004; Tapısız ve Özat, 2009; Mülazımoğlu ve ark. 2011).

Diöstrus: Diöstrus en uzun dönemdir yaklaşık 57 saat sürer. İpliksi mukus ile karışık lökositler, birkaç nükleuslu epitel hücresi mevcuttur (Solberg, 2004; Tapısız ve Özat, 2009; Mülazımoğlu ve ark. 2011).

2.6.3. Ratların Diseksiyonu

Diöstrus fazında olduğu belirlenen bütün ratların diseksiyon öncesi vücut ağırlıkları tartıldı ve kayıt altında tutuldu. Ratlara 50 mg/kg Ketamin HCL ve 10 mg/kg Ksilazin HCL intramuskuler (IM) olacak şekilde anesteziye alındı (Tapısız ve Özat, 2009; Erdem ve ark. 2014). Servikal dislokasyon ile sakrifiye edilerek bilateral uterus ve ovaryumları çıkarıldı. Çıkarılan organ ağırlıkları kayıt altına alındı.



Şekil 1. Bilateral uterus ve ovaryum diseksiyonu.

2.7. Dokuların Takibi ve Dokuların Saklanması

Gruplara uygun dönemde (diöstrus) alınan ovaryum doku örnekleri %10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

Doku Takibi Prosedürü

HCHO (Formaldehit)	1 saat
% 70'lik alkol	2 saat
% 96'lık alkol	1 saat
% 96'lık alkol	1,5 saat
% 99'luk alkol	1 saat
% 99'luk alkol	1 saat
% 99'luk alkol	1,5 saat
Xylene	1 saat
Xylene	1 saat
Xylene	1,5 saat
Parafin	2 saat
Parafin	2 saat

2.8. Ovaryumlardan Kesit Alma İşlemleri

Sağ ve sol ovaryumlar rutin histolojik doku takip işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü ve parafin blokları hazırlandı.



Şekil 2. Parafine gömülmüş kesit alma işlemine hazır bir doku örneği.

Parafin bloğundan rotary mikrotomla 40 µm kalınlığında kesitler alındı. Bir hayvandan ortalama 10 kesit olacak şekilde kesitler arasında rastgele bir tanesinden başlanarak ve onun ardından gelen her 5. kesit ve yanına yedeği alınarak sistematik ve rastgele bir şekilde 1/5 oranında örnekleme yapıldı. Elde edilen tüm kesitler sırayla numaralandırıldı ve jelatinli lama çekilerek kuruması beklendi. Kuruduktan sonra lamalar 60 derece ısıda bir gün etüvde bekletildi. Kesitler deparafinize edildi. Ovaryumların en iyi şekilde görüntülenebildiği boyama şekli olan Giemsa boyama işlemine tabi tutuldu. Lamalar Entellan (Merck) aracılığıyla lamelle kapatıldı. Stereolojik ölçümde ise optik disektör metodu kullanıldı. Boyalı kesitlerin değerlendirilmesinde fotoğraf ataşmanlı Olympus BH-2 (KHW10X/20L) ışık mikroskopunda follikül sayımı için kullanıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı.



Şekil 3. Sayımda kullanılan fotoğraf ataşmanı ilave edilmiş mikroskop (Olympus BH2- Japon).

2.9. HİSTOLOJİK ÇALIŞMALAR

2.9.1. Ovaryumların Boyanma İşlemleri

Ovaryum dokularının (bağ dokusu), primordial foliküller, primer ve sekonder foliküller Giemsa boyama yöntemi ile boyandı.

2.9.2. Parafin işlemi

2.9.2.1. Parafinin Uzaklaştırılması İşlemi

Xylene 15 dk

Xylene 15 dk

% 99'luk alkol 5 dk

% 99'luk alkol 5 dk

% 99'luk alkol 5 dk

% 96'lık alkol 5 dk

%96'lık alkol 5 dk

% 96'lık alkol 5 dk

%70'lik alkol 2,5 dk

%70'lik alkol 2,5 dk

Distile suda 2 dk

Giemsa boyası 7 dk

Çeşme suyunda 5 dk

Distile su (100 ml) + 3-4 damla asetik asit 10 dk

Suyun Uzaklaştırılması

% 99'luk alkol 5 dk

Xylene

Xylene üçünde toplamda 5-10 dakika.

Xylene

2.10. Örneklem Şeklinin Belirlenmesi

Stereolojik metotlar kullanılırken, çalışmaya başlamadan önce pilot bir çalışma yapıldı. Çalışmayla sayım esnasında uygulanan adımların uygunluğu araştırıldı. Optik disektör metodu için yapılan pilot çalışma sonucunda 100-200 civarında hücrenin sayılması gerektiğine karar verildi.

Bunun için parafin bloklardan 40 µm kalınlığında kesitler almaya, ovaryumlarda folikül hücreleri sayımı için 4225 µm² alanı olan bir sayım çerçevesi kullanmaya, X ekseninde 110 µm ve Y ekseninde de 110 µm adım aralıkları bırakılmaya karar verildi. Sayımların yüksekliği 11,2 µm olan optik disektör sondası içerisinde gerçekleştirildi. Uygulanan adımlar ve almış olunan bu sonuçlar neticesinde folikül sayımı gerçekleştirildi.

2.11. Mikroskopta stereolojik inceleme



Şekil 4. Boyama sonrası mikroskopta incelenmek üzere hazır lamalar.

Ovaryum dokuları hazırlandıktan sonra primordial, primer ve sekonder folikül sayıları hesaplandı. Hücre sayımı için optik disektör sondaları kullanıldı (Gundersen, 1986; West et al. 1991).

Hücre çekirdeği sayımı mikroskop (Olympus BH2), motorlu tabla (Marzhauser Multicontrol 2000), mikroskoba bağlı CCD kamera (JVC) ve bunlara bağlı olan bir masaüstü bilgisayarı kullanılarak, Cast programı (VisioPharm, Hørsholm, Denmark) aracılığıyla yapıldı. Kesit kalınlıklarının ölçümünde Heidenhain marka mikrokator ND 281 (Traunreut, Germany) kullanıldı.

Disektör sondasının yüksekliği 11,2 µm olarak belirlendi. Sayımda 60x'lik (N.A. 1,4) immersiyon objektifi kullanıldı. Ovaryumlarda primordial, primer ve sekonder folikül sayımı için 4225 µm² alanı olan bir sayım çerçevesi kullanıldı. Ovaryum folikül sınıflamasında Myers et al. (2004) kullandığı sınıflama uygulandı. Adım aralığı olarak da X ekseninde 110 µm ve Y ekseninde de 110 µm adım aralıkları bırakıldı. Örnekleme yapılan alanın fraksiyonu 1/4, sayma noktası alanı 4225 µm², referans alanı 7878 µm², kesit kalınlığı 22,18µm, disektör yüksekliği 11,2 µm olarak belirlendi. Sayım için Cast programı kullanılarak, mikroskoptaki 4x'lik büyütmede bilgisayarın monitörüne yansıyan görüntüdeki ovaryum dokusunun etrafı mouse yardımıyla çizilerek sınırlandırıldı. Daha sonra objektifte ve bilgisayarda 40x'lik büyütme seçeneğine geçildi. Sayım, sınırlandırılmış bu alan içinde sayım çerçevesinin ovaryum folikülleri üzerine rastgele ve sistematik olarak düştüğü bölgelerde gerçekleştirildi.

Ovaryum folikülü bulunduğu bölgelerde dokunun kalınlığı mikrokator yardımıyla ölçüldü. Örneğin doku kalınlığı 20 µm ise üstten 5 µm, alttan 5 µm'lik bir mesafe bırakılarak orta kısımdaki 10 µm'lik yükseklik içerisinde sayım gerçekleştirildi.

2.12. İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen verilere göre gruplara ait istatistiksel hesaplamalar ve grupların ortalama değerleri arasındaki farklılıkların önemliliği için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için "TUKEY" testi uygulandı. İstatistik analizler SPSS 10.00 (Inc., Chicago, II, USA) programı ile yapıldı. $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Fitokimyasal Analiz Sonuçları

Çalışma kapsamında, soya bitkisinden ard arda ekstraksiyon yöntemiyle hekzan, etil asetat ve etanol ekstreleri elde edilmiş ve bu ekstratlar üzerinde biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır. Bundan sonraki aşamada hekzan, etil asetat ve etanol ekstratlarının yapılan ince tabaka kromatografisi (İTK) analizinde hekzan ve etil asetat ekstratlarının herhangi bir izoflavon içermediği, etanol ekstratının ise yoğun bir şekilde izoflavon içerdiği tespit edilmiştir. Bu bilgi ışığında etanol ekstratı üzerinden HPLC çalışmalarının yürütülmesine karar verilmiştir. Yapılan HPLC analizi sonucunda gradient elüsyon uygulanan HPLC sisteminde daidzein ve genistein'in retensiyon zamanları sırasıyla 22,3 ve 25,8 dakika olarak belirlenmiştir. Daidzeinin örnek içindeki konsantrasyonu 3,851 µg/g; genisteinin konsantrasyonu ise 3,127 µg/g olarak tespit edilmiştir.

Relatif ovaryum ağırlığı etanol 200 mg/kg grubunda anlamlı olarak arttığı saptandı ($p<0,05$). Primordial folikül sayısı kontrol, CMC, n-hekzan, etil asetat ve etanol grubunda farklılık göstermedi. Primer folikül sayısında da tüm gruplar arasında farklılık oluşmadığı tespit edildi. Sekonder folikül sayısının etanol 200 mg/kg ve 100 mg/kg gruplarında arttığı, ancak etanol 200 mg/kg grubunda artışın daha fazla olduğu saptandı ($p<0,05$). Etanol grubunda doz bağımlı artış görülmüştür. Ratların deney başlangıcı ve bitişinde canlı ağırlıkları (CA) arasında fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$).

3.2. Histopatolojik Bulgular

3.2.1. Ovaryum ve Uterus Dokusunda Gözlenen Değişimler

Ratların deney sonunda ilk belirlenen ağırlıklarına göre canlı ağırlığını arttırdığı, ancak anlamlı bir fark oluşmadığı belirlendi. Soyanın uterus ve ovaryum ağırlığını arttırdığı belirlendi.

n-hekzan, etil asetat ve etanollü ekstratların 200 mg/kg dozda uygulanan gruplarda vajinal açıklığın belirgin ve erken olduğu gözlemlendi. Uterus dokusu hiperemik görünümde, damarlar belirgin, ödemli ve dilate görünümündeydi.

Endometriumda damarlaşmada artma ve endometriumun lümen epitelyumunda hipertrofi mevcuttu. Epitelyum bazı yerlerde çok katlı hale geldiği görüldü. Ovaryum dokusunun da damarlı ve hiperemik şekli dikkat çekiciydi. Primordial, primer folikül yapılarında anormallik gözlenmedi.

Ovaryumlardaki folliküller incelendiğinde primordial folikül sayısının diğer folikül sayılarına (primer, sekonder) oranla fazla olduğu belirlendi. Primordial folikül sayıları en küçük ve en çok olanıydı. Folikül büyüdükçe folikül sayılarının azaldığı literatürle uyumlu olduğu gözlemlendi. Primordial folikül sayısı gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmadı. Ancak sekonder follikül çapında küçülme ve sekonder folikül sayısının etanol ekstresi verilen grupta sayıca arttığı ve bunun da anlamlı bir fark yarattığı belirlendi. Corpus luteum yapıları ve ovaryumların interstisyel dokusu normal olarak izlendi.

3.3. Optik Disektör Yöntemi Kullanılarak Primordial, Primer, Sekonder Folikül Sayılarının Hesaplanması

3.4. Stereolojik Analiz

Optik disektör yöntemi kullanılarak foliküllerin sayısı hesaplanmadan önce foliküllerin kesit kalınlığı belirlendi. Aşağıdaki formüle göre her ovaryumda primordial ve primer folikül sayıları hesaplandı.

$$N = 1/F_{ssf} \times 1/F_{hsf} \times 1/F_{asf} \times \sum Q^{-}$$

F_{ssf} kesitlerin örnekleme oranı (1/5), F_{hsf} örnekleme fraksiyonunun yüksekliğidir (11,2 μm). Ortalama kesit kalınlığı disektörün yüksekliğine bölünür. F_{asf} , örnek fraksiyonun alanıdır (x-y adım uzunlukları çarpılır ve çerçeve uzunluğuna bölünür: [110 μm x 110 μm] / 4225 μm^2 ve $\sum Q^{-}$, primordial ve primer folikül sayılarının toplamıdır (West et al. 1991).

Tablo 2. Ratların deney öncesi ve sonrası canlı ağırlıkları (g)

Gruplar	CA Başlangıç (g)	CA Bitiş (g)
	MEANS ±SE	MEANS ±SE
Kontrol	172±3,66	190±3,48
CMC	174±2,87	193±3,41
N-Hekzan 100 mg/kg	174±2,93	190±5,66
N-Hekzan 200 mg/kg	173±2,01	194±3,78
Etil Asetat 100 mg/kg	171±2,08	194±4,83
Etil Asetat 200 mg/kg	174±2,44	192±4,78
Etanol 200 mg/kg	174±2,39	194±5,04
P değeri	0,974	0,955

CA: Canlı Ağırlık

CMC: Karboksimetil selüloz

Ratların deney öncesi ve sonrası canlı ağırlıkları tüm deney gruplarına bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

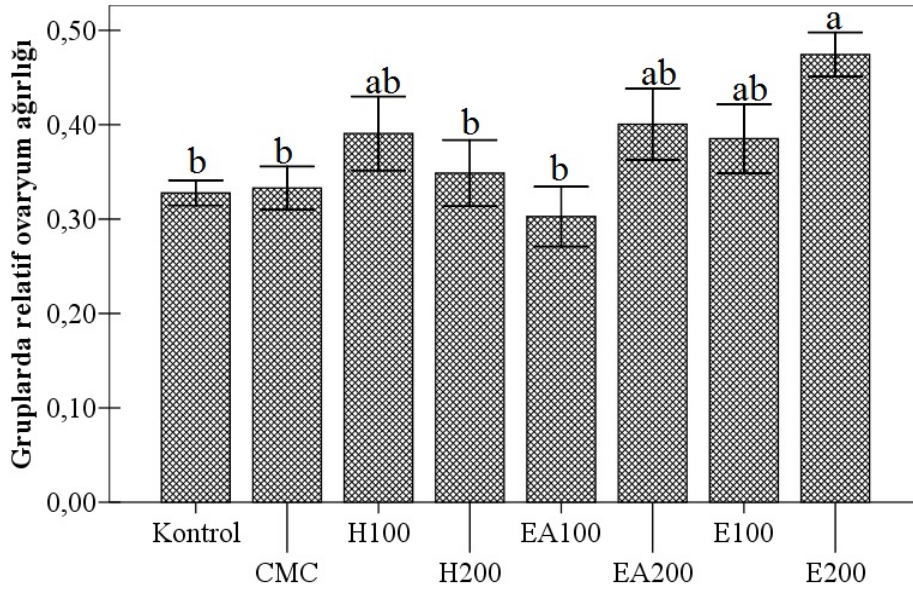
Tablo 3. Ratların Relatif Ovaryum Ağırlıkları (g)

Gruplar	ROA
	MEANS ±SE
Kontrol	0,327±0,01 ^b
CMC	0,332±0,022 ^b
N-Hekzan 100 mg/kg	0,390±0,039 ^{ab}
N-Hekzan 200 mg/kg	0,348±0,038 ^b
Etil Asetat 100 mg/kg	0,302±0,031 ^b
Etil Asetat 200 mg/kg	0,400±0,037 ^{ab}
Etanol 100 mg/kg	0,385±0,036 ^{ab}
Etanol 200 mg/kg	0,474±0,023 ^a
P değeri	0,006

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir.

ROA: Relatif Ovaryum Ağırlığı

Relatif ovaryum ağırlığı etanol 200 mg/kg grubunda anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0,05$). Diğer gruplarda anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi.



Şekil 5. Gruplarda relatif ovaryum ağırlığı.

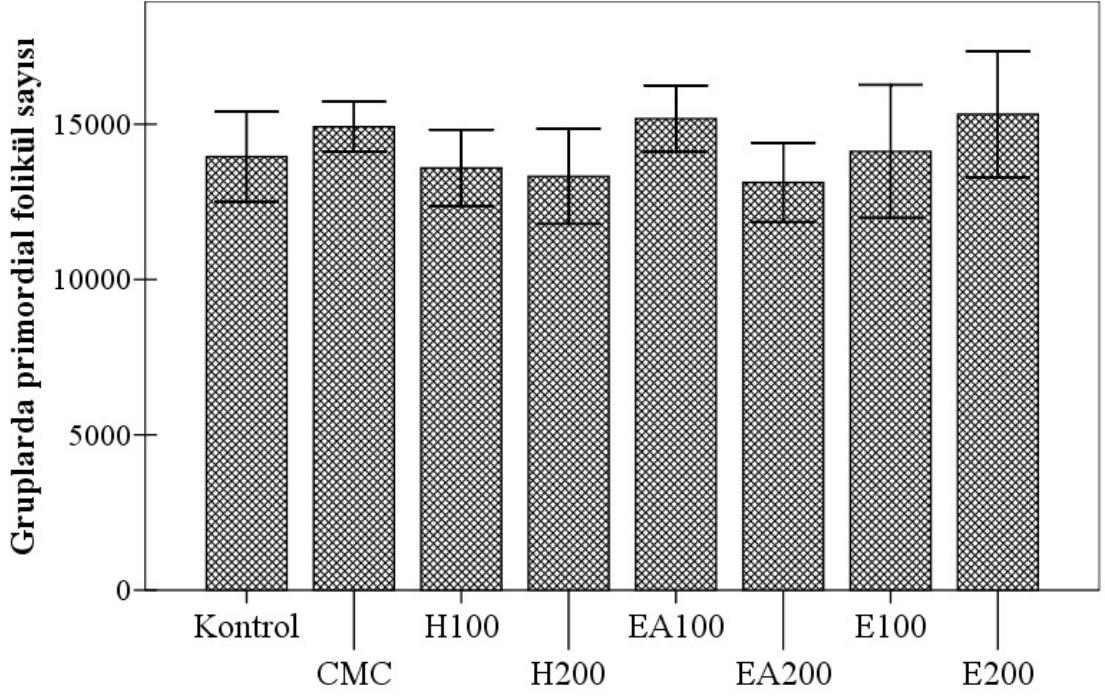
Ratların relatif ovaryum ağırlığı etanol 200 mg/kg grubunda anlamlı olarak artış gösterdiği saptandı ($p < 0,05$). Kontrol ve CMC gruplarında herhangi bir fark oluşmadığı ve yine n-hekzan 200 ve 100, etil asetat 200 ve 100, etanol 100 mg/kg grubunda da anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Tablo 4. Gruplarda primordial folikül sayıları.

Gruplar	PMFS
	Means \pm SE
Kontrol	13954 \pm 1447
CMC	14917 \pm 806
N-Hekzan 100mg/kg	13589 \pm 1233
N-Hekzan 200mg/kg	13322 \pm 1533
Etil Asetat 100mg/kg	15179 \pm 1068
Etil Asetat 200 mg/kg	13125 \pm 1278
Etanol 100mg/kg	14123 \pm 2142
Etanol 200mg/kg	15320 \pm 2023
P değeri	0,940

PMFS: Primordial Folikül Sayısı

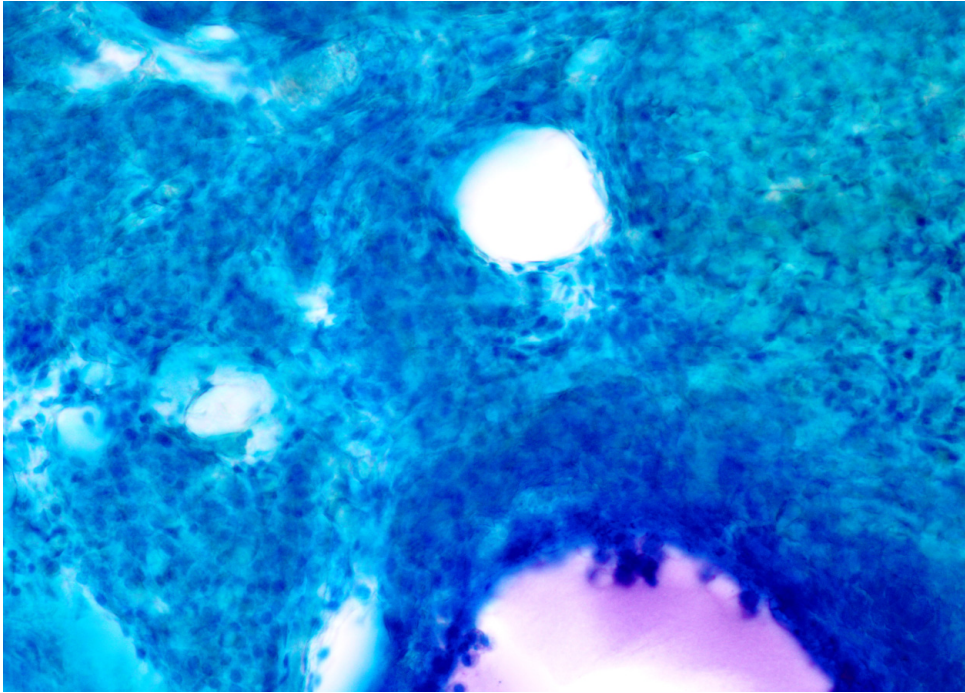
Primordial folikül sayıları kontrol grubu ile kıyaslandığında, CMC, hekzan, etil asetat ve etanol verilen gruplar arasında farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$).



Şekil 6. Gruplarda Primordial Folikül Sayıları.

Kontrol: Negatif kontrol grubu (herhangi bir madde/solvan uygulanmayan grup); **CMC:** Pozitif kontrol grubu (numunelerin deney hayvanlarına uygulanabilmesi için ekstre süspansiyonunda kullanılacak olan %0,5'lik CMC çözeltisi); **H100:** N-Hekzan 100mg/kg; **H200:** N-Hekzan 200 mg/k; **EA100:** Etil Asetat 100 mg/kg; **EA 200;** Etil Asetat 200 mg/kg; **E100:** Etanol 100 mg/kg; **E200:** Etanol 200 mg/kg

Gruplar arasında primordial folikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



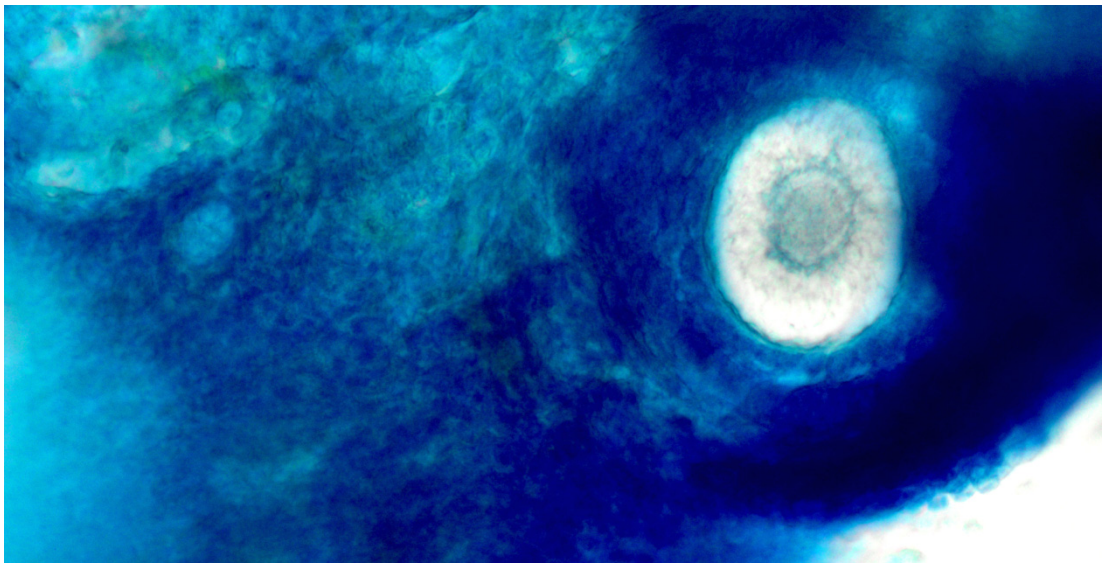
Şekil 7. Etil Asetat 100 mg/kg grubu 3. deneye ait primordial folikül görüntüsü (Giemsa Boyama)

Tablo 5. Gruplarda Primer Folikül Sayıları

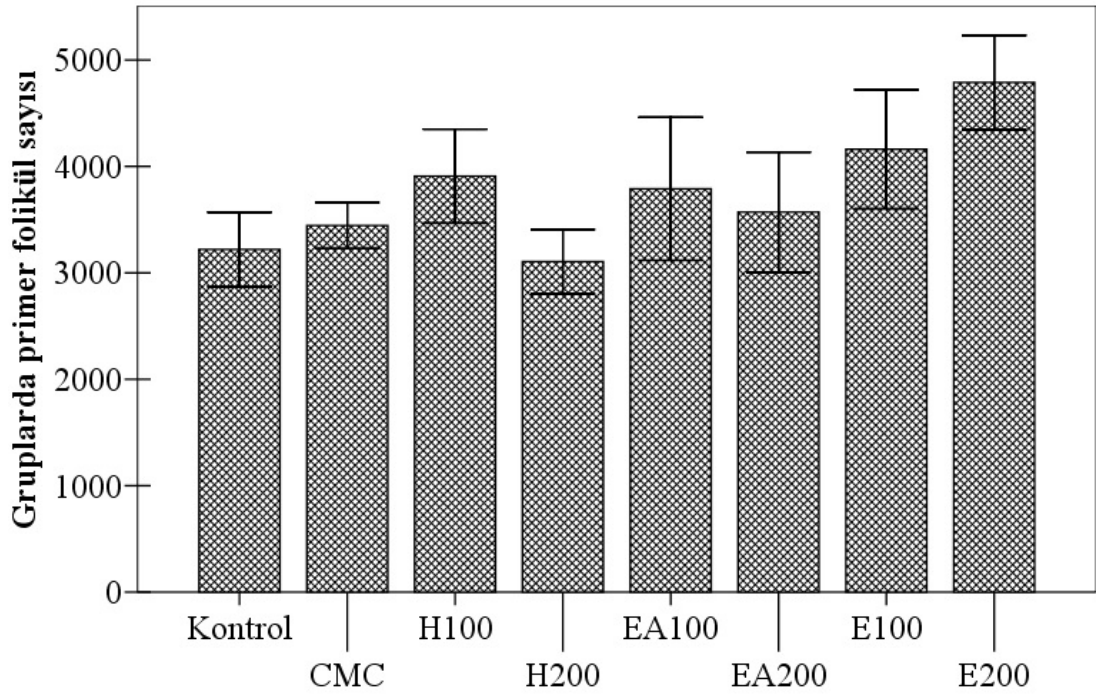
Gruplar	PFS
	Means \pm SE
Kontrol	3219 \pm 349,7
CMC	3444 \pm 216,3
N-Hekzan 100mg/kg	3908 \pm 441,0
N-Hekzan 200 mg/kg	3105 \pm 302,0
Etil Asetat 100 mg/kg	3789 \pm 672,0
Etil Asetat 200mg/kg	3570 \pm 563,9
Etanol 100mg/kg	4161 \pm 559,5
Etanol 200mg/kg	4789 \pm 442,4
P değeri	0,139

PFS: Primer Folikül Sayısı

Primer folikül sayıları gruplar arasında farklılıklar göstermezken, primordial folikül sayılarına oranla primer folikül sayılarının azaldığı belirlendi. Primer folikül sayısı etanol grubunda, özellikle de etanol 200 grubunda fazla olduğu belirlenmesine rağmen değerler istatistiki olarak bir fark oluşturmadı ($p>0,05$).



Şekil 8. Etanol 100 mg/kg grubu 2. deneğe ait primer folikül görüntüsü (Giemsa Boyama)



Şekil 9. Gruplarda Primer Folikül Sayıları.

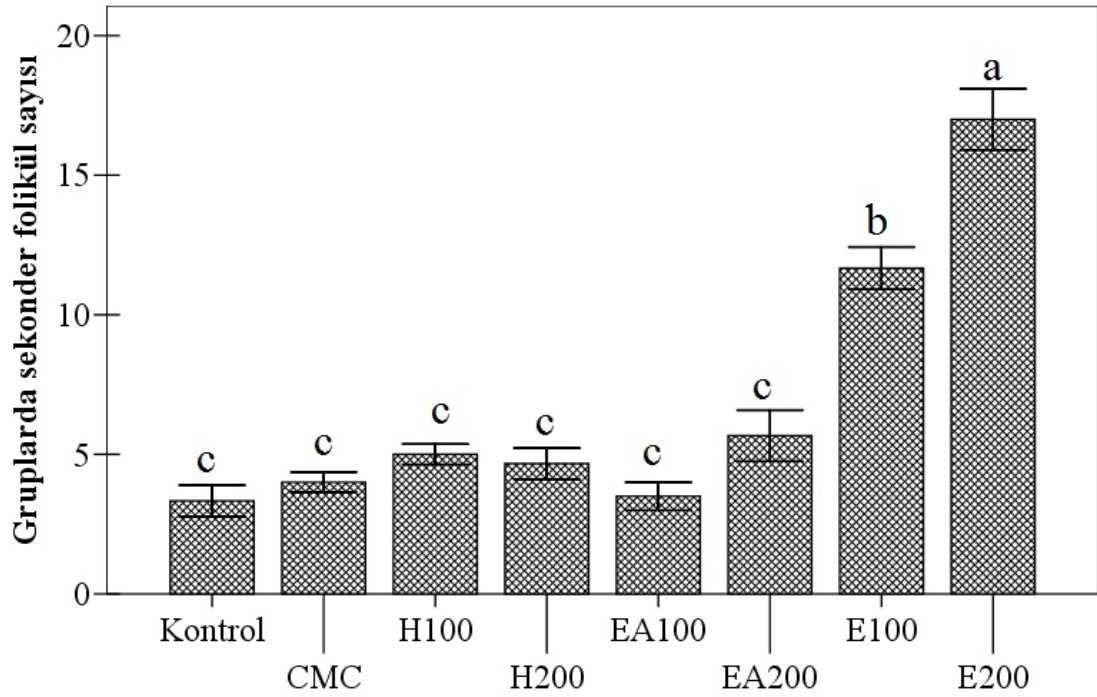
Kontrol: Negatif kontrol grubu (herhangi bir madde/solvan uygulanmayan grup); **CMC:** Pozitif kontrol grubu (numunelerin deney hayvanlarına uygulanabilmesi için ekstre süspansiyonunda kullanılacak olan %0,5'lik CMC çözeltisi); **H100:** N-Hekzan 100mg/kg; **H200:** N-Hekzan 200 mg/k; **EA100:** Etil Asetat 100 mg/kg; **EA 200;** Etil Asetat 200 mg/kg; **E100:** Etanol 100 mg/kg; **E200:** Etanol 200 mg/kg

Tablo 6. Gruplarda Sekonder Folikül Sayıları

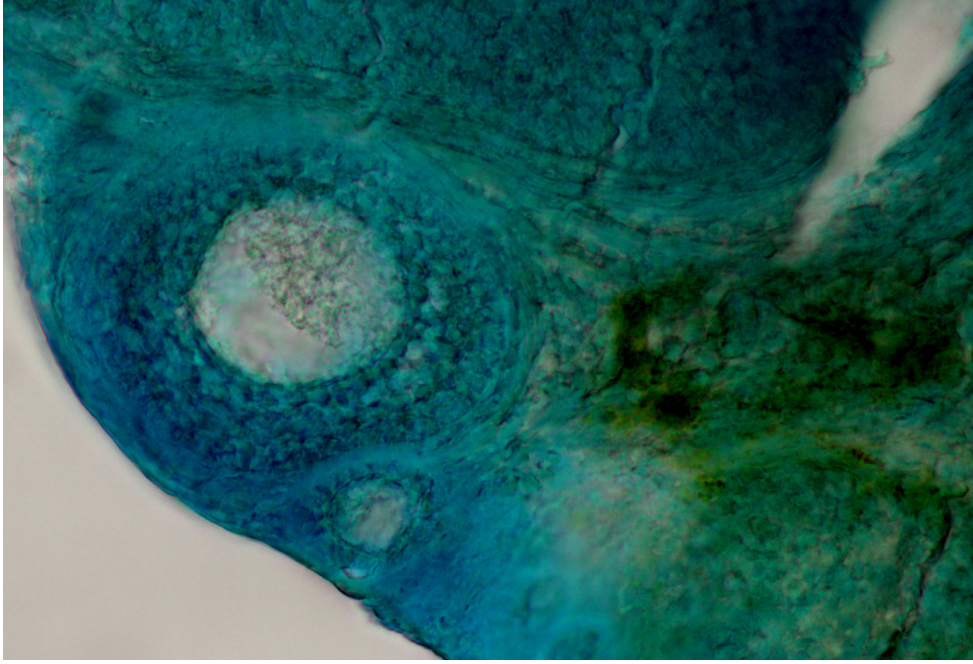
Gruplar	SFS
	Means \pm SE
Kontrol	3,33 \pm 0,55 ^c
CMC	4,00 \pm 0,37 ^c
N-Hekzan 100mg/kg	5,00 \pm 0,36 ^c
N-Hekzan 200mg/kg	4,66 \pm 0,55 ^c
Etil Asetat 100mg/kg	3,50 \pm 0,50 ^c
Etil Asetat 200mg/kg	5,66 \pm 0,91 ^c
Etanol 100mg/kg	11,66 \pm 0,76 ^b
Etanol 200mg/kg	17,00 \pm 1,09 ^a
P değeri	0,000

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir.
SFS: Sekonder folikül sayısı

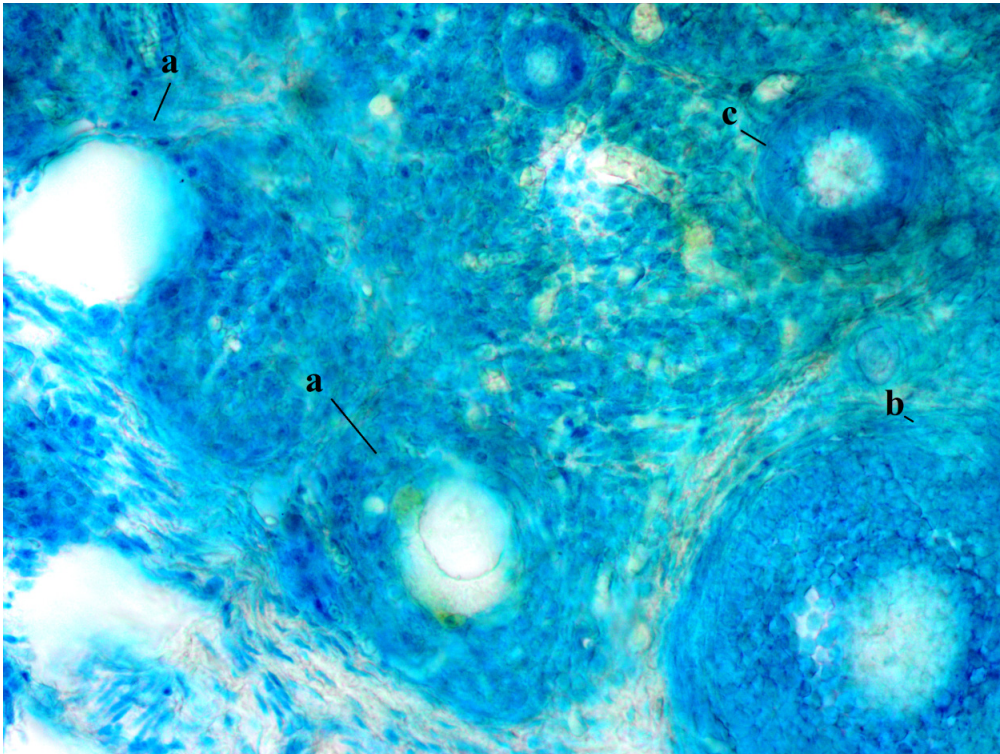
Sekonder folikül sayısı gruplar arasında farklılık göstermiştir. Sekonder folikül sayısı kontrol, CMC, etil asetat ve hekzan gruplarına göre etanol verilen grupta özellikle de etanol 200 mg/kg ekstre verilen grupta anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Etanol ekstresinin doz bağımlı olarak folikül sayısında artışa neden olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 10. Gruplarda Sekonder Folikül Sayıları.



Şekil 11. Etanol 200 mg/kg grubuna ait 3. deneğin sekonder folikül görüntüsü (Giemsa Boyama)



Şekil 12. Kontrol grubu 2. deneğe ait a: primordial folikül, b: primer folikül c: sekonder folikül görüntüsü (Giemsa Boyama).

4. TARTIŞMA

Soya yüksek protein içeriğinden dolayı binlerce yıldır et yerine kullanılan canlı yaşamı için paha biçilmez bir besin kaynağıdır (Anaç ve Ertürk, 2003; Modaresi et al. 2011). Bu özelliği sayesinde hayvan besleme alanında da kendine geniş bir yer bulmuştur. Soyanın içeriğinde östrojenik/antiöstrojenik etkiye sahip izoflavonlar bulunmaktadır ve bunlardan genistein endokrin bozucular sınıfında yer almaktadır (Hong et al. 2006; Yeşilkaya, 2008). Başta insan sağlığı olmak üzere hayvanlarda da infertiliteye kadar gidebilen problemlere yol açma potansiyeli göz önüne alınarak gerçekleştirilen bu çalışmada dişi genital sistem üzerine soyanın etkileri araştırılmıştır.

Yapılan literatür çalışmalarında içerdiği fitoöstrojenler sebebiyle soyanın üreme sistemi üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu bildiren çok sayıda literatür vardır (Sharaf, 1969; Goncharova et al. 1997; Awoniyi et al. 1998; Gallo et al. 1999; Jung et al. 2004; Lee et al. 2004; Erlandsson et al. 2005; Gorski et al. 2006; Rimoldi et al. 2007; Brasil et al. 2009; Dinsdale ve Ward, 2010; Jefferson, 2010; El din et al. 2011; Modaresi et al. 2011; Abbasoğlu, 2010; Cederroth et al. 2012; Jefferson et al. 2012). Soya ürünlerinin içerdiği diyetle seksüel siklusun değiştiği, implantasyon sonrasında embriyonik ölümün arttığı, yaşamın 14. gününden itibaren vücut ağırlıklarının azaldığı ve sonuç olarak da soyanın fazla tüketiminin üreme fonksiyonlarını azalttığı belirlenmiştir (Delclos et al. 2001; Goncharova et al. 1997). Benzer şekilde çalışmamızda 200 mg/kg verilen gruplarda soyanın üreme organları olan ovaryumlara ve uterusu olumsuz etkilerinin olduğu, siklusu etkilediği ve üreme fonksiyonlarını bozabileceği tespit edildi. Yapılan başka bir çalışmada ise fitoöstrojenlerin üreme fonksiyonlarında bozulmaya neden olabileceği belirlenmiştir (Awoniyi et al. 1998).

Litvinova ve Federchenko (1994), tarafından yapılan bir çalışmada, farklı soya, bezelye ya da akdiken yağı, ayçiçeği tohumundan elde edilen yağların ratlarda östrus siklusunda fertilitateye etkisi araştırılmış ve ovaryum görevinin ve aktivitesinin soya ile inhibe edildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmadan hareketle araştırmamızda soyanın dişi üreme organları üzerindeki etkisi steorolojik yöntemle çalışılmıştır. Çalışmamızda soya tüketiminin siklusu öne çektiği, diöstrus döneminde belirgin epitelyum boyunda azalma olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda toz edilmiş soya bitkisinden farklı polaritelerde ekstreler hazırlanmış ve biyolojik aktivite deneylerinde kullanılmıştır. Yapılan İTK analizinde uygulanan ekstreler arasında etanollü ekstrede izoflavon varlığı tespit edilirken diğer ekstrelerde buna rastlanmamıştır. Bundan sonraki aşamada HPLC tekniği kullanılarak etanol ekstresinde izoflavon miktar tayini yapılmıştır.

Stereoloji güncel bir yöntem olması ve daha doğru sonuçlara ulaşmayı sağlaması açısından değerlendirildiğinde bugüne kadar pek çok tür canlının doku ve organında kullanılmıştır. Stereoloji, insanlar da ve köpeklerde fetal dönemde testis hacmini belirlemede (Malas ve ark. 1999; Akosman ve Özdemir, 2010), ratlarda ovaryum morfolojisini değerlendirmede kullanılmıştır (Yoldan ve Yüce 2005; Rıstic et al. 2007; Kaplan Parıltı, 2011; Medigovic et al. 2012; Çölçimen, 2013). Yapılan araştırmalarda ovaryum dokusunda stereolojik çalışmanın zorluklarına değinilmiştir ve bu nedenle ovaryumda yapılan çalışma sayısı sınırlıdır (Myers et al. 2004). Çalışmamızı ovaryum ve uterus üzerinde gerçekleştirerek ovaryum ve uterus morfolojisini değerlendirdik ve stereolojik olarak folikül sayılarını hesapladık.

Ovaryumlarda folikül sayımını fiziksel disektör kullanarak yapan çalışmalar mevcuttur (Ünal ve ark. 2002; Myers et al. 2004; Ristic et al. 2007, Medigovic et al. 2012). Optik disektör yöntemi ovaryumda folikül sayımında daha az çalışmada kullanılmıştır (Myers et al. 2004; Evirgen, 2012; Hansen ve ark. 2012). Stereolojik yöntemlerden optik disektör, fiziksel disektörle kıyaslandığında daha yeni kullanılan ve fiziksel disektöre göre daha avantajlı bir yöntemdir. Bu çalışmada da ovaryumlardaki folikül sayıları optik disektör yöntemi ile sayıldı. Myers ve ark. (2004) yaptığı çalışmada, foliküllerde kübik hücrelerin hakim olması durumunda foliküllerin primer folikül olarak sınıflandırılması gerektiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kübik ve skuamoz granuloza hücrelerinin ara sıra bir arada bulunduğu tespit edilmiş ve bahsi geçen literatüre bağlı kalarak foliküler sınıflandırma yapılmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada, etanol ekstresinin 200 mg/kg dozda uterus, ovaryum ve relatif ovaryum ağırlıklarını anlamlı olarak arttırdığı, vajinal açıklığın belirgin ve daha erken oluştuğu ve yine bu gruplarda uterusu ödem oluştuğu diğer gruplarda ise herhangi bir fark oluşmadığı belirlenmiştir. Gallo ve ark. (1999), tarafından yapılan bir çalışmada, soya ekstresi verilen dişi ratlarda vajinal açıklığın daha erken meydana

geldiği belirlenirken, yüksek doz soya verilen dişilerde ağırlıkta artış, uterusu ödem, endotelyal hiperplazi gibi etkiler gözlenmiştir (Gallo ve ark. 1999). Nagao ve ark. (2001), tarafından yapılan bir başka çalışmada ise genistein'in üreme fonksiyonları üzerine etkileri araştırılmış ve relatif organ ağırlıklarının dişi ve erkek rat grubunda kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. Çalışmamızda relatif ovaryum ağırlıkları kontrol grubuna göre özellikle de etanol 200 mg/kg verilen grupta anlamlı olarak artış göstermiştir. Sharaf (1969), tarafından yapılan bir çalışmada ise nohut, salatalık, yer fıstığı gibi östrojen içerikli yağların uterus ağırlıkları üzerindeki etkileri değerlendirilmiş relatif organ ağırlıklarının dişi ve erkek rat grubunda kontrol grubuna göre azaldığını, uterusu ağırlık artışı, prolapsus, motor aktivisinde artma, infertilite, distosi gibi değişimler olduğunu belirtmiştir. Başka bir çalışmada fitoöstrojen içeriği bilinen coumestrol'un ratlarda uterotopik etkili olduğu ve uterus ağırlığını arttırdığı belirlenmiştir (Whitten et al. 1992). Sevilmış (2008), yaptığı çalışmada 100mg/kg subkutan genistein enjekte edilen farelerde uterus ağırlığı ve epitelyum hücre sayısının arttığını, ilginç bir şekilde daidzeinin fare uterusu üzerinde ölçülebilir bir östrojenik etki yaratmadığını ve uterusu da benzer değişimler olmadığını bildirmiştir.

Çalışmamızda ışık mikroskopunda, proöstrusta değişim gözlenmezken, diöstrus döneminde belirgin epitelyum boyunda azalma olduğu gözlenmiştir. Ratlarda siklus boyunca uterusun değişiminin değerlendirildiği bir araştırmada; proöstrusta uterus epitelyum boyunun uzadığı, girinti ve çıkıntıların azaldığı, metaöstrusta epitelyum boyunun azaldığı ve sitoplazmanın yoğunlaştığı, diöstrusta ise metaöstrusta izlenen yapısal değişimlerin arttığı bildirilmiştir (Turhan ve ark. 2008) . Mevcut çalışmada ise etanol (200 mg/kg) ekstresi verilen gruplarda proöstrusta bir değişim gözlenmezken, diöstrusta epitelyum boyunda belirgin bir azalma olduğu tespit edildi.

Yapılan bir çalışmada soya yağı diyetinde ratlarda embriyonik ölümlerin arttığı, abortusa neden olduğu ve siklus süresinin değiştiği ve ovaryumlardaki corpus luteum sayısının azaldığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada ovaryum folikülogenezisin baskılandığı ve implantasyona engel olduğu da belirtilmiştir (Litvinova ve Federchenko, 1994). Diğer bir çalışmada ise en yüksek dozda verilen soya grubunda ratlarda anormal ovaryen foliküller ve vajinada anormal hücrel maturasyon gözlenmiştir (Delclos ve ark. 2001). Çalışmamızda etanol ekstreleri verilen

gruplarda alınan vajinal smear örnekleri sonucu (12 saatte bir alınan) siklus süresinde değişime neden olduğu (östrusu öne çekerek) belirlendi. Mikroskopta yapılan ovaryum ve uterus değerlendirmeleri sonucu corpus luteumda değişim izlenmemesine rağmen folikül hücrelerinin atrofik yapıya sahip olduğu, ovaryum dokusunun damarlı ve hiperemik olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda etanol 200mg/kg verilen grupta primordial ve primer folikülden sekonder foliküle geçişi hızlandırdığı ve siklusu aktive ettiği de tespit edilmiştir. Ratlarda bu durumun puberta öncesi dönem olmasının kızgınlığı öne çekebileceği ve soyanın üreme sistemine olumsuz etkileri olabileceği tarafımızdan belirlenmiştir.

Hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar normal dozlarda izoflavonların endometriyumu etkilediğini fakat anomaliye neden olmadığını bildirmiştir (Abbasoğlu, 2010). Bu doz ratlarda 5-10mg olarak belirlenmiştir (Abbasoğlu, 2010). Yüksek dozda (1000 µg/g) fitoöstrojen alımının ise uterus endometriyumunda dejeneratif etkilere neden olduğu ve endometriyumun geç sekretuar evreye daha erken girmesini sağlayarak fertilitiyi etkileyebileceği düşünülmüştür (Abbasoğlu, 2010). Bunun yanında 3-6 kat daha yüksek dozlardaki izoflavonun, ratlarda uterus büyümesini arttırdığı belirlenmiştir (Erlandsson ve ark. 2005; Abbasoğlu, 2010). Bu nedenle izoflavonların güvenlik sınırları çok geniş değildir. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada genisteinin östrojen içeriğinden dolayı uterus parametrelerini inhibe edici etkisinin olduğu belirlenmiştir (Erlandsson ve ark. 2005). Bu bulgulara paralel olarak çalışmada soyanın 200mg/kg dozda uygulanan n-hekzan, etil asetat ve etanol ekstraktlarının uterus hiperemik, damarları belirgin, ödemli ve dilate, corpus luteum ve intertisyel dokunun normal, endometriyumda damarlanmada artma, endometrium lümen epitelyumunda hipertrofiye neden olduğu tespit edildi. Verilen soya ekstresinin dozuna bağlı (200mg/kg) olarak olumsuz etkilerin gözlemlendiği belirlendi.

Çelik ve ark. (2005), tarafından yapılan çalışmada, ratta tek ve multidozda metotreksat (dış gebeliğin tedavisinde ve özellikle de meme kanserinde kullanılan ilaç) verilerek ovaryum folikül rezervi değerlendirildiği araştırmada; primordial, primer, sekonder, perantral, antral, atretik folikülleri saymış ve corpus luteumu değerlendirmiştir. Primordial, primer, sekonder, perantral, antral, atretik foliküller, corpus luteum sayılarında anlamlı değişiklik saptanmamıştır. Grupların hiçbirinde ilaç uygulaması sonrası siklus düzensizliğine rastlanmazken, ovaryum kisti oluşumunda anlamlı artışlar tespit etmişlerdir. Evirgen (2012) yaptığı çalışmada,

ratlarda kontrollü ovaryum hipersitümlasyonunun genital organlara etkilerini araştırırken primordial ve primer folikülleri saymıştır. Kontrol grubunda yaşlı ratlarda primordial ve büyümeyen foliküller genç ratlara oranla daha az olduğu tespit edilmiştir. Primer folikül sayılarının genç ve yaşlılarda aralıksız iki kez tekrar edilen kontrollü ovaryum hiperstimülasyonunun uygulaması ile en fazla sayıda olduğu belirtilmiştir. Yaşlı ve genç ratlarda kontrollü ovaryum hiperstimülasyon uygulamasının muhtemelen folikül hasarına bağlı olarak gelişmekte olan primer folikül sayılarında azalma oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. Yoldan ve Yüce (2005), tarafından yapılan çalışmada, ovaryumda folikül sayımı yapılmıştır. Siklofosfamidin artan dozları ile primordial foliküller arasında anlamlı bir ters ilişki olduğu belirtilmiştir. Kaplan Parıltı (2011), yaptığı çalışmada diklofenak sodyumun gebe sıçanlarda ovaryum primordial folikül sayısına etkisine bakmış ve çalışmamıza benzer şekilde primordial folikül sayısının değişmediğini gözlemişlerdir. Başka bir çalışmada immatür ratlarda kısa süreli genisteine maruz kalmanın ovaryum foliküllerine etkilerini araştırılmıştır. Genisteinin östrojen gibi davranıp davranmadığını belirlemek için 17 α -etinilestradiol etkileriyle karşılaştırılmıştır. Genisteinin ovaryum ve overyan stroma hacimlerini arttırdığı belirlenmiştir. Çalışmada primordial, primer, sekonder folikül sayısını azaltırken; atretik folikül sayısının arttığı bildirilmiştir. Genisteinin bir östrojen antagonisti olarak görev yaptığı ve foliküllerin başlangıç fazına inhibitör etkisi olduğu diğer yandan da genisteinin bir östrojen agonisti olduğu preantralden antrale geçen folikül sayısını arttırdığı belirlenmiştir (Medigovic ve ark. 2012). Başka bir çalışmada ise oofektomi yapılan kadınlarda, menstrual siklus belirlemesi ile folikül sınıflaması yapılarak, antral, primordial ve primer folikül sayıları hesaplanmıştır. Primordial ve atrofik folikül sayılarının azaldığı ve gruplar arasında da önemli bir farklılık yarattığı belirtilmiştir (Hansen ve ark. 2012). Yapılan bu çalışmanın aksine çalışmamızda primordial folikül sayılarında bir farklılık olmadığı belirlendi. Etanol ekstresi grubunun daidzein ve genistein içeriğinin fazla olması, bu grupta primordial folikül sayısının fazla olması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda etanollü ekstre uygulanan ratların primordial, primer ve sekonder foliküllerin diğer ekstre grupları ve kontrol grubuna göre fazla olduğu ancak değerlerdeki bu artışın primordial ve primer folikül sayısında istatistiksel açıdan bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir. Diğer yandan literatürde de primordial foliküllerin, foliküller içerisinde en küçük ve en fazla sayıda olduğu bildirilmiştir (Kuyucu, 2011).

Literatürde belirtildiği şekilde primordial foliküle oranla primer ve sekonder folikül sayısında azalma olduğu, sekonder folikül sayısının belirtilen grupta fazla olduğu (primordial ve primerden az) ancak sekonder folikülün çapında küçülme olduğu tarafımızdan tespit edilmiştir.

Fitoöstrojenlerin uterusu ağırlık artışını, östrus döngüsünün düzenlenmesini, östrojen reseptörü pozitif olan hücrelerin büyümesini uyardığı bildirilmiştir (Whitten et al. 1992; Jefferson, 2012; Abbasoğlu, 2010). Awoniyi ve ark. (1998), dişi ratları gebeliklerinin 17. günden başlayarak doğumdan sonra 21. güne kadar kontrol rat yemi ve genisteinle karıştırılmış yem (yaklaşık 50 mikrog/d) olmak üzere iki farklı grup şeklinde beslemişlerdir. Kontrol grubundaki ratlara oranla genisteine maruz kalan ratlarda, 21. günde ovaryumların ve uterusun ağırlığı önemli ölçüde azaldığı, genistein verilen dişi ve erkek ratlarda, en yüksek dozda verilen grupta yavruların doğum ağırlığının baskılandığı, vücut ağırlıklarının azaldığı belirtilmiştir. Çalışmamızda uterus-over ağırlığında artış olduğu, canlı ağırlık başlangıç ve bitiş grupları arasında istatistiksel bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Yukarıda sunulan birçok çalışmada denek sayısının ve verilen grup sayısının az olduğu, stereolojik değerlendirmede optik disektör yerine fiziksel disektör kullanımının yaygın olduğu tespit edilmiştir. Stereolojik değerlendirmelerde ovaryum değerlendirmesinin sıkıntıları bilindiği için (Myers ve ark. 2004) deneylerin daha çok testis ya da diğer dokular ve organlar üzerinde yapıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada her grupta 8 hayvan olmak üzere 8 grup oluşturulmuş ve çeşitli polaritelerde ekstrelerin ve aktif çıkan ekstrede HPLC tekniği kullanılarak izoflavonların miktar tayini yapılmıştır. Foliküllerin stereolojik değerlendirmesinde optik disektör kullanımı ise çalışmamıza ayrı bir değer ve önem katmaktadır.

5. SONUÇ

Soya insan yaşamında oldukça değerli fitokimyasallar açısından zengin bir bitkidir. Yüksek protein içeriği nedeniyle Asya ülkelerinde binlerce yıldır et yerine kullanılan bir gıda ürünüdür. Ayrıca fitokimyasal içeriği nedeni ile de pek çok ilacın bileşimine girmesi açısından soya oldukça önemli bir bitkidir. Asrın harika bitkisi olarak kabul edilen soyaya talep, nüfus artışına paralel olarak artmaktadır.

Soyayı tüketim süresinin de alınan miktarı kadar önemli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Soya ve soya içeren gıdaların tüketimi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda sağlıklı ve güvenilir dozlarda alınması Food and Drug Administration (Gıda ve ilaç İdaresi), The American Heart Association (Amerikan Kalp Derneği) ve diğer sağlık organizasyonları tarafından tavsiye edilmektedir. Sağlıklı yetişkin bir bireyin ideal bir diyet için günlük yaklaşık 10-25 g soya proteini tüketmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Tüketilen soya miktarına göre yarar zarar ilişkisi hakkında yapılan çalışmalarda, gebelikte uterusun genisteine maruz kalması sonucu, doz bağımlı olarak göğüs tümörü insidansının arttığı gözlenmiştir. Pediatri grubunda ise izoflavonların en iyi kaynağı olarak gösterilen soyanın günlük miktarı yaşamın ilk haftalarında 24,8 mg, 4 aydan 1 yaşına kadar da 41,0 mg'a kadar artabileceği belirtilmiştir. Sonuç olarak soya alımının, infantlarda da güvenli ve etkili doz alımı ile normal gelişim ve büyüme için alternatif olacağı belirtilirken yüksek oranda soya tüketen infantlarda olumsuz etkiler olabileceği bildirilmiştir (Hasler, 2004). Bu bilgiler ışığında gebelikte soya tüketiminden kaçınılması gerektiği, yetişkin dönemde ise fazla miktarda soya tüketilmesinin üreme sistemini olumsuz etkileyebileceği, bebek mamalarının kullanımında dikkatli olunması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Son yıllarda güncellik kazanan ve günümüzde de yapılan bilimsel araştırmalar sayesinde, oldukça ön plana çıkan en önemli fitoöstrojenler ise soyada bulunan izoflavonlardır. Endokrin sistemi bozan kimyasallar (Endocrine Disrupting Chemicals-EDCs) olarak tanımlanan, endokrin bozucular sınıfında yer alan ve soyada bulunan genistein, östrojenik etkiye sahip bir maddedir ve üreme sisteminde bazı patolojilere sebep olabileceği vurgulanmaktadır. Ayrıca hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar da uzun süre soya ağırlıklı beslenmenin kısırlıktan yavru atmaya

ve verim azalmasına kadar giden problemler oluşturduğunu savunmaktadır. Çalışmamızda da doz artışına bağlı ovaryum ve uterustaki değişimlerin üreme fonksiyonlarında değişikliğe neden olabileceği belirlenmiştir.

Günümüzde görülme sıklığı gittikçe artan, kadınlarda menstrual siklus düzensizlikleri, kız çocuklarının erken pubertaya erişmesi ve çeşitli hormonal düzensizlikler sonucu oluşan genital sistem hastalıkları göz önüne alındığında soya gibi içeriğinde endokrin bozucuların bulunduğu gıda maddelerinin tüketiminde daha bilinçli olunması gerektiği düşünülmektedir.

ÖZET

SOYA (*Glycine max* L.)' NİN DİŞİ RATLARDA REPRODÜKTİF SİSTEME ETKİLERİNİN STEREOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada sadece hayvan beslenmesinde değil insan gıdalarında da çeşitli formlarda kendine yer bulan soya bitkisinin dişi genital sistem üzerine etkileri araştırıldı.

Çalışmanın ilk aşamasında, Türkiye'de yetişen *Glycine max* L. bitkisi üzerinde biyolojik aktivite taraması tayini amacıyla n-hekzan, etil asetat ve etanollü ekstraler hazırlanarak ratlara oral yolla 100mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda 1 ay süreyle verildi.

Deney süresinin sonunda ratların menstrual siklusu hergün vajina smear yöntemiyle takip edilerek diöstrus safhasında olan ratlar ötenazi edildi.

Deney sonucunda ratlardan alınan genital sistem organları stereolojik metotlar kullanılarak incelendi. Stereolojik olarak optik disektör metodu ile ovaryumda folikül sayımı yapılırken ovaryum ve uterusun ağırlıkları da ölçülerek değerlendirmeye alındı.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda başta etanollü ekstre grubu olmak üzere 200 mg/kg dozda soya ekstreleri verilen ratların genital sisteminde bazı değişikliklerin olduğu saptandı. Bahsi geçen gruplarda önemli bir canlı ağırlık artışı olmazken vajinal açıklığın, relatif ovaryum ve uterus ağırlığının arttığı, epitelyum hücrelerinin irileştiği, uterusun hiperemik görünümde olduğu, sekonder folikül sayısı artarken sekonder folikül çaplarında küçülme olduğu tespit edilmiştir. Hazırlanan ekstraler üzerinde laboratuvar çalışmaları yapıldıktan sonra, ince tabaka kromatografisinde izoflavon içeriği yoğun olduğu belirlenen ekstre üzerinden izoflavon miktar tayini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği kullanılarak yapıldı.

Elde edilen bulgular ışığında soya bitkisinin içeriğindeki fitoöstrojenlerin dişi genital sistemi üzerine etkilerinin olduğu ve bu etkinin doza bağlı olarak değişebileceği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Fitoöstrojen, *Glycine max* L., rat, reproduktif sistem, stereoloji.

SUMMARY

Stereological Investigations of the Effects of Soybean (*Glycine max* L.) on the Reproductive System of Female Rat

In the present study the effects on the female genital system of soybean which can be found in various forms not only in animal nutrition but also human food have been investigated. For this purpose, the extracts of soya plant which were prepared with *n*-hexane, ethyl acetate and ethanol were given to rats orally at 100 and 200 mg/kg doses for 1 month. At the end of the experimental period, the rats which were at the stage of diestrus determined by monitoring the menstrual cycle with vaginal smear method, were euthanized. The genital system organs taken from rats were analyzed by using stereological methods. Follicule was counted with the optical dissector method in the ovary as Stereological and the weights of ovaries and uterus were also evaluated. At the end of the evaluations it was determined that some changes occurred in the genital system of the rats which were given at 200 mg/kg dose of soy extract, especially the ethanol extract. In the test groups vaginal aperture increased and uterine appeared like hyperemia while significant weight increase did not occur. In addition, the weight of relative ovarium and uterus weight increased and coarsening of epithelial cells was observed. It was identified that diameter of seconder follicule reduced while the number of seconder follicule increased. The amount of isoflavone content was determined by using high pressure liquid chromatography (HPLC) technique on the extract which was determined to have the highest isoflavone content by thin layer chromatography. In the light of the findings of the present study, phytoestrogens in the soya plant were found to have effects on the female genital system and this effect may change according to dose.

Key Words: Phytoestrogen, *Glycine max* L., Rats, Reproductive System, Stereology.

7. KAYNAKLAR

ABBASOĞLU TOPA, E. G. (2010) Fitoöstrojenlerin Uterus Endometriyumuna Olan Etkileri. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.

AKÇABAY, Ç. (2010) Ivf- Icsı-Et Sikluslarında Luteal faz Desteği İçin Verilen Progesteron ve Progesteron+ Östradiolün Gebelik Oranlarına Etkisi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi.

AKDEMİR, F. (2008) Bildircinlarda Rasyona İlave Edilen Genisteinin Yumurta Verimi ile Yumurta Sarısı Genistein, Daidzein ve Lipit Peroksidasyon Düzeyleri Üzerine Etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı. Doktora Tezi.

AKOSMAN, M. S., ÖZDEMİR, V. (2010) Köpek Testislerinde Hacim Hesaplaması İçin Cavalieri Metodu Uygulanabilirliği. *Eurasian J Vet. Sci.* **26(2)**: 63-67.

ALBERT, A., ALTABRE, C., BARO, F., BUENDIA, E., CABERO, A., CANELO, M. J., CASTELO-BRANCO, C., CHANTRE, P., DURAN, M., HAYA, J., IMBERT, P., JULIA, D., LANCHARES, J. L., LLANEZA, P., MANUBENS, M., MINANO, A., QUEREDA, F., RIBES, C., VAZQUEZ, F. (2002) Efficacy and Safety of a Phytoestrogen Preparation Derived from *Glycine max* (L.) Merr in Climacteric Symptomatology A Multicentric, Open, Prospective and Non-Randomized Trial Phytomedicine. **9(2)**: 85-92.

ALLRED, C., ALLRED, K., JU, Y., VIRANT, S., HELFERICH, W. (2001) Soy Diets Containing Varying Amounts of Genistein Stimulate Growth of Estrogen-Dependent(MCF-7) Tumors in a Dose-Dependent Manner. *Cancer Research.* **61**: 5045-5050.

ANAÇ, H., ERTÜRK, Y. E. (2003) Soya Fasulyesi. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü. T.E.A.E.- BAKIŞ. **2(6)**. ISSN:1303-8346.

ANTHONY, M., CLARKSON, T., HUGHES, C., MORGAN, T., BURKE, G. (1996) Soybean Isoflavones Improve Cardiovascular Risk Factors Without Affecting the Reproductive System of Peripubertal Rhesus Monkeys. *Journal of Nutrition*. **126**: 43-50.

ARJMANDI, B., ALEKEL, L., HOLLIS, B., AMIN, D., STACEWICZSA PUNTZAKIS, M., GUO, P., KUKREJA, S. (1996) Dietary Soybean Protein Prevents Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. *In the Journal of Nutrition*. **126**: 161-167.

AWONIYI, CA., ROBERTS, D., VEERAMACHANENI, DN., HURST, BS., TUCKER, KE., SCHLAFF, WD. (1998) Reproductive Sequelae İn Female Rats After in Utero and Neonatal Exposure to the Phytoestrogen Genistein. *Fertil Steril*. **70(3)**: 440-447.

AYAŞAN, T. (2011) Soya Sıladı ve Hayvan Beslenmede Kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **8 (3)**; 193-200.

AYDIN, H. (2007) Kedi ve Köpek Mamalarındaki Soya ve Soyalı Ürünlerin Klinik Farmakoloji ve Toksikoloji Yönünden Değerlendirilmesi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **33(2)**: 51-59.

BACHA, W., BACHA, L. (1990) Color Atlas of Veterinary Histology. Second Edition. BALADO, d. (ed.) First Edition.

BAHR, JM., NAKAI, M., RIVERA, A., WALSH, J., EVANS, GL., LOTINUN , S., TURNER, RT., BLACK, M., JEFFERY, EH. (2005) Dietary Soy Protein and Isoflavones: Minimal Benefical Effects on bone and No Effect on the Reproductive Tract of Sexually Mature Ovariectomized Sprague-Dawley Rats. *Menopause*. **12(2)**: 165-173.

BANKS, W. (1993) Applied Veterinary Histology. Third Edition. Texas Veterinary Center. Reinhardt(ed.) Mosby. ISBN:0- 8016-6610-4.

BAŞER, K. H. C. (2002) Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildirisi. ISBN: 975-94077-2-8.

BAYRAKTAROĞLU, A. G. (2012) Deneklerin Histolojik Özellikleri Bunların Deneysel Çalışmalarda Sınırlayıcı Yönleri. *Journal of Clinical Analytical Medicine*. sy. 33-38.

BAYRAM, G. (2008) Miad Yenidoğan Sıçanlarda Oluşturulan Hipoksik İskemik Ensefalopati Modelinde İntraperitoneal Olarak Uygulanan Fenitoinin Beyin Hasarına Etkisi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi.

BRASIL, F. B., SOARES, L. L., FARIA, T. S., BOAVENTURA, G. T., SAMPAIO, F. J., RAMOS, C. F. (2009) The Impact of Dietary Organic and Transgenic Soy on The Reproductive System of Female Adult Rat. *Reproductive Biology*. **292(4)**: 587-594.

BURAK, M., ÇİMEN, Y. (1999) Flavonidler ve Antioksidan Özellikleri. T. Klin. Tıp Bilimleri. **19**: 296-304.

BÜYÜKTUNCER, Z., BAŞARAN, A. (2005) Fitoöstrojenler ve Sağlıklı Yaşamdaki Önemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. **25 (2)**: 79-94.

BYUN, J., LEE, S. (2010) Effect of Soybeans and Sword Beans on Bone Metabolism in a Rat Model of Osteoporosis. *Ann Nutrition & Metabolism*. **56**: 106-112.

CARRAO-PANIZZI, M., PEDROSO, S., KIKUCHI, A. (2002) Extraction Time for Soybean Isoflavone Determination. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **45: 4**. ISSN 1516-8913.

CEDERROTH, CR., NEF, S. (2009) Soy. Phytoestrogens and Metabolism: A Review. *Mol Cell Endocrinol*. **25: 304 (1-2)**: 30-42.

CEDERROTH, C., ZIMMERMANN, C., NEF, S. (2012) Soy. Phytoestrogens and Their Impact on Reproductive Health. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **355(2)**: 192-200.

CHEN, A., ROGAN, W. (2004) Isoflavones in Soy Infant Formula: A Review of Evidence for Endocrine and Other Activity in Infants. *Annu. Rev. Nutr*. **24**: 33-54.

ÇELİK, H., ATILGAN, R., AKPOLAT, N., GÜRATES, B., HANAY, F., KARAOĞLU, A. (2005) Tek ve Multidoz Methotrexate Uygulamalarına Bağlı Overyan Histopatolojik Değişimler ve Folikül Gelişimi Üzerine Etkileri. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi*. **8(1)**: 14-18.

ÇOLAKOĞLU, S. (2006) Boyun Omurlarının(C3-C7) Gövde Hacimlerinin Stereolojik Yöntemlerle Hesaplanması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Anatomi Anabilim Dalı. Doktora Tezi.

ÇÖLÇİMEN, N. (2013) Gebe Sıçanlara Uygulanan Prostaglandin Sentez İnhibitörü Diklofenak Sodyumun Postnatal Ovaryum Morfometrisine Etkilerinin Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi.

DELCLOS, KB., BUCCI, TJ., LOMAX, LG., LATENDRESSE, JR., WARBRITTON, A., WEIS, C. C., NEWBOLD, RR. (2001) Effects of Dietary Genistein Exposure During Development on Male and Female CD (Sprague-Dawley) Rats. *Reproductive Toxicology*. **15(6)**: 647-663.

DELLMANN, H., EURELL, J. (1998) Textbook of Veterinary Histology. PRIEDKALNS, J., LEISER, R. Female Reproductive System. CANN, C.(ed) Lippincott Williams&Wilkins. Fifth Edition.

DINSDALE, E., WARD, W. (2010) Early Exposure to Soy Isoflavones and Effects on Reproductive Health: A Review of Human and Animal Studies. *Nutrients*. **2**: 1156-1187.

DIEL, P., SMOLNIKAR, K., SCHULZ,T., LESCHOWSKI, U., MICHNA, H., VOLLMER, G. (2001) Phytoestrogens and carcinogenesis- differential Effects of Genistein in Experimental Models of Normal and Malignant Rat Endometrium. *Human Reproduction*. **16(5)**: 997-1006.

DOĞAN, G., BİRCAN, R. (2009) Bitkisel Yem Hammaddelerinde Bulunan Antibesleyici Faktörler ve Balıklar Üzerine Etkileri. *Journal of Fisheries Sciences*. **3(4)**: 323-332.

DURSUN, N. (2008) Veteriner Anatomi II. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı. Medisan Yayınevi. Ankara. ISBN 975-7774-09-X.

EKİNCİ, S. (2009) Genistein'in Bildircin (*Coturnix Coturnix*) Testisi Üzerine Kısa Süreli Etkileri. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

EL DIN, S., BALTA, H., ELAZIM, A., EL FATTAH, A. N. (2011) Effect of Soybean on Fertility of Male and Female Albino Rats. *Journal of American Science*. **7(6)**: 872-883.

ERDEM, MK., YURDAKAN, G., YILMAZ – SİPAHİ, E. (2014) The Effects of Ketamine, Midazolam and Ketamine/xylazine on Acute Lung Injury Induced by α -Naphthylthiourea in Rats. *Adv Clin Exp Med*. 2014 May-Jun; **23(3)**: 343-51.

ERLANDSSON, MC., ISLANDER, U., MOVERARE, S., OHLSSON, C., CARLSTEN, H. (2005) Estrogenic Agonism and Antagonism of the Soy Isoflavone Genistein in Uterus, Bone and Lymphopoiesis in Mice. *APMIS*. **113**: 317-323.

EVİRGEN, O. (2012) Genç ve Yaşlı Ratlarda Tekrarlayan Kontrollü Ovaryum Hiperstimulasyon Tedavisinin Genital ve Endokrin Sistem Organları Üzerindeki Etkisinin Morfometrik Olarak İncelenmesi. Ankara Üniversitesi. Bilimsel Araştırma Projesi. Proje Numarası: 10B3330027.

FUKUDA, I., TSUTSUI, M., YOSHIDA, T., TODA, T., TSUDA, T., ASHIDA, H. (2011) Oral Toxicological Studies of Black Soybean (*Glycine max*) Hull Extract: Acute Studies in Rats and Mice, and Chronic Studies in Mice. *Food and Chemical Toxicology*. **49(12)**: 3272-78.

GALLO, D., CANTELMO, F., DİSTEFANO, M., FERLINI, C., ZANNONI, GF., RIVA, A., MORAZZONI, P., BOMBARDELLI, E., MANCUSO, S., SCAMBIA, G. (1999) Reproductive Effects of Dietary Soy in Female Wistar Rats. *Food Chem Toxicol*. **37(5)**: 493-502.

GONCHAROVA, E. N., TIMOSHIN, SS., RADIVOZ, MI., KOMOL'YKH, OM. (1997) Effect of Soybean Products on the Reproductive System of Sexually Mature Female Albino Rats. *Vopr Pitan*. **1**: 17-20.

GORSKI, K., TACIAK, M., ROMANOWICZ, K., MISZTALL, T. (2006) Differential Effects of Soy-Containing Diets on the Reproductive Tissues Growth and Reproductive Hormone Secretion in Male Rats. *Reproductive*. **6(3)**: 275-290.

GRANT, G., DORWARD, P. M., BUCHAN, W., ARMOUR, J., PUSZTAI, A. (1995) Consumption of Diets Containing Raw Soya Beans (*Glycine max*), Kidney Beans (*Phaseolus Vulgaris*), Cowpeas (*Vigna Unguiculata*) or Lupin Seeds (*Lupinus Angustifolius*) by Rats for up to 700 days: Effects on Body Composition and Organ Weights. *British Journal of Nutrition*. **73**: 17-29.

GUNDERSEN, HJ. (1986) Stereology of Arbitrary Particles. A Review of Unbiased Number and Size Estimators and the Presentation of Some New Ones, in Memory of William R.Thmpson *J. Microsc.* **143(1)**: 3-45.

HANSEN, KR., CRAIG, LB., ZAVY, MT., KLEIN, NA., SOULES, MR. (2012) Ovarian Primordial and Non-Growing Follicle Counts According to the Stapes of Reproductive Aging Workshop (STRAW) Staging System. *Menopause*. **19(2)**: 164-171.

HASLER, C., MBA, PhD. (2004) Safety of Soy Products. National Safety Associates.

HONG, E., PARK, S., CHOI, K., LEUNG, P., JEUNG, E. (2006) Identification of Estrogen- Regulated Genes by Microarray Analysis of the Uterus of Immature Rats Exposed to Endocrine Disrupting Chemicals. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **4**: 49.

HOŞGÜN, E. (2008) Farklı Yöntemlerle Soya Yağı Ekstraksiyonu ve Karakterizasyonu. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.

İNANÇ, N., TUNA, Ş. (2005) Fitoöstrojenler ve Sağlıkta Etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **2(2)**: 91-95.

JEFFERSON, W. (2010) Adult Ovarian Function Can be Affected by High Levels of Soy. *The Journal of Nutrition*. **140(12)**: 2322-2325.

JEFFERSON, WN., PATISAUL, HB., WILLIAMS, CJ. (2012) Reproductive Consequences of Developmental Phytoestrogen Exposure. *Reproduction*. **143(3)**: 247-260.

JUNG, E. Y., LEE, B., YUN, Y., KANG, J., BAEK, J., YON, J., LEE, Y., SOHN, H., LEE, J.Y., KIM, K., YU, W., DO, C., KIM, Y.C., NAM, S. (2004) Effects of Exposure to Genistein and Estradiol on Reproductive Development in Immature Male Mice Weaned from Dams Adapted to a Soy-based Commercial Diet. *J.Vet. Med. Sci.* **66(11)**: 1347-1354.

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J., KELLEY, R. (1993) Temel Histoloji. Barış Kitabevi. Seventh Edition. İstanbul.

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J., (2006) Temel Histoloji Text & Atlas. Aytekin, Y., Solakoğlu, S. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul.

KAMILOĞLU, N., BEYTUT, E., ÖZSAR, N. (2002) İnsan ve Hayvan Sağlığında Fitoöstrojenlerin Önemi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* **8(2)**: 189-194.

KAPLAN PARILTI, E. (2011) Gebe Sıçanlara Uygulanan Prostaglandin Sentez İnhibitörü Diklofenak Sodyumun Postnatal Ovaryum Morfolojisine Etkilerinin Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.

KARACAN, K. (2008) Çocuklarda Lateral Ventrikül ve Beyin Hacminin MR İnceleme Yöntemi Kullanılarak Stereolojik Metotla Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi.

KAYA, S., YAVUZ, H. (1993) Yem ve Yem Hammaddelerinde Bulunan Olumsuzluk Faktörleri ve Hayvanlara Yönelik Etkileri:1: Organik Nitelikli Olumsuzluk Faktörleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* **40(4)**: 586-614.

KELEŞ, O. (2007) Sıçan Fetüs, Yenidoğan ve Erişkinler Cerebrum Gelişiminin Volumetrik Açından İncelenmesi. (Bir Stereolojik ve Embriyolojik Çalışma) Atatürk Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji& Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

KESHUN, L. (1997) Soybeans, Chapman and Hall, New York, 1-75 pp.

KIM, H. K., DOOLEY, C. N., DELLA-FERA, M. A., YANG, J. Y., ZHANG, W., DUAN, J., HARTZELL, D. L., HAMRICK, M. W., BAILE, C. A (2006) Genistein Decreases Food Intake, Body Weight, and Fat Pad Weight and Causes Adipose Tissue Apoptosis in Ovariectomized Female Mice. *Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions. In the Journal of Nutrition.* **136**: 409-414.

KORKMAZ, A., TÜMKAYA, L. (1997) Estimation of the Section and Optical Disektor Height with a Simple Calibration Method. *Journal of Microscopy.* **187(2)**: 104-109.

KURTULUŞ, A. (2005) Sıçanlarda Elektrik Akımına Bağlı Hipokampal Hasarın Stereolojik Yöntemlerle Değerlendirilmesi. Pamukkale Üniversitesi. Tıp Fakültesi. Adli Tıp Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi.

KUYUCU, Y. (2011) Anti Müllerian Hormon'un Sıçanlarda Folikül Gelişimi Üzerine Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde Değerlendirilmesi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi.

LEE, B., JUNG, E., WON YUN, Y., KANG, J., BAEK, I., YON, J., LEE, Y., SOHN, H., LEE, J., KIM, K., NAM, S. (2004) Effects of Exposure to Genistein During Pubertal Development on the Reproductive System of Male Mice. *Journal of Reproduction and Development.* **50(4)**: 399-409.

LITVINOVA, LB., FEDORCHENKO, TV. (1994) The Effect of Plant Oils on the Female Reproductive System. *Eksp Klin Farmakol.* **57(4)**: 49-51.

MALAS, M. A., GÖKÇİMEN, A., SULAK, O. (1999) Stereoloji Yöntemiyle Fötal Dönemdeki Testis Hacminin Hesaplanması. *T. Klin. Tıp Bilimleri.* **19**: 218-222.

MEDIGOVIC, I., RISTIC, N., TRIFUNOVIC, S., MANOJLOVIC-STOJANOSKI, M., MILOSEVIC, V., ZIKIC, D., NESTOROVIC, N. (2012) Genistein Affects Ovarian Folliculogenesis: A Stereological Study. *Microscopy Research and Technique.* **75(12)**: 1691-1699.

MODARESI, M., MESSRIPOUR, M., KHORAMI, H. (2011) Effect o Soybean on Male Reproductive. Physiology in Mice. *International Conference on Life Science and Technology*. **3**: 15-18.

MÜLAZIMOĞLU, S., İDE, T., ASLAN, S. (2011) Ratlarda Üreme. Journal of Clinical and Analytical Medicine. Ankara Üniversitesi. Veteriner Fakültesi. DOI: 10.4328/JCAM.585.

MYERS, M., BRITT, K.L., WREFORD, NGM., EBLING, F., KERR, JB. (2004) Methods for Quantifying Follicular Numbers Within the Mouse Ovary. *Society for Reproduction and Fertility*. **127**: 569-580.

NACIFF, J., JUMP, M., TORONTALI, S., CARR, G., TIESMAN, J., OVERMANN, G., DASTON, G. (2002) Gene Expression Profile Induced by 17 α -Ethinyl Estradiol, Bisphenol A, and Genistein in the Developing Female Reproductive System of the Rat. *Toxicological Sciences*. **68**: 184-199.

NAGAO, T., YOSHIMURA, S., SAITO, Y., NAKAGOMI, M., USUMI, K., ONO, H. (2001) Reproductive Effects in Male and Female Rats of Neonatal Exposure to Genistein. *Reproductive Toxicology*. **15(4)**: 399-411.

OBA, G., ASLAN, S., KAYMAZ, M. (2001) Gebelik ve Siklus Dönemlerinin Belirlenmesi Amacıyla Ratlarda Vajinal Sitolojinin Kullanılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. **48**: 51-57.

ODACI, E., BAHADIR, A., YILDIRIM, Ş., ŞAHİN, B., CANAN, S., BAŞ, O., BİLGİÇ, S., KAPLAN, S. (2005) Cavalieri Prensibi Kullanılarak Bilgisayarlı Tomografi ve Manyetik Rezonans Görüntüleri Üzerinden Hacim Hesaplaması ve Klinik Kullanımı. *Türkiye Klinikleri J.Med Sci*. **25**: 421-428.

OKWU, W., OKWU, D.E., ORJI, B.O. (2007) Phytochemical Composition and Nutritional Quality of *Glycine max* and *Vigna Unguiculata* L.Walp. *American Journal of Food Technology*. **2(6)**: 512-520.

ÖCAL, C. (2007) Hiperlipidemik Ratlarda Oluşan Kardiyovasküler Hasar Üzerine, Antioksidan Bir Madde Olan Genistein'in Etkileri. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi.

ÖKTEM, Ö., URMAN, B. (2011) Over Hayat Döngüsünü Anlamak. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*. **8(2)**: 71-82.

PATISAUL, H., JEFFERSON, W. (2010) The Pros and Cons of Phytoestrogens. *Neuroendocrinol.* **31(4)**: 400-419.

PIOTROWSKA, K., WOCLAWEK-POTOCKA, I., BAH, M., PISKULA, M., PILAWSKI, W., BOBER, A., SKARZYNSKI, D. (2006) Phytoestrogens and Their Metabolites Inhibit the Sensitivity of the Bovine Corpus Luteum to Luteotropic Factors. *Journal of Reproduction and Development*. **52(1)**: 33-41.

PONNUSHA, B. S., SUBRAMANIYAM, S., PASUPATHI, P., SUBRAMANIYAM, B., VIRUMANDY, R. (2011) Antioksidant and Antimicrobial Properties of *Glycine max*- A Review. *International Journal of Current Biological and Medical Science*. **1(2)**: 49-62.

POTOCKA, I., BAH, M., KORZEKWA, A., PISKULA, M., WICZKOWSKI, W., DEPTA, A., SKARZYNSKI, D. (2005) Soybean- Derived Phytoestrogens Regulate Prostaglandin Secretion in Endometrium During Cattle Estrous Cycle and Early Pregnancy. *Experimental Biology and Medicine*. **230(3)**: 189-199.

RIMOLDI, G., CHRISTOFFEL, J., SEIDLOVA-WUTTKE, D., JARRY, H., WUTTKE, W. (2007) Effects of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus, and Vagina. *Environmental Health Perspectives*. **115 (1)**: 62-68.

RISTIC, N., NESTOROVIC, N., MANOJLOVIC, M., FILIPOVIC, B., SOSIC-JURJEVIC, B., MILOSEVIC, V., SEKULIC, M. (2007) Maternal Dexamethasone Treatment Reduces Ovarian Follicle Number in Neonatal Rat Offspring. *Journal of Microscopy*. **232 (3)**: 549-557.

SANTELL, R., CHANG, Y., NAIR, M., HELFERICH, W. (1997) Dietary Genistein Exerts Estrogenic Effects Upon the Uterus, Mammary Gland and the Hypothalamic/Pituitary Axis in Rats. *In The Journal of Nutrition*. **127**: 263-269.

SETCHELL, K., NECHEMIAS, L., CAI, J. HEUBI, J. (1998) Isoflavone Content of Infant Formulas and the Metabolic Fate of These Phytoestrogens in Early Life. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **68**: 1453-1461.

SETCHELL, K., CASSIDY, A. (1999) Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *In the Journal of Nutrition*. **129**: 758-767.

SEVİLMİŞ, G. (2008) Bazı Fonksiyonel Gıdalarda Tüketici Kararları ve Bunları Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.

SHARAF, A. (1969) Food Plants As a Possible Factor in Fertility Control. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*. **17(2)**: 153-160.

SOLBERG (2004) Examination of Vajinal Smears in the Rat. Laboratory Animal Unit. National Institute of Public Health. <http://oslovet.norecopa.no/teaching/rat/oestrus/> 06.05.2014.

SOSIC-JURJEVIC, B., FILIPOVIC, B., SEKULIC, M. (2011) Soybean Phytoestrogens- Friends or Foes. *Intech. Sy.* 131-174. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/22601.pdf>. 10.05.2014

STARK, A, MADAR, Z. (2002) Phytoestrogens: a review of recent findings. *J Peidatr Endocrinol Metab*. **15**: 561- 572.

STERIO, D. C. (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*. **134(2)**: 127-136.

ŞAHİNGÖZ, S., ARLI, M. (2002) Bireylerin Soya Fasulyesi ve Ürünleri konusundaki Bilgileri, Bu Ürünleri Tanıma ve Tüketim Düzeyleri. *Gazi Üniversitesi Endüstriyel Sanatlar Eğitim Fakültesi Dergisi*. **10**: 57-70.

TAPISIZ, Ö., ÖZAT, M. (2009) Histerektominin Steroidojenik Hormonlar Olan Estradiol, Progesteron ve Testesteron Düzeyleri Üzerine Etkisi: Deneysel Dişi Rat Modeli. *Gazi Tıp Dergisi*. **20(4)**: 163-168.

THAM, D., GARDNER, C., HASKELL, W. (1998) Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **83 (7)**: 2223- 2235.

TURHAN, F., ERDOĞAN, D., TAKE, G., BARDAKÇI, Y. (2008) Electron Microscopic Changes in The Rat Uterus During The Menstrual Cycle. *Gazi Tıp Dergisi*. **19 (3)**: 102-111.

ÜNAL, B., CANAN, S., ASLAN, H., ŞAHİN, B. (2002) Doku Örneklerinin Sayılarının Hesaplanmasında Tarafsız Stereolojik Metotlar: Fiziksel Disektör. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. **22**: 15-24.

ÜNSAL, Ç., SARIYAR, G. (2008) Antiaging İçin Fitoöstrojenler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. **28**: 160-165.

WEI, H., BOWEN, R., CAI, Q., BARNES, S., WANG, Y. (1995) Antioxidant and Antipromotional Effects of the Soybean Isoflavone Genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **208**: 124-130.

WEST, MJ., SLOMIANKA, L., GUNDERSEN, HJG. (1991) Unbiased Stereological Estimation of the Total Number of Neurons in the Subdivisions of the Rat Hippocampus Using the Optical Fractionator. *The Anatomical Record*. **231**: 482-497.

WHITTEN, PL., RUSSEL, E., NAFTOLIN, F. (1992) Effects of a Normal, Human-Concentration, Phytoestrogen. Diet on Rat Uterine Growth. *Steroids*. **57(3)**: 98-106.

W LU, LJ., ANDERSON, K. (1998) Sex and Long-term Soy Diets Affect the Metabolism and Excretion of Soy Isoflavones in Humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. **68**: 1500-1504.

W LU, LJ., ANDERSON, K. E., GRADY, J. (2000) Decreased Ovarian Hormones During a Soya Diet: Implications for Breast Cancer Prevention. *Cancer Research*. **60**: 4112-4121.

XIAO, C. (2008) Health Effects of Soy Protein and Isoflavones in Human. *J.Nutr*. **138(6)**: 1244-1249.

YEŞİLKAYA, E. (2008) Endokrin Bozucular. *Güncel Pediatri Dergisi*. **6(2)**: 76-82.

YOLDAN, A., YÜCE, A. (2005) Siklofosfamid Kemoterapisi Sırasında GnRH Agonist ve Antagonist Uygulamalarının Primordial Foliküler Rezervi Korumadaki Etkinliklerinin Deneysel Olarak Karşılaştırılması. Trakya Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi.

YILDIRIR, A., TOKGÖZOĞLU, L. (2001) Fitoöstrojenler ve Kardiyovasküler Sistem. *Türk Kardiyol Dern. Arş.* **29**: 233-237.

YILMAZ, H. A., EFE, L. (1998) Bazı Soya [*Glycine max* (L.) Merrill] Çeşitlerinin Kahramanmaraş Koşullarında II.Ürün Olarak Yetiştirilebilme Olanakları. *J. of Agriculture and Forestry.* **22**: 135-142.

YILMAZ, O., UÇAR, M., ÇELİK H. (2006) Köpeklerde Ovaryumların Ultrasonografik ve Postoperatif Muayeneleri. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.* **25**; 1-6.

<http://www.haticeolgun.com/soya.asp?ContentCatId=17&ContentId=140> 16.06.2014

OLGUN, H., ERDOĞMUŞ, M., ARSLAN, D. (2008) Soya Bitkisinin Hayvan Beslenmesindeki Yeri ve Önemi. Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü. Samsun.